解説

高速ビジョンを用いた細胞マニピュレーション

Cell Manipulation by Utilizing Online High Speed Vision

金子 真* *大阪大学
Makoto Kaneko* *Osaka University

1. なぜ高速細胞マニピュレーションが重要？

細胞の硬さと疾患との間に密接な相関がある。例えば、糖尿病患者やマラリヤ感染者の赤血球は硬くなることが知られている。細胞の硬さ評価は一般に細胞群として取り扱われるので、個体差の影響を押さえるため、通常統計的処理が行われる。そのためには少なくとも数百個というオーダーの細胞の硬さ計測を行う必要がある。一方で、例えば赤血球の場合、数分単位で硬さが変化してしまうため、硬さを正確に評価しようとする、採血後、速やかに計測を完了する必要がある。赤血球に限らず、万能細胞から2D細胞シート、3D組織、さらには生体組織構築を目指す再生医療[1][2]でも初期の細胞選択の段階で細胞の高速硬さ評価が強く望まれている。高速細胞マニピュレーションに対する強いニーズがあるのはこのような背景による。

2. どうやって高速細胞マニピュレーションを実現？

細胞を培養液中から出してしまうとたちどころに機能が低下してしまうため、通常は培養液中でのマニピュレーションが前提となる。培養液中でのマニピュレーションに着目したとしても、ロボット指を用いる方法[3]、光ピンセットを用いる方法[4]~[6]、マイクロ流路内の流れを制御する方法[7]~[10]等に分類できる。本解説では、ハイスループットが期待できるマイクロ流路内の流れを制御する方法に着目する。マイクロ流路内の細胞を操る方法に大きく二つありの方法がある。一つは一定圧で駆動する受動的方法で、もう一つはアクチュエータを導入して細胞を自由に操る能動的な手法である。いずれの方法においてもハイスループットが期待できる。本解説ではアクチュエータと高速ビジョンの組み込みを前提とする能動的方法を主に説明し、受動的方法については最後に触れる程度にとどめる。

図1 幾何学的運動拘束型細胞マニピュレーション

図2 マイクロアクチュエータとマクロアクチュエータ

3. 高速・高分解能細胞マニピュレーションシステム

筆者らが提案した細胞マニピュレーション法のアイデアのポイントは「操作対象の動きを1Dに拘束したうえで操作をする」である。操作対象の動きを幾何学的に1Dに拘束することにより、マニピュレーションが容易になり、処理速度を飛躍的に向上させることができる。また、自動化が容易となるため、作業者の熟練度に依存しない安定した処理を行うことができる。図1は本アイデアの概念を示している。

高速・高分解能細胞マニピュレーションシステムを構築する上で重要なキーワードが二つ、すなわち高速・高分解能アクチュエータと高速・高分解能センサである。そのいずれか一方が欠けても、高速・高精度細胞マニピュレーションシステムの構築は難しい。

はじめに高速・高分解能アクチュエータについて考えてみよう。マイクロ流路との組み合わせを考えた場合、アクチュエータの選択肢として図2に示すように大きく二つありの方法がある。一つはマイクロ流路内への組み込みを想定するマイクロアクチュエータ方式、もう一つはマイクロ流路外への設置を想定するマクロアクチュエータ方式である。両者とも一長一短ある。マイクロアクチュエータ方式

原稿受付 2014年9月19日

キーワード: High Speed Vision, Cell Manipulation, High Resolution

*〒565-0871 吹田市山田丘2-1

*Suita-shi, Osaka

は、マイクロ流路に組み込むため、アクチュエータの分解能がそのまま細胞の位置決め分解能に反映される。そのため細胞の位置決め分解能という切り口で考えると、高分解能を維持しやすい。これに対し、マクロアクチュエータを用いると、アクチュエータ断面積とマイクロ流路断面積比 A_1/A_2 分細胞の位置決め分解能は低下する。ここで A_1 、 A_2 はそれぞれアクチュエータ側の断面積およびマイクロ流路側の断面積である。このようにマクロアクチュエータ方式には分解能という切り口ではハンディキャップを背負っているにもかかわらず、筆者らは、マクロアクチュエータ方式を採用した。その一番の理由は、経済性、すなわちアクチュエータのリユース機能を重視したかったからである。例えば、細胞がマイクロ流路内で詰まってしまった場合、アクチュエータをチップ内に組み込むマイクロアクチュエータ方式の場合、アクチュエータも同時に不良品になってしまう。しかもアクチュエータを組み込んだチップの製作には多大な時間と費用がかかってしまう。これに対して、マクロアクチュエータ方式の場合、マイクロ流路内に細胞が詰まった場合、アクチュエータと切り離して、マイクロチップのみを不良品として新品に取り替えればよい。このため製作時間、コストを考えると圧倒的に経済的になる。しかもマクロアクチュエータはマイクロアクチュエータと違って、市場で入手しやすいだけでなく信頼性も高い。つまり、位置決め分解能さえクリアできれば、マクロアクチュエータとマイクロ流路の組み合わせのほうが圧倒的にメリットが大きい。ただし断面積比 A_1/A_2 は通常 10^6 のオーダーとなり、マクロアクチュエータの分解能が 1 [nm] としても、マイクロ流路内の細胞の位置決め分解能は 1 [mm] オーダーとなり、位置決め精度を上げる上での大きな障害になる。ところがPDMS（ある種のシリコンゴム）製マイクロ流路は、内圧変動によってチップ内体積が変動する弾性特性を有しており、しかも応答性は数百 Hz オーダーと極めて高い。つまりマイクロ流路内に細胞の動きを遅くする“仮想減速器”が存在していると考えられる。筆者らは、この点に着目し、マクロアクチュエータとマイクロ流路の組み合わせであるにもかかわらず、細胞の高分解能位置決めの実現に成功した [9] [10]。

次に高速センサに目を向けてみよう。高速センサとして使用できる候補として、電気インピーダンスセンサ、高速ビジョンセンサ等が考えられるが、ここでは高速ビジョン方式を採用した。高速ビジョンを採用した一番の理由は必要に応じて細胞の動きがモニタできることを利用したかったからである。つまりマイクロ流路内で細胞がどのような振る舞いをしているのかデータログとして残せる利点に魅かれたわけである。

図 3 は、以上の点を踏まえて、細胞の動きを観察する高速ビジョンとその動きに応じて細胞位置を制御するマクロ

図 3 マイクロアクチュエータによる細胞マニピュレーション

図 4 高速細胞マニピュレーションシステム

方式の高速アクチュエータとを組み合わせた高精度・高速細胞マニピュレーションシステムの概要である。液柱圧力 ΔP を与えた状態で、細胞を自動的にマイクロ流路内に流入させ、目標値との偏差は下流側に配置されたアクチュエータだけで補償する構成になっている。

図 4 は、高速・高分解能マニピュレーションシステムの一例である。実験に用いたマイクロチップ出入口にはシリコンチューブが差し込まれ、液柱圧力が作り出す主流によって細胞はマイクロ流路内に送り込まれる。アクチュエータとしてはピエゾアクチュエータ（メステック社製：PSt 150/5/40 VS10）が用いられている。細胞の位置は倒立型位相差顕微鏡（OLYMPUS: IX71）を通して高速ビジョン（Photron: FASTCAMMH4-10K）を用いて $3,000\text{ [frames/s]}$ で撮影し、高速画像処理ボード（i-i-lab.）を用いてリアルタイムで処理し、結果は制御用 PC に送られる。画像の空間分解能は $0.24\text{ [}\mu\text{m/pixel]}$ 。この細胞位置情報をもとにアクチュエータへの指令値が決められる。制御系のブロック線図を図 5 に示す。ここで、 K_P 、 K_D 、 K_I はそれぞれ比例、微分および積分ゲインを示す。

細胞の位置決め分解能は 250 [nm] 、細胞位置決めの応答時定数は 15 [ms] であった。図 6 はこれらのデータのエビデンスである。細胞の位置決め制御を行っていて痛感したことは、高速・高分解能アクチュエータと高速ビジョンを

図5 細胞制御のブロック図

図6 細胞の応答特性

組み合わせ、かつサンプリング周期を上げることができれば、細胞の一次元的な位置制御は極めて容易に行うことができる点である。

4. 赤血球疲労試験への応用

赤血球を機械材料と見立てて、破壊するまで力学ストレスを加えるとどうなるのだろうか。赤血球変形能の極限的状态が評価できるに違いない。図4の実験装置を用いてテストしてみると、数百回から千回程度繰り返しストレスを赤血球に加えても破裂は観察されることはなかった。よく考えてみると、赤血球は体内を1日に数百回から数千回循環している。数十秒で同じ赤血球が心臓に帰ってくる勘定になる。単純に計算してみても肺の毛細血管、末端の毛細血管と少なくとも赤血球は1日数百回から数千回のストレス試験にさらされることになる。しかも赤血球が血管内に入ってから寿命が約4ヶ月であることを考えると、赤血球の寿命スパンでは数万回から数十万回のストレス試験にさらされていることになり、わずか数千回のストレス試験で破裂していたのでは、生命維持ができなくなってしまう。そこで極細流路の中にさらに幅3ミクロンメートルの狭窄部を設け、1回通過する際のストレスレベルをあげてみた。基本的には極細流路内での赤血球の伸展能と極細流路から出た後の回復能を同時計測し、さらにストレス試験の回数によって両指標がどのように変化していくのかストレス回数毎に追跡するという方法である。重要な点は、ストレス回数ごとに赤血球の伸長特性も回復特性も悪くなり、結果的に両者が一致する疲労限界回数 N_c が必ず存在し、その回数をその赤血球の変形能限界と見なした点である(図7)。これまで伸展能と回復能はそれぞれ個別に実験が行われていたが、それらを同時に調べることによって、個体差や実

図7 細胞疲労試験

図8 疲労試験中の赤血球の様子

験時間からくるブラックボックスを排除しようとしている。図8はストレス試験中の赤血球の様子を示したものである。運動方向によって赤血球の形が変化し、魚の尾ひれのような形状は運動方向の後部側に現れる。しかもこの尾ひれ形状が現れるのは変形能が高いときだけで、変形能が低くなると、この尾ひれ形状は消滅する。興味深い点は、この変形能限界に対応するストレス回数は、1回目のストレス時の伸長特性と回復特性と相関がでる点である。図9は、縦軸に変形能限界、横軸に1回目のストレス試験における伸長特性と回復特性の差を無次元化したパラメータ EI で整理した図である[10]。この図からも両者の間で相関があり、1回めに大きな差がでる赤血球は変形能が高く、疲労限界回数 N_c も大きくなっていることが分かる。この実験における高速ビジョンの役目は、 $N=1$ における赤血球の直径、伸展相における赤血球の長さ、さらに回復相における赤血球の長軸方向の長さを高速に計測することである。

図9 変形能限界と伸展性の関係

図10 マイクロ流路内での赤血球の挙動

図11 データログの威力

5. 高速ビジョンを用いた細胞変形能の受動的計測

図10は一定圧力差を与えた状態で、赤血球のマイクロ流路内での動きを連続写真として捕えた一例である。この場合、一定圧力差を維持しておけば、赤血球を操る特別なアクチュエータは不要である。筆者らはオンライン高速ビジョンで400個/[s]の赤血球の硬さ評価を行うことに成功している。図11はエビデンスの一例である。ここでは極細流路入口とで出口できっちり細胞先端が高速ビジョンによって捕えられているかどうかを細胞が出入り口に来た際にトリガーをかけることによって、その画像だけを残すようにしている。図11からも分かるように細胞が出入り口のウィンドウでしっかり捕えられていることが分かる。このデータログを残す機能はデータの信頼性を確認する上で極めて重要な機能であることを指摘しておきたい。

6. おわりに

マイクロ・ナノの世界でも高速ビジョンと高速アクチュ

エータの組み合わせは新たな研究トピックスを発掘する上で強力な武器になることを付記しておきたい。

参考文献

- [1] K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida and T. Okano: "Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium," *The New England Journal of Medicine*, vol.351, pp.1170–1172, 2004.
- [2] S. Masuda, T. Shimizu, M. Yamato and T. Okano: "Cell Sheet Engineering for Heart Tissue repair," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.60, pp.277–285, 2008.
- [3] T. Tanikawa, M. Ukiana, K. Morita, Y. Koseki, K. Ohba, K. Fujii and T. Arai: "Design of 3-DOF parallel mechanism with thin plate for micro finger module in micro manipulation," *Proc. of the 2002 IEEE IROS*, pp.1778–1783, 2002.
- [4] H. Zhang and K.K. Liu: "Optical tweezers for single cells," *J. R. Soc. Interface*, vol.5, pp.671–690, 2008.
- [5] D.G. Grier: "A revolution in optical manipulation," *nature*, vol.424, pp.810–816, 2003.
- [6] F. Arai, T. Endo, R. Yamuchi and T. Fukuda: "3D 6DOF Manipulation of Micro-object Using Laser Trapped Microtool," *Proc. of the 2006 IEEE ICRA*, pp.1390–1395, 2006.
- [7] C. Tsai, M. Kaneko, S. Sakuma and F. Arai: "Phase Decomposition of a Cell Passing Through a μ -channel—A Method for Improving the Evaluation of Cell Stiffness," *Proc. of the 2012 IEEE ICMA*, pp.138–143, 2012.
- [8] W. Fukui, M. Kaneko, S. Sakuma, T. Kawahara and F. Arai: " μ -Cell Fatigue Test," *Proc. of the 2012 IEEE ICRA*, pp.4600–4605, 2012.
- [9] S. Sakuma, K. Kuroda, F. Arai and M. Kaneko: "Cell Vibrodeformability," *Proc. of the Int. Conf. on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (micro-TAS)*, pp.976–978, 2013.
- [10] S. Sakuma, K. Kuroda, C. Tsai, W. Fukui, F. Arai and M. Kaneko: "Red Blood Cell Fatigue Evaluation Based on the Closed-Encountering Point between Extensibility and Recoverability," *Lab on a Chip*, vol.14, no.6, pp.1135–1141, 2014.
- [11] K. Kuroda, W. Fukui, M. Kaneko, S. Sakuma and F. Arai: "A New Index of Cell Fatigue under Reciprocative Stress Test," *Proc. of the Int. Conf. on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences (micro-TAS)*, pp.371–373, 2013.
- [12] S. Sakuma, K. Kuroda, F. Arai and M. Kaneko: "Realization of 240 Nanometer Resolution of Cell Positioning by a Virtual Flow Reduction Mechanism," *Proc. of the 2014 IEEE Int. Conf. on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, pp.1031–1034, 2014.

金子 真 (Makoto Kaneko)

1981年東京大学博士課程修了(工学博士)、1981年通産省機械技術研究所(現産総研)入所、1990年九工大情報工学部助教授、1993年広島大学教授、2006年大阪大学大学院機械工学専攻教授、現在に至る。ヒトの能力を超えた人工機械とその応用に興味を持つ、日本ロボット学会論文賞(1994, 2007, 2014)、計測自動制御学会論文賞(1996, 2002, 2008, 2009, 2013)、IEEE RAS Best Transacton Paper Award(2004)。(日本ロボット学会正会員)