A111 細胞把持回転装置の小型化とこれを用いた細胞の3次元形態観察

Development of a novel cell rotation device and its application to 3D observation of cell morphology

○ 和家史知(名工大) 正 長山和亮(名工大) 正 松本健郎(名工大)

Fuminori WAKE, Nagoya Institute of Technology, Nagoya 466-8555

Kazuaki NAGAYAMA, Nagoya Institute of Technology, Nagoya 466-8555

Takeo MATSUMOTO, Nagoya Institute of Technology, Nagoya 466-8555

1. 緒 言

細胞骨格や細胞小器官が、細胞内で空間的にどのように配置しているのかを詳細に知ることは、細胞の機能を明らかにする上で極めて重要である。細胞内の3次元微細構造は一般的に、共焦点レーザ顕微鏡で焦点面をずらした細胞の断層像を複数枚撮影し、得られた断層像を積み重ねることで求められる。しかし、細胞内3次元微細構造を詳細に観察できる精度の共焦点レーザ顕微鏡は極めて高価であり、またその再構築像も満足なものとは言えない。

そこで、我々は細胞内の3次元微細構造を比較的安価な装置で詳細に得ることを目指し、細胞を顕微鏡下で顕微鏡光軸と直交する軸周りに回転させ、様々な方向から観察した像を元に細胞内3次元構造を明らかにする細胞把持回転観察システムの開発を行ってきた^[1,2]。しかし、従来のシステムはピペット先端の位置制御精度が悪く、細胞を1回転させるのに時間がかかり、十分な観察ができなかった。本研究では、新たな原理に基づく細胞把持回転装置を試作し、ピペット先端の位置制御時間の短縮を図るとともに、これを用いて細胞内の3次元微細構造を観察した。

2. 従来の回転観察システム

従来のシステム(Fig.1)では、細胞をマイクロガラスピペットで吸引・把持し、観察用正立顕微鏡(BX61, オリンパス)の光軸と直交する軸周りに回転させ、様々な方向からの細胞の回転観察画像を得ている。顕微鏡光軸方向をz方向、ピペット回転軸方向をy方向、両方の軸と直交する方向をx方向と定義する。マイクロピ

Fig. 1 Schematic diagram of the conventional cell rotation system.

ペット先端の焦点情報、位置情報は画像処理装置を通して二値化面積値(Area)と中心座標(X, Y)として出力され、Areaが最小となるようにz軸マニピュレータを制御し、(X, Y)がモニター中心位置になるようにxならびにy軸マニピュレータを制御することで、ピペット先端位置を画面中心に焦点の合った状態に保った。

このシステムでは、位置制御用マニピュレータのモータがアナログ式であるため、移動量を精密に制御できない、駆動部がボールネジ式のためバックラッシュが大きいといった問題から、細胞内微細構造観察に不十分な20倍対物レンズ下で制御を行なっても、ピペット1回転に約60秒を要していた。また、細胞を把持・回転させる機構部が非常に大きく顕微鏡ステージと独立した配置となっていたため操作性が悪いといった問題があった。

3. 細胞把持回転装置の小型化と位置制御機構の改良

本研究では圧電素子を用いた新たな位置制御機構を導入した。本機構では、ステンレス軸と平行に取り付けた圧電素子を2枚の真鍮円盤で挟み、圧電素子の伸長をステンレス軸の曲げ変形に変換し、ピペット先端に増幅して伝達することでピペット先端の位置制御を行う。また、圧電素子を回転中心軸周りに回転軸と平行に2つ90°ずらして配置することでマイクロピペット先端をx-z平面内で移動させることができる。この方法で圧電素子の変形は3倍程度増幅され、ピペット先端の移動量は50μm程度になるが、ピペット先端の回転中心軸からのずれは通常200μm以上であるため、位置制御を行うには不十分である。そこで、圧電素子後部にさらにマイクロメータヘッドを取り付けることで、圧電素子の変形とは別にピペット先端を移動させ、あらかじめ1回転当たりのずれを圧電素子の変形で制御できる範囲に抑えることにした。また、ステンレス軸に半球形の治具Aを取り付け、治具の球面

Fig. 2 Schematic diagram of the tube deflection mechanism. A set of mechanism in one of two directions is shown for simplicity.

をテーパのついた治具 B に押し付けて回転させる滑り軸受けを機構部の前後に導入することで、従来の玉軸受けを用いた片持ち機構よりも回転に伴うピペット先端のがたつきを抑えながら、圧電素子とマイクロメータヘッドによるステンレス軸の変形をピペット先端に伝達できるようにした。また、ステッピングモータの回転をベルトとプーリを介してステンレス軸に伝達し、ステンレス軸に取り付けたマイクロピペットを顕微鏡光軸と直交する軸周りに回転させる方式とした。

以上の改良と、ステッピングモータの小型化で細胞把持・回転機構部を正立顕微鏡ステージに乗る程度まで小型化できた(Fig.3)。

Fig. 3 Schematic diagram of the new cell rotation device.

4. 試作した機構の評価

試作した機構を用いてピペット先端の位置ずれ制御の評価実験を行った。あらかじめマイクロメータヘッドによる予備調整を行なうことで、ピペット先端の位置ずれを制御せずとも 60 倍対物レンズ視野におさまる程度まで低減することができた(Fig.4)。

次に、ピペット回転角度 36°毎に 1 回転分計 10 回の焦点位置、x 位置を決定するためのキャリブレーションを行った。すなわち、各角度でピペット先端を焦点位置、モニタ画面中心位置に制御したときにそれぞれの圧電素子にかかっている電圧を求め、この電圧をキャリブレーション電圧とした。その後、求めた 10 組のキャリブレーション電圧を線形補間し 9°毎にオープンループによる位置制御を行うことで回転中のピペット先端位置制御を行った。

オープンループによる回転中のピペット位置制御によりピペット先端に焦点を合わせたまま回転させることができた。また、従来ピペット 1 回転に 60 秒要していたところを 60 倍対物レンズを使用しつつ 1 回転 30 秒程度に短縮できた。

5. 細胞の 3 次元形態観察

試作した装置を用い、トリプシン処理により基板から剥離したウシ胸大動脈由来培養内皮細胞について 0°から 360°まで回転角度 9°毎にピペット位置制御を行い、各角度での画像を撮影した。細胞は SYTO13 (Molecular Probes) により核を、rhodamine phalloidin (Molecular Probes) によりアクチンフィラメントを二重染色し、落射蛍光像を撮影した。Fig.5に 0°, 90°, 180°, 270°における細胞の明視野像、細胞核およびアクチンフィラメントの蛍光

像を示す。トリプシンにより剥離した細胞核の輪郭形状は各回転角度で異なり、細胞核が単純な球形ではないということが確認できた。

6. 結 言

新たな位置制御機構の導入、回転伝達機構の改良、ステッピングモータの小型化で装置が顕微鏡ステージ上に乗る程度までの小型化を実現できた。また、圧電素子を用いたピペット位置制御機構を導入することで細胞内微細構造観察に必要な 60 倍対物レンズ下での回転制御が可能となった。今後は、試作した装置を用いて得られた各角度における回転画像から X 線 CT スキャンの技術を利用した細胞内微細構造の 3 次元再構築などを行う予定である。

参考文献

- [1] 伊藤仙和, 松本健郎, 佐藤正明: 単離細胞観察のための細胞把持回転装置の開発, 第 13 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 pp.18-19 (2001)
- [2] 田島英樹, 長山和亮, 伊藤仙和, 松本健郎, 佐藤正明: 細胞回転観察システムの開発と細胞形態の 3 次元観察に関する基礎検討, 日本機械学会東北支部第 38 期総会・講演会講演論文集 pp.176-177 (2003)

Fig. 4 Reduction of the micropipette displacement brought by coarse adjustment with the micrometer heads.

Fig. 5 The images of an endothelial cell under rotation.