

報告番号	甲 第 (2786) 号
------	--------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 **Mechanical Property Measurement of Single Cell Using Robot Integrated Microfluidic Chip**
(ロボット統合型マイクロ流体チップを用いた細胞の機械特性計測に関する研究)

氏 名 杉浦 広峻

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、マイクロナノ領域のメカトロニクス技術を基盤とし、生体組織の構成要素である単一細胞の分析を推進する研究である。

1章では、研究背景について述べている。生体機能の解明や医療への貢献、創薬を目的として、生体組織を単一細胞レベルで分析する研究が活発に行われている。特に、細胞の特性を決定づける要因として、細胞と細胞外基質、または細胞同士の力学的な相互作用が注目を集めており、近年は細胞凝集塊に代表される組織培養を用いることで、生命機能発現機構の解明などが盛んに行われている。これらの力学的相互作用を発現する過程において、個々の細胞はその構造を自在に調整しているため、個々の細胞の機能、状態の違いは機械的な物性の計測値より状態推定が可能であると考えられる。そのため、個々の細胞に対して、定量的に機械特性を評価する手法を開発することは、非常に大きな意義を有する。蛍光試薬などを用いた計測分析技術と異なり、機械的特性の計測は、生体試料の物理的な特性の違いを直接的に取得することが可能である。そのため、計測システムの測定精度の許す範囲において、細胞内の状態の違いを取りこぼすことなく取得できることが可能であるほか、計測対象に対する侵襲性も恒常的ではないなどの利点がある。これは、1種の Label-free Quantification に準じた方法として、生体細胞に広く利用することができる。従来、細胞レベルの機械的特性は、マイクロマニピュレータや原子間力顕微鏡により実現されてきた。さらに、少量のサンプルを高効率に計測する要求から、申請者の研究室では、マイクロ流体チップなどに計測機能を統合化する研究を推進している。そこで本研究では、

マイクロ流体システムに統合可能な細胞の機械特性計測を実現するための技術的な枠組みを論じ、実証を行った。

2章では、システムの基本構成と、動作原理において特筆すべき点を述べる。また、MEMS 微細加工技術を用いてマイクロ流体チップを作成する技術について述べる。マイクロ流体チップを基盤中心として、その外部に撮像光学系、チップ内の微小構造物を駆動するための駆動源、細胞供給用途の流体システムを組み合わせた実験系を構築した。マイクロ流体チップは材料と単結晶シリコンで構成しており、半導体プロセスを利用して加工した機械式の微小機械構造体を搭載している。特に本研究では細胞の機械特性の計測機能のため、細胞に圧縮変形を与えられるようなプローブとはり構造からなる変形用力センサを実装した。これらはマイクロ流路側壁に配置することで、流路を通過する個々の単一細胞に対して機械特性の計測をする構成となっている。次に、チップ内のプローブの駆動方法について述べる。従来技術として、磁気、光、誘電泳動などの電場勾配力、熱などが利用されてきたが、申請者は、位置決め精度、発生力、共振周波数の高さなどを考慮して、圧電素子を用いた微小構造物の位置決め制御に着目した。圧電素子による駆動では、優れた動作特性を有する反面、導電率の高い雰囲気中では高電圧印加により絶縁破壊を伴うため、液中環境での駆動としての利用は難しい。そこで、圧電素子を、アタッチメントを介してチップ外部から駆動対象の構造物に接触させ、さらに剛性の高い単結晶シリコンからなる予圧機構を用いて、高い復元力と拘束力を形成する方法を提案した。これにより、圧電素子の特性を活かしながら、液中構造物の高速高精度な駆動を実現可能とした。微細加工技術によるマイクロ流体チップの加工技術では、薄膜シリコンを有する SOI ウェハのデバイス形状を加工する技術、パッケージングを行うガラス材料の形状加工技術、ならびに、接合技術を論じ、随所にある技術的要点を説明することで、実験系構築の指針を示した。

3章では、力センサの物理特性について重点的に述べている。力センサは従来両持ちはり構造を採用していたが、線形性や構造形成時の熱応力の影響を低減するため、折返し梁構造を採用することで、静荷重計測に対する高い性能を得ることが可能となった。また、計測精度を担保することを目的として、モデルベースのパラメータ推定方法を用いてばね定数を校正する手法を確立した。測定対象のモデルとして、梁の剛性、粘性抵抗などの影響を理論的に計算した結果、単純調和振動子モデルとなることが判明した。このモデルをもとに、チップの基板に周波数の異なる正弦波入力を加えた際の応答特性を利用し、各周波数における複素振幅から、機械的インピーダンスに関する正規方程式の最小 2 乗解得ることで、想定する物理モデルに対応するばね定数を同定することに成功した。本手法により、反力センサのばね定数に関して、設計値に対し 20%程度存在した誤差を補正し、細胞特性計測の正確さを保証するに至った。

4章では、画像走査モアレ縞を利用した微小構造物の高精度変位計測について述べている。申請者の研究において、マイクロ流体システムに搭載した、微小はり構造の機械式力センサは、準静的駆動条件において、その先端の変位を発生している反力に変換する

作用を有する。そのため、変位計測精度が力計測精度に直結する。従来構想においては、マシンビジョンによる境界検出アルゴリズムなどを利用し、変位検出を行ってきたが、その検出精度は、誤差部分において数百 nm オーダあり、細胞変形の数%以上に相当する。はり構造のセンサの歩留まりを考慮すると、検出器として性能は 100 倍程度高いことが好ましく、新たな手法の模索が必要であった。そこで、画像モアレ縞の位相差検出を利用した高精度変位計測技術を開発した。顕微鏡で撮像した周期構造を持つ画像に対し間引きと線形補間を利用することで生成できるモアレ縞は、その位置関係から一周期に相当する位相シフト画像となる。このモアレ縞の位相は、フーリエ変換に類する位相シフト法を適用することによって、輝度変動、背景輝度などの影響を受けることなく計測することができる。これより、撮像格子の格子定数と位相の変化割合の積から、構造物の変位を計測する事が可能となる。本手法の優位点は、その利便性と、格子定数を用いて変位を算出するため、検出器としてのキャリブレーションが不要であるという点である。これより、10nm オーダを超える変位計測精度を実現することができ、力センサとなる微小はり構造物の剛性を十分に確保しながら、nN オーダ以下の発生力計測を実現することができた。

5 章では、計測結果の考察、ならびに、ヘルツ理論の拡張による細胞変形モデルを提案している。細胞の弾性特性評価を行うにあたり、AFM などの走査プローブ顕微鏡では、Hertz 理論などに準じた変形特性を利用した解析が主流である。一方で申請者の計測システムでは、並行平板における短軸圧縮を比較的大変形領域まで行うことで、物性値を測定している。そのため、Hertz 理論のスコープとして適切ではなく、さらに細胞の物性や幾何的な変形挙動を十分に検討できていないため、計測した弾性定数の値の妥当性や物理的意味付けが十分でなかった。そこで申請者は、計測系の評価方法に即した、大変形領域まで拡張可能な細胞の弾性変形モデルと弾性定数の評価方法を確立した。細胞の構造は細胞骨格と呼ばれる高分子のネットワークから構成されていることから、基礎方程式を高分子弾性論とし、幾何的拘束を考慮することで、本計測系における圧縮状態を再現する機械的なモデルを再現した。非線形モデルであることから、数値解析的な最適化手法によって弾性率を算出し、ニュートン法による数値解析から弾性定数を同定した。本手法では、細胞の大変形領域において細胞の静的な変形—反力特性をうまく説明しており、マイクロ流体システムを用いた計測系において普遍的に利用できると思われる。

6 章では、主論文のまとめと、今後の展望について述べている。以上の内容により、マイクロ流体システムにおいて細胞の機械特性を計測する基盤技術を体系的に論じた。これらの評価方法並びに得られた結果は、単一細胞解析への応用を実現するために重要であり、工学の発展に寄与するところが大きいと判断できる。