

局所化学環境制御システムの構築と評価

Construction and Evaluation of Local Environment Chemical Stimulation System

○ 小嶋 勝 (阪大), 世良京太 (阪大), 前 泰志 (阪大), 新井 健生 (阪大)

Masaru KOJIMA, Osaka University, kojima@arai-lab.sys.es.osaka-u.ac.jp
Kyota Sera, Osaka University
Yasushi MAE, Osaka University
Tatsuo ARAI, Osaka University

Single cell analysis has attracted much attention for revealing detailed and localized biological information. A local environmental control technique is desired when analyzing the detailed and localized properties of cells. In here, we propose a system for local environmental chemical stimulation with micropipettes for stimulating the local chemical concentration automatically and dynamically. The problem of the local chemical environment control is diffusion. The chemical solution is diffused and affects other objects. To address this problem, we use spout pipette and suction pipette for restricting diffusion. Then we used fluorescent substance and evaluate controllability of local chemical concentration quantitatively. Furthermore, we improved our developed system depend on evaluation and achieved high responsiveness of local chemical concentration control.

Key Words: Micro robotics, local environment control, chemical stimulation, micro pipettes

1. 緒言

近年、細胞解析技術において、集団細胞解析では得ることができない単一または少数細胞の特性を解析する技術が注目されている[1,2]. 細胞の特性解析において、ある刺激に対する応答を計測することが重要であるが、単一細胞解析を可能とするためには、いかに局所への刺激を実現するかが課題となる。特に化学刺激を行う場合、溶液が拡散してしまうという問題がある。この課題を解決するため、本研究室では単一・少数細胞の解析を可能とする局所化学刺激システムの開発を進めている[3]. 本稿では、開発したシステムの局所刺激範囲・噴出量を定量的に評価すると共に、高い応答性を持つ溶液噴出の実現を目指した。

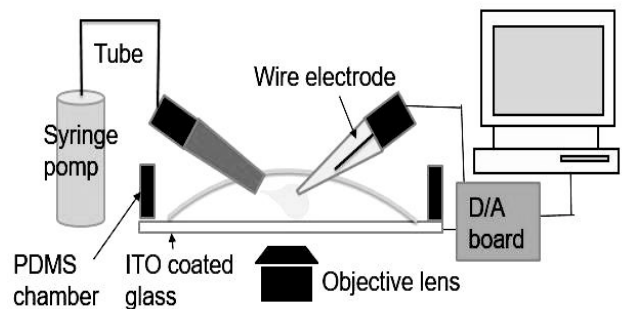


Fig.1 局所化学刺激システムのシステム構成

2. 局所化学刺激システム

局所化学刺激システムのシステム概要図を Fig.1 に示す。本システムは、二本のガラスピペット間の化学環境の制御を各ピペットからの溶液噴出及び除去により行うものである。溶液の噴出は噴出用ピペットから行う。噴出は電気浸透現象を利用してピペット内部に配置した導線と底面間に電圧を加えることで行い、応答性の高い噴出を実現している。また、溶液の除去には吸引用ピペットを利用する。吸引はピペットが接続されたシリンジポンプを用いて一定量の溶液を吸い続けることで実現する。さらに、噴出・吸引の様子を高感度高速カメラにより取得して、画像フィードバック制御を行う。これにより、カメラ画像の取得による噴出量の測定、測定結果に基づく DA ボードからマイクロピペットへの印加電圧の決定・制御、印加電圧に基づくマイクロピペットからの溶液噴出による化学刺激をリアルタイムで実現する。

3. 蛍光溶液噴出によるシステム検証

3.1 蛍光溶液噴出による化学刺激範囲の確認

構築したシステムを用いた化学刺激の局所性を確認するた

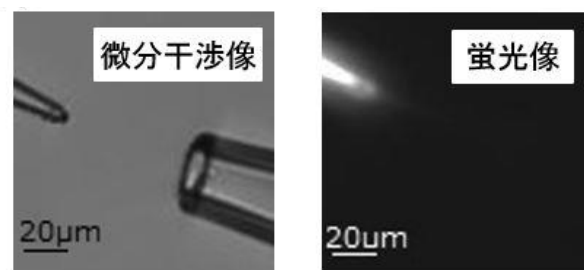


Fig.2 噴出時のピペットの先端の様子

めに、蛍光溶液(7.5[mM] fluorescein)を噴出し、蛍光が観察された範囲の計測を行った (Fig.2)。外径 2[μm]のピペットを用いて印加電圧 5[V]で噴出を、外径 30[μm]のピペットを用いて 100[$\mu\text{L}/\text{m}$]で吸引を行い、噴出と吸引のピペット間の距離を 20[μm]から 230[μm]に数段階に変化させ、バックグラウンド以上の輝度値の示した範囲の面積の計測を行った (Fig.3)。

ピペット間距離が 100[μm]程度までは、ピペット間の距離が離れるにつれ化学刺激範囲が指数関数的に上昇していくことが確認された。また、ピペット間の距離を 100[μm]未満に設定

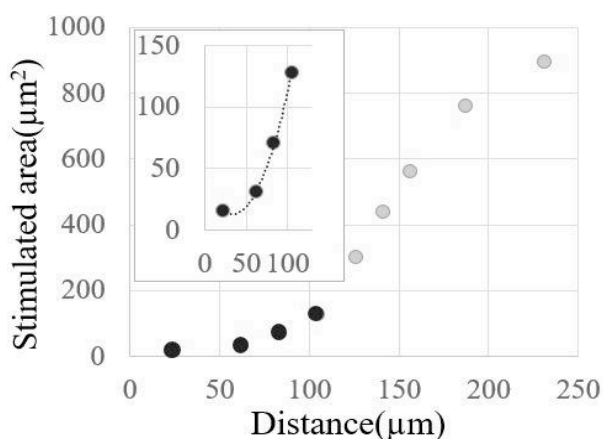


Fig.3 ピペット間距離と化学刺激範囲の関係

することで、化学刺激範囲を 100 [μm^2]未満にすることが可能であり、これは、直径 10 $[\mu\text{m}]$ 程度の標準的な動物細胞単一を刺激可能である。

3.2 各印加電圧におけるステップ応答の確認

印加電圧をパルスで与え、1V から 5V までの 5 段階の電圧印加時のステップ応答を確認した。蛍光溶液 (7.5[mM] fluorescein) を充填した外径 2 $[\mu\text{m}]$ のピペットを用いて、指定した電圧の印加を 5 秒間行った。蛍光強度は、ピペットの先端付近に一辺 10 $[\mu\text{m}]$ の正方形の ROI を設け、ROI 内の輝度値を計測することで算出した。蛍光強度の変化から、定常状態になるまでの時間、定常時の蛍光強度、噴出停止から蛍光が完全に消失する間での時間 (立ち下がり時間) を確認した。さらに、定常状態になるまでの時間を詳細に分け、電圧を印可してピペット先端の ROI 内の輝度値が定常状態の 10% の輝度に届くまでの時間を無駄時間、輝度値が定常状態の 10% から 90% になるまでの時間を立ち上がり時間と定義し、印加電圧ごとに計測した結果を Fig.4(a) に示す。

立ち下り時間は 0.16 秒ほどでほぼ一定であったが、定常状態に至るまでの時間は大きく変化した。無駄時間、立ち上がり時間は共に電圧を上げるほど短くなり、電圧が高いほど応答速度が速くなることを確認された。

3.3 PID 制御

ステップ応答の結果より、低い印加電圧で噴出すると定常状態に達するまでにかかる時間が長くなることが確認された。本システムでは適用対象によっては高い応答性を求められるため、応答性の改善を試みた。具体的には、指定した ROI 内の平均輝度値をフィードバックした PID 制御により、その応答性の改善を試みた。ステップ応答により計測した波形をもとに、無駄時間を含む一次遅れ系として近似し、蛍光噴出の PID 制御を行った。無制御で 0.5[V] の印加電圧で噴出した場合の定常状態の輝度値(30)を目標値とし、PID 制御を行った場合と比較した (Fig.4(b))。PID 制御を行った場合の方が目標の値に 12 倍早く到達しており、制御を行うことによる応答性の改善が確認できた。

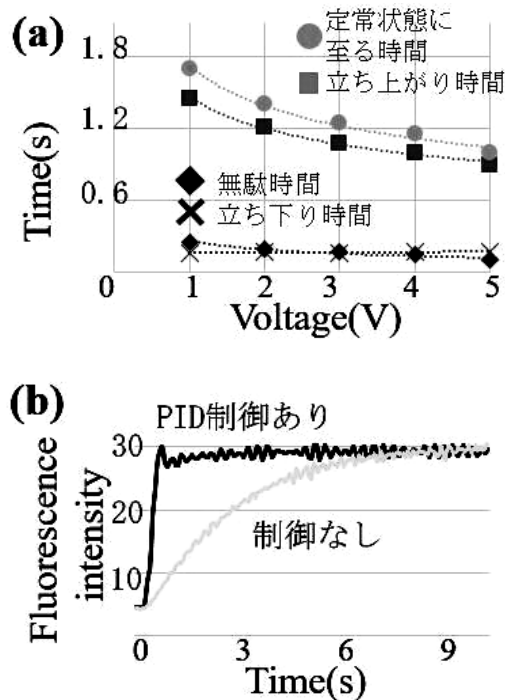


Fig.4 (a) 印加電圧の違いによる応答時間の変化、
(b) PID 制御と無制御の応答性の比較

4. 結言

本稿では、開発した局所化学刺激システムの応答測定や噴出範囲の確認を行い、システムの定量化を行った。その結果、本システムにより、10 $[\mu\text{m}]$ ほどの単一の細胞解析も行うことが可能であることを確認した。また、ステップ応答を解析し、蛍光噴出の PID 制御を行うことで応答性が改善されることを確認した。今後は、本システムを細胞の特性解析、例えば、微生物分子モータの回転原理解明に適用し、有効性の確認に取り組む。

5. 謝辞

本研究の一部は、科研費・若手研究 (A) (JP16H06076)、ヒューマンウェアイノベーションプログラム・融合研究および未来研究ラボシステムの助成を受けたものである。

参考文献

- [1] C. V. Rao, D. M. Wolf, and A. P. Arkin, "Control, exploitation and tolerance of intracellular noise," *Nature*, vol. 420, pp. 231-137, 2002.
- [2] D. D. Carlo, N. Aghdam, and L. P. Lee, "Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays," *Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 4925-4930, 2006.
- [3] K. Nogawa, M. Kojima, M. Nakajima, S. Kojima, M. Honma, T. Fukuda, "Rotational speed control of N a+-driven flagellar motor by dual pipettes" *IEEE Trans. on NanoBiosci*, Vol. 8, pp. 341-348, 2009.