

単一細胞の大変形圧縮モデルを用いたオンチップ弾性特性計測

On-chip Method to Measure Elastic Property of Single Cell Using Large Compressive Deformation Model

○学 杉浦 広峻 (名古屋大学) 正 佐久間 臣耶 (名古屋大学)
正 金子 真 (大阪大学) 正 新井 史人 (名古屋大学)

Hiroataka Sugiura, Nagoya University, sugiura@biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp
Shinya Sakuma is in Nagoya University, Makoto Kaneko is in Osaka University
Fumihito Arai is in Nagoya University.

This paper proposes a method to measure cellular elasticity on a microfluidic chip using large compressive deformation model. In our previous researches, we succeeded in improving accuracy and sensitivity of measurement devices using piezoelectric actuator and sampling moire method. However, there still were some problems on the analysis of mechanical properties of cell. Conventional studies employed Hertzian Contact Theory, which could be utilized in quite limited area of cell compression. Therefore, this theory could not be adaptive to on-chip measurement system based on uniaxial large compression mechanism. In this research, we introduce a large compressive deformation model to illustrate elastic behavior of single cell in detail. This is naturally extended model of Hertzian Contact Theory, and in good accordance with the experimental data. Using iterative least square estimation method, we succeed in demonstrating elasticity measurement based on the new model.

Key Words: Lab-on-a-Chip, Cell Measurement, Elasticity, Microfluidic Systems, Spatiotemporal Bio-integrity

1. 緒言

近年、生体組織を単一細胞レベルで分析し、生体機能の解明や医療応用、創薬試験を実現する研究が活発に行われている[1]。特に、細胞の機械的な特性に関連する細胞生理学的機能が、非常に重要な役割を果たすことが判明してきている。たとえば、環境イオン濃度の違いに対して細胞内圧を調整する浸透圧適応機能や、拍動刺激を受ける細胞の配向性を有する組織成長、間葉系幹細胞の力学刺激に応じた細胞分化などが、これに該当する。これらの機能は、末端器官で力を知覚する作用（メカノセンシング）、それを電気化学的信号に変換し細胞内ネットワークに伝播させる作用（メカノトランスダクション）、この信号に基づき細胞内各部に力を発生させる作用（メカノフィードバック）などから構成され、複雑に相互作用することが知られている。これらすべての機能、特性を網羅的に評価することは難しいが、細胞系の外からは、その作用の影響を機械的な特性変化として観測することができる。そのため、単一細胞レベルの機械的な特性の計測技術や、計測対象となる細胞機能を説明する機械的なモデルの構築は、細胞生理学現象の解明や定量的な評価を行う上で非常に重要な役割を果たす。

従来細胞の機械特性評価には、マイクロマニピュレータ[2]、AFM[3]などが用いられてきた。さらに我々の研究グループでは、計測操作のハイスループット化や、計測環境の安定化、機能統合化を目的として、マイクロ流体チップ上における機械特性計測の機能開発を進めている[4]。浮遊状態にした細胞を流体圧により搬送することで、マイクロマニピュレータのような計測構造を細胞に位置合わせする煩雑さを軽減し、AFMと同様に、板ばね状の梁を用いて機械特性を評価することが可能である。先行研究では、計測デバイス側の高機能化に重点を置き、高い精度、信頼性を有する圧縮変形の印加、およびそのときの反力の観測を可能とした。しかしながら、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、計測した指標の妥当性や物理的意味付けが十分でなかった。そこで本研究では、特に細胞が発現する弾性特性に着目し、より詳細な評価方法を検討し、実際の細胞計測に適用する実証実験を行った。

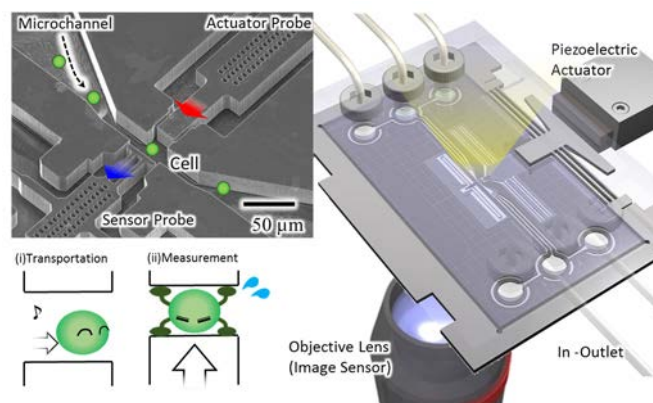


Fig. 1 Overview of On-chip System to Measure Mechanical Properties of Cells

2. 計測系と計測手法

2.1 計測系の概要

図 1 に計測手法の概要を示す。計測系はマイクロ流体チップ上に構築され、シリコン製のプローブと板ばねとなるはり構造がガラスによってパッケージングされた構造となっている。プローブは流路の両側壁に配置し、外部のリザーバから供給された細胞に対して圧縮変形を加える役割、及び細胞の変形量と反力を観測する役割を果たす。細胞に変形を与えるプローブの駆動方法は、先行研究に基づき、外付けのピエゾアクチュエータを利用する方法を採用する[5]。この方法によりプローブの駆動を 1 nm オーダほどの精度で行うことが可能となる。細胞の変形量と反力はプローブの変位によって計測する。プローブの変位は、チップ下部に配置したイメージセンサにより観測する。先行研究において、プローブの境界検出精度を確保するため、モアレ縞を用いた高精度計測技術を実装している[6]。これは、プローブに周期構造を形成し、撮像した際に発生する走査モアレ縞の位相変化をもとにプローブの変位を計測する方法であり、液中構造物の計測精度において他に比類のないものとなっている。現在までに本計測系において検出感度 0.2 nm、計測誤差は 3- σ 信頼区間において 2 nm

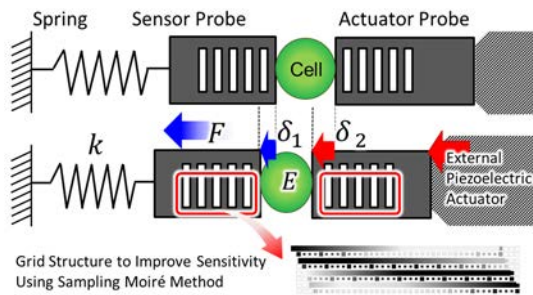


Fig. 2 Mechanism to Measure Cellular Characteristics

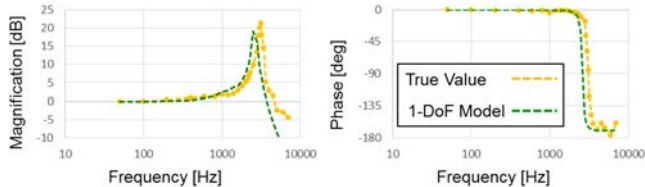


Fig. 3 Characteristics of On-chip Force Sensor

を達成している。これは、我々が計測対象としている一般的な動物性真核細胞の直径、10-20 μm に対して 0.1 %ほどに相当する。また、現在加工可能な単結晶シリコンからなるオンチップ力センサのばね定数（およそ 1 nN/nm）を考慮すると 100 pN オーダの力を検出可能である。反力センサであるのは構造は、事前に動特性からキャリブレーションを行っている。図 3 に、本研究で用いたチップのはり構造の周波数特性を示す。文献[6]に示す 1 自由度振動系パラメータの推定方法によって、はり構造のばね定数を校正することができる。本研究では、推定値の 1.13 nN/nm を利用する。以上の計測デバイス、および計測技術のもと、高精度かつ信頼性の高い、細胞の機械特性の計測が可能である。

2.2 細胞の弾性特性計測とその問題点

計測データから細胞の機械特性を推定する場合、計測デバイスの精度特性に加えて、細胞の押しこみ変形挙動に対応する数理的な変形モデルが必要である。特に細胞の弾性率は、主として細胞質に分布するアクチンなどの高分子フィラメントが有すると考えられている。細胞内のフィラメントの分布や組成は、細胞種や生理学的状態によって異なるから、弾性率を推定することで、分化した細胞種の判別やがんの浸潤の有無の評価などが可能になると考えられる。そこで我々は、細胞の弾性率に着目し、その推定方法の確立を目指している。

従来弾性率の推定には、AFM の計測方法にならい Hertz の接触理論が用いられてきた。しかしながら、平板プローブによる圧縮を利用して細胞全体の特性を評価する本研究の計測系では、以下に示すような課題があった。まず、ヘルツの接触理論は微小変形においてのみ利用可能であるため、弾性率計算に利用できる計測データが非常に少なくなる。また、接触の初期位置を推定することが難しい。このため、推定された弾性率はその精度、信頼性が十分ではなかった。さらに、接触領域では、細胞表面の凝着力の影響が無視できないほどに存在するが、Hertz の接触理論において、凝着力の影響は考慮されていない。JKR 接触理論などによってこの影響を評価することは可能である[7]が、閉空間に配置したプローブの表面エネルギー計測が困難なため、本研究では利用が難しい。

この問題を解決するため、本研究では従来用いてきた Hertz の接触理論を拡張した、細胞の圧縮大変形モデルによる弾性計測方法の検討を行う。これにより、接触による凝着が支配的な微小変形域を超えた広いレンジの計測データを用いて、厳密な細胞の弾性率評価を実現することを目指す。

2.3 細胞の平板圧縮変形時における弾性変形のモデル化

本研究では、球形の細胞が平板によって圧縮変形を受けた際の細胞挙動を、細胞の材料的特性と幾何的拘束条件を考慮した弾性変形モデルによって考察する。前提条件として、大変形領域の特性を説明できるようなモデルを想定する。実験的観測から、細胞の弾性変形時において、押し込み量に対して反力が非線形的に増加すること、および接触円半径の増加、半径方向の伸びが発生することが確認されている。また、計測系、計測対象に対して、(i)細胞の変形は、準静的かつ同時変形、(ii)材料力学が適用可能なひずみの小さい変形で説明可能、(iii)高分子材料の弾性特性を表現する基礎方程式に準拠、(iv)体積一定、の 4 つの仮定を設定する。これらの条件をもとに細胞の弾性変形を定式化するが、条件的な整合性から、本研究では、Tatara らによって構築されたゴム球の弾性変形を表現するモデルを基本に、変形した形のものを用いる[8]。

細胞の弾性は高分子フィラメントが主としてその機能を発現し、その特性は非線形であることが知られている。網目状高分子の弾性特性を表現するもっとも基礎的な方程式は、Kuhn によって統計熱力学の観点から導入されたもので、式(1)のように表現される。[9]

$$\sigma = \nu_m R_g T \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \quad (1)$$

ここで、 σ は軸方向応力、 λ はひずみ率、 ν_m は単位体積あたりの架橋数、 R_g は気体定数、 T は絶対温度である。式(1)に対して図 4 に示すように変形を記述するための変数を定義し、体積一定、相似変形などに基づく境界条件を用いることで、式(2)に示すような構成方程式を得る。

$$\begin{bmatrix} z_0 - R + \sqrt{R^2 - a^2} \\ a' - a - \frac{3AP}{4\pi E_0} \left(1 + \frac{Ba^2}{5R^2} \right) \left\{ \frac{\sqrt{z} - \sqrt{2R - z}}{2R\sqrt{2R}} \right\} \\ \delta - \frac{9AP}{16E_0} \left\{ 1 + \frac{Ba^2}{8R^2} \right\} \frac{1}{a'} + \frac{f(a)AP}{\pi E_0} \left\{ 1 + \frac{Ba^2}{5R^2} \right\} \\ z_0 - AP \left\{ \frac{9}{32E_0 a} \left(1 - \frac{Ba^2}{2R} \right) + \frac{Bf(a)a^2}{2\pi E_0 R^2} \right\} \end{bmatrix} = 0 \quad (2)$$

ここで、 (z_0, a) は変形後接触部の境界(δ, a')に移動する物質座標、 P は細胞が発生させる力、 E_0 は初期割線弾性率、 R は細胞の半径である。 E_0 は、Hertz の接触理論における弾性率に相当し、式(1)のパラメータを用いて、 $E_0 = \nu_m R_g T / 3$ と表せる値である。 $A, B, f(a)$ は文献[9]の式(20),(28)によって与える。なお、微小変形領域において、このモデルは第 3 式以外を自動的に満たし、ヘルツの接触理論と同一になる。そのため、モデルの変形挙動はヘルツ接触の自然な拡張であり、従来研究との整合性を取ることが可能である。

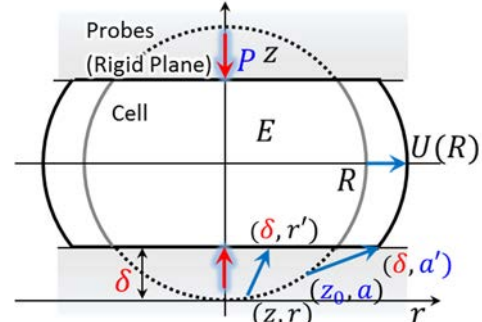


Fig. 4 Definition of Variances for Large Compressive Deformation Model of Single Cell

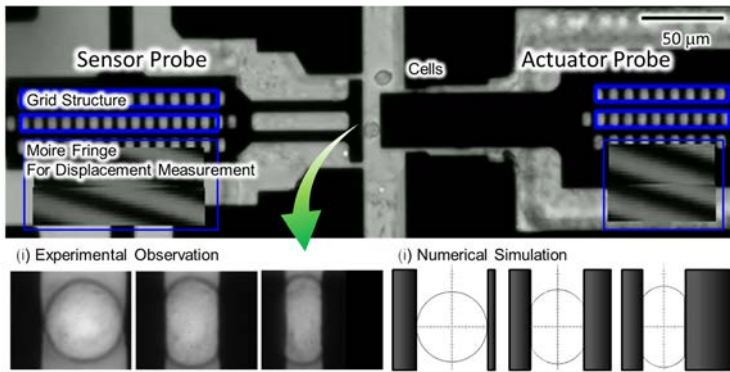


Fig. 5 Typical Examples of Cell Indentations

計測系は、 piezoelectric アクチュエータによって細胞に既定の変形量 δ を与えることができるから、任意の δ に対する未知変数ベクトル $x(\delta) = [z_0 \ a \ a' \ p]^T$ を得る事ができればよい。ここで、式(2)は 4 つの非線形連立方程式であるから、Newton 法によって $x(\delta)$ を数値的に計算することができる。Newton 法の性質上、解を得るための初期値 $x_0(\delta)$ を適切に置く必要があるため、微小変形時にヘルツの接触理論をもとに各値を決定し、微小変形から外れた領域ではその近傍の収束値を利用する。収束条件は、 P, δ の計測精度を考慮し、すべての変数の相対誤差が 10^{-5} 以下となるよう設定した。

2.4 弾性率の推定方法

前節の細胞変形モデルを用いて、実験データを利用し弾性率 E_0 を推定する方法を考える。推定には最小二乗法を用いる。本研究の計測系において、高精度に実測可能なのは反力 P である。そのため、最小二乗法に用いる評価関数は、以下のように設定する。

$$G(E_0) = \sum_{i=0}^N (P_{sim}(\delta_i) - P_{exp}(\delta_i))^2 \quad (3)$$

ここで、 $P_{sim}(\delta_i)$ は数値解、 $P_{exp}(\delta_i)$ は実測値、 N はサンプル数である。今回考察したモデルは、ある特定の弾性率 E_0 であるサンプルの変形挙動を、非線形連立方程式をもとに陰解法で計算するものであるため、弾性率 E_0 に関する導関数を定義する事ができない。そこで、Evolutionary Process による確率的最適化を行う。なお、効率的な反復計算を必要とするため、線形理論によるシンプレックス法を応用した方法を用いる。本研究では、計算プラットフォーム MATLAB の関数、`fminsearch()` を利用する。

3. 細胞の弾性率計測実験および考察

マイクロ流体チップを用いて、実際に浮遊細胞を対象とする細胞計測を行った。計測対象は、動物系真核細胞である Mardin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞を利用した。培養液は DMEM (life technologies Co. ltd.) を利用し、細胞とチップの接着を防ぐために、BSA (bovine serum albumin) を 1% 混入させた。チップの投入口に外部のシリンジから MDCK 細胞を培養液とともに供給し、細胞をセンサに押し付けて変形させた。実際の細胞計測の様子と細胞の変形挙動と対応するモデルの変形の様子を図 5 に示す。変形の初期位置は、センサ側のプローブが変位を観測できた 1 フレーム前の画像から得られる位置を利用する。図 6 に得られた細胞 3 サンプルの変形率—反力の関係を示す。またこのデータをもとに大変形モデルを用いて弾性率を推定した結果を示す。Sample1,3 に関しては、

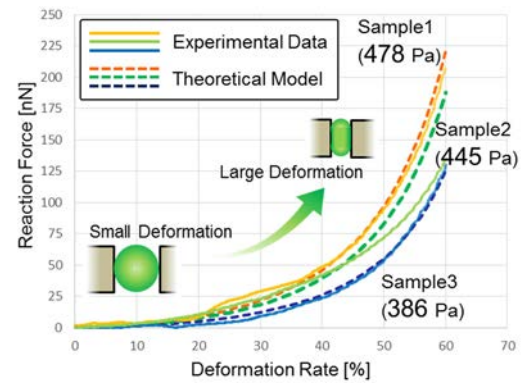


Fig. 6 Experimental Data and Elasticity Estimation

実測値と大変形モデルによる数値解の変形特性がおよそ一致している。計測した細胞の弾性率は、初期弾性率を想定しているため、本質的にヘルツの接触理論を用いて求めた値とおよそ一致するべきであり、実験結果を先行研究[6]と比較し同程度の値であることを確認した。これより、計測の難しい微小変形域を超えた領域での計測データを用いて弾性率を評価することが可能であることを示した。しかしながら、Sample2 に関しては、得られた曲線の形状がモデルと一致せず、大変形領域で大きな誤差が発生している。これは、本研究で細胞の弾性特性のみを考慮し、ポアソン比を 0.5 とすることで体積変化の影響を考慮していないことに起因すると考えられる。一般的に細胞のポアソン比は 0.45 から 0.5 付近とされている。ポアソン比を陽にとり、評価関数の最適化を行うことは可能であるが、この場合問題は制約付き非線形最適化となる。そのため、数値解が局所停留点に収束し、正確な弾性特性を得られないケースが発生した。今後より優れたパラメータの推定方法を確立することで、細胞の弾性特性だけでなく、圧縮性についても深い考察が可能になると考えられる。

4. 結言

本研究では、マイクロ流体チップを用いた細胞計測系における、大変形モデルを利用した厳密な弾性評価方法を検討した。また、実際の弾性率計測の推定アルゴリズムに適用することで、その妥当性の検証実証を行った。実験の結果と細胞の弾性変形モデルは広い範囲でよく一致し、Hertz の接触理論を用いるより厳密で有用性の高い評価方法であることが確認できた。本研究で用いたモデルは、弾性特性を高分子の架橋率などの統計熱力学的なパラメータにより説明できる。そのため、今後より詳細な解析を行うことで、細胞の弾性と生理学的機能を定量的に関係づける計測、評価方法として有用なものになると考えられる。

謝辞

本研究は科研費(23106002, 15H02226)の助成を得て行われたものである

参考文献

- [1] B. Geiger, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- [2] D.H. Kim, *IEEE Robot.*, 5, 5013-5018, 2004
- [3] D.H. Kim, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 11, 1, 203-233, 2009.
- [4] S. Sakuma, *J. Robot Mech.*, 25, 2, 277-284, 2013.
- [5] T. Kakio, *J. SICE*, 51, 1, 1-6, 2015.
- [6] H. Sugiura, *Micromachines*, 6, 660-673, 2015,
- [7] K. L. Johnson, *J. Colloid Interface Sci.*, 192, 2, 326-333, 1997
- [8] Y. Tatara, *J. Eng. Mater. Technol.* 113, 3, 292, 1991.
- [9] J. Bergstrom, *J. Mech. Phys. Solids*, 46, 5, 931-954, 1998.