

高速・高分解能な流体制御を用いた単一遊泳細胞ピックアップ

Picking up single motile cells using high-speed and high-resolution flow control

○学 笠井 宥佑 (名大) 正 佐久間 臣耶 (名大) 正 新井 史人 (名大)

Yusuke Kasai, Nagoya University*
Shinya Sakuma, Nagoya University, Fumihito Arai, Nagoya University
*kasai@biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp

Picking up single cell is a fundamental technique for single-cell analyses. Although high-resolution of controlled volume and high-speed actuation are required to pick up a single motile cell, it has not achieved in conventional pipetting techniques. Therefore, we have presented a high-speed picoliter pipette as a single cell pick-up device, which is driven by a piezoelectric actuator. However, since we have not performed the experiment of frequency response, the parameters of transfer function of the flow control system have been unknown values. Therefore, we performed the experiment, and the result showed the bode plot of second-order lag system. The result corresponded to the analytical model whose eigen frequency and damping ratio were 330 Hz and 1.16, respectively. The result indicates that the developed pipette can be applied for high-frequency flow control without the resonance peak.

Key Words: Frequency response, Flow control, High-speed, High-resolution, Pipette.

1. 緒言

マイクロ・ナノデバイスの発展に伴い、単一細胞解析の研究において、細胞ごとに個性があるということが明らかにされてきた[1]。特に近年、遊泳細胞であるユーグレナにも個体差があることが報告されており [2]、遊泳する細胞を単一分取する技術の需要が高まっている。単一細胞分取技術の中でも、培養皿中から直接細胞を観察・分取・分注可能という利点から、ピペットを用いた単一細胞ピックアップ技術が注目されている。培養皿中を遊泳する細胞を対象とするとき、以下の2点、①細胞群の中から目的の細胞のみをピックアップするためのピコリットルオーダーの高い分解能、および、②ピペット先端を通過する細胞をピックアップするためのミリ秒オーダーの高い応答速度、を両立した流体制御技術が要求される。従来のピペット操作技術において、電気浸透流を用いた高分解能な流体制御や[3]、メンブレンポンプを用いた高速な流体制御が報告されてきたが[4]、高速かつ高分解能なピペット操作技術は困難とされてきた。

このような背景から、我々は従来、ピエゾアクチュエータ駆動型のピペットを開発し、応答速度 3.9 ms、分解能 0.42 pL という高速かつ高分解能な流体制御を用いて、ユーグレナの単一細胞ピックアップに成功している[5]。また、同論文にて、流体システムのモデル化と伝達関数の導出を行っている。しかし、従来研究において流体制御の台形波に対する動的応答は確認されているが、周波数応答に関する議論は行われておらず、流体制御の伝達関数の検討は行われていなかった。

本研究では、我々の提案したピエゾアクチュエータ駆動型のピペットの周波数応答特性を確認し、提案されたモデルの伝達関数のフィッティングを行う。実験の結果、周波数応答は2次遅れの傾向を示し、提案されたモデルの伝達関数と一致することが確認された。また、フィッティングの結果、固有周波数 330 Hz、減衰比 1.16 という値を得た。

2. 実験方法

2.1 バブルバルブを有する流路系のモデル化

遊泳細胞のピックアップにおいて、応答速度と分解能以外に、ピックアップした遊泳細胞を如何に同じ場所に留めておくのかということも重要な問題となる。遊泳細胞をピックアップした場合、図1(a)に示すように、細胞がキャピラリー上流へ逃げてしまう問題が起こり得る。そこで我々は、図1(b)に示すように、キャピラリー内に泡を閉じ込め、遊泳細胞を留めるバルブとして泡を利用する手法を提案してきた[5]。この手法において、泡によるピペット先端の流体制御への影響を検討するため、Sakumaらによって提案された流体制御モデル[6]を持ちいて、我々は流路内に泡を有する流体制御モデル(Extended flow reduction mechanism)を提案した[7]。

図1(c)に Extended flow reduction mechanism のモデルを示す。本モデルにおいて、流体システムが含む弾性項は仮想流路に集約され、減衰項は断面積が大幅に縮小する位置にて考慮される。図1(c)中の文字 A_i , x_i , \dot{x}_i および p_i は、それぞれ、各位置における断面積、変位、速度および圧力を示している。温度を一定、および泡を弾性体として仮定し、各構成要素間の力のつり合いおよび連続の式を考慮すると、以下の7つの式を得ることが出来る。

$$A_1 \dot{x}_1(t) = A_2 \dot{x}_2(t) + A_3 \dot{x}_3(t) \quad (1)$$

$$A_2 p_1(t) = k_v x_2(t) \quad (2)$$

$$A_1 p_1(t) - A_3 p_3(t) = c_v \dot{x}_3(t) \quad (3)$$

$$A_3 p_3(t) = k_b (x_3(t) - x_b(t)) \quad (4)$$

$$A_b p_b(t) = -k_b (x_3(t) - x_b(t)) \quad (5)$$

$$A_b p_b(t) = c_2 \dot{x}_4(t) \quad (6)$$

$$A_b \dot{x}_b(t) = A_4 \dot{x}_4(t) \quad (7)$$

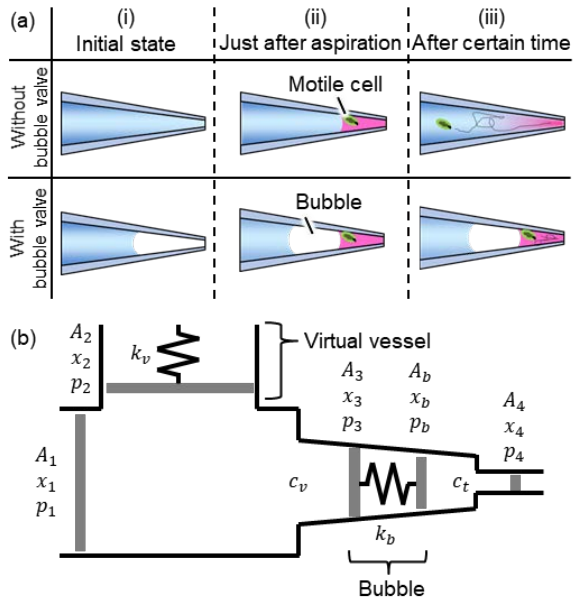


Fig. 1. Concept and model of the pipette with a bubble valve. (a) Concept of bubble valve to prevent a motile cell from escaping. (b) Model of the pipette based on the extended flow reduction mechanism.

$x_i(0) = 0$, $p_i(0) = 0$ の初期条件の仮定のもとラプラス変換することによって、以下の伝達関数を得ることが出来る。ただし p_i はゲージ圧である。

$$\frac{X_b(s)}{X_1(s)} = \frac{A_{12}A_{32}A_{4b} \cdot A_{13}}{s^2 + 2\xi\omega_n s + \omega_n^2} \quad (8)$$

ここで、 $X_i(s)$, A_{ij} , τ_1 , τ_b および τ_2 はそれぞれ、 $x_i(t)$ のラプラス変換、面積比 A_i/A_j , 時定数 c_v/k_v , c_t/k_v および c_t/k_b を示す。また、固有周波数 ω_n および減衰比 ξ は以下の式で表される。

$$\omega_n = \left(\frac{A_{12}A_{32}A_{4b}}{\tau_1\tau_b} \right)^{1/2} \quad (9)$$

$$\xi = \left(\frac{A_{12}A_{32}}{\tau_1} + \frac{A_{4b}}{\tau_b} + \frac{\tau_2}{\tau_1\tau_b} \right) / 2\omega_n \quad (10)$$

式(8)から、泡先端の伝達関数は2次遅れ系であることが確認できる。本モデルについて、周波数応答の実験を行い、モデルと実験結果の比較を行う。

2.2 実験システム

図2にピペットのコンセプト図と実験システムの概略図を示す。図2(a)に示すように、ガラスキャピラリーと piezoelectric actuator によってピペットを構成し、溶液を充填したガラスキャピラリーの根元に、金属棒を介して piezoelectric actuator を接続している。入力電圧を変化させて piezoelectric actuator の伸縮を制御することによって、図2(a-2)-2(a-4)のように、吐き出し、吸い込みのピペット操作を可能としている。図2(b)に実験セットアップの写真を示す。図2(b)に示すように、ピペットを電動 xy ステージを有する倒立顕微鏡の上に設置し、電動 z ステージによって高さを調節する。

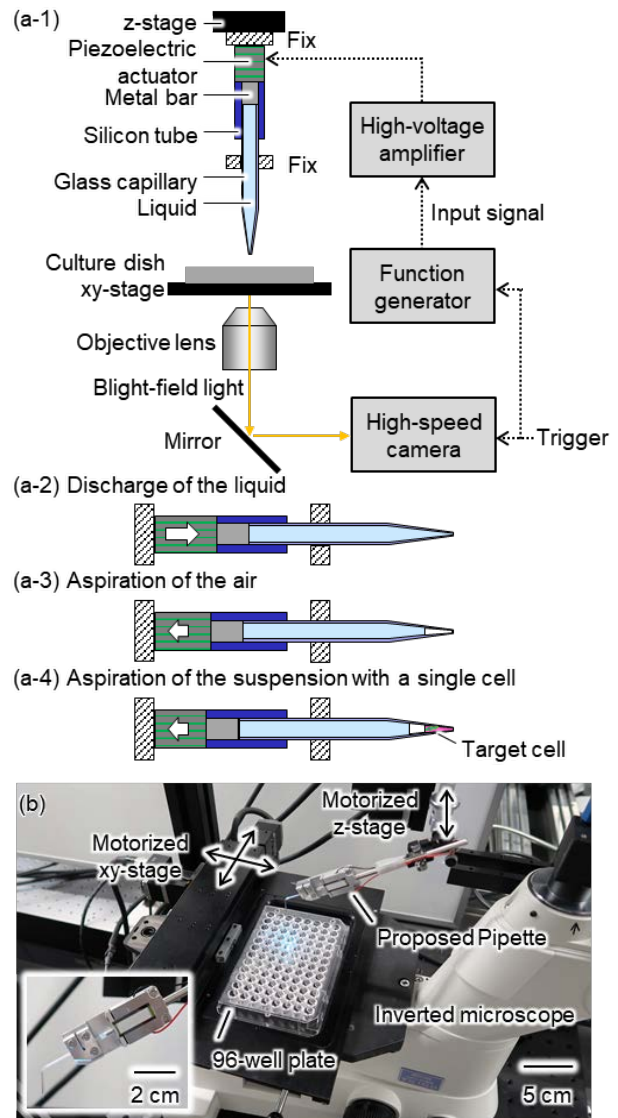


Fig. 2. Configuration of the proposed pipette and single cell pick-up system. (a-1) Schematic of the pipette and single cell pick-up system. (a-2) Discharge of the liquid. (a-3) Aspiration of the air. (a-4) Aspiration of suspension including a single cell. (b) Photograph of experimental setup.

従来研究において、本システムを用いて確認された分解能および応答速度を図3に示す[4]。分解能の評価のため、piezoelectric actuator に印加する電圧を変化させたときの電圧と制御体積の関係を図3(a)に示す。このとき、電圧と制御体積の比例定数は 16.6 pL/V であり、本システムにおいて、電圧の安定性が 25 mV であったため、分解能は 0.42 pL であった。

続いて、応答速度の評価のため、ピペット先端に粒子を配置し、粒子の変位から動的応答を確認した結果を図3(c)に示す。印可電圧の立ち上がり時間を変化させ応答時間の評価を行ったところ、立ち上がり時間 $100 \text{ }\mu\text{s}$ の場合において、応答時間 3.9 ms を達成している。以上の結果より、高速かつ高分解能な流体制御が可能であることが確認された。

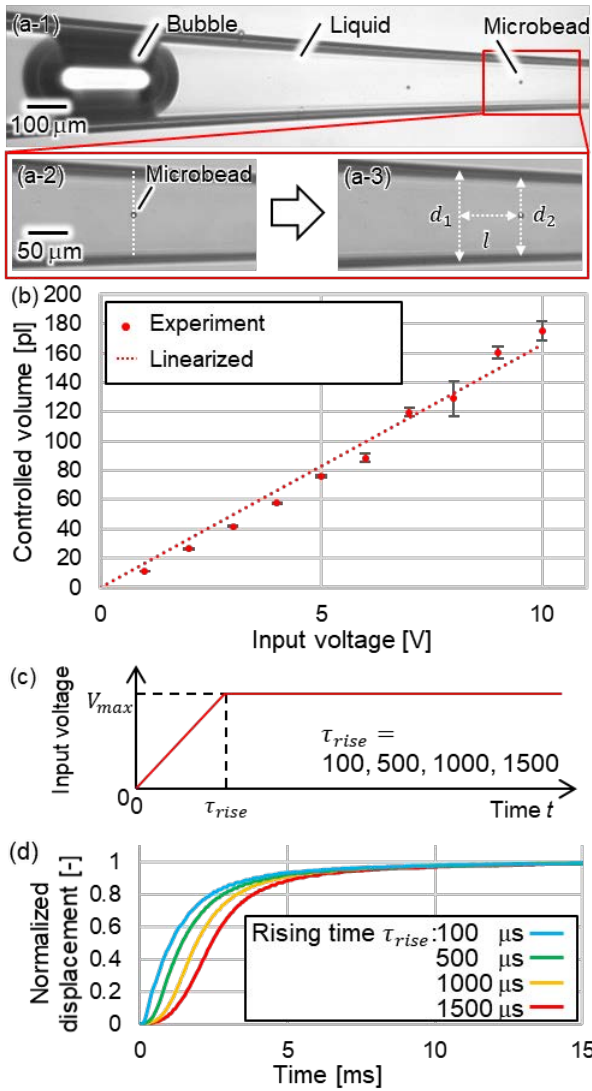


Fig. 3. Performances of the developed pipette. (a) Experimental photograph of volume control at the tip of the pipette. (b) Relationship between controlled volume and input voltage. (c) Applied voltage for evaluating dynamic response. (d) Dynamic response of the developed pipette.

3. 実験結果

周波数応答の実験を行った結果を図3に示す。振幅10Vのサイン波の電圧を印可し、周波数を変化させたときのバブルの先端の変位 x_2 の周波数応答を計測した。図4(a)に計測時のバブルの様子を示す。また、計測結果のゲイン線図と位相線図を図4(e), (f)に示す。図4(e), (f)より、バブルの先端の変位 x_2 のボード線図は、式(9)に示すような二次遅れ系の応答を示していることが確認された。ゲイン線図における計測結果に対し、最小二乗法近似を用いて式(9)をフィッティングしたところ、固有周波数 ω_v および減衰比 ξ はそれぞれ330 Hzおよび1.16であった。減衰比が1以上であり過減衰となっている点は、図3(b)の結果でオーバーシュートが無い点とも一致している。以上の結果より、Extended flow reduction mechanismのモデルと実験結果が同様の傾向を示すことを確認し、330 Hzという高い固有周波数で流体操作が可能であることが確認出

来た。

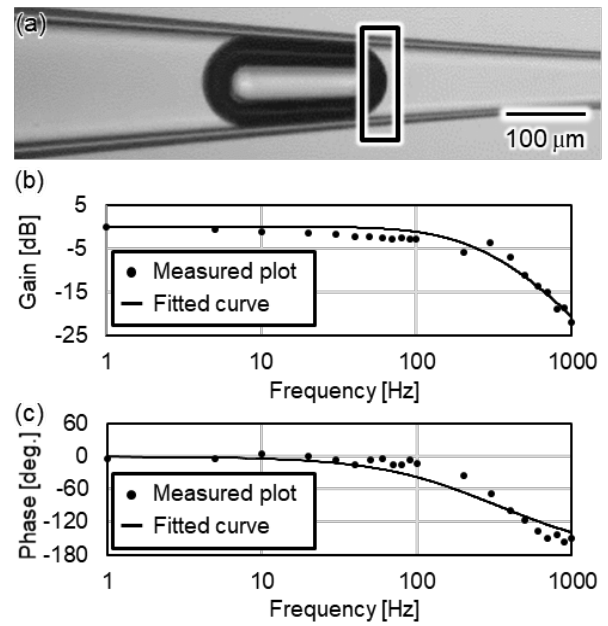


Fig. 4. Evaluation results of the frequency response of the developed pipette. (a) Photograph of the bubble valve for evaluation of the frequency response. (e) Gain plot. (f) Phase plot.

4. 結論

そこで本研究では、我々の提案したピエゾアクチュエータ駆動型のピペットの周波数応答特性を確認し、提案されたモデルの伝達関数のフィッティングを行う。実験の結果、周波数応答は2次遅れの傾向を示し、提案されたモデルの伝達関数と一致することが確認された。また、フィッティングの結果、固有周波数330 Hz、減衰比1.16という値を得た。以上の結果より、従来我々が開発したピペットは、共振ピークを持つことなく高周波領域で流体制御が可能であることが期待される。

謝辞

本研究は革新的研究開発プログラム (ImPACT) の助成を得て行われたものである。

参考文献

- [1] N.M. Toriello et al., Integrated microfluidic bioprocessor for single-cell gene expression analysis, Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 105, no. 51, pp. 20173-20178, 2008.
- [2] K. Yamada et al., Efficient selective breeding of live oil-rich *Euglena gracilis* with fluorescence-activated cell sorting, SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 26327, 8 pages, 2016.
- [3] A. Chen et al., Tunable electroosmosis-based femto-liter Pipette: A Promising Tool toward Living-Cell Surgery, Analytical Chemistry, vol. 89, no. 20, pp. 10806-10812, 2017.
- [4] Y. Anis et al., Diaphragm pico-liter pump for single-cell manipulation, Biomedical Microdevices, vol. 13, no. 4, pp.651-659, 2011.
- [5] Y. Kasai et al., Isolation of single motile cells using a high-speed picoliter pipette, Microfluidics and Nanofluidics, vol. 23, no. 18, 9 pages, 2019.
- [6] S. Sakuma et al., High resolution cell positioning based on a flow reduction mechanism for enhancing deformability mapping, Micromachines, vol. 5, no. 4, pp. 1188-1201, 2014.
- [7] S. Sakuma et al., "Extended Flow Reduction Mechanism", Proceedings of 29th 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, TA1_1_3, p. 186, 2018.