

細胞の特性計測・操作と応用

博士（工学） 新井 史人【編著】

コロナ社

組織工学ライブラリ

—マイクロロボティクスとバイオの融合—

編集委員会

新井 史人 (名古屋大学, 1 巻担当)

新井 健生 (大阪大学, 2 巻担当)

大和 雅之 (東京女子医科大学, 3 巻担当)

(2016 年 7 月現在)

編著者・執筆者一覧

編著者

新井 史人 (名古屋大学)

執筆者 (執筆順)

| | | | | | |
|------------|-----------------------|--|------------|-------------|----------------------|
| あら い 新井 | ふみひと 史人 | (名古屋大学, 1.1, 1.6, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1 節) | かわはら 川原 | ともひろ 知洋 | (九州工業大学, 2.2 節) |
| | | | やすかわ 安川 | ともゆき 智之 | (兵庫県立大学, 2.4, 3.5 節) |
| さく 佐久間 | ましんや 臣耶 | (名古屋大学, 1.1 節) | こづか 小塚 | てるゆき 晃透 | (愛知工業大学, 2.5 節) |
| Tsai 蔡 | Chia-Hung Dylan 佳宏 | (大阪大学, 1.2 節) | こじま 小嶋 | まさる 勝 | (大阪大学, 2.6 節) |
| かね 金子 | まこと 真 | (大阪大学, 1.2 節) | あら い 新井 | たつ お 健生 | (大阪大学, 2.6 節) |
| おかじま 岡嶋 | たかはる 孝治 | (北海道大学, 1.3 節) | ます だ 益田 | たいすけ 泰輔 | (名古屋大学, 3.1 節) |
| たかはし 高橋 | りょうすけ 亮輔 | (北海道大学, 1.3 節) | いりぐち 入口 | しょういち 翔一 | (京都大学, 3.2 節) |
| うめしま 梅嶋 | ひろ き 宏樹 | (京都大学, 1.4 節) | やまぐち 山口 | ともゆき 智之 | (東京大学, 3.2 節) |
| Yao 姚 | Jiafeng 佳烽 | (千葉大学, 1.5 節) | すず き 鈴木 | いくろう 郁郎 | (東北工業大学, 3.3 節) |
| たけ い 武居 | まさひろ 昌宏 | (千葉大学, 1.5 節) | やま だ 山田 | ますみ 真澄 | (千葉大学, 3.4 節) |
| まるやま 丸山 | ひさたか 央峰 | (名古屋大学, 1.6 節) | せき 関 | みのる 実 | (千葉大学, 3.4 節) |
| はやかわ 早川 | たけし 健 | (名古屋大学, 2.1, 2.3 節) | | | |

(2016 年 11 月現在)

刊行のことば

このたび「組織工学ライブラリー—マイクロロボティクスとバイオの融合—」を3巻のシリーズとして刊行いたしました。著者らが2011年7月から約5年をかけて取り組んだ文部科学省科学研究費補助金新学術領域「超高速バイオアセンブラ（略称：バイオアセンブラ）」プロジェクトが本ライブラリーの原点です。バイオアセンブラとは人工の3次元組織を生体外で構築し、生体としての機能を発現させるという革新的な取り組みです。作られた人工組織は再生医療や薬剤アッセイ、組織を対象とする試験や検査などに応用することができます。組織構築や細胞の計測制御にかかわるさまざまなプロセスにマイクロロボティクスの技術が活用されています。微小対象物の計測と制御を得意とするマイクロロボティクスの工学者、細胞や組織の培養や分析に携わる生物学者、そして人工組織を再生医療に活用しようとする医学者の三つの異分野の研究者が連携融合して、生体外で機能する人工3次元組織の構築に挑みました。プロジェクトは2016年3月に終了し、その主要な成果として本ライブラリーを刊行しました。

バイオアセンブラでは三つの重要な柱があります。

一番目は、生体外から取り出した単一細胞や細胞群の特性を見極めるということです。組織構築に使える細胞かどうかを判断するために短時間でその特性を計測し、有用な細胞や細胞群を高速により分けるための細胞特性計測と分離が必要です。第1巻では、これを細胞ソート工学と位置づけ、『細胞の特性計測・操作と応用』としてまとめています。

二番目は、単一細胞からさまざまな形状と機能を持つ3次元組織を組み立てるプロセスになります。細胞を紐状^{ひも}につなげて1次元の構造に、面状に並べて2次元に、これらを積み重ねて3次元組織を構築していきます。細胞塊を生体外で培養するとき、そのサイズがある一定以上になると内部の細胞には十分な酸素や栄養が行き届かなくなり壊死^えしてしまいます。酸素や栄養を補給するための適切な補給路、すなわち血管構造が必要となり、これをうまく内部に作りこむ必要があります。第2巻では、このような細胞の3次元組織を構築するためのさまざまな手法やツールを『3次元細胞システム設計論』としてまとめています。

最後の三番目は、上記のように人工的に作成した組織が、組織としての機能や性能を発揮することができるか、あるいはどのような条件で発現するかを見きわめる必要があります。これまでの再生医療や組織構築の研究で、生体内に移植して培養すると元の組織と適切に結合・融合して本来の組織の機能が発揮することが知られています。生体外条件 (*in vitro*)

ii 刊 行 の こ と ば

においていかに生体内条件 (*in vivo*) と同じ条件が作れるか、その培養方法と培養条件がポイントとなります。第3巻では、細胞どうしが協調、共存しあって組織としての機能を発現するという視点で、このような培養方法や機能発現の解明について『細胞社会学』としてまとめています。

プロジェクトでは上記三つの視点でそれぞれの方法論や学理を極めるとともに、これらを統合して計測分離から3次元組織の構築、そして機能発現までを通して実現し、さらにフィードバックするサイクルの検証までを実施しました。後者については、各巻の関連する部分においてそのつながりを示すようにしています。

バイオアセンブラのプロジェクトでは新しい原理の発見や革新的な手法の提案が行われ、数多くの学術成果が出されました。本ライブラリではそれらのエッセンスを示しながら、人工3次元組織の生体外構築に関わる知見と手法をまとめて紹介しています。本ライブラリがライフサイエンスのさらなる発展に寄与することができれば、著者一同望外の喜びです。発刊のお世話になりましたコロナ社の皆様、ならびにプロジェクトのご支援を頂きました文部科学省に謹んでお礼を申し上げます。

2016年6月

編 者 新井 健生
新井 史人
大和 雅之

まえがき

2011年7月から2016年3月までの約5年をかけて、文部科学省科学研究費補助金新学術領域「超高速バイオアセンブラ（略称：バイオアセンブラ）」が実施されました。本プロジェクトは、人工の3次元組織を生体外で構築し、生体としての機能を発現させるという革新的な取り組みであります。作られた人工組織は、再生医療や薬剤アッセイ、組織を対象とする試験や検査などに応用することを狙っています。このバイオアセンブラには三つの重要な柱があります。一番目は、人工組織を構成するための細胞の特性を計測してその特性を見きわめ、組織構築に使う細胞だけを分離することです。二番目は、単一細胞からさまざまな形状と機能を持つ3次元組織を組み立てるプロセスです。三番目は、人工的に作成した組織が、組織としての機能や性質を発揮することができるか、あるいはどのような条件で発現するかを見きわめることです。

本書では、特に一番目の細胞の特性を計測し、細胞を分離する点に焦点を当てています。ここでは細胞の特性に応じて特定の細胞を分離することを目的とした学問を「細胞ソート工学」として位置づけることとします。本書は、まず細胞を測るための計測技術をいくつか紹介し、つぎに細胞を分離するために適用可能なさまざまな操作技術を紹介します。そして、細胞の特性に応じて特定の細胞を分ける細胞分離技術を紹介します。

まず、細胞のどのような特性をどのように測るかですが、近年、顕微鏡の進歩とともに、細胞の特性を測る試みは数多くなされてきました。特に蛍光色素による染色技術の発展や超高解像度のイメージング技術の発展は目覚ましく、また、走査型プローブ顕微鏡による表面形状の計測技術の進歩も目覚ましいといえます。これらに関してはすでに多くの成書が出版されていますので、本書では、特にこれまであまり議論がされていない細胞の力学的特性や環境との力学的相互作用の計測に着目しました。ここでは、細胞の力学的特性は浮遊細胞と接着細胞に分けて計測手法を紹介します。また、細胞の電気的特徴量の計測についても紹介し、さらに、蛍光色素を用いて細胞の局所環境状態（pH、温度、酸素濃度など）を計測する方法を紹介します。

つぎに、細胞の分離に必要な細胞の操作技術について紹介します。細胞の計測結果や特性に基づいて、目的とする細胞もしくは目的としない細胞だけに力を加えることができれば細胞分離が達成できます。つまり、細胞の操作技術が細胞分離の基盤となるわけです。細胞操作技術にはさまざまな原理、方式があり、本書では非接触で細胞を操作する方式や、機

械式マイクロマニピュレータを用いる方式を紹介します。非接触で細胞を操作するための原理としては、光（レーザー）トラップ、磁場、音響流れ、誘電泳動、超音波などがあります。これらは直接的に細胞に力を加えることが可能ですが、人工的に製作した微小なツールに力を加えて、このツールを介して細胞を間接的に操作する方式もあります。これらは力の発生方式の違いで位置決め分解能や力の発生レンジ、発生範囲、さらには細胞への影響（ダメージ）が異なるため、目的に応じて適切な方式を用いることが必要です。

最後に、細胞の特性に応じて特定の細胞を分離する細胞分離技術の例をいくつか紹介します。細胞を分離する方式としては、以下の二つの方式に大別できます。

- (1) 細胞を一つずつ個別に計測し、その計測結果に基づいて分離する方式
- (2) 細胞の特性（細胞の免疫特性、力学的特性、電気的特性など）に応じて、特定の細胞だけを捕捉したり、特定の細胞だけに力を加えて操作することで分離する方式

ただし、(1)と(2)の組み合わせも考えられ、例えば、まず(2)によって分離もしくは固定したあとに(1)によって細胞を一つずつ計測し、ターゲットを絞り込むこともあります。どの分離手法も計測・操作の原理に由来して一長一短があるため、実際は目的に応じて適切な方式を選択することになります。ここで、(1)の方式は、なにをどう計測するかとか、計測パラメータの数が増えるほど計測の速度が鍵となります。(2)の方式は、特定の細胞だけをいかに捕捉もしくは操作するかが鍵となります。どちらの技術にも共通して重要な点は、組織構築に使う分離細胞にダメージがないことといえます。

作られた人工組織を、再生医療や薬剤アッセイ、組織を対象とする試験や検査などに応用するには、人工組織を構成するための部品としての細胞の選択はきわめて重要であり、細胞の特性に応じて特定の細胞を分離することを目的とした「細胞ソート工学」が重要となります。本書では、細胞を測るための計測技術、細胞を分離するために適用可能なさまざまな操作技術、そして、細胞の特性に応じて特定の細胞を分ける細胞分離技術を紹介し、体系的にまとめました。また、これらの技術は多くの応用例が考えられており、適宜紹介しました。本書が今後の組織構築と再生医療の発展に資することを執筆者一同が願っています。

2016年10月

編者 新井 史人

目 次

1. 細胞の特性を測る

| | | |
|-------|-----------------------------|----|
| 1.1 | マイクロ流体チップによる浮遊細胞の力学特性の精密計測 | 1 |
| 1.1.1 | ハイスループットを可能とするマイクロ流体チップ | 1 |
| 1.1.2 | マイクロ流体チップを用いた細胞の力学特性計測 | 4 |
| 1.1.3 | 細胞の力学特性の精密計測のためには | 8 |
| 1.1.4 | ロボット統合型マイクロ流体チップを用いた浮遊細胞計測 | 10 |
| 1.1.5 | おわりに | 13 |
| | 引用・参考文献 | 14 |
| 1.2 | 浮遊細胞の力学的指標の高速計測 | 16 |
| 1.2.1 | はじめに | 16 |
| 1.2.2 | パッシブ計測手法 | 18 |
| 1.2.3 | アクティブ手法による細胞疲労試験 | 24 |
| 1.2.4 | 考 察 | 29 |
| 1.2.5 | おわりに | 29 |
| | 引用・参考文献 | 29 |
| 1.3 | 原子間力顕微鏡を用いた細胞の力学特性計測 | 30 |
| 1.3.1 | 原子間力顕微鏡 | 30 |
| 1.3.2 | AFMを用いた細胞の力学特性計測 | 31 |
| 1.3.3 | ソフトガラスレオロジー理論 | 36 |
| 1.3.4 | 多数細胞間レオロジーのばらつき | 36 |
| 1.3.5 | 細胞内レオロジーの空間分布 | 40 |
| | 引用・参考文献 | 41 |
| 1.4 | 牽引力顕微鏡法を用いた細胞と基質の界面における力の計測 | 43 |
| 1.4.1 | はじめに | 43 |
| 1.4.2 | シリコーン基質を用いた計測 | 45 |
| 1.4.3 | マイクロピラーアレイによる計測 | 46 |
| 1.4.4 | ポリアクリルアミドゲルを用いた計測 | 46 |
| 1.4.5 | 生体高分子ゲルを用いた計測 | 47 |
| 1.4.6 | おわりに | 54 |
| | 引用・参考文献 | 54 |
| 1.5 | 浮遊細胞の電気的特徴量の計測 | 56 |
| 1.5.1 | はじめに | 56 |

| | | |
|-------------------|--------------------------|------------|
| 1.5.2 | 細胞の誘電特性の計測 | 58 |
| 1.5.3 | 流れ場における細胞の分布計測 | 63 |
| 1.5.4 | おわりに | 65 |
| | 引用・参考文献 | 66 |
| 1.6 | 細胞の蛍光計測 | 68 |
| 1.6.1 | はじめに | 68 |
| 1.6.2 | 蛍光の原理 | 68 |
| 1.6.3 | 蛍光に影響を及ぼす要因 | 70 |
| 1.6.4 | 蛍光計測法の分類 | 72 |
| 1.6.5 | マルチパラメータ計測用蛍光センサビーズ | 76 |
| 1.6.6 | マウス卵子酸素消費速度の蛍光計測チップ | 79 |
| 1.6.7 | おわりに | 84 |
| | 引用・参考文献 | 84 |
| 2. 細胞を操作する | | |
| 2.1 | 光による操作 | 87 |
| 2.1.1 | はじめに | 87 |
| 2.1.2 | 光による細胞操作の分類 | 87 |
| 2.1.3 | 光圧による細胞操作 | 89 |
| 2.1.4 | そのほかの操作 | 102 |
| 2.1.5 | おわりに | 108 |
| | 引用・参考文献 | 108 |
| 2.2 | 磁気駆動マイクロロボットによる操作 | 110 |
| 2.2.1 | はじめに | 110 |
| 2.2.2 | 駆動方式による分類 | 111 |
| 2.2.3 | 磁気駆動ロボットの駆動性能向上のための方策 | 114 |
| 2.2.4 | 細胞操作への応用 | 122 |
| 2.2.5 | おわりに | 123 |
| | 引用・参考文献 | 123 |
| 2.3 | 音響流れによる操作 | 126 |
| 2.3.1 | はじめに | 126 |
| 2.3.2 | 定常表面弾性波 (SSAW) による操作 | 129 |
| 2.3.3 | 進行表面弾性波 (TSAW) による操作 | 131 |
| 2.3.4 | 一軸振動誘起流れによる操作 | 134 |
| 2.3.5 | 多軸振動誘起流れによる操作 | 135 |
| 2.3.6 | おわりに | 143 |
| | 引用・参考文献 | 145 |

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 2.4 誘電泳動による操作 | 147 |
| 2.4.1 はじめに | 147 |
| 2.4.2 誘電泳動の原理 | 148 |
| 2.4.3 誘電泳動デバイスの作製技術 | 152 |
| 2.4.4 細胞操作のための誘電泳動デバイス | 152 |
| 2.4.5 3次元電極を用いた細胞操作の拡張 | 156 |
| 2.4.6 おわりに | 158 |
| 引用・参考文献 | 158 |
| 2.5 超音波による操作 | 160 |
| 2.5.1 はじめに | 160 |
| 2.5.2 超音波音場 | 161 |
| 2.5.3 定在波音場中での微小物体の捕捉 | 164 |
| 2.5.4 超音波マニピュレーション | 168 |
| 2.5.5 おわりに | 174 |
| 引用・参考文献 | 175 |
| 2.6 機械式マイクロマニピュレータによる操作 | 176 |
| 2.6.1 はじめに | 176 |
| 2.6.2 二本指マイクロハンドの概要 | 177 |
| 2.6.3 マイクロハンド設計・開発 | 180 |
| 2.6.4 振動解析 | 186 |
| 2.6.5 可動範囲評価 | 188 |
| 2.6.6 おわりに | 190 |
| 引用・参考文献 | 190 |

3. 細胞分離への応用

| | |
|-------------------------------|-----|
| 3.1 気液界面を用いた細胞分離 | 193 |
| 3.1.1 はじめに | 193 |
| 3.1.2 移流集積法 | 194 |
| 3.1.3 移流集積による微粒子配列 | 195 |
| 3.1.4 気液界面を利用したパターン配列 | 196 |
| 3.1.5 気液界面を利用した希少細胞の分離 | 198 |
| 3.1.6 おわりに | 200 |
| 引用・参考文献 | 200 |
| 3.2 閉鎖系高速細胞解析分離 | 203 |
| 3.2.1 はじめに | 203 |
| 3.2.2 循環がん細胞 | 205 |
| 3.2.3 出生前診断による胎児の染色体異常の検出 | 206 |
| 3.2.4 血液中希少細胞の検出の問題点と解決策 | 206 |

| | | |
|------------|---------------------------------|------------|
| 3.2.5 | マイクロ流路と超高速画像処理システムを用いた血液細胞の物性解析 | 207 |
| 3.2.6 | おわりに | 210 |
| | 引用・参考文献 | 212 |
| 3.3 | マイクロ流体チップを用いた細胞カプセルの分離 | 213 |
| 3.3.1 | はじめに | 213 |
| 3.3.2 | ビーズ表面を利用した細胞培養とセンシング | 215 |
| 3.3.3 | 細胞のカプセル化培養技術 | 217 |
| 3.3.4 | マイクロ流路型セルソーター | 218 |
| 3.3.5 | cell ball ソーティング | 221 |
| | 引用・参考文献 | 223 |
| 3.4 | 流体力を利用した細胞のソーティング | 224 |
| 3.4.1 | はじめに | 224 |
| 3.4.2 | 大きさを利用した細胞の選抜 | 227 |
| 3.4.3 | 水力学的フィルトレーション | 229 |
| 3.4.4 | 格子状流路の利用 | 232 |
| 3.4.5 | 表面マーカーを利用した細胞の選抜 | 233 |
| 3.4.6 | おわりに | 235 |
| | 引用・参考文献 | 236 |
| 3.5 | 電場を利用した細胞分離 | 237 |
| 3.5.1 | はじめに | 237 |
| 3.5.2 | 誘電泳動ピンセット | 238 |
| 3.5.3 | マイクロ流路システムに誘電泳動を組み込んだ細胞分離 | 239 |
| 3.5.4 | 免疫反応を利用した細胞分離 | 245 |
| | 引用・参考文献 | 247 |
| 索 引 | 引 | 249 |

1.

細胞の特性を測る

▶ 1.1 マイクロ流体チップによる浮遊細胞の力学特性の精密計測 ◀

1.1.1 ハイスループットを可能とするマイクロ流体チップ

近年、細胞の特性は、顕微鏡から得られる画像情報をもとに機械式マイクロマニピュレータを用いた操作によって計測されてきた。これらのロボット技術を基盤とする微細操作によって、同一環境で培養された細胞集団の計測の場合においても、**図 1.1** に示すように細胞の特性にばらつきが存在し、いわゆる“ユニークな細胞”の存在が明らかとなってきた^{1)†}。そこで、単一の細胞や、単一の細胞凝集体、さらには単一の微生物など、極微小な単一生物サンプルの計測技術に注目が集まってきた^{2)~4)}。一方で、細胞などの極微小な単一生物サンプルを計測するには、単一細胞レベルで操作・解析する必要がある。最近では、マイクロ・ナノ技術の発展とともに、単一細胞レベルでの力学的操作が可能となり、細胞の特性計測に貢献してきた。特に、単一細胞レベルの力学的操作技術の大きな貢献は、細胞の力学特性計測技術の発展であるといえる。細胞の弾性や粘性といった機械的特徴量は、生体の疾患や、細胞そのものの状態との依存関係があるといった報告がある。例えば、卵子の透明帯の硬さは、細胞周期に応じて変化する⁵⁾ということが報告されている。また、マラリアの感染⁶⁾や、糖尿病患者⁷⁾では、赤血球の変形能が低下する兆候が見られるなどといった報告がある。つまり、細胞の力学特性計測は、細胞そのものの弾性や粘性といった機械的特徴量の評価だけでなく、生体の疾患の検査や薬効評価にも貢献し得る技術であると考えられる⁸⁾。

近年の単一細胞計測に関する研究結果が示唆するように、細胞集団はユニークな単一細胞の集団であると考えられる。すなわち、細胞の弾性や粘性、もしくは大きさといった個々の細胞の力学特性は、**図 1.2 (a)** のようなばらつきを持つデータであることが予想される。

† 肩付き数字は、節末の引用・参考文献の番号を表す。

2 1. 細胞の特性を測る

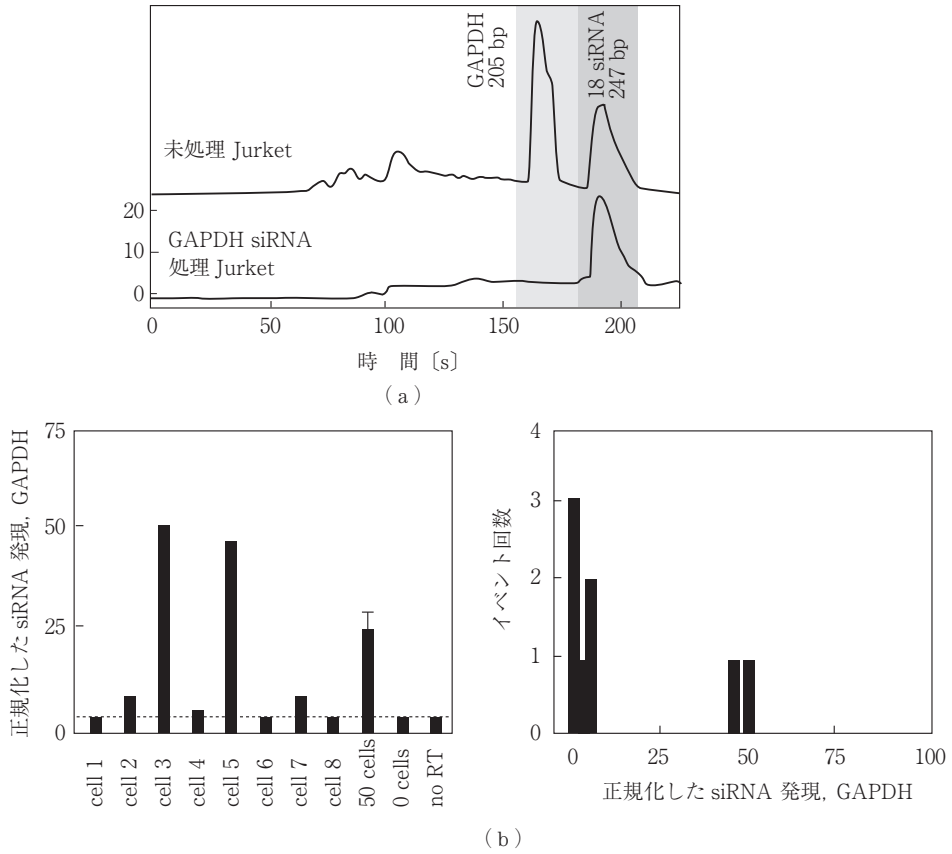


図 1.1 単一細胞計測による集団の中のユニークな細胞の例¹⁾

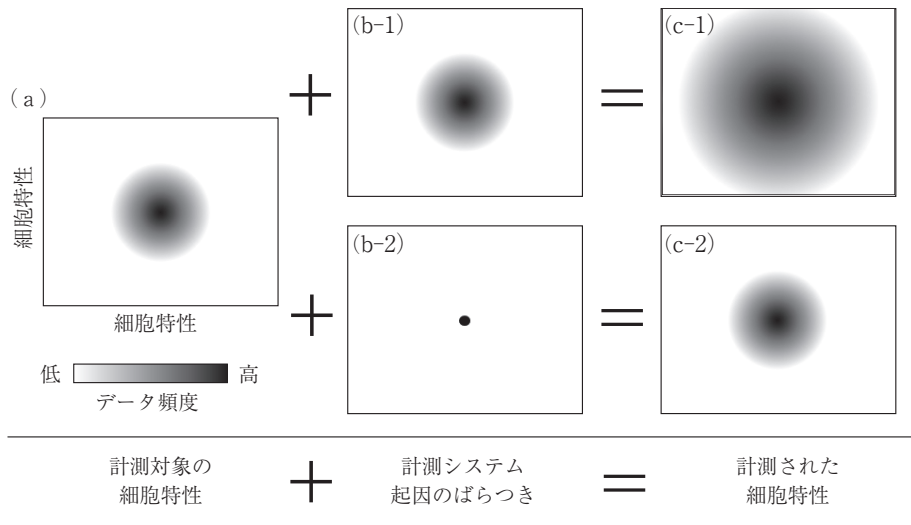


図 1.2 計測系のばらつきが計測結果に与える影響の概念図⁹⁾

一般に、これらの対象を計測するには、計測系の計測ばらつきがデータに付与されることが考えられる。わかりやすい例を挙げれば、顕微鏡を通して得られる画像データから計測される細胞の大きさといったデータは、光の分解能などの影響から少なくとも数百ナノメートルのばらつきを持つことが考えられる。もちろん、この計測ばらつきは、測定対象の大きさが計測ばらつきに対して非常に大きい場合は、大きな問題とならないが、一般に、細胞の大きさは数十マイクロメートルであり、たとえシンプルなサイズ計測においても数パーセントのばらつきを持つことになる。したがって、図 (b) に示すように、細胞の特性計測においては、計測ばらつきを含んだデータを細胞の特性ばらつきとして計測することになる。つまり、図 (c) に示すように、計測系のばらつきを小さくすることが、細胞の特性を精密に計測することに強く貢献できると考えられる⁹⁾。

最も有名な機械式マイクロマニピュレータを用いた単一細胞計測技術の一つは、図 1.3 に示すような、1954 年に Mitchison らによつてはじめて報告されたマイクロピペット吸引法を用いたウニの卵子計測である¹⁰⁾。この方法では、細胞の大きさより小さな内径を有するマイクロピペットを用いて細胞を吸引し、そのときの吸引圧力と変形形状から、細胞の硬さを算出する。高精度・高出力・多自由操作が可能な機械式マイクロマニピュレータと、顕微鏡の外部に配置した精密な圧力制御システムを用いることで、複雑な細胞計測を顕微鏡の焦点面に限定した状態で細胞を一つずつ操作し、細胞に精密に吸引圧力を印加した際の変形の様

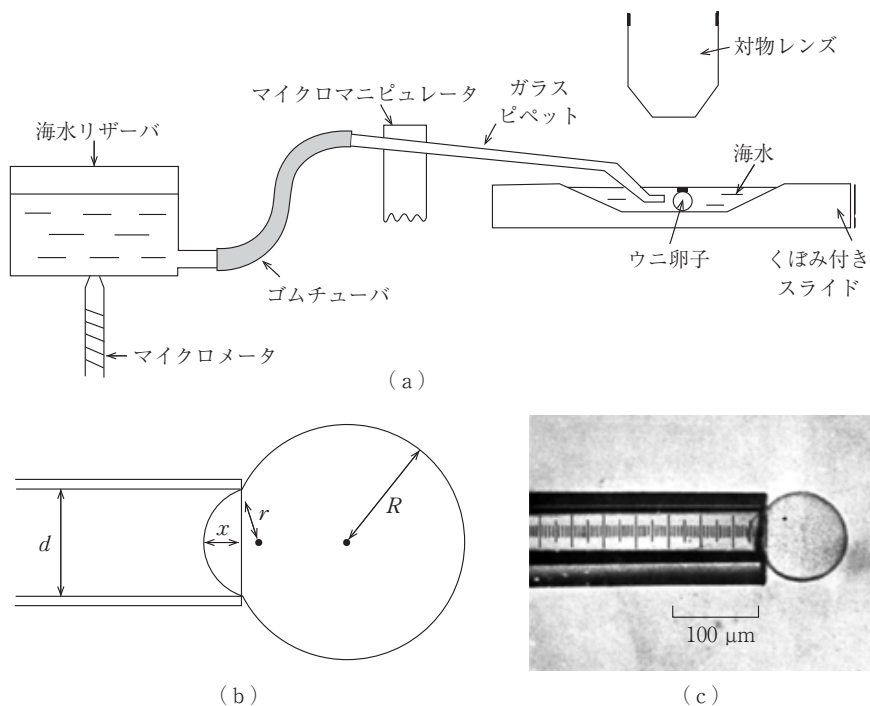


図 1.3 マイクロピペット吸引法によるウニの卵子計測¹⁰⁾

4 1. 細胞の特性を測る

子を精密に計測することが可能である。現在までに、マイクロピペット吸引法を用いた、浮遊細胞の多数の力学特性計測が報告されている^{10)~13)}。

一方で、その計測作業の多くは人手によるものであり、操作技術の習熟を要因とする、操作中に生じる流体移動に伴う計測のばらつきの増大や、スループットの低下、さらには操作者間での再現性の向上などの課題があった。これらの要因から、単一細胞の特性計測においては、再現性の高いハイスループット計測が強く求められてきた。

そこで近年、micro total analysis systems (μ TAS) や、lab-on-a-chip (LOC) に代表されるような、マイクロフルイディクスを基盤としたマイクロ流体チップを用いたハイスループットな細胞の特性計測が提案されてきた。この方式においては、マイクロ流体チップ中に配置したマイクロ流路を搬送系として細胞を連続的に導入することで細胞の特性計測を行う。マイクロ流路内は、マイクロ・ナノ領域において特徴的な、低レイノルズ数環境となるため、環境制御が容易で、かつ予期しない流体移動などの問題を解決できるため、きわめてばらつきの少ない再現性の高い安定した計測環境が実現できる。すなわち、マイクロ流体チップを用いることで、計測ばらつきの少ない細胞の特性計測を行うことができ、細胞特性計測のスループットを飛躍的に向上することが可能であると考えられる。

以上の背景を踏まえ、本節では、マイクロ流体チップを安定した計測環境として用いて細胞の力学特性を計測する技術について紹介する。

1.1.2 マイクロ流体チップを用いた細胞の力学特性計測

細胞を計測対象として考えると、その形態は接着状態と浮遊状態に大きく分けられる。接着状態の細胞計測の詳細は1.3節に譲るが、代表的な計測手法としては、atomic force microscopy (AFM)^{14),15)} や、磁性体を用いたレオロジー解析^{16)~20)} といった方法が挙げられる。特に AFM を用いた方式では、空間分解能が高いので、単一の細胞内の力学特性のマッピングが可能であるため、接着細胞の細胞骨格などの評価に広く用いられている。AFM を用いた手法においては、高精度かつ高空間分解能な計測が可能である反面、スキャンングの速度に時間を必要とするため、浮遊状態の細胞をハイスループットに計測することは困難であるといえる。そこで、本項では浮遊状態での細胞の力学特性計測について考える。

マイクロ流体チップを用いた細胞の機械的特徴量計測について考えると、計測方式は計測指標の対象に関して間接対象方式と直接対象方式に大きく分けることができる。間接対象方式に関しての詳細は1.2節で議論されるが、例えば、マイクロ流路に対して赤血球などの比較的軟らかい細胞を導入し、マイクロ流路に狭窄部を設けることで幾何学的に細胞に力を印加し、そのときの細胞の挙動から機械的特徴量を指標化する方式である^{21)~23)}。高速度カメラを用いて、細胞がマイクロ流路内に設けた狭窄部を通過する際の、通過時間、通過形状な

などを計測し、これらを機械的特徴量の指標として計測する。この方式では、マイクロ流体チップの安定した低レイノルズ数環境を用いて、いわば細胞を流路に流すだけで計測できるため、きわめてハイスループットな計測が可能である。しかし、例えば卵子や核を有する細胞など、比較的硬い細胞に適応することを考えると、幅の固定されたマイクロ流体チップを用いるため、狭窄部での細胞が詰まるといった課題がある。また、狭窄部のない計測方式として、流体力を用いて細胞を変形させ、細胞の形状の硬さを指標化する研究が行われている²⁴⁾。

これは、十字路を有するマイクロ流路に対して細胞を導入し、一对の対抗する流れを用いて、細胞を圧縮することで、細胞を変形させ、このときの変形量に応じて細胞の硬さを指標化する方式である。レイノルズ数が10程度の高速な搬送流を用いるため、流体制御のばらつきや、マイクロ流路内での細胞の位置決めが難しいことから、計測データのばらつきが大きいといった課題があるが、非常にハイスループットな計測が可能である (図 1.4)。

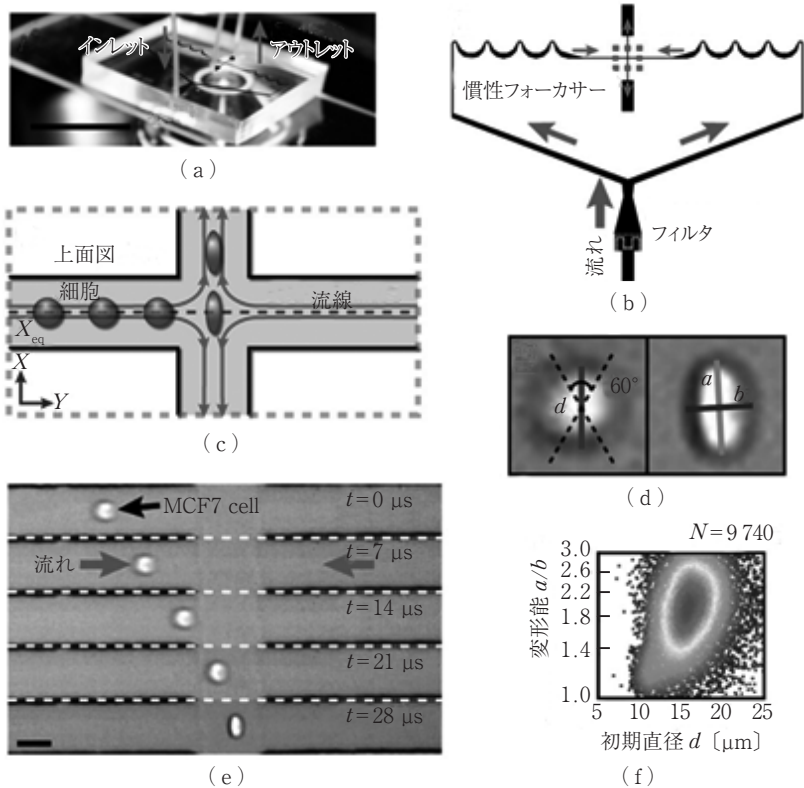


図 1.4 高速流体環境を用いた細胞の力学特性計測²⁴⁾

一方で、直接対象方式とは、細胞を変形させたときの反力を計測することで、細胞の弾性や粘性といった力学特性を直接に計測する方式である。マイクロ流体チップ内のきわめて安

索引

| | |
|-----------------------|--------|
| 【あ】 | |
| アクチン | 44 |
| 【い】 | |
| 位相-強度変換フィルタ | 94 |
| 位相シフトインデックス | 12 |
| 移流集積法 | 194 |
| インピーダンススペクトロ スコピー法 | 56 |
| 【お】 | |
| 応力緩和計測法 | 31 |
| 音響流れ | 126 |
| 音響放射圧 | 160 |
| 【か】 | |
| 画像補間 | 50 |
| カプセル化培養技術 | 217 |
| 間接操作 | 88 |
| 緩和計測法 | 31 |
| 緩和弾性率 | 33 |
| 【き】 | |
| 気液界面 | 194 |
| 機械式マイクロマニピュ レータ | 1, 176 |
| 機械的特徴量 | 1 |
| 【く】 | |
| 空間位相変調器 | 94 |
| クリープ計測法 | 31 |
| クリープコンプライアンス | 33 |
| 【け】 | |
| 蛍光活性化細胞ソーティング | 225 |
| 蛍光計測 | 68 |
| 蛍光寿命 | 70 |
| 決定論的側方変位 | 227 |
| 牽引力顕微鏡法 | 45 |
| 【こ】 | |
| 光圧 | 87 |
| 交差周波数 | 151 |
| 光電気相互作用 | 88 |

| | |
|--------------------------|-----|
| 光熱相互作用 | 88 |
| 光量子収率 | 69 |
| 【さ】 | |
| 酸素消費速度 | 79 |
| サンプリングモアレ法 | 10 |
| 【し】 | |
| 磁気駆動方式マイクロ ロボット | 110 |
| 時分割スキヤニング法 | 93 |
| 循環がん細胞 | 203 |
| 除核作業 | 122 |
| 振動誘起流れ | 128 |
| 【す】 | |
| 水力学的フィルトレーション | 229 |
| ストレスファイバー | 44 |
| 【せ】 | |
| 静的粘弾性計測法 | 34 |
| 正の誘電泳動 | 150 |
| 赤血球疲労試験 | 24 |
| 接着状態 | 4 |
| 接着斑 | 44 |
| 線形相互作用 | 88 |
| 【そ】 | |
| 損失弾性率 | 34 |
| 【た】 | |
| 多重周波数フォースモジュレ ーション計測法 | 35 |
| 多点操作光ピンセット | 93 |
| 【ち】 | |
| 直接操作法 | 88 |
| 貯蔵弾性率 | 34 |
| 【て】 | |
| 電気泳動 | 148 |
| 【と】 | |
| 動的粘弾性計測法 | 34 |

| | |
|-----------------------|---------|
| 【に】 | |
| 二本指マイクロハンド | 176 |
| 【は】 | |
| 胚操作技術 | 122 |
| 発蛍光速度定数 | 69 |
| パラレルメカニズム | 179 |
| パラレルリンク機構 | 179 |
| 【ひ】 | |
| 光退色 | 71 |
| 光てこ法 | 31 |
| 光ばね定数 | 6 |
| 光ピンセット | 6, 88 |
| 微小流体力学 | 226 |
| 非接触操作 | 87 |
| 非線形光学現象 | 88 |
| 表面弾性波 | 127 |
| ピンチドフローフラクショ ネーション | 227 |
| 【ふ】 | |
| フィールドフロー分別法 | 241 |
| フォースカーブ計測法 | 31 |
| フォースモジュレーション 計測法 | 31 |
| 複素弾性率 | 34 |
| 不定特異点 | 181 |
| 負の誘電泳動 | 150 |
| 浮遊状態 | 4 |
| フローサイトメトリー | 56, 225 |
| 【へ】 | |
| ヘルツの接触モデル | 9 |
| ヘルムホルツコイル | 112 |
| 【ほ】 | |
| 放射圧 | 87 |
| ポリアクリルアミドゲル | 46 |
| 【ま】 | |
| マイクロピペット吸引法 | 3 |
| マイクロフルイディクス | 226 |
| マイクロ流体チップ | 4 |

マイクロ流路 4

【み】

ミオシン 44

【む】

無輻射失活速度定数 69

【め】

メニスカス 194

【も】

モアレ縞 10

モル吸光係数 69

【ゆ】

誘電泳動 147

誘電泳動ピンセット 238

【よ】

葉状仮足 44

溶媒和 70

【ら】

ランベルト・ベールの法則 69

【れ】

レシオ計測 74

【ろ】

ロボット統合型マイクロ流体
チップ 6

【A】

acoustic streaming 126

AFM 4

atomic force microscopy 4

【B】

bicubic 法 50

bilinear 法 50

【C】

castellated 電極 153

cell ball 221

CEP 25

CGH 94

Clausius-Mossotti 因子 150

close encountering point 25

CM 因子 150

computer generated
hologram 法 94

CTCs 203

【D】

DEP-FFF 241

deterministic lateral
displacement 227

durotaxis 43

【E】

ECM タンパク質 48

【F】

FACS 225

FITC 77

Fluorescein isothiocyanate 77

【G】

generalized phase
contrast 法 93

GPC 94

【H】

Hanai Cell Model 56

highest occupied molecular
orbital 69

HOMO 69

hysteresivity 35

【I】

image interpolation 50

interdigitated 電極 154

【L】

lab-on-a-chip 4, 147

lamellipodia 44

LOC 4, 147

lowest unoccupied molecular
orbital 69

LUMO 69

【M】

MEMS 6

micro-electro-mechanical-
systems 6

micro total analysis
systems 4, 147

【N】

nearest neighboring 法 50

negative-DEP 150

【O】

OCR 79

oxygen consumption rate 79

【P】

particle image velocimetry 50

particle tracking

velocimetry 50

PCF 94

phase-contrast filter 94

pinched flow fractionation 227

PIV 50

polynomial 電極 153

positive-DEP 150

power-law structural damping
model 35

PTV 50

【R】

Rhodamine B 77

【S】

SAW 127

SGR 理論 36

SLM 94

soft glassy rheology 36

spatial light modulator 94

Sulfo-SANPAH 49

sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-
2'-nitrophenylamino)

hexanoate 49

surface acoustic wave 127

【T】

time-shared scanning 法 93

TSS 93

【μ】

μ TAS 4, 147

— 編著者略歴 —

1986年 東京理科大学工学部機械工学科卒業
1988年 東京理科大学大学院工学研究科修士課程修了（機械工学専攻）
富士写真フィルム株式会社入社
1989年 名古屋大学助手
1993年 博士（工学）（名古屋大学）
1994年 名古屋大学講師
1998年 名古屋大学助教授
2005年 東北大学教授
2010年 名古屋大学教授
現在に至る

細胞の特性計測・操作と応用

Measurement of Cell Property
and Manipulation of Cells

© Fumihito Arai 2016

2016年12月22日 初版第1刷発行

★

検印省略

編著者 あら い み ひと
新井史人
発行者 株式会社 コロナ社
代表者 牛来真也
印刷所 萩原印刷株式会社

112-0011 東京都文京区千石 4-46-10

発行所 株式会社 コロナ社

CORONA PUBLISHING CO., LTD.

Tokyo Japan

振替 00140-8-14844・電話 (03) 3941-3131 (代)

ホームページ <http://www.coronasha.co.jp>

ISBN 978-4-339-07261-7

（柏原）（製本：愛千製本所）

Printed in Japan



本書のコピー、スキャン、デジタル化等の無断複製・転載は著作権法上での例外を除き禁じられております。購入者以外の第三者による本書の電子データ化及び電子書籍化は、いかなる場合も認めておりません。

落丁・乱丁本はお取替えいたします