



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on High-Speed Measurement of Cell Rheology Using Atomic Force Microscopy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高橋, 亮輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第12404号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63340
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryosuke_Takahashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（情報科学） 氏名 高橋 亮輔

学 位 論 文 題 名

原子間力顕微鏡による細胞レオロジー測定的高速化に関する研究

(Study on High-Speed Measurement of Cell Rheology Using Atomic Force Microscopy)

近年, 原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy (以下 AFM)) によるイメージング測定やマッピング測定によって, 細胞内弾性率の不均一性が観察されている。AFM イメージング測定では現在, 数 nm という高い空間分解能で細胞の弾性率を測定することが可能となっている。しかしながら, その弾性率は, カンチレバーの共振周波数における値に限定されている。細胞は低周波数領域 (< 1kHz 程) において, べき乗則に則ったレオロジーの周波数特性を示す。このような細胞レオロジーはべき乗則モデルである power-law structural damping model を用いて, 弾性率のスケール因子, べき指数, ニュートン粘性係数という 3 つの変数で表される。細胞レオロジーを測定する手法として, 周波数掃引フォースモジュレーション法が広く用いられている。先行研究において周波数掃引フォースモジュレーション法を用いて, 細胞内レオロジーマッピング測定が行われた。しかしながら, 複数の周波数成分を段階的に変化させて計測する本手法は, 1 点あたりの測定に数秒から数十秒を要する。フォースモジュレーション測定的高速化が可能になれば, 高い空間分解能での細胞レオロジーの周波数特性計測によって, 細胞構造と細胞レオロジーとの関係を明らかにすることが可能となると期待される。そこで, 本研究では (1) 周波数成分を同時に計測することが出来る多重周波数フォースモジュレーション法の開発を行った。多重周波数フォースモジュレーション法の性能評価として, 周波数成分の重ね合わせによる非線形な増幅効果がないことを, 多重周波数フォースモジュレーション法と周波数掃引フォースモジュレーション法によるシリコン基板レオロジー測定によって示した。また, 多重周波数フォースモジュレーション法によってレオロジー測定にかかる時間が 1 秒程度となり, 単一周波数でのフォースモジュレーション測定と同程度となった。更に, 多重周波数フォースモジュレーション法を用いて細胞内レオロジーマッピング測定を行った。細胞内レオロジーマッピング測定によって, 細胞レオロジーの局所的な変化が観察され, アクチンフィラメントや細胞核などの内部構造と関係している可能性が示唆された。

AFM 細胞レオロジー測定では, フォースモジュレーション法による周波数領域測定だけでなく, 応力緩和測定やクリープ測定といった時間領域測定も広く行われている。細胞の緩和弾性率, クリープコンプライアンスは数 10 ミリ秒から数 10 秒といった長いタイムスケールで単一のべき挙動として観察される。近年の研究で, AFM クリープ測定において観測時間を短くすることで, 高い空間分解能で細胞内レオロジーマッピング測定が行われた。しかしながら, AFM 時間領域測定では, 細胞に力がかかってから観測を開始するまでの間に遅延時間が生じている。この遅延時間による影響はこれまで定量的に明らかにされていなかった。そこで, 本研究では多重周波数フォースモジュレーション測定と応力緩和測定の同時測定によって周波数および時間領域の細胞レオロジーを比較

した。時間領域で測定されたべき指数は周波数領域で測定されたべき指数よりも低くなる傾向となった。また、その原因として遅延時間によって時間領域でべき指数が過小見積もりされることを定量的に示した。

また、細胞の力学物性には大きな個体差があり、その物性の平均と偏差は細胞種や細胞疾患の状態によって異なる。従って、細胞力学物性の個体差を精密に定量化することで、1細胞単位で細胞疾患を診断することが可能になると期待されている。細胞間の個体差を定量化するためには、多数の細胞のレオロジーを測定することが必要である。一般的な市販の AFM 装置は局所領域で高い空間分解能の測定に適しているが、多数細胞計測には適していない。走査範囲は広範囲操作可能な市販 AFM において $100\mu\text{m}$ 程である。そのため、数 $100\mu\text{m}$ から数 mm の領域に存在する多数の細胞を測定する場合、測定位置を何度も手動で調整する必要があり、測定時間が冗長であった。特に、細胞物性の統計性を評価する場合、時間の短縮化は測定細胞を等価に扱うために重要である。従って、AFM の高精度位置制御の機構を損なわずに広範囲計測を行うシステムの開発が求められる。そこで本研究では、(2) 多数細胞計測を高速化するために広範囲自動測定が可能な AFM 計測システムの開発を行った。本研究で開発された自動 AFM ステージは mm オーダーの広い走査範囲と nm オーダーの高い空間分解能を達成した。また、先行研究において AFM とマイクロアレイ基板を組み合わせることで、多数細胞の統計性の評価がなされた。しかしながら、この研究で用いたマイクロアレイ基板は隣接する細胞同士接触していたので、細胞間の力学的相互作用が顕著に表れる細胞種では、理想的な 1細胞計測とは言い難い。また、隣接するウェルへの細胞移動や伸展も完全に制御することができていなかった。この問題を解決する手段として細胞の接着領域・非接着領域を形成して、細胞の形状・運動を制御可能なマイクロパターン基板技術が考えられる。実際に、マイクロパターン基板技術は AFM 細胞計測にも用いられている。しかしながら、従来の方法ではパターンの位置が可視化されていないため、細胞計測位置制御が困難である。そこで本研究では、(3) 単一細胞を透明なガラス領域上にパターン化出来るマイクロアレイ基板に代わる細胞培養基板の開発を行った。これら (2),(3) の技術開発によって、本研究では多数の単一細胞レオロジー測定を行い、細胞間接触による個々の細胞レオロジーへの影響はほとんどないことを示した。本研究で行われた (1)~(3) の技術開発によって、細胞レオロジー測定は従前手法と比較して数倍~数十倍の高速化を達成した。