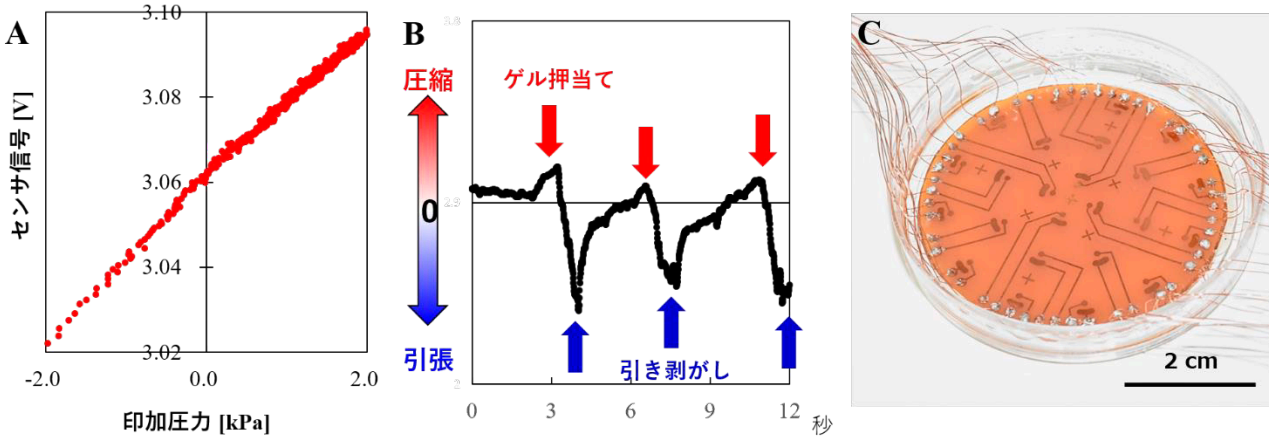
203　力がモニタリングできる細胞培養チップの開発	森脇　健司

【目的】細胞の機能を評価するうえで、その接着力や牽引力は重要な指標のひとつとなる。細胞の力の計測には、原子間力顕微鏡や蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、マイクロピラープレートなどが利用されているが、3 次元的な力の向きと大きさを把握するのは難しい。一方、我々は感圧層の電気抵抗変化を利用したフィルム型力覚センサの開発を行っている。電極の配置を工夫することで感圧部表面に作用する 3 次元的な力を検出できる。これまでに本センサ技術を細胞と培養皿表面間に作用する接着力分布のモニタリングに応用するため、電極と感圧層を導電ペーストで接着することで引張力を計測可能とし、細胞接着力のような微弱な引張力も検出できる可能性を示した。本研究では、密着方法の改良を行った後に多点センサを作製し、粘着ゲルの引き剥がしによって接着力分布のモニタリングを行った。

【方法】フォトリソグラフィとウェットエッチングによってパタニングした 2 枚の銅ポリイミド積層フィルムで導電ゴムを挟むことで、圧力センサシートを作製した。感圧部の周辺に接着剤を塗布し、接合時に圧縮力をかけることで、電極と感圧層を密着させた。測定部に圧力が作用すると導電ゴムが変形し電気抵抗値が変化するが、電子回路により抵抗変化を電圧信号変化へと変換し、センサインターフェイスにより記録した。引張・圧縮試験機を用いてフィルム型センサに圧力を印加した際の電圧信号の変化を調べた。また、センサ上で粘着性ゲルの押当てと引き剥がし動作を繰り返し、センサ信号の変化を捉えた。細胞評価に向けて、透明素材によってセンサを作製した。また、多点 2 軸力センサシートを細胞培養皿に貼り付けた。

【結果】センサの電極と感圧層をあらかじめ密着させておくことにより、引張力が検出できた。1 kPa 以下の力も検出でき、細胞と培養皿間に作用する微弱な接着力の評価が可能だと考えられた。また、粘着性ゲルの押し当てと引き剥がしに合わせて圧縮力と引張力が検出された。10 Hz 以上のサンプリングが可能であることが確認できた。多点化も可能で、センサシートを押した位置と力や粘着ゲルを引き剥がした際の剥離点やその引張力の大きさを評価できた。酸化インジウムスズ（ITO）を成膜しフォトリソグラフィによりパタニングしたところ、透明電極が作製できた。感圧層にはポリチオフェン系導電性高分子を用いることで、ほぼ透明なセンサ構造を作製することができた。また、細胞培養ディッシュに貼り付けるセンサシートを作製した。培養平面に対する垂直方向と半径方向の 2 軸の力が検出でき、細胞とディッシュ間に作用する接着力や細胞同士の凝集力の把握に有用だと考えられる。

センサ特性と細胞培養皿への貼り付け



203. 力がモニタリングできる細胞培養チップの開発

森脇　健司

*弘前大学 大学院理工学研究科 知能機械工学コース

Key words：センサフィルム，引張力，圧力，接着，モニタリング

緒　言

細胞の機能を評価するうえで、その接着力や牽引力は重要な指標のひとつとなる。細胞の接着特性の評価には、原子間力顕微鏡や光／磁気ピンセット、せん断流れなどで外部刺激を与えた際の細胞応答を調べる方法が一般的に行われている。また、近年では細胞が能動的に生み出す力を検出するため、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）[1] やマイクロピラープレート [2] が利用されている。しかし、これらの方法で検出している細胞の力は、前者はスカラー量、後者は平面 2 軸方向の力であり、3 次元的な力の向きと大きさを把握するのは難しい。

一方、我々は感圧層の電気抵抗変化を利用したフィルム型力覚センサの開発を行っている。電極の配置を工夫することで感圧部表面に作用する 3 次元的な力を検出できる。これまでに本センサ技術を細胞と培養皿表面間に作用する接着力分布のモニタリングに応用するため、電極と感圧層を密着することで引張力を計測可能とし、細胞接着力のような微弱な引張力も検出できる可能性を示した [3]。本研究では、密着方法の改良を行った後に多点センサを作製し、粘着ゲルの引き剥がしによって接着力分布のモニタリングを行った。

方　法

1.　引張・圧縮力用センサフィルムの作製

本センサは、2 枚の電極で感圧層を挟み、感圧層の電気抵抗変化を利用することで力を検出している（図 1）。既報 [3] では、導電性ペーストで電極と感圧層を接合したが、ペーストが濡れ拡がるため電極サイズの制御が難しく、また、電極と感圧層の両素材と親和性のある導電性接着剤を選定する必要があった。そこで、感圧部の周辺に接着剤を塗布し、接合時に圧縮力をかけることで、電極と感圧層を密着させた。電極にはフォトリソグラフィとウェットエッチングによってパタニングした銅ポリイミド積層フィルムを、感圧層には導電ゴムを用いた。

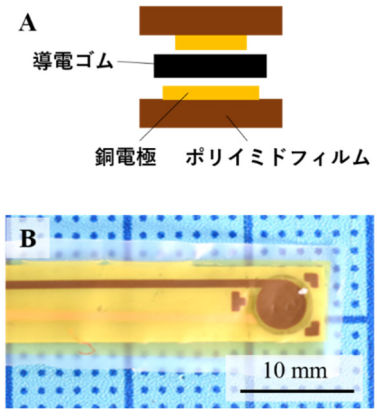


図 1.　フィルム型圧力センサ

A)　断面概略

B)　センサ外観

*現在の所属：弘前大学 大学院理工学研究科 機械科学コース

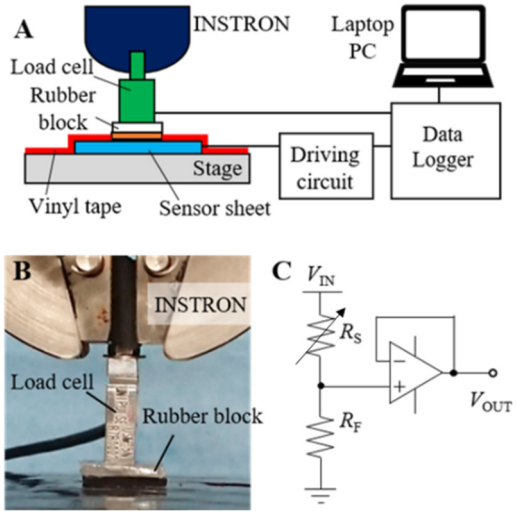


図 2. 校正システム

A）システム概略、B）加圧部外観、C）電圧変換回路。

2. センサ特性の評価

図 2 の通りのシステムを用いて、今回作製した密着センサと特に密着させず電極と感圧層を重ね合わせただけの従来センサとの印加圧力に対するセンサ特性の変化を調べた。具体的には、フィルム型センサを引張・圧縮試験機（4464、インストロン）のステージに固定し、低荷重用ロードセル（USM-5N、ユニバルス）とゴムブロックを介してセンサに引張・圧縮荷重を印加した。引張力を印加するため、ロードセル・ゴムブロック・フィルム型センサ間の各界面は両面テープによって接合した。センサの電気抵抗変化は図 2C の通りの回路で電圧信号に変換した。その出力電圧 V_{OUT} は以下の式の通り導出される。

$$V_{OUT} = \frac{R_F}{R_S+R_F} V_{IN} \qquad (1)$$

ここで、R_F は固定抵抗、R_S はフィルム型センサの抵抗値、V_{IN} は入力電圧（5 V）である。ロードセルと圧力センサの信号はセンサインターフェイス（PCD-430A、共和電業）によって取得した。

センサ信号の即応性を確認するため、固定したフィルム型センサに粘着ゲルの押し当て／引き剥がし動作を繰り返した。また、上記同様の要領で 16 点センサを作製し、指押しやゲル引き剥がし動作時の多点モニタリングを行った。

3. 細胞計測に向けた検討

本センサは、ディッシュ・チップ上で培養している細胞が生み出す力をモニタリングすることを目的に開発を進めている。本センサが光学的な評価の妨げにならないよう、透明素材でセンサを構成できないかを検討した。また、培養ディッシュ上に平面方向と垂直方向の 2 軸の力を計測できる多点センサシートを作製した。

結果および考察

1. センサの圧力－電圧変化特性

引張・圧縮試験機を用いてフィルム型センサに圧力を印加した際の電圧信号の変化を図 3 に示す。電極と感圧層間を密着させていない従来センサでは、圧縮力に応じてセンサ信号は変化したが、印加圧力がゼロ付近でその信号はほぼゼロとなり引張力を検出できなかった。一方、電極と感圧層間を密着させたセンサでは引張力に応じてセンサ信号は変化した。あらかじめ圧縮した状態で周囲を固定してセンサを作製することで、引張力が作用しても電極と感圧層間の導通が保たれたと考える。また、サブ kPa オーダ以下の微弱な力に対してもセンサ信号は明瞭な変化を示した（図 4）。細胞と培養基板間に作用する引張り力は数 10 から数 100 Pa 程度と考えられ［4］、本センサフィルムにより作用力を検出できる可能性があることが確認できた。

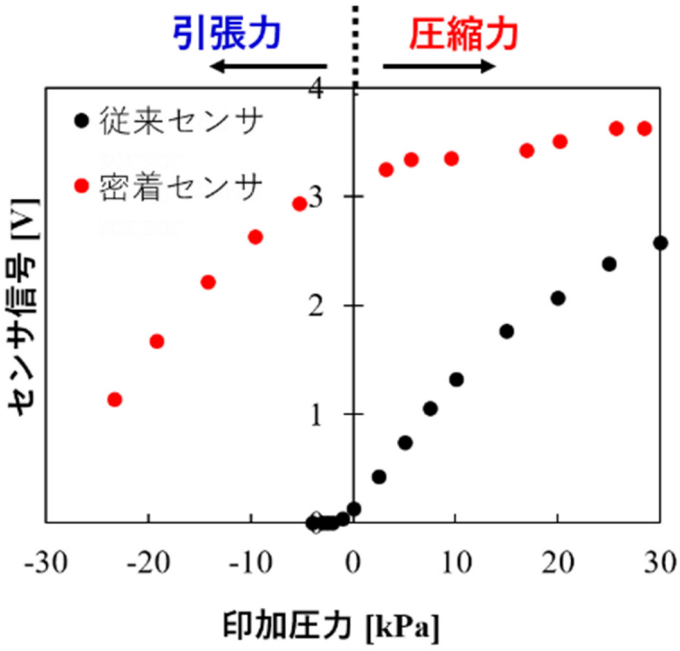


図 3. センサ信号の比較

電極と感圧層間を密着させることで引張力が検出可能となった。

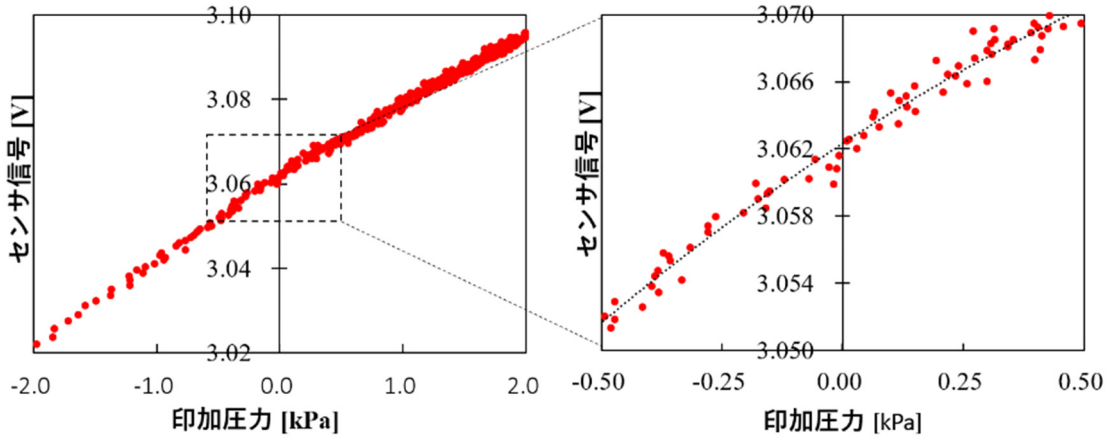


図 4. 微弱な力に対するセンサ信号の変化

1 kPa 以下の力も検出できるほど高感度で高分解能であった。

2. 引張・圧縮力モニタリング

単点センサフィルムにゲルの押当て・引き剥がしを行った際の信号変化を図 5 に示す。ゲルを押当てたタイミングで圧縮力が、引き剥がしたタイミングで引張力が検出されており、妥当な信号変化が得られていると考えられる。

また、多点センサフィルム上に粘着性ゲルを置き、①左側を弱く押し、②右側を強く押し、③左からゲルを引き剥がした際の信号変化について、図 6 に示す。指押しの際には、押している場所の測定点では圧縮力が検出され、その周りの測定点ではゲルが押している箇所に向けて若干引っ張られることで引張り力が検出された。ゲル引き剥がしの際には剥離している点で強い引張り力が検出された。引き剥がし後は初期状態に比べ全体的に信号が小さくなった。ゲル自重により作用していた圧縮力が除荷されたためだと考えられる。単点・多点センサともにサンプリング周波数は 10 Hz 以上であり、引張・圧縮力のモニタリングに有用だと考える。

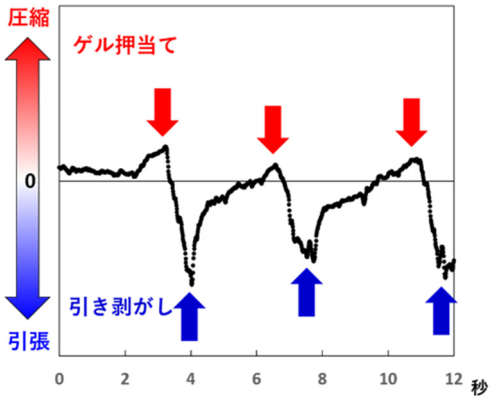


図 5.　単点センサでの圧力モニタリングの例
センサ上でゲルシートの押し当てと引き剥がしを繰り返した際のセンサ信号。

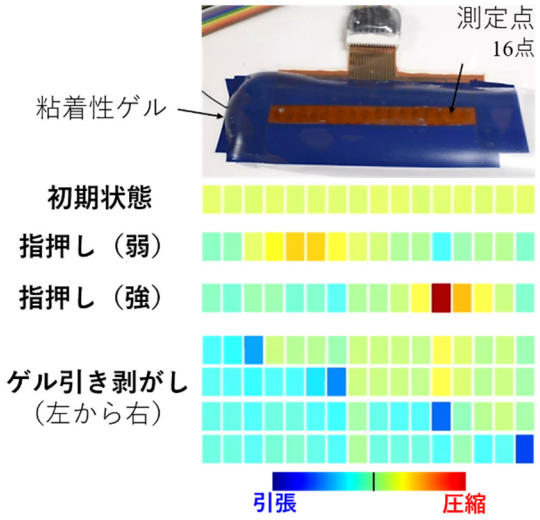


図 6.　多点センサでの圧力モニタリングの例
センサ上の測定点を指で押したときとルを引き剥がした際のセンサ信号。

3.　細胞計測に向けたセンサ付き培養皿作製結果

細胞の評価は光学顕微鏡を用いたものが多く、培養基板は透明であることが望ましい。そこで酸化インジウムスズ（ITO）を成膜しフォトリソグラフィによりパタニングしたところ、図 7 のような透明電極が作製できた。また、感圧層にポリチオフェン系導電性高分子を用いることで、ほぼ透明なセンサ構造を作製することができた。

図 8 のような、細胞培養ディッシュに貼り付けるセンサシートを作製した。培養平面に対する垂直方向と半径方向の 2 軸の力が検出でき、細胞とディッシュ間に作用する接着力や細胞同士の凝集力の把握に有用だと考えられる。



図 7. 透明電極の作製
フォトリソグラフィによりパタニング可能。

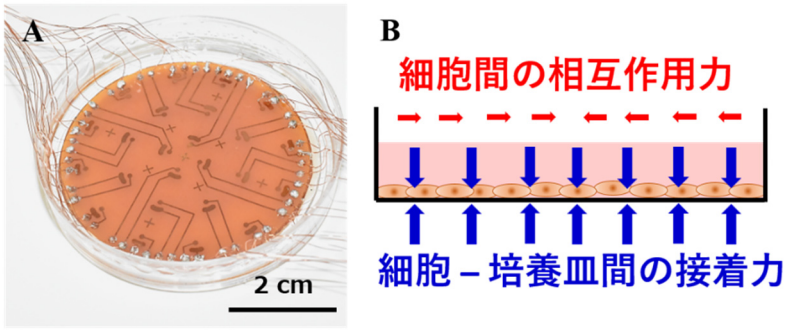


図 8. 垂直・平面方向の力分布検出培養皿（A）と作用力のイメージ（B）
（A）は下部電極を配置した様子で、実際は感圧層と上部電極をさらに配置する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岡山理科大学フロンティア理工学研究所の岩井良輔氏である。また、実験に協力して下さった弘前大学理工学部機械科学科の笹川・森脇研究室の高野裕哉氏に感謝いたします。

文　献

1) Eder D, Basler K, Aegerter CM. Challenging FRET-based E-Cadherin force measurements in Drosophila. Sci Rep. 2017 Oct 20;7(1):13692. Equb 2017 Oct 20. PMID: 29057959 DOI: 10.1038/s41598-017-14136-y
2) Nagayama K, Inoue T, Hamada Y, Sugita S, Matsumoto R. Direct application of mechanical stimulation to cell adhesion sites using a novel magnetic-driven micropillar substrate. Biomed Microdevices. 2018 Sep 26;20(4):85. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30259169 DOI: 10.1007/s10544-018-0328-y
3) Moriwaki T, Fujisaki K, Sasagawa K. Adhesion force measurement with a flexible film-type sensor. Adv Exp Mech. 2019 Aug 31;4:153-6. Equb 2019 Aug 31. DOI: 10.11395/aem.4.0_153
4) Sim JY, Moeller J, Hart KC, Ramallo D, Vogel V, Dunn AR, Nelson WJ, Pruitt BL. Spatial distribution of cell-cell and cell-ECM adhesions regulates force balance while main-taining E-cadherin molecular tension in cell pairs. Mol Biol Cell. 2015 Jul 1;26(13):2456-65. Equb 2015 May 13. PMID: 25971797 DOI: 10. 1091/mbc.E14-12-1618