

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

( 1 / 3 )

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |        |       |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|
| 研究テーマ | ベンチトップで利用できる超音波フローサイトメリーの開発                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 報告書作成者 | 伊藤 一陽 |
| 研究従事者 | 秋山真紗子・伊藤一陽                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |        |       |
| 研究目的  | <p>私たちの体を構成する細胞は、同じ種類であっても一つ一つ少しずつ異なる性質を持っている。例えば、大きさや形、増殖の状態などには細胞ごとの差があり、この違いを一つずつ調べることは、がん研究、免疫研究、再生医療、創薬など、さまざまな生命科学分野において重要である。そのため近年では、多数の細胞をまとめて評価するだけでなく、一つ一つの細胞を個別に調べる「シングルセル解析」が注目されている。シングルセル解析に広く用いられている装置の一つが、フローサイトメリーである。フローサイトメリーでは、細胞を液体の中で一つずつ流し、レーザー光などを照射することで、それぞれの細胞の特徴を短時間に調べることができる。非常に有用な技術である一方、高性能な光学系や検出機構を必要とするため、一般に装置は大型かつ高価であり、すべての研究室が気軽に導入できるものではない。そこで本研究では、従来のレーザー光に代えて超音波を利用する新しいフローサイトメリーを提案する。目指すのは、研究室のベンチトップに設置でき、より手軽に使用できる小型の細胞観察装置である。超音波は、医療で広く使われている超音波診断と同じように、対象に音波を送り、そこから返ってくる信号を利用して対象の情報を得ることができる。本研究ではこの原理を、流路内を流れる一つ一つの細胞の観察に応用する。</p> <p>本研究で特に着目しているのが、超音波による細胞のイメージングである。従来の超音波画像では、超音波を送受信するプローブを電子的または機械的に走査することで、対象の二次元的な情報を取得する。これに対して本研究では、プローブ側を走査するのではなく、観察する細胞そのものを流路内で移動させ、その移動に合わせて超音波信号を取得することで画像化するという考え方を採用する。すなわち、「計測する側を動かす」のではなく、「計測される対象を流す」ことで画像を得るという発想である。さらに、超音波を用いることで、蛍光色素などを細胞に付けることなく観察できる可能性がある。現在のフローサイトメリーでは蛍光標識が重要な役割を担っているが、標識のためには試料の前処理が必要になる。本研究が目指す超音波による観察が実現すれば、細胞をできるだけそのままの状態、簡便に観察するための新たな手段となることが期待される。</p> <p>本研究の目的は、このような考え方に基づき、「ベンチトップで利用できる超音波フローサイトメリー」の基盤技術を構築することである。既存の高性能なフローサイトメリーを置き換えることを目指すのではなく、日常的な細胞観察や研究の初期段階などにおいて、研究者がより手軽に一細胞ずつ観察できる新しい選択肢を提供することを目指している。安価で小型な細胞観察技術が実現すれば、大型・高額な装置を保有する研究施設だけでなく、より多くの研究室や教育現場において一細胞解析を利用できる可能性が広がる。また、超音波計測、マイクロ流体技術、デバイス設計を組み合わせることで、従来とは異なる細胞イメージングの方法を提示することにもつながる。本研究を通じて、生命科学における細胞観察技術の選択肢を広げるとともに、超音波を利用した新しい計測・イメージング技術の確立を目指す。</p> |        |       |

## 研究内容

本研究では、従来のフローサイトメトリーで用いられる光学系を超音波計測系に置き換え、流路内を流れる細胞を一つずつ超音波で観察するための小型計測システムの開発に取り組んだ。提案するシステムは、測定対象を一定の位置に流す「流路系」、対象に超音波を照射して返ってくる信号を取得する「超音波送受信系」、得られた信号を処理・画像化する「信号処理系」を基本構成としている。

**1. 超音波計測に適したマイクロ流体デバイスの開発** 本研究の特徴は、一般的な超音波イメージングのようにプローブを走査するのではなく、測定対象そのものを流路内で移動させることによって二次元的な情報を取得する点にある。そのためには、細胞などの微小な対象を超音波が照射される位置に安定して通過させる流路と、超音波を効率よく送受信できるデバイスを一体として設計する必要がある。そこで、測定対象を含む液体の周囲に別の液体を流し、対象を流路中央付近に集める「ハイドロダイナミックフォーカシング」を利用したマイクロ流体デバイスを作製した。これにより、微小な測定対象を一定の位置に整列させながら流し、固定した超音波振動子の前を順次通過させる構成とした。プロポーザルで掲げた「振動子を動かすのではなく、計測対象を動かす」という考え方を、実際のデバイスとして構築したものである。一方、一般的な超音波計測では水中から直接対象を観察できるのに対し、本システムでは超音波がデバイス材料や液体など複数の物質を通過した後に測定対象へ到達する。このため、デバイス内部で生じる超音波の減衰や不要な反射をできるだけ小さくすることが重要となる。これは当初の研究計画でも主要な技術課題として設定していた。本研究では、超音波振動子をマイクロ流体デバイスに組み込み、流路と超音波の伝搬経路の双方を考慮しながら試作と改良を行った。

**2. 流動する微小物体からの超音波信号の取得と画像化** 構築したデバイスを用いて、流路内を移動する微小な対象から超音波信号を取得するための計測系を構築した。将来的には細胞を測定することを想定し、細胞程度の大きさの対象を観察できるよう、中心周波数 80 MHz の高周波超音波振動子を使用した。振動子から短い超音波を繰り返し送信し、対象から返ってくる微弱な信号を高速に取得した。本手法では、一つの対象が超音波の照射範囲を通過している間に、短い時間間隔で繰り返し信号を取得する。得られた信号を対象の移動方向に沿って順番に並べることで、対象を流すこと自体を「走査」として利用し、二次元的な超音波画像を構成することを試みた。この方法は、固定したプローブであっても、流れている対象の連続的な情報を取得できるという特徴を持つ。開発したシステムの基本性能を確認するため、まず実際の細胞に近い大きさを持つ直径 15  $\mu\text{m}$  のポリスチレン粒子を測定対象として実験を行った。試料液とその周囲を流れる液体の流量を調整することで粒子を流路中央付近に集め、超音波振動子の前を通過させた。粒子の移動速度に対して十分に高い頻度で超音波を送受信することで、一つの粒子から複数の信号を連続して取得した。

以上のように、本研究では、「微小な対象を安定して流すマイクロ流体技術」と「微弱な超音波信号を高速に取得する計測技術」を組み合わせ、対象を流すことによって画像を得る超音波フローサイトメトリーの基本システムを構築した。これにより、将来的に細胞をラベルフリーで一つずつ画像化するための基盤技術について検討を進めた。

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究のポイント | 本研究のポイントは、従来のフローサイトメトリーで用いられる光学計測を超音波計測に置き換え、小型・低コストな細胞観察装置の実現を目指している点にある。提案するシステムは、流路系、超音波送受信系、信号処理系から構成され、将来的には蛍光標識を必要としないラベルフリー観察への展開を目指している。特に特徴的なのは、超音波振動子を走査するのではなく、観察対象そのものを流路内で移動させることで画像を得るという発想である。従来の超音波イメージングでは、プローブを電子的または機械的に走査して二次元情報を取得するのに対し、本研究ではマイクロ流体デバイス内で粒子や細胞を一定の位置に整列させて流し、その移動に合わせて連続的に超音波信号を取得する。流体技術と超音波計測技術を組み合わせることで初めて実現できる、新しいイメージングの考え方である。さらに、本研究では高価な大型装置と同等の性能を追求するのではなく、研究室のベンチトップで日常的に使用できる装置としての実用性を重視している。小型で扱いやすく、細胞をラベルフリーで観察できるシステムが実現すれば、高額な装置を導入しにくい研究室や教育現場にも、一細胞観察の機会を広げられることが期待される。 |
| 研究結果    | 本研究では、試作した超音波フローサイトメトリーを用いて、まず細胞と同程度の大きさを持つ直径 15 $\mu\text{m}$ のポリスチレン粒子を対象とした基礎実験を行った。その結果、流路内を移動する粒子からの超音波散乱信号を検出することに成功した。さらに、粒子が超音波ビームを通過する間に連続して取得した信号を並べることで画像を作成したところ、粒子の通過位置を明瞭に可視化することができた。特に、超音波振動子の焦点付近を通過した粒子では明瞭な像が得られ、測定対象そのものを流すことで二次元的な情報を取得するという本研究の基本原理を実証した。一方、粒子が超音波の焦点位置から外れると画像がぼやけることや、試作デバイスの一部に用いた材料が水中で膨潤・変形し、粒子の流れる位置が不安定になることも明らかとなった。以上から、本研究で構築したシステムによって微小物体の超音波検出・画像化が可能であることを確認するとともに、今後実際の細胞を安定して観察するために解決すべき技術的課題を明確にすることができた。                                                                  |
| 今後の課題   | 今後の課題は、実際の細胞を安定して検出・画像化できる計測系へ発展させることである。今回の実験では直径 15 $\mu\text{m}$ のポリスチレン粒子から明瞭な超音波信号を取得できた一方、実際の細胞は周囲の液体との音響的な差が小さく、より微弱な信号を高い S/N 比で検出する必要がある。そのため、超音波の減衰や不要な反射を抑えられるデバイス材料や構造を検討し、より高感度な計測系へ改良する必要がある。また、試作デバイスでは水中での材料の膨潤・変形によって粒子の流れる位置が変化し、超音波の焦点から外れることで画像が不鮮明になる場合があった。今後は、水中でも形状を安定して維持できる材料の選定と流路設計の改良を進め、測定対象が常に適切な位置を通過できるようにすることが重要である。これらの改良を通じて、まずは培養細胞を対象とした超音波イメージングを実現し、最終的にはベンチトップで手軽に利用できるラベルフリーの超音波フローサイトメトリーへ発展させることを目指す。                                                                                  |

## 研究題目:ベンチトップで利用できる超音波フローサイトメトリーの開発

本研究では、サンプル溶液を流路中央に導入し、両側からシース液を流すことでサンプル流を流体力学的に絞り込み、測定対象を超音波の計測領域内に整列させる。次に、シリンジポンプで試料を送液しながら、振動子から超音波を送受信し、得られた信号をオシロスコープで取得する。対象が超音波ビーム内を移動する間に連続して信号を取得し、それらを並べて画像化することで、振動子を走査することなく、流れる微小対象を可視化する。本研究では直径 15  $\mu\text{m}$  のポリスチレン粒子を用いて原理実証を行い、流路内を移動する粒子を超音波画像として捉えることに成功した。

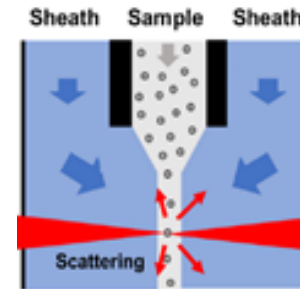


Fig.1 流体力学的絞り込みによる細胞の整列: シース液による流体力学的絞り込みにより、中央を流れるサンプル溶液の幅を超音波の被写界深度程度まで縮小し、細胞を計測領域内に整列させる。

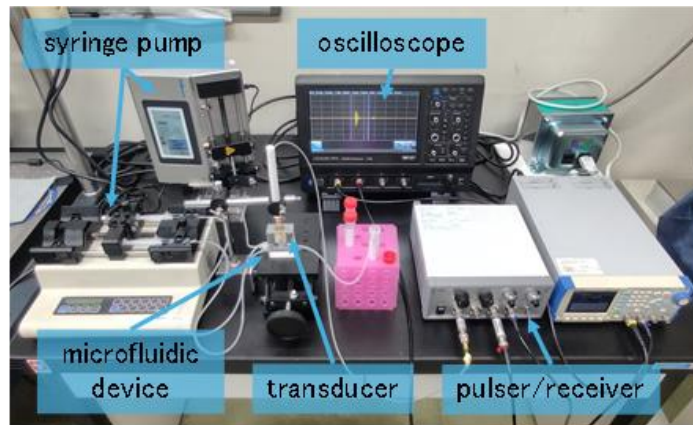


Fig.2 システム構成図: シリンジポンプで試料を送液し、振動子から超音波を送受信する。送受信の制御にはパルスレーザとファンクションジェネレータを用い、得られた超音波信号をオシロスコープで取得する。

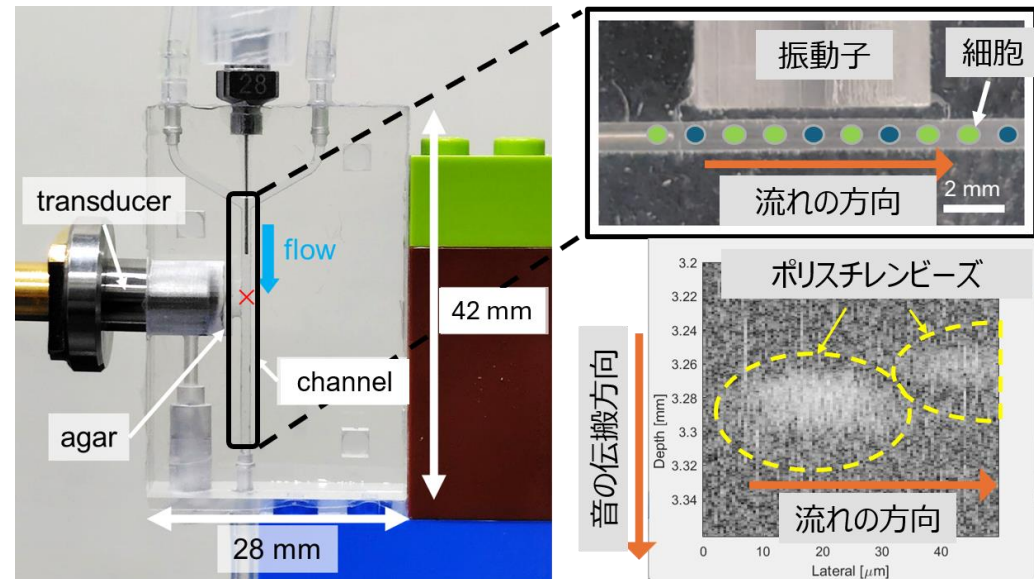


Fig.3 作製したデバイスの構成: 流路内で粒子あるいは細胞を一列に整列させて流し、超音波信号を取得・画像化する。デバイス本体は名刺サイズよりも小さい。