

細胞内微小器官操作システムの構築

佐藤知正 東大先端研
三由貴史 オリジナル光学

三田太一 東大
Stephen PALM 東大先端研

Development of Cell Handling System

Tomomasa SATO : RCAST, The University of Tokyo. 4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo

Taichi MITA : The University of Tokyo. 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo

Takashi MIYOSHI : OLYMPUS OPT.CO.,LTD. 2-3, Kuboyama-cho, Hachioji-shi, Tokyo

Stephen PALM : RCAST, The University of Tokyo. 4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo

Abstract – This paper presents an optical microscope-based robot system for the purpose of cell-handling. The system has the following features: 1)The system has xy-stage driven by stepping motors, and can manipulate a cell directly with the Preparation Manipulator (new type of glass micro-tool). 2)The operator select a cell to manipulate by a mouse-click on a PC display showing a video image from the microscope. The effectiveness of the system is proved though an experiment of separating and collecting MATO-cells from a mouse brain.

Key Words : Cell Handling, Mato-cell, Manipulatable Preparation

1 はじめに

近年の分子生物学の急速な発展は、生命の基本的なしくみを明らかにしつつあるが、その発展にともない、細胞、細胞内微小器官などの直接操作を精密に、大量に、繰り返し行なう技術への要求が高まってきている。細胞のハンドリングの例として、人工受精が良く知られているが、これは通常作業者が顕微鏡を覗きながら液体圧式マニピュレータなどを操作し行なう。ところがこれらの作業は熟練を要し、医者や研究者への負担が大きい。

本研究の目的は、細胞および細胞内微小器官の操作を自動で行なうシステムを構築することである。筆者等が開発した細胞内微小器官操作システム¹⁾は、プレパラート自身に取り付けられた工具でハンドリングを行なうという特徴を持つマニピュレータを、光学顕微鏡からの画像を介したインターフェースにより制御し、対象を直接操作することができる。また、プレパラート上の脳血管周囲に見られるマトウ細胞の単離、回収実験を行なった。

2 細胞内微小器官のハンドリング

2.1 ハンドリングの現状と問題点 従来の細胞内小器官のハンドリングといえば、大量の細胞をすりつぶし、電気泳動や遠心分離によって目的の物質を精製していたが、遠心分離によってでは、比重の似通った物質を分離できないという問題を抱えていた。また、レーザーピンセットによる対象の捕捉、レーザーメスによる切除なども行なわれているが、レーザーピンセットは大きな力を得られない。また例えば細胞を液中から取り出し別の場所へ移動させたり、操作した遺伝子や精子などを注入する場合には、工具により直接対象をハンドリングすることが必要となる。この直接操作に手動のマニピュレータが用いられてきたが、問題点として、(1)操作が難しく、熟練するのに時間がかかる。(2)失敗が多く、満足する成果をなかなか得られない。(3)多数のサンプルに作業を行なうことは人間には難しい。などが挙げられる。このような医者や研究者の時間的、肉体的負担を軽減するために細胞内微小器官操作システムを構築した。以下に本システムの実現したハンドリングスキル、システムの特徴などについて述べる。

2.2 マトウ細胞 本システムの具体的なアプリケーションとして、マトウ細胞からの蛍光顆粒の取り出し作業を選んだ²⁾。マトウ細胞は脳血管周囲に存在する細胞の一種で、内部に励起光の照射により蛍光を発する顆粒を蓄積する。加齢とともにマトウ細胞は蛍光顆粒を蓄積し、次第

に血管を圧迫するようになる。この蛍光顆粒を分取、解析し、マトウ細胞の働きを解明するために求められる作業として次の二つが挙げられる。

- 蛍光顆粒をマトウ細胞から分離する
- 蛍光顆粒を取り出し、分析する場所まで運ぶ

また、本研究では脳のサンプルとしてマウスの脳を用い、これをプレパラート上に薄く引き伸ばした「ストレッチサンプル」を使用する。ストレッチサンプルは脳血管を一方方向に伸ばすので、血管やそ

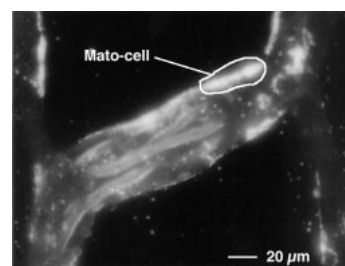


Fig. 1: Mato-cell

の周囲に存在するマトウ細胞を観察しやすいという利点を持つ。図1にマトウ細胞の蛍光顕微鏡写真を示す。

2.3 本システムのハンドリング手法 マトウ細胞の大きさはおおよそ20~30 μm、蛍光顆粒は数μmである。細胞を観察しながらハンドリングを行ない、さらに回収、分析を行なうことを考慮すると、高倍率光学顕微鏡を使用することになる。光学顕微鏡には、高倍率観察をする場合、対物レンズと対象を極端に近付けなければならない、という欠点を持つ。必然的に対象に横方向からアクセスしなければならない。本研究では、プレパラート平板上に微小工具を設けたプレパラートマニピュレーション工具による「単離」と、マイクロピペットによる「回収」を行なった。工具形状やハンドリング手法については以下に詳しく述べる。

2.3.1 蛍光顆粒単離 蛍光顆粒の大きさは数μmであるので、それをハンドリングするには少なくとも先端径数μmの工具が必要となるが、剛性が極端に低下するので、工具の制御が困難になる。そこで、蛍光顆粒を直接集めるのではなく、マトウ細胞を集めることにした。顆粒はマトウ細胞内に多数存在するので、細胞の分取でも分析時の顆粒の密度を大幅に上げることができるという理由からである。そのために、マトウ細胞の周囲を削って取り除き、他の部分から分離させるという戦略をとることにした。先端径10 μm程度のガラス製マイクロスクレーパーを用いた。

2.3.2 蛍光顆粒回収 単離したマトウ細胞を、先端径10 μm程度のガラス製マイクロピペットで水を滴下し、組

織を遊離させて水と一緒に吸引することで回収する。

2.4 本システムの特徴 本システムの特徴として以下のことが挙げられる。

- ハンドリングを自動化することにより、操作者の負担を軽減でき、さらに時間も節約することが可能
- 画像を用いたインターフェースによる制御
- レーザーや場の力ではなく、ガラス工具による直接操作を実現している

3 システム構成

3.1 ハードウェア 図2に本システムのハードウェア構成を示す。光学顕微鏡にはxy ステージと、CCD カメラが取り付けられている。xy ステージの移動は、PCからドライバを制御してステップモータを駆動することにより行なう。カメラからの信号はキャプチャボードに入力され、PCのディスプレイに画像を表示することができる。

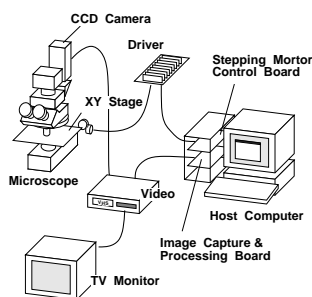


Fig. 2: Hardware

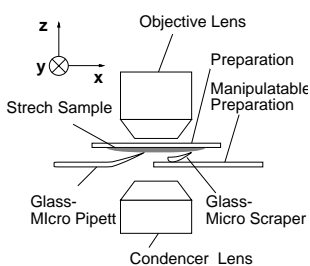


Fig. 3: Manipulator

3.1.1 プレパラートマニピュレーション工具 新しく開発した新構造の工具で、高い操作性をもつ。従来の工具は微小領域で弾性体としての性質を示し、加工も容易であることからガラス棒(または円筒)を細く引き伸ばしたものが一般的であったが、大きく弾性変形するため操作性が低いという欠点も持っていた。プレパラートマニピュレーション工具はプレパラートのカバーガラスまたはスライドガラスのような透明平板に従来の工具の先端を取り付けたような形状で、高い剛性を得ることができる。2枚のガラスを相対的に動かすことにより、スクレープのような比較的大きな力がかかる操作を行なうことが可能となった。

3.1.2 蛍光顕微鏡 マトウ細胞内の蛍光顆粒を観察するため蛍光顕微鏡を用いた。これは対象の発する蛍光だけを見られるので、高いコントラストの像が得られる。図1の写真も蛍光観察したものである。明視野観察も可能であるので、工具の位置決めも容易に行なえる。

3.1.3 xy ステージと工具固定用アーム 本システムは、工具取付用アームを2本、プレパラート取付用アームを1本持つ。工具取付用アームはxyz3軸の手動精密ステージの先端に取り付けられており、3軸ともストローク6.5mm、最小読みとり精度0.01mm並進微動機構を持つ。プレパラート取付用アームは、ステップモータ駆動のxy軸自動ステージの先に取り付けられている。1ステップでの移動距離は0.5 μm、最大移動速度は4mm/secである。図3はこれらを顕微鏡の前方から見たものである。視野中で工具は動かず、サンプルが移動する形をとっているが、プレパラートと工具を付け換えることで、視野中で工具が移動するようにすることも可能である。

3.2 ソフトウェア

3.2.1 モータコントロール部、インターフェース部 ディスプレイ上にCCDカメラからの画像が表示されている。操作者がマウスを使って工具を移動させたい目標点をクリックすると、画面中の位置からxy ステージ上での座標

を計算し、工具は目標点に移動し、範囲指定を行なうとその内部を残し周囲を自動切削するコマンドを有する。

3.2.2 ビジュアルフィードバック部 プラパラートマニピュレータは、剛性が向上したとはいえ、若干のたわみはある。またプレパラート自体のたわみもあるのでフィードバックをかけた位置制御が不可欠である。この場合、モータの回転量と工具先端の移動量が比例しないので、ビジュアルフィードバックを行なう予定である。

4 分離・回収実験

4.1 単離実験 単離実験は、マトウ細胞の周囲の削り方によってラスタスキャン方式とらせん方式の2つを行なった。前者は工具軸方向に順にスキャンしてゆき、後者は細胞の周りをらせん状に外側に削ってゆく。両方式とも残すべき領域は長方形で指定する。図4がラスタスキャン方式で細胞周囲を削った結果である。おおむね除去されているが、血管部分がまだ残っている。これは、血管部分が周囲の組織よりも堅いためであると思われる。また、らせん方式は工具軸垂直方向への剛性が不足するため、うまく除去できなかった。

4.2 回収実験 周囲から分離された細胞にマイクロピペットで水を少量滴下する。その結果乾燥してプレパラートに固着した細胞が軟化、遊離するので、水と一緒に吸い込むことで回収する。実験の様子を図5に示す。ピペットの先端に細胞が吸い込まれている。

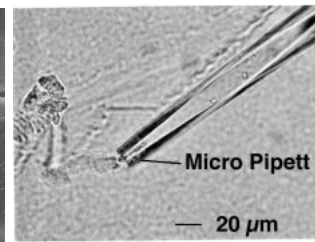
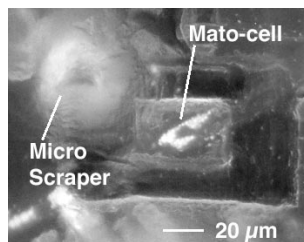


Fig. 4: Separate Mato-cell Fig. 5: Collect Mato-cell

5 おわりに

本研究では、高い操作性を持つプレパラートマニピュレーション工具と、xy2自由度を配したステージを持ち、光学顕微鏡からの画像を介したインターフェースを備えた細胞内微小器官操作システムについて述べた。また、マトウ細胞の単離、回収実験を行ない、本システムの細胞内微小器官ハンドリングに対する有効性を示した。プレパラートを構成するガラス上のマイクロ工具でマニピュレーションを行なう、プレパラートマニピュレーションという概念は、光学顕微鏡下での生体標本の操作の幅を広げる可能性を持つと思われる。さらに多くの工具(保持、切除など)の開発が今後の課題である。またビジュアルフィードバックを用いた制御を現在開発中である。

東大先端研佐藤研究室の森武俊講師、宮崎英樹助手、サンプル提供などで協力していただいた東京大学先端研分子生物医学分野の児玉龍彦教授、浜窪隆雄助手、自治医科大学間藤方雄名誉教授、大河原重雄教授に感謝いたします。なお、本研究は文部省科学研究費補助金の援助により実施されました。

参考文献

- 1) 佐藤知正, 三由貴史, 宮崎英樹. 細胞ハンドリングロボットシステムの開発. 第14回日本ロボット学会学術講演会講演論文集, 第3巻, pp. 1135-1136, 1996.
- 2) 児玉龍彦, 浜窪隆雄. 考える血管. 講談社, 1997.