

## 自動細胞品質評価のための On-chip 対象物位置制御システムの最適化

大阪大学大学院工学研究科機械工学専攻

伊藤 弘明, 小宮 拓也, 洞出 光洋, 高山 俊男, 金子 真

邦文要旨：マイクロ流体デバイスは微量の細胞懸濁液等の精密な取扱いに広く用いられ、赤血球から幹細胞まで、種々の細胞に対する次世代の評価手法として期待されている。近年、マイクロ流路内の対象物の位置を視覚フィードバックを用いた圧力制御により操作するシステムが開発されており、これを用いた細胞の特性評価が報告されている。現状では、操作を安定させるために PID 制御ゲインパラメータの手動調整が必要であるが、長い調整時間と制御理論の知識が必要であるため、医療現場への現実的な普及が困難であった。本研究では、最適なゲインを自動で探索・設定するシステムの開発を目的とし、マイクロ流路中を高速で流れる対象物の自動捕捉および、オーバーシュート及び収束時間の観点から位置操作の自動最適化を行うシステムを構築した。自動捕捉は比例ゲインを調整することで、位置操作の自動最適化は各種ゲインでのステップ応答特性を評価することで実現された。

Key words: Lab on a chip, Microfluidics, Automated system, Cell deformability, Robotic pump

### I. 緒言

マイクロ流体デバイスは、マイクロメートルスケールの微小環境で流体の振る舞いを精密にデザインすることで、チャンバー<sup>1)</sup>、ミキサ<sup>2)</sup>、液滴形成<sup>3)</sup>、など様々な機能を実装したものであり、微量の溶液や細胞懸濁液等の精密な取扱いに広く応用されている<sup>4)</sup>。マイクロメートルスケールの微量の溶液を扱うため、試料コストが削減できることや、スペースをとらず複数の試験を並行して行うことができるといった利点がある。更に、polydimethylsiloxane (PDMS)や polymethyl methacrylate (PMMA)などで作製する安価なマイクロ流体チップを用いた手法は、試験にかかる費用、時間、人的コストも大きく削減できると期待されている。また、マイクロスケールの流れの特徴として、マイクロ流体デバイス内の世界では粘性が支配的なレイノルズ数の小さい流れの特性が表れ、流れが乱れのない層流になりやすいことがあげられる。この性質を利用して、非

常に再現性高くデバイス内の流体や懸濁物質の挙動を制御でき、また、その挙動の理論的な取扱いや予測も行いやすい。

マイクロ流体デバイスの最大の応用例の一つとして、細胞を用いる実験システムへの応用が挙げられる。細胞は培養液や溶液中で数十マイクロメートル～百マイクロメートル程度の大きさを持つため、マイクロ流体デバイスでの (“On-chip”での) 取扱いに適している<sup>5-7)</sup>。さらに、前述のマイクロ流体デバイスの特性を活かしつつ、ロボット工学を組み合わせることでデバイスの挙動を制御することで、細胞の培養や特性評価に関わる基板条件<sup>8)</sup>や水圧条件<sup>9)</sup>、播種細胞の分布<sup>10)</sup>、培養液内の物質濃度<sup>11,12)</sup>などの時間・空間的条件を正確に制御することが可能になる<sup>13)</sup>。とりわけ、再生医療や創薬への応用を見据え近年集中的に研究が進展しているヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) などにおいて、培養環境の時空間制御は分化誘導にとって本質的に重要であり、各種コストを下げながら正

確な環境を提供するマイクロ流体デバイスの活用に注目が集まっている<sup>14)</sup>。実際に、分化したヒトiPS細胞の選別<sup>15)</sup>や、細胞の品質評価<sup>16)</sup>も報告され始め、再生医療におけるマイクロ流体デバイスの応用は現実のものとなってきた。

細胞の選別や品質評価の指標の一つとして、遺伝子発現やタンパク質発現等の生物学的指標の他に、接着力や細胞の硬さ、変形しやすさ(変形能)といった力学的な指標も広く用いられている。原子間力顕微鏡(AFM)やマイクロピペットなどの手法はその典型例であるが、近年は微細加工技術の発展とともに、マイクロ流路を用いた手法が一般的になってきた。流路幅を試験対象の細胞と同スケールに設計することで、細胞を流路に沿って一列に整列させ、流路を流れてくる単一の細胞毎に品質評価や操作を行うことができる。廣瀬ら<sup>17)</sup>は狭窄部を有したマイクロ流路を用いて、細胞が狭窄部を通過するときの速度と細胞のサイズから細胞の剛性を評価している。Bowら<sup>18)</sup>は、並列に設計した狭窄部に赤血球を通過させ、健全な赤血球とマラリアに感染した赤血球の変形能を評価している。これらの手法はマイクロ流路内に細胞懸濁液を流し観察を行う受動的な変形試験であったが、佐久間ら<sup>19)</sup>、門澤ら<sup>20)</sup>は、ハイスピードカメラと高速なアクチュエータを用いたフィードバック制御をマイクロ流体デバイスに組み合わせることによりマイクロ流路内での高速な細胞制御

(On-chip細胞マニピュレーション)を可能にしており、狭窄部を挟んで赤血球を繰り返し往復運動させる疲労評価試験や130 [Hz]での高速な細胞位置制御に成功している。伊藤ら<sup>21)</sup>は狭窄部内で細胞を保持するマニピュレーションを行うことで継続的な変形負荷を与え、その後負荷から解放した際の回復挙動から広い時間領域における粘弾性パラメータを推定する手法を提案している。

これらのOn-chip細胞マニピュレーションを用いる手法は単純に細胞を押し流す従来のマイクロ流体デバイスの概念を超えて、長時間にわたる粘

性的な挙動など従来のマイクロ流体デバイスでは得られない力学パラメータによる新たな細胞品質評価を可能にしている。その一方で、マイクロ流路チップ外部のアクチュエータによって細胞の位置を制御し負荷と解放を行っているため、繊細かつ高速なマニピュレーション技術が求められる。これまでのOn-chip細胞マニピュレーションシステムでは、安定で精密な位置制御を実現するためには、実験セットアップ毎にわずかに異なる流路の状況に応じて、実験者が手動で試行錯誤によりPIDゲインを調整する必要があった。このとき、マニピュレーションの指令値入力と細胞の応答を観察して、制御理論の知識にもとづいて各ゲインの値を微調整し、オーバーシュートや収束時間を実験目的にあわせて最適化していかなければならない。しかしながら、この細胞品質評価手法を生物学の実験現場や実際に医療現場で使用することを視野に入れると、実験実施者に制御理論の知識や実験システムへの習熟が必要であることがネックになり、実験室の枠を出た多様な現場での活用が困難であるという課題が残る。

そこで本論文では、マイクロ流路内での対象物のフィードバック位置制御において、PIDゲインを自動で最適値に調整するシステムを構築することを目的とする。これにより、実験システムやPID制御系の操作に習熟していない実験実施者にも容易に扱えるOn-chip細胞マニピュレーションシステムの確立を目指す。

## II. 方法

実験装置はマイクロ流体チップ、顕微鏡、ハイスピードカメラ、ピエゾアクチュエータによって構成される。本研究ではOn-chipマニピュレーションの対象物として直径2 [μm]のマイクロビーズ(Polyscience, Polybead Polystyrene Microspheres 2.0μm)を用いる。PBS(Sigma Aldrich, Phosphate Buffered Saline)にBSA(Sigma Aldrich, Bovine Serum Albumin)を質量比2%で加えた溶液2 [ml]に

マイクロビーズ懸濁液一滴を分散させる。BSA を溶かした溶液を分散媒に用いることで、マイクロビーズの凝集や流路壁面への接着を防いでいる。図 1 に実験装置の写真を示す。マイクロ流路の流入口にシリコンチューブを接続し、マニピュレーション対象となるマイクロビーズを流し込む。顕微鏡(OLYMPUS, IX71)を用いて 40 倍の対物レンズでマイクロ流路を流れるビーズを観察し、ハイスピードカメラ(Photron, IDP-Express R2000)で画像を取得する。取得された画像の空間分解能は 240 [nm/pixel] である。撮影される画像をリアルタイムで 1000 [Hz] の周波数で処理し、マイクロビーズの位置情報を数値データとして取得してフィードバック制御に用いる。取得した位置情報からマイクロビーズの現在位置と目標位置の偏差を後述するアルゴリズムで出力電圧に変換し、PC に接続された D/A ボードによって D/A 変換して出力された電圧を piezo コントローラ(MESS-TEK, M-2655S)へ送る。piezo コントローラで 15 倍に増幅された電圧を piezo アクチュエータ(PIEZOMECHANIK, PSt150/5/40 VS10)に入力してアクチュエータを駆動し、アクチュエータに接続されたシリンジを操作する。piezo アクチュエータの応答周波数、分解能はそれぞれ 20 [kHz], 10 [nm] である。このシリンジの動作によってマイクロ流路の圧力差が変化し、対象物であるマイクロビーズの位置を指令値に従うよう操作することができる。



図 1. 実験システム

本実験では、1000 [Hz] でループが回るプログラム内で PID アルゴリズムを用いて出力電圧を決定する。検出したマイクロビーズの位置  $x_n$ , 目標位置  $x_t$  から偏差  $e$ , 偏差の積分  $e_i$ , 偏差の微分  $e_d$  を以下のように決定する。

$$e = x_n - x_t \quad (1)$$

$$e_i = e_i + e\Delta t \quad (2)$$

$$e_d = \frac{e - e_{mem}}{\Delta t} \quad (3)$$

ここで、 $e_{mem}$  は 1 ループ前における偏差、 $\Delta t = 0.001$  [s] は時間分解能である。これらを用いて、以下の式により出力電圧  $V$  が与えられる。

$$V = K_p \cdot e + K_i \cdot e_i + K_d \cdot e_d + V_0 \quad (4)$$

$K_p$ ,  $K_i$ ,  $K_d$  はそれぞれ比例ゲイン、積分ゲイン、微分ゲインである。D/A ボードから出力可能な電圧が 0 [V] から 10 [V] であるため、オフセットとして  $V_0 = 5$  [V] を与え、電圧の正負に関して対称に出力電圧を定義している。これにより、piezo アクチュエータの伸び縮みの範囲を対称に取ることができる。

この PID 制御を用いて、マイクロ流路内に対象物であるマイクロビーズが高速で流れている状態から、図 2(a) に示すように対象物を捕捉し、また、図 2(b) に示すように捕捉後の対象物のマニピュレーション (位置制御) を行うことができる。

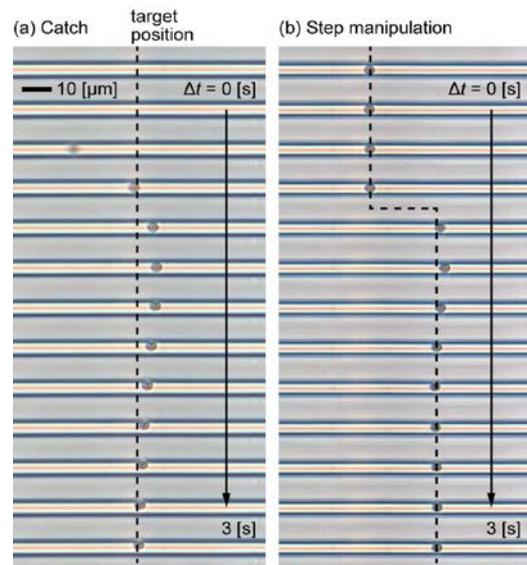


図 2. 対象物の (a) 捕捉と (b) ステップ操作

### III. 結果

#### 1. 対象物の自動捕捉

対象物が流れている状態から自動で捕捉を行うシステムを実現するため、対象物を捕捉できずに通過した場合に $K_p$ が自動的に大きくなるプログラムを作成した。流れる対象物がハイスピードカメラの視野内に検出され、ピエゾアクチュエータのフィードバック動作にも関わらず対象物が目標位置に収束することなく視野外に出た場合、その時点で $K_p$ を0.002刻みで上昇させる。これを対象物が目標位置に収束するまで繰り返す(図3(a))。このプログラムを用いることで、低ゲインで対象物を捕捉できない状態から自動で徐々にゲインが上がり、手動での調整をすることなく対象物の捕捉に成功した。この過程の典型的な比例ゲイン $K_p$ の変化、および対象物の検出位置をそれぞれ図3(b)と図3(c)に示す。

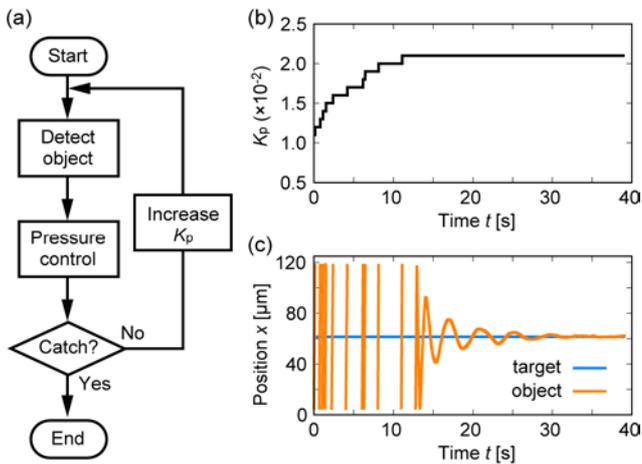


図3. 対象物の On-chip 自動捕捉

(a) 制御フローチャート. (b) 比例ゲイン  $K_p$ .  
(c) 位置  $x$  の指令値および対象物の測定値.

#### 2. 位置制御パラメータの最適化

次に、補足した対象物の位置制御(マニピュレーション)性能の最適化に移行する. 本研究では制御性能を評価するために、マイクロビーズの目標位置をステップ状に動かす入力を加えた場合の検出位置で見られる「収束時間」「オーバーシュート」の2つをパラメータとして評価関数を作成する. 一般に、収束時間が短くオーバーシュートが小さい制御が望ましい. ここでは、対象の位置が目標位置の $\pm 4$  [pixel]に留まっているならば収束したとみなして、ステップ入力後の収束までにかかった時間を「収束時間」と定義し、ステップ入力後の目標位置からの最大のずれを「オーバーシュート」と定義した.

ゲインを変更してステップ入力を繰り返すことで、異なるゲインにおける収束時間とオーバーシュートの値を得ることができる. このようにして得られたデータを収束時間とオーバーシュートそれぞれについて規格化する. 式(5)に示すように規格化した2つのパラメータに重みをつけて足し合わせたものを評価関数と定義する.

$$f(u, v) = A \cdot \hat{u} + B \cdot \hat{v} \quad (5)$$

ここで、 $u, v$ はそれぞれ収束時間とオーバーシュートの値、 $\hat{u}, \hat{v}$ は以下のようにそれぞれ最小の値を0, 最大の値を1に規格化した収束時間とオーバーシュートを表す.

$$\hat{u} = \frac{u - u_{min}}{u_{max} - u_{min}} \quad (6)$$

$$\hat{v} = \frac{v - v_{min}}{v_{max} - v_{min}} \quad (7)$$

これら2つの項に対する重み $A, B$ は、収束時間とオーバーシュートの変化率に対応させる. 2パラメータそれぞれの最大, 最小, 平均から以下のように $h$ という値をそれぞれ算出し、その比を重みに対応させる. これにより、ゲインを変えてステップ入力を加えた際に大きな変化がある重要なパラメータに適切な重み付けをすることができる.

$$h_u = \frac{u_{max} - u_{min}}{u_{ave}} \quad (8)$$

$$h_v = \frac{v_{max} - v_{min}}{v_{ave}} \quad (9)$$

$$A : B = h_u : h_v \quad (10)$$

このようにして求めた評価関数  $f$  の値が最も小さいとき、収束時間とオーバーシュートがともにバランスよく小さくなっている。このときのゲインを最適なゲインとして決定する。以上の手順を比例ゲイン  $K_p$ 、積分ゲイン  $K_i$ 、微分ゲイン  $K_d$  の順でそれぞれについて行い PID ゲインを最適化する (図 4)。なお、本来は 3 つのゲインの全ての値の組み合わせについて最適化することが望ましいが、その組み合わせの条件数は膨大になってしまう。ここでは、比例ゲインが制御に最も支配的であるという経験則と探索時間短縮のため、比例ゲイン  $K_p$ 、積分ゲイン  $K_i$ 、微分ゲイン  $K_d$  の順に別個に最適化した。

比例ゲイン  $K_p$ 、積分ゲイン  $K_i$ 、微分ゲイン  $K_d$  に対する自動調整を行った場合の収束時間、オーバーシュート、評価関数の値をそれぞれ図 5、図 6、図 7 に示す。収束時間、オーバーシュート及び評価関数におけるグレー部分 (Diverge) は、制御が不安定になり対象物の位置が収束しなかったことを表す。 $K_p$  を変化させた時には収束時間とオーバーシュートは下に凸のような概形を取り、 $K_p$  の最適な値が存在することがわかる。また、 $K_i$  を変化させた時、収束時間は下に凸、オーバーシュート

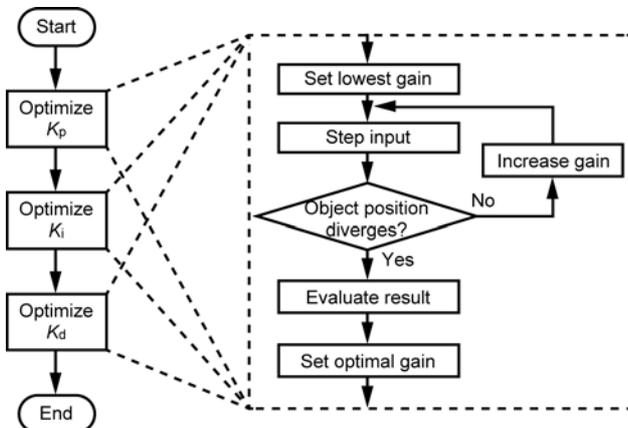


図 4. 制御ゲインの自動最適化フローチャート

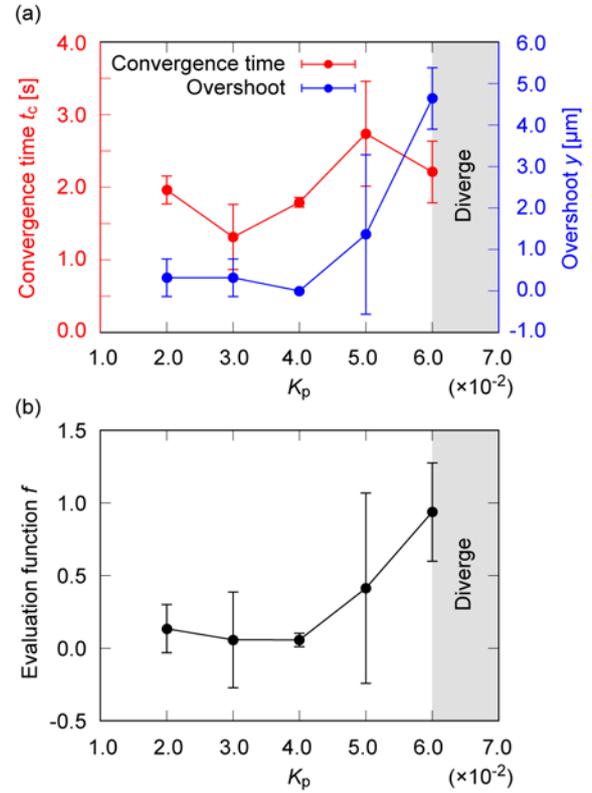


図 5. 比例ゲイン  $K_p$  に関する (a) 収束時間  $t_c$  とオーバーシュート  $y$ , (b) 評価関数  $f$

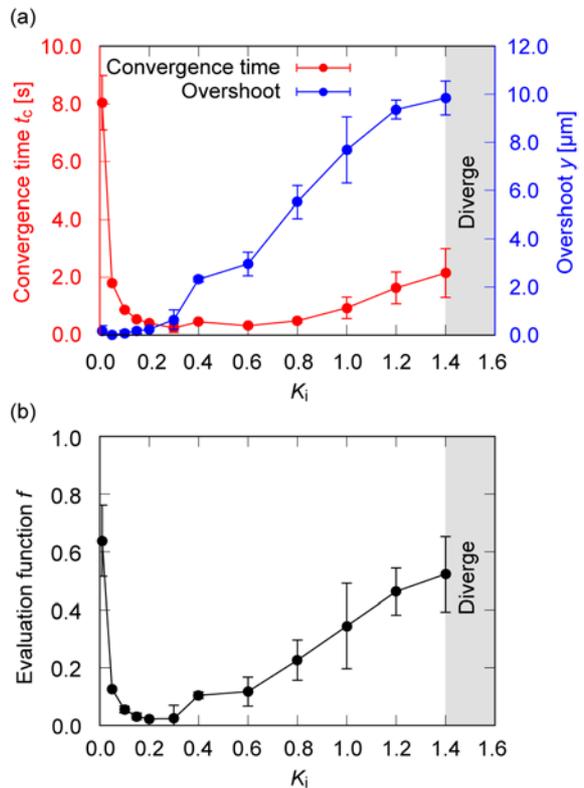


図 6. 積分ゲイン  $K_i$  に関する (a) 収束時間  $t_c$  とオーバーシュート  $y$ , (b) 評価関数  $f$

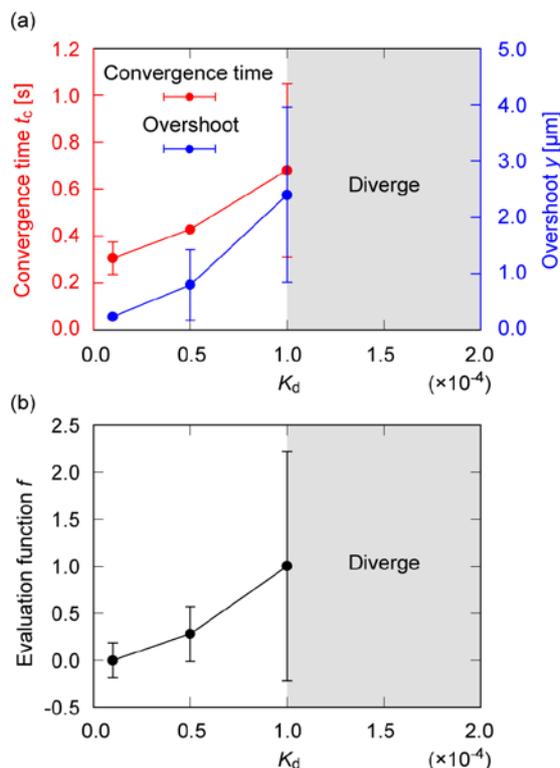


図 7. 微分ゲイン  $K_d$  に関する (a) 収束時間  $t_c$  とオーバーシュート  $y$ , (b) 評価関数  $f$

は  $K_i$  の増加とともに単調に大きくなった。  $K_d$  を変化させた時、収束時間とオーバーシュートの両方が  $K_d$  の増加に伴い単調に大きくなった。  $K_p$ ,  $K_i$ ,  $K_d$  全てに共通して、ゲインを増加していくと最終的に不安定になった。

一連の自動調整で最適化されたゲインは  $K_p = 0.04$ ,  $K_i = 0.2$ ,  $K_d = 0.00001$  であった。この最適ゲインの場合と、実験開始時の初期ゲイン  $K_p = 0.02$ ,  $K_i = 0.00001$ ,  $K_d = 0.05$  の場合のマイクロビーズのステップ応答を図 8 に示す。実際に、収束時間とオーバーシュートも小さくなり、対象物の位置制御性能の向上に成功したことが見てとれる。

#### IV. 考察

実験における最適ゲインは、同様の方法で実験を行ったとしても、マイクロ流体デバイスのセットアップ毎に実現した実際のむだ時間やチューブ、マイクロチップを介した変位の伝達特性、1000

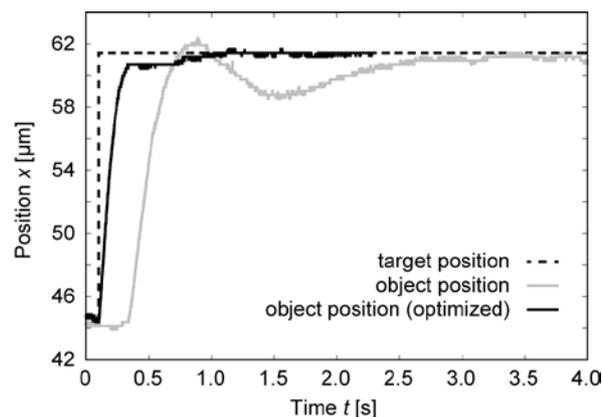


図 8. 最適化前後のステップ応答

[Hz]の制御周波数による離散時間処理や撮影画像のピクセルデータ化などシステムそのものの離散性、などを原因として、理論によって予測される最適ゲインとは異なるものとなる。したがって、実験セットアップ毎に本研究のような手法で最適ゲインを探索する必要がある。本実験で構築した最適ゲイン探索システムを用いることで毎実験行う必要があるゲイン調整を自動化することが可能となり実験時間を短縮し、実験を容易に行うことができる」と期待される。

本研究では、マイクロ流路内を高速で流れる対象物を捕捉し位置制御 (On-chip マニピュレーション) を行うマイクロ流体システムにおいて、最適な制御ゲインへと調整するまでを自動で行うシステムを構築した。対象物が高速で流れて捕捉できない状態から自動で  $K_p$  を増加させるシステムを構築し、自動での対象物捕捉に成功した。その後、捕捉した対象物に対して PID ゲインを変化させてステップ入力を与え、応答の収束時間とオーバーシュートから制御性に関する評価関数を作成するシステムを構築した。また、作成した評価関数の最小化によってステップ応答特性を最適化し、ステップ応答の最適ゲインの自動探索を行った。本研究で構築した On-chip マニピュレーションの自動最適化システムにより、システムへの習熟や制御理論の深い理解をスキップして対象物のマニピュレーションや評価を行うことができるようにな

る。このような自動最適化システムは、iPS 細胞や ES 細胞の選別や品質評価に用いるマイクロ流体デバイスとして再生医療の発展に貢献するほか、臨床現場におけるマイクロ流体デバイスを用いた細胞診断などの応用化へもつながっていくと期待できる。

本研究の一部は、科研費基盤 (JP15H05761)、挑戦的研究 (萌芽) (JP17K18759)、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業 (大阪大学ナノテクノロジー設備供用拠点) (F-17-OS-0001, S-17-OS-0001) の支援を受けて行われた。

## 引用文献

- 1) Hegab HM, ElMekawy A, Stakenborg T: Review of microfluidic microbioreactor technology for high-throughput submerged microbiological cultivation. *Biomicrofluidics* 7: 021502, 2013.
- 2) Lee CY, Chang CL, Wang YN et al: Microfluidic mixing: a review. *Int J Mol Sci* 12: 3263-3287, 2011.
- 3) Teh SY, Lin R, Hung LH et al: Droplet microfluidics. *Lab Chip* 8: 198-220, 2008.
- 4) Gravesen P, Branebjerg J, and Jesen OS: Microfluidics- a review. *J Micromech Microeng* 3: 168-182, 1993.
- 5) 藤井 輝夫: マイクロ流体デバイスのバイオ分野への応用. *生産研究* 55: 121-126, 2003.
- 6) Lindner M, Bauer G: ヒト iPS 細胞技術の実用化に向けたマイクロ流路デバイス. *日本薬理学会誌* 149: 115-118, 2017.
- 7) Sun T and Morgan H: Single cell microfluidic impedance cytometry- a review. *Microfluid Nanofluid* 8: 423-443, 2010.
- 8) Jeon KJ, Park SH, Shin JW et al: Combined effects of flow-induced shear stress and micropatterned surface morphology on neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biosci Bioeng* 117: 242-247, 2014.
- 9) Horade M, Tsai CHD, Ito H et al: On-chip cell gym. 2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017).
- 10) Tsai CHD, Akai T, Horade M et al: Virtual vortex gear. 2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS2017).
- 11) 川田 治良, 木村 啓志, 金田 祥平 他: マイクロ流体デバイスを用いた多能性幹細胞の時空間分化誘導制御. *生産研究* 64: 31-35, 2012.
- 12) Chung BG, Flanagan LA, Rhee SW et al: Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. *Lab Chip* 5: 401-406, 2005.
- 13) Gómez-Sjöberg R, Leyrat AA, Pirone DM et al: Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Anal Chem* 79: 8557-8563, 2007.
- 14) Ertl P, Sticker D, Charwat V et al: Lab-on-a-chip technologies for stem cell analysis. *Trends Biotechnol* 32: 245-253, 2014.
- 15) Singh A, Suri S, Lee T et al: Adhesion strength-based, label-free isolation of human pluripotent stem cells. *Nat Methods* 19: 438-444, 2013.
- 16) Narsinh KH, Sun N, Sanchez-Freire V et al: Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 121: 1217-1221, 2011.
- 17) Hirose Y, Tadakuma K, Higashimori M et al: A new stiffness evaluation toward high speed cell sorter. 2010 IEEE International Conference on Robotics and Automation, ICRA2010: 4113-4118, 2010.
- 18) Bow H, Pivkin IV, Diez-Silva M et al: A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria. *Lab Chip* 11: 1065-1073, 2011.
- 19) Sakuma S, Kuroda K, Tsai CHD et al: Red blood cell fatigue evaluation based on the close-encountering point between extensibility and recoverability. *Lab*

Chip 14: 1135-1141, 2014.

20) Monzawa T, Kaneko M, Tsai CHD et al: On-chip actuation transmitter for enhancing the dynamic response of cell manipulation using a macro-scale pump. *Biomicrofluidics* 9: 014114, 2015.

21) Ito H, Murakami R, Sakuma S et al: Mechanical diagnosis of human erythrocytes by ultra-high speed manipulation unraveled critical time window for global cytoskeletal remodeling. *Sci Rep* 7: 43134, 2017.

### Optimization of On-Chip Position Control System for Automated Cell Evaluation

英文要旨 : Microfluidic devices have various functions such as particle trapping, mixing, and droplet formation realized by designed fluidic behavior in a microscale environment. These novel handling techniques have been used to evaluate small amount of solution or suspension of biological cells, ranging from red blood cells to stem cells. Recently the on-chip cell manipulation system by feedback pressure control in a microchannel was developed, and a relationship of cell characteristic and disease has been reported with this system. To improve manipulation performance, it was necessary to adjust PID gain manually. Since the manual adjustment of the gains is time-consuming and expertise on control engineering is required, it has been difficult to widely adopt this method at medical scenes. In this work, we aim to construct a system with automatic PID gain tuning. We developed a system that automatically catches an object flowing in a microfluidic device and optimizes PID gain for manipulation based on convergence time and overshoot. We succeeded in automatic catch by adjusting the proportional gain and in automatic gain optimization with an evaluation function of step responses.

責任著者 : 伊藤 弘明, 金子 真

住所 : 大阪府吹田市山田丘 2-1 機械系 M4 棟 406

所属 : 大阪大学大学院工学研究科機械工学専攻

Department of Mechanical Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University

E-Mail: ito@hh.mech.eng.osaka-u.ac.jp, mk@mech.eng.osaka-u.ac.jp