



Title	VSION-BASED ON-CHIP CELL MANIPULATION
Author(s)	Uvet, Huseyin
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/23494">https://hdl.handle.net/11094/23494</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	フセイン ウベツト HUSEYIN UVET
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 8 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科システム創成専攻
学 位 論 文 名	VISION-BASED ON-CHIP CELL MANIPULATION (視覚センサを用いたオンチップ細胞マニピュレーション)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 新井 健生 (副査) 教 授 佐藤 宏介 教 授 宮崎 文夫

論 文 内 容 の 要 旨

There are two main concepts and challenging issues for on-chip living cell operations which as sensing and manipulation. Visual sensing techniques of living cells associated with numerous computer vision methods and automatic manipulation tasks of them have vital importance for microfluidic devices. Key requirements in successful implementation of such techniques are real-time cell detection, tracking, sizing and dexterous on-chip or off-chip cell manipulations, which are essential parts of the micro-robotic applications.

Visual sensing process is the first part to be implemented on microfluidic chips. Due to high cost and big sizes, on-the-shelf microscopic systems are not appropriate to be used to monitor different locations at the same time on microfluidics devices. Thus, integration of optical components with microfluidic devices accompanied by light sources and sensors can be an efficient alternative. Although there have been a wide range of applications using integrated optics on fluorescent techniques, there are no widely-known integrated camera ready optical devices coupled with a light source for the purpose of image analysis capable of acquiring the required information such as size and position to manipulate cells in a micro channel. Three MicroVision systems were prototyped and designed for the purpose of on-chip continuous monitoring of living cells. These compact imaging systems were associated with computer vision algorithms. They are compact and provide a good image quality allowing extraction of the desired information of the living cells from the acquired images.

Dexterous manipulation is main function for on-chip cell operations such as single cell loading/supply and cell coupling. To do that, cells must be aspirated from a container and then, transfer into microfluidic chip. For example, in conventional method, the single cell transfer and control from a container to in a PDMS microfluidic chip is carried out by the aid of a micro-pipette suction and manual on-chip stream manipulation by a pump. Biological cells must be picked up from the container one by one under the view of microscope and then, supplied into the microfluidic chip, where single cell operations are performed. For each single cell, an operator should go over same method again until collecting desired number of cells. Even though this process is somehow relatively easy for big size cells (oocyte ~100  $\mu\text{m}$ ), it is infeasible for small size cells (fibroblast ~15  $\mu\text{m}$ ) for repetition of this process. A skilled operator is required for such kind of time consuming applications. Moreover, if the pump speed doesn't synchronize with every manual cell supply process, bubble formation could be observed in the flow stream, which is harmful for living cells. Once the desired number of cells is delivered into micro-channel, they need to be brought into the operation area one by one again. Besides, the distance between consecutive cells cannot be maintained in the micro-channel by manual methods. Here, I show a novel solution which can accomplish all these manipulation tasks (cell suction, transportation, in-chip position control and cell supply to other modules) automatically with one integrated system in order to achieve successful single cell loading/supply and cell coupling.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

小型PDMS基板上に設けたマイクロ流路内で各種細胞を操作するため、流路内細胞の状態を観察するマイクロビジョンシステムと、ビジョン情報を用いて流路内で細胞の搬送や位置決めなどを行う制御手法の提案と応用システムの構築について研究がおこなわれている。本研究は、自動クローニング技術開発の一環として行われており、小型基板上に搭載可能なマイクロビジョンシステムと、細胞操作の具体的な実例として、チップ流路への細胞の自動投入、並びに卵子とドナー細胞のカップリング操作について、新たな方法論やシステムの提案が行われている。

マイクロビジョンシステムは流路上に搭載が可能で流路内の細胞を非接触で観測する必要がある。特に、高解像度と全体の小型化が極めて困難な設定条件であり、これを市販の光学素子やCCDカメラなどを用いて経済的に構成するため、光学系の設計やチップ上への搭載方法などが検討、評価されており、小型顕微鏡システムとしての最適化が図られている。また、提案された可変焦点レンズはPDMS流路の制約と特性を生かした光学系であり、倍率の調整が外部からの空気圧制御で簡単に行える画期的な光学素子である。レンズを構成する液状光学媒体の屈折率に応じて、現状では40lp/mmの解像度の鮮明な細胞の顕微鏡画像が得られている。

搭載型ビジョンシステムを用いた細胞操作の具体的手法として、卵子と線維芽細胞をそれぞれ単一細胞として採集し、チップ流路内へ自動投入するシステムの構築が扱われている。自動投入はポンプによる吸引と押し出しを利用しており、細胞収納容器内の細胞を個別に認識し自動吸引した後、2つのバルブを搭載したY字型切り替え流路と流速の制御により、細胞を安定にPDMS流路内に供給するシステムが実現されている。手作業による従来の細胞投入を大きく改善し、自動で安定に細胞を供給するシステムを提案しており、バイオ操作実験の効率化に貢献する画期的な技術で

ある。

さらに、クローニングに有用な卵子とドナー細胞のカップリング操作について研究が行われている。流路内で直径 $100\text{ }\mu\text{m}$ の卵子表面に直径 $20\text{ }\mu\text{m}$ 程度の線維芽細胞を確実に付着させる操作であり、提案したマイクロビジョンシステムの取得画像を利用して、ポンプ流量の制御と付着に必要な誘電泳導制御を行うために、大きさが異なる2つの細胞の位置情報を安定に取得する手法が提案されている。実証実験と評価により、成功率の高いカップリングの動作制御が実現されていることが示された。

以上の通り、マイクロビジョンシステムとビジョン情報を用いた流路内細胞操作について、新たな方法論やシステムの構築を行い、チップ上に構成された流路内での自動細胞操作の実現可能性を示すとともに、自動クローニングの確立に大きく貢献をしている。ロボット工学における学術的かつ技術的貢献をもたらしており、博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。