

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14196

研究課題名(和文) マルチマテリアルのナノ加工による光機能制御マイクロ・ナノロボットの創成

研究課題名(英文) Generation of optically-controlled micro-nano robot by nanofabrication of multi-material

研究代表者

丸山 央峰 (Hisataka, Maruyama)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60377843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：光機能制御マイクロ・ナノロボット創成を目的として、異なる波長の光の照射により、搬送、ロボット表面のゼータ電位制御による細胞附着、表面プラズモン効果によるロボットの温度制御、蛍光を用いた局所環境計測、が可能なロボットの試作と評価を行った。1064 nmの近赤外レーザーによる搬送、366 nmの紫外光によるゼータ電位制御、808 nmの近赤外光による温度制御、可視光領域の波長に用いた蛍光環境計測、が可能なマイクロ・ナノロボットの作製と機能制御に成功した。今後は作製したマイクロ・ナノロボットを用いて細胞内導入の成功率や細胞生存率の評価、および細胞内局所刺激や細胞内計測に向けた研究を行っていく。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of generation of optically-controlled micro-nano robot, function control such as transportation, cell attachment by zeta potential control on the robot surface, temperature control of the robot by surface plasmon effect, local environment measurement using fluorescence, by irradiation with light of different wavelengths was fabricated and evaluated. We confirmed the functions such as transportation by 1064 nm near-infrared laser, zeta potential control by ultraviolet light at 366 nm, temperature control by near infrared light at 808 nm, fluorescence environment measurement used for wavelength in visible light. In the future, we will conduct research on rapid and low-invasive injection of the micro-nano robot, intracellular local stimulation, and intracellular measurement using micro-nano robot.

研究分野：マイクロ・ナノロボティクス

キーワード：マイクロ・ナノメカトロニクス

1. 研究開始当初の背景

細胞計測において、細胞外の環境制御とそれに伴う細胞活性の計測（イオン濃度、温度等）に関する研究は盛んにおこなわれているが、特定の単一細胞内外におけるイオン濃度勾配の制御およびイオン勾配や力学的刺激に対する応答計測や、細胞間のシグナル伝達に関する研究を行っている例は少ない。本研究は、光により機能制御可能なマイクロ・ナノロボットを用いて細胞内の局所環境計測・制御とそれに対する細胞の活性変化の計測を目標としている。

申請者はこれまでに、光硬化性樹脂のハイドロゲルをビーズ状もしくは膜状に形成したゲルツールを用い、マイクロ流体チップ内の環境計測、細胞操作および細胞内外の局所環境計測に関する研究を行ってきた。ゲルツールを光ピンセットで操作することで細胞操作を、電解質濃度制御と併用した光誘起細胞固定、フォトクロミック材料の光構造変化による可逆的な細胞付着を実現してきた（丸山, JRM 2010）。

また、ゲルが網目状のポーラス構造をしていることを利用し、環境指示薬を内包したゲルツールを作製して、マイクロスケールでのチップ pH 分布、細胞内温度、細胞酸素消費速度の計測を実現してきた（丸山, *Microfluidics and Nanofluidics* 2009）。このゲルツールによる計測は光を用いるため細胞内等の配線が困難な領域での計測が可能である。また同様に光により pH 等を制御することで、従来のポンプやピペットでは不可能であった細胞内等の溶液交換が困難な場所での選択的な局所刺激を実現できる。例えば、ゲルツールに紫外光を照射することで水素イオンを放出する分子を導入することで、任意の微小空間の pH 制御に成功している（丸山, ICRA2013）。また、光により色が変わり光の吸収波長が変化する分子を導入することで、選択的な温度制御が可能となる。

以上のように、温度、pH を制御可能なマイクロ・ナノロボットは、細胞内局所計測及び細胞活性制御に大きく貢献できるものである。

2. 研究の目的

光造形やフォトリソグラフィ等の微細加工技術で作製した微小構造体に、照射する光の波長で物性や構造が変化しその機能を任意に制御可能なナノマテリアルを組み込み、これを非接触で操作することで、細胞を対象として、高速操作、細胞刺激、細胞の力学的特性および生理状態の計測を実現する光機能制御マイクロ・ナノロボットを創成する。フォトレジスト等の光硬化性ポリマーにフォトクロミック材料及び環境指示薬を導入した材料を微細加工技術により目的の形状に造形することで、細胞操作および細胞の生理状態や力学的特性の計測・制御を実現する。これを実現するため、①光機能制御マイク

ロ・ナノロボットの作製・操作・制御、③ナノ・マイクロロボットを用いた細胞刺激および応答計測、について研究を実施する。

3. 研究の方法

光機能制御マイクロ・ナノロボットの創成のため、以下の項目について研究を行う。

（1）光機能制御マイクロ・ナノロボットの作製・操作・制御

フェムト秒レーザや自己組織化等を用いて、異なる光機能性材料と混合したポリマー、光硬化性樹脂、生体高分子等を積層造形することで、多層構造を有するマイクロ・ナノロボットを作製する。非接触に温度や pH・応力を計測・制御するために機能性材料を導入することで、光機能制御ナノ・マイクロロボットを作製する。

（2）光機能性マイクロ・ナノロボットを用いた細胞刺激および応答計測

作製した光機能制御マイクロ・ナノロボットを用いて、細胞の生理状態や力学刺激に対する応力の計測、細胞内部での温度・pH 刺激を行う。

4. 研究成果

図 1 に、本課題で作製した光機能制御マイクロロボットを用いた応用例として細胞内への光機能制御マイクロロボット導入の概念図を示す。光機能制御マイクロロボットは、任意の環境に対して感受性を有し可視光で励起される蛍光色素で修飾されている。また、この光機能制御マイクロロボットは、図 2 に示すように脂質二重膜で覆われており、その脂質膜内部には、808 nm の光を選択的に吸収し表面プラズモン効果で発熱する長さ 41 nm の金ナノロッドと、360 nm 付近の紫外光により分子構造が変化しゼータ電位が増加するフォトクロミック材料のスピロピラン (SP)

(図 2(b)) が内包されている。SP は紫外光が照射されると分子構造がメロシアン型に変化し、ゼータ電位が上昇する。この変化は 420 nm 硫黄の可視光や熱により元に戻り可逆的に生じる。この光によるゼータ電位変化を利用し、通常はロボットのゼータ電位を負にすることで不要なロボットの細胞への付着を防止し、目的のロボットのみを正のゼータ電位にすることで選択的固定を実現する。

この光機能制御マイクロロボットの細胞への選択的導入においては、まず 1064 nm の波長のレーザによる光ピンセットで操作し目的の細胞まで搬送する。光機能制御マイクロロボットを細胞膜上まで搬送した後、紫外光を照射することで光機能制御マイクロロボットのゼータ電位が負から正に変え、負のゼータ電位である細胞膜上にクーロン力により付着させる。808 nm の光を細胞膜上に固定した光機能制御マイクロロボットへ照射することで、加熱により細胞膜を融解して蛍

光センサを細胞内へ導入する．細胞内の局所的な環境を蛍光センサの蛍光情報を用いて取得する．

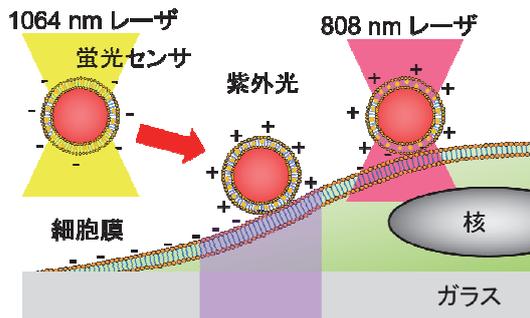


図 1 光機能制御マイクロロボットを用いた選択的細胞導入の概念図

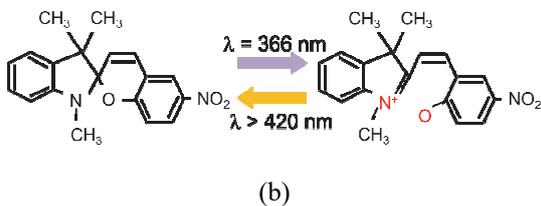
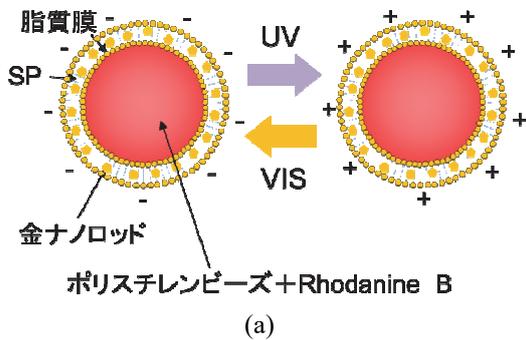
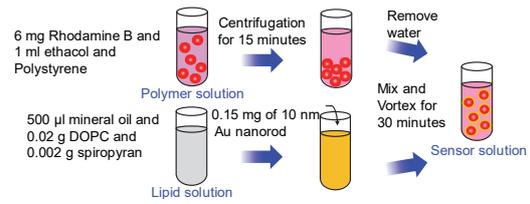


図 2 光機能制御マイクロロボットの概念図。(a), (b)

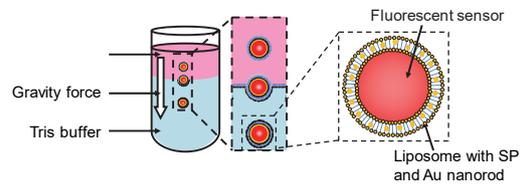
本課題で作製した光機能制御マイクロロボットの作製プロセスを以下に示す (図 3)．光機能制御マイクロロボットは，直径 $1 \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズ，直径 10 nm ，長さ 41 nm の金ナノロッド，温度感受性の蛍光色素である Rhodamine B，電気的に中性な脂質の DOPC，フォトクロミック材料の 1,3,3-トリメチルインドリノ-6'-ニトロベンゾピロリシラン(SP)で構成される．

蛍光センサの作製プロセスを以下に示す．

1. ポリスチレンビーズを Rhodamine B のエタコール溶液 (6 g/l) に含浸し，ポリスチレンビーズを染色する．
2. DOPC との SP 及び金ナノロッドのエタコール溶液を $500 \mu\text{l}$ のミネラルオイルと混合し脂質溶液を作製する．
3. マイクロチューブに下から PBS バッファ，脂質溶液，ビーズ溶液の層を形成し，油中液滴法によりビーズを脂質膜に内包し蛍光センサを作製する．



(a)



(b)

図 3 光機能制御マイクロロボットを用いた選択的細胞導入の概念図

図 4 に本研究で用いた実験システムを示す．倒立顕微鏡に 1064 nm のレーザを用いたホログラフィック光ピンセットシステム，蛍光画像を取得可能なレーザ共焦点蛍光観察システム，紫外光を照射可能な落射蛍光システム， 808 nm の光を照射可能なフェムト秒レーザシステムが組み込まれている．図 5 に示すように， 1064 nm のレーザを用いて，任意の蛍光センサを選択的に搬送することに成功した．また，図 3(c)に示すように 561 nm の励起光により蛍光センサの蛍光画像の取得が可能であることも確認した．本グループの先行研究により Rhodamine B の蛍光強度の温度感受性は， $-2.5 \%/K$ である．

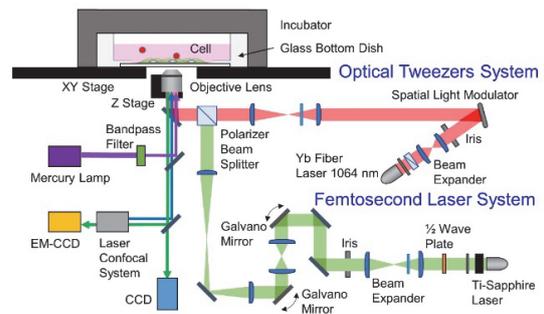


図 4 実験システムの光学系

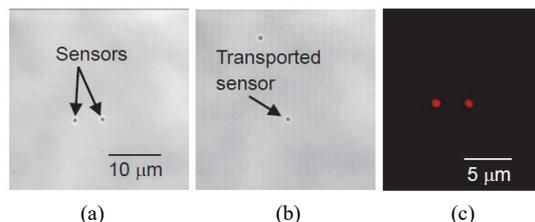


図 5 光機能制御マイクロロボット．(a) 明視野画像，(b) 光ピンセットによる搬送，(c) 蛍光画像

表 1 に紫外光照射前後のゼータ電位を示す．光機能制御マイクロロボットのゼータ電位

の計測は静電容量方式のナノ粒子分析装置を用いた。紫外光照射により負のゼータ電位であったが、正のゼータ電位に変化するため、クーロン力により細胞膜への付着により、高速細胞搬送や細胞への固定が可能である。

表 1 光ゼータ電位制御による電位変化

	Before UV illumination	After UV illumination
Zeta potential	-69.7 mV	141.1 mV

図 6 に犬の腎臓細胞 (MDCK) に光機能制御マイクロロボットを選択的に固定した結果を示す。紫外光を照射しながら光機能制御マイクロロボットを細胞へ接触させることで、約 80% の成功率で細胞膜上で固定させることに成功した。

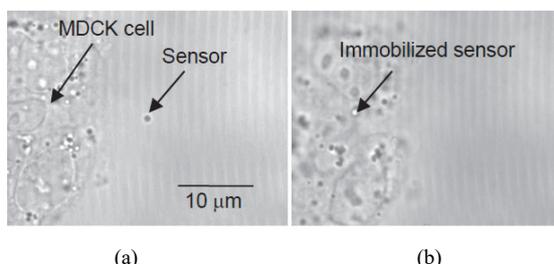


図 5 光機能制御マイクロロボットのゼータ電位制御による MDCK 細胞への付着. (a) 付着前, (b) 付着後

図 6 に、光機能制御マイクロロボットに 808 nm のレーザを入射した前後の温度変化の計測結果を示す。レーザの強度は 100 mW とした。808 nm レーザの照射により約 4 K の温度上昇が確認された。図 7 にレーザ強度を変えた条件での温度上昇のグラフを示す。レーザ強度 I と温度上昇 ΔT の間に比例関係が存在し、式 1 であらわすことができる[4]。

$$\Delta T = 0.034 \times I \quad (1)$$

レーザ強度を 1.5 W とすれば 50 K 以上の加熱が可能であり、細胞膜を融解させ蛍光センサを導入することが可能である。以上より、複数の波長の光を用いて、単一の蛍光センサで複数の機能制御の有効性を確認した。

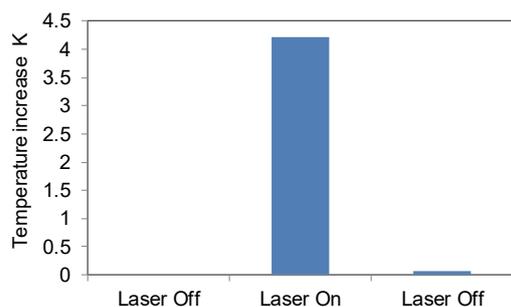


図 6 808 nm レーザ光照射による光機能制御マイクロロボットの温度制御

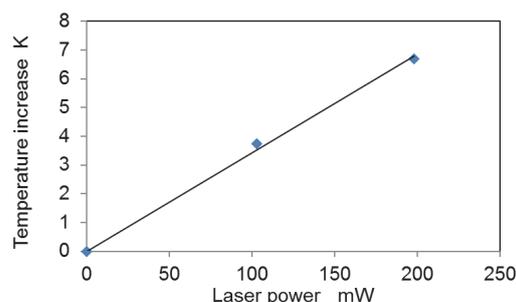


図 7 8808 nm レーザ光の強変化による光機能制御マイクロロボットの上昇温度の変化

本研究では、高分子マイクロビーズに対して、異なる波長の光に反応する光応答性材料を修飾することで、搬送、環境計測、ゼータ電位制御、局所加熱といった、異なる機能を独立に制御可能な光機能制御マイクロロボットの作製、評価により有効性を確認した。今後は、本ロボットを細胞内に導入し、ウイルス感染等の刺激印加時の細胞内の生理状態変化の計測や、加熱刺激による細胞の状態変化や活性制御などのへの応用に向けて研究を行っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/member/profile/Maruyama.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 央峰 (MARUYAMA HISATAKA)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60388743

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し