

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12608
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K05020
研究課題名(和文)2次元マイクロ凹面鏡アレイとケーラー照明による単一細胞2次元アレイ操作技術の開発

研究課題名(英文)A study of two-dimensional array manipulation technique and single-cell isolation using two-dimensional micro-concave mirror array and Koehler illumination

研究代表者
松谷 晃宏 (Matsutani, Akihiro)
東京工業大学・オープンファシリティセンター・主任技術専門員

研究者番号：40397047
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年の単一細胞操作の技術開発の要求は従来の集団分析的な方法から個々の細胞の振舞いに着目した研究に移りつつある。本研究はマイクロメートルサイズの微生物細胞についての単一細胞の捕獲技術を開発するものであり、2次元マイクロ凹面鏡アレイを配置した基板にケーラー照明の平行光を用いた集光スポット位置での光学的な細胞捕獲技術を用いることにより、単一細胞2次元アレイ捕獲技術の開発を目指し、2次元アレイ細胞トラップの原理実証や簡易製造法の実現可能性について示すことができた。また、スンプ法によるセルロイド製マイクロ凹面鏡の製作方法は、ディスポーザブルなマイクロ時計皿の製作にも活用可能なことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示した2次元アレイ細胞トラップの原理や簡易製造法の実現可能性やスンプ法によるセルロイド製マイクロ凹面鏡の製作方法は、近年の単一細胞操作の技術開発の要求にも合致したものである。本研究の成果を応用することにより、従来の集団分析的な生化学的技術における多くの細胞から得られた平均値のみしか情報から、個々の細胞の振舞いに着目した研究が可能になり、創薬や細胞工学の研究に新しい展開が期待できる。本研究の成果は、このような細胞分析技術の要素技術の一つとして活用できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, the demand for technological development of single-cell manipulation is shifting from conventional population analysis methods to research focusing on the behavior of individual cells. The purpose of this study is to develop a single-cell capture technology for bacterial cells, which is an optical system at the focused spot position using parallel light of Kohler illumination on a substrate on arranged a two-dimensional micro concave mirror array. By using various cell-capturing techniques, we were able to demonstrate the principle of a two-dimensional array cell trap and the feasibility of a simple manufacturing method with the aim of developing a single-cell two-dimensional array capture technology. It was also suggested that the method of making celluloid micro concave mirrors by the SUMP method, which was carried out in this study, could be used for making disposable micro watch glasses.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

キーワード：細胞捕獲 リソグラフィ スンプ法 凹面鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、単一の細胞を操作する技術開発の要求が増加している。これは、従来のコロニー形成による方法では集団的取り扱いしかできないため、同一の培養液中においてもそれぞれの細胞の特徴は同一でないにもかかわらず、各細胞の個性まで分離できないためである。また、基板表面のマイクロ及びナノポジショニングに関心の高まりがあるが、そのアプリケーションはバイオセンサーおよび分子エレクトロニクスを含むものである。位置決めのためのパターン形成のために、例えばディップペンリソグラフィーや静電的位置決め、あるいは自己組織化などの方法があるが、いずれも分離速度はきわめて遅い。また、異なるサイズの粒子や細胞小器官、細胞の選別は生物学および医学的用途のために重要であるが、細胞の大きさの分類を瞬時に自動的に制御する方法はほとんどみあたらない。従来の単一細胞分離技術は基板に小さな穴(well)を掘って細胞を捕獲する方法であった。この方法では μm サイズの細胞を対象とする場合、穴の直径が小さくなり表面張力等の影響により液体の供給や循環が難しくなることが多い。そこで、報告者らはマイクロピラーの柵(マイクロ囲い)で細胞を囲うという方法を提案し、大腸菌や酵母の単一細胞の分離、異なるサイズの細胞の分離や捕獲細胞の培養を実現した。この単一細胞分離の方法は、単一細胞分離技術としては捕獲確率が高くほぼ理想的な結果が得られた。しかしながら、細胞の捕獲は懸濁液中の細胞の自重で沈む確率的なプロセスに頼っており、細胞密度が低い懸濁液では単一分離は可能なものの、単一分離された細胞は広い面積に分散したもので、その他の要素技術と融合し $\mu\text{-TAS}$ として利用するには単一細胞分離構造への細胞導入のための収集・瞬時位置決め技術のような課題が残されていた。報告者らは、これを解決するために、細胞を微粒子として扱い、クラドニ図形の原理で垂直振動による液体定在波(ファラデー波)を利用した細胞収集パターンについて酵母を用いて形成することに成功し、これに上記マイクロ囲いを併用しマイクロ流路フリーで細胞の収集・瞬時位置決め技術を確立した。

しかしながら、マイクロ囲いにより2次元アレイ状に単一細胞分離した細胞を、例えば液中に浮揚させながら培養したり光反応の分析に利用したりするには単一分離した細胞の2次元アレイトラップ技術の開発が必要となる。細胞のトラップ技術については、光ピンセット技術があるが、これは集光系の対物レンズを観察系とは別に用意して集光した一つのスポットに細胞をトラップするもので、2次元アレイ化は難しい。つまり、2次元アレイトラップを可能にするには、基板表面上マイクロ囲い構造で単一分離した細胞それぞれに専用の集光機能を用意すればよいということになる。本研究では、2次元アレイ状態で細胞をトラップすることを目指し、複数の2次元アレイ集光スポットを製作するというところが特徴となる。2次元アレイ操作の基礎に関連する実験については、これまでに3~7mWの出力の波長850nmの面発光レーザー(VCSEL)を用いた細胞トラップの報告がたが、VCSELアレイの製作は一般的には困難であり、素子それぞれに供給する電気配線も必要となる。また、2次元マイクロレンズアレイによる集光点での捕獲操作の手法も考えられるが、トラップ光がない時には細胞がレンズの凸面上に落下するため位置決めが不安定となり再度捕獲することが難しかった。

2. 研究の目的

本研究で目指す2次元アレイ細胞トラップの原理は、凹面鏡を用いてその焦点の位置に平行光を集光するものである。顕微鏡観察の落射照明では、ケーラー照明により試料上に平行光で照明して観察することができる。従来の細胞操作技術で用いられる光ピンセットの原理は集光位置で細胞をトラップするものである。これらを組み合わせると、図1のようにマイクロ凹面鏡にケーラー照明の光を当てれば、凹面鏡の焦点の位置に集光可能で、条件が整えば、観察するだけでその位置で細胞をトラップできることになる。つまり、マイクロ凹面鏡を2次元アレイ状に製作すれば、多数の細胞を同時にアレイ状にトラップできることになる。これは液体中に浮遊したストレスフリーな状態であり、マイクロ囲い構造と併用することにより、単一分離と捕獲が光のon/offで制御することも可能となる。また、レンズ系で特有の色収差は凹面鏡では原理的に存在しないので様々な波長の光の焦点ズレが無く、高いNA(開口数)も実現し易いのも応用面で有利となる。さらに、上述の垂直振動を利用した細胞収集方法やセンサー技術との組み合わせについてもマッチングがよく、幅広い応用展開が期待できる。マイクロ凹面鏡を用いた先行研究の事例では、半導体微細加工技術を駆使した複雑な手法で製作されていた。本研究では、細胞の2次元アレイトラップについて次のような予想される解決すべき課題とした。

- (1) マイクロ凹面鏡による細胞トラップの原理実験
- (2) 2次元アレイマイクロ凹面鏡とマイクロ囲い構造を組み合わせた製作方法の開発
- (3) 2次元アレイマイクロ凹面鏡チップと液体定在波による細胞収集方法の融合

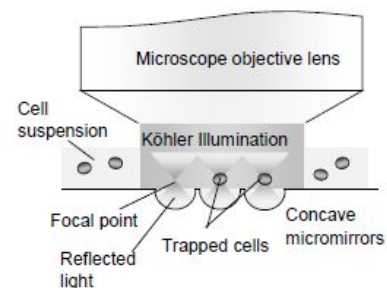


図1 2次元マイクロ凹面鏡アレイによる細胞トラップの原理

本研究では、これらを段階的に解決することを目指した。

3. 研究の方法

本研究で提案したマイクロ凹面鏡構造の政策には、まず初めに XeF₂ 気相エッチングによる Si マイクロ凹面鏡の製作を行った。実験には Si(100)基板を用いた。電子線レジスト ZEP520 に EB リソグラフィにより形成した直径 5 マイクロメートル以下のアレイ状の円形開口のエッチングマスクパターンを用いて、自作の XeF₂ 気相エッチング装置で Si 基板の等方性エッチングを行い、直径 40 マイクロメートルの半球形状のマイクロ凹面鏡を形成した。これを金属顕微鏡のケラー照明下で観察しマイクロ凹面鏡の光学特性を確認した。細胞捕獲の実験には、酵母細胞を用いた。マイクロ凹面鏡のより簡易な制作方法については、レーザー描画とニッケルメッキで製作したモールドにスンプ法でセルロイド板に転写する方法で、実験者が手元で量産する方法を試みた。

4. 研究成果

XeF₂ 気相エッチング装置で Si 基板の等方性エッチングを行い、半球形状のマイクロ凹面鏡を形成した結果を図 2 (a) に示す。本マイクロ凹面鏡構造表面に Al 薄膜をスパッタにより成膜し、Si 基板表面よりも反射率を向上させることも確認した。また、2 段階エッチングによる凹面形状の制御を行い、本手法により放物面形状の製作が可能であることもわかった。また、図 2 (b) に示すように、レーザー光を用いて製作したマイクロ凹面鏡の集光スポットの光学特性評価も評価し、十分な集光性能をもつことを確認した。この手法で製作した図 3(a) に示すマイクロ凹面鏡を用いて酵母細胞の捕獲を試みたところ、光源の強度が捕獲力の下限に近かったこともあったが、揺れながら捕獲されたとされる事象を観測することもできた。図 3 (b) に細胞の軌跡を含めた様子を示す。

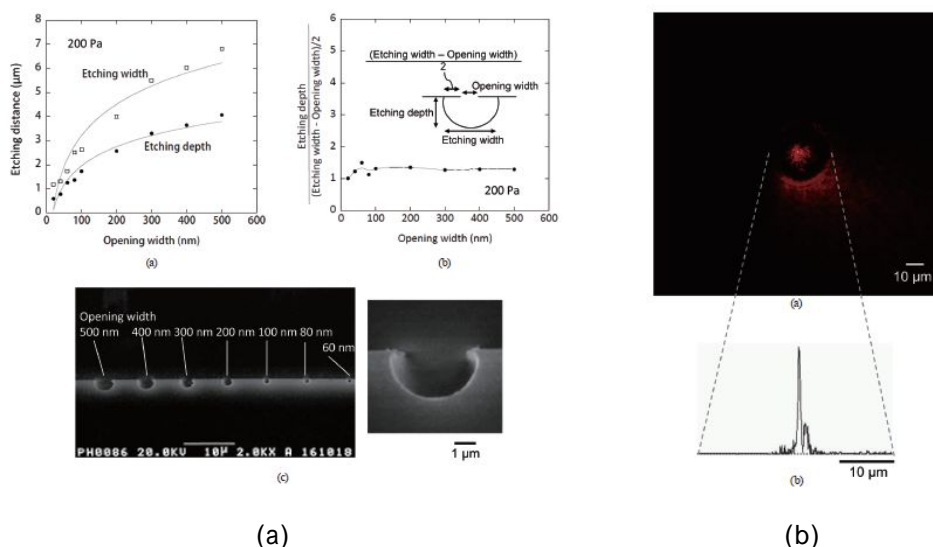


図2 XeF₂ 気相エッチング装置を用いた Si 基板の等方性エッチングによる半球形状のマイクロ凹面鏡形成結果 (a) と集光スポットの観測結果 (b)。

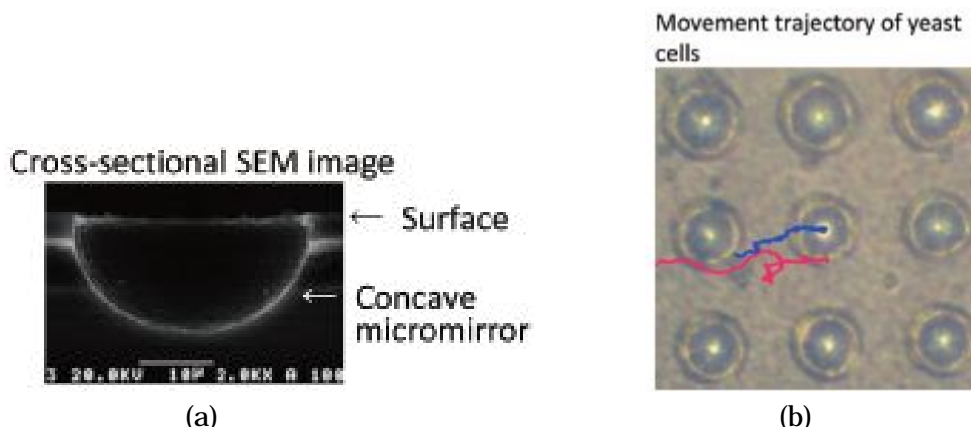


図3 懸濁液製作したマイクロ凹面鏡の断面 (a) と中の酵母細胞の軌跡 (b)

上記の Si マイクロ凹面鏡では鏡面に粗さが存在していたことと製作プロセスがやや複雑であったことから、より簡易に製作するために図 4 (a)に示すような、レーザーリソグラフィ装置でフォトリソスト上に直接描画することでマイクロ凹面鏡構造を形成した後、メッキにより凹面鏡製作のための Ni モールドを製作し、これを用いて樹スンプ法でセルロイド板上に転写して球面鏡などのマイクロ凹面鏡を形成する方法を試みた。直径 25~70 マイクロメートルのマイクロ凹面鏡を金属顕微鏡のケラー照明下で観察したマイクロ凹面鏡の集光位置では、図 4(b)に示すように球面の凹面鏡と放物面の凹面鏡でそれぞれの特徴を示した集光スポットを観察することができ、本手法で製作した凹面構造がマイクロ凹面鏡としての集光機能を有することがわかった。また、このセルロイド製のマイクロ凹面鏡構造表面に Al 薄膜を真空蒸着プロセスにより成膜し、樹脂表面よりも反射率を向上させた。XeF₂ 気相エッチングではエッチング面の粗さが大きかったが、本手法ではより平滑な凹面鏡表面が得られており集光効率が改善された。本方法により任意の形状のマイクロ凹面鏡を簡便に実験者が手元で必要数を制作できる方法が確立された。

細胞の収集・単一捕獲・アレイ状操作の連続プロセスの実証については、単一細胞 2 次元アレイトラップチップの製作技術と液体定在波による収集方法の融合を目指した。波長 850 nm の近赤外半導体レーザー光を顕微鏡の光路に導入して、マイクロ凹面鏡により集光スポット生成し、可視光で観察したところ、酵母細胞を部分的にはあるが短時間の捕獲の様相を観測した。しかし、本研究で用いた方法では集光点に酵母細胞がやってくるのは偶然性を利用した方法であり、効率のよいものとはならなかった。垂直振動による液体定在波（ファラデー波）を利用した細胞を微粒子とみなした集積化では、細胞密度の高低の実現はできたが、高効率で細胞を捕獲するには、垂直振動とともに、先行研究で実施されたようなマイクロ流路による細胞導入が必要であると考えられる。

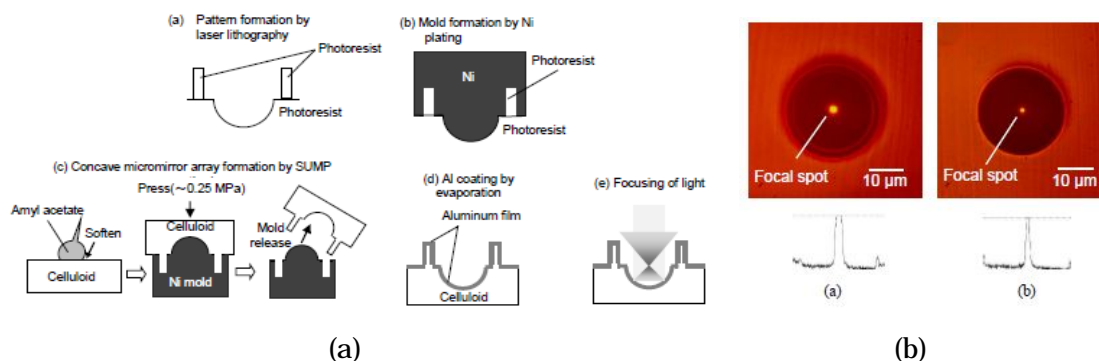


図 4 スンプ法によるセルロイドマイクロ凹面鏡の形成法(a)とその集光スポット像(b)

一方、浅い深さのマイクロ凹面鏡をスンプ法でセルロイド板上に形成して、倒立顕微鏡で観察すると、図 5 に示すような単一細胞を周期的に配列可能なマイクロ時計皿として機能することが実証された。また、この手法では、細胞懸濁液の濃度を制御することにより、ある程度のまとまった数の細胞群を比較的小さな標準偏差で周期配列させることも可能であり、この機能は、細胞の単一分析や一定量の集団分析などに応用可能なことが示唆された。

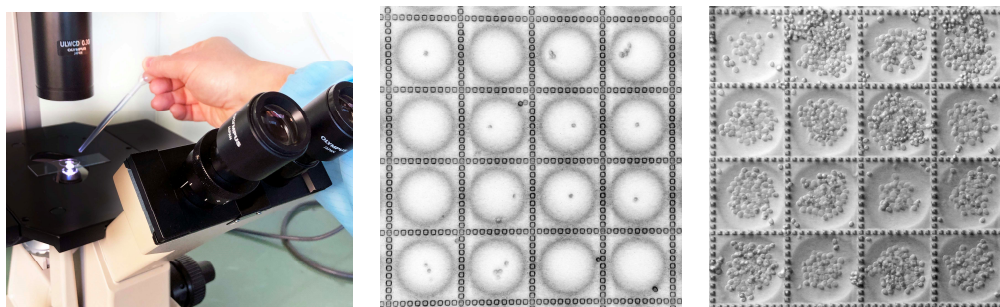


図 5 スンプ法でセルロイド板上に形成した浅い深さのマイクロ凹面鏡の細胞の周期的配列可能なマイクロ時計皿として機能させた例

以上により、本研究で目指した 2 次元アレイ細胞トラップの原理や簡易製造法の実現可能性について示すことができた。また、本研究で実施したスンプ法によるセルロイド製マイクロ凹面鏡の製作方法は、ディスプレイなマイクロ時計皿の製作にも活用可能なことが示唆された。本研究の成果は、細胞分析技術の要素技術の一つとして活用できるものと期待さ

れる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akihiro Matsutani	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct observation of spherical aberration under microscope using concave micromirrors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1088/1361-6404/ab90df.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiro Matsutani, Mina Sato, Koichi Hasebe, Ayako Takada	4. 巻 31
2. 論文標題 Microfabrication of Concave Micromirror for Microbial Cell Trapping Using Kohler Illumination by XeF2 Vapor Etching	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 1325-1334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.18494/SAM.2019.2235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akihiro Matsutani, Ayako Takada	4. 巻 30
2. 論文標題 Celluloid Microenclosure and Microlens Array Fabricated by Suzuki's Universal Microprinting Method and XeF2 Vapor Etching for Microbial Analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 149-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM.2018.1729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松谷晃宏
2. 発表標題 スンプ法によるセルロイドマイクロ時計皿アレイ細胞集積チップの製作
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Matsutani, A. Takada
2. 発表標題 Optical Characterization of Concave Micromirror Array for Microbial Cell Trapping Fabricated by Laser Lithography and SUMP Method
3. 学会等名 MNC 2019, 32st International Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松谷晃宏, 高田綾子
2. 発表標題 スンプ法とレーザー描画により製作したマイクロ凹面鏡の集光特性
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松谷晃宏, 佐藤美那, 長谷部浩一, 高田綾子
2. 発表標題 Siマイクロ凹面鏡とケーラー照明光による酵母細胞の捕獲
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Matsutani, M. Sato, K. Hasebe, A. Takada
2. 発表標題 Microfabrication of Si-based Concave Micromirror Array for Microbial Cell Trapping by XeF ₂ Vapor Etching
3. 学会等名 MNC 2018, 31st International Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松谷晃宏, 佐藤美那, 長谷部浩一, 高田 綾子
2. 発表標題 XeF ₂ 気相エッチングにより製作した微生物細胞捕獲用Siマイクロ凹面鏡の集光実験
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A. Matsutani, A. Takada
2. 発表標題 Profile Control in Si Etching by Two-step Etching Process Using XeF ₂ Vapor for Fabrication of Concave Micromirror
3. 学会等名 39th International Symposium on Dry Process (DPS2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松谷晃宏, 西岡國生, 佐藤美那
2. 発表標題 XeF ₂ 気相エッチングによるSiマイクロ凹面鏡構造の製作
3. 学会等名 第65回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松谷晃宏, 高田綾子
2. 発表標題 XeF ₂ 気相エッチングとスンプ法により製作したセルロイドマイクロレンズによる酵母細胞の捕獲実験
3. 学会等名 第78回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----