

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19760170

研究課題名 (和文) ゲルマイクロツールの光ピンセット操作による閉空間内の局所環境計測

研究課題名 (英文) ON-CHIP LOCAL ENVIRONMENT MEASUREMENT USING GEL-MICROTOOL MANIPULATED BY OPTICAL TWEEZERS

研究代表者

丸山 央峰 (MARUYAMA HISATAKA)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60377843

研究成果の概要：ゲルマイクロツールを用いてマイクロ流体チップ内における局所環境計測を目的として、親水性の光硬化性樹脂を電解質水溶液中で凝集して作製し内部に pH や温度感受性の色素や蛍光色素等の指示薬を内包した機能性ゲルマイクロツールの作製、光照射によるゲルマイクロツールの付着制御によるマイクロ流体チップでのセンサアレイの構築及び細胞周辺局所計測、及びゲルマイクロツールの非特異吸着を生じない特性を利用したツールの計測環境への局所投入法を実現した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：機械工学

科研費の分科・細目：知能機械学・機械システム

キーワード：マイクロ・ナノデバイス、光ピンセット、ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

細胞の構成要素並びに細胞集団を扱うバイオ産業が発展する中で、細胞そのものの機能にはまだ不明な部分が多い。細胞をシステムとして理解するには、細胞が環境中の外部刺激に対してどう反応し、どう状態を変化させるのかを計測する必要がある。細胞集団における細胞1固体レベルでの変化をモニタリングし、環境の変化に対するタンパク質の発現等の細胞の変化を追うことで、未知遺伝子の機能解明等が可能となる。細胞と細胞周りの環境との相互関係の解明には細胞周りの局所空間の環境を計測する必要がある。

細胞近傍の環境計測を行うためには外乱の影響を低減可能なマイクロ流体チップ等の微小閉空間での計測が有効であり、微小閉空間での環境計測を行うための計測プローブとその操作手法が必要となる。従来のマイクロ流体チップ内の環境を計測する手法としては蛍光法があり環境全体を一度に計測することが可能であるが、計測の度に蛍光試薬の投入が必要となるだけでなく蛍光試薬が細胞内に入り込んで細胞に好ましくない影響を与える可能性がある。また温度又はpHに対して依存性を有する高分子を表面に化学的に修飾したマイクロビーズを用いる手

法があるが、ビーズ表面の化学的な修飾に長時間を要する。その他の手法としては微細加工により温度センサや pH センサをマイクロチップ内に製作する手法があるが、センサは固定されているため計測可能な範囲はセンサの存在する場所のみであり、3 次元的に任意の場所の環境計測及び細胞周りの 3 次元的な環境計測は困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、レーザによる非接触操作手法である光ピンセットにより駆動する計測プローブと計測プローブをマイクロチップ内に必要な時に局所的に投入する局所投入法を確立し、閉空間であるマイクロチップ内において 3 次元的な局所環境計測の実現を目的として以下の項目について研究を行う。

(1) 光硬化性樹脂を用いた塩析・凝析ゲルマイクロビーズによる環境計測ゲルマイクロツールの作成

(2) 環境計測ゲルマイクロツールのマイクロチップ内への局所投入

3. 研究の方法

(1) 光硬化性樹脂を用いた塩析・凝析ゲルマイクロビーズによる環境計測ゲルマイクロツールの作成

光硬化性樹脂と高濃度電解質溶液との混合による塩析及び凝析により生じるゲルツールの内部に環境依存性を有する高分子を導入し環境計測ゲルマイクロツールを製作する。ゲルツール内に導入する高分子としては色素及び蛍光試薬を用いる。塩析及び凝析したゲルは光硬化性樹脂のため紫外光により重合させること形状を維持でき、高塩濃度溶液中以外でも使用可能である。また重合したゲルツールはガラスやゲルツール同士が接触におり付着するため、レーザ操作におけるマイクロ流体チップ内の環境計測の他にマイクロ流体チップ内に固定しての定点観測やゲルを組み立てて用途に応じたゲルツールを作成することが可能である。ゲルツール内部の高分子と溶液との反応が必要な計測の場合はツール内への液透過性を有する親水性光硬化性樹脂の塩析ゲルを、ツール内の高分子と溶液の反応が不要もしくは望ましくない場合は疎水性光硬化性樹脂を用いる等選択が可能である。作製したゲルツールを光ピンセットで操作し、マイクロ流体チップ内の環境を 3 次元的及び局所的に計測する。

① 環境計測ゲルマイクロツールに適用可能な環境依存性高分子の選別

環境計測ゲルツールに適用可能な環境依存性高分子の選別を行う。環境依存性を有する色素及び蛍光色素をゲルツール内部に導入した場合としない場合での環境変化に対する応答を測定し比較を行い、十分な環境応答性を示す環境依存性高分子の選別を行う。

② 環境計測ゲルマイクロツールの作成

選別した環境依存性高分子を親水性及び疎水性光の光硬化性樹脂を塩析及び凝析させて生じるゲルマイクロビーズに導入して図1に示すような環境計測ゲルマイクロツールを作成する。作成したゲルマイクロツールについて分解能、精度、耐久性等の評価を行う。また作成した環境計測ゲルマイクロツールを光ピンセットによる操作及びマイクロチップ内部に固定してマイクロチップ内の環境計測を行う。

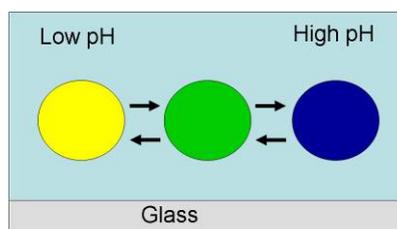


図1環境計測ゲルマイクロツールの概念図

③ 環境計測ゲルツールプローブの作成

環境計測ゲルツールにレーザを直接照射して操作する場合、ゲルツールへのレーザの熱吸収が生じると温度計測の場合計測に悪影響を与える。また細胞周辺の環境を計測する場合レーザの細胞への吸収も問題となる可能性となる。これらの問題を図2に示すようにゲルマイクロツールと脂質からなるナノチューブ材料を組み立てることで環境計測ゲルツールプローブを作成する。プローブの組み立ては、未硬化のゲルツールはナノチューブ材料を内部に包むように取り込むのでプローブが作成可能である。作成したゲルツールプローブと環境計測ゲルマイクロツールでマイクロチップ内の環境計測の結果の比較を行う。

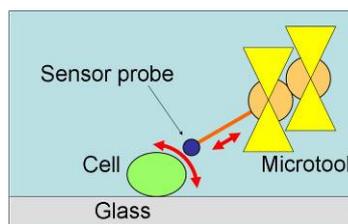


図2環境計測ゲルツールプローブの概念図

(2) 環境計測ゲルマイクロツールのマイクロチップ内への局所投入

環境計測ゲルマイクロツール及びゲルツールプローブをマイクロチップ内で効率的に使用するためには環境計測ゲルマイクロツールを計測エリアに局所的且つ迅速に投入する必要がある。このためゲルマイクロツールをツールホルダーに配列しマイクロ流体チップ内に設置することでゲルツールの計測環境への局所投入を行う。

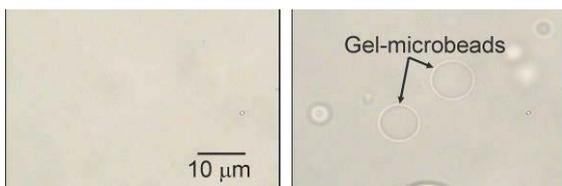
ツールホルダーとしてガラス上に熱可塑性のゲルをコーティングしたものをを用いる。図6に示すようにゲル上にゲルマイクロツールを固定する。レーザによるゲルの加熱によりゲルマイクロツールを離脱する。ゲルの発熱しやすくなるようゲルにレーザを吸収する物質を添加する。ツールホルダーはマイクロチップ内に設置する。マイクロチップの材料としてシリコン樹脂を用いておりガラスに対して自己吸着性を有するためマイクロチップへのホルダーの固定は容易である。

4. 研究成果

(1) 複数環境計測ゲルツールの作製とオンチップ局所環境計測及び電解質濃度とUV/VIS 照射による機能性ゲルマイクロツールの付着制御

ゲルマイクロツールの材料として、細胞やタンパク質等の生体物質の固定に用いられる光硬化性樹脂 (ENT-3400, 関西ペイント) を塩析により凝集させて作製した図3に示すゲルマイクロビーズを用いた。この樹脂の主成分はポリエチレングリコール (PEG) のプレポリマーで親水性である。近紫外光 (366 nm をピークとする) の照射によりラジカル重合が生じ重合する。ゲルツールの屈折率は約 1.4 で水 (約 1.3) よりも高いため、水溶液中において光ピンセットにより操作できる。

ゲルマイクロビーズの生成に必要な電解質濃度を4種類の電解質に関して調べた。表1に示すようにゲルツールが生成可能な電解質濃度はホフマイスター系列における凝集力の強さに応じて低くなった。本課題ではゲルマイクロツールは 8.0 wt% のリン酸二カリウム水溶液中で生成し紫外光照射により重合したものをを用いた。



(a) 0 wt% solution (b) 8.0 wt% solution
図3 ゲルマイクロツールの写真 (wt%はリン酸二カリウム水溶液の濃度である)

表1 ゲルマイクロツールの生成に必要な電解質濃度

Electrolyte	Concentration wt%
sodium chloride	22.5
potassium acetate	15.0
sodium acetate	11.3
phosphate	8.0
dipotassium salt	

作製したゲルマイクロツール内部にブROMOチールブルー (BTB) やブROMOKレゾールグリーン (BCG) 等の pH 指示薬や Rhodamine B のような温度の上昇に従って蛍光強度が低下する蛍光色素を導入することで環境計測ゲルマイクロツールを作製した。しかしながら単独の指示薬の内包では計測対象数及び計測範囲に限られる。複数の指示薬を一つのゲルツールに内包することで計測範囲の拡大は可能であるが、指示薬の色変化の鈍化による計測能の低下や指示薬同士の干渉の問題が生じる可能性がある。

そこで、異なる指示薬を含んだ環境計測ゲルツールを複数組み立てることで、単独の指示薬では困難な広い計測範囲や pH や温度等の複数の環境要素の同時計測を実現した。複数環境計測ゲルツールの製作及び使用プロセスは以下の通りである (図4参照)。

- ①指示薬と光硬化性樹脂の混合溶液を高濃度電解質水溶液へ導入後1分間の攪拌処理及びUV照射により環境計測ゲルツールを作製
- ②ゲルツールをマイクロチップ内へ投入
- ③任意の試薬を含むゲルツールを組立
- ④組み立てた複数環境ゲルツールの色及び蛍光強度を CCD で取得し pH 及び温度の計測。

この方法で作製した複数環境計測ツールは、異なる指示薬を独立に内包したゲルツールを組み立てるため指示薬同士の干渉を受けにくい。細胞周辺等の特定の場所の計測は、組み立てたゲルツールの姿勢を光ピンセットで制御し目的の指示薬を内包した部分を対象に近づけることで行う。また互いに干渉しない指示薬を用いる場合は、複数の指示薬を同一のゲルツールに内包した複数環境計測ゲルツールを作製可能である。

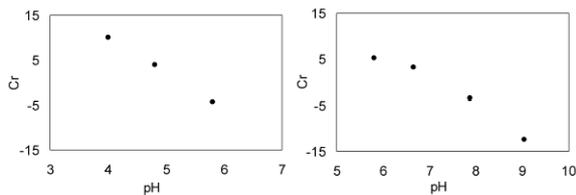
本課題では計測対象を pH と温度とした。pH の計測は pH 指示薬である BTB と BCG を用いた。BTB は pH6~8 に変色域を有し、酸性側で黄色をアルカリ性側で青色を示す。BCG は pH4~6 に変色域を有し、酸性側で黄色を中性側で青色を示す。pH の計測はゲルツールの色変化の検出により行う。CCD で得られる RGB 情報の各成分には輝度情報が含まれている

ため輝度が色測定に影響を与えることが考えられる。輝度情報と色情報を分離するため式(1)により RGB 色空間から YCrCb 色空間に変換した。Yは輝度, Crは赤の色差, Cbは青の色差である。BTB及びBCGはpHの増加に伴い黄から青へと変色するため pHの増加に伴い Crは減少, Cbは増加する。CCDで得たゲルツールの色情報を変換して求めた Cr, Cbの値と pHとの校正結果に基づいて pH計測を行い, 温度に関しては 25度の蛍光強度を基準にした相対強度で校正を行った(図4参照)。

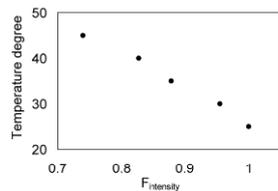
$$Y = 0.299R + 0.587G + 0.114B$$

$$Cr = 0.5000R - 0.419G - 0.081B \quad (1)$$

$$Cb = -0.169R - 0.419G + 0.500B$$



(a) Cr with pH in BCG (b) Cr with pH in BTB



(c) Temperature with fluorescence

図4校正結果

ゲルツールの組立は電解質濃度制御と UV照射を用いて行った。一定以上の濃度の電解質水溶液中でガラスや他のゲルツール及び細胞と付着するが選択性が欠如していた。選択的なゲルツールの組立を実現するため, 紫外光照射を併用した選択的なゲルツールの付着制御法を開発した。ゲルツールの選択的な付着のプロセスは以下の通りである(図5参照)。ゲルツールを操作し対象の接触後に接触している場所に紫外光を照射することで接触させたゲルツールと対象のみが選択的に付着する。付着は1秒未満の紫外光照射で可能である。この手法でゲルツールの選択的な付着が可能な電解質濃度を表3に示す。

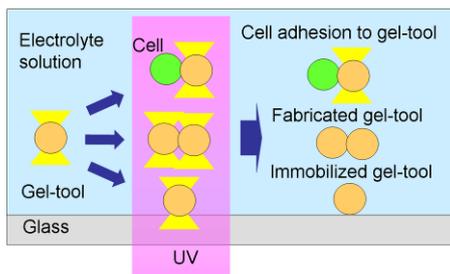


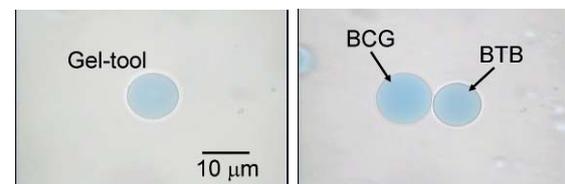
図5 ゲルツールの選択的付着制御プロセス

表3 ゲルマイクロツールの選択的付着が可能な電解質濃度

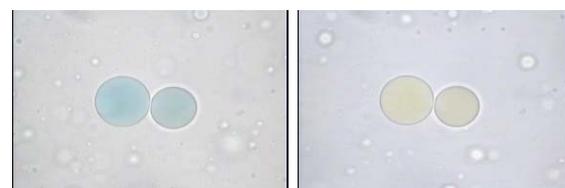
Electrolyte	Concentration wt%		
	Adhesion to glass	Adhesion to gel-tool	Adhesion to yeast cell
sodium chloride	2.5	1.9	1.9
phosphate dipotassium salt	0.1	0.1	0.2

複数環境計測ゲルツールのオンチップ作製とマイクロチップ内での複数環境計測を行った。BTBとBCGを内包した2つのゲルツールを組み合わせ pH4から pH9の範囲での計測が可能な広範囲 pH計測ゲルツールと BTBとローダミン Bを同一のゲルビーズに内包した pH・温度ゲルツールの2種類の複数環境計測ゲルツールを作製した。

広範囲 pH計測ゲルツールのオンチップ組立と pH計測の結果を図6に示す。pH9の溶液中においてそれぞれ BTB, BCGを内包した2つのゲルツールを光ピンセットで操作し図6(b)に示すゲルツールを組み立てた。その後 pH4の溶液を導入しゲルツールの色変化の観察画像と校正結果から広範囲での pH計測に成功した。図7に温度・pH計測ゲルツールによる計測の結果を示す。BTBとローダミン Bが互いに干渉しないため, 明視野及び蛍光観察の切り替えにより試薬の干渉の影響を受けず pHと温度の異なる環境要素の計測に成功した。

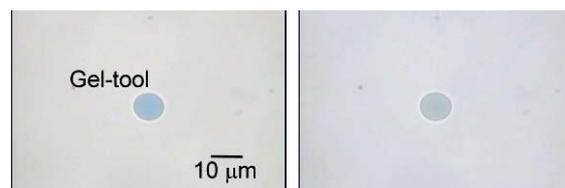


(a) Gel-tool with BTB (b) Gel-tool (pH9)



(c) pH8.1 (d) pH4.6

図6 広範囲 pH計測ゲルツール

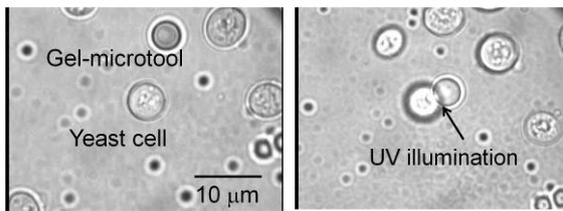


(a) Gel-tool (pH8.8) (b) pH8.8

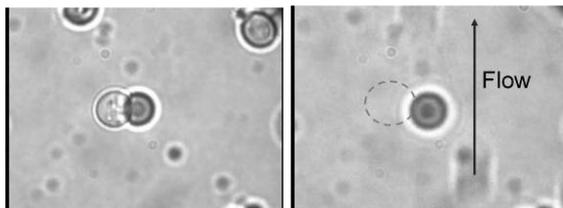


(c) pH4.6 (d) Temp. sensing (25°C)
図7 温度・pH計測ゲルツール

またフォトクロミック材料のスピロピラン (SP) をゲルツールに導入し UV/VIS 照射による SP の分子構造制御による可逆細胞固定を実現し (図), 前述の電解質濃度制御と UV 照射による不可逆固定との併用によりオンデマンド細胞付着制御を実現し, ゲルツールを用いた細胞計測の基盤技術を確立した。



(a) Gel-tool fixation (b) Cell adhesion

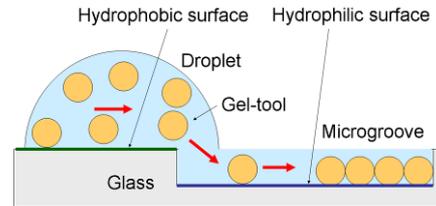


(c) Adhered cell (d) Cell release by VIS
図8 UV/VIS照射による可逆細胞付着制御

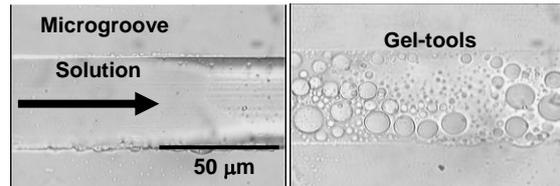
(2) 機能性ゲルマイクロツールのマイクロ流体チップへの局所投入

図9(a)に示すような親水化処理をしたガラス基板上に微小な溝を作製したゲルツールホルダを作製した。ホルダの溝及びマイクロチャンネルと重なる部分以外を疎水性に処理後, ゲルツールを含んだ溶液を溝の端部に滴下することで, 溶液の溝への導入と共にゲルツールが重力及び表面張力により自動的な溝への導入に成功した (図9(b), (c))。溝以外は疎水性のため溶液の蒸発に伴いゲルツールは溝内へと導入される。ゲルツールは非特異吸着を生じにくいPEGを主成分とし, また表面が非帯電のためゲルツールは溝の壁面及び他のゲルツールと付着を防止できた。ゲルツールの導入後ホルダとマイクロ流体チップを組み立てた。図10(a)に示すようにホルダの溝内のゲルツールは光ピンセットでの操作が可能であり, 溝内の任意のゲルツールを取り出すことでツールの局所投入に成功した。また使用後はゲルツールをホルダの溝中に入れることで重力により

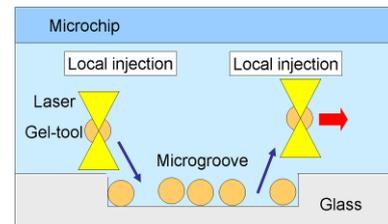
ゲルツールを溝中に保持することが可能であり, 投入と収納を可逆的に行うことが可能な局所投入法を実現した (図10(b), (c))。



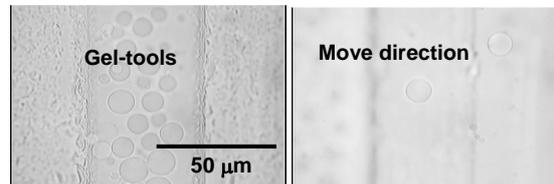
(a) Concept



(b) Tool holder (c) Injected tools
図9 ゲルツールのホルダー導入



(a) Concept



(b) Gel-Tools (c) Injected tool
図10 ゲルツールの局所投入

本課題での成果により大きさ数 μm の計測用ツールをマイクロ流体チップ内で自在に操作しまた目的に応じた形状への組立や細胞へ付着の可逆制御が可能となり, また計測ツールのマイクロチップ内への局所的な投入が実現され, 閉空間での局所環境計測実現のための要素技術の確立できたと考える。

この計測ツールは細胞操作ツールとしての利用も可能であり, マイクロ・ナノロボティクス分野における, スマートマイクロアクチュエータとしての学術意義が高い。微小閉空間内の局所環境計測が容易になることは, 細胞1個単位でのより詳細な特性解析を可能とし, 生命科学・医療等の分野への多大な貢献が期待される。今後は細胞周辺から細胞内の局所計測へと展開することで細胞内操作と計測を両立するスマートナノアクチュエータへの展開を考えている。

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4件)

- ① Hisataka Maruyama, Toshio Fukuda, Fumihito Arai, Functional gel-microbead manipulated by optical tweezers for local environment measurement in microchip, *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読有, 6, 2009, pp. 383-390
- ② 丸山央峰, 新井史人, 伊藤正樹, 中島正博, 福田敏男, 複数環境計測のための機能性ゲルツールのオンチップ作成, *日本ロボット学会誌*, 査読有, 26, 2008, pp. 583-589
- ③ Hisataka Maruyama, Fumihito Arai, Toshio Fukuda, On-Chip pH Measurement Using Functionalized Gel-Microbeads Positioned by Optical Tweezers, *Lab on a Chip*, 査読有, 7, 2008, pp. 346-351
- ④ 丸山央峰, 新井史人, 福田敏男, 複数環境計測のための機能性ゲルマイクロツールのオンチップ作成, *化学とマイクロ・ナノシステム研究会誌*, 査読無, 6, 2007, pp. 32-33

[学会発表] (計12件)

- ① 丸山央峰, 機能性ゲルツールの光誘起付着制御, 第18回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2008年12月9日, 京都大学 (京都府京都市)
- ② Hisataka Maruyama, On-Demand Adhesive Control of Functional Gel-Tool for On-Chip Cell Measurement, 2008 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2008年11月8日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- ③ Hisataka Maruyama, ON-CHIP LOCAL PH MEASUREMENT AROUND INDIVIDUAL CELL USING OPTICALLY MANIPULATED GEL-TOOL WITH ADHESIVE-CONTROLLABILITY, The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2008年10月14日, Sheraton San Diego Hotel & Marina (サンディエゴ, アメリカ)
- ④ 丸山 央峰, 機能性ゲルツールのオンデマンド付着制御, 第26回日本ロボット学会学術講演会, 2008年9月9日, 神戸大学 (兵庫県神戸市)
- ⑤ 丸山央峰, 機能性マイクロツールを用いたオンチップ細胞計測システム, ロボティクス・メカトロニクス講演会2008, 2008年6月8日, ビッグハット (長野県

長野市)

- ⑥ Hisataka Maruyama, Fabrication of Functional Gel-Microbead for Local Environment Measurement in Microchip, 2008 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2008年5月20日, Pasadena Conference Center (パサデナ, アメリカ)
- ⑦ Hisataka Maruyama, On-Chip Fabrication of Optical Multiple Microsensor Using Functional Gel-Microbead, 2007 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2007年11月12日, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
- ⑧ Hisataka MARUYAMA, ON-CHIP pH AND TEMPERATURE SENSING WITH GEL-TOOL MANIPULATED BY OPTICAL TWEEZERS, The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2007年10月8日, Cité des Sciences et de l'Industrie パリ (フランス)
- ⑨ 丸山央峰, 複数環境計測ゲルツールのオンチップ作製, 第25回日本ロボット学会学術講演会, 2007年9月14日, 千葉工業大学 (千葉県習志野市)
- ⑩ 丸山央峰, 複数環境計測のための機能性ゲルマイクロツールのオンチップ作成, 第15回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2007年5月26日, 東北大学 (宮城県仙台市)
- ⑪ 丸山央峰, 機能性ゲルツールによるオンチップ複合環境計測, ロボティクス・メカトロニクス講演会2007, 2007年5月12日, 秋田拠点センターALVE (秋田県秋田市)
- ⑫ Hisataka MARUYAMA, Gel-tool Sensor Positioned by Optical Tweezers for Local pH Measurement in a Microchip, 2007 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2007年4月11日, Angelicum University (ローマ, イタリア)

[図書] (計1件)

丸山央峰, シーエムシー出版, 細胞分離・操作技術の最前線, 2008, pp. 23-30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 央峰 (MARUYAMA HISATAKA)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 60377843

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者