

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25620114

研究課題名(和文)有機相中で光渦により捕捉した単一細胞を反応容器とする化学計測

研究課題名(英文)Chemical analysis using a single cell trapped by vortex beam as a reactor in organic phase

研究代表者

金田 隆 (KANETA, Takashi)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20243909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、レーザートラッピングを利用した単一細胞分析のための新しい方法の開発を目指した。レーザートラッピング技術は分散媒体よりも高い屈折率をもつ物体の操作に有効である。しかしながら、水滴の屈折率は有機溶媒の屈折率よりも低いため、有機溶媒中で水滴を操作することは困難である。この問題を解決するために、ドーナツ型のビーム形状をもつ光渦を利用した。この光渦を利用した有機溶媒中での水滴の捕捉、操作、融合のための方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to develop a novel technique for the analysis of a single cell using laser trapping. A laser trapping technique is useful for manipulating a small object dispersed in a medium with refractive index higher than that of the object. However, it is difficult to manipulate a water droplet in an organic solvent since water has the refractive index lower than that of the organic solvent. To solve this problem, we utilized a vortex beam which has a doughnut-shaped profile. Using the vortex beam, the method for trapping, manipulation, and fusion of water droplets in the organic solvent, manipulation was developed.

研究分野：分析化学

キーワード：レーザートラッピング 単一細胞計測 光渦 水滴 油滴 融合 化学計測

1. 研究開始当初の背景

近年、単一細胞内の化学成分を計測する技術が、細胞内現象解明のためのツールとして要求されている。通常、細胞の化学成分は、多数の細胞を溶解して行われるが、すべての化学種の濃度は平均値としてしか得られないため、個々の細胞における化学種の相対量を正しく評価できない。このような問題の解決には、単一細胞での計測が必要不可欠である。

もっとも広く用いられている単一細胞の計測法に顕微イメージングがある。この方法は顕微鏡を用いて単一細胞内の現象を計測するものであり、細胞内の局所的な情報が獲得できる。しかしながら、遺伝子工学のような特別な技術が必要かつ法令による制約があるため簡便性に乏しく、また定量分析が困難である。すなわち、局所的な情報は得られるが、細胞全体での物質量を測定することはできない。

一方、マイクロチップやキャピラリーのような微小空間を利用する単一細胞の化学計測法も報告されているが、単一細胞をキャピラリー内に導入するのは容易ではない。キャピラリー電気泳動による単一細胞計測は有効な手法のひとつであるが、特殊な注入装置を必要とするため、一般的には用いられていない。マイクロチップを利用する方法もまた、研究レベルの段階であり、より容易に単一細胞計測を実現できる技術が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、光の放射圧を利用する光トラッピング技術を利用し、有機溶媒中で細胞を捕捉し、細胞自身を反応容器として利用する化学計測法を開発することを目的とした。光トラッピング技術を利用することで、単一の細胞を操作することが容易となり、従来にはない簡便な単一細胞計測を実現できるものと期待できる。

しかしながら、光トラッピングでは、その基本原理から、媒体よりも高い屈折率をもつ物体を捕捉することはできるが、媒体よりも低い屈折率をもつ物体は光から逃れようとする。したがって、通常の条件では、高い屈折率をもつ有機溶媒中で水媒体である細胞を光トラップするのは困難である。そこで本研究では、光渦のレーザー光を利用して細胞を捕捉する。光渦を利用することで、単一細胞を有機溶媒中で単離させて捕捉し、その細胞を反応容器として利用できるものと考えられる。そこで、この原理に基づき単一細胞を操作するためのシステムを構築し、新しい単一化学計測法の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究では細胞自身を反応容器とする単一細胞化学計測を実現するために以下の実験を行った。

(1) レーザー光を二つに分割し、二つの液滴を独立して操作するためのシステムの構築と、これを用いた水相に分散した油滴の捕捉、操作、並びに融合

(2) 軸対称偏光変換素子を用いたレーザー光の光渦への変換と光渦ビームによる有機溶媒中での単一水滴の捕捉と融合

4. 研究成果

(1) 水溶液中に分散させた油滴をレーザーにより捕捉し融合させるために、レーザー光を二つに分割して顕微鏡に導入し、それぞれを独立に操作できるシステムを構築した。レーザー光をビームスプリッターにより二つに分割し、その後、再びビームスプリッターを介して二つのビームを重ねないようにわずかに離して配置させ、これを倒立顕微鏡内に導入した。油滴の操作はキャピラリーを用いたデバイス内で行った。532 nm のレーザー光をキャピラリーの観測部に集光し、油滴を捕捉した。キャピラリー壁面でのレーザー光のエネルギー損失や屈折による影響を最小限にするために、観測部には内径が 77.6 μm × 73.8 μm の角形溶融シリカキャピラリーを用い、キャピラリー周囲をキャピラリー壁と屈折率がほぼ同じミネラルオイル ($n=1.467$) で満たした。実験に用いる油滴は、マイクロシリンジにエマルジョンを満たし、シリンジポンプを用いて注入することで導入した。このシステムを用いて水溶液中に分散させた油滴を捕捉し、それらを融合させる方法について検討した。

水溶液中で、油滴を安定に存在させるために、有機相として 1-ブタノールとデカンの 1 : 1 混合溶媒を用い、これに種々の界面活性剤を添加して、エマルジョンを作製した。界面活性剤には陽イオン性の臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB)、陰イオン性のドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、及び中性のポリエチレングリコール (PEG) を用いた。これらの界面活性剤を用いて作製したエマルジョンをガラスの角型キャピラリーに流し、レーザーで捕捉して接触させたところ、いずれの油滴に対しても融合させることはできなかった。

界面活性剤は油滴を安定化させる効果があるため、単に捕捉、接触させるだけでは融合させることは困難であると予想された。そこで、界面活性剤の濃度をできるだけ低下させ、融合を試みた。1 日以上、油滴が分散しているエマルジョンの状態を保つことのできる最低濃度について検討し、CTAB、SDS は 0.005 mM、PEG は 1% (w/v) を最適濃度として、実験を行った。しかしながら、界面活性剤濃度を低下させた場合にも、油滴の融合は困難であった。この原因は、油滴表面の界面活性剤が親水基を表面に向けて配向していることによるものと推察された。すなわち、SDS や CTAB のようなイオン性の界面活性剤では、界面活性剤分子は油滴表面の水相に向け

て親水基が配向しているため、界面活性剤の静電反発により、融合が阻害されているものと考えられる。一方、PEG は電荷をもたないが、親水部分には水分子が水和しているため、この水分子が油滴の融合を阻害しているものと推測された。

そこで、油滴の安定性を低下させるために、油滴を捕捉した後に、界面活性剤を含まない水で周囲の媒体を置換するとともに、温度を上昇させることで融合を試みたところ、PEG を用いて作製した油滴の融合に成功した。これは、周囲の媒体を水に置換することで油滴表面の界面活性剤分子が水の中に拡散し、油滴表面の不安定化を引き起こしたものと考えられる。さらに、このとき、温度を上昇させることで、融合に要する時間が短くなることを見出した。すなわち、油滴を融合させるためには、水-油滴界面の界面活性剤を除去することで油滴の融合が促進できることを明らかにした。温度上昇に伴う融合時間の短縮は、温度上昇により分子運動が活発になり、界面活性剤分子が油滴表面からバルクの水に拡散しやすくなったためであると予想された。

(2) 油相に分散させた水滴を捕捉するために、Z 偏光素子を用いて光渦を発生させ、水滴の捕捉を行った。まず、レーザー光を Z 偏光素子に導入し、その透過光をビームスプリッターで分割させ、ふたつのドーナツ型のビームを発生させた。

有機溶媒にアセトフェノン、界面活性剤に SPAN80 を用い W/O エマルションを作製した。作製した W/O エマルションを流路に流し、ドーナツ型の光渦ビームを用いて、水滴の捕捉を試みたが、ビームの外周部分で反発が起るため、水滴をビームの中心に引き込むことができなかった。

そこで、Z 偏光素子を操作して、ドーナツ型ビームを一旦、U 字型に変換し、水滴が U 字のくぼみに入ったところで、再度 Z 偏光素子を操作してドーナツ型に変換したところ、水滴をドーナツ型ビームの中心に捕捉することに成功した。しかし、このとき、ドーナツ型ビームの中心部の径が小さすぎるため、安定した捕捉が困難であった。具体的には、光強度の小さな中心部の径が捕捉する水滴よりも小さいため、外周部分の光と水滴に重なりが生じ、水滴をビームの進行方向に押す力が発生してしまうことがわかった。また、ビームの進行方向に加速された水滴は、流路壁に押しつけられ、流路壁に付着し、移動できない状態となった。

水滴が流路壁に付着する原因は、流路表面と水滴との相互作用によるものであるため、流路表面を疎水化することで、水滴の付着を防ぐ方法について検討した。疎水化のために、物理的なコーティング方法と化学的なコーティング方法について検討した結果、化学的なコーティング法により、水滴に対して大き

な接触角を与える表面処理を実現することができた。この流路内で水滴を光渦内に捕捉し、操作と融合を試みたが、疎水化することでは水滴の流路壁への付着を防ぐことはできなかった。この原因は水滴表面の界面活性剤分子が表面に疎水基を向けているため、疎水的な流路壁に対する吸着を防ぐことができなかった可能性がある。流路壁への付着の原因が水滴表面にある界面活性剤の疎水基によるものかどうかについては現段階では明らかになっていないが、今後は界面活性剤を用いずに水滴を作製し、これを捕捉、融合させる必要があると考えられる。

界面活性剤を使用せずに、有機相内で安定な水滴を形成させるための有望な方法は、内径の小さなキャピラリーを大きなキャピラリーに挿入するシースフロータイプの流路を用いるか、あるいは、微小液滴を形成できるマイクロ流体デバイスを作製するかのいずれかであると考えられる。そこで、さらに研究を進展させるために、液滴形成が可能なマイクロ流体デバイスの作成についても検討した。フォトレジストである SU-8 を用いて鑄型を作製し、これを用いたポリジメチルシロキサン (PDMS) によるマイクロ流体デバイスの作成について検討した。その結果、シリコン基板上に SU-8 をスピンコートし、紫外光照射することで鑄型の作製に成功し、この鑄型を用いて PDMS によるマイクロ流体デバイスを作製することができた。この技術を利用して、水滴作製用流路と水滴操作用流路を備えたマイクロ流体デバイスを作製することで、有機相内での水滴の捕捉と融合が実現できるものと期待している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

光延愛美, 小林桜子, 武安伸幸, 金田隆「レーザートラッピングによる油滴融合における界面活性剤の影響」日本分析化学会第 63 年会, 2014 年 9 月 17 日, 広島大学(広島県・東広島市)。

Takashi Kaneta (Invited), “Single cell analysis using laser trapping” 2015 BK21Plus Symposium on HRD Center for Creative Convergence Chemical Science & The 2nd SKKU-OU Joint Symposium on Advanced Chemistry, February 12, 2015, Hongcheon (Korea).

島田雄飛, 武安伸幸, 金田隆「光渦ビームによる油相中水滴の捕捉と単一細胞計測への応用」日本分析化学会第 64 年会, 2015 年 9 月 11 日, 九州大学(福岡県・福岡市)。

光延愛美, 金田隆「光ピンセット法を用いたマイクロ流体デバイス内での油滴融合」

2015 年日本化学会中国四国支部大会，2015 年 11 月 15 日，岡山大学（岡山県・岡山市）。

島田雄飛，金田隆，武安伸幸「単一細胞計測のための光渦を用いた油相中水滴の捕捉」
2015 年日本化学会中国四国支部大会，2015 年 11 月 15 日，岡山大学（岡山県・岡山市）。

Manami Mitsunobu, Sakurako Kobayashi, Nobuyuki Takeyasu, Takashi Kaneta, (Invited) “Fusion of oil droplets in a microfluidic device using optical tweezers” The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, December 16, 2015, Honolulu (USA).

〔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〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

金田 隆（KANETA Takashi）

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20243909

(2)研究分担者

なし