

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02096

研究課題名(和文) オプト・ケモロボットを用いたマルチスケール細胞解析システム

研究課題名(英文) Multi-scale cell analysis system using opto-chemo robots

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) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、単一細胞レベルから集団細胞レベルでのマルチスケールでの細胞の生理状態を計測するためのデバイスとして、(1)光応答性の試薬を導入した機能性微粒子を作製し、異なる複数の波長の光を用いて駆動・計測・刺激を行うカプセル型オプト・ケモロボット、(2)基板上に光応答性の試薬を導入した微小構造体を作製し、光学式計測・刺激を行うチップ型オプト・ケモロボット、の基盤技術として、直径1 μmのカプセル型で蛍光による温度計測機能を有し、1064 nmの光で操作808 nmの光で加熱が可能な細胞内計測用光環境センサ、およびpHの絶対測定を行うためのリファレンス機能を有する光環境センサの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の実施期間に得られた、細胞内および培養環境の環境情報を精密に計測する技術は、工学的アプローチを基盤とし、生物化学において新しい知見を提供するための光化学・分子化学的アプローチを複合的に用いることを特色とした新規な微細操作・計測技術の開拓が期待される成果である。また、本成果は、例えばウイルス感染細胞におけるウイルス増殖過程の細胞の状態計測を行うことで、ウイルスが増えやすい、もしくは増えにくいように細胞機能を誘導する技術にブレークスルーを起こすことが期待でき、新たな感染症対策を開拓する可能性を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we developed two types of devices for measuring the physiological state of cells on a multi-scale from a single cell level to a group cell level. (1) a capsule-type opto-chemo robot that is driven, measured, and stimulated by using light with different wavelengths, which is fabricated from functional particles with photo-responsive reagents, and (2) a chip-type opto-chemo robot that is driven, measured, and stimulated by using light with different wavelengths. As achievements, 1 μm-diameter capsule-type optical sensor for intracellular measurement that has temperature measurement function, transportation using 1064 nm laser, and heating function using 808 nm laser were fabricated. And a chip-type opto-chemo robot for on-chip pH measurement with reference function for absolute measurement of pH has been successfully fabricated.

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

キーワード：マイクロ・ナノメカトロニクス 光環境センサ 光ピンセット 細胞解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは、細胞膜に付着すると細胞のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、膜融合により核近傍で RNP を放出する。放出された RNP は細胞質から核へマイクロチューブを経由して運ばれる。ウイルス RNA ゲノムの転写と複製は、核内において核機能に依存して進行する。ウイルス増殖は細胞の RNA ゲノムの転写活性と強い相関があると考えられるが、転写活性に差のある不均一な細胞集団を利用した実験では、定量的解析が困難で推測の域を出てない。従来のウイルス増殖解析は、ディッシュ上に培養した細胞にウイルスを播種し、一定時間経過後に細胞を回収し、ウイルスの遺伝子を PCR により増幅し解析することで行われてきた。しかしながら、実際に単一のウイルスに感染した特定の細胞の生理状態変化とウイルス増殖能の解析は困難であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、光により駆動・計測・細胞への刺激を行うオプト・ケモロボットを構築し、ウイルス感染細胞内および細胞培養環境に投入し、ウイルス増殖に伴う単一細胞および集団細胞の生理状態変化の解析を行うための基盤技術の構築を目的とする。また、これまで明らかにされてこなかった、核内でのウイルス増殖部位の特定を、ウイルス複製時に生じる温度・pH・酸素濃度変化に着目し、細胞内にカプセル型オプト・ケモロボットを導入し計測することでウイルス増殖が活発な部位を特定可能な解析プラットフォームの基盤技術の確立を目指す。また、増殖したウイルスは細胞外に放出され周囲の細胞に再び感染し、増殖を繰り返す。この細胞間感染の時間的拡大や細胞集団の生理状態変化を、チップ型オプト・ケモロボットのマルチ蛍光センサアレイを用いて細胞集団における温度、pH、酸素濃度、グルコース濃度、等を計測することで明らかにし、細胞内計測と組み合わせ、ウイルス増殖メカニズムに関する新しい知見を得て、生物学・医学の発展に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1. 単一細胞計測・刺激用カプセル型オプト・ケモロボット

光圧により駆動可能なカプセル型オプト・ケモロボットの基盤技術を確立する。直径 1  $\mu\text{m}$  以下の微粒子に蛍光指示薬および光刺激（熱・pH 等）が可能なナノ材料を導入して作製し、1064 nm の赤外光による操作、紫外から可視光、及び 1064 nm 以外の赤外光を用いた環境計測および環境刺激機能を実現する。

#### 2. 細胞集団計測・刺激用チップ型オプト・ケモロボット

集団細胞の生理状態計測および環境刺激が可能なチップ型オプト・ケモロボットの基盤技術を確立する。フォトリソグラフィや 3D プリント等の微細加工技術を用いて作製し、集団細胞の生理状態計測および局所環境刺激を実現する。

### 4. 研究成果

#### 1. 単一細胞計測・刺激用カプセル型オプト・ケモロボット

図 1 に波長選択的なレーザー加熱によるカプセル型オプト・ケモロボット（光環境センサ）の細胞内導入の概念図を示す。培養環境中に導入された光環境センサを、共焦点蛍光観察が可能なレーザーマニピュレーションシステムを用い、1064 nm レーザを用いた光ピンセット操作による細胞膜への搬送後、細胞膜上で 808 nm のレーザー照射によりセンサを加熱し細胞質内へ導入する。この導入プロセスは全てレーザーを用いた非接触操作であり、マイクロ流体チップのような閉空間環境でも使用可能である。

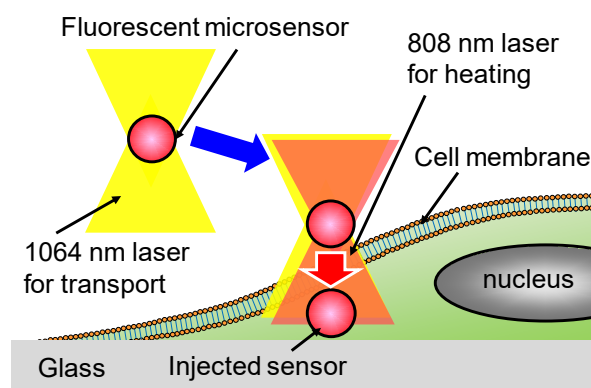


図 1 カプセル型オプト・ケモロボットを用いたセンサの細胞導入の概念図

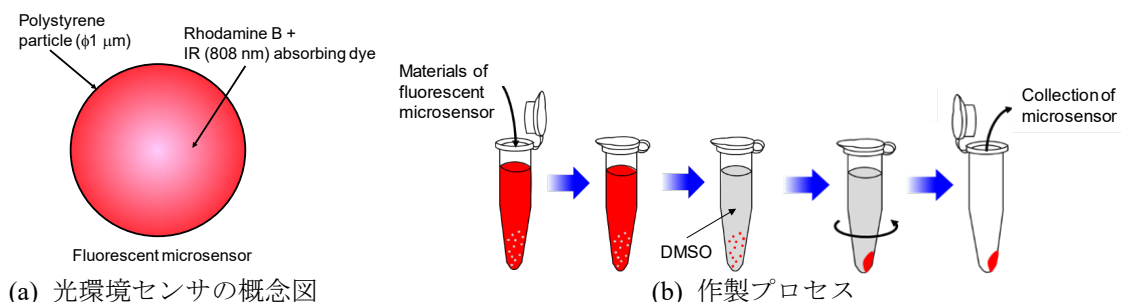
光環境センサは、直径 1  $\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズに、温度感受性を有する蛍光色素の Rhodamine B（蛍光波長 580 nm）、808 nm の光を選択的に吸収する近赤外吸収剤の FDN-002 を導入することで作製する。ポリスチレンビーズの屈折率は 1.6 と水（屈折率：1.3）より高いため、

1064 nm のレーザーで光ピンセットによる操作が可能である。蛍光計測は、488 nm の励起光を行い、580 nm の蛍光を EM-CCD で計測する。

光環境センサの作製プロセスを以下に示す。

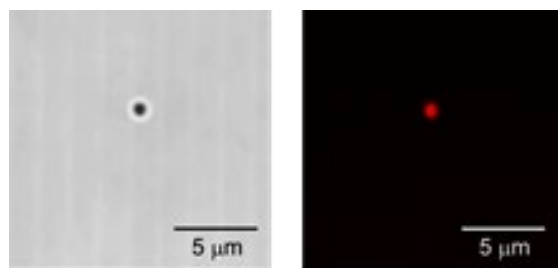
- ① FDN-002 と Rhodamine B がそれぞれ 1 mg/ml となるように Dimethyl sulfoxide(DMSO)溶液の染色液を調整する。
- ② 1  $\mu$ l のアミノ基付きマイクロビーズ 100  $\mu$ m を①で作製した溶液 1 ml に加える。
- ③ ②で作製した溶液 0.5 ml を 1 ml のマイクロチューブに入れ、0.5 ml の脱イオン水を加え 1 時間静置する。
- ④ 遠心分離を 15000 rpm で 5 分間行い、上澄み液を除去。
- ⑤ ③、④の手順を 10 回繰り返し、センサの洗浄を行う。

図 2 に作製した光環境センサの明視野および蛍光画像を示す。電気抵抗ナノパルス式の粒径分析器の qNANO を用いてセンサのサイズを計測したところ、図 2(c)に示すように平均粒径 0.98  $\mu$ m、標準偏差 0.1  $\mu$ m の粒径分布であった。また蛍光強度と温度の較正を行った結果、蛍光強度の温度計測感度は-1.4%/ $^{\circ}$ Cであった。



(a) 光環境センサの概念図

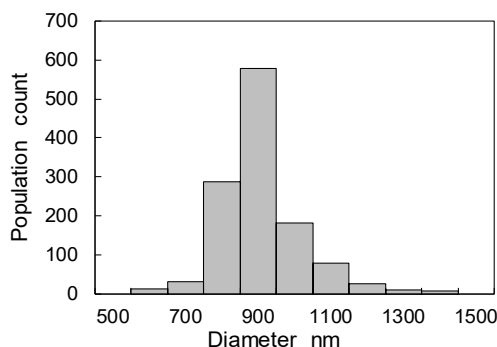
(b) 作製プロセス



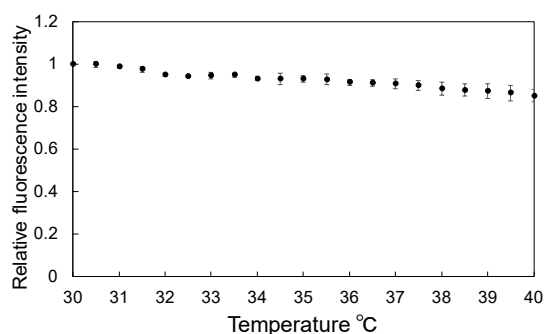
(c) センサの明視野画像

(d) センサの蛍光画像

図 2 カプセル型オプト・ケモロボット (光環境センサ) の作製



(a) センサのサイズ分布



(b) センサの蛍光強度と温度の較正結果

図 3 カプセル型オプト・ケモロボット (光環境センサ) のサイズ、温度計測機能評価

作製した光環境センサの波長による吸収特性の違いを評価した結果を図 4 に示す。厚さ 150  $\mu$ m のガラス製マイクロ流路に 808 nm および 1064 nm の赤外吸収剤の濃度を変えた染色液を導入し、各波長の吸収率を評価した。結果は、1 mg/ml の際に 808 nm、1064 nm の吸収率はそれぞれ 85 %、1 %とレーザー吸収の波長特異性が確認された。808 nm レーザ照射時の光環境センサの加熱実験の結果を図 4 に示す。20 回目の計測 (露光時間 500 ms) 時にレーザーの照射を開始した。この光環境センサの温度感度の較正結果を用いて蛍光強度変化を温度変化に換算した。10 mW では温度上昇が確認できなかったが、40 mW においては、10 秒の加熱で約 15 $^{\circ}$ C の温度上昇が確認された。実験環境は 37 $^{\circ}$ C であることから、従来研究で得られた細胞導入に必要な 50 $^{\circ}$ C 以上への加熱が可能であることを確認した。

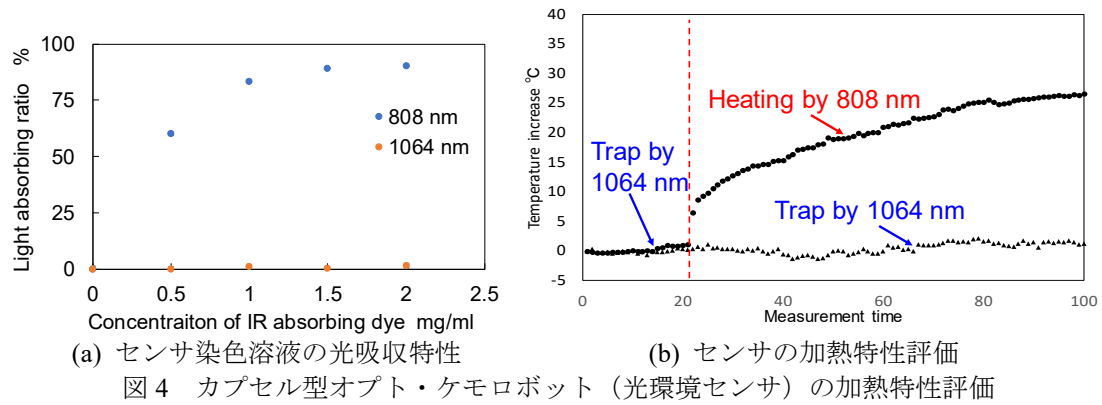
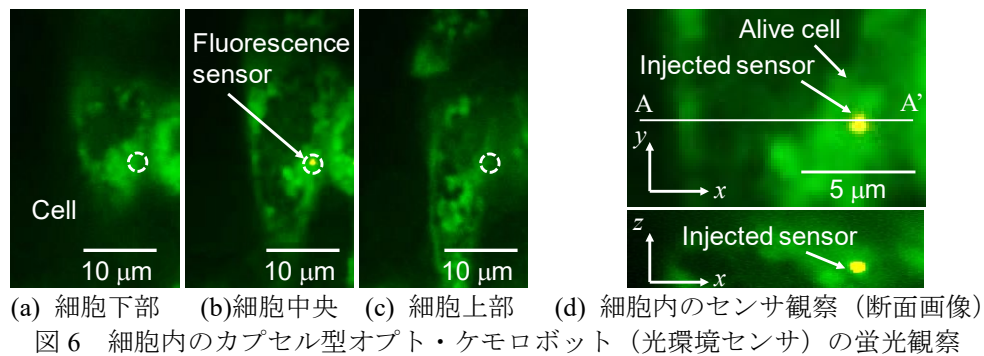
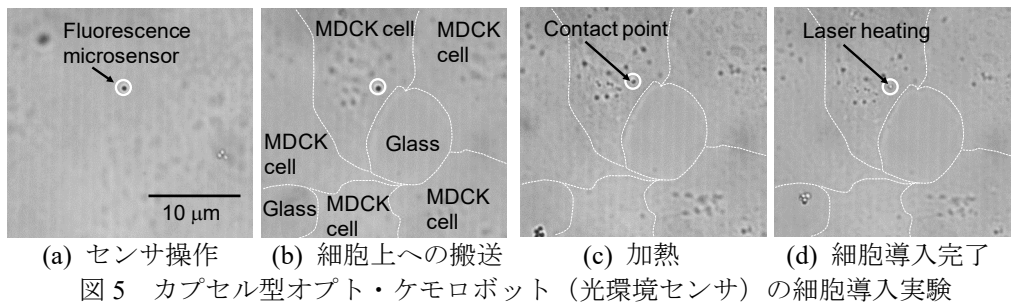


図 5 に 1064 nm のレーザを用いて光環境センサを操作し、犬の腎臓細胞（MDCK 細胞）の細胞膜上へ搬送した結果を示す。1064 nm および 808 nm のレーザ強度は、対物レンズを通過した後で 40 mW になるように調整した。MDCK 細胞は、生細胞内でエステラーゼ活性により加水分解され蛍光を発する Calcein-AM で染色している。1064 nm のレーザによる細胞膜上へ光環境センサの搬送後、808 nm のレーザを細胞へ照射することで光環境センサの加熱を行った。光環境センサへの 808 nm のレーザ照射により、細胞膜上の光環境センサの焦点が細胞膜より下に移動したことが確認された。図 6 に 808 nm レーザによる光環境センサの加熱後に、0.1  $\mu\text{m}$  ピッチで細胞内のスライス画像を取得し、細胞内の光環境センサを観察した結果を示す。808 nm で加熱された光環境センサが細胞内に導入されている（成功率 70%）とともに、導入された細胞の生存が確認され（生存率 100%、提案手法の有効性を確認した）。



## 2. 細胞集団計測・刺激用チップ型オプト・ケモロボット

図 7 にチップ型オプト・ケモロボット（ハイドロゲル製光環境マイクロセンサ）を作製するためのマイクロ 3D 造形システムの概念図を示す。市販の倒立顕微鏡（Ti-U, Nikon）に 60 倍の対物レンズを搭載した光学系に、ピーク波長 365 nm の LED（M365LP1, Thorlabs）および観察用の CCD（VCXU-02M, Baumer）を組み込んでおり、対物レンズを通して紫外光の照射および作製の様子を観察する。ステージ底面のガラス面にはハイドロゲルの光重合を阻害する酸素阻害層としてポリジメチルシロキサン（PDMS）の薄膜層が形成されている。造形物は 3 軸の電動ステージに吸引固定されたガラス製の透明ホルダに固定される。紫外光はスポット光として照射されるため、ステージを移動することでハイドロゲルを任意の場所に造形する。顕微鏡ステージ上に光硬化性ハイドロゲルをホルダに組み込まれた材料導入ポートより導入し、ステージの位置制御と紫外光照射により任意の形状のハイドロゲルパターンを造形する。

図 8 に本システムを用いてガラス基板上に造形した pH 計測用の光環境マイクロセンサの名視野画像および蛍光画像を示す。光環境マイクロセンサの材料として、親水性光硬化性樹脂の Polyethylene glycol diacrylate 575（PEGDA 575）の 10% 水溶液、アミノ基と結合した pH 感受性蛍

光色素の FITC (10 mg/ml in DMSO), 光重合開始剤の Omnirad1173 を用いた. また, 計測時にリファレンスとして用いるリファレンス用センサにおいては, 水を透過しない層を作製するために, 光硬化性樹脂の Polyethylene glycol diacrylate 250 (PEGDA 250) を PEGDA575 で作製した pH 計測用のセンサの表面を覆う形で造形した. PEGDA 575 水溶液と FITC 水溶液を 10:1 の割合で混合し, Omnirad1173 を 1 wt% で溶解した. PEGDA 250 には Omnirad1173 を 1 wt% で溶解した. まず, ガラス基板上に, 直径 20  $\mu\text{m}$ , 高さ 60  $\mu\text{m}$  の円柱上の PEGDA575 製の光環境マイクロセンサを作製した図 8(a). 次に図 8(b)に示すように一方の光環境マイクロセンサに PEGDA575 を覆うように PEGDA250 を硬化させた. PEGDA250 は FITC の励起光・蛍光を透過するため, 図 8(d)に示すように計測センサとリファレンス用センサの蛍光を観察可能である.

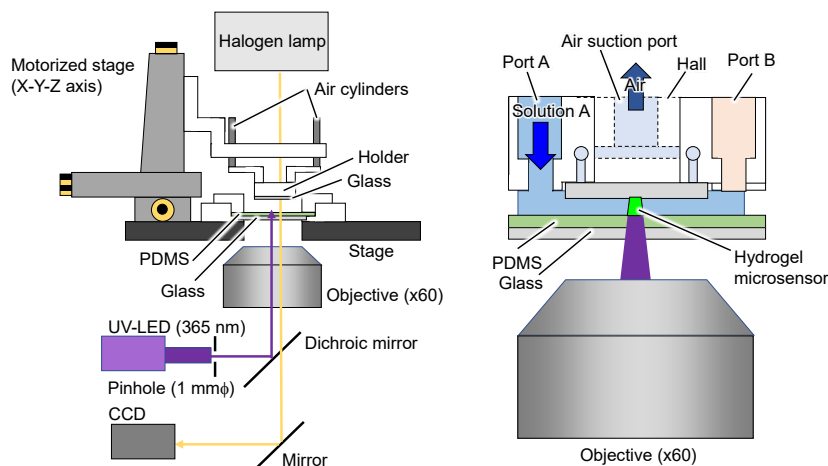
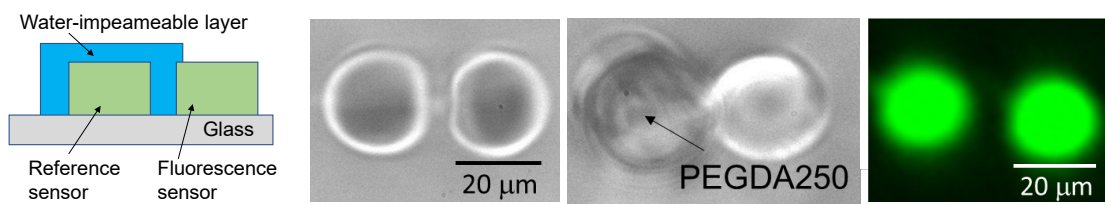
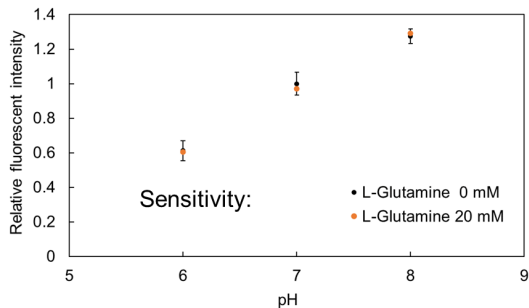


図 7 3次元マイクロ光造形システムの概念図

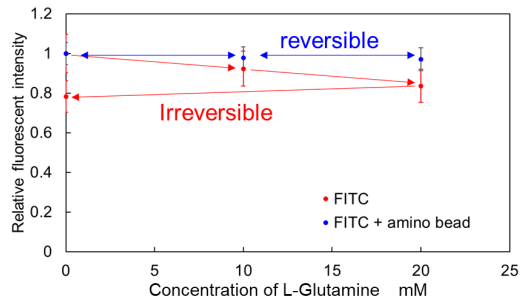


(a) センサの概念図 (b) センサ作製後 (c) 水不透過膜作製 (d) センサの蛍光画像  
図 8 作製したチップ型オプト・ケモロボット (ハイドロゲル製光環境マイクロセンサ)

図 9(a)に作製したハイドロゲル光環境マイクロセンサとリファレンス用センサの蛍光強度比と pH の較正を行った結果を示す. pH6, 7, 8 における蛍光強度比から, pH と蛍光強度比には高い相関が確認され, pH 計測感度は 27 %/pH, pH 計測精度は  $\pm 0.28$  であった. また, FITC はタンパク質 (アミノ基) の存在下では蛍光強度が変化するが, アミノ基を修飾した FITC を用いることで, タンパク質 (L-Glutamine) の存在下でも pH 計測感度が影響を受けないことを確認した. 図 9(b)に示すようにタンパク質濃度が増加する状況においても安定した pH 計測が可能であることを確認した. 以上の結果より, 本提案手法の有効性を確認した.



(a) pH 較正結果



(b) タンパク質濃度の影響の評価

図 9 チップ型オプト・ケモロボット (ハイドロゲル製光環境マイクロセンサ) の評価結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 H. Maruyama, F. Arai
2. 発表標題 93. REFERENCE PH MICROSENSOR FOR FLUORESCENCE MEASUREMENT IN CELL CULTURE ENVIRONMENT WITHOUT INITIAL PH INFORMATION
3. 学会等名 MicroTAS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Maruyama, H. Hashim Y. Yanagawa, F. Arai
2. 発表標題 92. Injection of a Fluorescent Microsensor into a Specific Cell by Laser Manipulation and Heating with Multiple Wavelengths of Light
3. 学会等名 ICRA2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山央峰, 新井史人
2. 発表標題 組織内部の pH 計測のためのリファレンス機能を統合したハイドロゲル光環境センサ
3. 学会等名 第21回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山央峰, 新井史人
2. 発表標題 組織内部の pH 計測のためのリファレンス用ハイドロゲル光環境センサ
3. 学会等名 第38回日本ロボット学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山央峰, 新井史人
2. 発表標題 リファレンス用光環境マイクロセンサを用いた細胞培養環境の pH 計測
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳川亮太, 丸山央峰, 新井史人
2. 発表標題 波長選択的レーザー操作・加熱による光環境センサの高速細胞導入
3. 学会等名 RSJ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisataka Maruyama, Taisuke Masuda, Weng Ruixuan, Wang Zhaoyu, Eiji Tokai, Fumihito Arai
2. 発表標題 Fluorescence Microsensor Using Near-Infrared Light for Physiological Measurement inside Tissue
3. 学会等名 MHS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------