

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760182

研究課題名(和文) 光機能制御ゲルマイクロツールの光ピンセット操作によるオンチップ微細作業

研究課題名(英文) Optically controlled gel-microtool manipulated by optical tweezers for on-chip micromanipulation

研究代表者：

丸山 央峰 (MAUYAMA HISATAKA)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：60377843

研究成果の概要(和文)：本課題では、光により機能制御可能な光機能制御ゲルマイクロツールを用いたオンチップ微細作業に関する研究を行った。主な成果としては、(1) 細胞へのゲルツールの選択的固定方法として、フォトクロミック材料のスピロピランをゲルツールに導入し、紫外・可視光照射による可逆的な細胞付着制御、(2) 細胞内の環境計測を目的とした、ロイコクリスタルバイオレットの紫外・可視光照射による可逆的な pH 制御による選択的 pH 応答性リポフェクションによるゲルセンサの細胞導入、が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：We studied on optically-controlled gel-microtool for on-chip micromanipulation. We achieved (1) Bidirectional cell adhesion control of the gel-microtool induced by UV/VIS illumination using Spiropyran, (2) Intracellular measurement using the gel-microsensor injected using the optically-controlled lipofection by optical pH regulation using Leuco crystal violet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・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、マイクロ流体デバイス

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内の状態計測だけでなく細胞が存在する環境等からの外部刺激に対する応答や環境との相互作用も計測する必要がある。従来は細胞集団を用いた解析が主であったがそれから得られる個々の情報は平均されたものであり、近年では細胞1個体単位でのモニタリング及び遺伝子発現等の細胞の状態変化を追うことで未知の細胞機能の解明を実現しようとする試みが盛んに行われている。

細胞1個体単位での計測においては、細胞自

体の精密な操作及び細胞とその近傍の環境、特に細胞表面での細胞と環境との相互作用の計測が重要となる。しかし溶液中の細胞の表面近傍へマイクロマニピュレータや計測プローブを配置することは操作者に熟練を要するだけでなく細胞への損傷や細胞表面近傍の環境を乱す原因となりうる。細胞近傍の環境変動を抑制しながら操作及び計測を行うためには、外乱の影響を低減可能なマイクロチップ等の微小閉空間が有効であり、微小閉空間での細胞操作及び局所環境計測・制御手法が必要となる。

マイクロチップ内で細胞を選択的に操作する手法としては、誘電泳動等の電気的な力、磁場、光ピンセット等が主に用いられてきた。

誘電泳動は細胞のシーケンシャルな操作に用いられてきたが、この手法は細胞を3次元的にランダムに操作するには適さない。磁性ビーズで目的の細胞を修飾して操作する手法も行われているが、細胞へ付着した磁性ビーズの残留による影響が懸念される。光ピンセットは細胞1個単位で選択的かつ3次元的に操作可能であるが、レーザーの直接照射による操作では、細胞の光損傷や点での操作による操作性に課題があった。マイクロチップ内の計測においては、温度やpHに対して依存性を有する蛍光色素の蛍光強度プロファイル等を用いた手法が多く用いられてきた。蛍光色素の退色や蛍光色素の細胞染色に起因する細胞への影響等の問題がある。また環境感受性を有する蛍光色素や指示薬等を表面に修飾したマイクロビーズを用いた計測手法も提案されている。この手法は光ピンセット等の非接触操作手法により細胞への試薬染色が無く3次元空間の計測が可能であるが、常にビーズを操作し続ける必要があり長時間計測や複数個所の対象の同時計測には適さない。その他に集積化した温度センサやpHセンサを用いる手法があるが、ディポスポーザブル化が困難であるといった課題が存在した。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに申請者が提案してきたゲルマイクロツールを発展させ、細胞への接着や水素イオン及び水酸化物イオンの放出によるpH制御等の機能を光により制御可能なゲルマイクロツールを実現することを目的とする。またこれまでに実現してきた環境計測機能と併用可能なように設計することで、例えば細胞周辺の局所的なpHのフィードバック制御系の構築を目指す。

申請者はこれまで主に液中の細胞の特性調査のための単一細胞を対象としたオンチップ細胞計測に関する研究を行ってきた。単一細胞の操作のためにレーザーマニピュレータ（光ピンセット）を主に用い、レーザー操作時の安定性や安全性の向上、及び細胞操作や環境計測等に適した機能の付与を目的としてマイクロツールと呼ぶ微小構造物に関する研究を行ってきた。マイクロチップ内への任意の場所へのマイクロツールの供給方法を2002年から、目的に応じた形状・機能をもつマイクロツールのその場光造形による製作を2004年から、2005年から凝集したハイドロゲルをマイクロツールとして用いたゲルマイクロツールの操作・固定及び環境計測に関して研究を行ってきた。ハイドロゲルを利用したオンチップ微細作業に関するノウハウは蓄積できており、さらに光による機能制御機構を追加することでさらなる機能

向上を目指す。

3. 研究の方法

オンチップ細胞計測の高度化のため、ゲルマイクロツールの細胞への接着や水素イオン及び水酸化物イオンの放出によるpH制御等の機能の付与及びその光制御の実現を目的として以下の項目に関して研究を行う。

(1) ゲルマイクロツールへのフォトクロミック材料の導入による機能付与と機能の光制御

親水性及び疎水性の光硬化性樹脂を電解質溶液により凝集して作製するゲルマイクロツールの内部にフォトクロミック材料環境依存性を有する高分子を導入し、光照射により制御可能な細胞付着性、局所粘性制御、pHコントロール等の機能をマイクロツールに付与し、光制御による機能発現の評価を行う。機能を付与したゲルマイクロツールを光ピンセットで操作し、マイクロチップ内での局所光照射による細胞付着制御、局所粘性制御を用いた細胞搬送、及び細胞近傍の局所pH制御を実現する。

(2) 光機能制御ゲルマイクロツールの構造制御及び計測機能との融合

光機能制御ゲルマイクロツールをフォトリソグラフィや光造形等の加工技術を用いて、作業目的に適した形状を有するゲルマイクロツールを作製する（図2参照）。また環境応答性の蛍光試薬や指示薬を内部に導入して、光照射に伴う環境変化と同時に計測を行うことで局所環境のフィードバック制御系の構築を行う。

4. 研究成果

(1) フォトクロミック材料とUV/VIS照射によるゲルマイクロツールの付着制御

機能性ゲルマイクロツールは親水性光硬化性樹脂製を電解質溶液中で凝集させて生成したビーズ内へのフォトクロミック材料や環境感受性を有する指示薬を導入することで作製する（図1参照）。この樹脂は生体適合性があり、近紫外光により重合する。

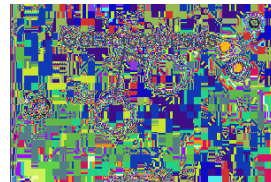
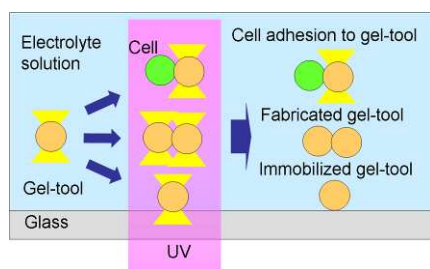


図1 ゲルマイクロツールの光学顕微鏡像
このゲルマイクロツールは一定以上の濃度の電解質溶液中において、接触した物体に対して非特異的に接着する。また一定の濃度

以上の電解質溶液中において、紫外光を照射したときのみ接触した物体と付着する。この性質を利用して、図2に示すような細胞やガラス基板等への選択的付着を実現できる。



(a)

Electrolyte	Concentration wt%		
	Adhesion to glass	Adhesion to gel-tool	Adhesion to yeast cell
sodium chloride	22.5	12.7	12.7
phosphate dipotassium salt	5.0	5.0	8.0

(b)

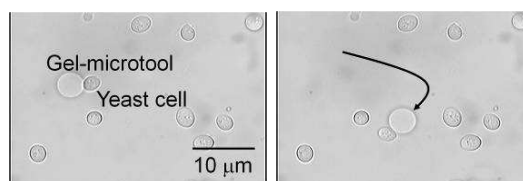
Electrolyte	Concentration wt%		
	Adhesion to glass	Adhesion to gel-tool	Adhesion to yeast cell
sodium chloride	12.7	12.7	10.0
phosphate dipotassium salt	1.7	1.7	3.4

(c)

図2 電解質濃度制御と紫外光照射によるゲルマイクロツールの付着制御 (a)概念図 (b)非特異的付着を生じる下限の電解質濃度 (c)紫外光照射により付着を生じる下限の電解質濃度

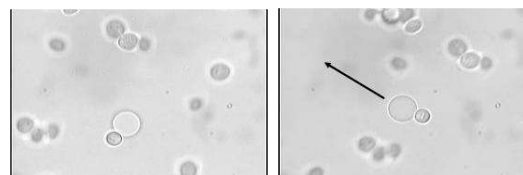
この付着制御手法を用いて、図3に示すような細胞高速搬送、及び図4に示すようなpH指示薬を導入してセンサ化したゲルツールに細胞を固定して細胞周辺の局所pH計測を行った。細胞搬送に関しては、ゲルマイクロツールを用いて細胞を押しつけて搬送する場合は最高搬送速度が $18\mu\text{m/s}$ であったものが、細胞をゲルツールに付着させて引っ張って搬送することで搬送速度は $100\mu\text{m/s}$ 以上に改善することに成功した。計測に関しては、細胞を付着させたゲルマイクロツールをガラス基板に固定することで対象とする細胞近傍のpHを長時間計測できるようになった。また細胞の位置を保持したまま溶液を置換できるため、培養中における細胞近傍のpHをモニタリングしながら細胞の様子を観察

するといった実現されていなかった技術を実現した。しかしながら、本手法は不可逆な固定であり、付着したゲルツールからの細胞の離脱はできなかった。



(a)

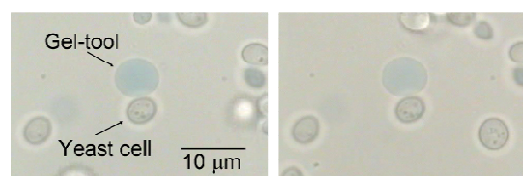
(b)



(c)

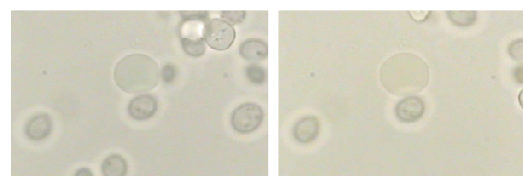
(d)

図3 電解質濃度制御と紫外光照射によるゲルマイクロツールを用いた細胞の高速搬送 (a)-(b) ツールによる押しつけての細胞搬送 (c) 細胞のツールへの付着 (d) 引っ張っての細胞の高速搬送



(a)

(b)



(c)

(d)

図4 pH計測機能付きゲルマイクロツールへ固定した細胞近傍の局所pH計測 (a) ツールへの細胞固定 (pH8.5) (b) pH7.8 (c) pH7.1 (d) pH6.3

可逆的な細胞付着制御を実現するため、ゲルマイクロツールにフォトクロミック材料のスピロピランを導入し、図1に示すようにUV照射による細胞付着性の誘起と、可視光照射による細胞付着性の消失を可逆的に制御する手法を開発した。スピロピランは図1(b)に示すように紫外光照射により分子構造の一部が開環し正と負のチャージを生じる。このチャージが細胞行面のアミノ基やカルボキシル基とイオン結合することで付着がおこなわれる。可視光を照射するに開環部が閉

環しチャージが消失し細胞は剥離する。

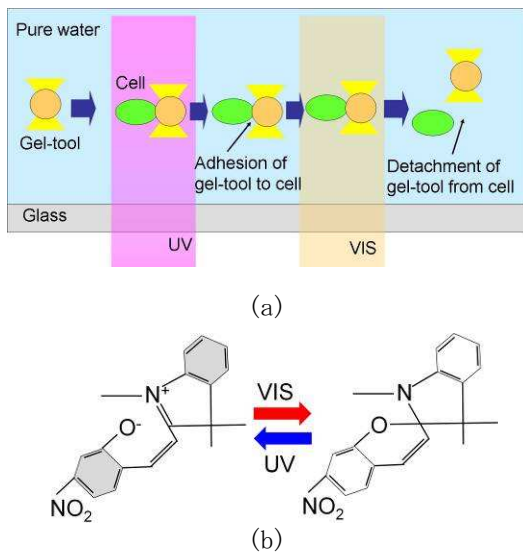


図5 フォトクロミック材料とUV/VIS照射によるゲルマイクロツールの可逆的付着制御 (a)概念図 (b)スピロピランの光照射による構造変化

この性質を利用し、図6に示すように細胞の可逆的な付着制御に成功した。この可逆的な細胞付着は図2(c)で示した電解質濃度以下の環境で利用可能であり、環境の電解質濃度を調整することで不可逆・可逆の付着を制御できることを確認した。

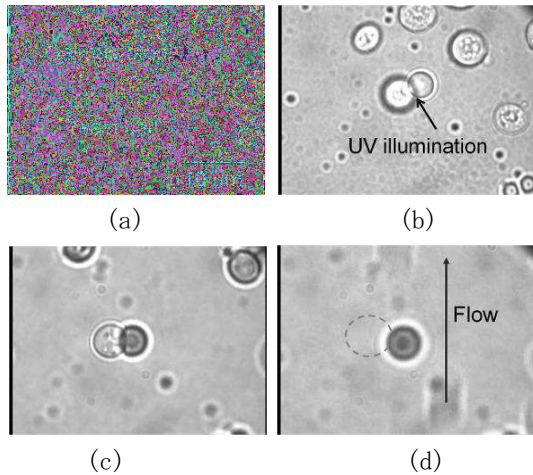


図6 スピロピランと光制御によるゲルマイクロツールを用いた細胞の可逆付着制御 (a)-(c) 紫外照射による細胞固定 (d) 可視光照射による細胞剥離

(2) フォトクロミック材料とUV/VIS照射によるゲルマイクロツールを用いた局所pH調整機構

機能性ゲルマイクロツールの細胞付着制御により細胞周辺及び細胞表面の計測は実現可能となったが、細胞内での微細作業を実現するには、細胞内にゲルツールを導入する

必要がある。従来のエンドサイトーシスによるナノ物質の導入法を用いることも可能であるが、導入させたツールがエンドソームに包埋されるため細胞内部の環境を直接計測することは困難である。

そこで、細胞膜と同様の性質を有する脂質二重膜のリポソームを用いたリポフェクションによる導入でツールの細胞導入を行うこととした。リポフェクションとしてはpH応答性リポフェクションを用いるため、図7に示すような選択的な導入にはリポソーム内部のpHを任意の制御する必要がある。そのため、光により局所的なpH制御が可能な機能性ゲルツールを開発した。

光pH制御のために、紫外光照射による構造変化により水素イオンを放出し可視光照射で元に戻るフォトクロミック材料のロイコクリスタルバイオレット (LCV) をゲルツールに導入した。LCVを導入したゲルツールをリポソームに内包することで、図7(b)に示すように紫外光照射量によるpH制御による選択的細胞導入を行う。

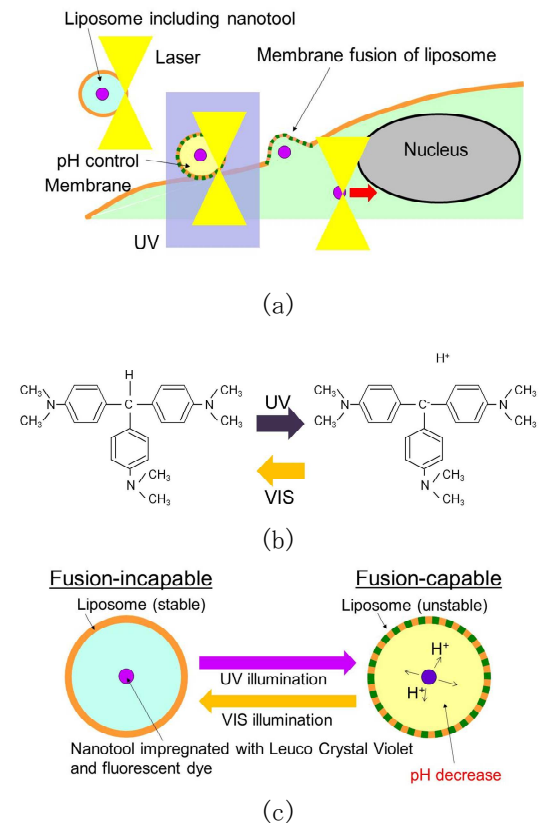


図7 ロイコクリスタルバイオレット (LCV) の光応答性構造変化をりようした光制御リポフェクションによるゲルツールの選択的細胞導入 (a) 概念図 (b) LCVの光構造変化の模式図 (c) 光pH制御によるリポソームの細胞膜融合性制御の模式図

pHの変化量とLCVの導入量の関係の解析を行った。解析モデルを図8に示す。直径Dの球形の空間に直径dのゲルツールが一つ存在

している状態で解析を行った。空間内の pH の最大変化量 ΔpH_{max} とゲルツールと LCV の重量混合比 m_{LCV} の関係は式(1)で表される。 pH_{in} は初期 pH を、 M_{LCV} [g] は LCV の分子量、 ρ_r [g/ml] は樹脂の密度を示す。

$$\Delta pH_{max} = -\text{Log}_{10} \left\{ \frac{M_{LCV}}{\rho_r} \times \left(\frac{D}{d} \right)^3 \times 10^{-3} \times m_{r/LCV} + 10^{-pH_{in}} \right\} - pH_{in} \quad (1)$$

ここで、LCV の分子量は 373.53、樹脂の密度は 1.11g/ml である。 pH_{max} に至るまでの pH 制御は紫外光の入力量制御で行う。

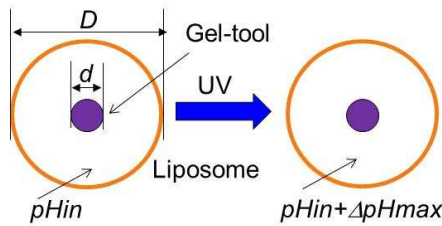


図 8 光 pH 制御によるリポソーム内の pH 変化量の解析モデル図

ゲルツールは LCV を導入したゲルツールの溶液を脂質を底面にコートしたビーカーに導入し、55°C で 20 分間静置させることで生成したリポソーム内部にツールを導入することで作製した (図 9 参照)。

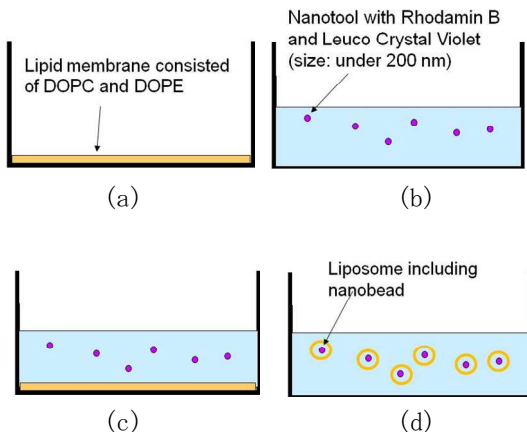


図 9 pH 制御ゲルツール導入リポソームの作製プロセス (a) 脂質膜の形成 (b) ゲルツール溶液の導入 (c) 55°C での加熱 (d) リポソームの生成

図 10 に示すように、作製したリポソーム内における光 pH 制御機能の確認を行った。リポソーム内部には pH 指示薬のプロモクレゾールグリーン (BCG) を導入してある。UV を照射することでリポソーム内の BCG が青色から黄色に変色し、可視光を照射すると青色に戻ることを確認した。BCG は中性で青色、酸性で黄色を示すため、光によるリポソーム内部の pH 制御に成功した。この手法を用い、図 11 に示すように MDCK 細胞へのリポソームの選択的付着実験を行った。紫外光を照射す

る前は、リポソームを光ピンセットで搬送し細胞へ押し当てても細胞へ付着しなかったが、紫外光照射により 95% の確率で細胞へ付着することを確認した。また細胞へ導入したゲルツールを細胞内で操作することに成功し、細胞内計測の可能性を示した (図 12)。

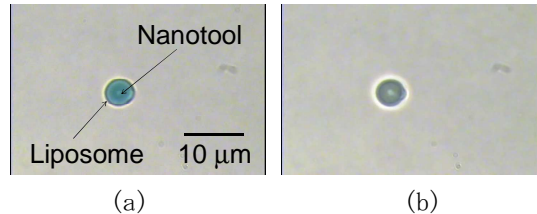


図 10 pH 制御ゲルツールによるリポソーム内 pH 制御 (a) 紫外光照射前 (pH6.8) (b) 紫外光照射後 (pH5.5)

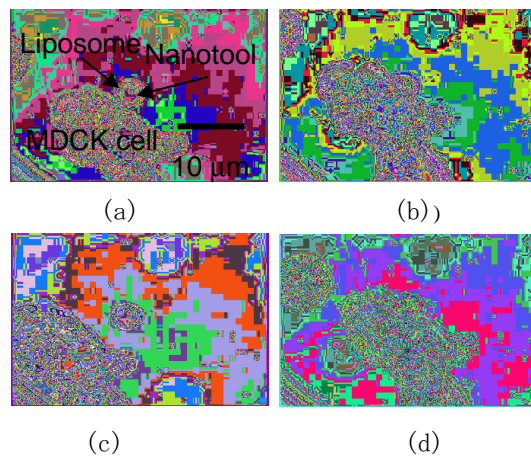


図 11 光 pH 制御による選択的リポソームへの押し当て、(d) 紫外光照射後の細胞への押し当てによる細胞膜への付着

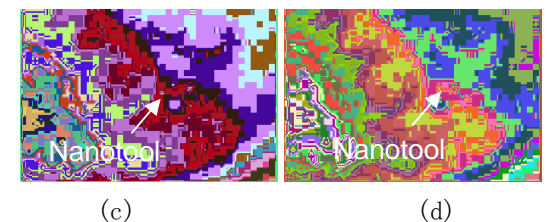
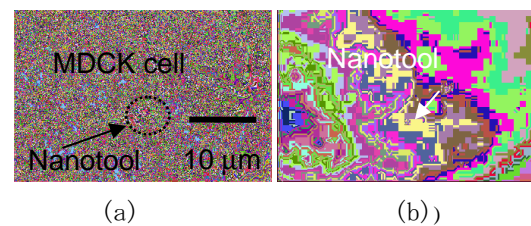


図 12 細胞内へ導入したゲルツールの細胞内操作 (a) 明視野画像 (b)-(d) ゲルツールの細胞内操作の蛍光画像

以上のように計測に、細胞操作や細胞計測等のオンチップ微細作業に適した物理的、化学的性質のツールを作製する技術を確認して

おり、マイクロ流体チップ内での単一細胞レベルでの評価実験に適用を進める。

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1件)

- ① Hisataka Maruyama, Toshio Fukuda, Fumihito Arai, Optical Adhesion Control of Hydrogel Microtools for On-Demand Immobilization and Measurement of Cells on a Microfluidic Chip, Journal of Robotics and Mechatronics, 査読有, Vol. 22, pp. 631-638, 2010.

[学会発表] (計7件)

- ① Hisataka Maruyama, Taisuke Masuda, Naoya Inoue, Nagoya University, Japan, Ayae Honda, Tatsuro Takahata, Fumihito Arai, Optical pH Regulation Using Functional Nanotool Impregnating with Photo-Responsive Chemical for Intracellular Measurement, MHS2010, 2010年11月9日, Noyori Conference Hall, Nagoya
- ② Hisataka Maruyama, Kyosuke Kotani, Ayae Honda, Tatsuro Takahata, Fumihito Arai, OPTICAL INJECTION AND MANIPULATION OF FUNCTIONAL NAOTOOL USING PHOTO-RESPONSIVE CHEMICAL AND OPTICAL TWEEZERS FOR INTRACELLULAR MEASUREMENT, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2010年10月6日, Martiniplaza, Groningen, The Netherlands
- ③ Hisataka Maruyama, Kyosuke Kotani, Ayae Honda, Tatsuro Takahata, Fumihito Arai, Injection and Laser Manipulation of Nanotool Using Photo Responsive Chemical for Intracellular Measurement, IEEE NANO 2010, 2010年8月19日, KINTEXT, Seoul, Korea
- ④ 丸山央峰, 港谷恭輔, 吉田圭佑, 本田文江, 高畑辰郎, 新井史人, オンチップ細胞計測に関する研究—その2:細胞内計測のためのナノツールの細胞導入と細胞内レーザー操作—, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2010, 2010年6月16日, 旭川大雪アリーナ(北海道)
- ⑤ 丸山央峰, 大竹智之, 新井史人, 機能性マイクロツールを用いた細胞近傍環境計測, 第10回システムインテグレーション

部門講演会, 2009年12月26日, 東京, 芝浦工業大学

- ⑥ Hisataka Maruyama, Fumihito Arai, Fabrication of Functional Gel-Nanotool for Intracellular Measurement, 2009 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2009年11月10日, 名古屋, 名古屋大学
- ⑦ 丸山央峰, 港谷恭輔, 飯塚龍, 本田文江, 江島美穂, 新井史人, 細胞内環境計測のための機能性ナノツールの作製, 第27回日本ロボット学会学術講演会, 2009年9月16日, 横浜, 横浜国立大学

[その他]

ホームページ等

- ① http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/research/Robomec2010/Robomec2010_maruyama_cell.pdf
- ② http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/research/21stCheminas/21Cheminas_maruyama.pdf

受賞

- ① NANOKOREA AWARD (Certificate of Merit), Korea Nano Technology Research Society, NANO KOREA 2010 joint symposium with IEEE NANO 2010, 2010.
- ② 第10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 優秀講演賞, 計測自動制御学会, 機能性マイクロツールを用いた細胞近傍環境計測, 丸山 央峰, 大竹 智之, 新井 史人, 2009
- ③ 日本機械学会, 社団法人日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門ベストプレゼンテーション表彰, 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, 丸山央峰, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし