

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25706025

研究課題名(和文)動く細胞の詳細を覗く事を可能にするフェムト秒レーザーを用いたバイオチップ作製

研究課題名(英文)Biochip fabrication using femtosecond laser for dynamic observation of moving cells

## 研究代表者

花田 修賢 (Hanada, Yasutaka)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20435671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：組織形成などの初期過程を知ることを目的とした固体境界面における細胞の顕微動態観察が、バイオ医療分野で盛んに行われている。細胞を顕微鏡下で観察する際には、バイオチップが用いられているが、バイオチップ材料にはガラスなどの透明材料が用いられていることから、バイオチップ内(流体)構造境界面において、観察像がぼやけ、影ができる問題があった。よって、本研究では、フェムト秒レーザー3次元加工技術を用いた水の屈折率にほぼ等しい低屈折率フッ素ポリマーを用いたバイオチップ作製を行った。更に、作製したバイオチップを用いることで、流体構造壁面においてユニークな運動をする細胞の鮮明な動態観察に成功した。

研究成果の概要(英文)：The dynamic analysis of cellular migration using microscope systems has become a trend within research in biology, medicine and tissue engineering, as a means of studying the early stages of tissue formation etc. When observing a cell under the microscopic system, biochips made of glass materials are used to streamline the analysis. However, conventional biochip materials are not suited to the microscopic observation of the cell at the fluid boundary due to the refractive index mismatch between the medium and the biochip material. Therefore, the use of conventional biochips results in blurry microscopic images of cell migration near the fluid surface. For this reason, we have developed a method of fabricating 3D microfluidic chips made of the low refractive index fluorine polymer. A microfluidic chip made in this manner enabled us to more clearly observe the flagellum motion of the cell near the fluid surface, compared to the observations possible using conventional microfluidic chips.

研究分野：レーザープロセッシング

キーワード：フェムト秒レーザー 低屈折率ポリマー バイオチップ 流体構造 細胞 顕微鏡観察 固体境界面

### 1. 研究開始当初の背景

顕微鏡を用いた細胞の動態観察は、シャーレやスライドガラスを用いて細胞の母集団を統計的に観察・分析する手法が主流であるが、近年、「一つ一つの細胞には個性がある」という概念がバイオや医療分野など細胞を扱う研究分野においてトレンドとなっている。しかしながら、集団の中にある一つの細胞を観察する場合、高速かつ自由自在に動く細胞を捕らえることは困難である。よって、現在ではマイクロ化学総合分析システム( $\mu$ -TAS)と呼ばれる機能を集積したバイオチップを用いる観察法が、単一細胞の観察・分析の主流となっている。このようなバイオチップの作製方法は、フォトリソグラフィと呼ばれる半導体表面加工技術が用いられているが、3次元流体構造をバイオチップ基板内に作製する場合、多重プロセスになることや、張り合わせ工程における基板同士の位置調整が必要不可欠である。また、基板の再利用の際に試薬の液漏れが起こる、基板が剥がれてしまう等、問題がある。

従来バイオチップ材料には、ガラスやPDMSポリマーなどの透明材料が用いられているが、流路壁面等の固体境界面における細胞の動態観察では、培地(水)とバイオチップ材料との屈折率差により顕微鏡像がぼやけ、影ができるなどの問題があった。よって、流速による流路内圧力勾配により流路壁面に追いやられた細胞や壁面近傍でのみユニークな運動をする細胞の顕微鏡観察は困難を擁していた。

一方、フッ素ポリマーの多くは高い透過性、耐熱性などその他従来ポリマーが有する特徴のほか、低屈折率性を有することから、フッ素ポリマー製バイオチップを作製することで、バイオチップ内流路境界面における細胞の動態観察が可能になると考えられる。しかしながら、フッ素ポリマーの微細加工技術は、フッ素ポリマーが有する優れた諸特性により、加工が困難とされていた。

### 2. 研究の目的

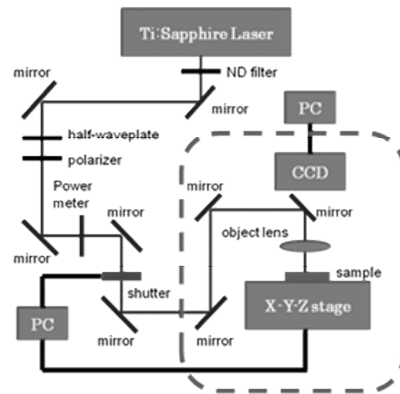
上述した背景を踏まえ、本研究では、流体構造壁面における鮮明な細胞の動態観察を可能にする低屈折率フッ素ポリマーバイオチップの作製を目的とし、フッ素ポリマーの微細加工技術開発および細胞の固体境界面における動態顕微鏡観察を試みた。具体的な実験の目的を以下に示す。

- (1)フッ素ポリマー3次元微細加工技術開発
- (2)細胞動態観察用バイオチップ作製
- (3)流路壁面での細胞動態観察

### 3. 研究の方法

図1に実験装置及び実験手順を示す。実験では、アモルファスフッ素ポリマーCYTOP(旭硝子社)をバイオチップ基板として使用した。フェムト秒(fs)レーザー(波長:775

nm、パルス幅:180 fs、繰り返し周波数:1 kHz)から発振されたレーザー光を、アッテネーターにより出力調整し、20倍の対物レンズ(NA:0.46)を介してCYTOP基板に集光照射した。バイオチップ作製は、図1に示す3つの手順:(1)フェムト秒レーザーアブレーションによりCYTOP基板内部に直接描画を行う。(2)アセトン希釈によるフッ素溶媒を用いたウェットエッチング、(3)熱処理によりCYTOP基板内部へ3次元流体構造を作製した。バイオチップ作製後、水と渦鞭毛藻(水棲微生物)を流路内部に封入し、渦鞭毛藻の流路壁面近傍での顕微鏡観察を試みた。



1. fsレーザー照射 2. エッチング 3. 熱処理

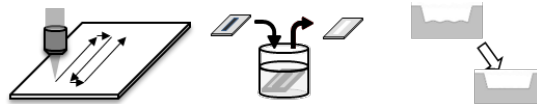


図1 fsレーザー加工システム及びバイオチップ加工方法

### 4. 研究成果

#### (1)フッ素ポリマー3次元微細加工技術

CYTOP基板内部に3次元流体構造を作製するため、フェムト秒レーザー多重走査によるCYTOP基板表面へのアブレーション加工を試みた。その結果、図2に示す走査型電子顕微鏡(SEM)像により、レーザー照射領域にはアブレーションにより生じたと思われる残留物質が周期的に堆積した。

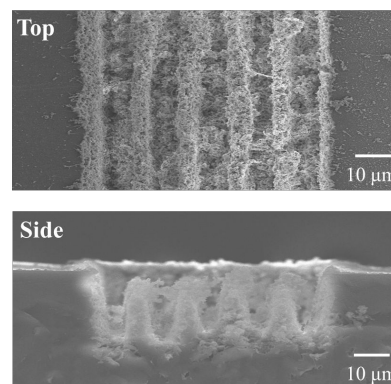


図2 fsレーザーアブレーション後のCYTOP基板SEM像(表面及び側面)

レーザー多重走査後に堆積した周期的残留物質を選択的エッチングするために、エッチング溶液の選定を行った。通常、溶媒のポリマーに対する溶解性を検討する際には、ハンセン溶解度パラメータが用いられるが、フッ素ポリマーには、本パラメータが利用できない事が知られている。よって、エッチング用溶媒の選定では、分子量や化学構造、高度にフッ素化されているかどうか等の観点から、市販されている幾つかのフッ素溶媒を検討した。表1に、アブレーションされたCYTOP基板の各種フッ素溶媒を用いたエッチングについての実験結果を示す。

表1 各種フッ素溶媒検討結果

	AC-6000	AK-225	CT-SOLV180
Molecular weight [kg/mol]	348.11	202.94	Ave. ca. 150 thousand
Solubility (Undiluted)	○	○	○
Chemical formula	$C_8H_5F_{15}$	$C_3HCl_2F_5$	$(C_{12}F_{27})_n$
Water	×	×	×
Acetone	○	○	×
Ethanol	○	○	×

表1より、アセトンにより50%希釈した市販フッ素溶媒 AC-6000(旭硝子社)を用いたエッチングでは、アブレーションされた領域において、クラックやプリスターを形成する事なく、高品質なエッチング結果が得られた。図3に、アブレーション後、AC-6000によるエッチングを行ったCYTOP基板表面のSEM像を示す。

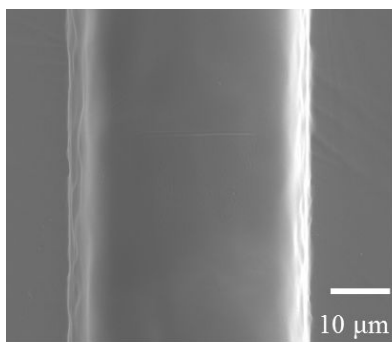


図3 エッチング後のCYTOP基板SEM像

図3より、アブレーションにより生じた堆積物は、希釈したエッチング溶液により選択的に除去されているのが確認できる。次にレーザー照射領域が選択的にエッチング除去された理由を化学的、物理的に検討した。図4に、アブレーションにより生じた堆積物の拡大SEM像を示す。レーザー照射領域の選択的エッチングを可能にした理由については未だ不透明ではあるが、図4より、レーザー照射領域内にある残留物質は、多孔質状になっていることから、エッチング溶媒がレーザー未照射領域に比べ浸透しやすくなり、選択的エッチングを可能にした、と考えられる。

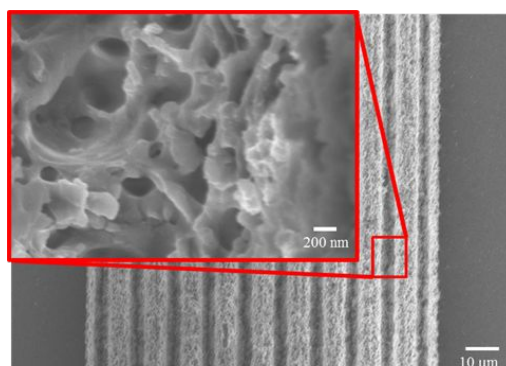


図4 アブレーション後のCYTOP基板拡大SEM像

図5に(a)レーザー未照射、(b)エッチング後、(c)熱処理後のCYTOP表面の原子間力顕微鏡(AFM)像を示す。エッチング後、レーザー照射領域の表面粗さは47 nmであったが、熱処理を行うことにより、8 nmまで改善することができた。一般的に熱処理によるフッ素ポリマーの流動性は、その安定した化学構造により低いと言われている。よって、熱処理では、熱処理温度をCYTOPが有するガラス転移温度以上の190 とし、処理時間を30分と短くすることでアブレーション加工形状を崩さず平坦化を行った。

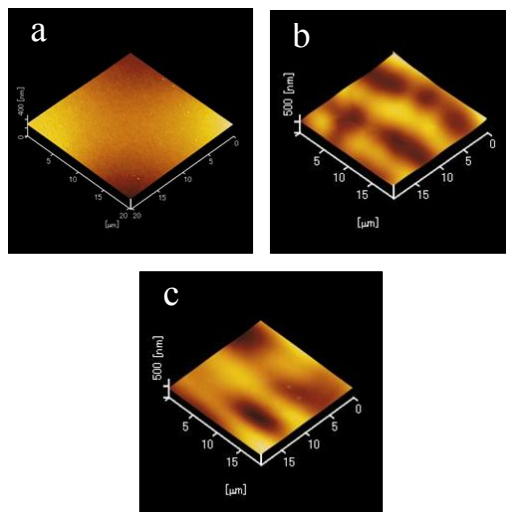


図5 CYTOP基板の表面粗さ測定結果 (a)未照射 (b)エッチング後 (c)熱処理後のAFM像

## (2) 作製した3Dバイオチップによる細胞の動態観察

光合成能をもつ渦鞭毛藻(Dinoflagellate)は珊瑚に共生することから、珊瑚の生成に重要な役割を果たす。渦鞭毛藻は、一旦、珊瑚から離れると遊泳し、その後、珊瑚等の固体表面近傍で一定の距離を保った状態で回転運動する。この運動メカニズムは解明されておらず、渦鞭毛藻が距離を感知するメカニズムを解明することは、細胞がもつ未知なるセンサー器官の発見に繋がると言われている。し



かしながら、従来バイオチップによる流路壁面などの固体近傍における細胞動態観察は、上述した光学的問題により困難であり、その他多くの細胞観察がそうであるように、これまでは細胞を上から観察する、流体力学的シミュレーションすることしか行われていなかった。

よって、これまでの加工結果を元に、渦鞭毛藻の流路壁面近傍における動態観察を目的とした CYTOP 基板内部への 3 次元流体構造を作製した。図 6 に、バイオチップの光学顕微鏡像上面図及び破線に沿って切断した流路断面図を示す。流体構造は 2 つのリザーバーと CYTOP 表面から 50  $\mu\text{m}$  下に埋め込まれた中空構造の流路から成る。

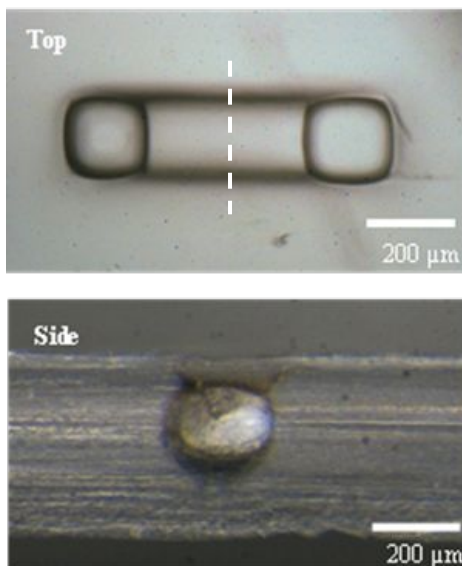


図 6 作製した CYTOP 3 次元流体構造

図 6 より、CYTOP 基板内部に作製した 3 次元流体構造は、当初設計したサイズとほぼ一致した形状となった。図に示すような比較的大きな流体構造を作製する場合には、fs レーザーアブレーション走査の際に、集光したレーザー光を流体構造の底面から基板表面に向かいレーザー走査する事で、多重レーザー走査の際のアブレーション残留物質によるレーザー光の散乱を防いでいる。

本バイオチップを用いた流路壁面近傍における渦鞭毛藻の動態観察を行う際には、片方のリザーバーから渦鞭毛藻及び培養液を同時に封入し、流路内を培養液で満たした後、流路壁面近傍を遊泳する渦鞭毛藻の光学顕微鏡観察を行った。

図 7 (a) に、CYTOP バイオチップを使用した際の流路壁面近傍を泳ぐ渦鞭毛藻のタイムラプス観察結果を示す。また、比較のため図 7 (b) に、従来ガラスバイオチップを使用した際の観察結果を示す。図 7 (a) より、CYTOP バイオチップを使用した場合には、流路壁面近傍にある渦鞭毛藻は、壁面から一定の距離をとり巡回運動し、また、鞭毛の一つが壁面に接触している様子が確認できる。よって、

CYTOP バイオチップを使用することで、渦鞭毛藻が固体表面から一定の距離を保ち巡回運動する際には、鞭毛を固体表面に接触させながら遊泳することが明らかになった。一方、従来ガラスバイオチップを使用した場合には、流路壁面近傍において、観察像がぼやけ、影ができることから詳細な渦鞭毛藻の動態観察ができなかった。

これらの結果により、開発した CYTOP バイオチップは、従来バイオチップでは観察不可能な流路壁面等の固体境界面での細胞動態観察に威力を発揮し、これまで行われてきた細胞の運動メカニズム解明研究に新たな知見を与えられられる。

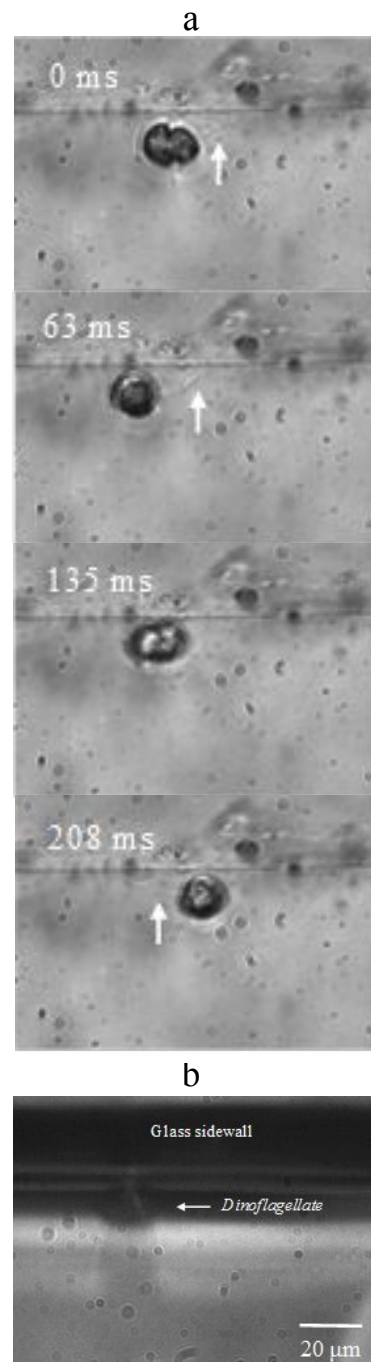


図 7 (a)CYTOP 流路および(b)ガラス流路内の渦鞭毛藻の動態観察(矢印は鞭毛の位置)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Yasutaka Hanada, Tatsuya Ogawa, Kazuhiro Koike and Koji Sugioka, “Making the Invisible Visible: Microfluidic Chip Using a Low Refractive Index Polymer”, Lab Chip, 2016. (accepted)査読あり  
DOI: 10.1039/c6lc00481d
2. Tatsuya Ogawa, Yasutaka Hanada, “Microfabrication of the UV transparent polymer CYTOP using a conventional pulsed green laser” Appl. Phys. A, 122, pp. 156-161, 2016.査読あり
3. Nobuaki Ishikawa, Yasutaka Hanada, Ikuko Ishikawa, Koji Sugioka and Katsumi Midorikawa, “Femtosecond laser fabricated biochip for studying symbiosis between Phormidium and seedling root” Appl. Phys. B, 119, pp. 503-508, 2015.査読あり
4. 花田修賢 “細胞や微生物の動態観察を可能にするフェムト秒レーザー3次元加工技術による  $\mu$ -TAS 作製” 精密工学会誌, 81, 8, pp.722-725, 2015.
5. 花田修賢, 杉岡幸次 “超短パルスレーザーを用いた水棲微生物観察用バイオチップ” レーザ加工学会誌, 21, 3, pp.6-10, 2014.

〔学会発表〕(計 28 件)

国際学会

1. Yasutaka Hanada, Koji Sugioka, “Cell observation in functional biochips fabricated by femtosecond laser direct writing”, International Union of Materials Research Societies- The IUMRS International Conference in Asia 2014 IUMRS-ICA, Fukuoka, (2014.8.28).招待講演

国内学会

1. 花田修賢, “流路内の鮮明な細胞観察を可能にする3次元バイオチップ作製”, 第84回レーザー加工学会, 名古屋, (2016.1.20).招待講演
2. 花田修賢, 石川 依久子, 杉岡 幸次, “細胞の詳細観察を可能にするフェムト秒レーザーを用いたバイオチップ作製”, レーザー学会学術講演会第35回年次大会, 品川, (2015.1.11).招待講演
3. 花田修賢, 杉岡幸次, “フェムト秒レーザーを用いたバイオチップ作製およびその応用”, 第74回応用物理学会学術講演会シンポジウム, 京都, (2013.9.16).招待講演

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mech.hirosaki-u.ac.jp/~y-hanada/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

花田 修賢 (HANADA Yasutaka)

弘前大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20435671