

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390037

研究課題名(和文)半導体微細加工プロセスとクラドニ図形の融合による細胞の輸送と単一分離技術の開発

研究課題名(英文)A study of transport of cells and single-cell isolation technology by combination of semiconductor microfabrication processes and Chladni patterns

研究代表者

松谷 晃宏 (Matsutani, Akihiro)

東京工業大学・技術部・技術専門員

研究者番号：40397047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年要求が増加している単一細胞操作の技術開発は、その実現により個々の細胞の振舞いに着目した研究が可能になり創薬や細胞工学の研究に新しい展開が期待できる。本研究では、垂直振動による液体定在波を利用してマイクロ流路を用いず細胞懸濁液中に細胞の収集パターンを形成させ、振動波形や周波数の制御により細胞の位置決めと操作および単一分離を併せて可能にする技術を開発した。また、半導体プロセスとスンプ法を用いてセルロイド基板上にマイクロレンズアレイを製作し、裏面よりコリメートされたレーザー光の照射により集光位置に粒子を停止させる細胞の輸送の制御方法について実験的に検討し、細胞輸送の制御に関する要素技術を実証した。

研究成果の概要(英文)：Technological development of single-cell manipulation that is increasingly required in recent enables realization of research that focuses on the behavior of individual cells and realization of novel developments in research on drug discovery and cell engineering. In this research, we use a liquid standing wave due to vertical vibration to form cell collection patterns in a cell suspension without using a microchannel, and by controlling oscillation waveform and frequency, positioning and operation of single-cell. In addition, we experimentally investigated a method of controlling the transport of cells, in which microlens arrays are fabricated on a celluloid substrate using various semiconductor processes and the SUMP method and yeast cells are stopped at the focal position by irradiation with collimated laser light from the back side, and demonstrated elemental technologies related to cell transport control.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

キーワード：ナノマイクロバイオシステム 細胞分離 液体定在波 半導体プロセス技術

1. 研究開始当初の背景

近年、単一の細胞を操作する技術開発の要求が増加している。これは、従来のコロニー形成による方法では集団的取り扱いしかできないため、同一の培養液中においてもそれぞれの細胞の特徴は同一でないにもかかわらず、各細胞の個性まで分離できないためである。また、基板表面のマイクロ及びナノポジショニングに関心の高まりがあるが、そのアプリケーションはバイオセンサーおよび分子エレクトロニクスを含むものである。位置決めのためのパターン形成のために、例えばディップペンリソグラフィや静電的位置決め、あるいは自己組織化などの方法があるが、いずれも分離速度はきわめて遅い。また、異なるサイズの粒子や細胞小器官、細胞の選別は生物学および医学的用途のために重要であるが、細胞の大きさの分類を瞬時に自動的に制御する方法はほとんどみあたらない。

従来の単一細胞分離技術は、基板に小さな穴(well)を掘って細胞を捕獲する方法であった。この方法では μm サイズの細胞を対象とする場合、穴の直径が小さくなり表面張力等の影響により液体の供給や循環が難しくなることが多い。そこで、申請者はマイクロピラーの柵(マイクロ罫)で細胞を囲うという方法を提案し、大腸菌(*E. coli*)や酵母(*S. cerevisiae*)の単一細胞の分離、異なるサイズの細胞の分離や捕獲細胞の培養を実現した。申請者が提案してきた単一細胞分離の方法は、単一細胞分離技術としては捕獲確率が高くほぼ理想的な結果がえられていた。しかしながら、単一細胞の分離と培養には成功したものの、細胞の捕獲は懸濁液中の細胞の自重で沈む確率的なプロセスに頼っており、細胞密度が低い懸濁液では単一分離は可能なものの、単一分離された細胞は広い面積中に分散したものであった。したがって、その他の要素技術と融合し μ -TAS として利用するには次のような課題が残されていた。

- (1) 単一細胞分離構造への細胞導入のための凝集の瞬時位置決め技術
- (2) サイズの異なる細胞の単一細胞分離のための凝集の瞬時位置決め技術
- (3) 細胞の凝集位置決め技術と単一細胞のトラップ技術の融合

2. 研究の目的

本研究は、酵母や大腸菌のような1~数 μm 程度の大きさの細菌細胞について単一細胞の操作技術を開発するものである。本研究では、これまでに開発に成功したマイクロピラー構造を利用した微生物の単一細胞分離技術と、新しく開発するパターンニングされた基板を用いたクラドニ法を利用した音響学的手法と表面にマイクロレンズを配置した基板にレーザー光を用いた光学的な細胞誘導技術を融合することにより、マイクロメ

ートルサイズの細胞操作分析技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究には、粒子の自動的なパターン形成技術の確立が必要となるが、この問題点を解決するために、細胞の密度が低い状態でも、局所的に細胞を収集させて密度の高い状態を作り出し、収集と収集位置(パターン)の変更を瞬時に行う技術を構築する。これを実現するために、本研究ではクラドニ図形のようなパターンを応用する。大腸菌や酵母などの細胞を微粒子として取り扱うことによりクラドニ図形のようなパターンの節線またはその交点などに細胞を輸送および凝集させ、その凝集位置にマイクロ罫やセンサーなどをあらかじめ配置しておけば、任意の位置での瞬時に細胞の単一分離やセンシングなどが“流路レス”基板上で実現できる。また、基板表面に製作したマイクロレンズアレイと半導体レーザーを用いてレーザートラップの技術を用いた実験を行い、細菌細胞の輸送分離技術確立の基礎とすることを目的とした。

4. 研究成果

鉛直加振による酵母細胞の凝集の振動周波数依存性 流路レス凝集の実験には、図1に示すように、金属製の円板の上にスチロール製の容器を載せ、この容器内に酵母の懸濁液を注入し、これを正弦波で鉛直方向に振動させることで液体に定在波を発生させた。

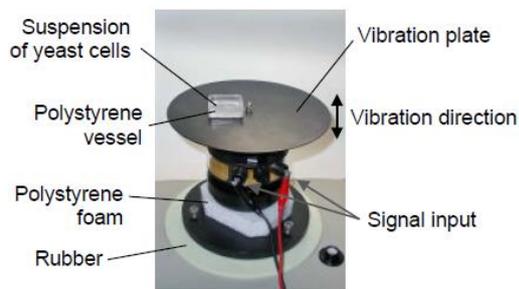


図1 本研究で用いた垂直振動可能な実験装置

図2に振動前と振動後の酵母懸濁液の変化を示す。13 Hzで振動させた後では、均一に分散していた懸濁液の酵母細胞はパターン化されて収集されていることがわかる。パターン形成時の液中粒子の運動はパターン形成に関連した円運動であることが動画による粒子追跡観察の結果明らかになった。振動前の濃度は 7×10^6 cells/ml、振動後の疎部および密部分のそれぞれの濃度は、 1×10^6 cells/mlと 7×10^7 cells/mlとなり、凝集による疎密比は約70倍となった。13 Hzの2倍および4倍の周波数、すなわち26 Hzおよび52 Hzで振動させた後の収集パターンの実験結果より、収集パターンは振動周波数に依存した液体定在波の波長に関係することがわ

かった。周波数変化によるこれらのパターンの形成にかかる時間は数秒程度であった。

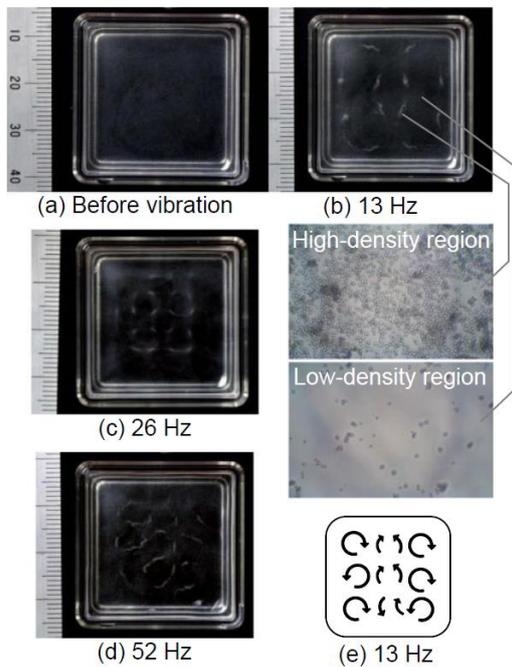


図 2 (a) 振動前の拡散した細胞懸濁液，酵母細胞の収集パターンの正弦波における振動周波数依存性 (b) 13 Hz, (c) 26 Hz (d) 52 Hz. (e) 13 Hz の振動における粒子運動の概略図.

図 3 に、鉛直加振による酵母細胞の凝集の振動波形依存性を示す. 本実験は、図 1 の加振器の金属製の円板上に 30×30 mm² のスチロール製の容器を載せ、この容器内に酵母の懸濁液を注入し、液面と垂直方向に振動させることで発生した液体定在波を用いて行った。パルス波および矩形波で振動させた後では明瞭な凝集パターンが得られたが正弦波では明瞭な凝集パターンが得られなかった。20Hz での励振ではいずれの波形でも凝集パターンを得ることができた。低周波励振では液体定在波の生成のために励振波形の選択が重要であることがわかった。

上記の実験により、低振動数においてはパルス波による振動が酵母細胞の流路レス凝集に有効であることがわかったので、タッピングによりパルス波を振動波形として流路レス凝集を試みた。図 4(a) に指で加振器の中心部を 2 Hz でタッピングすることにより酵母細胞を凝集した結果について示す。図 4(b) にガラス基板 (フォトマスク) 上に塗布した SU-8 に裏面から露光して製作した高さ 7 μm のマイクロピラー構造のマイクロ罫を用いて、4 Hz でタッピングしたときの凝集状態とマイクロ罫中に捕獲された酵母細胞の様子を示す。容器内に設置したマイクロ罫にタッピングにより流路レスで酵母細胞を凝集させて単一細胞分離可能なことと、凝集部と疎部で捕獲頻度が異なることがわ

かった。凝集部でマイクロ罫中に複数の酵母細胞が捕獲されたのはマイクロ罫の高さが過剰なために立体捕獲された影響と考えられる。

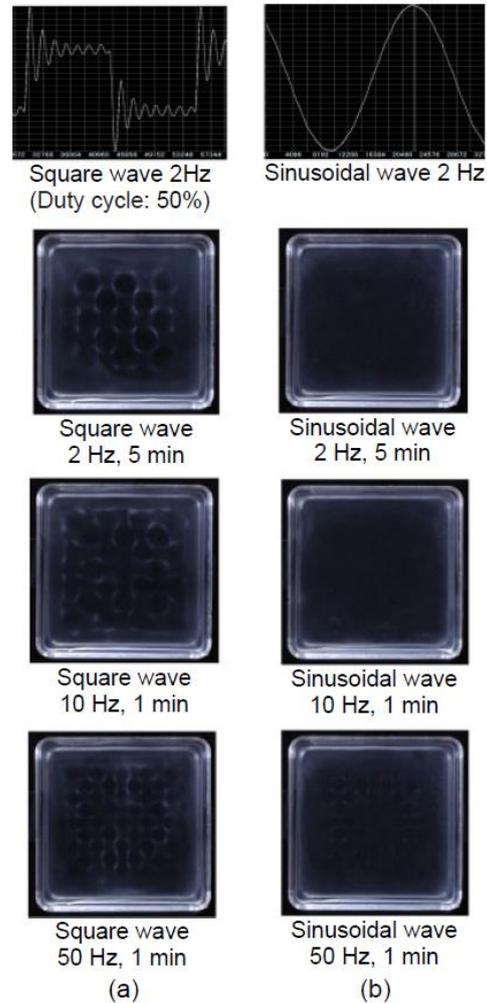


図 3 酵母細胞の収集パターンの振動波形依存性. (a) 矩形波, (b) 正弦波.

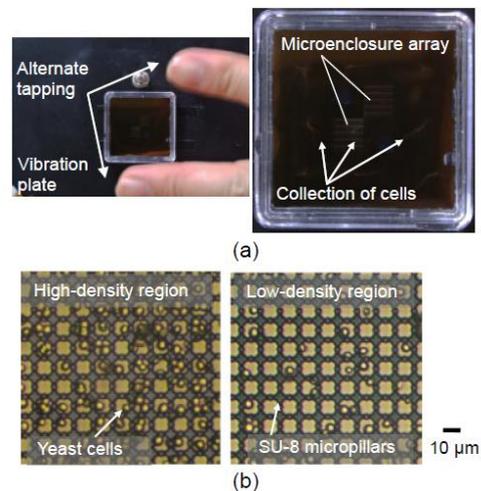


図 4 (a) タッピングによる収集パターン, (b) マイクロ罫アレイに捕獲された酵母細胞の光学顕微鏡写真

また、図5に示すように、この方法により異なる大きさの細胞の単一分離も可能なことがわかった。

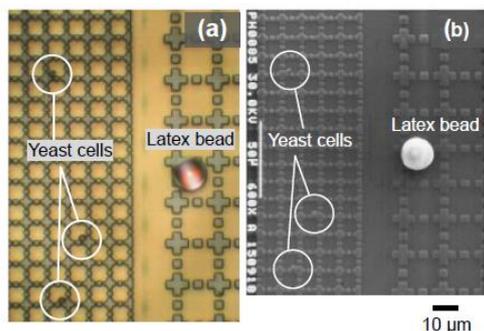


図5 サイズのふり分けの成功例。
(a) 光学顕微鏡写真, (b) 電子顕微鏡写真。

次に、流路レス凝集させてマイクロ罫を用いて単一分離した微生物細胞の分析応用の一つとして、マイクロ罫に単一分離された酵母細胞の蛍光観察を試みた。図6に、実際にGFP (Green Fluorescent Protein) を発現させた酵母を用いて、DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) で核染色した蛍光顕微鏡写真を示す。マイクロ罫を用いて単一細胞分離を行うことにより細胞毎の蛍光強度を比較することが可能であることがわかる。この例に示されるように、マイクロ罫による単一細胞分離では、細胞の位置決めが可能のため、それぞれの細胞の個性を判別する分析や実験が容易に実現できることが示された。

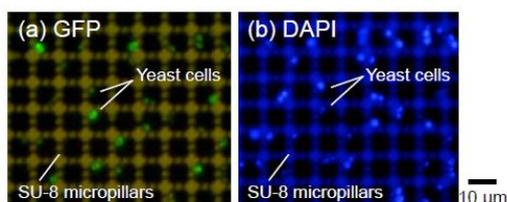


図6 マイクロ罫に捕獲された酵母細胞の蛍光顕微鏡写真。(a) GFP, (b) DAPI。

図7にモールド材料としたSi(100)基板に電子線レジストZEP520にEBリソグラフィにより形成した直径500 nm以下のアレイ状の円形開口のエッチングマスクパターンを用いて、XeF₂気相エッチング装置でSi基板の等方性エッチングを行い半球形状の孔のモールドにより、スンプ法で製作したセルロイドのマイクロレンズアレイによる空気中における集光の様子を示す。光源にはコリメートされた半導体レーザ($\lambda = 670 \text{ nm}$)を用いた。レンズごとに集光スポットが確認され、マイクロレンズアレイとして機能していることがわかる。直径約5 μm のレンズのレンズ平坦面から集光スポットまでの距離は、空気中で6 μm 、水中で約11 μm であった。

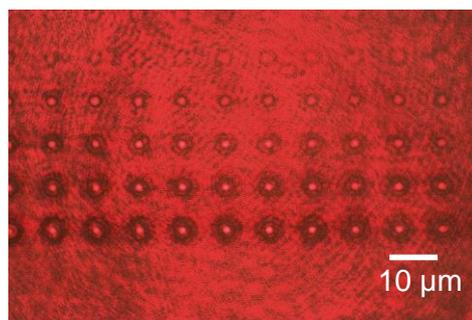


図7 スンプ法により製作されたセルロイドマイクロレンズアレイによるレーザ光の集光スポット。

図8にセルロイドマイクロレンズにより集光されたレーザ光により捕獲された酵母細胞を示す。コリメートされたレーザ光がマイクロレンズで集光された位置で対流により移動する酵母細胞(図中矢印)が停止した事象が観察された。レーザ光のパワーやマイクロレンズの直径および焦点距離等の最適化により、スンプ法によるセルロイドマイクロレンズを用いて液中の細胞を捕獲できる可能性が示された。

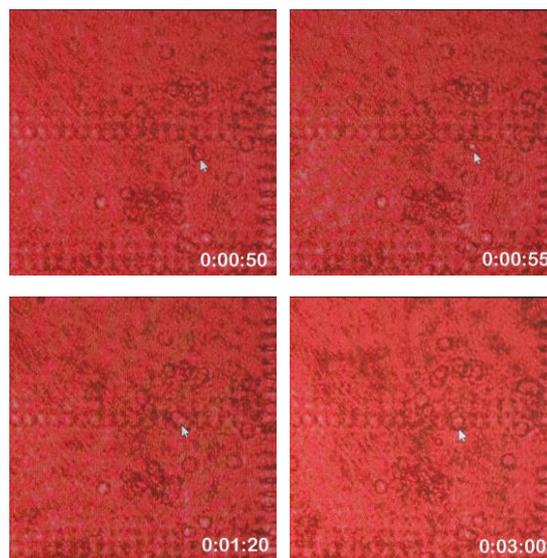


図8 上記(図7)のセルロイドマイクロレンズによりレーザ光が集光された箇所酵母細胞が停止した例。矢印が液中の酵母細胞。画面左右方向に規則的な配列がマイクロレンズアレイ。右下の数字の単位は秒。

以上の結果より、本研究で目的としたマイクロメートルサイズの細胞を、垂直振動による液体定在波を利用することにより、流路フリーで自動的な細胞収集パターン形成方法を開発し、本研究で開発したマイクロレンズの製作方法と実証実験により、細胞の単一分離および操作が可能な技術の可能性を明らかにし、それらの要素技術の基礎を確立した。

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2件)

- ① A. Matsutani, A. Takada,
“Microchannel-free collection and single-cell isolation of yeast cells in a suspension using liquid standing wave,” Japanese Journal of Applied Physics, **55** (2016) 118006. 査読有.
<http://iopscience.iop.org/article/10.7567/JJAP.55.118006/meta>
- ② A. Matsutani, A. Takada, “Single-Cell Isolation and Size Sieving Using Microenclosure Array for Microbial Analysis,” Sensors and Materials, **27** (2015) 383. 査読有.
<http://dx.doi.org/10.18494/SAM.2015.1077>

[学会発表] (計8件)

- ① 松谷晃宏, 高田綾子, “XeF₂気相エッチングとスンプ法によるセルロイドマイクロレンズアレイの製作”, 第64回応用物理学会春季学術講演会, 15a-P2-8 (2017年3月15日, パシフィコ横浜)
- ② A. Matsutani, A. Takada, “Single-cell Isolation of *S. Cerevisiae* Using Celluloid Microenclosure Array Formed by the SUMP Method,” 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2016), 10P-7-33 (Nov. 10, 2016, Kyoto).
- ③ 松谷晃宏, 高田綾子, “スンプ法により形成したセルロイド製単一細胞分離用プレートによる酵母細胞の分離”, 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 14a-D63-10. (2016年9月14日, 朱鷺メッセ)
- ④ 松谷晃宏, 高田綾子, “液体定在波を利用した微生物細胞の流路レス凝集法におけるマイクロ囲いアレイを用いた大きさによる篩い分けと単一分離”, 第63回応用物理学会春季学術講演会, 21a-P3-12 (2016年3月21日, 東京工業大学)
- ⑤ 松谷晃宏, 高田綾子, “タッピングによる酵母細胞の流路レス凝集パターン形成と単一細胞分離”, 第7回集積化MEMSシンポジウム, 29pm-PM-3, (2015年10月29日, 朱鷺メッセ).

- ⑥ 松谷晃宏, 高田綾子, “液体定在波を利用した酵母細胞の流路レス凝集パターン形成における励振波形の効果”, 応用物理学会2015年秋季学術講演会, 15p-PA3-1, (2015年9月15日, 名古屋国際会議場).

- ⑦ 松谷晃宏, 高田綾子, “液体定在波を利用した酵母細胞の流路レス凝集パターンの振動周波数による制御”, 2015年 第62回応用物理学会春季学術講演会, 12p-P2-6 (2015年3月12日, 東海大学)

- ⑧ 松谷晃宏, 高田綾子, “低周波鉛直加振による液体定在波を利用した酵母細胞の流路レス凝集”, 第31回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 21pm3-PS112, (2014年10月21日, くまびきメッセ)

[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]

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

松谷 晃宏 (MATSUTANI, Akihiro)
東京工業大学・技術部・技術専門員
研究者番号: 40397047

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

高田 綾子 (TAKADA, Ayako)
東京工業大学・技術部・技術専門員
研究者番号: 20401565

(4)研究協力者

なし