

報告番号	※ 甲 第 11064号
------	--------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 On-Chip Local Cell Manipulation
with Vibration-Induced Global Flow
(振動誘起広域流れ下でのオンチップ局所細胞操作)

氏 名 早川 健

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、オンチップ細胞操作のための”Local cell manipulation method” (局所細胞操作法)、及び”Global cell manipulation method” (広域細胞操作手法)に関する研究を行った。

昨今のバイオテクノロジーおよびマイクロ・ナノ工学の発展に伴い、細胞の解析・手術を行う需要が高まっており、そこで必要となる細胞操作技術が強く求められている。従来は機械式のマイクロマニピュレーターを用いて細胞培養ウェル上の細胞にアクセスし、細胞操作を行う方法が一般的であったが、この方法では操作に熟練した技術が必要であり、再現性・スループットが低いという問題があった。そこで近年注目されているのが、マイクロ流体チップ上に細胞操作に必要な機能を集積し、チップ上で細胞操作を行うオンチップ細胞操作という方法である。オンチップ細胞操作の基本的な方針として、細胞の高精度位置決め、回転、細胞手術、電気・機械的刺激等の高精度・多機能が求められる操作については、顕微鏡下で観察しながら行う (Local cell manipulation)。しかし顕微鏡の視野は約10 μm ~100 μm 平方程度であり、多数の細胞を操作する際には効率が低い、という問題がある。そこで細胞を上記の作業エリアに搬送、凝集、トラップするための広域的操作 (Global cell manipulation) を併用することにより、細胞操作の連続・並列処理を行い、高効率な細胞操作を実現する。つまりオンチップ細胞操作のためには、顕微鏡視野内の作業エリアで詳細な操作を行うLocal cell manipulationと、チップ全体の広域で細胞を操作するGlobal cell manipulationが必要であり、これらを併用することにより目的の細胞操作を高効率で行うことができる。

現在までに提案されているオンチップ細胞操作法として、流体力、電磁気力、音響力、光圧力等を用いた手法があるが、一般的には搬送等のGlobal cell manipulationには流体力がよく用いられる。また、一細胞を対象とした高精度 (≈ 100 nm) なLocal cell manipulationには、光圧力を利用した光ピンセットが適している。しかしながら、従来の流体力を用いた方法では、閉鎖系のマイクロ流路と外部ポンプを接続し流体制御を行うため、チューブ接続等のポンプとの接続部において微小かつ柔軟な細胞が詰まる、漏れるなどして失われてしまうことがあった。これは、希少細胞を扱う際や、細胞を個別に管理しその経時変化を観察したい用途において、非常に問題であった。特に近年では個々の細胞の特性を詳細に解析する単一細胞解析が非常に重要となっており、細胞に対してチップ上で計測・手術操作を行い、その後チップから取り出して個々の経時

変化を観察する、という需要が高まっている。そのため、従来の流体力を用いた操作において、チップから細胞を取り出すことが難しい、という特徴はオンチップ細胞操作の応用を著しく制限する問題点となっている。また、Local cell manipulationに関しては、光ピンセットを用いることにより高精度な操作が可能ではあるが、光ピンセットの操作力が非常に弱い (\approx pN) ため、従来は単純な搬送や、柔らかい細胞 (赤血球など) を対象とした力刺激の印可にのみしか適用できなかった。しかし、微小な細胞を対象として行いたい操作は多岐にわたるため、光ピンセットを用いた操作の多機能化がLocal cell manipulationの課題であった。そこで本論文では、光ピンセットによる多機能細胞操作を実現するためのハイブリッドナノロボットを用いたLocal cell manipulationと、細胞の導入・取り出しが容易な開放系チップ上でのGlobal cell manipulationに関する研究を行った。

まず、光ピンセットによるLocal cell manipulationの多機能化のために、機能性ナノマテリアルを搭載したハイブリッドナノロボットを提案する。以前より我々の研究室では、光ピンセットにより駆動可能なマイクロロボットを作製することにより、光ピンセットによる多機能化を目指してきたが、現在までは搬送にしか応用されていなかった。そこで、近年注目されている機能性ナノマテリアルを搭載したハイブリッドナノロボットを提案する。特に光熱変換特性、表面プラズモン特性、非線形光学特性等を持つ光機能材料を搭載しレーザーを照射することにより、局所加熱による細胞手術、表面プラズモン共鳴による局所高感度センシング、局所照明によるイメージング等が可能になると考えられる。本論文では、光熱変換特性を持つカーボンナノチューブ (CNT) を用いて細胞の局所加熱を行い、細胞穿孔を行うためのハイブリッドナノロボットを作製した。加工には100 nmオーダーで三次元構造を作製可能なフェムト秒レーザー露光法を用い、光ピンセットによるトラップが可能な球形状と、CNTを包埋したハイブリッド構造を実現した。また、作製したナノロボットを用いて、細胞への穿孔、及び蛍光ビーズの細胞内導入に成功した。

次に、開放系チップ上で利用可能な、振動誘起流れを用いたGlobal cell manipulationの提案を行った。前述の通り細胞のチップへの出し入れの需要は非常に高く、そのためにはチップ上へのアクセスが容易な開放構造が望ましい。しかしながら従来用いられていた方法では、閉鎖系マイクロ流路の構造を利用するため、開放構造のチップへの適用が難しかった。そこで、振動誘起流れ (vibration-induced flow) という現象に注目し、その細胞操作への応用を行った。振動誘起流れとは、流体中で振動する物体が存在すると、その周りで流れが生じる現象である。マイクロスケールにおいては、振動誘起流れが生じる領域は数~数十 μ m程度となり、またその速度・方向が印可している振動の振幅・周波数・方向により変調可能であるため、細胞操作に適していると考えられる。本手法では、マイクロピラーをチップ上に作製し、チップ全体に回転振動を印可することによりピラーの周りに回転流れを誘起する。これをもとに、マイクロピラーアレイを作製することによりアレイに沿った流れを誘起し、細胞搬送を実現する。また、ピラーの配置を変えることによって細胞のトラップ、濃縮、回転操作等にも応用できる。

振動誘起流れによる細胞操作の応用例として、単一細胞分離・分注チップの作製を行った。単一細胞の分離及び培養ウェルへの分注操作は生物・薬学等の分野で広く用いられており、従来はセルソーターを用いて行われていたが、導入費用が高価であること、細胞へのダメージが大きいことから、新たな方法が求められていた。今回我々は、以前から我々の研究グループで用いていたフォトリソグラフィ可能な温度応答性ゲル (バイオレジスト) と、振動誘起流れを併用することにより、チップ上での単一細胞分離を実現した。まず、バイオレジストを用いて単一細胞サイズの穴パターンを作製する。バイオレジストは低温 (<32 $^{\circ}$ C) では吸水し膨張、高温 (>37 $^{\circ}$ C) では脱水し収縮するため、高温状態で細胞をトラップし、温度を下げることにより、単一細胞のトラップが可能となる。細胞をトラップした状態で細胞培養ウェル上にチップを被せ、再度加熱することにより、穴パターンを開いて細胞を開放する。これにより細胞をチップ上で単一分離し、細胞培養ウェルに分注することが可能となる。このチップ上で細胞をバイオレジストパターン部分へ搬送するために、振動誘起流れを用いる。マイクロピラーをらせん状に作製し、回転振動を印可することにより、らせん中心への細胞搬送が可能となり、そこにバイオレジストをパターンニングすることにより、単一細胞分離が可能となる。作製したチップを用いて単一細胞分離実験を行い、60%の確率での細胞分離とウェルへの分注に成功し、そのうち61%は長時間培養後も生存していることが確認できた。

本論文で提案した、光ピンセットによる多機能Local cell manipulationと、振動誘起流れを用いたGlobal cell manipulationは、それぞれ従来の方法では不可能であった光ピンセットによる細胞操作の多機能化と、開放系チップ上での細胞操作を可能とした。前者を用いることにより単一細胞に対するより詳細な解析・手術が可能となり、後者を用いることにより細胞のチップ導入・回収が自由に行えるようになり、細胞の個々の情報を経時的に取得することが可能となる。これらによって実現される細胞操作は、細胞生物学や再生医療等、多くの分野で今後広く応用されることが期待される。