

## 論文の内容の要旨

論文題目 細胞ハンドリングシステムに関する研究

氏名 塚田 修大

### 1. はじめに

近年、化学または生物学の分野で、ガラスやプラスチック基板上に形成された微細構造を用いて、化学物質の合成や、細胞の培養、DNA の分離などを行う研究が盛んに行われている。これらの研究は、従来の実験手法を微細なチップ上で行えるということから Lab on a Chip と呼ばれている。チップ上の微細流路を用いることで、試薬や試料の節約、実験の簡略化・効率化などが可能になる。特に細胞培養に関して言えば、コンタミネーションの減少、より生体内に近い培養環境の実現、単一細胞の取り扱い、などが利点として挙げられる。

Lab on a Chip 技術の適用が期待される分野の一つとして発生工学がある。発生工学とは、生物の個体発生過程に様々な実験的操作を加えることによって、その発生過程をこれまでと違った新しいものに変えたり、その結果として新しい生物システムをつくることを主な内容とする生物学の一分野である。しかし、発生工学の実験に、微細チップを用いるという研究例は少ない。その理由は、発生工学では細胞に対して機械的な操作をする必要があり、それを微細チップ内の微細構造によって行う

ことは困難であるからである。例えば、クローン動物の作製過程の一つである核移植では、卵細胞の核を取り除く必要がある。この操作は、現状では微細ピペットを用いることでしか実現できない。

したがって、より汎用的な細胞操作を実現するには、図1に示すようなピペットによる操作と微細チップの併用が可能な新しいタイプの細胞ハンドリングシステムが必要となる。このようなシステムでは、ピペットとその補助的なツールを用いて細胞を操作した後に、微細チップ内の in-situ 加工によって細胞周囲に流路などの微細構造を作製する必要がある。

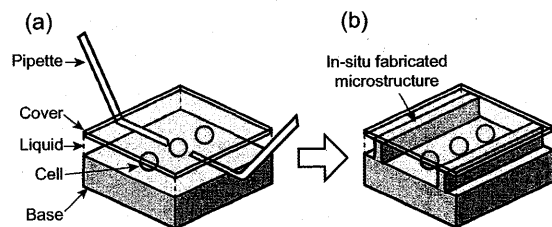


図1 微細ピペットと微細チップを併用した細胞ハンドリングシステムの概要図。ピペットによる操作(a)の後に、ピペットを退避させ、チップ内で微細構造を作製する(b)。

そこで本研究では、そのシステムを実現するための要素技術として、

- ・ 静電気力による細胞の回転操作技術
- ・ レーザ加熱による in-situ 微細加工技術を開発することを目的とする。

## 2. 静電気力による卵細胞の回転操作

微細ピペットによって、細胞の搬送や保持など様々な操作が実現できる。しかし、細胞の姿勢を位置決めする回転操作は困難である。そこで本研究では、微小物体の操作に優れた静電気力を利用した、細胞の回転操作技術を開発する。静電気力による微粒子や細胞の挙動として、回転電界によって微粒子が回転する誘電回転や、電界強度分布の不均一によって微粒子が移動する誘電泳動が知られている。この二つの現象を同時に起こす電界によって、細胞を定位置に捕捉し、かつ回転させることが可能である。

### 2.1. 基礎実験

図2に試作した微小電極を示す。これはガラス基板上にクロムとアルミを真空蒸着し、その後エッチングすることによって製作した。この微小電極に振幅  $4.0V_{0-p}$ 、周波数  $500kHz$  の四相交流電圧を印加して、培養液中でマウス卵細胞を回転させた様子を図3に示す。このように、卵細胞を定位置で回転させること

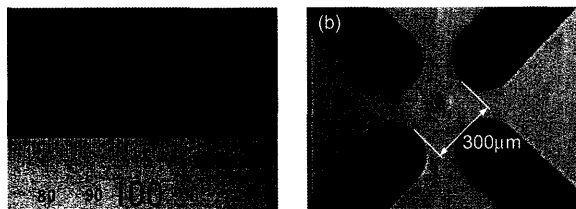


図2 試作した四相電極。(a)外観。(b)先端拡大図(黒い部分が電極。中央にマウス卵細胞がある)。

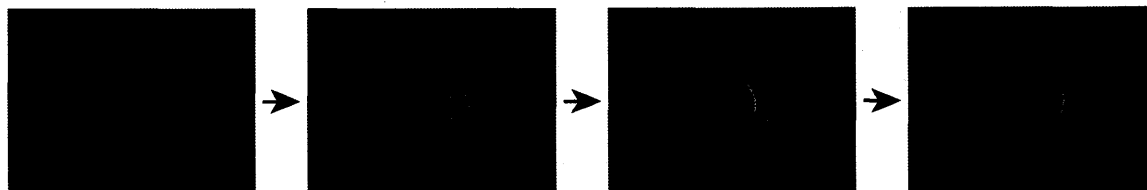


図3 マウス卵細胞の回転の様子。印加電圧の条件：周波数  $500kHz$ 、振幅  $4V_{0-p}$ 。

が可能であることを確認した。また、電圧の印加をやめるのとほぼ同時に卵細胞の回転が止まる。これは卵細胞程度の大きさでは、慣性力よりも周囲の液体の粘性力の効果が大きいことに起因している。したがって、回転姿勢を高精度に位置決めすることができる。

卵細胞は他の細胞と異なり、その表面を透明帯と呼ばれる厚い膜で覆われている。透明帯は表面に親水基を持つため、同じく親水表面を持つガラスに吸着する。その吸着力によって回転操作が阻害されるため、シリコーン処理によってガラス基板表面を疎水化することを試みた。その結果、吸着力を弱めることができ、ほぼすべての卵細胞を回転させることに成功した。シリコーン処理をした電極基板を用いた場合の、印加電圧の周波数と振幅に対する卵細胞の回転速度を図4に示す。回転速度は、周波数  $500kHz$  で最大となり、振幅に対しては単調に増加する。印加電圧の振幅によって回転速度を調整でき、目視で十分確認できるほど遅い速度でも回転させることが可能であった。このことより、この手法は卵細胞の回転操作に適していることが明らかとなった。

### 2.2. 卵細胞の受精能・発生能に与える影響

静電気力による回転操作が、卵細胞の受精能および発生能に与える影響を検討する必要

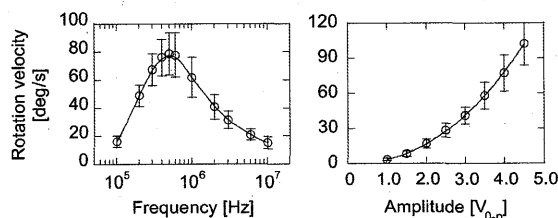


図4 印加電圧の周波数(左、振幅  $4V_{0-p}$ )、振幅(右、周波数  $500kHz$ )に対する、マウス卵細胞の回転速度。

がある。そこで、静電気力によって回転させた卵細胞に、体外受精 (In vitro fertilization: IVF) または核移植を行い、その発生状況を確認した。その結果を表 1 に示す。IVF に関しては、受精率、卵割率、発生率の全てにおいて、回転させた卵細胞とコントロールの間に統計的に有意な差は見られなかった。したがって、静電気力による回転操作は、卵細胞の受精能・発生能に影響を与えないと結論付けられる。核移植に関しては、融合率、卵割率については有意な差は見られない。発生率に関しては、発生した卵細胞の絶対数が静電気力で回転させたものが 2、コントロールが 7 と少なく、統計的な判断をすることは難しいが、静電気力による回転操作の後にも、発生することは確認できた。

表 1 IVF(上), 核移植(下)の結果 ("Developed"は Morula の段階まで発生した卵細胞の数を示す)。

	Total	Fertilized	Cleavage	Developed
Rotated	50	86.0%(43/50)	83.7%(36/43)	60.5%(26/43)
Control	30	86.7%(26/30)	69.2%(18/26)	57.7%(15/26)

	Total	Fused	Cleavage	Developed
Rotated	88	65.9%(58/88)	82.8%(48/58)	3.4%(2/58)
Control	82	70.7%(58/82)	86.2%(50/58)	12.1%(7/58)

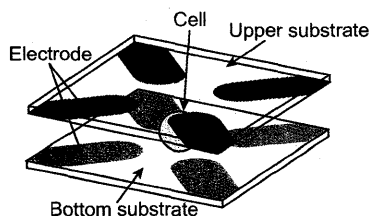


図 5 三自由度の回転を実現する電極配置。

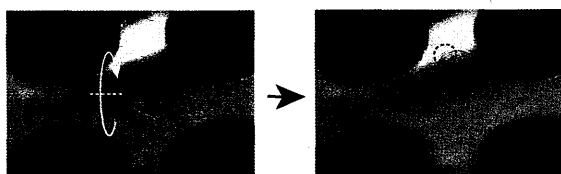


図 6 立体回転の様子 (点線で囲んだ極体が移動している様子が確認できる)。

### 2.3. 三自由度の回転操作

図 5 に示すように、2 枚の電極基板を上下に重ね合わせ、それらの電極に交流電圧を印加することによって立体的に回転する電界を発生させ、卵細胞を立体的な三自由度に回転させることに成功した。図 6 にマウス卵細胞の立体的な回転の様子を示す。印加電圧は周波数 500kHz、振幅  $3.0V_{0-p}$  である。

### 3. レーザ加熱による in-situ 微細加工技術

図 1 に示した細胞ハンドリングシステムでは、微細ピペットを細胞の操作に用いた後に退避させ、その状態で細胞の周囲に微細構造を作製する必要がある。そこで本研究において、生体適合性の高いパラフィンレーザ加熱によって変形させる加工技術を新たに開発した。この加工法は、液体中のパラフィンにレーザを照射すると、融解したパラフィンが凸状に成長するという興味深い物理現象を利用している。実験には、波長 1064nm の Nd:YAG レーザを用いた。

#### 3.1. 加工原理の実験的検証

図 7 に、形成される微細構造の生成過程を示す。まず、レーザ加熱によってパラフィンが局所的に融解し(a)、膨張する(b)。その後、融解した部分は液体中を凸状に成長する(c)。レーザの遮断に伴って、融解していた部分が固化する(d)。生成過程の中で最も興味深い部分である、レーザ加熱によって融解したパラフィンが液体中を凸状に成長するメカニズムを実験的に検証した。

水中でのパラフィンの突起の形成過程を観察した結果、突起の先端のみが変形し、また突起の内部に流路状のものが確認された (図 8)。また、空気中や、水よりも熱伝導率が低い液体中でレーザをパラフィンに照射すると高アスペクト比の突起状の構造は形成されなかった。これらの結果から、成長中の突起の液体に接している部分は液体への放熱によって固化するが、その内部はレーザによる加熱で融解された状態を保持して膨張を続けることで、突起が成長するということが示された。

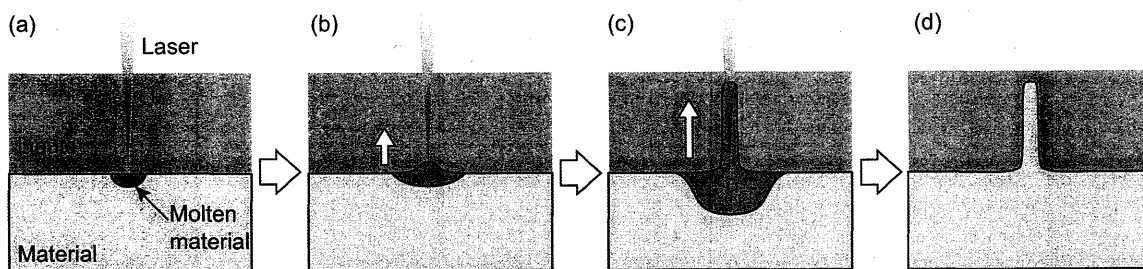


図7 レーザ加熱によって形成される微細構造の生成過程。



図8 生成中の突起。(a)画像。(b)線画。

### 3.2. 本加工法の応用

本加工法は、液体の上にレーザを透過するカバーをかぶせても、加工材料を加工することができる。そこで、パラフィンとガラスカバーの間に水を満たした空間内で、微細構造を作製することを試みた。図9(a), (b)に作製した微細構造を示す。このように、細胞の囲い(a)や、流路(b)のような微細構造を作製することが可能である。また、形成される微細構造はガラスカバーと接合することが確認されており、微細チップの密封にも利用できる可能性が示された。

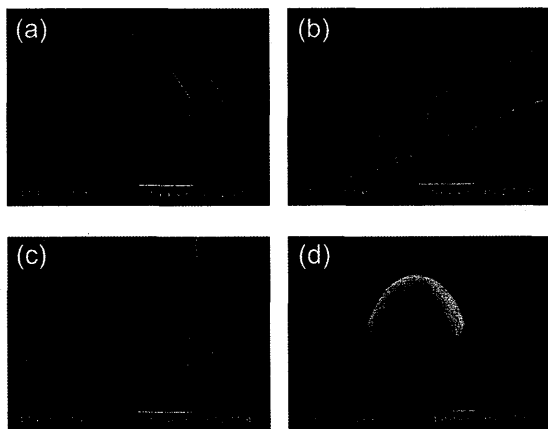


図9 本加工法で作製された微細構造の例。

本加工法は、レーザの照射方法によって、柱、壁、傾斜した柱、円錐など様々な形状の微細構造を作製することが可能である。また、それらの形状は、レーザの出力や照射時間、走査速度、走査回数などで制御することができる。また、本加工法は熱可塑性の材料の加工に応用できる。その一例として、汎用的なプラスチック材料であるポリエチレンを加工することを試みた。その結果、ポリエチレンから突起状の微細構造を作製することに成功した。図9(c), (d)に、本加工法で作製した微細構造の例として、パラフィンの柱とポリエチレンの突起をそれぞれ示す。

### 4. まとめ

本研究では、微細ピペットによる細胞操作と微細チップを併用する細胞ハンドリングシステムの構築を目指し、その要素技術である、静電気力による細胞の回転操作技術、およびレーザ加熱を利用した in-situ 微細加工技術に関して研究を行った。静電気力を用いて、卵細胞の3自由度の回転操作を実現した。また、この操作は卵細胞の受精能・発生能に影響を与えないことを示した。本研究で新たに開発したレーザ加熱による in-situ 加工技術によって、微細チップ内のような密閉された空間の中で、パラフィンから流路やチャンバーのような形状を作製できることを可能とした。