

微細加工技術を用いた オンチップ細胞計測システムの開発

Use of Microfabrication Technology for the
Development of On-chip Cell-based Systems

2011 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

生命理工学専攻 実験生物物理学研究

服部 明弘

目次

| | |
|--|----|
| 目次 | 1 |
| 第1章 序論 | 4 |
| 1. 1 研究の背景と目的：微細加工技術を用いたオンチップ細胞計測技術の開発 | 4 |
| 1. 2 本論文の構成 | 7 |
| 第2章 オンチップ細胞計測を実現するための微細加工技術 | 8 |
| 2. 1 序論 | 8 |
| 2. 2 微細加工装置および手法 | 9 |
| 2. 2. 1 レーザ描画装置 | 9 |
| 2. 2. 2 スピンコーター | 11 |
| 2. 2. 3 コンタクト式露光装置 | 11 |
| 2. 2. 4 プラズマエッチング装置 | 12 |
| 2. 2. 5 抵抗加熱式蒸着装置 | 13 |
| 2. 3 微細加工のプロセス | 14 |
| 2. 3. 1 ガラスエッチングによる微細加工 | 14 |
| 2. 3. 2 高分子の構造体構築による微細加工 | 14 |
| 2. 3. 3 アガロース微細加工 | 14 |
| 2. 4 第2章のまとめ | 15 |
| 第3章 光硬化性樹脂で作成したマイクロチャンバーを用いた遊泳細胞の運動計測 | 22 |
| 3. 1 序論 | 22 |
| 3. 2 装置および方法 | 24 |
| 3. 2. 1 実験装置 | 24 |
| 3. 2. 2 方法 | 25 |
| 3. 3 結果 | 30 |
| 3. 3. 1 高分解能レンズを用いた細胞の観察 | 30 |
| 3. 3. 2 大腸菌の運動解析 | 30 |
| 3. 3. 3 大腸菌の壁に対する反応の解析 | 31 |
| 3. 3. 4 孤立大腸菌一細胞連続解析による、細胞状態の変化の追跡 | 32 |
| 3. 4 考察 | 33 |
| 3. 5 第3章のまとめ | 34 |
| 第4章 微小流路と高速画像認識技術を用いたオンチップ・セルソーターの開発 | 41 |
| 4. 1 序論 | 41 |
| 4. 2 装置および方法 | 44 |
| 4. 2. 1 オンチップ・セルソーター | 44 |
| 4. 2. 2 セルソーティングチップ | 44 |

| | | |
|---------|-----------------------------------|-----|
| 4. 2. 3 | 画像認識によるソーティングの原理 | 48 |
| 4. 2. 4 | チップ内培養を可能にするメンブレンフィルターの評価 | 49 |
| 4. 3 | 結果 | 52 |
| 4. 3. 1 | チップデザインの検討 | 52 |
| 4. 3. 2 | 微小流路中の脈流のないサンプル駆動力の発生 | 53 |
| 4. 3. 3 | アガロースゲル電極 | 56 |
| 4. 3. 4 | 画像認識に基づいた細胞分離 | 58 |
| 4. 3. 5 | 顕微観察光学系における被写界深度の拡大 | 63 |
| 4. 3. 6 | 1/2,000 秒リアルタイム画像処理によるソーティングの高速化 | 66 |
| 4. 3. 7 | メンブレンフィルター付リザーバー内での細胞培養 | 71 |
| 4. 4 | 考察 | 73 |
| 4. 4. 1 | ゲル電極について | 73 |
| 4. 4. 2 | 細胞画像の像質改善について | 74 |
| 4. 4. 3 | 1/2,000 秒オンチップ・セルソーターの課題 | 74 |
| 4. 4. 4 | 1/10,000 秒ソーティング実現に向けての検討 | 75 |
| 4. 4. 5 | 高速ソーティングにおける層流の維持について | 76 |
| 4. 5 | 第4章のまとめ | 78 |
| 第5章 | 赤外レーザを用いたアガロース培養チップへの三次元微細加工技術の開発 | 118 |
| 5. 1 | 序論 | 118 |
| 5. 2 | 装置および方法 | 120 |
| 5. 2. 1 | 1064/1480 nm 二波長レーザ集束光加熱加工装置 | 120 |
| 5. 2. 2 | 1064/1480 nm 二波長レーザ集束光加熱加工の原理 | 120 |
| 5. 2. 3 | 集束光加熱による細胞培養用マイクロチャンバーの加工 | 121 |
| 5. 2. 4 | 海馬初代培養細胞の調製 | 122 |
| 5. 2. 5 | 培養液の構成と培養環境 | 123 |
| 5. 3 | 結果 | 124 |
| 5. 3. 1 | 集束光加熱加工 | 124 |
| 5. 3. 2 | 1480 nm レーザ照射における溶解点の径のレーザ出力依存性 | 124 |
| 5. 3. 3 | 溶解点の径の時間依存性 | 125 |
| 5. 3. 4 | アガロースマイクロチャンバーチップにおける三次元構造 | 125 |
| 5. 3. 5 | 集束光加熱加工法による海馬細胞の神経突起結合の方向性制御 | 126 |
| 5. 4 | 考察 | 129 |
| 5. 4. 1 | アガロース微細加工技術の既存の微細加工技術に対する利点 | 129 |
| 5. 4. 2 | アガロースマイクロ構造の段階的構築法の開発と課題 | 129 |
| 5. 5 | 第5章のまとめ | 131 |
| 第6章 | 本研究のまとめと今後の展望 | 141 |

| | | |
|---------|----------------------|-----|
| 6. 1 | 本研究のまとめ..... | 141 |
| 6. 2 | 今後の展望..... | 143 |
| 6. 2. 1 | オンチップ・セルソーター..... | 143 |
| 6. 2. 2 | 二波長赤外レーザ集束光加熱装置..... | 143 |
| 6. 3 | 最後に..... | 144 |
| | 謝辞..... | 145 |
| | 参考文献..... | 146 |
| | 研究業績..... | 152 |

第1章 序論

1. 1 研究の背景と目的：微細加工技術を用いたオンチップ細胞計測技術の開発

細胞は、その自己複製能力、遺伝情報の保持や伝承能力、そして環境との相互作用によって獲得した情報の保持能力を持つ最小構成単位である。細胞の研究を技術的観点から見ると以下のような歴史で発展してきたことがわかる。17世紀にロバート・フックが原始的な顕微鏡を用いて細胞を発見して以来、細胞に関する数多くの研究がなされてきたが、今日においても顕微鏡を使って細胞を観察することは、研究を進める上で欠くことのできない研究手法となっている。それは、例えば細胞の大きさや形がどれだけ変化したか、細胞がどれだけ移動したか、細胞がどのような状態にあるかなど、細胞に関する数多くの「時空間」情報が、細胞を直接「見る」ことで得られるからである。顕微鏡はその登場以来絶え間ない改良が加えられ、現在では明視野観察以外にも位相差観察法[1-3]や微分干渉観察法、偏光観察法、蛍光観察法、共焦点蛍光観察法、二光子励起蛍光観察法[4]など複数種の観察法の中から目的のサンプルに適した観察法を選択できるようになっている。また蛍光観察法で用いる蛍光染色試薬についても、細胞の部位や状態によって異なる色を呈するものや光刺激によって蛍光色が変わるもの[5]などが数多く開発されており、フックの時代とは比較にならないほど顕微鏡から多くの細胞情報を得ることができるようになっている。

しかしながら、上記のような光学観察技術に対しては目を見張るような多くの研究者の注力があつたが、実際に観察する対象をどのように顕微鏡の試料台の上で扱うか、ということについては、従来からフラスコやカルチャーディッシュ中で分散培養した細胞の集団を用いて実験を行うことが主流であつた。このため、分散培養された細胞の評価では細胞ごとの違いに着目することもなく、集団を構成する細胞はすべて同一のものと

して扱われるため、得られるデータはどうしても平均化されたものになってしまうという問題があった。また、これらの技術は分析的アプローチの範疇にあるものであったため、単に細胞をあるがままに観察するだけであり、自然には存在しないようなパターンに細胞を配置することも困難であり、細胞同士がどのように相互作用をしながら活動しているのかを詳細に観察することもできなかった。また、実験に用いる細胞についても課題がある。現在では質の揃った特定の機能を持った細胞を効率よく集めて実験を進めるために、多様な組織や臓器から直接採取した細胞を用いる手法を取るよりも、むしろこれらの細胞をガン細胞との細胞融合によって無限に分裂するモデル化した細胞株を用いることが多い。しかしこれらは細胞をガン化させて作り出したもので細胞周期が正常細胞のそれと異なっており、正常な細胞が本来持っている周辺の細胞との相互作用も持たない。そのため、これら細胞株を用いた場合、細胞本来の状態を計測したとは言い難いのが実情である。したがって細胞の機能や振る舞いを詳細に調べるためには、細胞の質や状態の揃った細胞を組織から効率よく精製することが重要であり、培養環境や他の細胞との相互作用を制御することが必要である。さらに、生体内の臓器や組織のモデル構築のために細胞集団を用いる場合においても、集団を構成する細胞数や空間配置パターンを厳密に制御することも必要である。

そこで上記のような課題を解決するために、従来の技術では十分に検討されてこなかった、細胞集団の構成的な空間配置技術を用いた観察技術、細胞株を用いなくともより精密な細胞精製技術など、一連の新しい一細胞レベルでの細胞操作、観察技術の開発を、主に半導体製造現場で用いられる微細加工技術を用いて行った。これは、微細加工技術の発展によってミクロンオーダーの大きさである細胞の空間配置を厳密に制御できる容器を作ることが可能となったため、本研究は、これを活用してガラスなどの基板上に微細構造物を作成し、その上で細胞計測を行う実験系の構築の試みであるということもできる。こうした微細加工技術を駆使して構築した一連の細胞計測技術の開発を

“オンチップ細胞計測システム”と呼ぶこととした。

この「オンチップ細胞計測システム」を用いて遺伝情報と後天的に獲得された情報を分離して計測することで、遺伝情報と後天的に獲得された情報がそれぞれ細胞表現に与える影響や、後天的に獲得された情報が蓄積される媒体、さらに後天的に獲得された情報の安定性などの細胞が保持し細胞表現を決定している細胞情報の性質を明らかにすることができると考えた。そして、生命が用いている情報の性質を明らかにすることで、生命への理解が深まると考え、後天的情報を理解するための基盤技術開発を目指して本研究を行った。

1. 2 本論文の構成

本論文は、下記の内容から構成されている。第1章では、本研究の背景と目的、および構成について述べる。第2章では、本研究で用いた微細加工技術全般についてまとめる。第3章では、リアルタイム画像処理を用いた遊泳細胞の運動解析についてまとめる。第4章では、微小流路チップと高速画像処理を組み合わせたオンチップ・セルソーターについてまとめる。第5章では、赤外レーザとアガロースを用いた三次元微細構造加工技術についてまとめる。最後に、第6章では本研究全体の成果をまとめた上で、将来展望を述べる。

第2章 オンチップ細胞計測を実現するための微細加工技術

2. 1 序論

フォトリソグラフィに代表される微細加工技術は、シリコンウェハ上に LSI の回路パターンを転写する半導体製造分野の要請で、まさしく日進月歩の進歩を見せている。現在では微細化の程度を示す金属酸化物電界効果トランジスタ (MOSFET) のゲート配線幅が 32 nm で設計・製作されたパーソナルコンピュータ用 CPU が市販されており、さらに次世代の 22 nm 線幅の技術研究が進められている。さらなる微細化のためには光の波長によって解像度の限界が決まってしまう現在のフォトリソグラフィに代わる新技術が必要であるとの見方もあるが、当分フォトリソグラフィが技術の主役であり続けるであろう。一方、ガラスやシリコンウェハ上に微小流路などの微細構造を構築し、化学分析をチップ上で行う技術開発が拡がりを見せており、近年では生物学研究の分野にも展開が進み、バイオ MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) などと呼ばれている。微細化するメリットとしては、使用する試料や試薬の量を節約できる、狭い空間では拡散距離が短くなり反応時間が短縮される、単位体積当たりの表面積が大きくなるため熱交換が効率化される、などが挙げられる。これらの研究においてもフォトリソグラフィ技術が主に使われており、多くの場合マイクロメートル単位の微細構造で充分であるため、比較的安価な装置で実現できる点も普及を後押ししている。

本研究においても、様々な細胞計測のデバイス作成においてフォトリソグラフィ技術を用いた。本章では本研究に用いた微細加工装置、およびこれを用いた手法について述べる。

2. 2 微細加工装置および手法

2. 2. 1 レーザ描画装置

レーザ描画装置とはフォトリソグラフィ工程で必要となるフォトマスクのパターニングを行う装置であり、構成を簡単に説明すると金属顕微鏡の照明光学系の途中に描画用レーザの光学系を挿入し、ステージ部分を自動 XY ステージとしたものである。図 2. 1

(a) に本研究で用いたレーザ描画装置 (DDB-3TH、ネオアーク株式会社) の主要部分を示す。また図 2. 1 (b) に装置写真を示す。本装置では、描画に先立ち、装置に接続された制御用コンピュータに、CAD などで作成したマスクパターンの図面データを読み込ませておき、描画制御ソフトウェアにより自動描画を行う。本装置の場合、描画用レーザは露光レジスト材の感光特性に合わせて波長 405 nm の青紫色半導体レーザを用いており、対物レンズを通してマスクブランク基板表面上に集光される。マスクブランクとは、フォトマスク作成用にあらかじめガラス基板上にフォトレジストが塗布された基板である。

本装置では、装置仕様上の描画可能最小線幅は、50 倍の対物レンズを使用した場合でおよそ 1 μm である。描画用レーザと対物レンズの間には音響光学素子が挿入されており、描画用レーザの出力調整に加え高速なレーザシャッターとして機能する。この音響工学素子によるレーザの on/off と自動 XY ステージの移動によるマスクブランクへのレーザ照射位置走査をコンピュータ制御することで、任意のマスクパターンをマスクブランク上に描画することができる。装置にはもう一つフォーカス補正用の赤色レーザが搭載されている。このフォーカシング用赤色レーザもまた対物レンズを通してマスクブランクに照射されるが、マスクブランク表面からの反射光は位置検出用ダイオード上に投影される光学系となっている。描画中、マスクブランクの反りや自動ステージに用いられている移動ガイドの平行度の精度に応じて、対物レンズとマスクブランクの間の距離は常に変動しているため、対物レンズが固定されていると、描画した線幅が不均一に

になってしまう。そのため、位置検出用フォトダイオードに投影したフォーカシング用赤色レーザの反射光の変位を、三角測量の原理によって対物レンズとマスクブランク間の距離に換算し、対物レンズが取り付けられたフォーカシング用ピエゾアクチュエータを高速に上下動させることで一定線幅の描画ができるように補正する仕組みとなっている。なお、一般にフォトレジストは紫外線に感光するように作られているため、波長 670 nm のフォーカシング用赤色レーザを照射しても同じ箇所に数時間以上照射し続けられない限り感光することはない。

図 2-2 に、レーザ描画装置でマスクパターンの描画が完了したマスクブランクが、最終的にフォトマスクとなるまでの作業工程を示す。本研究では、フォトマスク作成用にクリーンサアフェイス技術株式会社の CBL4006Du-AZP というマスクブランク製品を使用した。マスクパターンの描画からフォトマスク完成までは、大きく分けて（１）マスクパターン描画、（２）現像、（３）クロムエッチング、そして（４）レジスト除去の 4 つの工程から成る。以下に各工程について述べる。

（１）マスクパターン描画：

本研究で用いたマスクブランクは、ソーダガラス基板に遮光層としてクロムを蒸着し、さらにその上にポジ型レジストである AZP1350 を塗布している。上述したレーザ描画装置を用いてマスクパターンの描画を行う。AZP1350 のレジスト層では、描画用レーザを照射した部分で光化学反応が起こり、高分子同士のリンクが切れる。

（２）現像：

マスクブランク基板全体をフォトレジストの現像液（NMD-3、東京応化工業株式会社）に数秒間浸し、レーザ描画した部分を溶出する。

（３）クロムエッチング：

基板全体をクロムエッチング液（MPM-E30、ザ・インクテック株式会社）に数十秒間

浸し、上記の手順で露出したクロム層部分を溶出する。この時、マスクパターンが透けて見えるようになる。

(4) レジスト除去：

基板全体をアセトンに浸し、基板上に残ったレジスト層を除去する。

上記工程によって、フォトマスクが完成する。

2. 2. 2 スピンコーター

スピンコーターは、粘性の高いフォトレジストを基板上に均一な膜厚で塗布するための装置である。図 2-3 (a)、(b) に本研究で使用したスピンコーター（1H-DX2、ミカサ株式会社）の機構部の模式図を示す。また図 2-3 (c) に装置写真を示す。装置機構部は、中空モータとモータの軸に固定された試料台から構成されている。基板へのフォトレジスト塗布の手順は以下の通りである。まず図 2-3 (a) に示すように処理基板を試料台に乗せ、真空ポンプで排気することによって基板を試料台に吸着固定する。次にフォトレジストを基板上に滴下し中空モータを回転させる。すると図 2-3 (b) のように遠心力によって基板上のフォトレジストが放射状に拡がり、均一な膜厚にコートされる。フォトレジストの粘度とモータの回転数の組み合わせでコートされるフォトレジストの膜厚を制御することができ、基板上の余分なレジストは基板を離れ飛散防止カバー内に溜まる。この時、いきなり目標とする回転数で回転させるのではなく、低速から段階的に回転数を上げるようプログラムしておくにより均質なレジスト膜をコートできる。

2. 2. 3 コンタクト式露光装置

コンタクト式露光装置は、レジストを塗布した基板の上に 2. 2. 1 で作成したフォトマスクを重ね合わせ、紫外線などの露光によりフォトマスクパターンをレジストに転写するための装置である。図 2-4 (a)、(b) に、本研究で使用したコンタクト式露光装

置（MA-20、ミカサ株式会社）の主要部分の模式図を示す。また、図 2-4（c）に装置写真を示す。本装置では、露光用光源として 500W の超高圧水銀灯を搭載しており、主に紫外線に反応するレジストへのパターン転写に適している。露光に先立ち、2. 2. 1 で述べたフォトマスクを装置のマスクホルダーに固定し、2. 2. 2 で述べたスピナーでレジストを塗布された処理基板を位置決めテーブル上の試料台に固定する。次にアライメントスコープの接眼レンズを覗きながら位置決めテーブルを操作し、マスクパターンと処理基板の位置合わせを行う（図 2-4（a））。位置決めが完了したらフォトマスクに処理基板を密着させ、アライメントスコープ全体を傾けた後に所定の時間だけ水銀灯の光をマスク越しに処理基板に露光する（図 2-4（b））。露光が完了した処理基板を現像液に浸して余分なレジストを取り除くと、基板上にマスクパターン通りのレジスト構造物が残る。

2. 2. 4 プラズマエッチング装置

プラズマエッチング装置は、基板表面の改質のために反応ガスをプラズマによって活性化し、活性化ガスとして基板表面と反応させるための装置である。図 2-5（a）に、本研究で使⽤したプラズマエッチング装置（FA-1、株式会社サムコインターナショナル研究所）の試料チャンバー部分の模式図を示す。また、図 2-5（b）に、装置写真を示す。試料チャンバー内は処理基板を乗せる平面電極（カソード）と対向電極（アノード）が向かい合うように配置されている。試料チャンバー内を真空にした後、反応ガスを導入して平面電極および対向電極間に高周波電圧を印加すると電極間にプラズマが発生する。反応ガスが電離して生じたプラスイオンが陰極である平面電極側に引き寄せられることで、活性ガスによる処理基板へのエッチングが可能になる。反応ガスとしてフッ化物ガスである CF_4 を用いることで、シリコンウェハなどの表面を実際にエッチングすることが可能であるが、本研究では反応ガスとして酸素ガスを用い、レジストなどとガ

ラス基板との密着性を高めるための表面の親水化処理のために用いた。

2. 2. 5 抵抗加熱式蒸着装置

基板表面に金属薄膜などをパターン化するためには、一般に抵抗加熱などによって真空中で金属や誘電体などの蒸着材料を蒸発させ、これを基板表面に蒸着する。図 2-6(a)に、本研究で用いた抵抗加熱蒸着装置 (KE208K-70LPT 型、株式会社ケーサイエンス) における蒸着原理を示す。また、図 2-6 (b) に装置写真を示す。蒸着手順は以下の通りである。蒸着材料をるつぼ状のタングステンバスケットに入れ、ベルジャー上部に処理基板を固定しておく。次にベルジャー内を 10^{-6} Torr 前後の真空中にし、タングステンバスケットに 40A 程度の電流を流し蒸着材料を加熱する。蒸着材料が溶解して蒸発を始めたところで処理基板手前のシャッターを開け、蒸着材料の蒸気を処理基板上に堆積させて成膜する。処理基板付近には膜厚計として水晶振動子が設置されており、振動子上への蒸着材料の堆積による共振周波数の変化を測定することで蒸着された膜厚を知ることができる。希望の膜厚になったところでシャッターを閉じれば不要な蒸気の堆積を防ぐことができ、数 nm 単位で膜厚を制御することが可能である。本研究では、ガラス基板へのクロム膜蒸着のために用いた。

2. 3 微細加工のプロセス

本研究では、ミクロンオーダーでの微細加工によって作った微細空間を利用した細胞ベースでの研究を行うために、上記2. 2で述べた一連の装置を用いた。実際の微細加工では、上記装置を、その手段に応じて柔軟に活用して微細加工を行なった。以下に、いくつかの手段について簡単に述べる。

2. 3. 1 ガラスエッチングによる微細加工

ガラスエッチングを用いた微細加工では、フォトマスクに露光用高分子層と、この下のクロム等の金属層をエッチングマスクとして用いる。そのために、ガラス基板上にクロム薄層を蒸着し、この上に現像用高分子をスピコートする。エッチングしたい場所を露光し（ポジティブマスクの場合）、現像によって高分子層を除去した後に、まず、金属層をエッチングする。次に、ガラス層をエッチングする。ガラスエッチングが終了したところで高分子層および金属層を除去して、微細加工を行ったガラス基板を得る。

2. 3. 2 高分子の構造体構築による微細加工

平坦なガラス基板上に高分子を希望する立体構造の高さになるように、スピコーターでコートする。次に、露光装置を用いて高分子を露光し、光が当たった部分のみが重合するようにする。最後に、現像液で重合しなかった部分を除去することで、立体構造を得る。

2. 3. 3 アガロース微細加工

第5章で詳しく述べるが、ガラス基板（あるいは培養プラスチックシャーレ）上に、スピコーターによって一定の希望する厚さとなるようにアガロースを塗布する。その後、赤外集束光によってアガロース層を希望する形状にエッチングする。

2. 4 第2章のまとめ

本章では、本研究の微細加工で用いた一連の微細加工装置を概説するとともに、その一般的な使い方について概要を述べた。実際の本技術の具体的な目的に応じた利用の詳細については、後述する各章で解説する。

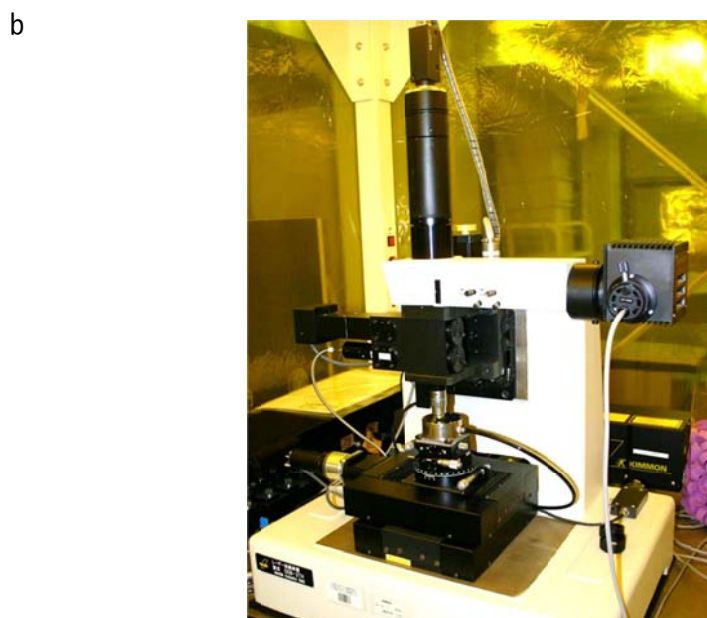
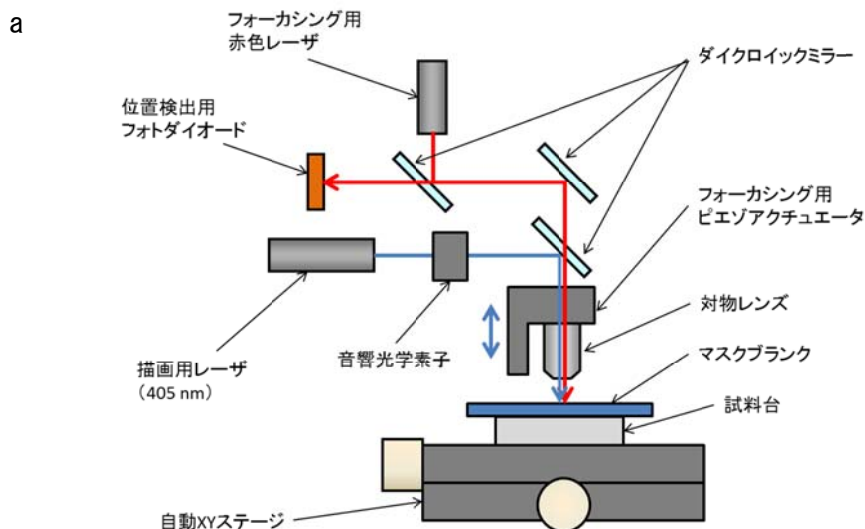


図 2-1 レーザ描画装置。(a) レーザ描画装置の装置構成図。波長 405 nm の描画用レーザーは対物レンズを介してマスクブランク上に集光される。同時にマスクブランク上に照射されるフォーカシング用赤色レーザーの反射光は、位置検出用フォトダイオード上に投影されピントの変動による変位を、対物レンズが取り付けられたフォーカシング用ピエゾアクチュエータが高速に補正することで描画用レーザーが露光する線幅を一定に制御する。音響光学素子は描画用レーザーの強度変調を高速に行い、事実上のレーザーシャッターとして機能する。音響光学素子によるレーザーの on/off と自動 XY ステージの移動によって任意の描画パターンをマスクブランク上に露光することができる。(b) 本研究で使
用したレーザー描画装置。

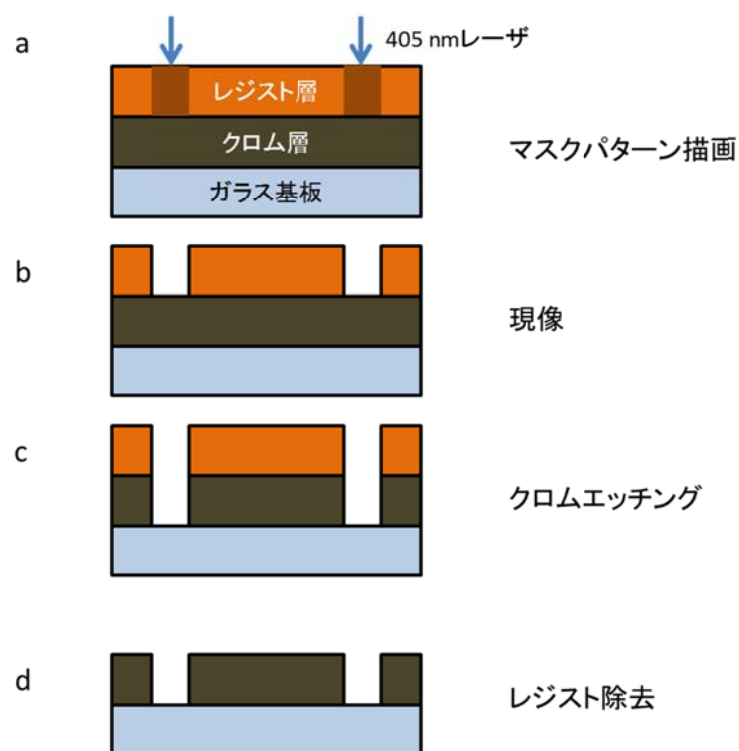


図 2-2 フォトマスクの作成工程。露光前のマスクブランクは、ガラス基板上に蒸着されたクロム層とその上にコートされたレジスト層から構成されている。(a) 405 nm レーザを照射した部分のレジスト層が感光する。(b) 現像液にマスクブランク基板を浸し、感光した部分のレジスト層を溶かす。(c) 基板をクロムエッチャント液に浸し、レジスト層の溶出により露出した部分のクロム層をエッチングする。(d) 基板をアセトンに浸し、基板上に残ったレジスト層すべてを除去してフォトマスクが完成する。

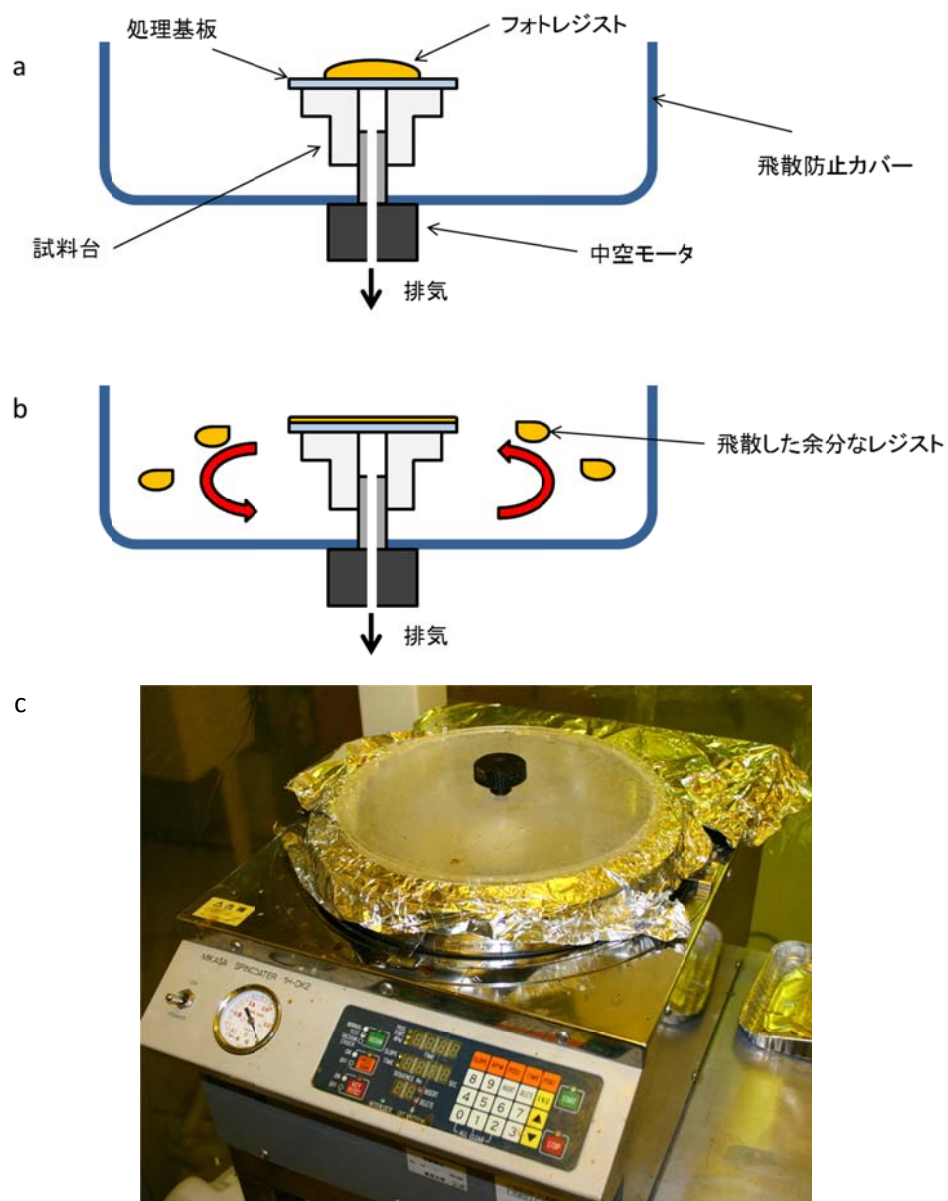


図 2-3 スピンコーター。(a) フォトレジストを塗布したい基板を試料台に乗せ、真空ポンプによって試料台に吸着固定する。基板上にフォトレジストを滴下する。(b) 中空モータによって試料台を高速回転させると、遠心力によってフォトレジストが回転数に応じた一定の膜厚で基板に塗布される。(c) 本研究で使用したスピンコーター。

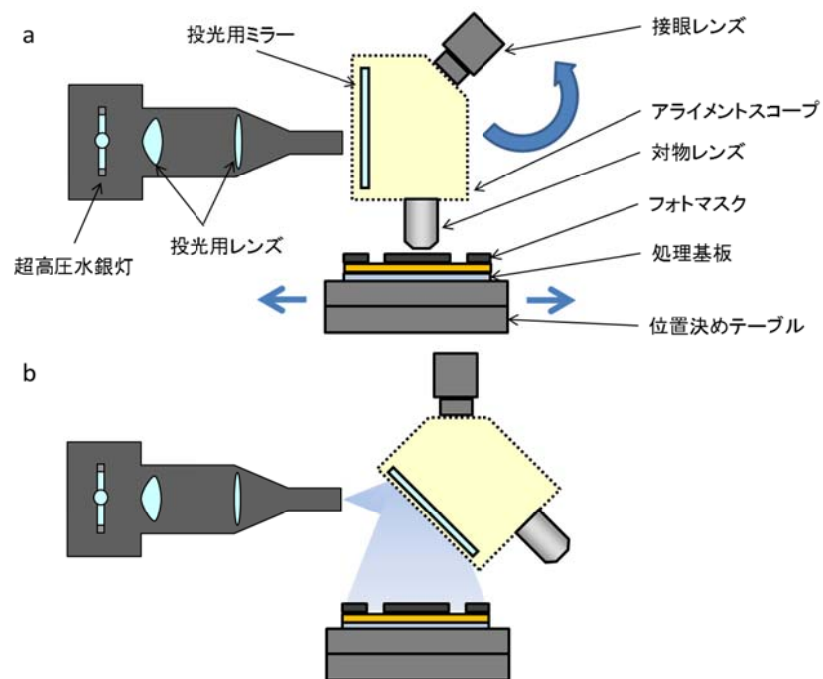


図 2-4 コンタクト式露光装置。(a) フォトマスクを露光装置に、フォトレジストが塗布された処理基板を位置決めテーブルにそれぞれ固定した後、アライメントスコープに取り付けられた接眼レンズを覗きながら位置決めテーブルを動かしてフォトマスクとの位置合わせを行う。(b) フォトマスクと処理基板を密着させた後アライメントスコープ全体を傾け、超高圧水銀灯の紫外光を投光用ミラーに反射させて露光する。(c) 本研究で使用した露光装置。

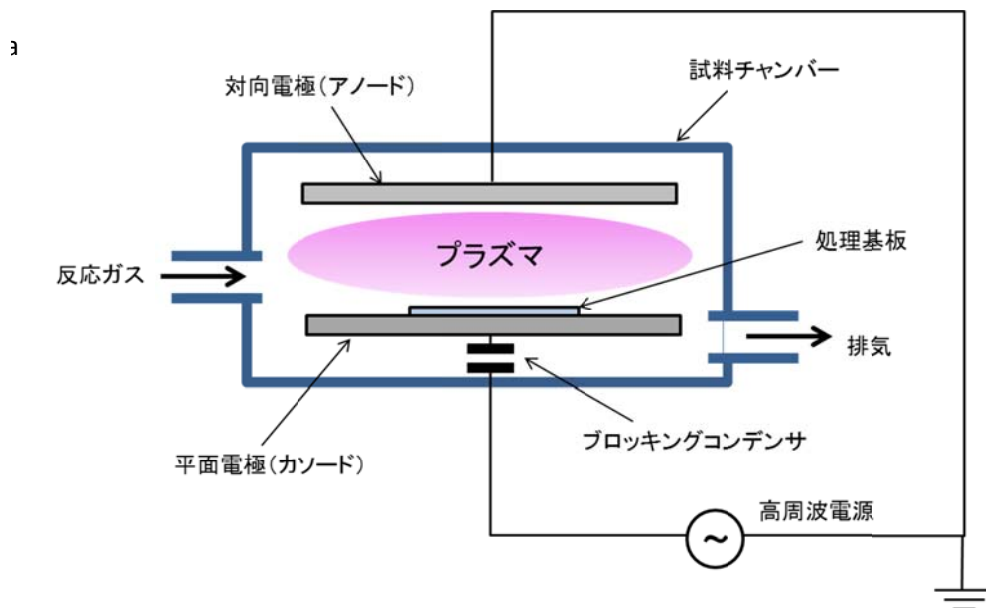
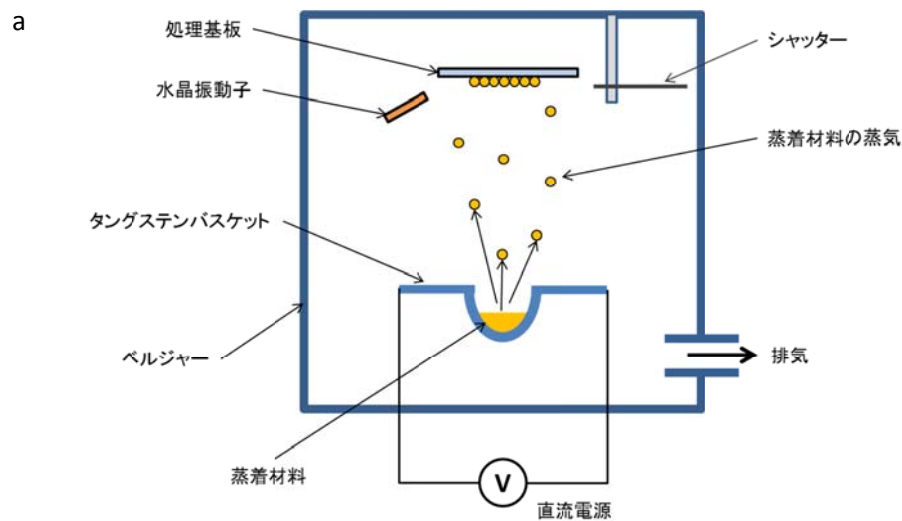


図 2-5 プラズマエッチング装置。(a) 試料チャンバーの模式図。試料チャンバー内を真空にした後に反応ガスを導入し、平面電極と対向電極間に高周波電圧を印加すると電極間にプラズマが発生する。プラズマ中の電子は、活性ガスであるプラスイオンに比べて軽く動きが速いため、対向電極と平面電極にすぐに集まる。集まった電子は、対向電極ではアースに接続されているために電位は変わらないが、平面電極はブロッキングコンデンサによって直流の電流が遮断されてしまうため平面電極に電子が溜まりマイナス電位になる。この陰極降下のマイナス電位により、プラズマ中の活性ガスであるプラスイオンが引かれて、ウエハ表面に垂直に入射するため異方性エッチングが行われる。(b) 本研究で使用したプラズマエッチング装置。



b



図 2-6 抵抗加熱蒸着装置。(a) 抵抗加熱法による蒸着原理。蒸着作業に先立ち、成膜したい処理基板をベルジャー上方に設置し、蒸着材料をタングステンバスケットに入れバスケットの両端を直流電源の回路にしっかり固定する。この時、処理基板手前のシャッターを閉じた状態にしておく。その後ベルジャー内を真空引きし、真空度が $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Torr 程度に到達したらタングステンバスケットに数十 A の電流を流し、蒸着材料が溶け始めたら水晶振動子の膜厚計を見ながら蒸着材料に合った成膜速度になるよう電流量を調整する。最適な成膜速度になったことを確認したらシャッターを開け、必要な膜厚に到達したところでシャッターを閉じる。(b) 本研究で使用した蒸着装置。

第3章 光硬化性樹脂で作成したマイクロチャンバーを用いた遊泳細胞の運動計測

3. 1 序論

細胞は、物理的あるいは化学的な周辺環境の変化に対し何らかの応答を示す。細胞が環境の変化に対して示す応答という形で現れる「適応」という現象は、細胞が環境変化の中でも生存してゆくための最も重要な過程の一つである。特に遺伝子の理解からつながる「決定論」の考え方が細胞の階層にあってどこまで示されるのか、単純な細胞のなるべく単純な機械的応答に的を絞って理解を進めることは、「細胞」の応答が遺伝子によって一意的に決まっているものなのか、外界との相互作用によって柔軟に決められるものなのか、またその柔軟性はどれほどのものなのかなどを理解するためにも非常に重要な課題である。この仕組みを理解するためには、特定の細胞に注目してこの細胞への外的刺激を確認しながら、かつその応答を詳細に長期間観察し続ける必要がある。しかしながら通常は細胞集団の測定によって得られた平均的な結果をもとに議論されている[6-13]ために、このような個別の細胞の応答の時間変化を集計して行われた例は存在しなかった。したがって、特定の細胞に変化が生じたのかどうかを個別に確認することは困難であった。この問題を解決しようと、細胞を直接観察することによっていくつかの研究が行われてきた[14-16]が、細胞運動（遊泳など）のために長期にわたって観察することは困難であった。しかし、最近になってガラス基板などのチップ上に作成したマイクロチャンバーによって一細胞単位の長期培養計測が可能な技術が開発されている[17-19]。

これら一連のオンチップー細胞計測技術によって、一定の環境下にある特定の一細胞に生じる変化を直接観測できるようになったが、特定の細胞の運動そのものに着目して

その運動を計測することはなお不可能であった。そこで、特別に設計したマイクロチャンバーと、リアルタイム画像処理技術とを用いて、上記のオンチップー細胞培養計測技術を改良することを試みた。

本章では、微細加工技術で作成したマイクロチャンバーを用いて、遊泳する細胞が障害物に対してどのような反応を示すかを長期間の直接観察によって計測した結果について述べる。

3. 2 装置および方法

3. 2. 1 実験装置

図 3-1 に、遊泳細胞の計測用に開発したオンチップ培養システムの構成を示す。このシステムは、主に以下の 3 つの部分で構成されている。すなわち、1) 厚さ 0.2mm のカバーガラス上に $5\mu\text{m}$ の高さとなるようにフォトリソで作成したマイクロチャンバーアレイ、2) 60 倍の対物レンズを備え、撮影用に CCD カメラ (CS230、オリンパス株式会社) を取り付けけた位相差顕微鏡 (IX70、オリンパス株式会社)、そして、3) 画像入力ボード (IMAQ PCI-1409、日本ナショナルインスツルメンツ株式会社) を内蔵した画像処理用コンピュータの 3 つである。CCD カメラの画像はビデオデッキを経由して画像入力ボードに接続し、ビデオデッキへの録画とコンピュータでの画像解析を並行して行うことができるようにした。

図 3-2 (a) に示すように、マイクロチャンバーアレイは微細な構造物 (マイクロチャンバー) がカバーガラス上に 10×10 個のマトリックス状に配置されたガラス基板である。マイクロチャンバーは光硬化性樹脂 (SU-8 5、日本化薬株式会社) で作製され、観察対象の細胞を孤立させ、他の細胞とのコンタミネーションを避けながら観察できるようにしたものである。細胞をチャンバー内に閉じ込めるために半透膜でシールした。また、マイクロチャンバーアレイ全体を覆うように容積 1 ml でガラス製のカバーチャンバーを貼り付け、2 カ所ある継ぎ手を培養液の入口側、出口側とすることでマイクロチャンバー内の培養液の交換ができるようにした。培養液の送液にはペリスタルティックポンプを用いた。細胞を孤立させて光硬化性樹脂の囲いの中に閉じ込めることで、チャンバー内で遊泳する細胞を顕微鏡の観察視野内で長時間観察することができる。上述した通り、マイクロチャンバーアレイの壁の高さは $5\mu\text{m}$ としたが、これは 60 倍の対物レンズを用いて細胞を観察した時の被写界深度がおおよそ $5\mu\text{m}$ であることと、平均的な細胞長より浅い高さの空間を用いることで、細胞がこの空間内を 2 次元平面として移動

するようにという観点から、細胞の運動を長期間ピントの合った状態で観察可能な領域の高さとして決定した。マイクロチャンバーの大きさについても、顕微鏡の倍率と CCD カメラのイメージセンサの大きさで決まる視野にちょうど収まるよう $115\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ とした。一方、マイクロチャンバーの上方へ細胞が脱出しないようにするために、図 3-2 (b) に示すような半透膜の蓋でマイクロチャンバーアレイ全体をシールした。半透膜とカバーガラスとの密着性を高めるために、事前に半透膜側をアビジンで、マイクロチャンバーアレイ側をビオチンでそれぞれコートしておき、アビジン-ビオチンの結合反応を利用した。マイクロチャンバーの領域に対してマイクロチャンバーの高さが僅かであるため、マイクロチャンバー内で半透膜がカバーガラスに張り付かないようにちょうどテントの支柱のように、マイクロチャンバー内の 2 カ所に光硬化性樹脂の支持体を設置した。この半透膜のポアサイズは細胞の大きさに対して充分小さいため、細胞自体はマイクロチャンバー内に留めながら半透膜を通して培地交換が可能である。

3. 2. 2 方法

3. 2. 2. 1 マイクロチャンバーの作成方法

マイクロチャンバーは、フォトリソグラフィ技術を用いて作製した。作製にはフォトマスクを作製した後に光硬化性樹脂のガラス基板へのパターニングという二段階で行った。下記に本研究における作業手順を述べる。

(1) フォトマスクの作製：

- ① マイクロチャンバーアレイのパターンを二次元 CAD ソフトウェアで描き、図面データを元に 2. 2. 1 で述べたレーザ描画装置 (DDB-8TH、ネオアーク株式会社) に読み込ませ、ガラス基板上にクロム層、さらにその上にレジストが塗布されたマスクブランク基板 (CBL4006Du-AZ、クリーンサアフェイス技術株式会社) 上にマイクロチャン

バーアレイのパターンを 405 nm レーザで描画した。

- ② マスクブランク基板を現像液（NMD-3、東京応化工業株式会社）に浸し、描画された部分を溶かした後超純水で洗浄した。
- ③ マスクブランク基板をクロムエッチング液に浸し、レジストが除かれて露出した部分のクロム層を溶かした。
- ④ 基板全体をアセトンに浸し、基板上に残ったレジストをすべて除いた後超純水で洗浄した。

（2）光硬化性樹脂のパターニング

- ① 洗浄済みのカバーガラス上に光硬化性樹脂（SU-8 5、日本化薬株式会社）を 2 ml 滴下し、2. 2. 2で述べたスピンコーター（1H-DX2、ミカサ株式会社）を用いて膜厚が 5 μm となる条件、500 rpm で 5 秒間、続いて 3,000 rpm で 30 秒間回転させ、均一な光硬化性樹脂の薄膜を作製した。
- ② 上記①で作製した基板を 65°C に設定したホットプレート上に 1 分間、次いで 95°C に設定した別のホットプレート上に 3 分間乗せて加熱し、余分な溶媒を揮発させた。
- ③ 次に 2. 2. 3で述べたコンタクト式露光装置（MA-20、ミカサ株式会社）を用い、②の基板にフォトマスクを密着させて高圧水銀灯の i 線（365 nm）120 mJ/cm² の条件で露光した。
- ④ 光硬化性樹脂の架橋反応を促進するために、65°C のホットプレート上に 1 分間、次いで 95°C のホットプレート上に 1 分間乗せて加熱した。
- ⑤ 光硬化性樹脂用の現像液（SU-8 Developer、日本化薬株式会社）に④の基板を 1 分間浸し、露光されなかった部分の光硬化性樹脂を溶解して除いた後、2-プロパノールで現像液を洗い流し、さらに超純水ですすいでエアブローで乾燥させた。

3. 2. 2. 2 アビジン-ビオチン結合を用いたシーリング

アビジン修飾された半透膜とビオチン修飾されたマイクロチャンバーアレイ基板を作製し、アビジン-ビオチン結合を利用して半透膜とマイクロチャンバーアレイ基板を接着した。図 3-3 に、アビジン-ビオチン結合を用いた半透膜とマイクロチャンバーアレイ基板との接着方法を示す。また、以下にアビジン修飾された半透膜およびビオチン修飾された基板の作製方法を示す。

(1) 半透膜へのアビジン修飾：

半透膜 (Spectra/Por Membrane MWCO: 25,000, Spectrum Laboratories, Inc.) を純水で洗浄した後 5 cm 四方の大きさに切った。洗浄された半透膜を 0.2 M NaIO₄ 水溶液に 5 時間浸し、セルロースの水酸基を酸化させることによりアルデヒド基を生じさせた。反応させた半透膜を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 2 回洗浄し、15 µg/ml streptavidin hydrazide (PIERCE) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) と反応させた。ここでアルデヒド基は pH 4-6 で一級アミンと反応して Schiff 塩基を形成する。1 時間反応させた後、半透膜を純水で洗浄し、4°C で保存した。

(2) マイクロチャンバーアレイ基板へのビオチン修飾：

洗浄・乾燥させたカバーガラスを 25 °C で 1 % 3- (2-aminoethylaminopropyl) trimethoxysilane 水溶液に 30 分間浸し、その後 140 °C で 30 分間乾燥させることでガラス基板表面をアミノ基で修飾した。続いて、水中で超音波洗浄することで表面に残った未反応の 1 % 3- (2-aminoethylaminopropyl) trimethoxysilane を取り除き、基板を乾燥させた。表面処理されたガラス基板上に、3. 2. 2. 1 で述べた光硬化性樹脂製のマイクロチャンバーアレイを作製した。このマイクロチャンバーアレイ基板を 1 mg/ml EZ-Link NHS-LC-Biotin を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に 10 分間浸し、

基板表面をビオチンで修飾した。最後に基板を純水で洗浄し、室温で乾燥、保存した。

(3) アビジン修飾された半透膜とビオチン修飾されたマイクロチャンバーアレイ基板との接着：

サンプルのガラス基板への非特異的な吸着を防ぐために、サンプルを加える前に 10 % (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液を用い、マイクロチャンバーアレイ基板の表面を BSA でコートした。続いて、培養観察したいサンプルをマイクロチャンバーアレイ基板にあるマイクロチャンバーアレイに 5 μ l 滴下した。アビジン修飾された半透膜を 2~5 mm 四方の大きさに切り、半透膜についた余分な水分を濾紙で除いた後マイクロチャンバーアレイ上に載せた。半透膜とマイクロチャンバーアレイ基板についた余分な水分を濾紙で吸い取り、十分な接着力を得るために室温で 5 分間放置した。

3. 2. 2. 3 サンプルの調整

遊泳細胞のサンプルとして、大腸菌の W2252 株変異体を用いた。サンプルチューブに分注した Luria-Bertani (LB) 培地内に、グリセロール凍結保存した大腸菌を添加し、室温 (25°C) 中で十分に成長させた。次にこの中から 50 μ l を取ってサンプルチューブに分注した新たな LB 培地 1mL 中に添加し、室温中で 4 時間振とう培養した。それからこの培養液を、カバーガラス上のマイクロチャンバーに 1 つずつ細胞が配置されるよう適切な濃度に希釈した。この希釈された培養液 5 μ l をビオチン修飾したマイクロチャンバーアレイ上に乗せ、アビジン修飾した半透膜でシールした。次に、フレイムシール (Frame-Seal™ 25 μ l、バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社) をマイクロチャンバーアレイを囲むように貼り、その上にカバーチャンバーを貼り付け固定した。カバーチャンバーの継ぎ手にシリコンチューブをつなぎ、一方を新鮮な LB 培地の入ったメディアウム瓶に、そしてもう一方を廃液瓶側に接続し、ペリスタルティックポンプを用いて

0.1ml/min の流量となるよう送液した。

3. 2. 2. 4 画像処理による運動計測

大腸菌の運動を自動計測するために、グラフィカルプログラミング環境である LabVIEW および LabVIEW のマシンビジョン用拡張モジュールである IMAQ Vision (共に日本ナショナルインスツルメンツ株式会社) を用いてコンピュータに入力された画像を解析するソフトウェアを開発した。図 3-4 はこのソフトウェアにおける画像処理プロセスを示しており、4 つの工程からなる。すなわち、1) CCD カメラで撮影した位相差画像のコンピュータへの取り込み、2) 入力画像に対するノイズ除去処理および二値化処理による細胞体部分の抽出、3) 細胞の重心座標や大きさ、向きなどの演算、そして 4) 計測データのハードディスクへの記録の 4 つである。これら一連の処理にかかる時間は 100ms 以内であった。上記の工程を繰り返し実行することで、細胞の形態的な変化を 100ms の時間分解能で連続的に計測した。

3. 3 結果

3. 3. 1 高分解能レンズを用いた細胞の観察

実験に用いた 60 倍の対物レンズ (LCPlanFl 60×、オリンパス株式会社) で撮影した水平方向の画像分解能は $0.08 \mu\text{m}/\text{pixel}$ であった。一方垂直方向の画像分解能は $0.14 \mu\text{m}/\text{pixel}$ であり、大腸菌一細胞の長さ、方向、そして運動速度などを解析するのに十分な画素分解能を有していた。

3. 3. 2 大腸菌の運動解析

図 3-5 は、孤立した大腸菌がマイクロチャンバーの中で運動する様子を計測した時の 10 分間の軌跡を示す。グラフ中央部分の 2 つの円は、半透膜の高さを保つために配置した光硬化性樹脂の支柱である。軌跡の解析については、取得画像の二値化、画像からの細胞情報 (位置、サイズ、角度) の確認、移動情報としての確認、という手順を行った。以下に具体的な手法の結果について述べる。

(1) 取得画像の二値化と細胞情報の取得 :

CCD カメラが撮影した画像は、画像入力ボードを介してデジタル画像としてコンピュータに入力される。この時、256 階調のグレースケール、640 画素×480 画素のデータが毎秒 10 画像分送られる。開発した画像解析ソフトウェアを実行すると、まず背景画像の撮影を行う。次に入力されてくる画像から背景画像の減算処理を行う。これによって細胞の部分のみが輝度値を持ち、それ以外の部分は理論上輝度値ゼロの画像となる。ここで、適当な輝度値を設定して二値化処理を行うと、細胞体のみが抽出される。ここで得られた二値化画像にマシンビジョン用拡張モジュールが持つ画像解析関数を適用し、細胞体の重心座標、面積、長さおよび角度を得た。ここで言う画像の角度とは、図 3-6 に示すように、二値化画像を構成する画素の集合体において、二値化画像に外接す

る長方形の中で辺の長さが最も長くなる長方形の中心線を画像の長軸とし、水平軸（X 軸）から反時計方向に数えた時に長軸となす角度（ $<180^{\circ}$ ）として画像解析関数から返される値である。これら二値化画像から得られる画像情報を、100 ms ごとに計算し記録するソフトウェアとした。装置に用いた CCD カメラ自体は 1 秒間に 30 枚の画像を撮影・出力できるが、上記の画像解析処理のために画像の入力から計測までで 100 ms のインターバルが必要であった。図 3-7 に、画像解析で得られた大腸菌の長さ変化を示す。この結果、計測を開始してから 54 分後に細胞が二つに分裂したことがわかった。

（2）細胞の運動情報解析：

（1）で取得した細胞の重心座標を元に軌跡を調べたところ、細胞がマイクロチャンパーの壁に向かって進む際、壁に接触後運動方向を反転させる場合と壁に沿ってそのまま前進を続ける場合があり、時折壁に接触する前に進む方向を変えながら運動していることがわかった。計測で得られた軌跡を解析し、100 ms ごとに得られた大腸菌の重心座標を結んだ線分の角度変化が 5° 未満であった場合は直進と定義し、平均直進距離を求めたところ図 3-8 に示すように $4.5 \mu\text{m}$ であった。

3. 3. 3 大腸菌の壁に対する反応の解析

次に、画像解析ソフトウェアで得られた細胞情報を利用して、細胞が壁面にぶつかるときの角度に依存した細胞の応答特性を、同じ一細胞について計測した。細胞の入射角度は、図 3-9 に示すように細胞が実際に壁面に接触した時の壁の法線に対する角度と定義し、また、反応については、反転するか、そのまま前進するかの 2 つの反応のいずれか、という判断を行った。すなわち、壁面に接触した後の細胞の運動する角度を用いたのではなく、細胞の反応そのものを評価した。3. 3. 2 で述べた角度計測の定義では、記録される角度が必ずしも細胞の進行方向と壁とがなす角度と一致しないことから、ビ

デオで録画した映像を元に、細胞が反転した場合と前進した場合それぞれにおいて細胞が壁に衝突した時刻を調べ、該当する計測データから壁への入射角度に変換して解析を行った。

図 3-10 は、大腸菌がマイクロチャンバーの壁で反転運動を行う場合の、壁に対する入射角度依存性を示す。壁に対する入射角度が垂直に近い角度では、反転運動する場合と壁に沿って前進運動を続ける場合とで明確な差違が認められた。対照的に、大腸菌の入射角度が垂直付近でない場合、反転運動する比率と壁に沿って前進する比率がほぼ同じであった。この結果は、壁に衝突した後の大腸菌の運動は確率的であるものの、大腸菌の極には反転運動を誘発する何らかのセンサーが、細胞の両端（両極）に局在していること、あるいはその領域で接触情報が細胞運動に反映されることを示唆している。なぜなら、入射角度依存性は壁への垂直付近の入射角度以外では見られないからである。

3. 3. 4 孤立大腸菌一細胞連続解析による、細胞状態の変化の追跡

オンチップー細胞培養系観察系の利点のひとつは、孤立した一細胞の運動特性などの状態変化を連続で追跡して解析できるところである。図 3-11 は、3. 3. 1 から 3. 3. 3 の実験結果とは別の大腸菌における細胞長と運動速度との関係を示したものである。この例からもわかるように、本技術を用いれば、大腸菌の成長に伴って運動速度が低下するという関係を観察することもできる。これは、細胞の成長（伸長）自体が、細胞の粘性抵抗を増加させて速度を低下させるのか、あるいは、細胞長というよりむしろ細胞周期との関係での運動速度の減少なのか、少なくとも 2 つの可能性があるが、前者の単純な細胞長の変化に基づいた速度減少だとすると、15 分前後で観察された、速度の再上昇に続いた再減少などを説明することは難しいため、細胞内状態を反映した速度変化であるということが推察される。

3. 4 考察

本研究では、特定の一細胞の運動に着目し、培養環境を制御しながら計測する技術の確立を目指した。ガラス基板上に構築したマイクロチャンバー内に細胞を閉じ込めたことで特定の細胞の運動を連続して計測することができた。また、半透膜によってマイクロチャンバーをシールしたことによって、今回の実験では行っていないがマイクロチャンバー内へ安定的に栄養物質を供給するだけでなく、マイクロチャンバー内の栄養状態を変化させたり、化学物質による刺激を与えたりすることも可能である。

しかしながら、細胞間相互作用の制御といった観点では今回用いた実験系には課題も残った。例えば、大腸菌が分裂して細胞が二つになると、独立した運動の計測が難しくなるだけでなく、大腸菌同士の相互作用が発生してしまうという問題がある。特定の細胞をその分裂周期を大幅に超えて長期計測するためには分裂した細胞を排除する仕組みがなければならない。

解決法の一つとして、マイクロチャンバー内に隔離用の小さな小部屋を設けておき、光ピンセットなどの非接触ハンドリング技術を用いて余分な細胞を移動させ、計測する細胞数を制御することが考えられる。

3. 5 第3章のまとめ

微細加工技術を用いて一細胞の運動を直接観察して計測する実験系を開発し、遊泳する大腸菌の運動を細胞周期以上の長さに亘って計測することができた。また、大腸菌が光硬化性樹脂の壁に衝突する際の入射角度依存性についても計測した。この結果は、大腸菌が壁に対して垂直に近い角度で入射する場合に角度依存性を持つことを示唆しており、細胞集団を観察するだけの従来の顕微鏡手法では計測できなかったものである。

3. 1において述べたように、同じサンプルに着目して継続的に計測することは、個々の細胞がどのような傾向を持っているかを評価する上で非常に重要である。もし細胞集団に属する個々の細胞を識別することなく集団が持つ様々な表現型を評価しようとするれば、特定の表現型がどのような傾向をもっているかを知ることはできないであろう。したがって、微細加工を用いたオンチップー細胞計測は、細胞の表現型の傾向を理解する上でも有効である。

またこれらの結果は、タンパク質レベルでの反転運動を行う機構が厳密に機能したとしても、その機能がスイッチオンとなるかどうかは、まさに細胞と壁との接触の度合いによって大きく異なることを実際に示したものとなった。このことは、センサータンパク質が集団としてどのように最終的な意志決定の判断を行うのか、というタンパク質集団が論理演算的な結果を出すプロセスをより詳細に解明する必要があることを示唆している。実際には、細胞の運動という細胞レベルでの物理的な追跡観察だけでなく、これに細胞内の反転機構分子のスイッチオン／オフを直接観察できる分子計測技術が組み合わされることによって、まさしくタンパク質の機能の「決定論的」振る舞いと、細胞の「柔軟な」振る舞いととの接点にある事象を理解できるようになると考えている。

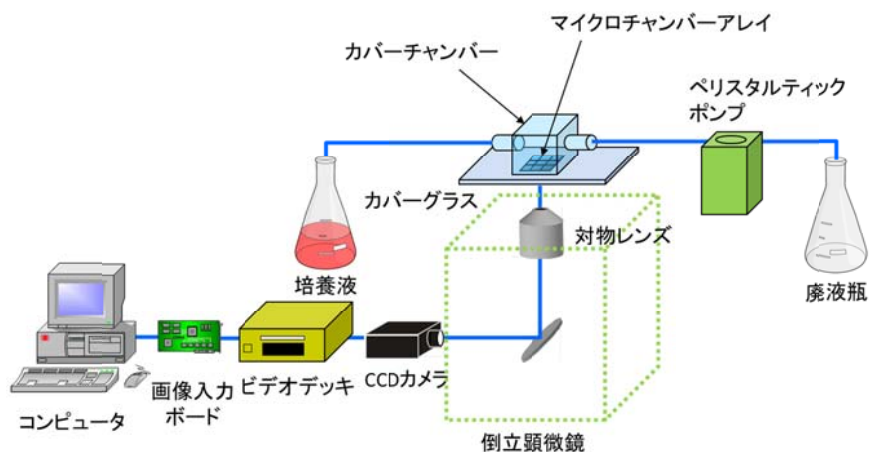


図 3-1 大腸菌の運動解析装置の構成図。

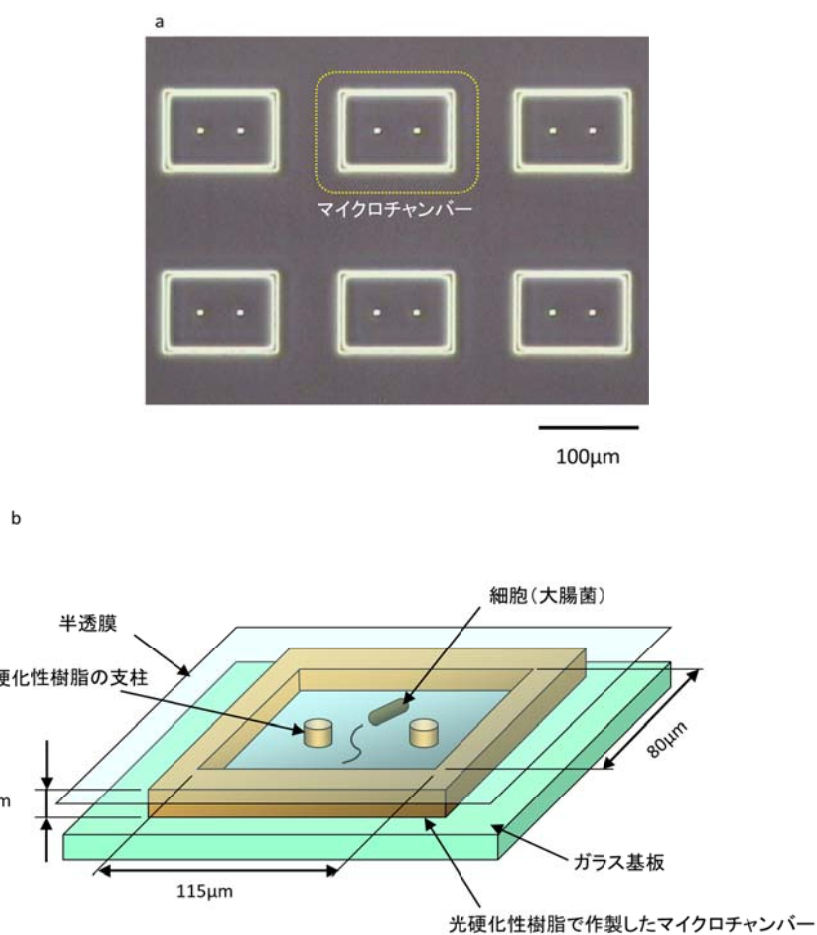


図 3-2 遊泳細胞の長期一細胞培養観察を行うマイクロチャンバーの設計。(a) 0.2mm 厚のカバーガラス上に作成されたマイクロチャンバーアレイの顕微鏡写真。(b) マイクロチャンバーの模式図。

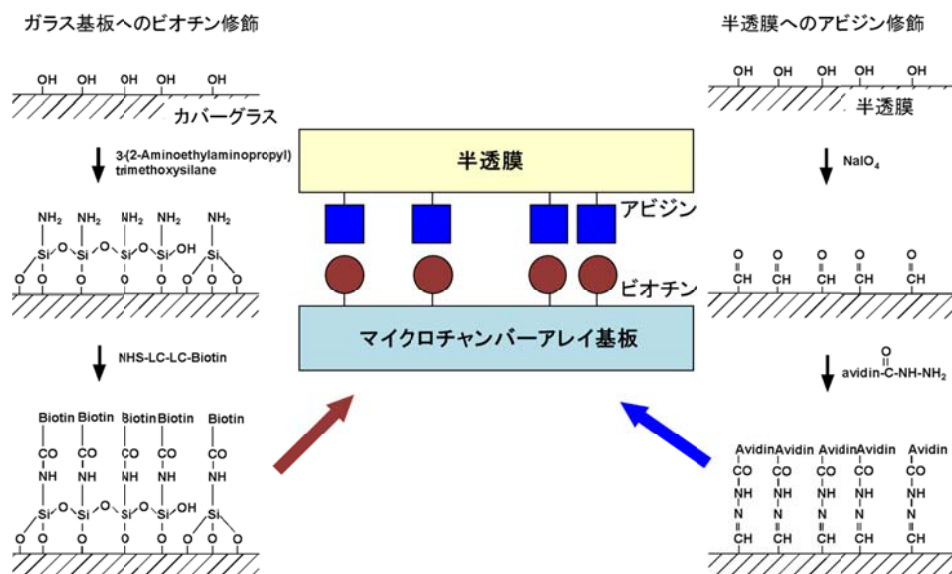


図 3-3 アビジン-ビオチン結合を用いた、半透膜とマイクロチャンバーアレイ基板の接着。

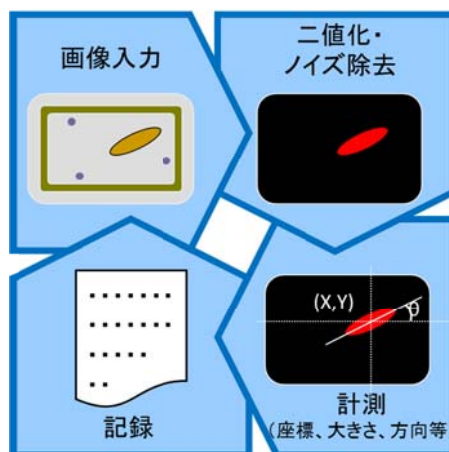


図 3-4 細胞運動を自動解析する画像処理ソフトウェアの処理手順。CCD カメラからコンピュータに取り込まれた位相差画像にはマイクロチャンバーの壁が含まれ、また時折カバーガラス上に付着したゴミやキズなどが映り込んでいることがある。そのため、入力された画像と背景画像との間で差分を取った上で所定の輝度値で二値化処理を行って細胞体のみを抽出した。次に抽出した画素の情報から、細胞の重心座標や面積、傾きなどの形態的情報を数値演算によって算出した。最後に、演算結果をコンピュータのハードディスクに記録した。これら一連の処理を循環的に繰り返すソフトウェアを作り、長期間に亘る計測を自動化した。1 サイクルの処理に要する時間は 100 ms 以内であった。

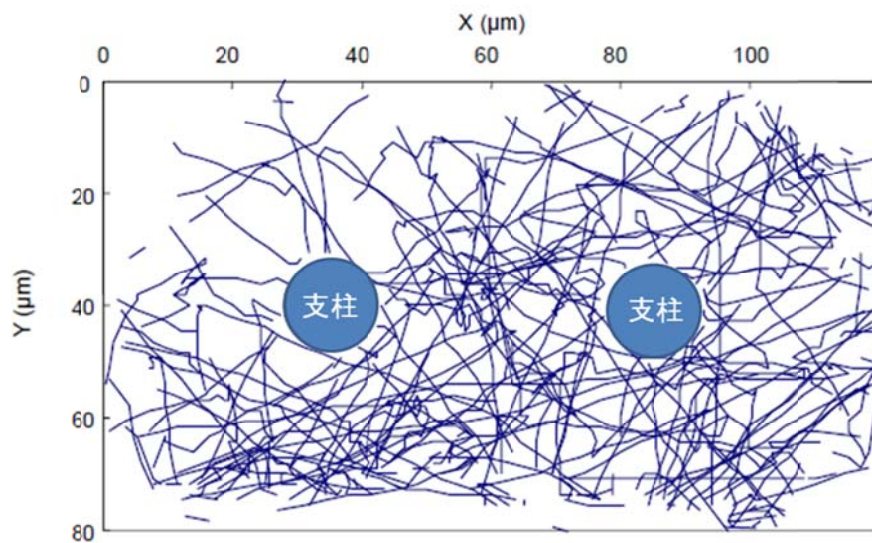


図 3-5 マイクロチャンバー内で遊泳する大腸菌の 10 分間の軌跡の例。

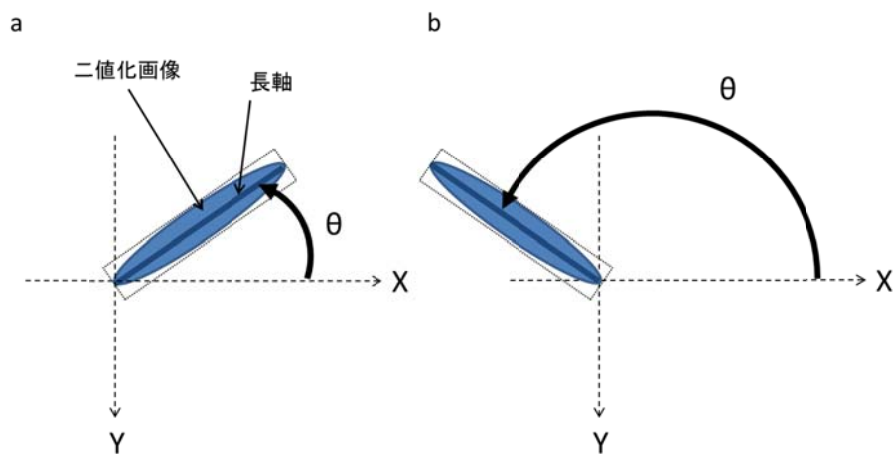


図 3-6 画像関数が定義する画像の角度。画像解析関数は、二値化画像に外接する長方形の中で、辺の長さが最も長くなる長方形の中心線を画像の長軸とし、水平軸（X 軸）から反時計回りに数えて長軸となす角度（ $<180^\circ$ ）として値を返す。(a) $\theta < 90^\circ$ の場合。(b) $90^\circ < \theta < 180^\circ$ の場合。

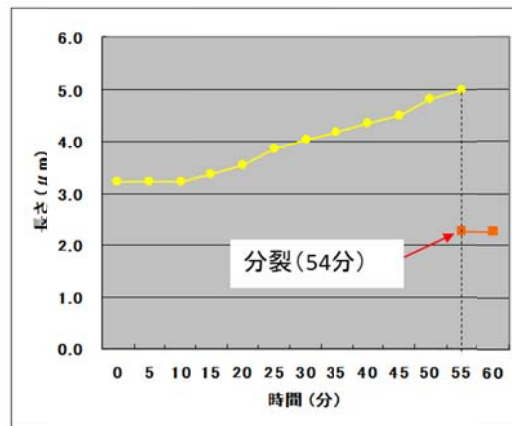


図 3-7 計測した大腸菌の成長曲線。この例では計測開始後 54 分後に分裂した。

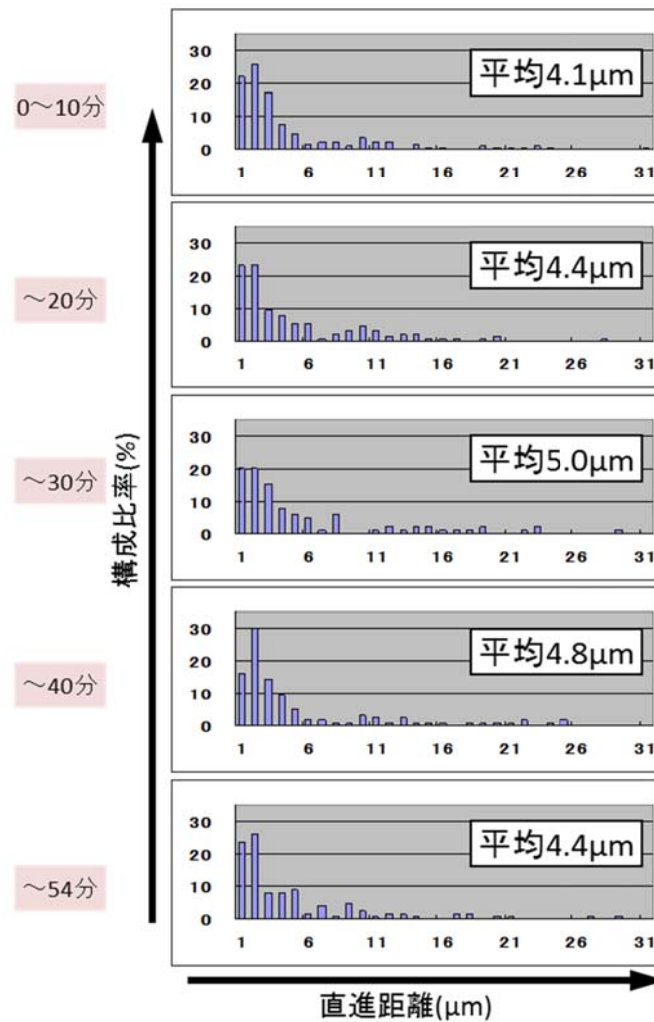


図 3-8 計測開始から 10 分ごとの大腸菌の平均直進距離。54 分間全体での平均直進距離は 4.5 μm であった。

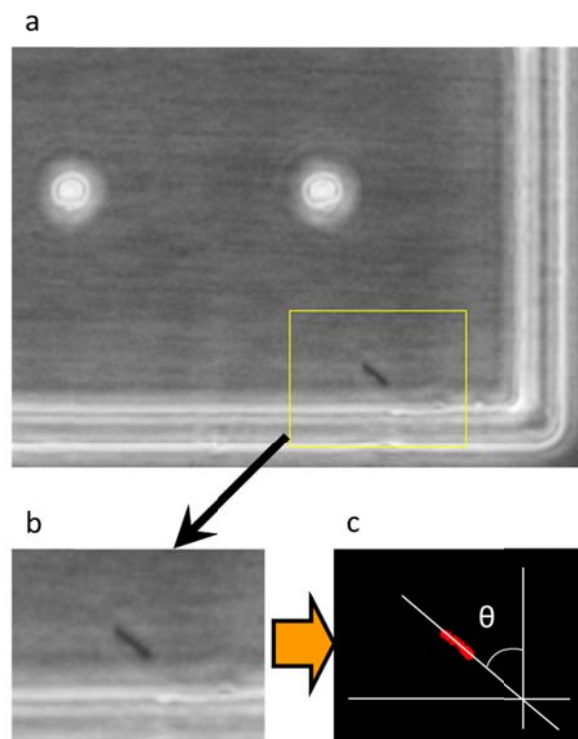


図 3-9 大腸菌がマイクロチャンバーの壁付近にいる時の画像解析の一例。(a) CCD カメラで撮影した位相差画像をトリミングした画像。(b) 大腸菌周辺をさらに拡大した画像。(c) 二値化した大腸菌（赤色）と、大腸菌の壁に対する入射角度の定義。壁への接触時に壁の法線と大腸菌の向きとのなす角を入射角度と定義した。

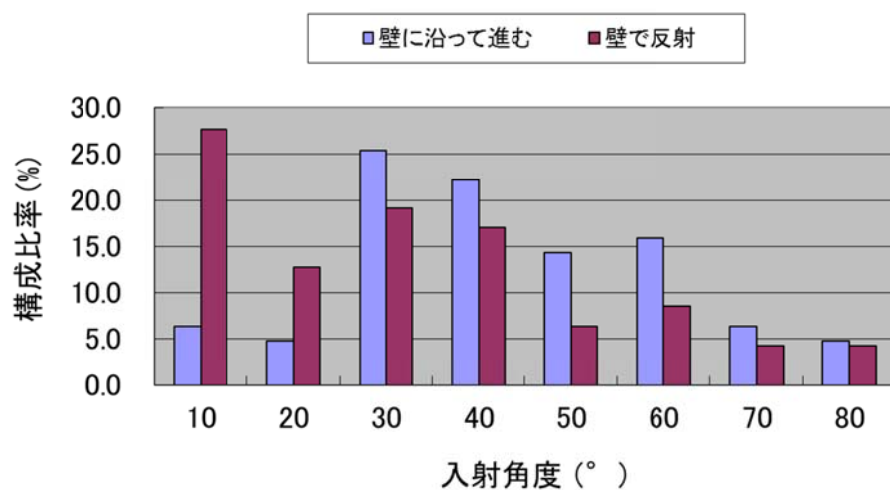


図 3-10 大腸菌がマイクロチャンバーの壁で反射運動を行う際の壁への入射角度依存性。

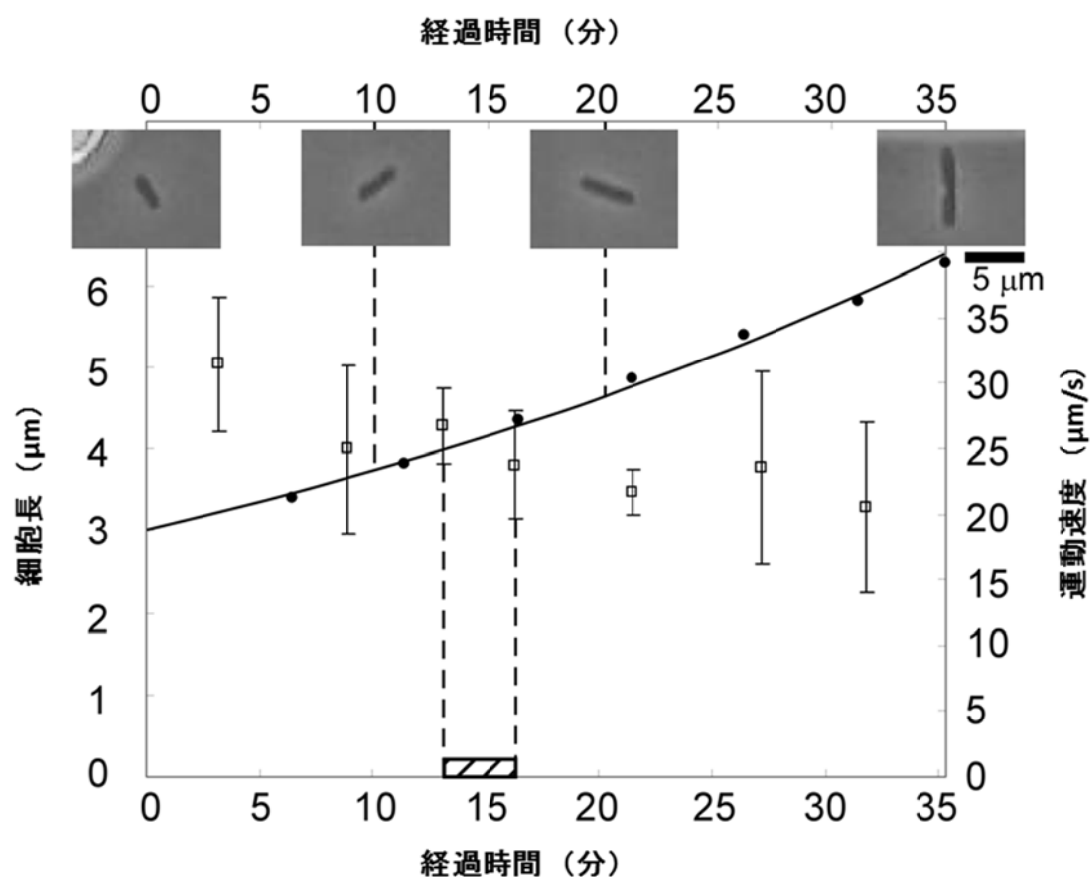


図 3-11 マイクロチャンバー内を運動する大腸菌一細胞の細胞長と運動速度の関係。実際のマイクロチャンバー内での孤立一細胞の形態を観察した一例である。上段の写真は、それぞれ 0 分（観察開始時）、10 分、20 分、35 分（分裂時）の写真である。下グラフは、実線と●が、細胞長さ、口が細胞の運動速度を示している。この例では、観察開始 15 分後あたりで、細胞運動速度の上昇から下降への変化が見られた。

第4章 微小流路と高速画像認識技術を用いたオンチップ・セルソーターの開発

4. 1 序論

細胞ベースの研究を推進するためには、複数種の細胞の混合物から特定の細胞種を識別・分離することが必要である。さらに、再現性のよいデータを得るためには、細胞を信頼性が高く非破壊的な方法で精製することが不可欠となる。こうした要求に応える形でこれまでも効率的で高速な細胞分離技術が開発されてきた。それらは、蛍光活性化セルソーター (Fluorescence -Activated Cell Sorting; FACS) [20], 磁気活性化細胞分離 (Magnetic-activated Cell Separation; MACS)、光ピンセットを用いた単一細胞自動ソーティングなどである[21-31]。これら従来の細胞分離技術は特定細胞の精製に用いられてきたが、必ずしも理想的ではなくいくつかの欠点も併せ持っていた。例えば、FACS には細胞が液滴形成過程でピエゾ素子の高速振動による圧力の急激な変化によって損傷を受け、細胞の検出にレーザの散乱光を用いているために細胞認識において限られた情報しか得られないといった問題がある。一方他の技術においても、コストの問題や、分離精製の効率、速度や分離の分解能などの欠点が存在する。細胞を分離精製した後培養するのであれば、分離過程で細胞が受ける損傷は最小限に止めなければならない。

これら従来の技術に対して、微小流路を構築したチップ上で細胞分離を実現しようとすると、サンプルボリュームの削減、操作・分析時間の短縮、設置場所の節約やランニングコストの削減といった利点が期待できると考えた。また、流路内を流れる細胞を直接観察することができれば、間接情報しか得られなかった FACS や MACS の欠点も克服できると考えた。

微小流路の加工については、それまでの微細加工素材の主流であったガラスやシリコンウェハに加え、1980年代の後半からシリコン系樹脂に微細構造を構築する技術が用いられるようになってきている。これらの技術は、ガラスやシリコンウェアへのリソグラフィーと対比して“ソフトリソグラフィー”と呼ばれている[32]。こうした方法は90年代に入ってから本格化し、現在では熱可塑性樹脂の一種であるPolydimethylsiloxane (PDMS)を用いて化学分析チップなどを作製する方法が広く普及している[33-35]。図4-1に示すように、PDMSは側鎖にメチル基を持つシロキサン系樹脂であり、白金を含む触媒溶液を加えることで重合し硬化する。この時、加熱することでより速く重合反応が進む。硬化する前に凹凸形状を持つ鋳型に流し込むことによって、プラスチックの射出成形のように鋳型の構造を転写することが可能である。しかも、プラスチックと比較して流動性が高く、 μm オーダーの隙間にも浸透して硬化するため、鋳型さえ用意しておけば、簡便に微小流路構造を作製することが可能である。上記の特徴の他、PDMSは下記に示す特徴を持つ。

- 1) ゴムのような弾力に富む。
- 2) 硬化後は細胞への毒性がない。
- 3) 耐熱性に優れ、オートクレーブ滅菌が可能。
- 4) 400~700 nmの可視領域において透明性を有し、顕微鏡などによる内部観察が可能。
- 5) 平坦面に対する自己吸着性を有し、ガラスなどへの接合が容易。
- 6) 低価格で入手可能。

以上の特徴を有するPDMSは、微小流路チップの試作用素材として最適であり、本研究においてもPDMSを用いて微小流路チップを作製し開発を進めた。本章では、従来にはない、微細加工によって作製した微小流路を一細胞単位で流れてくる細胞を高速で画

像認識し、細胞の形状などの画像情報から連続して細胞を精製回収することを目指した
オンチップ・セルソーターの開発について述べる。

4. 2 装置および方法

4. 2. 1 オンチップ・セルソーター

図 4-2 に、オンチップ・セルソーターの模式図を示す。この装置は、以下に示す 6 つの要素から構成されている。すなわち、1) 微小流路が形成されたセルソーティングチップ、2) 顕微観察光学系、3) 自動三次元分注機構、4) 高速 CCD カメラ、5) 画像収録ボードを内蔵した画像処理用コンピュータ、そして 6) 直流電源の 6 つである。チップの微小流路内を流れる細胞は、顕微観察光学系を通じ高速カメラで撮影され、画像収録ボードを介してデジタル画像として画像処理用コンピュータに取り込まれる。こうしてコンピュータ内に取り込まれた細胞の画像は、デジタル画像処理によって必要な細胞かそうでないかが判定される。画像処理用コンピュータは画像処理の他、自動三次元分注機構の制御も行う。この自動分注機構は、セルソーティングチップのインレットにサンプルを添加するだけでなく、精製された細胞をチップのリザーバーから回収することもできる。

4. 2. 2 セルソーティングチップ

4. 2. 2. 1 セルソーティングチップの構造

図 4-3 に、セルソーティングチップの模式図およびチップ内に形成された微小流路の顕微鏡写真を示す。セルソーティングチップはシリコーン系熱可塑性樹脂である PDMS 表面に微小流路を構築し、ガラス基板と貼り合わせることによって作製されている。チップ内には、サンプル溶液を流すための流路とバッファー用流路の 2 つの流路が PDMS 層内に左右対称に形成されている。これら 2 つの流路はチップの中央部分で結合しており、この結合部分で 2 つの流路の層流が境界面を成すようにしてある。この結合部分をソーティング領域と呼ぶことにする。図 4-3 (b) に示すように、アガロースゲルを充填した幅広流路がこの結合部分の左右から細いブリッジを介して接続している。これら

2 つの幅広流路は 1%アガロース (Agarose Type II-A, Sigma) および電解質として 0.5M の塩化ナトリウムを含んでいる。アガロースゲル中に電解質を含ませることで、これらの幅広流路は電極として機能する。この幅広流路をゲル電極と呼ぶこととする。

4. 2. 2. 2 PDMS を用いたセルソーティングチップの作製プロセス

PDMS への微細加工は、4. 1 で述べたように鋳型の微細構造を PDMS に転写することによって達成されるため、まず目的とする微細構造を持った鋳型を作製する作業が必要となる。図 4-4 に、鋳型の作製から PDMS チップ完成までの概略手順を示す。また、以下に本研究で行った PDMS セルソーティングチップの作製方法について述べる。

(1) フォトマスクの作製：

セルソーティングチップの流路パターンを CAD ソフトウェアにより設計し、2. 2. 1 で述べたレーザ描画装置 (DDB-8TH、ネオアーク株式会社) を用いてマスクブランク基板上に流路パターンを描画した。次にレジストの現像、および下地のクロム層のエッチング、さらに不要レジストの除去を経てフォトマスクを得た。

(2) 光硬化性樹脂による鋳型の作製：

次に (1) で作製したフォトマスクを用いて光硬化性樹脂 (SU-8 25、日本化薬株式会社) を光リソグラフィーでパターンニングして、マイクロ構造をガラス基板上に作り、これを鋳型とした。光硬化性樹脂は、15 μm ~40 μm の構造が作製可能な SU-8 25 というタイプを用いた。鋳型の作製は、以下の手順で行った。

- ① 洗浄しておいた大型スライドガラス (S9112、松浪ガラス工業株式会社) を、200°C のホットプレート上に 15 分間以上放置し基板を乾燥させた。光硬化性樹脂は水分が

付着した基板に対しては密着性が悪くなるためである。

- ② 光硬化性樹脂との密着性をよくするため、①の基板を 2. 2. 4 で述べたプラズマエッチング装置（FA-1、株式会社サムコインターナショナル研究所）にて酸素プラズマに曝し、ガラス表面を親水化処理した。処理条件は、出力電力：55 W、圧力： 1.0×10^{-7} atm、処理時間：30 s とした。
- ③ 基板上に 2 ml の光硬化性樹脂を滴下し、2. 2. 2 で述べたスピンコーター（1H-DX2、ミカサ株式会社）を用い、膜厚 25 μm となる条件、500 rpm で 5 秒間、続いて 2,000 rpm で 30 秒間回転させ、均一なレジスト膜を基板上に作製した。
- ④ 光硬化性樹脂に含まれる溶媒を揮発させて固めるために、ソフトベークと呼ばれる加熱処理を行った。はじめに 65 $^{\circ}\text{C}$ にて 3 分間、次に 95 $^{\circ}\text{C}$ にて 7 分間ホットプレート上で加熱した。
- ⑤ 2. 2. 3 で述べたコンタクト式露光装置を用い、④の基板上に（1）で作製したフォトマスクを密着させ、高圧水銀灯から発する i 線（365 nm）で 200 mJ/cm^2 の条件で露光を行なった。
- ⑥ 光硬化性樹脂の重合反応を促進させるため、ポストベークと呼ばれる加熱処理を行なった。はじめに 60 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間、次に 95 $^{\circ}\text{C}$ において 3 分間ホットプレート上で加熱した。
- ⑦ 専用の現像液（SU-8 Developer、日本化薬株式会社）に⑥の基板を 6 分間浸し、紫外線露光されていない部分の光硬化性樹脂を除去した。この時、特に細かいパターンの部分で現像のムラができないように、数十秒ごとに現像液中で基板を揺するようにした。その後 2-プロパノールにて現像液を洗い流し、さらに超純水ですすいだ後にエアブローで基板上の水分を取り除いた。
- ⑧ 基板と光硬化性樹脂との密着性をさらに上げるため、150 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレート上で 15 分程度加熱した。この処理はハードベークと呼ばれる。

(3) セルソーティングチップの作製：

上記(1)(2)に続き、以下の手順にてセルソーティングチップの作成を行った。

- ① PDMS (SYLGARD 184、東レ・ダウコーニング株式会社)の主剤および重合促進剤を10対1の比率でよく混ぜ合わせ、(2)で作製した鋳型基板上に約5 ml 滴下した。
- ② PDMS を混ぜ合わせる際に発生した気泡が抜けるのを2~3分待ち、基板を75℃に加熱しておいた高温チャンバー(ST-10、エスベック株式会社)に入れて90分間加熱した。
- ③ 硬化したPDMSを鋳型から剥がし、革細工用の穴開けポンチを用いて各リザーバー用の穴(直径：2 mm)を開けた。
- ④ ③のPDMSシートと洗浄済みのスライドガラスを、2.2.4で述べたプラズマエッチング装置(FA-1、株式会社サムコインターナショナル研究所)の平面電極上に貼り合わせ面を上にして並べ、出力電力：55 W、圧力： 1.0×10^{-7} atm、反応時間：30 sの条件で酸素プラズマ処理した。図4-5に示すように、PDMS表面を酸素プラズマ処理することでPDMS表面のジメチル基($\text{CH}_3\text{-Si-CH}_3$)が水酸基(HO-Si-OH)に変化し、この状態のPDMSを洗浄済みガラス基板と貼り合わせることでPDMSおよびガラスの表面の水酸基同士が縮合反応を起こしPDMSとガラス基板同士を強固に結合させることができる。
- ⑤ ④で処理したPDMSシートとスライドガラスを貼り合わせた後、サンプル用インレット、バッファー用インレット、ゲル用インレット2カ所、回収リザーバー、および廃棄リザーバーには外径：6 mm、内径：4 mm、高さ：5 mmの亚克力パイプをエポキシ系接着剤で接着し、さらにサンプル用インレットおよびバッファー用インレット両方を覆うように外径：20 mm、内径：18 mm、高さ：19 mmの亚克力パイプを

リザーバーパイプとして接着した。また下流側も同様に、回収リザーバーおよび廃棄リザーバー両方を覆うようにリザーバーパイプを接着した。

(4) ゲル電極の充填

チップ作製の終了後、ゲル電極の導入を以下に述べる手順で行った。

- ① (3)で作製した PDMS セルソーティングチップを 50°C のホットプレート上に乗せ、2~3 分間予熱した。
- ② アガロースの粉末 (Type II-A、シグマアルドリッチジャパン株式会社) を 0.5 M の塩化ナトリウム溶液に加えて濃度 1% (w/v) のアガロース溶液とし、電子レンジで加熱して完全に溶解させた。
- ③ ②のゾル状態のアガロースを、手早く (3) ⑤でチップに取り付けた左右 2 カ所のゲル用インレットのアクリルパイプに図 4-6 に示すようにマイクロピペットで 100 μ l ずつ分注し、毛細管現象を利用してゾル状アガロースをゲル電極用流路に充填した。
- ④ 最後にチップの前処理として、細胞がガラス基板表面に吸着することを防ぐために流路内部を pH8.0 の Phosphate Buffered Saline (PBS) に溶解させた濃度 7 mg/ml の Bovine Serum Albumin (BSA) 溶液によってコーティングし、5 分後に PBS で洗浄した。

4. 2. 3 画像認識によるソーティングの原理

図 4-7 に、ソーティング領域とソーティング動作の模式図を示す。ソーティング動作は以下に述べる手順で実行される。(a) 標的細胞がソーティング領域で撮影された場合はゲル電極間に電圧を印加せず、細胞はそのまま流路を進み回収リザーバーに到達する。

(b) これに対して標的細胞でない細胞がソーティング領域で撮影された際には 10V 以下の直流電圧が 2 つのゲル電極間に印加され、静電気力が発生する。この静電気力と流路中の層流との合力で細胞の移動方向が決まる。その後この力を受けて不要な細胞はサンプル用流路から反対側のバッファー用流路へと層流の境界を越えて移動し、最終的に廃棄リザーバーに到達する。なお、当初ゲル電極用流路のブリッジは左右対称の位置に設置していたが、電場によって移動した細胞や粒子が流路右側のゲル電極と流路の境界に電氣的に吸着してしまうことがあったため、これを避けるために非対称形に変更した。

図 4-8 に、画像認識の動作手順を示す。まず、元画像から背景画像を減算して差分画像を計算する。この差分画像を所定の閾値で二値化すると細胞体のみの領域を抽出できる。二値化された画像は画素の集合体として表されるので、数値演算によって画像としての細胞の特徴量を求めることが可能である。本研究で用いた特徴量は下記の 6 つである。すなわち、(1) 面積、(2) 周囲長 (3) 長径、(4) 短径、(5) 円形度、そして (6) 細胞体の平均輝度の 6 つである。これら一連の演算は、画像処理用コンピュータを用いてソフトウェアベースによる演算を行った場合、1/200 秒以内で実行できた。

4. 2. 4 チップ内培養を可能にするメンブレンフィルターの評価

ソーティングチップの回収リザーバーにメンブレンフィルターを取り付けることで、精製した細胞へのコンタミネーションを防ぎ、チップ内でそのまま培養可能なチップ内細胞培養技術の検討を行った。図 4-9 に、コンタミネーション防止用フィルターの候補となる 14 種類のメンブレンフィルターの写真を示す。フィルターは、ミリポア社製の Durapore、Isopore、Omnipore、Express、Fluoropore、PVC、Nylon の各タイプを用いた。各種フィルターのポアサイズは、Durapore は 0.22、0.45 μm 、Isopore は 0.2、0.4、0.8 μm 、Omnipore は 0.2、0.45、1.0 μm 、Express は 0.22 μm 、Fluoropore は 0.2、0.45 μm 、PVC は 0.8 μm 、そして Nylon は 0.2、0.45 μm のものを用いた。これら

のフィルターにアクリル製の筒（外径：6 mm、内径：4 mm、長さ：5 mm）に熱圧着させ、コンタミネーション防止用フィルターとしての評価を行った。図 4-10 に示すように、約 110 °C に加熱したコテの表面に選定候補のフィルターを置き、アクリルパイプを 2 ～5 秒押し付け熱圧着した。各フィルターをアクリルパイプに熱圧着させた後、フィルターに 10 μ l の純水を添加し、親水性および透明度を評価した。この時の評価の様子を図 4-11 に示す。これらの 14 種類全てのフィルターに関して、耐熱性、しわ、親水性、透明度の比較を行った。次に、各フィルターの細菌透過性について調べた。図 4-12 に、フィルターにおける細菌透過性の評価実験系の模式図を示す。各フィルターにアクリルパイプを熱圧着したものを 24 穴ウェルプレートのウェルに置き、アクリルパイプの内側に大腸菌を添加した LB 培地を、そしてパイプの外側には LB 培地のみを分注した。アクリルパイプの上部にはアルミナボールで蓋をし、パイプ内に大腸菌を添加した直後と 150 分後のパイプ外側の LB 培地を寒天培地に塗布し大腸菌の透過性を比較した。さらに、セルソーティングチップの回収リザーバーにメンブレンフィルターを熱圧着したアクリルパイプを取り付け、細胞培養槽付セルソーティングチップを組み立てた。チップに取り付けたこのアクリルパイプを新たに培養リザーバーと呼ぶ。マウス心筋細胞をセルソーティングチップのサンプルインレットに 20 μ l 添加した後に、空気圧を用いて 0.1 MPa の圧力で加圧して細胞をチップ流路内に送液した。マウス心筋細胞がチップ内の流路を通り培養リザーバーに到達した事を位相差顕微鏡で確認した後、培養リザーバー外側のリザーバーパイプに大腸菌を混入させたマウス心筋細胞培養用の DMEM 培地を 1ml 分注し、37°C、CO₂ 濃度 5% の環境下で 2 日間培養した。この時の実験の様子を図 4-13 に示す。通常の細胞培養実験では細菌の繁殖を抑えるために抗生物質を加えた培地を使用するが、ここではあえて抗生物質が添加されていない培地を使用した。その後、培養リザーバー外側の大腸菌を含んだ培地をすべて取り除き、培養リザーバー周辺を十分に洗浄した後培養リザーバー内の培地を回収して大腸菌のコンタミネーションの有無を

確認した。

4. 3 結果

4. 3. 1 チップデザインの検討

4. 3. 1. 1 サイドシースフローによる微小流路内での細胞の整列

図 4-14 に、流路中で細胞を一行に整列させる際の、サイドシースフロー用流路の形状による効果の違いを示す。流路中を流れる細胞を一行に整列させることは、細胞を 1 つずつ正確に画像処理するために必要である。そこで、サイドシースフロー用流路の形状が異なる動作評価用の流路チップを試作し、ウマ赤血球をサンプルとしてサイドシースフロー用流路がサンプル用流路に合流する前後で細胞が流路中のどの場所を通過するかを調べた。図 4-14 (a) に示す、幅 $20\mu\text{m}$ のサイドシースフロー用流路が同じ流路幅のままサンプル用流路に接続するチップでは、細胞の分布が $20\mu\text{m}$ から $10\mu\text{m}$ に狭まった (図 4-14 (b)、(c))。一方、図 4-14 (d) に示す、サイドシースフロー用流路の幅が $200\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ へと細くなりながらサンプル用流路に接続するようにしたチップでは、細胞の分布は $5\mu\text{m}$ まで狭くすることができた (図 4-14 (e)、(f))。図 4-15 に、サイドシースフロー用流路が幅 $200\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ へと細くなるテーパ形状を持つ、実際のセルソーティングチップにおけるサイドシースフロー用流路の合流部分の顕微鏡写真を示す。バッファ用流路側にもサイドシースフロー用流路を対称形に設けたのは、サンプル用流路側との流れのバランスを取るためである。図 4-15 (b) に示すとおり、サンプル流路内における細胞の分布は、左右のサイドシースフロー用流路によって流路幅である $50\mu\text{m}$ から $5\mu\text{m}$ へと収束した。

4. 3. 1. 2 Z 軸シース流の追加による流路内粒子の高さ制御

4. 3. 1. 1 で述べたセルソーティングチップでは、流路の両側から一対のサイドシースフロー用流路が合流する構造をとり、サイドシース流によって流路内を流れる細胞を一行に整列させて順番に画像処理できるようにしていたが、流路の深さ方向 (Z 軸)

には整列効果がなく、撮影した細胞画像のピントにばらつきが生じることがわかった。そこでサンプル用インレットとは別にインレットを持つチップを作製し、この追加したインレットからの流れにより細胞のZ軸方向の分布を制限しようと試みた。図4-16に、Z軸シース流付セルソーティングチップの模式図を示す。サンプル用インレットとは別にサンプル用流路の途中にZ軸シースフロー用インレットを追加したチップを試作した。サンプルとして直径 $2.5\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズをサンプル用インレットに分注した後、サンプル用インレットおよびZ軸シースフロー用インレット双方に共通の圧力がかかるように加圧し、セルソーティングチップ中央画像認識領域において撮影された粒子画像を解析して粒子面積のばらつき具合を調べた。図4-17に、Z軸シースフローを追加したチップにおける、直径 $2.5\ \mu\text{m}$ ビーズの面積分布を示す。Z軸シースを附加することで、粒子の流路深さ方向の分布を制限でき、フォーカスずれによる粒子面積のばらつきを50%低減することができた。

4. 3. 2 微小流路中の脈流のないサンプル駆動力の発生

多くの微小流路を用いた実験系において、微小流路内の流れの安定性は非常に重要である。本研究では流体の流速制御は機械ポンプを使用せず、流路上流部と下流部の圧力差を利用することで行った。図4-18に原理の円筒モデルを示す。チップ上流側および下流側のリザーバーパイプの液面の高さに差(δh)をつけることにより圧力差が生じ、この差をなくす方向に流れが発生する。ここで上流側と下流側のリザーバーパイプの液面高さの差を δh とし、単純化のために長さが L で半径が a の円筒内に粘性率 η の流体が流れるときの平均速度 V を考える。

円筒の両端に作用する圧力を、それぞれ p_1 、 p_2 ($p_1 > p_2$)とし、流体は速度 v で右向きに流れているとする。このとき、図の半径 r の円形の断面内の流体に作用する右向きの力 F は、

$$F = \pi r^2(p_1 - p_2) \quad (4.1)$$

である。一方、この半径 r の円筒のすぐ外側の流体の表面には、右向きにずり応力

$$T = \eta \frac{dv}{dr} \quad (4.2)$$

が作用している。その反作用として、半径 r の円筒内の流体の表面には左向きの応力

$$T' = -\eta \frac{dv}{dr} \quad (4.3)$$

が作用する。この左向きの力

$$2\pi r L T' = -2\pi r L \eta \frac{dv}{dr} \quad (4.4)$$

は(4.1)と釣り合って定常流をつくる。したがって、

$$\frac{dv}{dr} = -\frac{r}{2\eta L}(p_1 - p_2) \quad (4.5)$$

となる。これを積分して $v(a) = 0$ の条件を用いると、

$$v(r) = \frac{(p_1 - p_2)}{4\eta L}(a^2 - r^2) \quad (4.6)$$

を得る。これを円筒の全断面に渡って積分をすると、単位時間当たりの流量として、

$$Q = \frac{\pi a^4}{8\eta L}(p_1 - p_2) \quad (4.7)$$

となり、平均流速 V は単位面積あたりの流量 $Q/\pi a^2$ であるため、

$$V = \frac{Q}{\pi a^2} = \frac{a^2}{8\eta L}(p_1 - p_2) = \frac{a^2 \rho g}{8\eta L} \delta h \quad (4.8)$$

と導かれる。但し、 ρ は流体の密度を、 g は重力加速度である。すなわち式(4.8)は流速が上流と下流のリザーバーパイプの液面高さの差に比例することを示しており、この差を調整することで流速を制御できる。

次に流速の安定性について検討した。流体が流路を移動すればリザーバーパイプの液面高さが増減し、流速が変動することはソーティングの安定性の点で問題である。

ここで、底面積の大きさが S のリザーバーから断面積 S' の円筒内に流速 v の流体が時間 t の間に移動する時の液面高さの変化 δh は次の式で求めることができる。

$$\delta h = \frac{2vS'}{S}t \quad (4.9)$$

この式から液面高さの変化 δh はリザーバーパイプの底面積が大きいほど、少なくなることがわかる。そのため、リザーバーパイプの底面積はチップ構造の妨げにならない範囲でできるだけ大きくした。現状では底面積の大きさは $2.4 \times 10^8 \mu\text{m}^2$ である。

図 4-19 (a) に、重力エネルギーを送液の駆動源として利用したセルソーティングチップの断面図を示す。図 4-19 (b) は、微小流路でつながった上流側および下流側のリザーバーパイプの液面差によって生じる流速の、液面差依存性を示している。この重力エネルギーを利用した送液方法の利点は脈流が生じないことである。しかしながら、流速を上げるためには原理上相当な液面差を実現する高いリザーバーパイプが必要となるため、現実的に数 mm/s を超える流速の実現が難しい。具体的には、画像認識型の本装置ではセルソーティングチップの照明のためにコンデンサーレンズを配置する必要があるが、例えば倒立顕微鏡用の長作動距離タイプのコンデンサーレンズを用いた場合、コンデンサーレンズの作動距離 27 mm がリザーバーパイプの高さの上限となるためである。

この問題を解決するために、別の送液方法についても検討した。図 4-20 (a) に空気圧を送液の駆動源としたセルソーティングチップの断面図を示し、図 4-20 (b) に流速の空気圧依存性のグラフを示した。ここで加圧する空気圧を p_a とすると上記式 (4.8) から、

$$p_a = p_2 + \rho g \delta h \quad (4.10)$$

となる。ここで p_2 との比として表すと空気圧と液面高さの差との関係は、

$$\left(\frac{p_a}{p_2}\right) = 1 + \frac{1}{p_2}(\rho g \delta h) \quad (4.11)$$

として示すことができる。

この場合、微小流路中の流速は空気圧に対して線形に増加し、150 mm/s を超える流速を実現できた。

4. 3. 3 アガロースゲル電極

4. 3. 3. 1 低抵抗電極としてのアガロースゲルの組成

微小流路チップを化学分析チップに用いることの利点の一つとして、流路内のサンプルの体積に対して表面積が大きく、放熱効果が高いことが挙げられる。本研究で電極素材として用いているアガロースゲルもゲル電極用流路に充填されているため、上述した利点を享受できる。しかしながら、アガロースゲル電極内に生じるジュール熱の発生を抑えることは重要である。なぜなら、アガロースゲルの融点が約 80°C であるため、大きな電圧を印加したり、電圧印加が繰り返されたりといった状況が発生した場合に、アガロースゲル電極が融解してしまう可能性があるためである。このことからアガロースゲル電極に含まれる電解質は重要である。図 4-21 は、濃度が 0.5 M である様々な電解質を含んだ 1%アガロースゲル電極の抵抗値 (Ω/mm) を示している。ここでは、内径 1 mm のシリコンチューブに充填したアガロースゲルの抵抗をインピーダンスアナライザ (4294A、Agilent Technologies, Inc.) で測定した。図 4-21 に示すように、塩化コバルトを含んだアガロースゲルの抵抗値が低く、塩化カルシウムや塩化鉄においても比較的抵抗値が低くなっている。しかしながら、アガロースゲル電極の電解質としては、塩化ナトリウムを用いるべきと考えた。なぜなら、微小空間中のセルソーティングにおいて電解質中のキャリアイオンが細胞に与え得る影響を考慮する必要があるからである。例えば、ナトリウムおよび塩化物イオンは培養液にも含まれており、銅イオンやカリウムイオン、カルシウムイオンあるいはマグネシウムイオンといった他の種類のイオンと比較すると細胞への刺激は少ないと考えた。加えて、硫酸マグネシウムやコバルトカルシウム、硫酸亜鉛といった強いイオン強度を持つ電解質を含んだ 1%アガロースは、室

温では硬化しづらい傾向があるためゲル電極に用いるのは不適當と判断した。図 4-22 は、ゲルの抵抗値の塩化ナトリウム濃度依存性を示す。グラフが示すように、アガロースゲルのインピーダンスは、塩化ナトリウム濃度の上昇とともに減少し、0.5M の濃度でほぼ横ばいとなった。また、この実験において塩化ナトリウムの濃度を高めてゆくとゲルの固さが極端に低下し、1M の塩化ナトリウムを含んだゲルではかろうじて形状を維持できる程度の固さであった。よって、アガロースゲル電極における塩化ナトリウムの濃度の最適値を 0.5 M とした。

4. 3. 3. 2 ゲル電極用流路の形状検討

本研究では、アガロースゲル電極を微小流路内に充填するために、ゾル状態のアガロースの表面張力を利用した。当初は細長い流路形状ではなく、図 4-23 (a) に示すように流路を挟んで三角形が向かい合うような構造とし、穴開けポンチで開けた開口部からアガロースを最短で充填することを考えた。しかしながら加熱したゾル状アガロースを実際にゲル用インレットに滴下してみると、図 4-23 (b) のようにゲルの充填にムラができるか、図 4-23 (c) のようにブリッジを越えて一気にサンプル/バッファー用流路内に漏れ出てしまうかのどちらかで、一度もゲルの充填に成功しなかった。そこで、チップに滴下されたアガロースが毛細管現象によってゲル用の流路内を進み、かつ、ゲルの進行方向が直接流路を向かないよう弧を描く形状に改良したところ、充填の成功率が向上したためゲル電極用流路を持たせる設計とした。また、ゲル電極用流路の幅についても検討し、アガロースの流路内での流動速度とサンプル/バッファー用流路への漏れにくさなどをチップの試作を繰り返しながら確認し、最終的に 200 μm の幅と決定した。図 4-24 は、ゲル電極用流路とサンプル/バッファー用流路とをつなぐブリッジ部分の長さが異なるチップにアガロースを充填した時の例である。ブリッジ部分が長くなるとアガロースがブリッジ部分の途中で止まってしまったり、ブリッジ部分が空洞になってしま

ったりする失敗が増え、90 μm の長さでは一度も正しい充填ができなかった。図 4-25 に、ブリッジ部分へのゲル充填が不十分であった場合にソーティング動作を行った場合の例を示す。ブリッジ部分にゲルが充填されていないと、電圧印加時にサンプルがブリッジ部分に入り込んでしまうことがわかった。このことからブリッジ部分は短いほどよいと思われたが、あまりに短くなるとゲル電極用流路がサンプル/バッファ用流路に接近しすぎることになり、PDMS への流路形状転写に悪影響がでることも予想されたためブリッジ部分の長さを 30 μm とした。また、ブリッジ部分の幅についても流路成形に問題が生じない最小の幅である 15 μm とした。

4. 3. 3. 3 冷凍保存に対するゲル電極の安定性

実用的な応用を考えると、ゲル電極充填済みチップの保存方法の確立は重要課題である。ゲル電極の性質上、乾燥保存はゲル電極と流路の接点となるブリッジ部分のシーリングの維持という観点から適していない。そこで別の方法として冷凍保存について検討した。図 4-26 (a) および図 4-26 (b) に示すように、ゲル充填済みのチップを冷凍したのち解凍すると、ゲルが縮退して流路壁面との間に隙間ができ、電圧印加時に細胞がこの隙間に入り込む現象が見られた。トレハロースは細胞の構造を維持したまま冷凍保存するための抗凍結剤としてよく知られている[36-43]。図 4-26 (c) および図 4-26 (d) に示すように、トレハロースを濃度 1% (w/v) となるようアガロースゲルに添加すると、ゲルの縮退は見られず、冷凍後においても電圧印加時に正しくソーティング動作することを確認できた。

4. 3. 4 画像認識に基づいた細胞分離

4. 3. 4. 1 画像処理ソフトウェアの開発

細胞の画像情報に基づく細胞分離を実現するため、カメラが撮影した細胞の画像をコ

ンピュータに取り込み、画像解析を行ってソーティング電圧の出力を制御する画像処理ソフトウェアが必要である。そこでまず、1/30 秒で動作するアナログ白黒 CCD カメラ（CS3450、東京電子工業株式会社）の画像を画像集録ボード（IMAQ PCI-1409、日本ナショナルインスツルメンツ株式会社）を介してコンピュータに取り込み、画像処理アルゴリズムを検討するためのソフトウェアを開発して、最終的なソフトウェアの仕様を確定させた上で、1/200 秒カメラ（HAS-220、株式会社ディテクト）用のリアルタイム画像処理用ソフトウェアをカメラメーカーに外注することとした。図 4-27 に、グラフィカルプログラム開発環境である LabVIEW および、マシンビジョンソフトウェア開発環境 IMAQ Vision（共に日本ナショナルインスツルメンツ株式会社）を用いて開発したセルソーティングソフトウェアのメイン画面を示す。画面左下には細胞識別のためのしきい値を設定する制御器があり、細胞の大きさや形状、蛍光染色の程度などを分取の判定基準にすることができる。画面右上には CCD カメラで撮影した画像を表示する領域があり、画像サイズは 640×480 画素である。四角い点線で示した部分がリアルタイム画像処理の対象領域となる画像認識領域であり通常 100×100 画素以内で設定する。画面右下には画像認識領域の切り出し画像と二値化画像を表示するようになっている。表 4-1 に図 4-27 のソフトウェアにおけるコンピュータへの画像入力から画像の切り出し、二値化処理など画像処理の各プロセスに要する平均実行時間を示す。この結果から、画像認識領域すなわち画像処理の対象領域をカメラからの取得画像より大幅に小さく設定することで、カメラのフレームレートである 33 ms 以内でリアルタイム画像処理可能であることがわかった。

図 4-28 は、上述した 1/30 秒カメラを用いて検証したアルゴリズムを元に、1/200 秒カメラ用に開発したソフトウェアの実行の画面を示す。画面中央には 1/200 秒カメラが撮影した画像を表示するウィンドウがあり、画面中赤い四角形が画像認識領域を示す。また画面右側にはソフトウェアのメインウィンドウが配置されており、このウィンドウ

では画像認識領域の大きさや位置、画像認識領域内の画像をリアルタイム表示するかどうかの選択など、細胞の画像識別のための各種設定が行えるようになっている。メインウィンドウ内の右下の領域には画像から細胞体を抽出する二値化処理におけるしきい値および、二値化処理によって画素の集合体である粒子として認識されたものの中から、ソーティングの判定対象とするかどうかのしきい値を設定するボックスが配置されている。画像を二値化した際に、画像内の輝度分布によっては数画素単位のノイズが抽出されることがある。これらのノイズすべてに対してソーティングの判定と電圧印加を実施してしまうと計算量が増大し、正確なソーティングが行えなくなってしまう。そこで上述のしきい値設定によって、画像を二値化した際に生じた細胞よりも小さい（あるいは大きい）ノイズを、ソーティング電圧印加や画像保存の対象から外すことができるようにした。図 4-29 は、メインウィンドウから呼び出すことのできるソーティング時の判定パラメータを設定する画面である。ここでは、画像解析で得られる 6 つの指標（面積、周囲長、長径、短径、平均輝度、円形度）について各指標における値の範囲と、ソーティングにおいてどの指標を判定基準に採用するかを設定できる。例えば、粒子の面積のみを基準に、面積がある範囲内の粒子に対して電圧を出力したり、面積と平均輝度双方の条件を満足する粒子に対して電圧を出力したり、あるいは、面積または平均輝度どちらかの条件を満たす粒子すべてに対して電圧出力するといった設定が可能である。これら判定パラメータの設定に、出力電圧の大きさと印加時間の設定を組み合わせることによって様々なサンプルのソーティングに対応できるようにした。

4. 3. 4. 2 サンプル濃度および流速の上限

図 4-30 に、2 μm のポリスチレンビーズをサンプルとして、粒子濃度を変えながら画像認識させた場合のソーティングエリアの顕微鏡写真を示す。この結果、粒子濃度が 10^7 個/ml 台では 1 秒あたり数個の粒子しか画像認識領域に流れてこなかったが、粒子

濃度の増大と共に認識される粒子の数も増加し、 5×10^9 個/ml の濃度では画像処理速度の限界値に近い 190 個ものビーズを認識可能であった。しかしながら、この濃度では流路内のビーズ密度が高まり過ぎたためにビーズが重なり合って撮影されるケースが頻発した。粒子が重なり合ってしまうと画像による正確な粒子識別ができなくなるため、 10^9 個/ml 台の粒子濃度が使用できる濃度の限界であることがわかった。

一方、図 4-31 は同じく $2 \mu\text{m}$ ビーズを用い、流速を変えて画像認識させた時の顕微鏡写真を示す。1/200 秒カメラで設定可能な最小のシャッター速度である 1/2,000 秒で撮影したが、流速の増加と共にビーズの被写体ブレによりビーズの像が流れの方向に引き延ばされて歪んだ。流速 2.9 mm/s で撮影したビーズの像は一見歪みがなさそうであったが、1/2,000 秒 ($=500 \mu\text{s}$) で進む距離を考えると、 2.9 mm/s の流速でも $1.5 \mu\text{m}$ 程度ブレが発生することとなり、ここで使用した $2 \mu\text{m}$ ビーズのように小さい粒子では画像解析の際に大きな誤差となる。どの程度の被写体ブレまで許容できるかについては、光学的には使用する対物レンズと照明に使用する光源の波長によって決定されるが、仮に 500 nm 以内のブレまで許容できるとすると、その時の流速は 1 mm/s となり、1/200 秒カメラを用いた粒子の画像識別においては、リザーバーパイプの液面差による送液方式で十分である。

4. 3. 4. 3 画像認識に基づいたソーティング性能の評価

図 4-32 に、 $2 \mu\text{m}$ と $5 \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを混合したものをサンプルとしてオンチップ・セルソーターで処理した時に、画像処理用コンピュータに記録された粒子の写真を示す。ソーティング領域を通過する粒子に対してそれぞれ面積や周囲長などのインデックスをリアルタイム画像処理によって演算した後、高速カメラで撮影された各粒子の画像は、粒子の重心を中心として 80×80 画素の大きさにトリミングされて記録されるようにした。すべての粒子に対してこれら一連の動作を 5ms 以内で完了することが

できた。

図 4-33 は、 $2\mu\text{m}$ と $5\mu\text{m}$ のビーズの混合サンプルを用い、 $5\mu\text{m}$ のビーズを認識した時に 5V の電圧を印加するように動作させた時のエラー率の流速依存性を示している。

図 4-33 (a) は、 $5\mu\text{m}$ のビーズが電圧印加によって排除される際に、 $5\mu\text{m}$ のビーズに紛れて $2\mu\text{m}$ のビーズが廃棄流路側に移動してしまう場合のエラー率を示している。一方図 4-33 (b) は、 $5\mu\text{m}$ のビーズがソーティング領域内に存在しても廃棄流路側に移動させられなかった場合のエラー率を示している。これらのエラー率は流速と共に増大するが、回収したい粒子が誤って排除されてしまうエラー率は流速が 2.5mm/s 未満で動作させれば 5%未満に抑えられることがわかった。

ビーズを用いた評価の他、より現実的な使用環境を想定して実際の細胞を用いた分離性能の評価も試みた。図 4-34 に、マウス心筋細胞と赤血球を分離中の連続写真を、また図 4-35 には、DAPI で蛍光染色した COS 細胞（アフリカミドリザル腎臓由来細胞株）を非染色の細胞と分離する際の連続写真を示す。前者では細胞の大きさを指標に、また後者では細胞の平均輝度を指標とすることで、画像認識によって標的細胞とそうでないものを自動認識し、直流電圧によって分離することができた。

4. 3. 4. 4 回収した細胞の培養

ソーティング時に細胞へ与える影響を検討するため、細胞をソーティングした後に回収し、培養を行った。Hela 細胞と赤血球を等量混合したものをサンプルとし、細胞の大きさを指標としてソーティングを行った。電圧印加は Hela 細胞（十数 μm 程度）に比べて小さい赤血球（ $8\mu\text{m}$ 程度）に対してのみ行う条件とし、10V でソーティングを行った。図 4-36 に、回収リザーバーから回収した Hela 細胞をカルチャーディッシュ（Falcon）で培養中の顕微鏡写真を示す。培養 7 日目においても順調に分裂を続けている様子が観察された。なお、培地にはペニシリン/ストレプトマイシン/10% FBS を含

んだ DMEM (Gibco) を使用した。

4. 3. 5 顕微観察光学系における被写界深度の拡大

オンチップ・セルソーターにおいては、微小流路内を流れる細胞の画像解析に基づいてソーティングを行うため、撮影する細胞画像の像質は極めて重要である。特に細胞のピントが外れてしまうと細胞の認識すらできず、正確なソーティングは期待できない。本研究ではサイドシースフローを用いることで、微小流路内に細胞を一行に整列させる工夫をしているが、流路の深さ方向に対しては制御されておらず、特に大きさの小さい細胞では流路の深さに応じた像のボケが発生してしまう。そこでこの問題を解決するために、顕微観察光学系における被写界深度の拡大を図るための方法論について検討した。一般に、被写界深度と結像分解能とは両立しないため、低開口数 (NA) のレンズとズームレンズを組み合わせることで深い被写界深度と像倍率を両立した光学系を構築して評価を行った。図 4-37 に、検討用に構築した実験系を示す。ここでは NA=0.28 の対物レンズ (M Plan Apo 10x、株式会社ミットヨ) および、12 倍ズームレンズ (Navitar) を正立顕微鏡 (IX51、オリンパス株式会社) の筐体に組み込んで使用した。被写界深度の評価は、図 4-37 (b) に示すように顕微鏡のステージの高さを変えながら直径 10 μm のポリスチレンビーズを観察することによって行った。また、比較用に一般的な顕微観察光学系の例として、倒立顕微鏡 (IX70、オリンパス株式会社) を用いた。レンズのフォーカスがビーズに合って観察できるステージの高さを 0 μm とし、ステージの高さを最長 25 μm まで移動させて、一般光学系 IX-70 とズーム光学系の観察画像の被写界深度を比較した。まず、一般光学系 IX-70 で高さを 5 μm 間隔で観察したビーズの画像と、ビーズの中心線上に設定したラインプロファイルを図 4-38 に示した。図 4-38 の写真からわかるように、ビーズが対物レンズから離れていくにつれて、ビーズからフォーカスが外れてしまい、像がボケてしまうのが観察された。一般光学系 IX-70 を用いた場合の

輝度分布では、深度 0 μm では、ビーズの直径の両端で輝度が極端に下がり（図 4-38 (a)）、ピークの様に観測されていたが、深度 5 μm ~15 μm では、深度が深くなるにつれて 2 つのピークがなだらかになった（図 4-38 (b)、(c)、(d)）。深度 20 μm ~25 μm では、観察画像でもビーズの像が認識できなくなり、ビーズの真中も黒くなり、輝度変化も 1 つの緩やかなピークとなった（図 4-38 (e)、(f)）。本研究では、ビーズの真中が黒くボケ始め、輝度分布が 1 つのピークになる寸前の高さを被写界深度の限界として定義した（図 4-38 (d)）。深度変化によるビーズの像ボケの観察を簡略化するために、図 4-39ss に、それぞれの深度におけるビーズの中心線上の輝度変化画像を縦に並べたものを示す。

通常の倒立顕微鏡 IX70 を用いた一般光学系と今回試作したズーム光学実験系における仕様を表 4-2 にまとめた。また、15 μm のポリスチレンビーズを一般光学系 IX-70 用いて対物レンズを変えながら（10 倍、20 倍、40 倍）観察したビーズの被写界深度変化による画像と、それぞれの倍率での観察の輝度変化画像、及び輝度分布を図 4-40、41、および 42 に示した。一般光学系 IX-70 による 10 倍対物レンズ (UPlanFl 10 \times : NA=0.3、オリンパス株式会社) での観察画像において、ビーズの真中が黒くなる深さは 15 μm であった。輝度分布では、深度に依存して輝度の変化が小さく、ゆっくりボケていくのがわかる。20 μm では直径での輝度低下が真中にまで現れ、ビーズ像の認識が難しくなった（図 4-40）。20 倍対物レンズ (LCPlanFl 20 \times : NA=0.4、オリンパス株式会社) では、10 倍対物レンズに比べ開口数が大きく、ビーズの輪郭などが明瞭になり、空間分解能が向上したことが示唆された（図 4-41）。しかし、被写界深度は 5 μm の深度ですでにビーズの真中が黒くボケてしまい、また、輝度変化は急激に変化した。同様に 40 倍対物レンズ (LCPlanFl 40 \times : NA=0.6、オリンパス株式会社) でも被写界深度は 5 μm であり、ビーズの輪郭は明瞭になったが、被写界深度は浅かった（図 4-42）。

一方、ズーム光学実験系で観察したビーズの画像、輝度画像、輝度分布をそれぞれの

観察倍率ごとに図 4-43, 44, 45 に示した。ズーム光学系では、すべての観察倍率での観察画像において、25 μm 以上の被写界深度が確保できていた。深度変化による輝度変化も前の深度の輝度変化と比べて誤差が少なく、ほぼ全ての輝度変化曲線が重なった。

これらの結果から、一般光学系 IX-70 での観察では被写界深度が浅く、粒子の高さが数 μm 上下するだけで像のボケが発生してしまったが、低開口数レンズとズームレンズを組み合わせる事で観察倍率を維持しながら被写界深度を深く確保する事ができた。図 4-44 および図 4-45 において、2 倍ズームと 4 倍ズームの観察画像の輝度変化で、ビーズ中心の輝度が極端に明るくなっているのは、ビーズ自身が集光レンズとして働いてしまったためと思われる。また、4 倍ズームでの観察画像で、ビーズの影、輝度変化画像のビーズの中心部の明るい部分が深度によってずれているのは、ズーム光学系を本来取り付け互換性のない顕微鏡に組み込んでいるため、光軸がずれてしまったためだと思われる。

表 4-3 に、上記の結果をまとめた表を示す。ズーム光学系では、全ての倍率で被写界深度が 25 μm 以上保たれ、一般光学系 IX-70 と比較すると、1.6~5.0 倍も深い被写界深度が実現できている事がわかった。

一方、被写界深度の別の確認法として、ズーム光学系において 10 μm 間隔のミクロスケールを 30° 傾けて観察した時の写真を図 4-46 (a) に示す。図 4-46 (b) は、図 4-42 (a) 中に黄色の線で示した部分のラインプロファイルを示す。ピントが外れるとミクロスケール目盛りのコントラスト差が減少するので、ここでは被写界深度の定量化にコントラストプロファイルを利用した。図 4-46 (c) はコントラストプロファイルの山と谷の差を高さに対してプロットしたものである。高さの差が 30 μm においてコントラスト低減が 20%以下であることがわかった。この評価からも被写界深度として約 30 μm まで有効であるという結論を得た。

4. 3. 6 1/2,000 秒リアルタイム画像処理によるソーティングの高速化

4. 3. 6. 1 1/2, 000 秒カメラに対応した高速画像処理ボードの開発

本研究で開発したオンチップ・セルソーターは、微小流路チップとリアルタイム画像処理を用いて既存の装置にはなかった細胞の直接観察に基づいた細胞精製技術を実現しようとしたものであった。しかしながら、既存の FACS が 1 秒間に数万細胞の処理が可能と謳っていることを考えると、1 秒間に 200 回の画像撮影では処理速度の点で大きな隔たりがあった。そこで、現時点での最高速のリアルタイム画像抽出が可能なカメラとして、秒当たりの撮影回数がこれまでの 10 倍となる 1/2, 000 秒の高速カメラ (HAS-500、株式会社ディテクト) を用い、ソーティング速度向上のための検討を行った。図 4-47 に 1/2, 000 秒カメラの写真を示す。カメラに用いられている受光素子は 1 インチ CMOS センサーであり、撮影可能な画像サイズは 1/2, 000 秒のフレームレートで 1, 024×248 画素である。また、図 4-48 に示すように波長約 520 nm で受光感度が最大となる。撮影、画像処理、さらにその結果に基づいて判定しソーティング電圧出力までを行う機能を 1/2, 000 秒ごとに実行する必要があるため、1/2, 000 秒カメラと接続して用いる専用の画像入力/処理ボードを開発した。図 4-49 に開発した画像処理ボードの写真を示す。処理を高速化するため、画像処理に係るプログラムをプログラミング処理が可能な LSI である、Field Programmable Gate Array (FPGA) に格納して実行するようにし、画像処理ボード上に実装した。この画像処理ボードでは、1/2, 000 カメラから転送された細胞画像の画像解析およびソーティングの判定、そして外部のソーティング用直流電源へのトリガ信号出力を行う。これらの処理を 1/2, 000 秒以内で完了させなければならないため、画像解析によって計算、出力可能な粒子の特徴量は、1) 重心位置、2) 面積、そして 3) 周囲長の 3 つのみとなった。これらの内、実際にソーティングの判定用に用いるのは面積と周囲長のみであり、専用のソーティングソフトウェア画面上でそれぞれにしきい値を設定し、単独あるいは組み合わせて電圧を印加するかどうかの判定を行う仕様と

した。図 4-50 に、1/2,000 秒ごとに細胞を連続画像処理する場合の画像認識領域サイズと流速の考え方についての模式図を示す。1/2,000 秒カメラの撮影可能画像サイズが $1,024 \times 248$ 画素であると述べたが、撮影した画像を 1/2,000 秒以内でリアルタイム画像処理するために、実視野において流れ方向に $100 \mu\text{m}$ 分の領域の画像のみに対して画像処理を行うよう設定した。この領域を画像認識領域と呼ぶ。便宜上細胞が等間隔に並んだ流体を考えると、1/2,000 秒カメラの撮影時間 $500 \mu\text{s}$ ごとに画像認識領域の $100 \mu\text{m}$ ずつ流体が移動すれば画像認識される流体を重複なくすべて検査できることになる。この時の流体の移動速度 200 mm/s を装置全体における処理時間の基準とした。細胞の撮影からソーティング電圧用信号出力までのタイミングチャートを図 4-51 に示す。カメラで撮影された画像を画像処理ボードに転送するのに 1 フレーム分の時間が必要であり、画像処理にも 1 フレーム分の時間が必要であったため、撮影が完了してから 1 ms 後にソーティング電圧が出力される仕様とした。また、ソーティング電圧の出力回路にディレイ回路を追加し、サンプルの流速を 200 mm/s よりも遅く設定した場合にはディレイ回路に電圧出力の遅延時間を設定してソーティングのタイミングを調節できるようにした。

4. 3. 6. 2 高輝度パルス LED 光源の開発

高速カメラは高速になるほど露光時間が短くなり撮影像に光量不足が生じる。主に産業用アナログカメラで用いられる National Television System Committee (NTSC) 規格では、ビデオレートは約 30 コマ/秒であり露光時間は最大 33 ms であるが、1/2,000 秒カメラの場合は露光時間が最大でも $500 \mu\text{s}$ であり、イメージセンサの受光感度が同じ場合照明光源の光量としては通常のアナログカメラより 66 倍だけ輝度の高い光源が必要になる。さらに高速に移動する物体を残像無しで撮影するための条件により露光時間に対する制約がさらに厳しくなる。そこで流路内を移動する細胞の像を残像なく撮影す

るためにはこれまで用いてきたハロゲンランプの連続光ではなく、パルス発光する光源が必要と考えた。パルス光源としては、1) キセノンフラッシュランプ、2) パルスレーザー光源、3) パルス LED 光源の 3 種類が候補として考えられた。1/2,000 秒カメラと同期させるためには発光繰返周波数としては 2 kHz が必要であるが、キセノンフラッシュランプは該当製品が存在しなかった。一方、パルスレーザー光源は高い繰返周波数の製品が多く出ているが、レーザーで物体を照明すると図 4-52 に示したように画像に干渉縞が発生するために、画像処理用照明光源としては不適當である。拡散板をレーザーの光路に挿入して高速回転させることで、レーザーのコヒーレンスを低減させて照明用光源として用いる方法もあるが、照明用光学系が複雑になるため今回は採用を見送った。以上から、繰返周波数が 2kHz 以上で点灯可能なインコヒーレント光源として、高輝度パルス LED を用いた照明用光源の開発を行った。図 4-53 に開発したパルス LED 光源の写真を示す。また表 4-4 に光源に使用した LED 素子の仕様を示す。LED 素子は、図 4-48 に示した 1/2,000 秒カメラの最大感度波長に合わせ 527 nm のものを選定した。LED の発光時間は 1~5 μs の 5 段階に切り替えできるようにした。図 4-54 に示すように、照射光学系は平凸レンズ 3 枚で LED からの光を集光する構成とし、光源の筐体がセルソーティングチップのリザーバーパイプに干渉しないよう作動距離は 30 mm とした。LED は 1/2,000 秒カメラからの外部同期信号に同期して発光するようにし、発光時間は 1~5 μs の間で 1 μs 単位で切り替えて使用できるようにした。パルス光源の発光をカメラ露光と同期させるタイミングチャートを図 4-55 に示す。また、図 4-56 に直径 10 μm のポリスチレンビーズを空気加圧によって平均流速が 200 mm/s となるようセルソーティングチップ内を送液し、倒立顕微鏡に取り付けた 1/2,000 秒カメラで撮影した写真を示す。この結果から、200 mm/s の高流速下であっても 1 μs の発光時間であれば被写体ブレのない撮影を行えることがわかった。

4. 3. 6. 3 1/2,000 秒ソーティングに対応したセルソーティングチップの試作

微小流路を用いた実験系特有のトラブルとして、気泡による流路の閉塞が挙げられる。数十 μm 程度の流路幅/深さの微小流路中に気泡が混入すると、流路内部の溶液が気泡で寸断され、表面張力のために気泡を除くことが難しくなる。先に述べた PDMS で作製したセルソーティングチップでは、サンプル用流路とバッファ用流路のそれぞれにサイドシースフロー用流路を付加していたために流路の枝分かれが多く、実験開始前に流路内をバッファで満たす際に各所の枝分かれ部分で気泡による流路の閉塞が発生し、気泡の除去作業に手間を要するという問題があった。また、ソーティング処理の高速化のためには画像処理速度の向上だけでなく、送液速度も上げる必要があり、加圧による送液への耐性も考慮する必要がある。そこで、上記課題への対処も含め、高速ソーティングに対応したセルソーティングチップについて検討を行った。図 4-57 に、改良したセルソーティングチップの写真を示す。このチップは、アクリルの射出成形で試作した。図 4-57 (b) に示すように、サンプル流をシース流で挟み込み、細胞を流路中央に一直線に整列させる構造は 4. 3. 1. 1 で述べた方法と同じであるが、上流側は 1 本のサンプル用流路と両側のサイドシースフロー用流路の 3 本のみとして流路構造を単純化した。一方下流側の分離部分も 3 本に分岐する構造とした。PDMS チップと比較すると下流側の分岐流路が増加することになるが、チップ全体として分岐流路が減少しているので問題はないと考えた。また、PDMS チップでは流路とゲル電極用流路とをつなぐブリッジ部分が左右非対称であったが、今回のチップ試作では単純化のために左右対称形に戻した。4. 3. 6. 1 で述べたように、カメラが細胞を撮影してからソーティング用の電圧が印加されるまでに 1ms 必要であるため、200 mm/s の流速で送液することを前提に、サンプル用流路とゲル電極のブリッジ部分が接するソーティング領域と画像認識領域は 200 μm 間隔を空けて設定できるようにした。図 4-57 (b) において、画像認識領域を示す黄色い四角の右側にある三角形は、画像認識領域を設定する際の位置決めマ

ークである。

4. 3. 6. 4 1/2,000 秒オンチップ・セルソーターの試作

図 4-58 に、1/2,000 秒カメラ、パルス LED 光源、被写界深度拡大光学系、そして 1/2,000 秒高速画像処理ボードを内蔵した画像処理用コンピュータで構成した 1/2,000 秒オンチップ・セルソーターの試作機の装置構成を示す。試作機にはこの他に、セルソーティングチップに加圧して高速送液するためのエアシリンダおよび、高速画像処理ボードからのソーティング電圧出力トリガ信号を受けて 2 kHz で最大 350 V を出力可能なソーティング電源を搭載した。

4. 3. 6. 5 1/2,000 秒画像処理による粒子識別能力の評価

図 4-59 に、4. 3. 6. 4 で述べた試作機を用いて流速 200 mm/s で流した直径 5 μ m のポリスチレンビーズと直径 10 μ m のビーズを撮影した元画像と背景減算処理後の画像、そしてそれぞれの画像について二値化した画像を示す。元の画像はコントラストが十分でなく、カメラ由来の縦縞状のノイズの影響を受けてしまう。しかし、この縦縞のノイズは位置が固定されているので粒子がない状態の背景画像を減算処理することにより除去することを試みた。また図 4-60 に、粒子の面積分布を計測した結果を示す。直径 5 μ m と直径 10 μ m のビーズを画像で識別可能であることがわかった。

4. 3. 6. 6 改良したセルソーティングチップにおけるソーティングの確認

図 4-61 に、図 4-57 に示したセルソーティングチップを用いて、直径 10 μ m のポリスチレンビーズの電場による軌跡の変化を観察した時の顕微鏡写真を示す。粒子像の軌跡を観察するために流速を 2 mm/s 程度まで遅くした。流路内のバッファを純水にして実験したところ、印加した電圧が 1.4 V と小さくても流れの軌跡に変化を与えること

ができ、ビーズが分離されることが分かった。電場を印加しない場合、粒子は進路を変えずに直線流路を流れるが、マイナスに帯電しているために、電場を印加した場合は電極の+極側へ流れがシフトし、分岐用流路へ流れて分離される様子が観察できた。

4. 3. 7 メンブレンフィルター付リザーバー内での細胞培養

4. 3. 7. 1 メンブレンフィルターの機能性評価

表 4-5 に、メンブレンフィルターの種類別の評価結果を示す。評価は、耐熱性、しわ、親水性、透明度を○、△、×の3段階で評価した後、総合評価を行った。この結果から Omnipore、Isopore、Express、Nylon を培養リザーバー用フィルターの候補として選定した。各フィルターにおいて、耐熱性、しわ、親水性、透明度のポアサイズ依存性は認められなかった。

4. 3. 7. 2 メンブレンフィルターの細菌透過性

4. 3. 7. 1 の評価の結果残ったフィルター候補について、図 4-62 に示すように各フィルターに A~K までの文字を割り当て分別した。Omnipore のポアサイズが 0.1 μm を A、0.2 μm を B、0.45 μm を C、1.0 μm を D とし、Isopore のポアサイズが 0.1 μm のフィルターを E、0.2 μm のものを F、0.4 μm を G、0.8 μm を H とし、Nylon の 0.2 μm を I、0.45 μm を J とし、Express のポアサイズが 0.45 μm のものを K とした。図 4-63 に、寒天培地に現れた大腸菌コロニーの数から換算したフィルターごとの大腸菌濃度を示す。この結果から、Nylon のようにポアサイズが 0.2 μm と非常に小さなフィルターであっても、大腸菌が通り抜けることがあり、同じポアサイズであってもフィルターの素材に依存して大腸菌の透過率が異なることがわかった。

4. 3. 7. 3 チップ内細胞培養

細菌の透過性およびフィルターの性質から、これまでの評価で結果が良好であった Omnipore のポアサイズ 0.1 μm (A)、0.2 μm (B)、0.45 μm (C) の3種について、実際にセルソーティングチップの回収リザーバーにフィルターを取り付けて培養実験を行った。図 4-64 の上段に培養 1 日目のチップの写真を、中段および下段に培養リザーバー内のマウス心筋細胞の顕微鏡写真を示す。また図 4-65 の上段に培養 2 日目のチップの写真を、中段に培養リザーバー内の顕微鏡写真を、そして下段には培養リザーバー内外から回収した培地を寒天培地に塗布してインキュベートした結果の写真を示す。フィルターC (ポアサイズ 0.45 μm) のフィルター内部は、大腸菌が混入していた(約 $1 \times 10^{10 \sim 12}$ CFU/ml)。フィルターB (ポアサイズ 0.2 μm) は、混入率はフィルターCと比較すると極めて低いが、約 6.7×10^3 CFU/ml の大腸菌の混入が確認された。しかしながら、フィルターA (ポアサイズ 0.1 μm) 内部に細菌 (大腸菌) の混入は認められなかった。つまり、フィルターAは、細菌 (大腸菌) に汚染される事なく、マウス心筋細胞の培養が可能である事が確認された。これら一連の実験の結果から、セルソーティングチップの培養リザーバーには Omnipore のポアサイズ 0.1 μm のフィルターが最適である事がわかった。

4. 4 考察

4. 4. 1 ゲル電極について

本研究では、流路を流れる細胞を別の流路に移動させるために、アガロースゲル電極への直流電場印加という手法を採った。このため、電極間に 1V 以上の電圧を印加しても金属電極のように電気分解による気泡を発生させることなく細胞を移動させることができた。また、使用するバッファーに通常の培養液を使用できることは細胞培養を目的とする場合、大きな利点であると言える。ゲル電極内の電荷を担う主なキャリアはナトリウムイオンおよび塩化物イオンであるが、これらは培地にも含まれており、ゲル電極内のイオンの濃度勾配は起こりにくいと考えている。しかしながら、直流電場を用いたソーティング方式特有の課題もある。一般的に細胞の表面は糖鎖で被われており、糖鎖の末端にはシアル酸というマイナスの電荷を持った糖が結合している。これにより、細胞表面にはマイナス電荷の層が形成される。種類や状態によっては、この部分にカルボキシル基などが結合し、電氣的にマイナスの状態やプラスの状態に変化する。表面電荷の極性が異なる細胞群を直流電場によるソーティングによって分離するためには、細胞の種類や電荷の極性に応じて、電場の強度や方向を変化させる必要がある。図 4-66 は、直径 $2\ \mu\text{m}$ のビーズと $250\ \mu\text{M}$ のフルオレセインを混合したサンプルを純水で満たしたセルソーティングチップに流し、直流電圧を印加した時の様子を示す。わかりやすくするために疑似カラーで $2\ \mu\text{m}$ ビーズを緑、フルオレセインを赤で着色した。電圧が未印加の状態ではどちらも流路中の同じ場所を流れたが、 $70\ \text{V}$ の直流電圧を印加すると、 $2\ \mu\text{m}$ ビーズのみが廃棄流路に移動し、フルオレセインと分離できた。もしゲル電極によるソーティングが電気浸透流のみの作用で実現されているならば、フルオレセインもビーズと同じように廃棄流路に流れ込んだはずである。したがって、ゲル電極によるソーティングにおいては、電気浸透流だけの作用ではなく電気泳動による寄与が大きいことを示唆している。

4. 4. 2 細胞画像の像質改善について

4. 3. 5で述べた被写界深度を拡大する技術開発では、低開口数レンズを使用しているために高開口数レンズを用いた場合と同等の空間分解能を得ることは難しいが、Z軸シースなどにより粒子の高さ位置を精密に制御することができれば、深い被写界深度は必要がなくなる。そのため、高開口数対物レンズを用いての画像取得が可能となり、画像解析結果に大幅な改善が期待できると考えられる。ただ、今回検討したZ軸シースフローでは流路底面に細胞を押しつける方式のため、流路中を移動している細胞と静止している壁面との間のシアーストレスにより細胞が損傷を受ける可能性もある。例えばZ軸シースフローとして、流路の上下両方向から細胞を挟み込めば非常に狭い範囲に細胞を整列させることも可能と考えるが、セルソーティングチップの設置や送液制御が難しくなることが予想される。今後は、被写界深度の拡大と送液制御の両面から撮影画像の質を高める技術開発を進めたいと考えている。

4. 4. 3 1/2,000 秒オンチップ・セルソーターの課題

ソーティングの処理速度向上を図る目的で 1/2,000 秒カメラを用いた装置試作を行ったが、1/2,000 秒カメラの画像に縦縞のノイズが多く発生しており、ポリスチレンビーズという単純な形状の画像認識においても特に 10 μm ビーズの認識で誤差が多い原因となっている。このノイズは、イメージセンサを制御するファームウェアがまだ不十分であったことに加え、同時に開発したパルス LED 光源の輝度が、特に 1 μs の発光時間で撮影するには不十分であったためにカメラのゲインを上げたことでより強調される結果となった。画像のノイズはカメラのファームウェアのアップデートで今後改善が期待できるが、十分な光量で撮影ができるようより明るい LED 素子の探索や効率の良い照明光学系の検討を続けたいと考えている。

4. 4. 4 1/10,000 秒ソーティング実現に向けての検討

現時点で最も処理速度の速い細胞分離技術は、ジェットノズルと液滴荷電によるセルソーターであり、数万細胞/秒の処理速度を謳っている。しかし、性能評価用ビーズを用いた実験では 10,000 処理/秒となる流速での回収率は 80 %前後であり、以後流速が増すごとに回収率が低下するのが実情である。そのため、既存のセルソーターとの性能比較、特に処理速度における比較では、10,000 処理/秒が一つの基準となると考えている。

一方、1/10,000 秒インターバルで撮影ができ、リアルタイム画像転送が可能な高速カメラも登場してきており、画像認識という点では 10,000 処理/秒も視野に入ってきていると考えている。そこでここでは、これまでに得られたデータから 1/10,000 秒ソーティングの実現可能性について考察する。

図 4-67 に、PDMS セルソーティングチップを用いて、純水中で 2 μm ビーズを 200 mm/s の流速で流しながらソーティング電圧を印加し続けた時のソーティング効率、および電圧印加によってビーズが流路中を移動する時のシフト量を示す。図 4-67 (a) に示すように、電圧の増大とともにソーティング効率も上昇し、電圧を 45 V 印加した場合には 90 % のビーズが廃棄用流路に移動した。一方、ビーズの流路中におけるシフト量については図 4-67 (b) に示すように、同じ流速であれば印加電圧に比例してシフト量も増加することがわかる。流速の増大と共に急激にシフト量が減少するため、僅かのシフト量であっても不要粒子を廃棄用流路に移動させられるような流路形状への改良が重要である。図 4-68 は、PDMS セルソーティングチップのソーティングエリア部分の模式図に、ソーティング電圧を印加した場合としない場合のビーズの軌跡を重ねたものである。この図から、ビーズが電場の作用を受けて移動を始めてから廃棄用流路に移動が完了するまでの作用領域は、およそ 80 μm であることがわかる。図 4-67 (a) では 45 V の電圧印

加で 90 %のビーズが 80 μm の作用領域を流れる間にソーティングされたことになり、この間にかかる時間は 400 μs である。比例計算が成り立つと仮定すると、1/10,000 秒、すなわち 100 μs の電圧印加時間でソーティング効率を 90 %とするためには、45 V \times (400 μs /100 μs) =180 V の電圧が必要と見積もることができる。

4. 4. 5 高速ソーティングにおける層流の維持について

本章で開発したオンチップ・セルソーターにおいては、実際に一細胞単位で細胞を分離しようとする場合、細胞を観察してからその細胞を判別し、後段において電場による外力を加えて分離するために、観察領域に細胞を一系列に整列させる必要がある。細胞の整列についてはいくつかの方法があるが、本開発ではサイドシースフローを流路の両側面から合流させ、それによって細胞を整列させることが有効であった。この時の課題は、細胞を流す中央の流れと両側面のサイドシースフローが互いに層流を形成する必要があることである。層流を形成するためには、まず、3つの流れが脈流とならない一定の静かな流れであることが必要である。これについては、重力を利用したパスカルの原理に基づいた流れの発生が可能であることを確認し、さらに同一容器内でリザーバーの液面を空気で加圧することによって層流を維持したまま流速を自在に可変できることも確認することができた。層流の維持については、レイノルズ数について考察することが有効である。レイノルズ数 R_e は以下の式で表される。

$$R_e = \frac{UL\rho}{\mu} = \frac{UL}{\nu} \quad (4.12)$$

ここで、 U は流速[m/s]、 L は微小流路の大きさ（直径）[m]、 ρ は密度[kg/m³]、 μ は粘度[kg/ms]、 ν は動粘性係数[m²/s]である。レイノルズ数は流体に対する慣性力と粘性力の比を表しており、微小流路など非常に細い空間における流れでは、流体分子が流路壁面から受ける粘性抵抗の影響が大きくなり小さな値となる。一般に 2,000 以上では乱流、それ以下では層流となり、この値を臨界レイノルズ数と呼ぶ。

本章の実験系においてレイノルズ数を求めると、流速を図 4-20(b)の最大速度 160 mm/s を用いた場合でも 8 となり、臨界レイノルズ数よりも十分に低い領域の値であるため、10,000 処理/秒を実現できる可能性を持つことがわかる。

4. 5 第4章のまとめ

高速カメラとリアルタイム画像処理とを組み合わせたオンチップ・セルソーターを開発した。この装置の主要部を成すセルソーティングチップは、微細加工技術を用いて作製した。金属電極に代わるアガロースゲル電極への電圧印加によって不要粒子を廃棄用流路に移動させる動作原理によって、大きさの異なる2種類のポリスチレンビーズの混合サンプルから一方を分離する実験では、流速が2.5mm/s未満であればソーティングのエラー率は5%未満に収まることがわかった。また、細胞を用いた実験では大きさや輝度レベルの違いによって分離することができ、細胞の画像に基づいた分離手法が実用的な応用においても有効であることが示唆された。さらに、より高速な処理を目指し、1/2,000秒カメラとFPGAを用いて2,000回/秒にリアルタイム画像処理速度を向上させたオンチップ・セルソーターを試作し、高速度撮影に適した照明用光源および撮影光学系、そして微小流路内を流れる細胞の高さ方向のばらつきを抑えるためのZ軸シースフローの効果についても評価を行った。また、セルソーティングチップの回収リザーバーにメンブレンフィルターを取り付け、外部からのコンタミネーションを防ぎながら細胞培養リザーバーとして使用するチップ内培養技術についても検討した。通常の細胞培養の培地成分には抗生物質が添加されているが、抗生物質に耐性を持つ細菌類が混入した場合、培養細胞が細菌に汚染されてしまう。しかしながら、メンブレンフィルター付培養リザーバーでは培養リザーバー外部に非常に高濃度の細菌が存在していても、培養リザーバー内部へのコンタミネーションを回避することができた。さらに、新規開発の培養リザーバーの利点は、メンブレンフィルターが固定してある状態であっても、顕微鏡下でフィルターを通して培養細胞を観察出来ることにある。

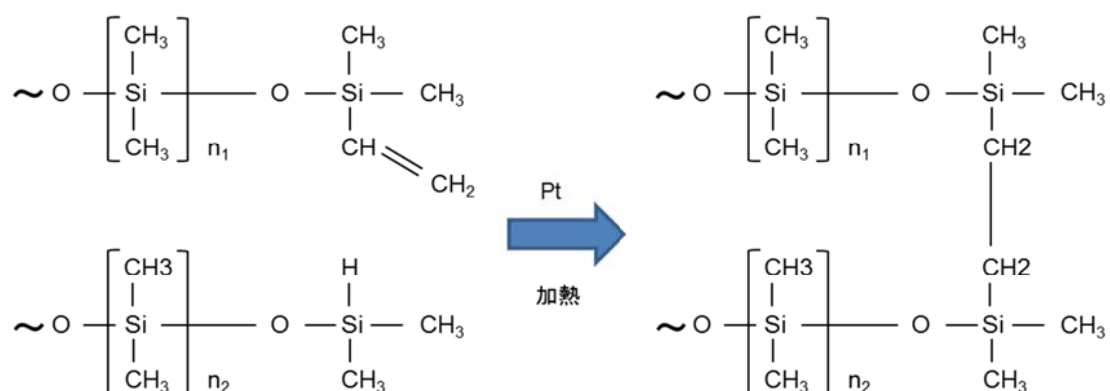


図 4-1 PDMS の構造と重合過程。

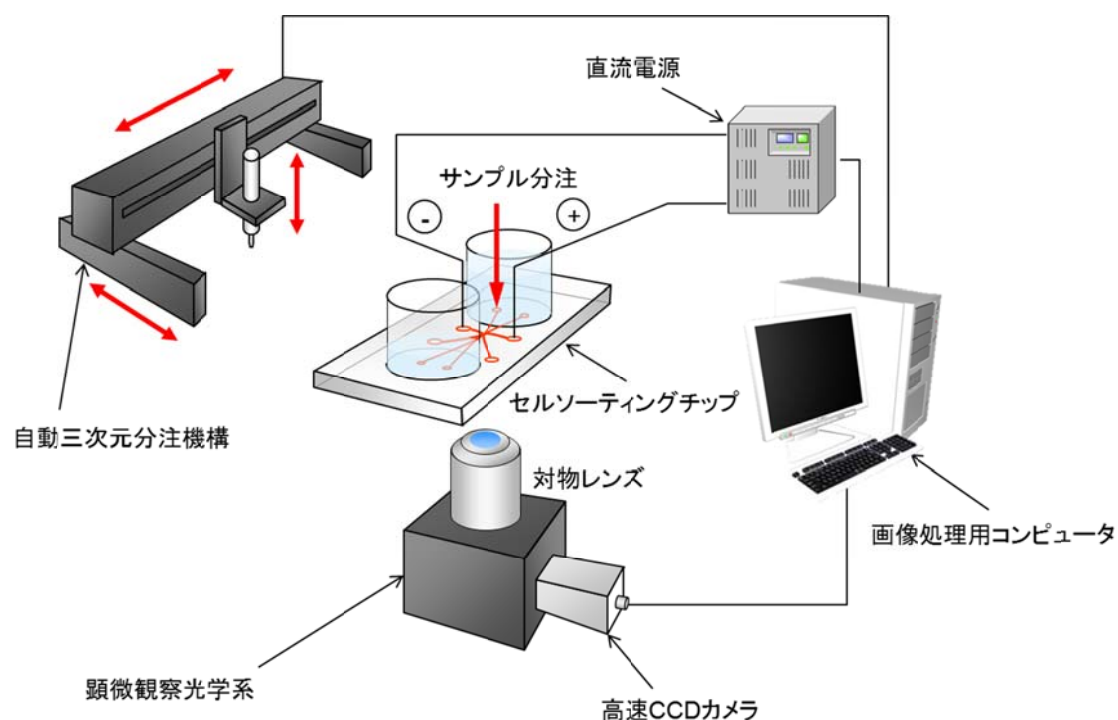


図 4-2 オンチップ・セルソーターの模式図。高速カメラが 5ms ごとにセルソーティングチップ内を流れる細胞を撮影すると同時に、画像処理用コンピュータがリアルタイム画像処理を行う。画像処理用コンピュータはまた、画像処理の結果に基づいて分離信号を直流電源に出力し、信号を受けた直流電源が流路中で細胞を分離するための電圧をセルソーティングチップに印加する。自動三次元分注機構は、エッペンチューブなどに用意されたサンプルをセルソーティングチップに分注すると共に、精製された細胞をチップから回収する役割を担う。

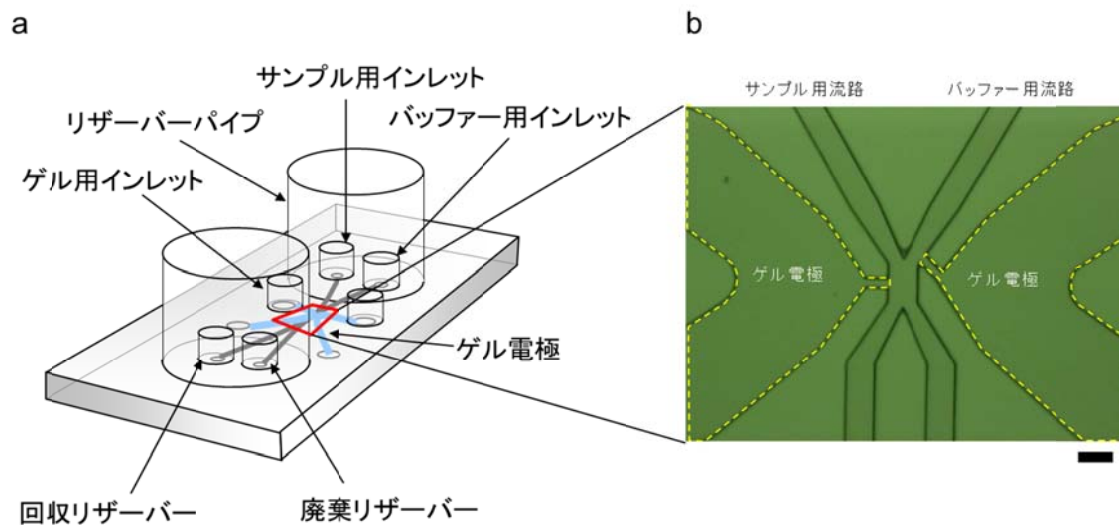


図 4-3 セルソーティングチップの構造。(a) セルソーティングチップ全体の模式図。
 (b) チップ中央付近の顕微鏡写真。サンプル用流路およびバッファ用流路はチップの中央部分で結合するように配置されており、それぞれの流路の流れは結合部分で層流の境界面を成している。そのため、サンプル用インレットに分注されたすべての細胞はそのままサンプル用流路を流れ、最終的に回収リザーバーに到達する。流路の幅は $50\mu\text{m}$ 、深さは $25\mu\text{m}$ である。また、サンプル用流路およびバッファ用流路の結合部の外側には電解質を含ませたアガロースゲルを充填した流路がゲル電極を構成しており、細いブリッジによって中央の流路結合部に連結している。ゲル電極用流路の幅は $200\mu\text{m}$ である。バーは $50\mu\text{m}$ の長さを示す。

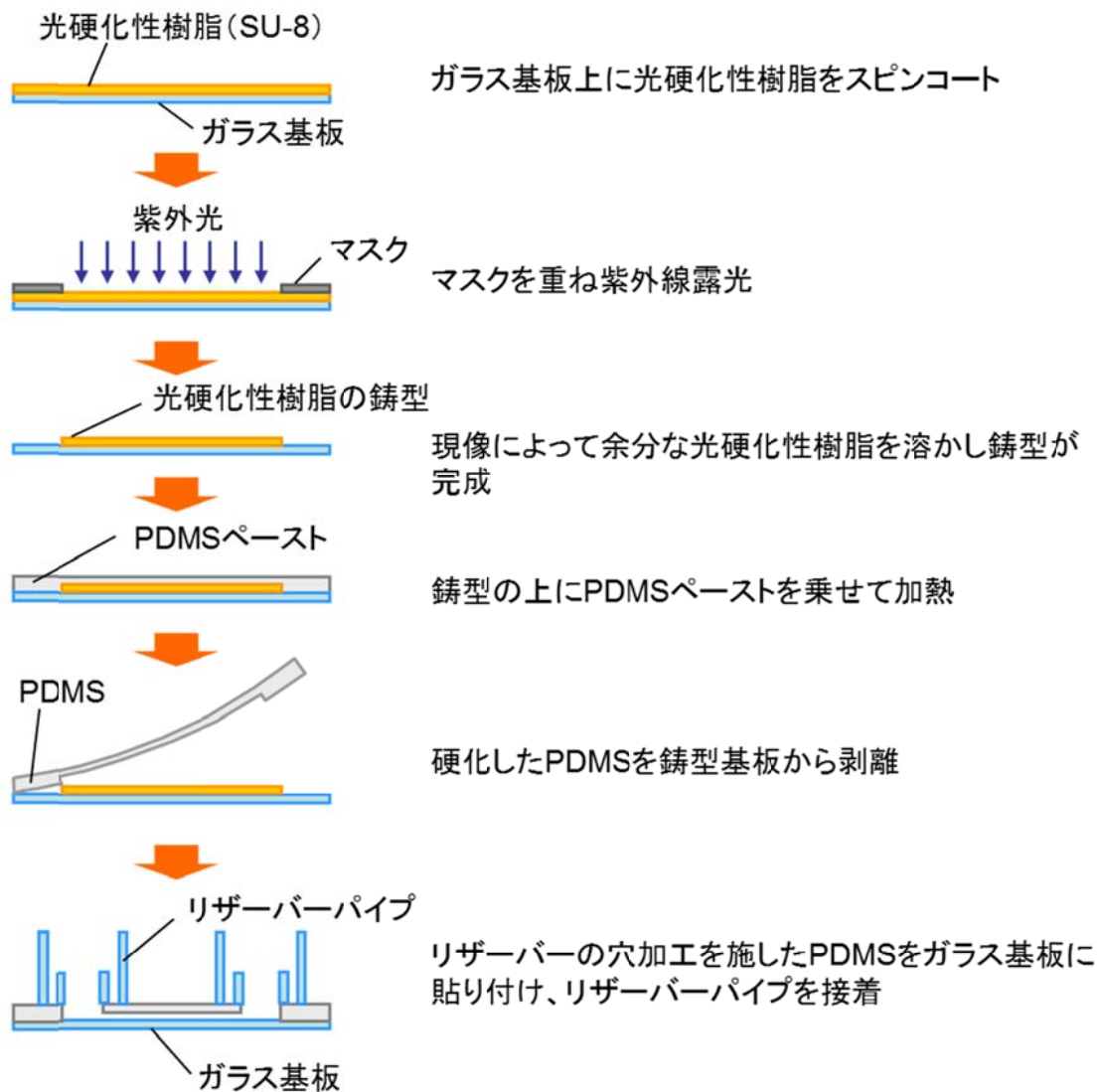


図 4-4 セルソーティングチップの作製工程。

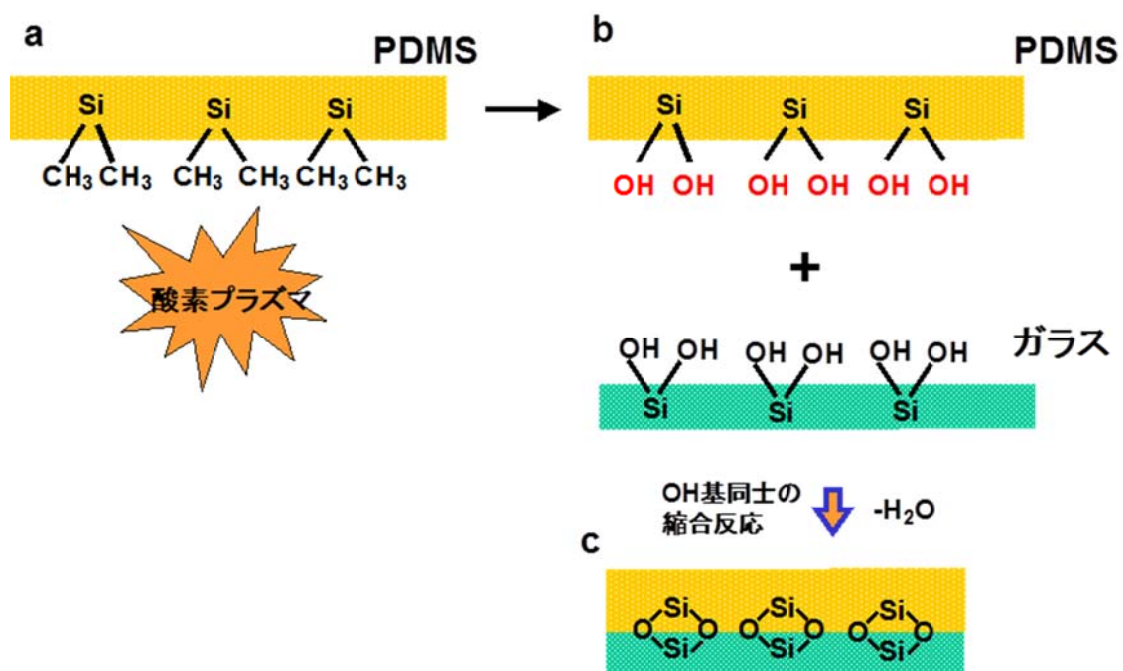


図 4-5 PDMS とガラスの間の不可逆的な接合。(a) 元々、PDMS 表面にはジメチル基が露出しているが、(b) 一定条件の酸素プラズマ処理によってジメチル基が水酸基に変化し、(c) 洗浄済みのガラスと張り合わせることにより、不可逆的な接合を形成することができる。

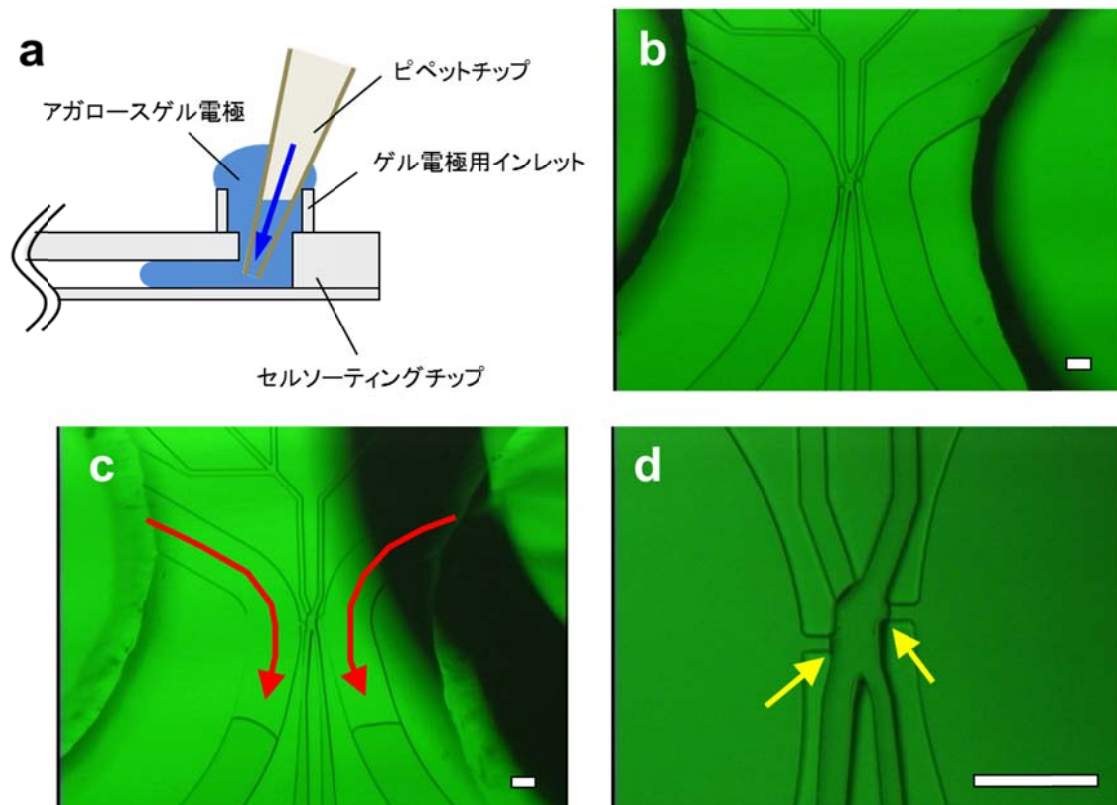


図 4-6 アガロースゲル電極のセルソーティングチップへの充填手順。(a) ゲル充填方法。ピペットチップでゾル状のアガロースゲル電極をゲル電極用インレットに $100 \mu\text{l}$ 分注する。(b) ゲルを充填する前のチップの顕微鏡写真。(c) ゲル充填中の写真。ゾル状アガロースは毛細管現象により、ゲル電極用流路を矢印の方向に進む。(d) 細胞が流れる流路とゲル流路とをつなぐ短い通路の幅は十数 μm 程度と細く絞り込まれているため、ゲルは表面張力によって細胞が流れる流路にあふれ出ることなく界面を形成する (黄矢印)。スケールバーの長さは $100 \mu\text{m}$ を示す。

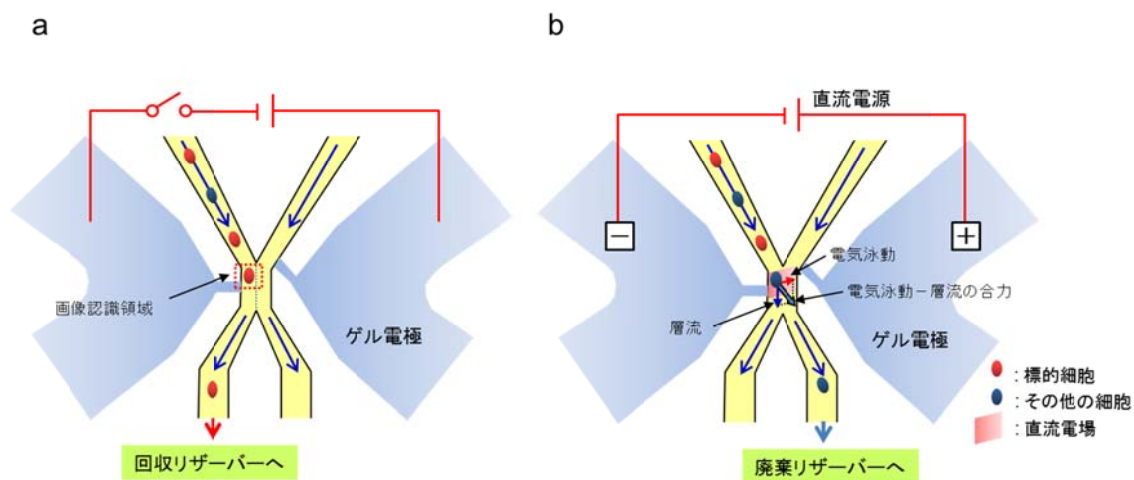


図 4-7 セルソーティングの原理。(a) 流路中を流れる細胞は、サンプル用流路とバッファ用流路の合流部分に設定された画像認識領域を通過する際に撮影された画像を元に要/不要の判定を受ける。標的細胞だと認識された場合には直流電圧は印加されず、細胞はそのまま層流に運ばれて回収リザーバーに向かって流れる。(b) 標的細胞でない細胞であると認識された場合には、ゲル電極間に直流電圧が印加されて細胞は電気泳動によってバッファ用流路側に移動し、廃棄リザーバーに集まることとなる。

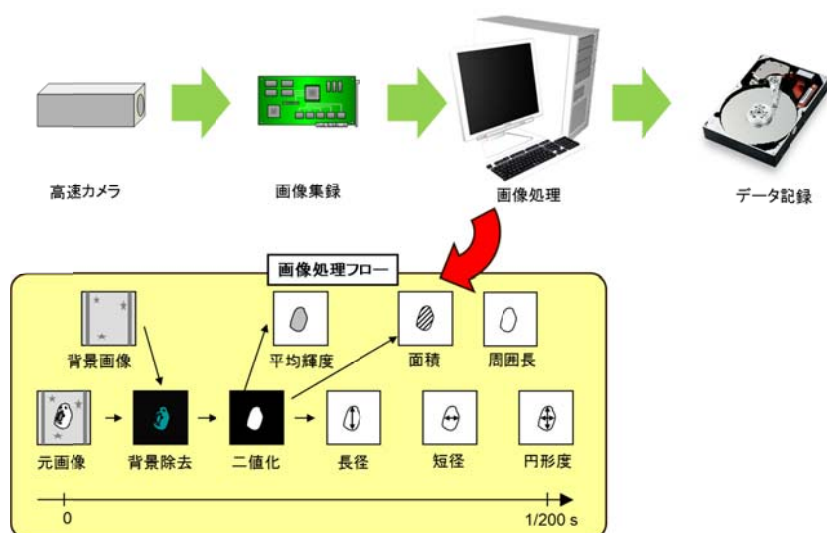


図 4-8 1/200s リアルタイム画像処理の流れ。(a) 200fps 高速カメラを用いたリアルタイム画像集録および画像解析の処理内容を示した図。画像処理用コンピュータのソフトウェアは、画像集録から細胞画像における各種特徴量の算出、そしてハードディスクへのデータ記録までの作業を 5ms 以内で実行する。

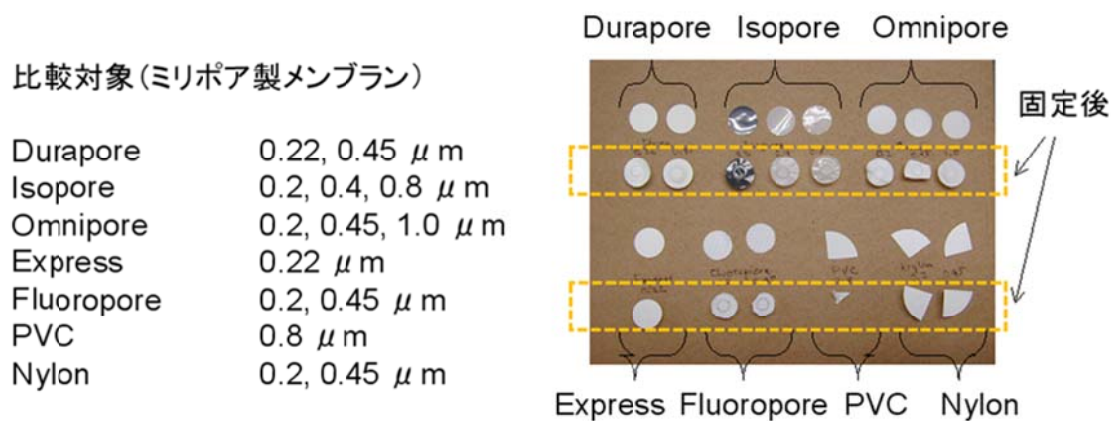


図 4-9 コンタミネーション防止用フィルターとして比較したメンブランフィルター。



図 4-10 メンブランフィルターのアクリルパイプへの圧着方法。約 110℃に熱した小型アイロンのコテにメンブランフィルターを乗せ、アクリルパイプを 2～5 秒間押しつけて熱圧着した。

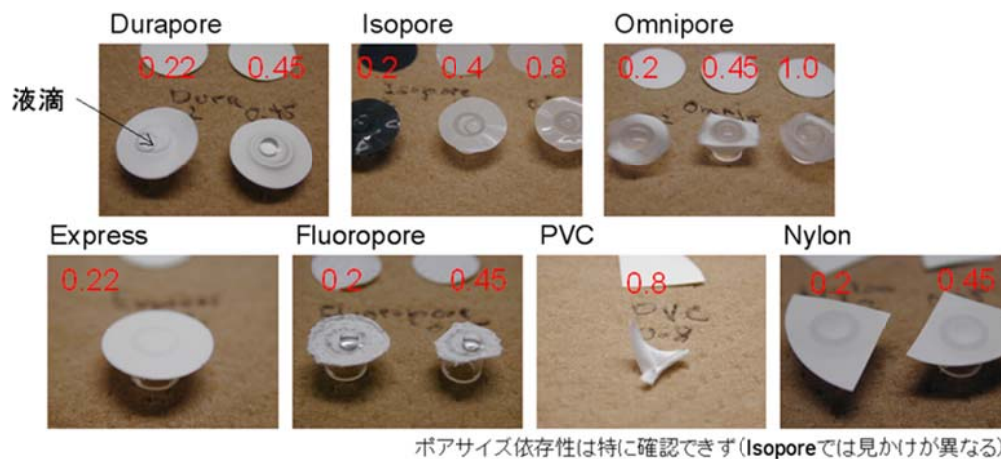


図 4-11 メンブランフィルターの親水性評価。アクリルパイプに圧着したフィルター上に 10 μl の純粋を滴下し、親水性と透明度を評価した。

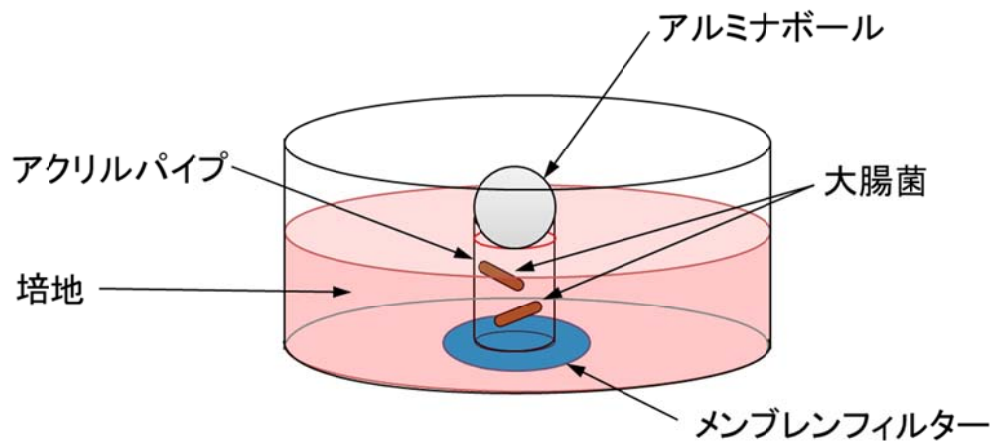


図 4-12 メンブレンフィルターの細菌透過性を評価する実験系の模式図。

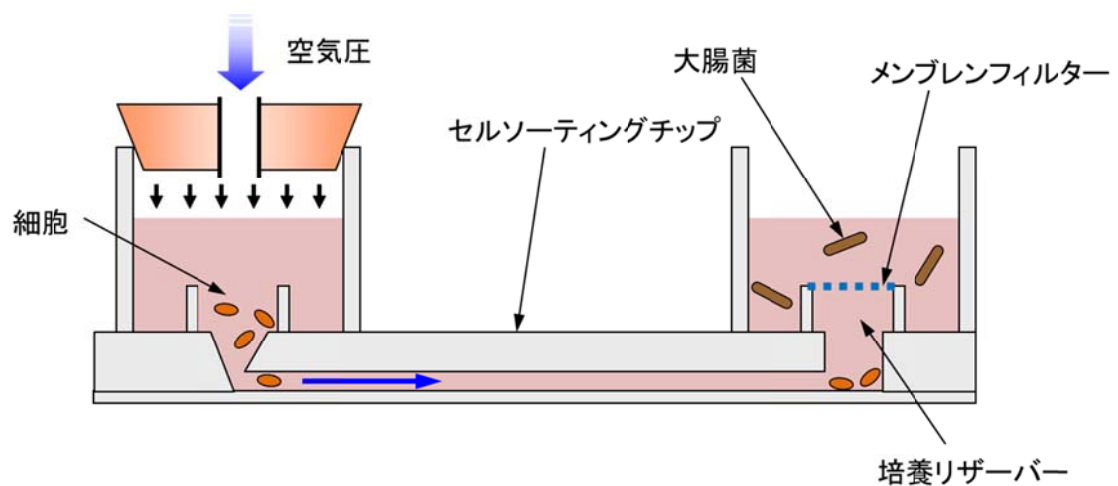


図 4-13 チップ内細胞培養における評価系の模式図。培養リザーバーの内と外はメンブレンフィルターで隔てられており、あらかじめ培養リザーバーの外側に大腸菌を加えた。

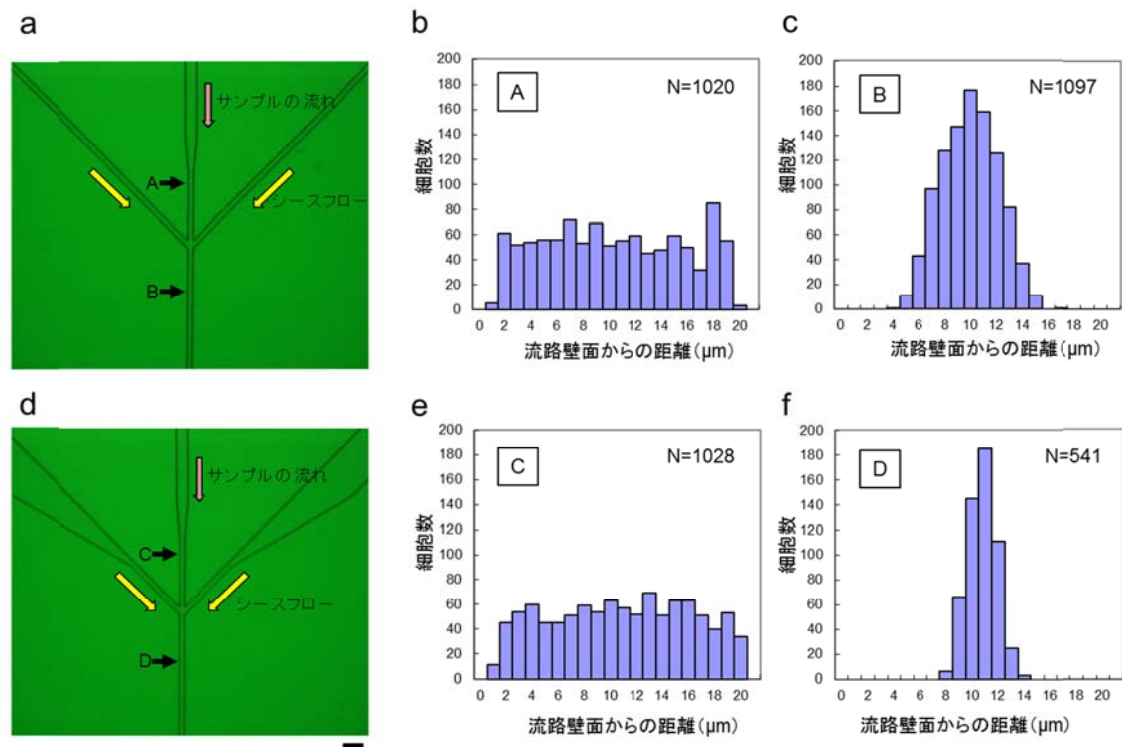


図 4-14 サイドシースフロー用流路の形状の違いによる細胞の整列効果の評価。(a) 動作評価用に作成したチップの顕微鏡写真。サンプル用流路およびサイドシースフロー用流路の幅は共に $20\mu\text{m}$ である。(b) チップの上流から流したウマ赤血球の A における流路内の細胞分布。(c) B における細胞分布。(d) サイドシースフロー用流路の幅が $200\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ まで連続的に細くなりながらサンプル用流路に合流するように作成した動作評価用チップの写真。(e) C における細胞分布。(f) D における細胞分布。スケールバーの長さは $100\mu\text{m}$ を示す。

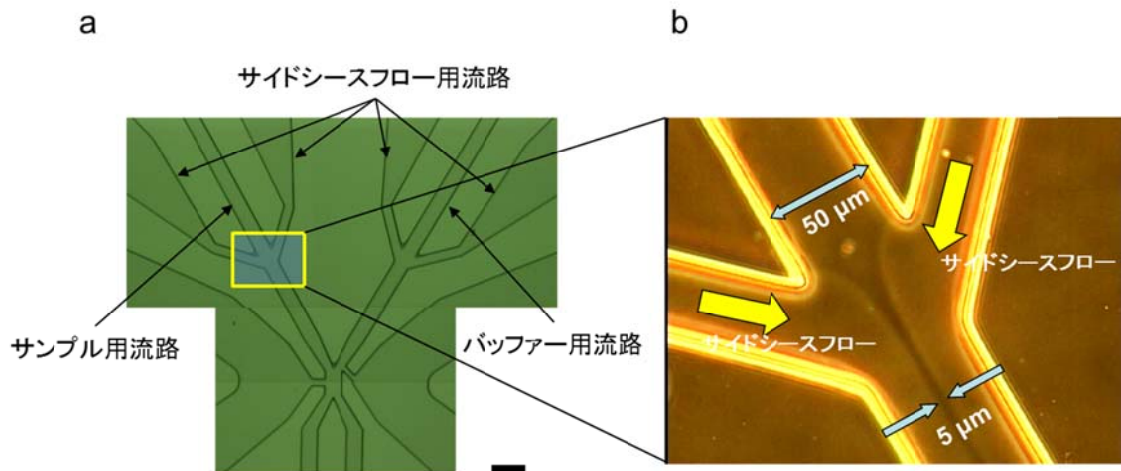


図 4-15 サイドシースフロー用流路のあるセルソーティングチップ。(a) サンプル用流路およびバッファー用流路それぞれにサイドシースフロー用流路が接続しているセルソーティングチップの顕微鏡写真。(b) サンプル用流路とサイドシースフロー用流路との合流部の拡大写真。サイドシースフローの挟み込みによって、細胞は流路中央に 5 μm 以内の幅で整列した。スケールバーの長さは 100 μm を示す。

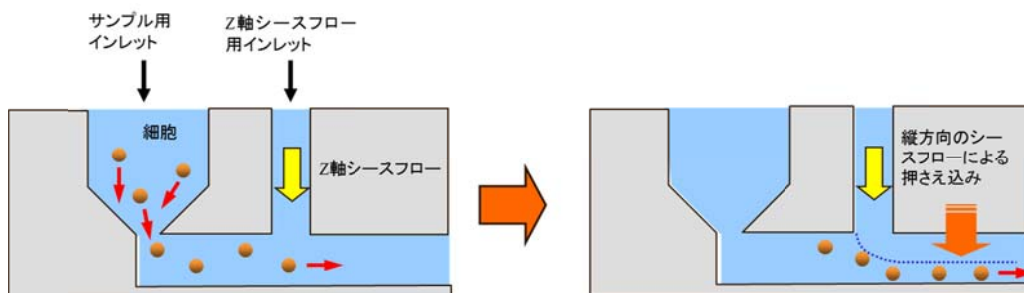


図 4-16 Z 軸シースフローの原理。サンプル流の下流側から Z 軸シースフローを合流させ、流路中を流れる細胞を流路の下部に押さえつけることで高さのばらつきを軽減する。

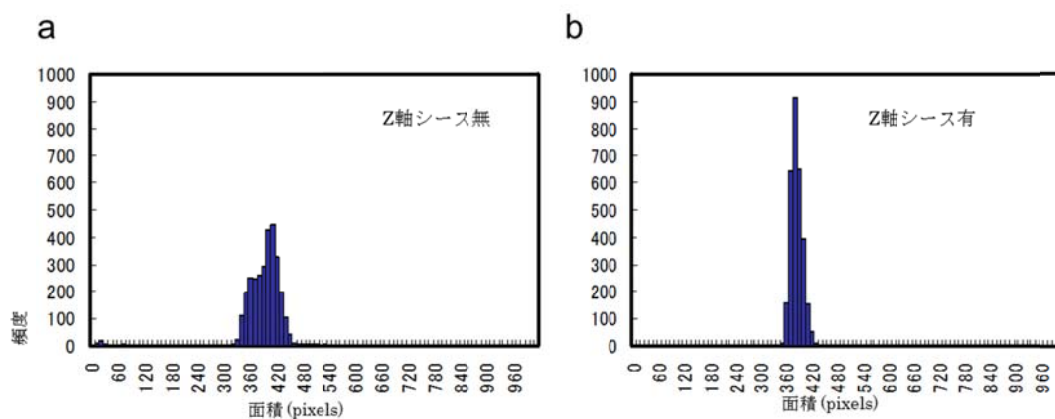


図 4-17 Z 軸シースフローによる深さ方向の粒子分布。直径 $2.5 \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを流して画像認識させた。(a) Z 軸シースフローなしで測定した時の粒子面積の分布幅。(b) Z 軸シースフローありの場合の粒子面積の分布幅。Z 軸シースフローによって流路深さ方向の分布幅が半減した。

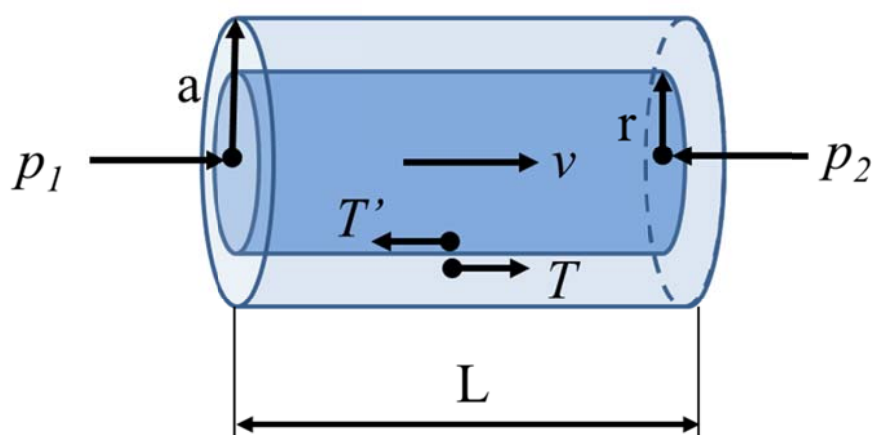


図 4-18 平均流速 V を導くための円筒モデル。

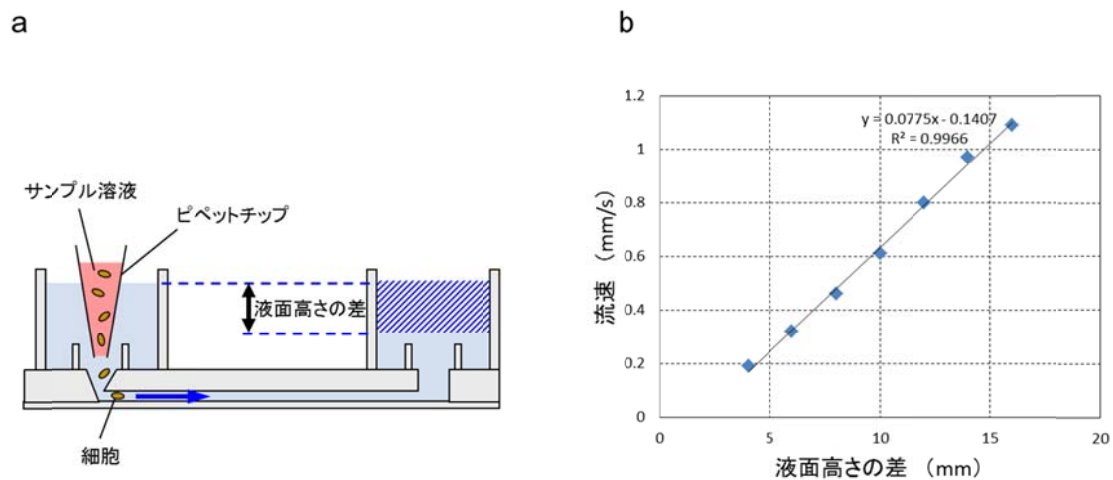


図 4-19 重力エネルギーを駆動源とした送液制御。(a) セルソーティングチップの断面図。サンプル用インレットのある上流側と下流側のリザーバーにおける液面高さの差から生じる重力エネルギーによって細胞を駆動する。(b) リザーバーの液面高さの差から生じるバッファの体積差と流路内の細胞の流速をプロットしたグラフ。

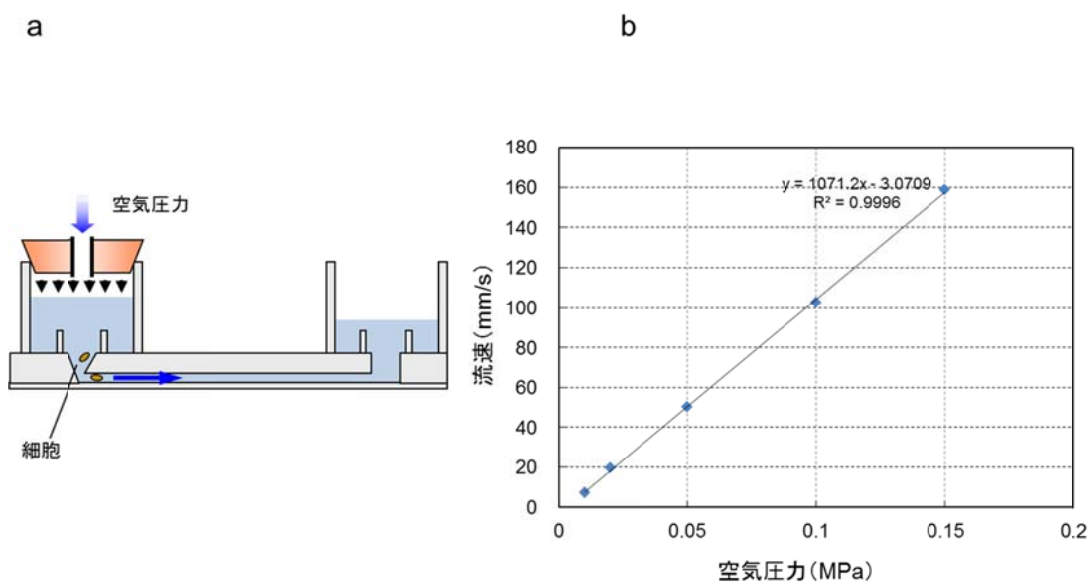


図 4-20 空気圧力を駆動源とした送液制御。(a) セルソーティングチップの断面図。サンプル用インレット側を加圧することで細胞を駆動する。(b) リザーバーへ加圧した空気圧力と流速をプロットしたグラフ。圧力に比例して流速は増加し、150mm/s に達した。

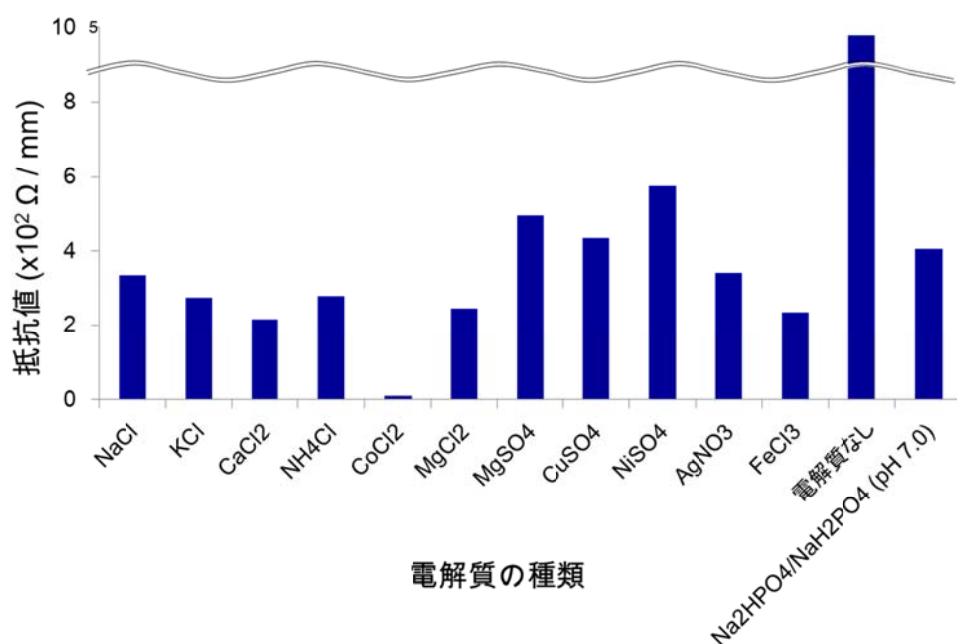


図 4-21 様々な電解質の抵抗値。測定には、各電解質を濃度 0.5M となるように調製した後、粉末のアガロスを濃度 1% (w/v) となるよう加えて電子レンジで加熱・溶解し、内径 1mm のシリコンチューブに充填したものを用いて単位長さあたりの抵抗値を求めた。

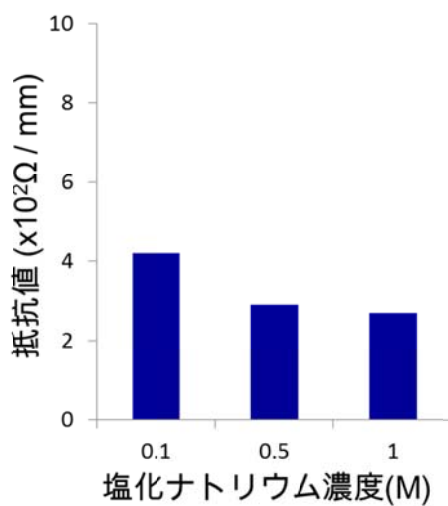


図 4-22 ゲル電極の電解質として塩化ナトリウムを用いた場合の、抵抗値の塩化ナトリウム濃度依存性。

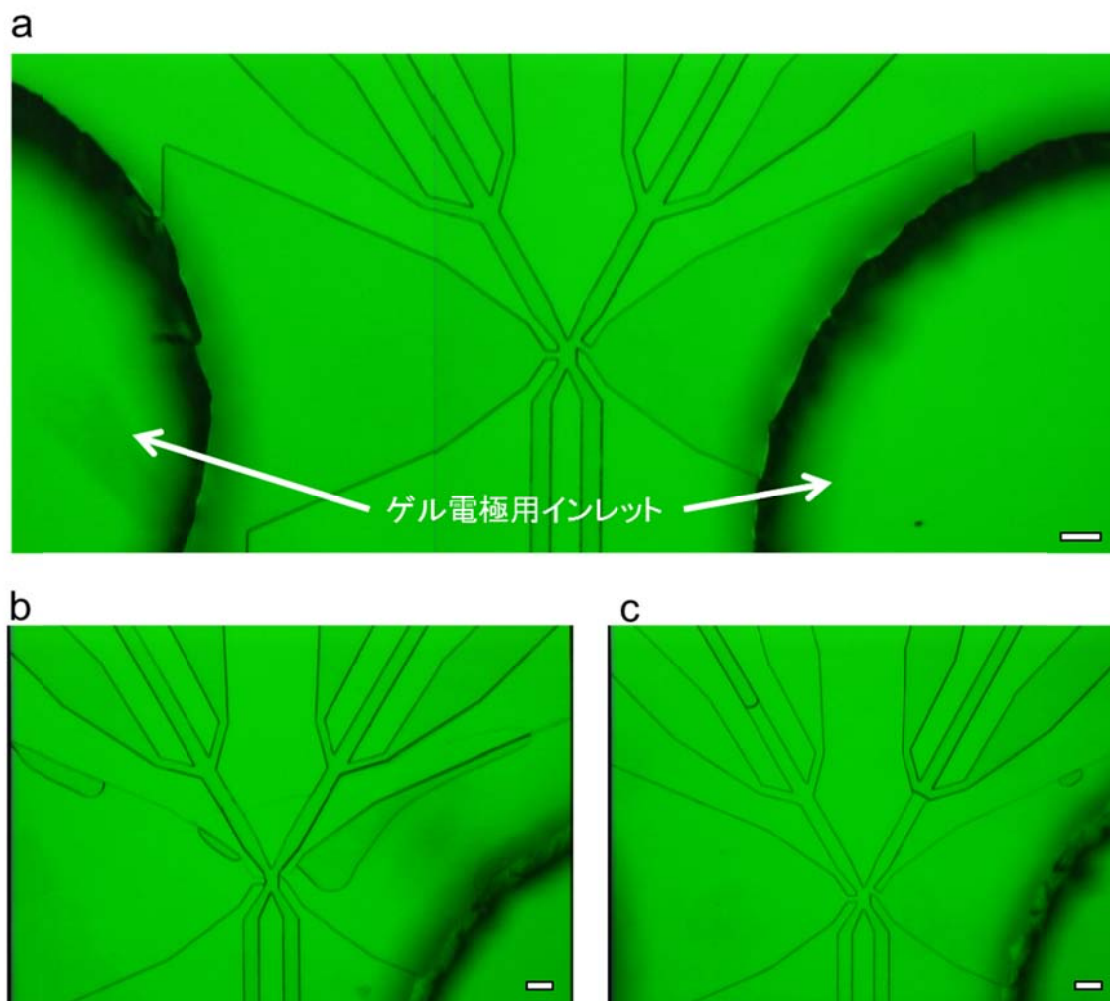


図 4-23 初期のゲル電極用流路。(a) ゲル電極用の充填空間が流路形状ではなく、三角形をした初期型のチップ。(b) ゲル電極の充填空間にムラができてしまった失敗例。(c) ゲルサンプル/バッファー用流路まで溢れ出てしまった失敗例。スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ を表す。

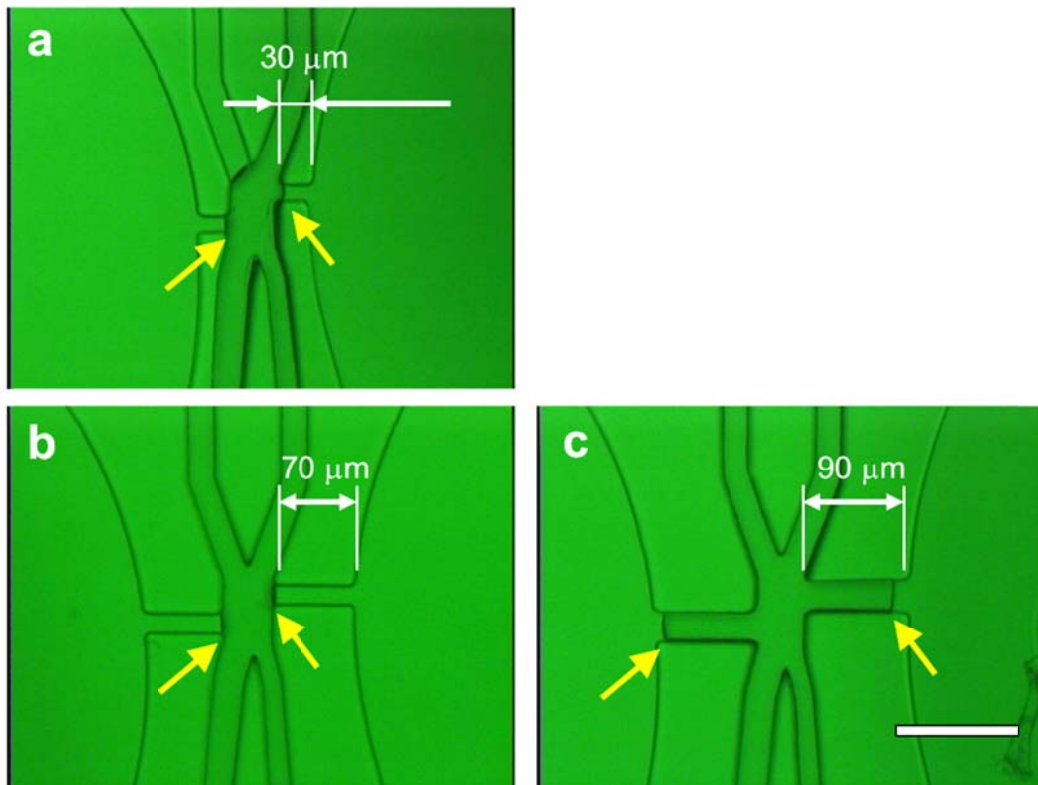


図 4-24 ゲル電極充填時におけるゲル充填パターンのブリッジ長依存性。ブリッジの長さは、(a) が $30\mu\text{m}$ 、(b) が $70\mu\text{m}$ 、そして (c) が $90\mu\text{m}$ である。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表す。

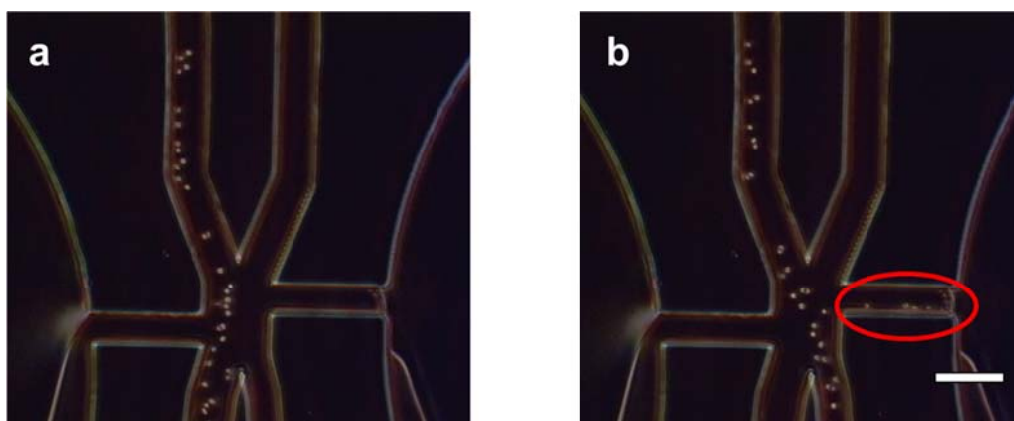


図 4-25 ゲル電極のブリッジ部分への充填が不十分であった場合のソーティングへの影響。(a) はソーティング電圧が未印加の状態。(b) は 10V の直流電圧を印加した状態。サンプルに用いたウマ赤血球の一部が、ゲルの充填されていないブリッジ部分に入り込んだ。スケールバーの長さは $50\mu\text{m}$ 。

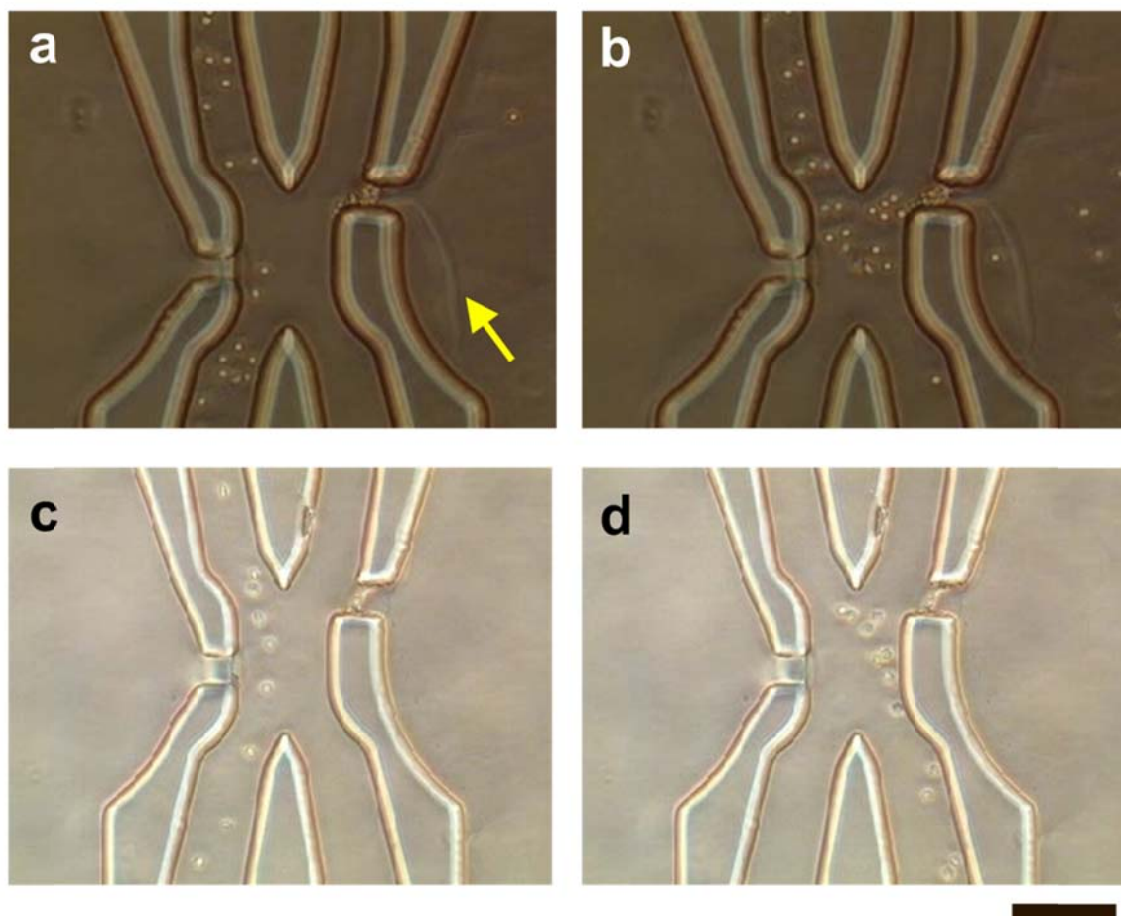


図 4-26 ゲル電極の冷凍保存がソーティングに及ぼす影響。(a) 冷凍保存したゲル電極入りソーティングチップを解凍し、ウマ赤血球を流した時の顕微鏡写真。(b) (a) のチップに 10V の直流電圧を印加した時の顕微鏡写真。冷凍-解凍過程でゲル電極とゲル電極用流路との間に隙間が生じ（黄矢印）、電圧印加時にサンプルが隙間に流れ込んだ。(c) ゲル電極にトレハロースを添加したソーティングチップを冷凍保存後、解凍してウマ赤血球を流した時の顕微鏡写真。(d) (c) のチップに 10V の直流電圧を印加した時の顕微鏡写真。トレハロースを添加した場合にはゲルの縮退は起こらず、ソーティング時にサンプルがゲル電極用流路に進入することもなかった。スケールバーの長さは 50 μm 。

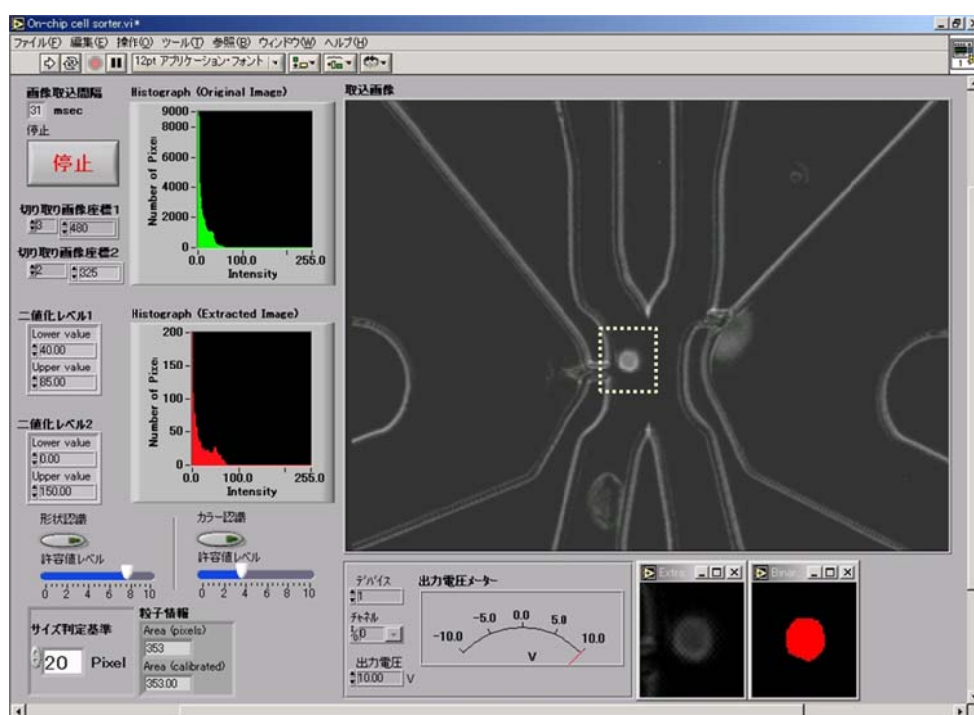


図 4-27 1/30 秒カメラを用いたリアルタイム画像処理のアルゴリズム検討用に開発したソフトウェア画面。

表 4-1 1/30 秒カメラ用セルソーティングソフトウェアにおける画像処理プロセスの平均実行時間。

| 処理内容 | 平均実行時間 (ms) |
|--------|-------------|
| 画像取得 | 0.1 |
| 画像切り出し | 7.3 |
| 二値化 | 3.3 |
| ノイズ除去 | 0.1 |
| 粒子解析 | 12.4 |
| 粒子計測 | 0.2 |
| 画像描画 | 7.4 |
| 合 計 | 30.8 |

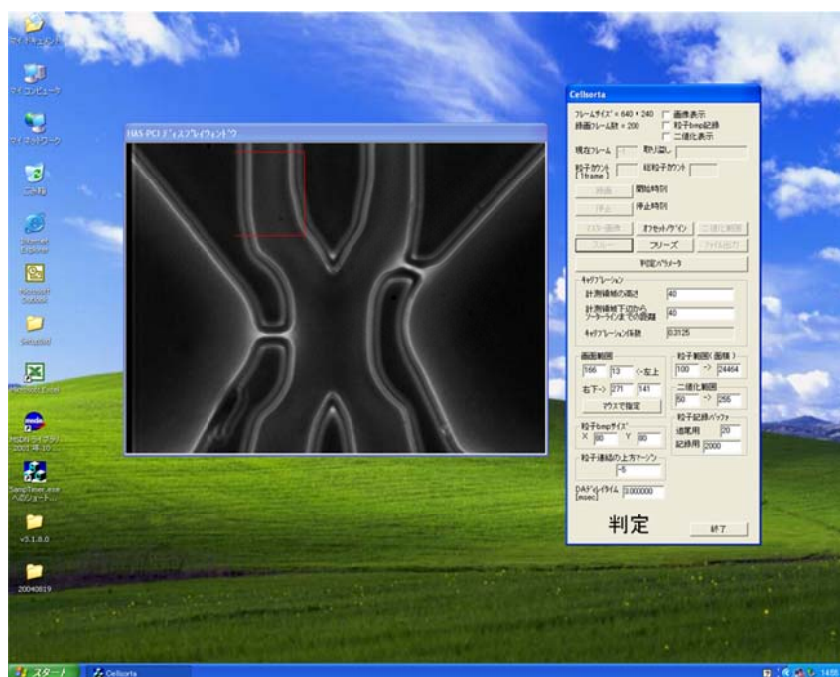


図 4-28 1/200 秒リアルタイム画像処理に対応したセルソーティングソフトウェアの実行画面

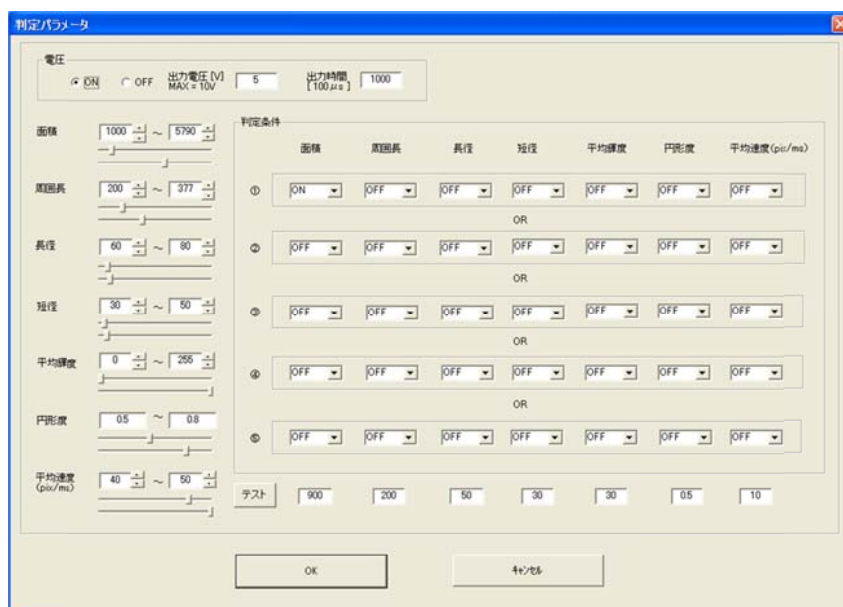


図 4-29 1/200 秒セルソーティングソフトウェアにおける、ソーティングパラメータの設定画面。

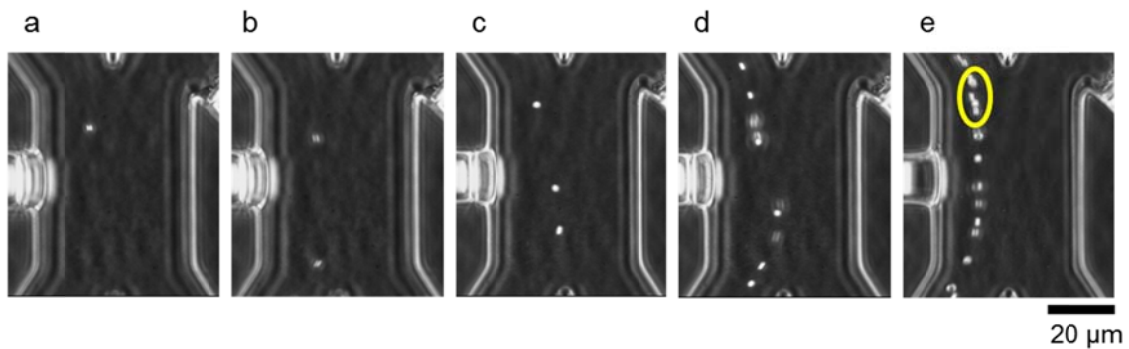


図 4-30 画像認識におけるサンプル濃度の限界。サンプルは $2\ \mu\text{m}$ ビーズ。各写真におけるサンプル濃度は、(a) : 2×10^7 個/ml (1 秒間の平均撮影個数 : 4 個)、(b) : 2×10^8 個/ml (21 個)、(c) : 1×10^9 個/ml (41 個)、(d) : 2×10^9 個/ml (112 個)、(e) : 5×10^9 個/ml (191 個)。

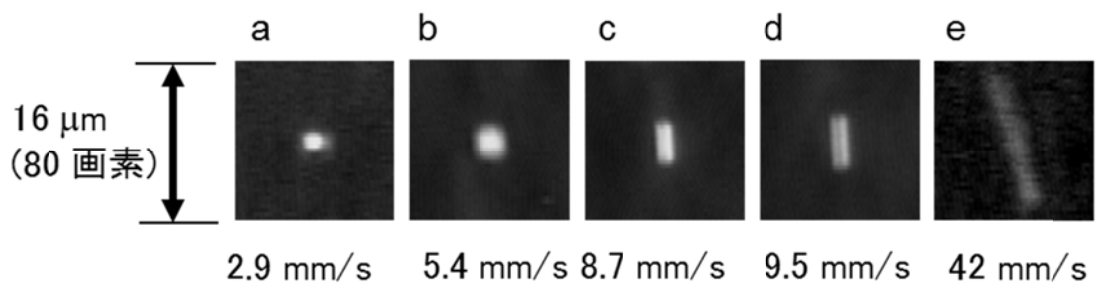


図 4-31 流速ごとのサンプルの見え方の違い。 $2\ \mu\text{m}$ ビーズを $1/2,000$ 秒のシャッター速度で撮影した。それぞれの速度は、(a) : 2.9 mm/s、(b) : 5.4 mm/s、(c) : 8.7 mm/s、(d) : 9.5 mm/s、(e) : 42 mm/s。

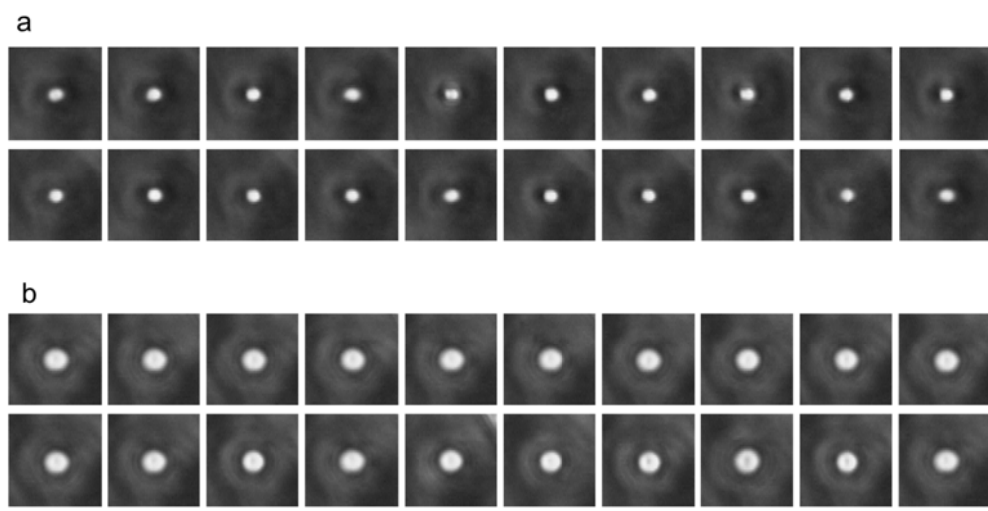


図 4-32 (a) オンチップ・セルソーターで記録された $2\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズの写真。(b) 同じく $5\mu\text{m}$ ビーズの写真。これらの粒子像は、画像解析によって求められた粒子の重心位置を中心として、 80×80 画素のサイズにトリミングされて画像処理用コンピュータのハードディスクに記録される。スケールバーの長さは $5\mu\text{m}$ を示す。

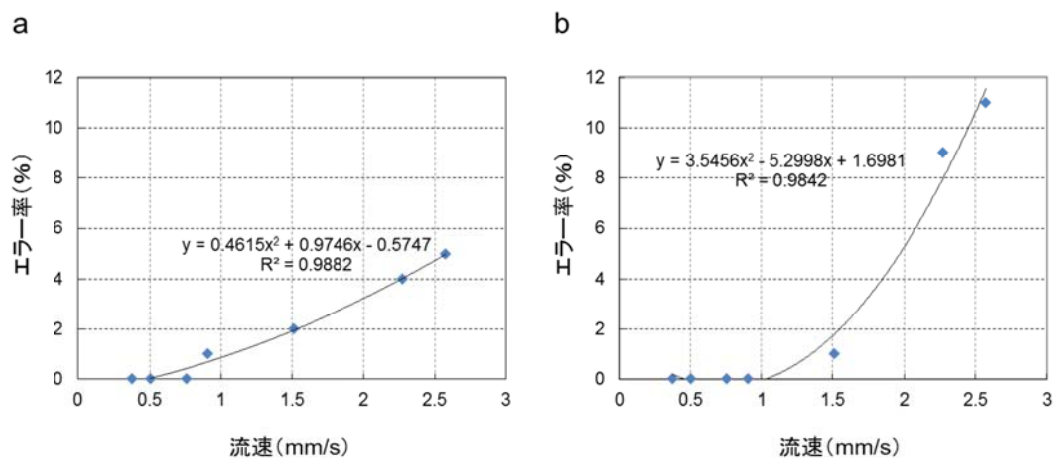


図 4-33 $2\mu\text{m}$ と $5\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズを混合したサンプルから、 $5\mu\text{m}$ ビーズに対して電圧印加した時のエラー率。(a) 回収されるべき $2\mu\text{m}$ ビーズが排除されてしまったエラー率。(b) $5\mu\text{m}$ ビーズが排除されなかったエラー率。

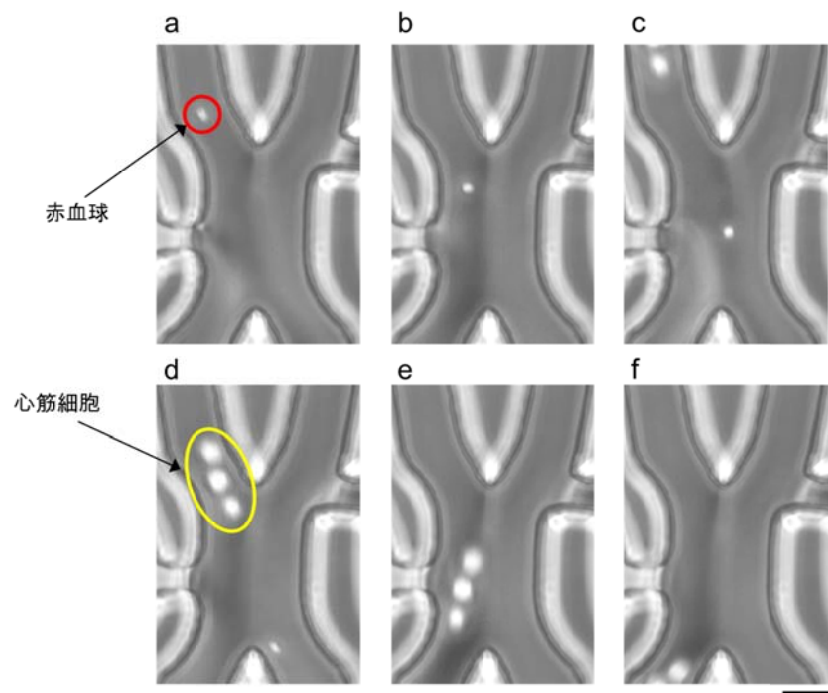


図 4-34 マウス心筋細胞と赤血球を分離した際の連続写真。スケールバーの長さは $20\ \mu\text{m}$ を示す。

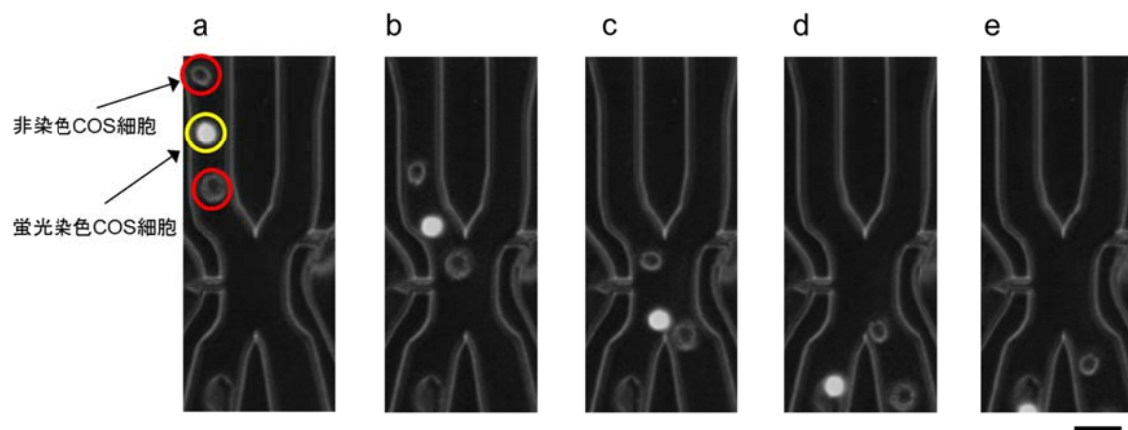


図 4-35 蛍光染色された COS 細胞と非染色 COS 細胞を分離した際の連続写真。スケールバーの長さは $20\ \mu\text{m}$ 。

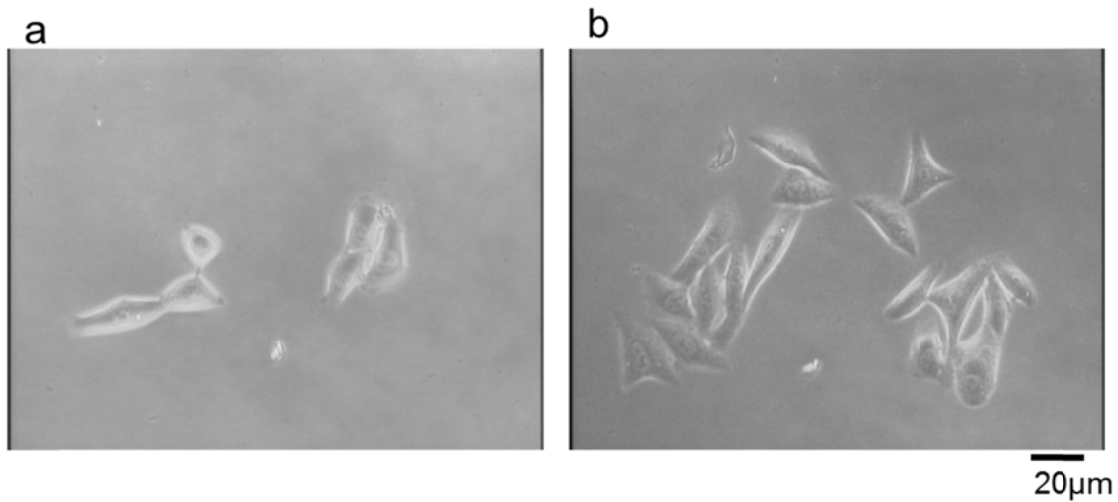


図 4-36 ソーティング後に回収した HeLa 細胞の培養。(a) 培養 2 日目の顕微鏡写真。
(b) 培養 7 日目の写真。

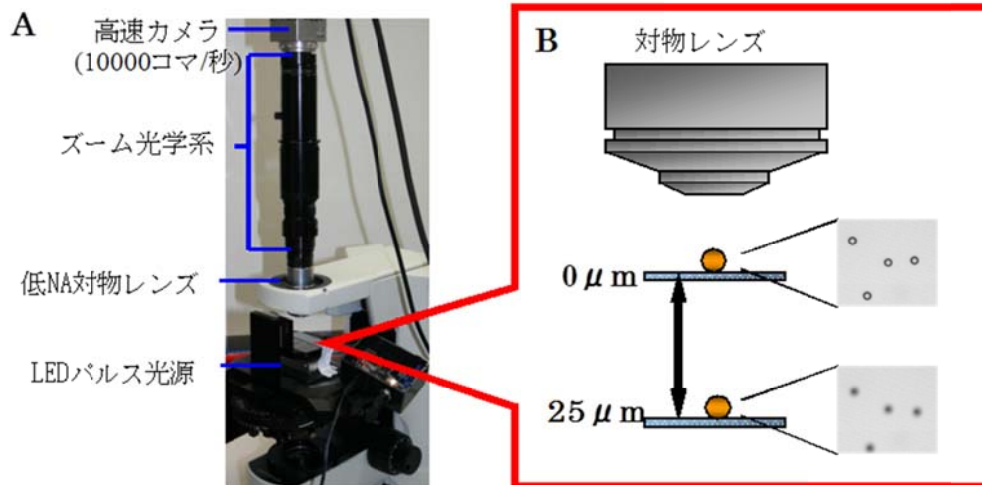


図 4-37 被写界深度を比較するための実験系。(a) 低開口数の対物レンズやズームレンズを正立顕微鏡の筐体に取り付けて構成した光学系。(b) 画像のボケ具合の確認方法。10 μm ポリスチレンビーズを観察しピントが合っている状態を深さ 0 μm とし、ビーズの位置を 25 μm まで遠ざけながら撮影し、像のボケ具合を評価した。

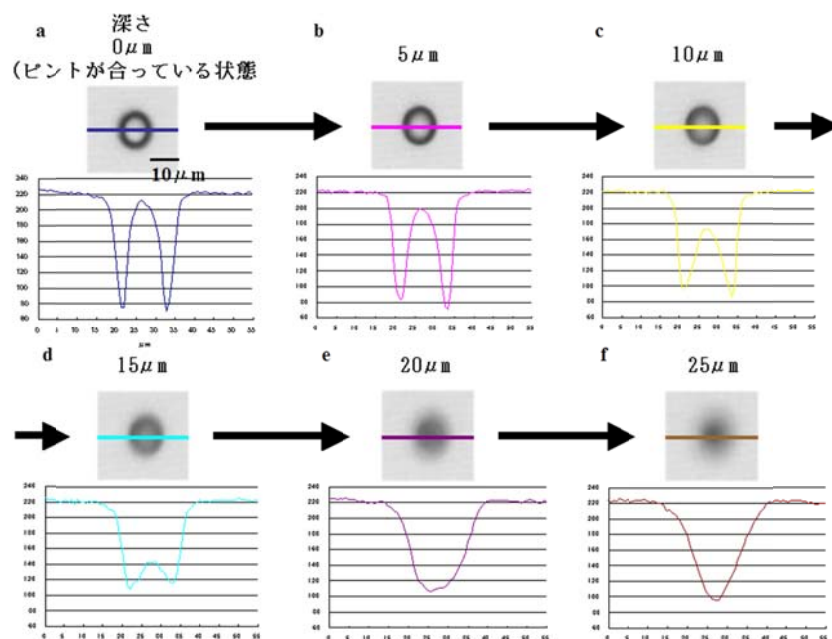


図 4-38 一般的な顕微鏡を用いたビーズ画像のフォーカス変化。ビーズにピントが合っている位置を深さ $0\mu\text{m}$ として、 $5\mu\text{m}$ 間隔に深さ $25\mu\text{m}$ 間で観察した。深くなるにつれて像がボケてゆくのが確認できる。また、ビーズの位置変化に伴って、輝度プロファイルも大きく変化した。ビーズの真中が黒くボケる寸前を被写界深度とした (d)。

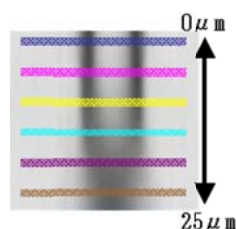


図 4-39 深さ $0\mu\text{m}$ ～ $25\mu\text{m}$ 間の輝度変化画像。

表 4-2 一般光学系とズーム光学系の仕様。

| 一般光学系 | | ズーム光学系 | |
|---------|-----|-------------------------|------|
| 対物レンズ倍率 | 開口数 | ズーム倍率 (対物レンズ倍率: 10倍) | 開口数 |
| 10倍 | 0.3 | 1倍 | 0.28 |
| 20倍 | 0.4 | 2倍 | 0.28 |
| 40倍 | 0.6 | 4倍 | 0.28 |

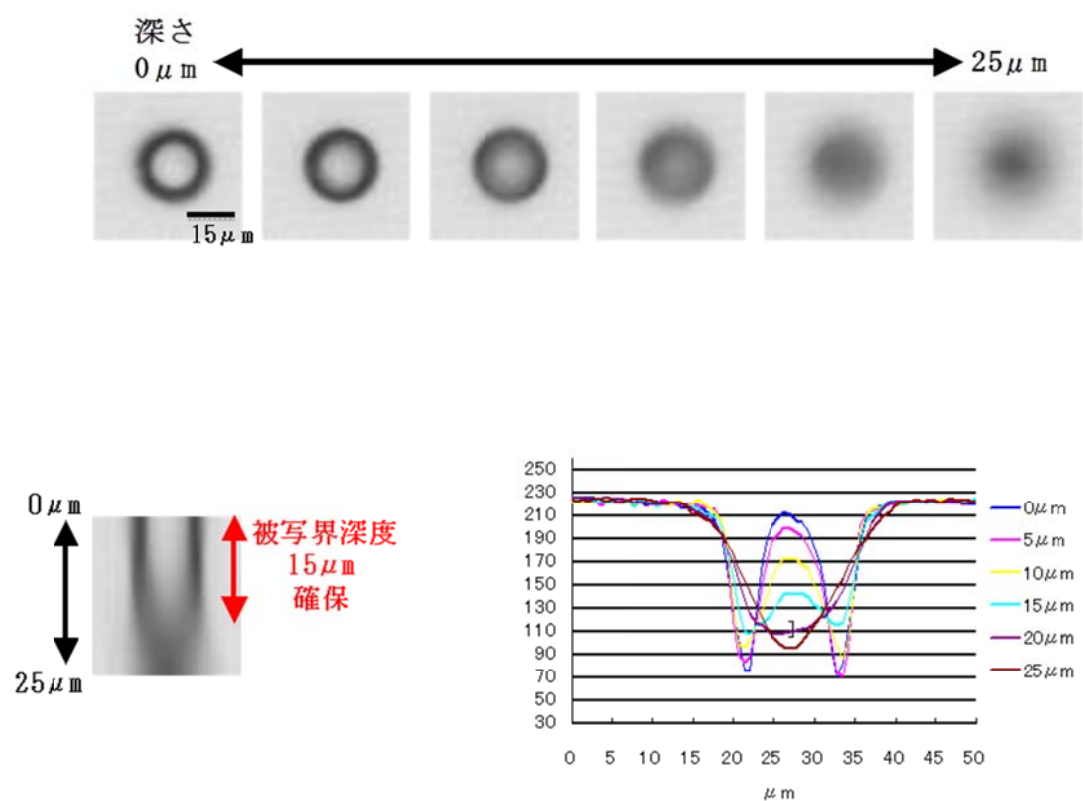


図 4-40 一般光学系 10 倍対物レンズ ($NA=0.3$) における像ボケの観察。

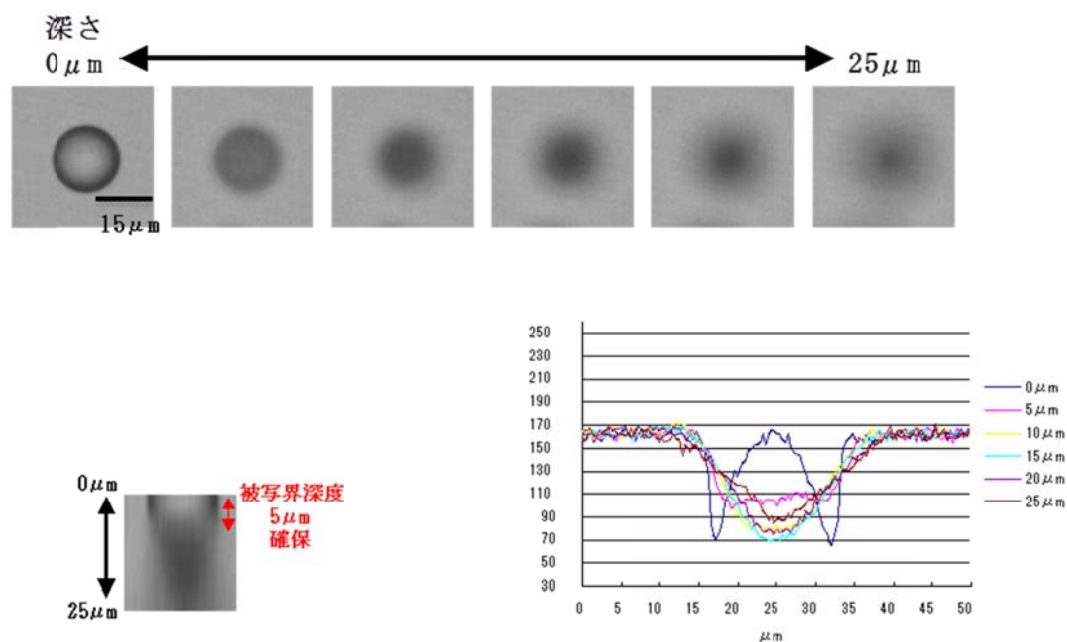


図 4-41 一般光学系 20 倍対物レンズ ($NA=0.4$) における像ボケの観察。

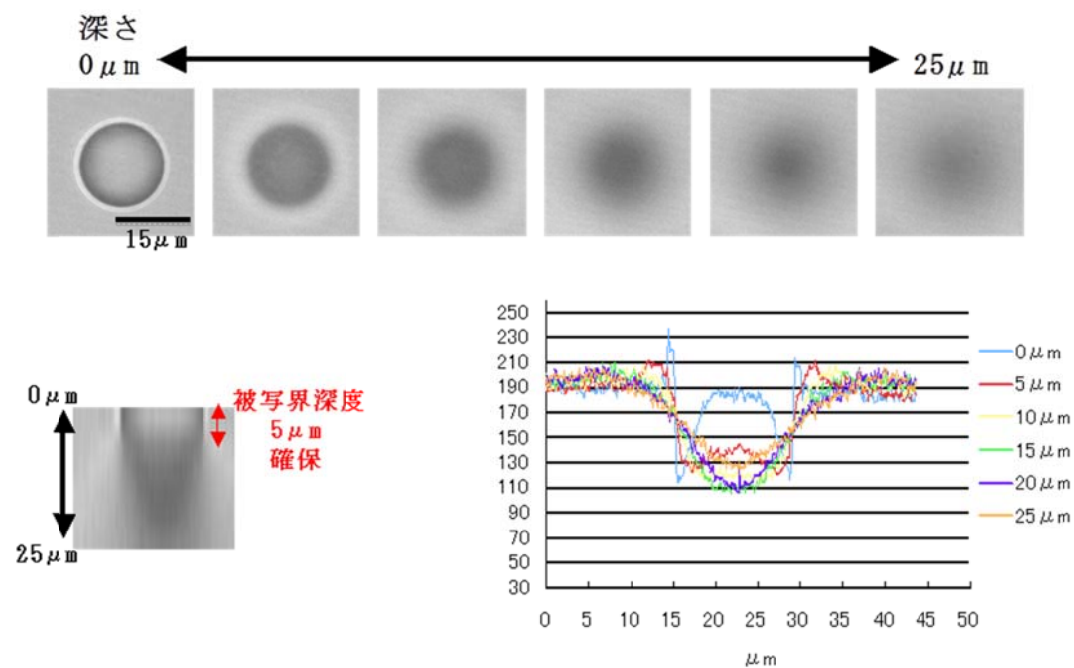


図 4-42 一般光学系 40 倍対物レンズ (NA=0.6) における像ボケの観察。

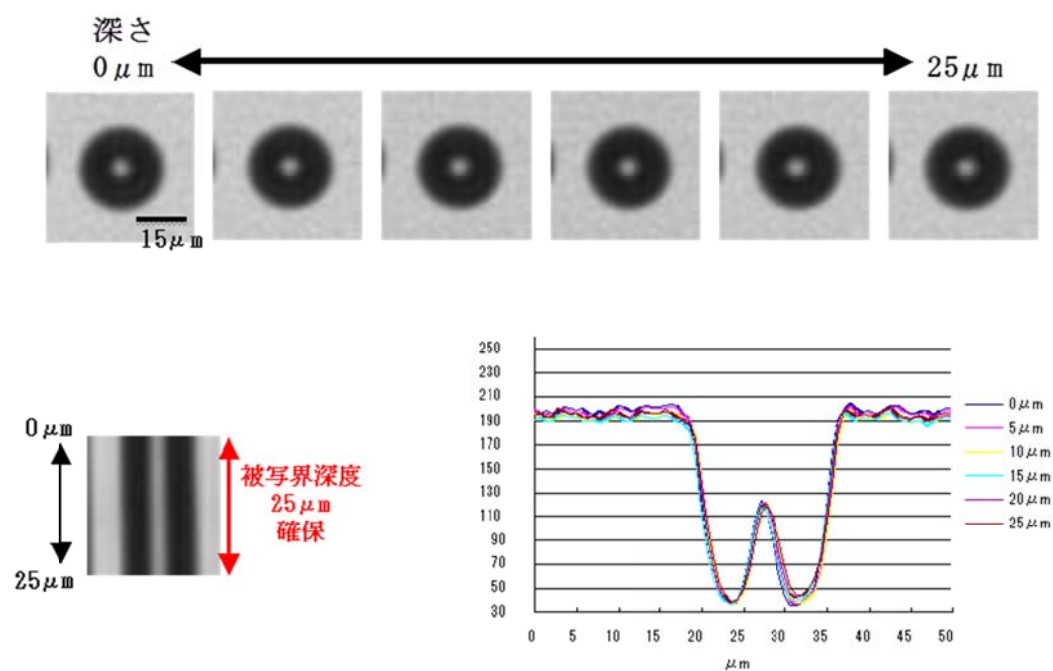


図 4-43 ズーム光学系 1 倍ズーム (NA=0.28) における像ボケの観察。

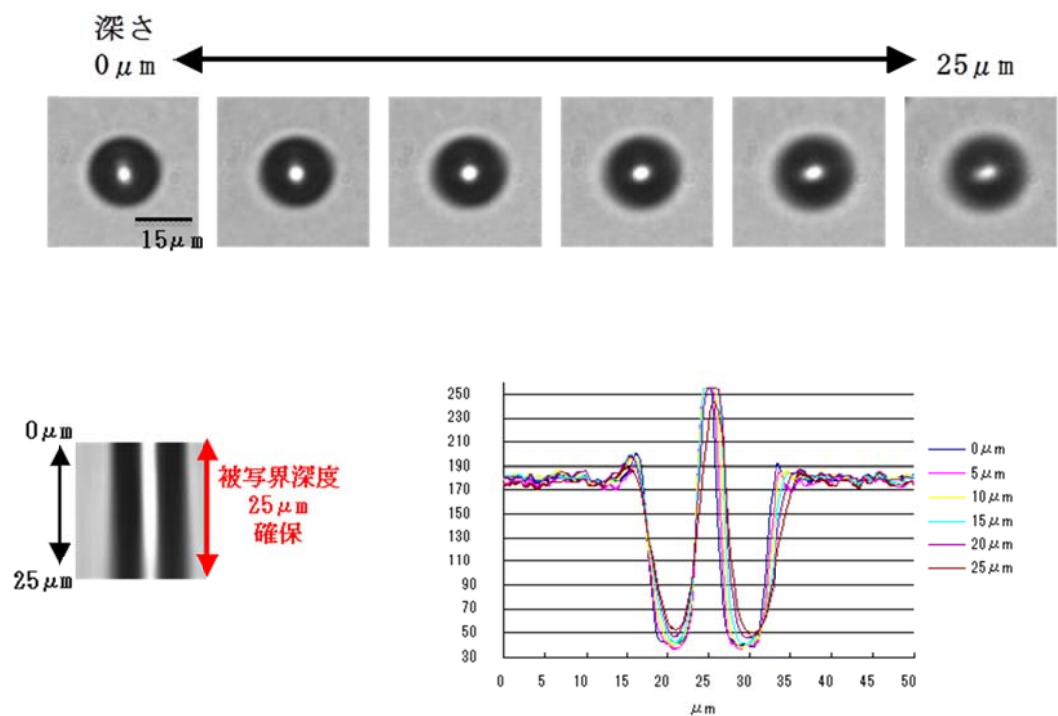


図 4-44 ズーム光学系 2 倍ズーム (NA=0.28) における像ボケの観察。

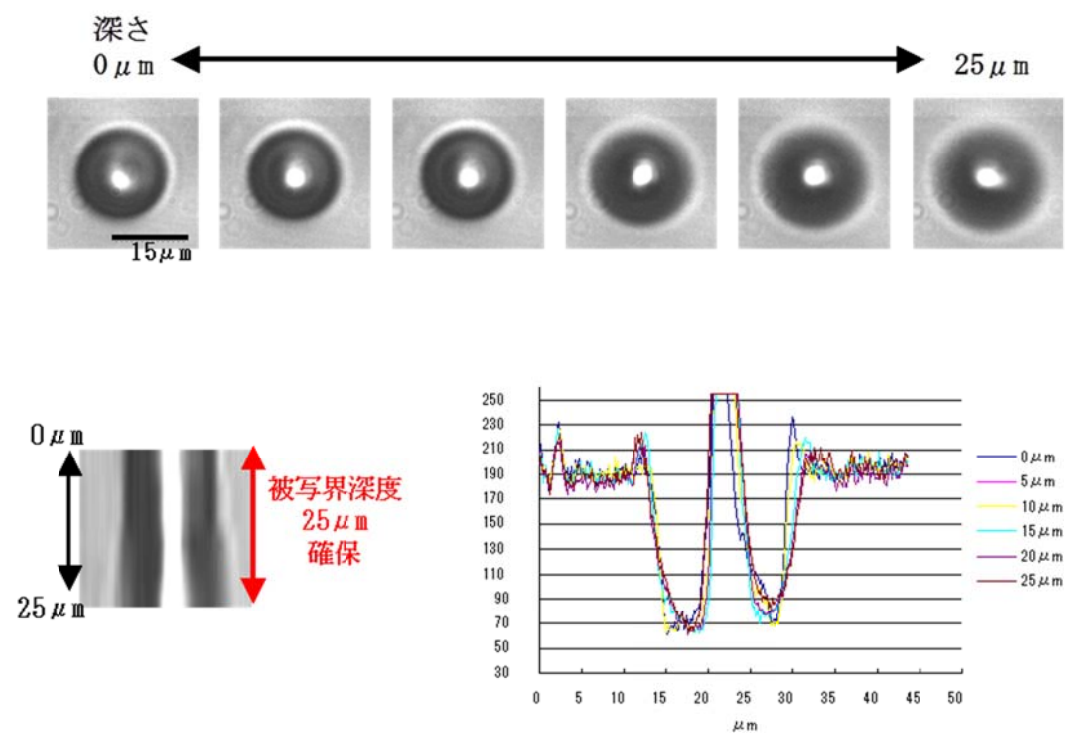


図 4-45 ズーム光学系 4 倍ズーム (NA=0.28) における像ボケの観察。

表 4-3 一般光学系 IX-70 とズーム光学系の開口数と被写界深度。

| 一般光学系 | | | ズーム光学系 | | |
|---------|-----|------------------|------------------------|------|------------------|
| 対物レンズ倍率 | 開口数 | 被写界深度 | ズーム倍率 (対物レンズ倍率:10倍) | 開口数 | 被写界深度 |
| 10倍 | 0.3 | 15 μm | 1倍 | 0.28 | 25 μm |
| 20倍 | 0.4 | 5 μm | 2倍 | 0.28 | 25 μm |
| 40倍 | 0.6 | 5 μm | 4倍 | 0.28 | 25 μm |

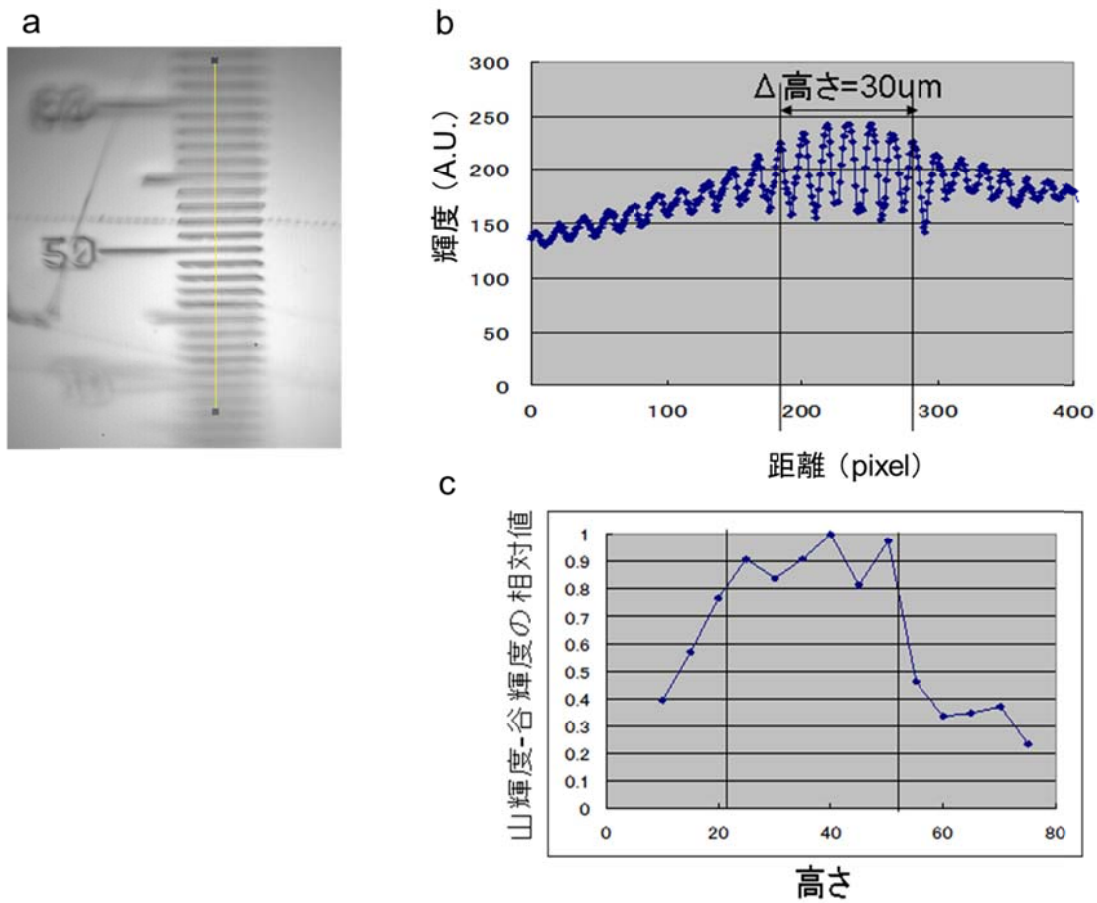


図 4-46 被写界深度拡大光学系における被写界深度の評価。(a) 10 μm 目盛りを持つミクروسケールを 30 度傾けて撮影した際の画像。(b) (a) の黄線のラインプロファイル。(c) (b) のラインプロファイルにおける山と谷のコントラスト差の相対値。

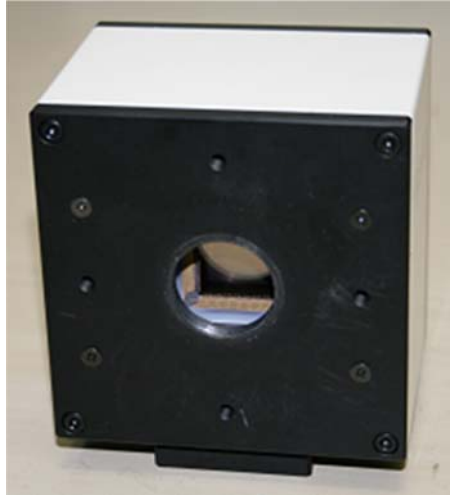


図 4-47 1/2000 秒カメラの写真。

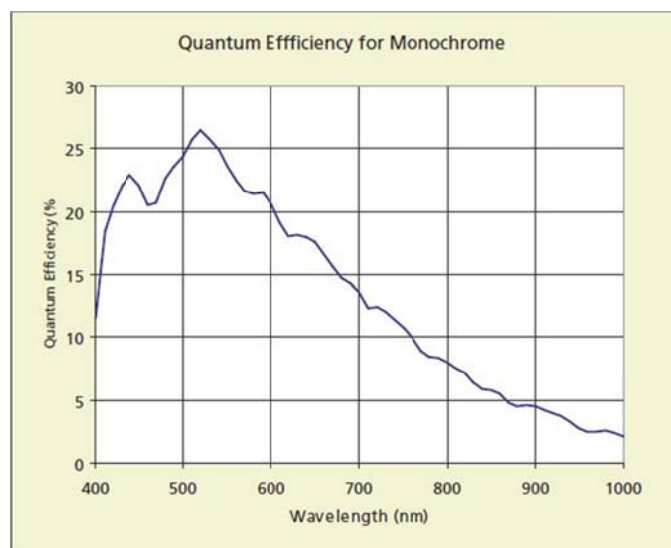


図 4-48 1/2000 秒カメラに搭載されている CMOS イメージセンサにおける受光感度の波長依存性。

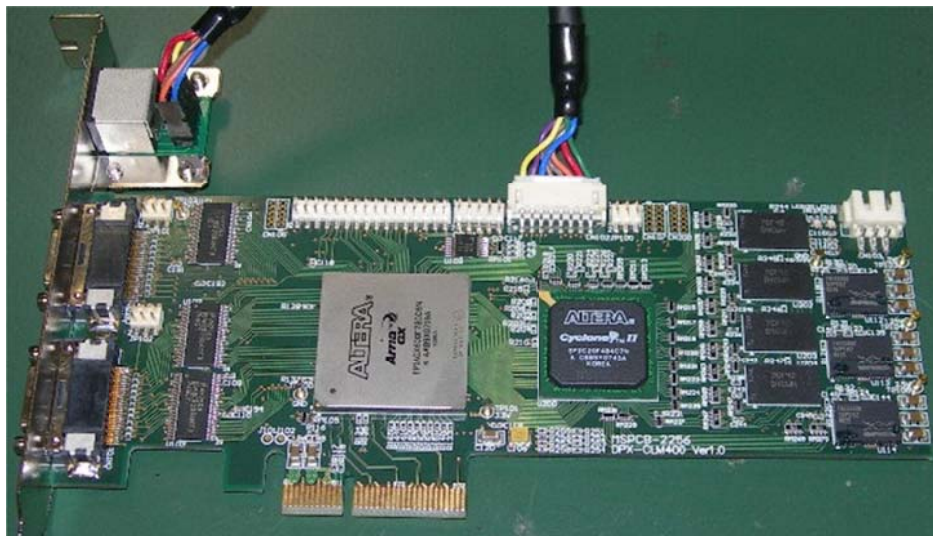


図 4-49 画像処理ボードの写真。ボード中央付近にある銀色の部品がFPGA モジュール。

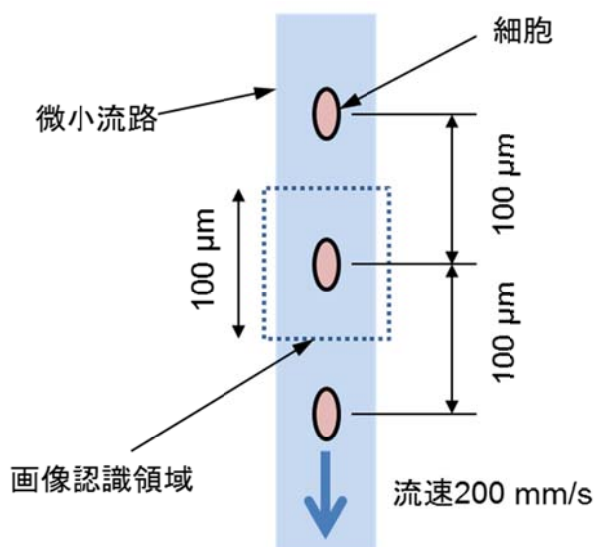


図 4-50 1/2000 秒ごとに連続画像処理を行う場合のモデル。

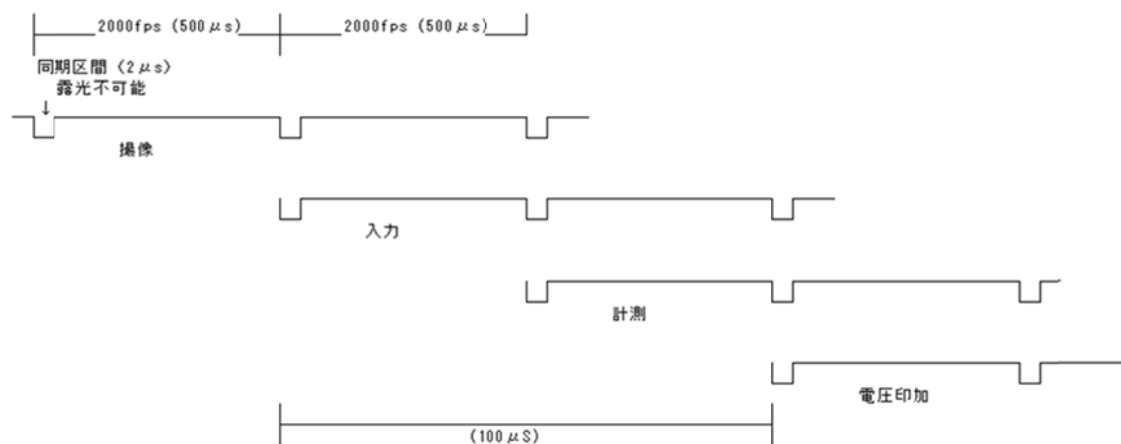


図 4-51 撮影からソーティング電圧印加までのタイミングチャート。撮影後に画像の転送、および画像処理の時間が必要になるため、画像撮影後 1 ms 経過してからのソーティング電圧印加となる。

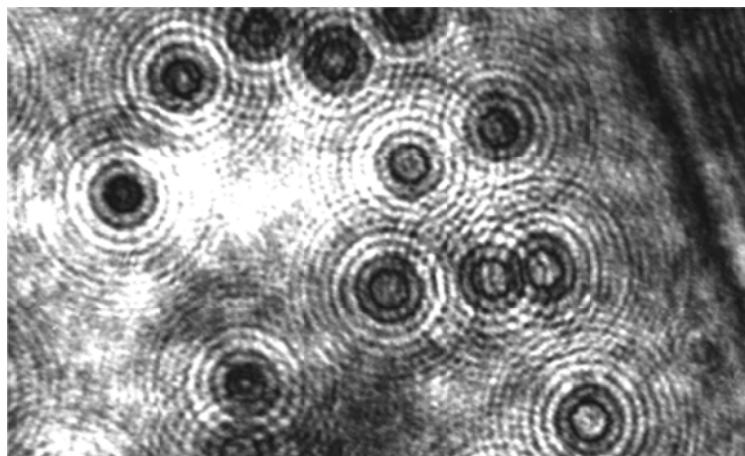


図 4-52 パルス発振するレーザ光源を照明用光源として用い、直径 10 μm のポリスチレンビーズを撮影した時の顕微鏡写真。コヒーレント光由来の干渉縞が発生している。

a



b



図 4-53 開発したパルス LED 光源の写真。(a)照射レンズも含めた光源全体の写真。(b)電源および制御回路を納めたケースの写真。切り換えスイッチによって、パルス点灯時間を $1 \sim 5 \mu\text{s}$ の間で $1 \mu\text{s}$ 単位で切り換えて使用できる。

表 4-4 パルス LED 光源の仕様。

| | |
|---------|-----------------------------------|
| LED素子出力 | 130mW min (米国CLEE製EZ1000型) |
| 発光面面積 | 1mm^2 |
| 波長 | 527nm |
| 繰り返し周波数 | 2kHz (1/2000秒カメラのシャッターに同期) |
| 発光パルス幅 | 1,2,3,4,5 μm (スイッチ切換式) |
| 作動距離 | 30mm |

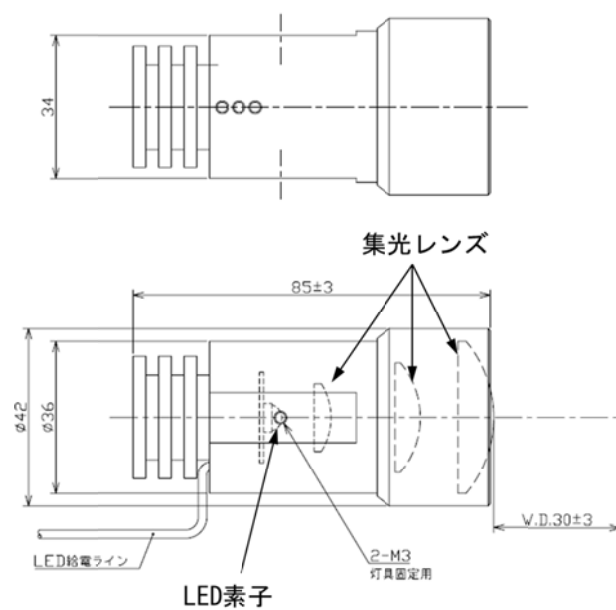


図 4-54 パルス LED 光源の光学系。三群レンズ構成で試料面に集光させる。

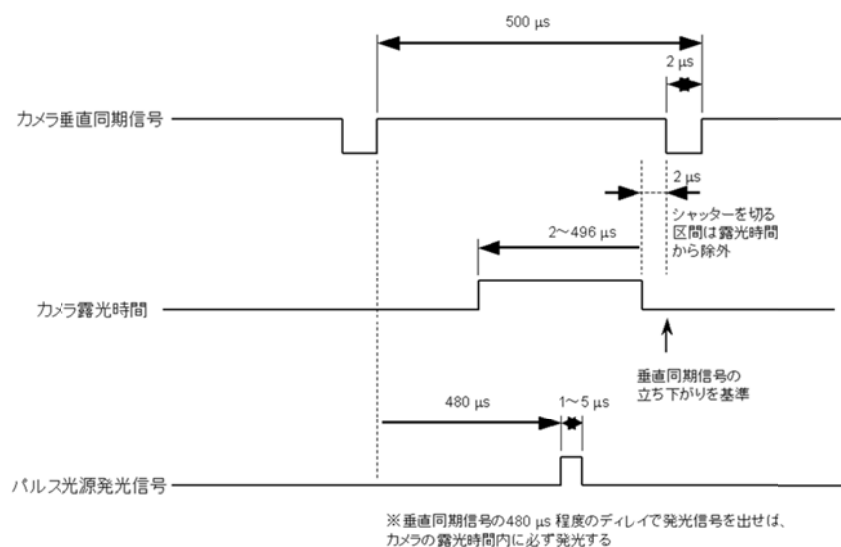


図 4-55 1/2,000 秒カメラの露光時間とパルス光源発光に関するタイミングチャート。

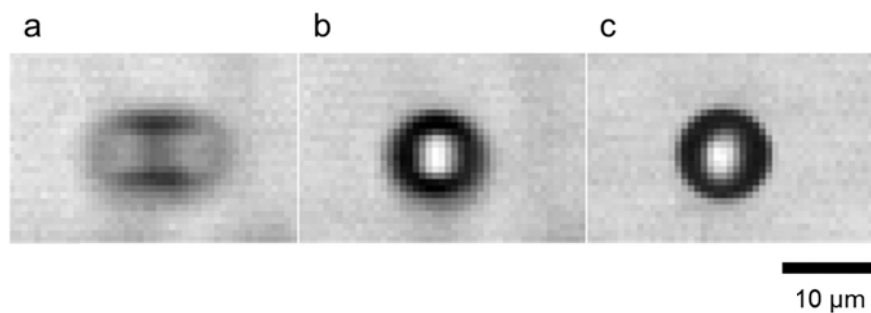


図 4-56 パルス LED 光源による残像除去効果。流速 200 mm/s で流れる直径 10 μm のポリスチレンビーズを撮影した顕微鏡写真。(a) 1/2,000 秒カメラの露光時間を 100 μs に設定して撮影。(b) 1/2,000 秒カメラの露光時間を 20 μs に設定して撮影。(c) パルス LED 光源の点灯時間を 1 μs に設定して撮影。

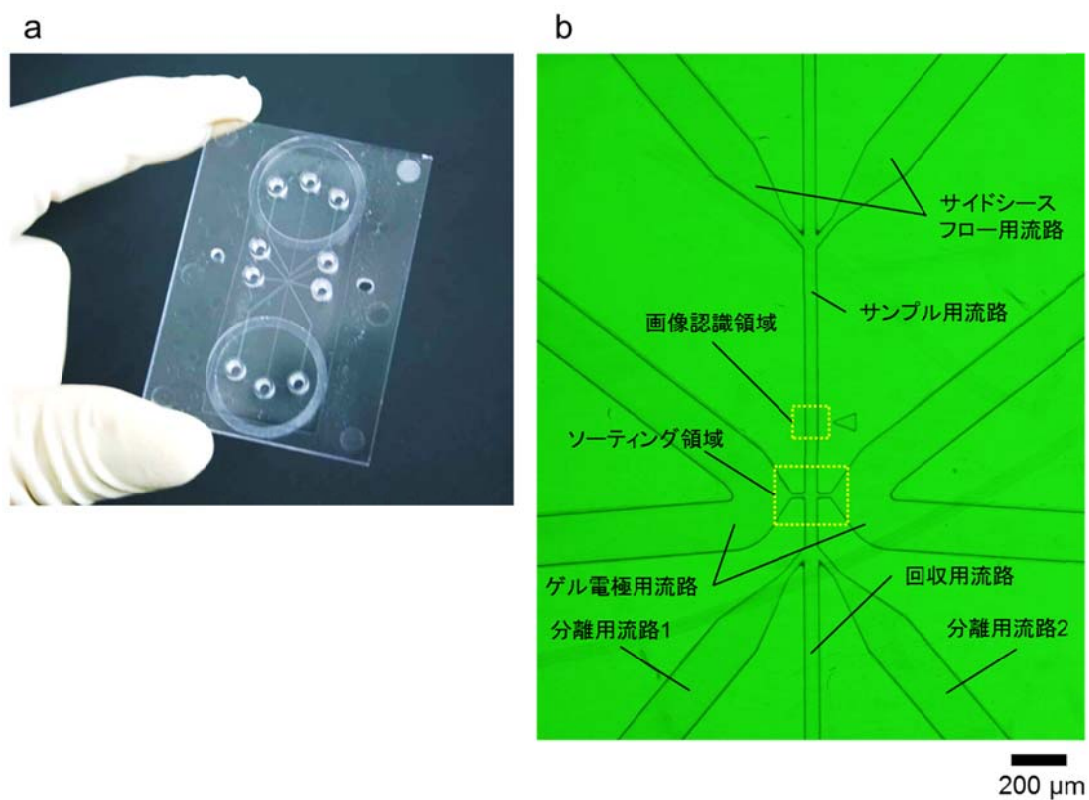


図 4-57 改良したセルソーティングチップ。(a) 射出成形で製作したアクリル製セルソーティングチップの写真。大きさは横 40 mm、縦 50 mm。(b) チップ中央部分の顕微鏡写真。

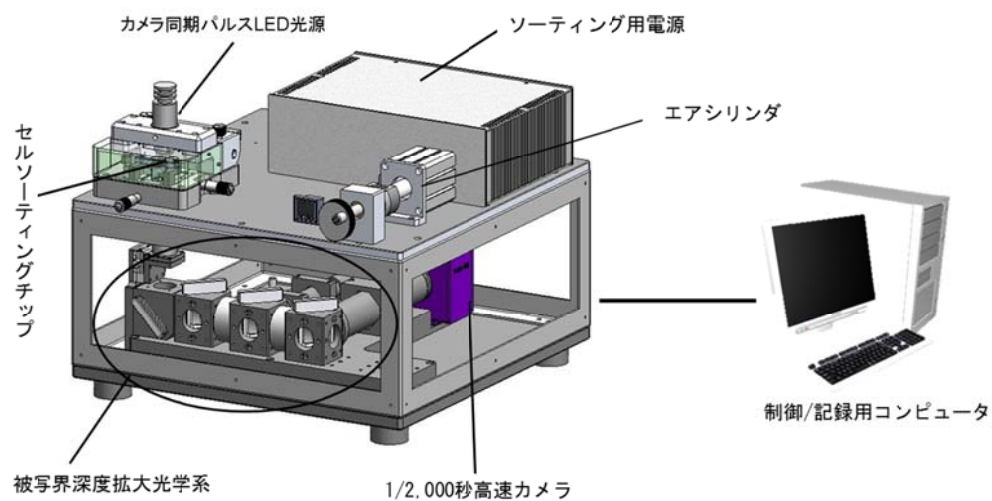


図 4-58 1/2,000 秒カメラに対応したオンチップ・セルソーターの装置構成。

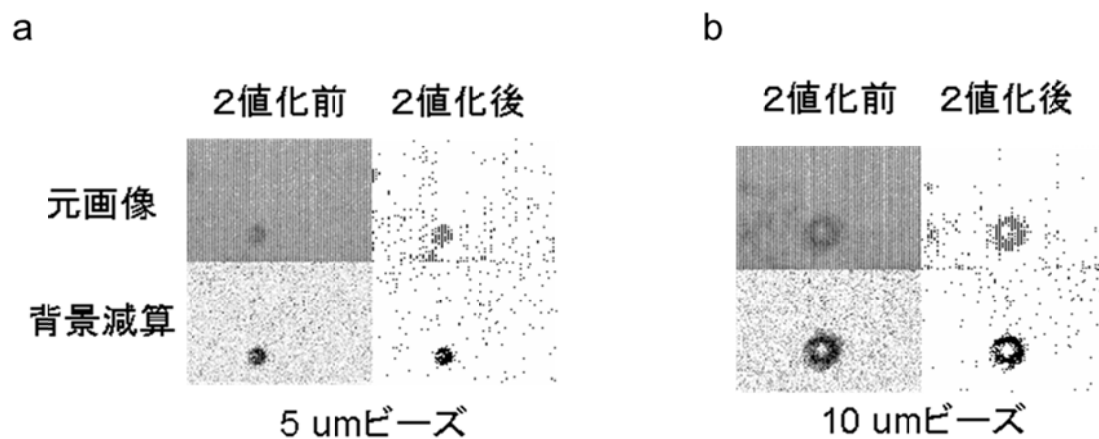


図 4-59 5 μm ビーズおよび 10 μm ビーズの画像処理結果。元画像はノイズが多いが、背景減算を行うことによってノイズが減少し、二値化画像のコントラストが向上した。

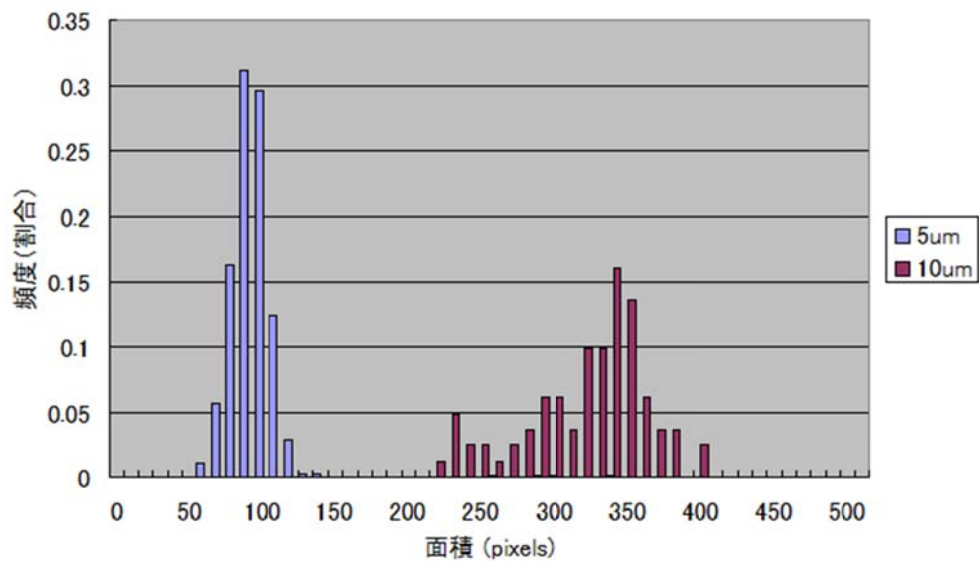


図 4-60 5 μm ビーズと 10 μm ビーズの混合サンプルを、流速 200 mm/s で送液した際に計測した粒子面積の分布。

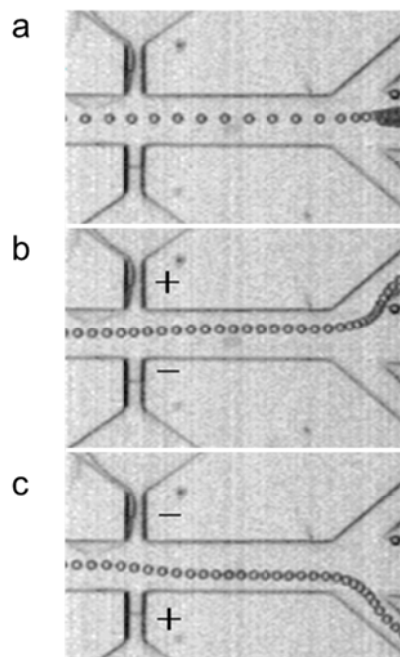


図 4-61 電場による純水中の 10 μm ビーズのソーティング。流速は約 2 mm/s。(a) 電圧を印加しない場合のビーズの軌跡。(b) ゲル電極間に 1.4V を印加（上側の電極を正極）。(c) (b) と極性を逆にして 1.4V を印加。

表 4-5 メンブレンフィルターの特性評価。

| | Dura | Iso | Omni | Expres | Fluoro | PVC | Nylon |
|-----|------|-----|------|--------|--------|-----|-------|
| 耐熱性 | ○ | ○ | △ | ○ | × | × | ○ |
| しわ | ○ | △ | ○ | ○ | × | × | ○ |
| 親水性 | × | △ | ○ | ○ | × | × | ○ |
| 透明度 | × | △ | ○ | × | × | × | × |
| 総合 | × | △ | ○ | △ | × | × | △ |












| A | B | C | D |
|---|---|---|--|
| OMNIPORE 0.1 μm | OMNIPORE 0.2 μm | OMNIPORE 0.45 μm | OMNIPORE 1.0 μm |
|  |  |  |  |
| E | F | G | H |
| ISOPORE 0.1 μm | ISOPORE 0.2 μm | ISOPORE 0.4 μm | ISOPORE 0.8 μm |
|  |  |  |  |
| I | J | K | |
| NYLON 0.2 μm | NYLON 0.45 μm | Express 0.45 μm | |
|  |  |  | |

図 4-62 メンブレンフィルターへの識別文字の割り当て。

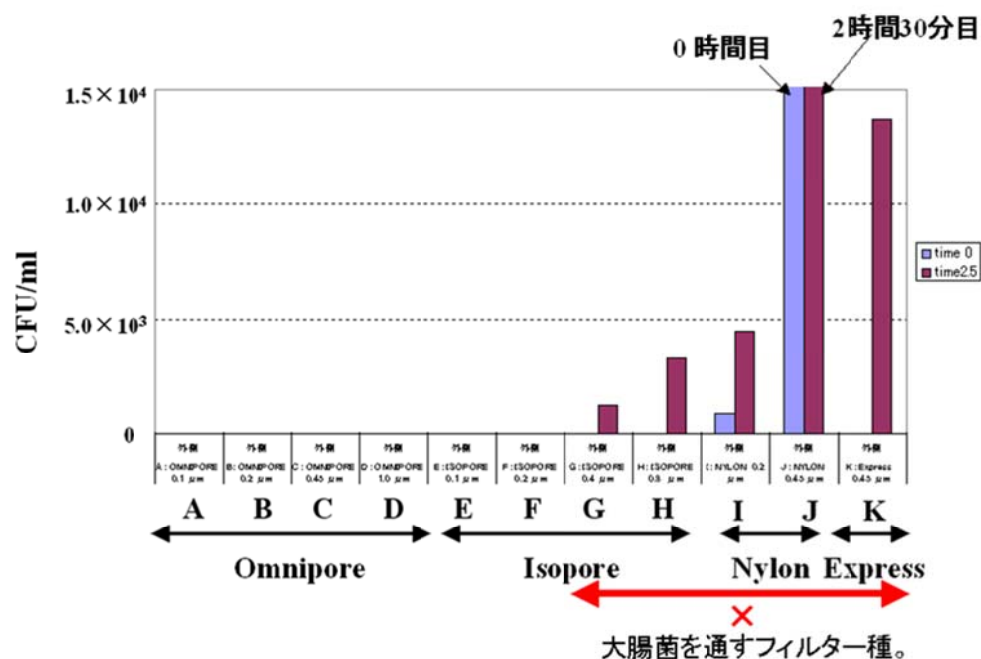


図 4-63 メンブレンフィルターにおける大腸菌の透過性比較。

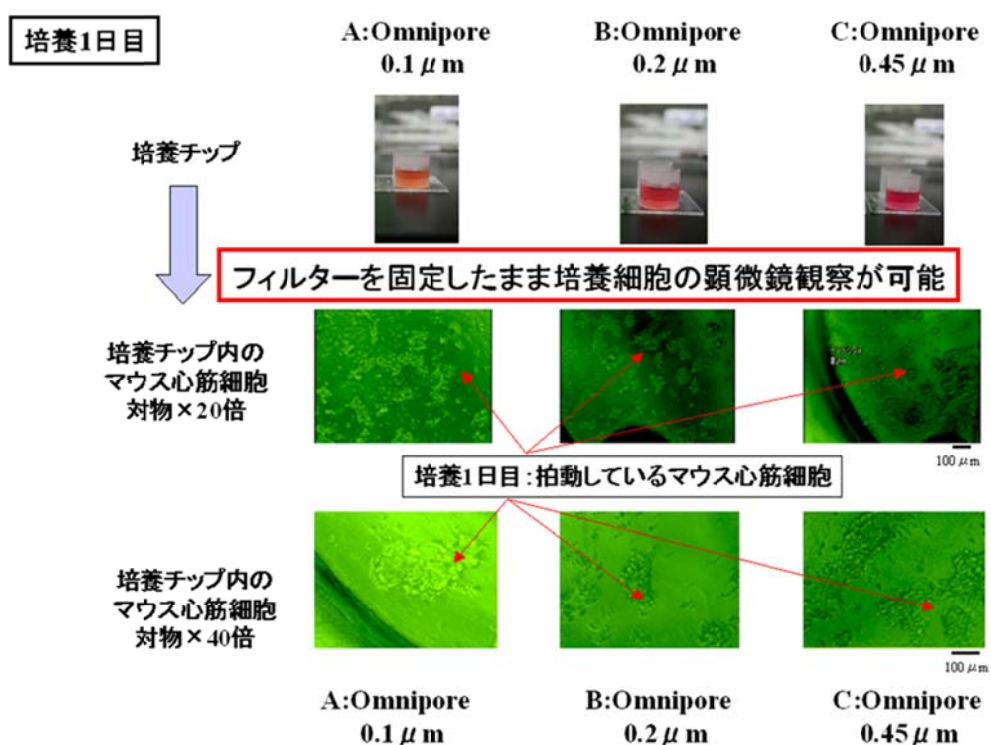


図 4-64 マウス心筋細胞のチップ内培養 (1 日目)

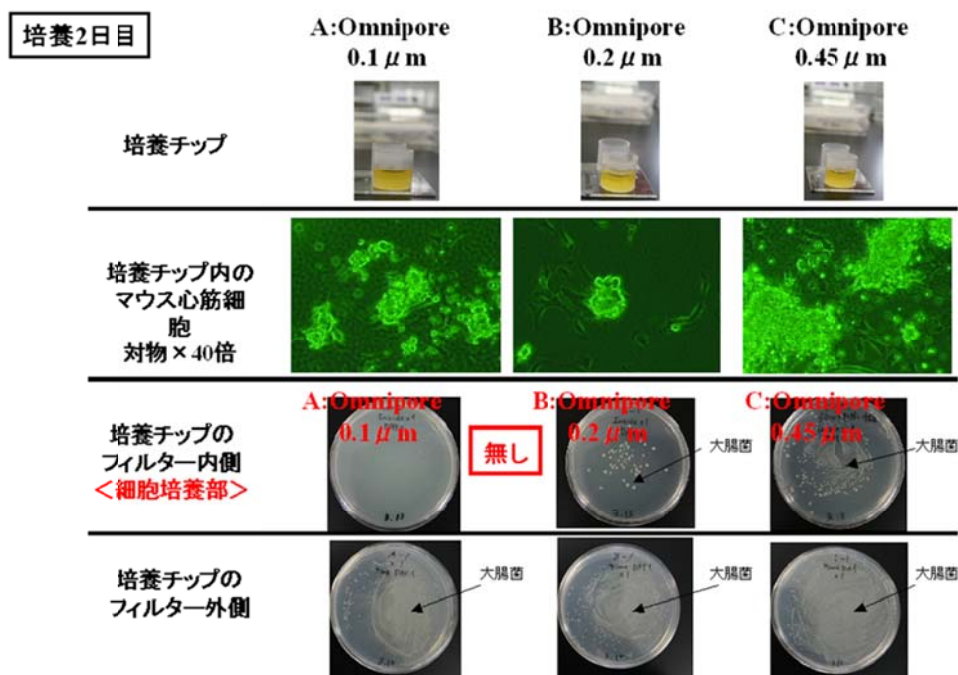


図 4-65 マウス心筋細胞のチップ内培養（2 日目）。

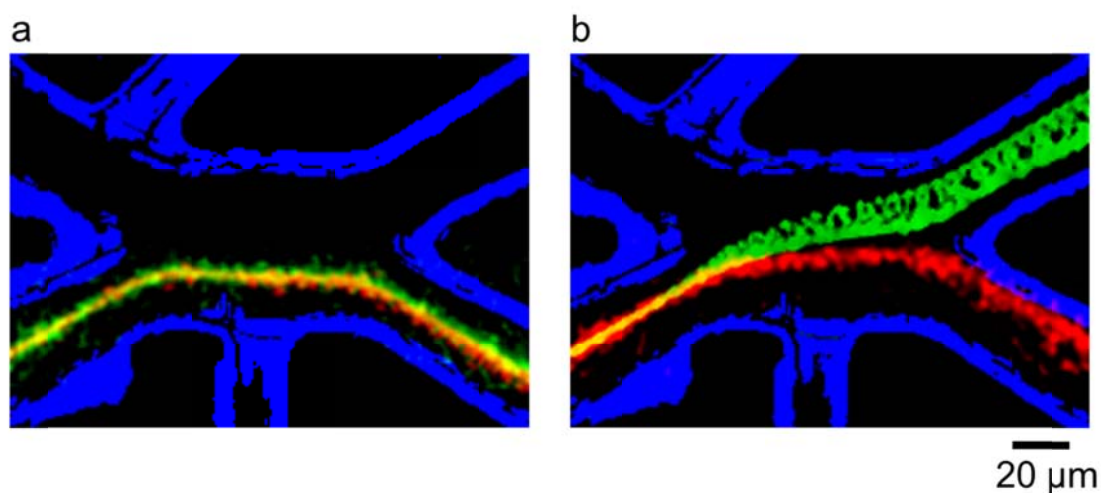


図 4-66 粒子と色素の分離。(a) 直径 2 μm のポリスチレンビーズ（緑）と、250 μM のフルオレセイン（赤）の混合サンプルが電圧未印加のセルソーティングチップを流れている様子。流速は 40 mm/s。(b) 70 V の直流電圧を印加した状態。フルオレセインは 10 μm ほど流路中をシフトしたが、廃棄用流路へは流れなかった。2 μm ビーズは大きくシフトし、廃棄流路へ移動した。

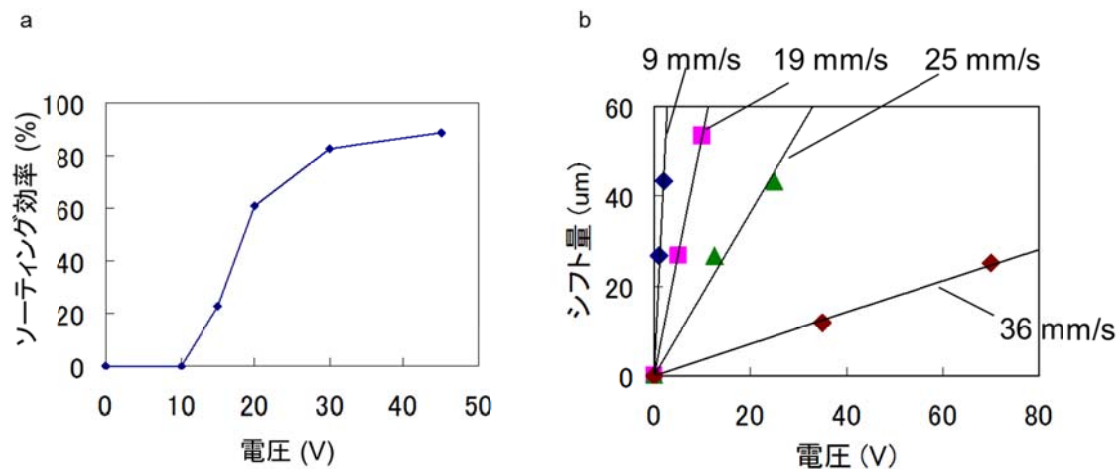


図 4-67 ソーティング効率およびシフト量の電圧依存性。(a) $2\ \mu\text{m}$ ビーズを純水中で $200\ \text{mm/s}$ の速度で流しながら電圧を印加し続けた時のソーティング効率。45 V の電圧印加で約 90 % のビーズがソーティングされた。(b) 電圧印加によってビーズが流路中でシフトする量の電圧依存性。流速が同じであれば、ビーズのシフト量は印加電圧の大きさに比例する。

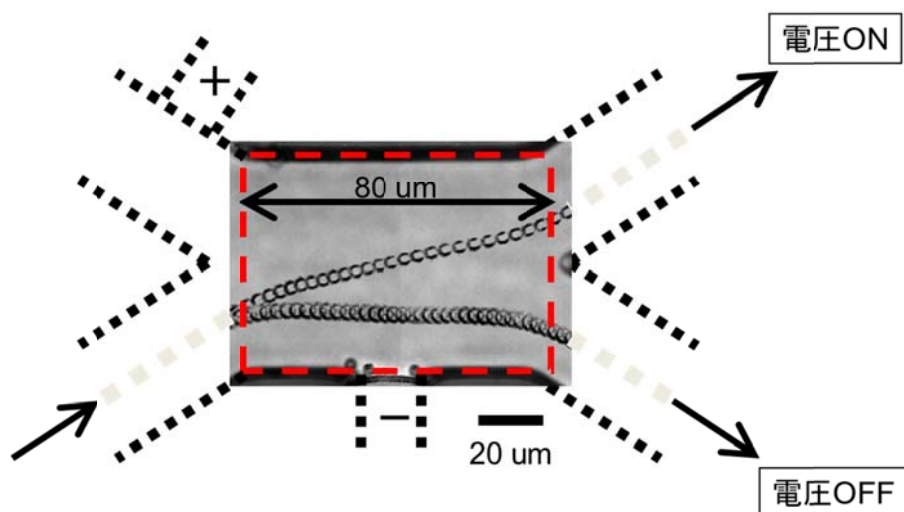


図 4-68 セルソーティングチップにおいて電場が作用する領域。ソーティング電圧を印加した場合としない場合それぞれの場合で撮影された $2\ \mu\text{m}$ ビーズの連続画像を重ね合わせた写真。

第5章 赤外レーザーを用いたアガロース培養チップへの三次元微細加工技術の開発

5. 1 序論

一細胞レベルの研究は、ドラッグスクリーニングや細胞における遺伝的・後天的情報の研究といった分野でますます重要になりつつある。ゲノム研究の分野では、マルチキャピラリー電気泳動装置など、新しいゲノム配列解析手法によってめざましい進歩を遂げた。これとは対照的に、細胞レベルの後天的情報に関する研究は未だ模索中といった状態である。後天的情報の研究における主な関心の一つは、細胞内の情報がどのように制御され蓄えられるのかということである。とりわけ、いわゆる「コミュニティ・エフェクト」と呼ばれる、細胞集団の数による影響や細胞間の相互作用におけるトポロジーについて理解を深めることは重要である。この目的のために、最新の微細加工技術を用いて穴加工や金属修飾がなされたシリコンウェハやスライドガラスのデバイスが製作され、評価されている。さらに、細胞内の後天的情報の研究のためにマイクロチャンバーアレイと光ピンセットを用いた一細胞レベルのオンチップ培養システムの開発もなされている[44-47]。これら既存の微細加工技術は、精緻な空間分解能で構造を形成することができるが、それらの形状を細胞培養中に変化させることは難しい。なぜなら、どのような構造が最適かはあらかじめ予測できず、細胞の培養中にのみ決定できるからである。

集団効果のような細胞間相互作用を調べようとする場合、例えば2つの培養チャンバー同士をつなぎ、細胞自体は通り抜けることができない細いトンネルを形成することは有効な手法である。かくして、様々な材質や接着・積層化技術などの方法が2つの培養チャンバーをトンネル状の微細構造作成に用いられてきた[48]。しかしながら、これら

の微細構造を基板上に形成するには数多くの手順が必要であり、当然細胞培養中に実施することは不可能で、すべての微細構造物は実験に使用するまでに基板上に作成しておく必要があった。そこで新たに 1064 nm および 1480 nm の赤外レーザーの収束光加熱で加工したアガロースを用いた細胞培養法を開発した。先行研究では 1064 nm の赤外レーザーを用いたアガロース加工法が報告されており、細胞培養中に新たにトンネル状微細構造を形成することが可能であったが、培養チャンバー自体は培養を開始する前に注型法によって作成しておかねばならなかった[49-50]。

本章では、新たに開発した 1064/1480 nm 二波長レーザー収束光加熱法について述べる。この方法では、2 つの赤外レーザーにおける波長の違いを利用している。具体的には、1064 nm レーザを照射した場合には基板表面のクロム薄膜近傍のみのアガロースが溶解し、1480 nm レーザを照射した場合にはレーザービームの透過領域すべてのアガロースが溶解するという違いを利用している。この方法を用いれば、事前に光硬化性樹脂で鋳型用の型を作成する必要もなくなる。言い換えれば、希望する形状の微細構造を基板上的のアガロース層中に 10~20 分程度で、しかもクリーンルームではなく培養室中で作成することができる。

5. 2 装置および方法

5. 2. 1 1064/1480 nm 二波長レーザ集束光加熱加工装置

図 5-1 に、1064/1480 nm 二波長レーザ収束光加熱加工装置の概略図を示す。本装置は、(1) 自動 XY ステージ（を搭載した倒立型位相差顕微鏡、(2) 1064 nm および 1480 nm の二波長赤外レーザに対応した照射光学系の 2 つの部分から構成されている。赤外レーザによるアガロース加工時の様子を位相差観察できるように、顕微鏡光学系の途中に 1064 nm、および 1480 nm に対応したダイクロイックミラーを挿入して構成した。顕微鏡の位相差像は顕微鏡に取り付けた CCD カメラで撮影した。また、色収差による観察領域のピント面と赤外レーザの実際の集光点とのずれを補償するために、それぞれの赤外レーザの光路途中にフォーカシングレンズを挿入した。

5. 2. 2 1064/1480 nm 二波長レーザ集束光加熱加工の原理

本装置では、2 つの赤外レーザの波長の違いによる透過特性を生かしてアガロース層に対する非接触三次元加工を実現した。1064 nm の赤外光は水やアガロースゲルにはほとんど吸収されないので 1064 nm を吸収するクロム薄膜近傍のみのアガロースが溶解する。一方、1480 nm の赤外光は水および水分を含んだアガロースゲルに吸収されるため、レーザビームが透過した領域全体が加熱され溶解する。レーザを用いた非接触加工によって、フォトリソの作製やフォトリソの現像などの作業を必要とせず、実験室の顕微鏡上で微細構造を構築することができる。図 5-2 は、1064/1480 nm それぞれの赤外レーザビームを照射した場合の、アガロースへの加工原理を示している。1064 nm レーザがガラス基板上のクロム層に集光すると、レーザビームを吸収して発熱したクロム層近傍のアガロースが溶解し始め (a)、自動ステージを移動させることで相対的にレーザビームの集光点を基板と平行に移動させ、局所加熱されたアガロースが次々に溶解してアガロースの網目構造を通り抜けて水中に拡散してゆき (b)、最後にレーザビームの

移動が完了するとビームが移動した箇所のアガロース底面にトンネルが形成される (c)。一方 1480 nm レーザをアガロース基板に集光させると、レーザビームの通過領域にあるアガロースが溶解を始め (d)、次にレーザビームを基板に平行に移動させるとビームの通過域にあるアガロースの溶解が進んで水中に拡散し (e)、最後にレーザビームの移動が完了するとアガロースに貫通穴が完成する (f)。

5. 2. 3 集束光加熱による細胞培養用マイクロチャンバーの加工

アガロースゲルチップは、カバーガラス上に 5 nm の厚みでクロム蒸着したカバーガラス上に低融点アガロースを塗布した構造を持つ細胞培養用チップである。図 5-3 に、アガロースゲルチップへの赤外レーザの集束光を用いた加熱加工手順を示す。

まず (a) 2. 2. 5 で述べた抵抗加熱式蒸着装置 (KE208K-70LPT 型、株式会社ケーサイエンス) を用いて、カバーガラス上にクロムを 5 nm の厚みになるように蒸着し、(b) 細胞接着基質である Collagen-type I (新田ゼラチン) 溶液を 150 $\mu\text{g/ml}$ 、pH3.0 の条件で 24 時間コートし、続いて 100 $\mu\text{g/ml}$ の Poly-D-Lysine (シグマアルドリッチジャパン株式会社) 溶液を 24 時間コートした。次に、(c) ゼル状の 2% (w/v) アガロース (ISC BioExpress, GenePure Lowmelt:melting temp. 65°C) を基板上に 20 μl 滴下し、スピンコーター (IH-D7, ミカサ株式会社) を用い 500rpm で 5 秒、続いて 4,000rpm で 20 秒間基板を高速回転させてアガロース薄層を形成した。そして、(d) 1480 nm レーザ (RLM-3-1480-M, IPG Laser GmbH) をアガロースゲルチップに集光させ、細胞を配置するマイクロチャンバーを作製した。続いて、(e) CCD カメラ (CS230B、オリンパス株式会社) で顕微鏡視野を確認しながら自動 XY ステージ (BIOS-201T, シグマ光機株式会社) を用いてチップの位置決めを行い、近接するマイクロチャンバーを同様に作製した。最後に、(f) 1064 nm レーザ (PYL-1-1064-M, IPG Laser GmbH) を照射し続けた状態で XY ステージを動かすことでマイクロチャンバー間をつなぐマイクロトンネルを作

製した。

アガロースゲルを溶かした部分だけ細胞接着基質が露出するため、その部分のみに培養でき、大きさや形状によって細胞体の位置や伸長方向を自在にコントロールできる。また、培養中に追加加工できるため、段階的にマイクロチャンバーやマイクロトンネルを構築することができる。

5. 2. 4 海馬初代培養細胞の調製

海馬初代培養細胞を以下の手順で単離、精製した。まず、妊娠 18 日目の Wister Rat (埼玉動物実験センター) をジエチルエーテル (和光純薬工業株式会社) で麻酔し、胎児を取り出し、Dissection medium (hank' s balanced salt solution [HBSS、Invitrogen Corp]、1mM Pyruvic acid、10 mM HEPES、pH7.2) に移した。胎児から脳を摘出し、顕微鏡下で海馬を切り取り、メスで組織を細切した後、Phosphate Buffered Saline 溶液 (PBS、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8 mM Na₂HPO₄、1.5 mM KH₂HPO₄、pH7.4) で 2 回洗浄した。その後、Trypsin (0.5 mg/ml) と DNase (0.1 mg/ml) を含む HBSS にて 37°C で 15 分間酵素処理をした。それを 4°C、1,000rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、酵素処理を止めるために、10 %Fatal Bovine Serum (FBS、Invitrogen) を含む HBSS を加えてピペッティングを行った。続いて 4°C、1,000rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て Dissection medium を加えてピペッティングを行った。この作業を 3 回繰り返した後、40 μm のフィルターに通し、単離、精製した海馬初代培養細胞を得た。

5. 2. 5 培養液の構成と培養環境

細胞培養に使用した培地は Neurobasal medium (Invitrogen) に 2 %v/v B27 supplement (Invitrogen)、10 %v/v Fetal Bovine Serum (Invitrogen)、0.074 mg/ml L-glutamine (シグマアルドリッチジャパン株式会社)、50 μ g/ml Gentamycin Reagent Solution (Invitrogen)、100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) を加えたものを基本とした。そして、海馬初代培養細胞を一細胞単位で長期生存させるために、図 5-4 に示すような培養環境で培養した。まず、シャーレ中央に 1 cm 四方のアガロースゲルチップを固定した後、マイクロ構造を作製する前にゲルチップの回りに予めグリア細胞等を 2 週間ほど培養した状態を作った。こうすることで、常にグリア細胞からの液性因子が放出されている状態をつくり、構築する神経細胞の生存率を向上させた。また、アガロースゲルチップ上での培養開始後の培地交換は、上記に示した培地を予めグリア細胞を分散培養しておいたシャーレに 1 日～2 日間浸したものを、3 日に 1 回半量ずつ交換した。

5. 3 結果

5. 3. 1 集束光加熱加工

1064/1480 nm レーザを用い、実際にアガロースゲルチップに微細構造を加工した一例を図 5-5 に示した。まず、アガロースの厚みを 200 μm にして作製したアガロースチップ (a) に 1480 nm レーザを照射し、約 80 μm の直径で 2 つの穴を作成した (b)。次に、1064 nm レーザを用い、先に加工した穴の一つに位置を合わせてクロム層に集光するように照射し、もう一方の穴に向けて照射位置を移動させた (c)。作成した微細構造は、蛍光マーカー用のインクをチップに注いだ上で共焦点レーザ顕微鏡 (FluoView FV300, Olympus) によって確認し (d)、1480 nm レーザの出力 100 mW で穴構造が上部まで貫通し、1064 nm レーザの出力 40 mW でクロム層近傍のみにトンネル構造が形成されていることがわかった。当初微細構造を可視化するための蛍光色素としてローダミンを試したが、ローダミンがアガロースを通り抜けて拡散してしまったために、色素粒子の大きい蛍光マーカー用インクを用いた。図 5-5 (d) において 2 つの穴の上部が暗くなっているが、これはインクに含まれる色素粒子が観察中に沈殿してしまったため輝度にムラが生じたと考えられる。

5. 3. 2 1480 nm レーザ照射における溶解点の径のレーザ出力依存性

われわれが行った先行研究では、1064 nm レーザを用いた場合のアガロース加工について、レーザ出力が 3 mW より小さいと加工できず、照射レーザ出力が 3 mW から 50 mW の間では加工線幅は出力に比例し、2 μm から 50 μm であった。

一方、1064 nm レーザによる集光点での加工とは対照的に、1480 nm レーザを用いた加工ではレーザビームの通過領域すべてのアガロースを溶解させることができる。図 5-6 に、1480 nm を照射した時の溶解部分の径がレーザ出力と共にどのように変化するを示した。図 5-6 における上段と中段の写真は、レーザ出力が 40 mW から 120 mW の

時の位相差像と共焦点画像の上面図を示し、下段の写真は共焦点画像による穴の断面図を示している。この例では、レーザの照射時間はすべて 30 秒とした。加工した穴は位相差検鏡によって観察することができたが、共焦点像ではレーザ出力が 93 mW 未満の場合確認することができなかった。この理由は、30 秒間という照射条件では加工した穴がアガロース表面まで貫通せず、共焦点像取得用に用いた蛍光色素が穴の中に浸透しなかったからと考える。図 5-7 は図 5-6 の顕微鏡写真から計測した穴径のレーザ出力依存性を示す。この結果は、先行研究において 1064 nm レーザを用いてアガロースを加工した時の結果と同様に比例関係が成り立つことを示している。この関係を式にすると次のようになる。

$$W (\mu\text{m}) = I - 20 (\text{mW}) \quad (5.1)$$

5. 3. 3 溶解点の径の時間依存性

図 5-8 に、1480 nm レーザを用い 120mW の出力で加熱加工した穴の顕微鏡写真を示す。図 5-9 は、溶解点の径の時間変化をプロットしたものである。グラフが示すように、時間経過に比例して溶解点の径が増大した。この結果は、先行研究において 1064 nm レーザの照射後 20 秒で溶解点サイズが平衡に達した場合とは異なっている。このことは、アガロースゲルチップに対して任意形状の加工を行うためには、レーザの照射時間を厳密に制御する必要があることを示している。

5. 3. 4 アガロースマイクロチャンバーチップにおける三次元構造

ここでは、アガロースに加工したマイクロチャンバーとトンネルにおいて、共焦点顕微鏡を用いて三次元形状を評価した結果について述べる。レーザ照射によって生じたアガロース中の隙間には、図 5-5 および図 5-6 で示したように蛍光インクを注入して可視

化した。図 5-10 の左側の顕微鏡写真は細い溝でつながれたアガロースマイクロチャンバーの上面図である。また、図 5-10 の右側には断面の共焦点画像を示した。ここでは、2つの円筒形の穴をつなぐ細いトンネル構造をクロム層の真上に確認することができる。これら断面の共焦点画像は、2種類の赤外レーザ集束光を用いた加熱加工によって、アガロース中に細胞培養用チャンバーと細いトンネル構造を作成可能であることを示している。

5. 3. 5 集束光加熱加工法による海馬細胞の神経突起結合の方向性制御

5. 3. 5. 1 アガロースマイクロチャンバーの作製

ラット海馬細胞の一細胞ネットワークを構築するためのアガロースマイクロチャンバーを作製した。図 5-11 に、マイクロチャンバーの加工手順について示す。まず、10 倍の対物レンズ (UPlanFLN 10×, NA : 0.3、オリンパス株式会社) を用いて、1480 nm レーザを出力 40 mW、照射時間 1 秒でアガロース層に照射し、複数の細胞培養用マイクロチャンバーを作成した (図 5-11 (a)、(b))。続いて 20 倍の対物レンズ (LCPlanFL 20× NA : 0.4、オリンパス株式会社) を用い、1064 nm レーザを出力 17mW、50 $\mu\text{m/s}$ でマイクロチャンバーから近接する別のマイクロチャンバーへ向けてレーザビームをスキャンすることにより幅約 5 μm のマイクロトンネルを作製した。但し、トンネルの片方の端はマイクロチャンバーに接続するように加工し、反対側の端は別のマイクロチャンバーの手前まで伸ばすがマイクロチャンバーには接続しないでおいた (図 5-11(c))。海馬細胞の軸索がトンネルの中にまで充分伸長した後、マイクロチャンバーと接続していない側のトンネルの端に対して 1064 nm レーザにより出力 17 mW、照射時間 1 秒で追加のレーザ照射を行い、マイクロチャンバーがトンネルでつながった状態になるよう加工した (図 5-11 (d))。

5. 3. 5. 2 突起伸長方向を制御した一細胞ベース神経回路網の段階的構築

アガロースマイクロチャンバー作製後、チャンバー内に海馬初代培養細胞を1つずつ配置した。加工したマイクロチャンバーへの細胞の配置はガラスキャピラリーをプーラー（PC-10、株式会社 成茂科学器械研究所）で引き伸ばして作製したガラスマイクロピペットを取り付けた手動マイクロインジェクター（CellTram Air、エッペンドルフ株式会社）によって行った。図 5-12 に、マイクロチャンバーへ細胞を配置する時の様子を示す。まず、細胞混濁液をマイクロチャンバー付近に撒き、周囲に浮遊している細胞をピペットで吸引し、それをマイクロチャンバー上に移動させ、静かに吐出しチャンバー内に落下させることで配置した。マイクロチャンバーの底面は細胞接着基質が露出しているため、配置後数分で細胞が接着した。

細胞配置後、段階的に神経回路を構築する過程を図 5-13 に示す。培養 2 日目には神経突起がマイクロトンネルを伸長し（図 5-13 (b)）、3 日目にはトンネルの端まで十分伸長した様子が観察された（図 5-13 (c)）。その時点で接続されていなかった黄矢印部分を 1064 nm レーザを用いて追加加工し、突起を隣の細胞に結合させた。結合が確認された後、今度は縦方向に新たなマイクロトンネルを作製した（図 5-13 (d)）。4 日目には、新たに作製したマイクロトンネルに突起が十分伸長している様子が観察され（図 5-13 (e)）、その時点で黄矢印の部分を追加加工することで図中上側の細胞に結合させた（図 5-13 (f)）。このように、神経突起の伸長方向を一細胞単位で制御した構成的神経ネットワークの構築に成功した。ここで、培養中にレーザ照射を行っても、直接細胞にレーザ照射しなければ細胞にダメージがないこと、接着基質を持たないアガロース上への神経突起の乗り越えは起こらないことがわかった。

一方、最初からマイクロトンネルを両方のマイクロチャンバーに接続した状態で培養を開始すると、神経突起は確率的にどちらかのトンネルに伸長してしまい、方向性を制御した神経回路の構築はできなかった。このことから、一方向に作製したマイクロトン

ネルを追加加工することではじめて厳密な神経突起の方向性制御ができることがわかった。

5. 4 考察

5. 4. 1 アガロース微細加工技術の既存の微細加工技術に対する利点

赤外レーザを用いたアガロースへの集束光加熱加工技術は、顕微鏡のステージ上で非接触加工が可能である。これは細胞の培養環境を維持したまま追加加工が行えるという点で、従来の微細加工技術にはない利点である。また、微細加工パターンのフォトマスクを事前に作製しておく必要もなく、フォトレジストを用いた微細構造物の作製では必須の現像工程も不要である。このため通常の培養実験室において作業ができ、基板のベーク処理や現像後の洗浄工程にかかる時間も短縮できるため実験を迅速に進める上でも有利である。さらに、フォトレジストや現像液などは細胞に有害な成分を含んでいることが多いが、アガロースを用いていることで細胞毒性の心配はない。また、アガロースならではの特徴として、アガロースが細胞接着性を持たないために、特別な表面処理を行わなくとも細胞をパターンニングしたい領域を制御できることも大きな利点である。

5. 4. 2 アガロースマイクロ構造の段階的構築法の開発と課題

細胞の空間配置制御技術確立のために、アガロースゲルと 1064/1480 nm 二波長レーザ集束光加熱加工装置を組み合わせた新たな培養手法を開発した。この手法の最大の特徴は培養中にマイクロ構造を追加加工できる点にある。この特徴によって、一細胞単位で神経突起の伸長方向を段階的に制御した神経回路の構築に成功した。

これにより、神経回路の自在な空間パターンを構築することができ、空間パターン依存的な回路の活動計測や同一サンプルを用いた神経回路の空間パターンの違いといった差分計測もできることが示唆された。また、神経突起の伸長方向制御にも成功し、神経細胞同士の信号伝播方向の制御も可能であることが示唆された。

またアガロースには細胞接着性がなく、 μm 単位で形状を制御できることから細胞体の大きさに応じたマイクロチャンバーや神経突起の太さに応じたマイクロトンネルを

自在に作製できる。したがって、図 5-13 に示したようにマイクロトンネルの幅を細胞体が進入できない幅（10 μm 以下）に作製することで、細胞体をチャンバー内に留まらせることができた。

一方、アガロースを加工素材に用いることの課題も明らかになった。本研究では基板上にアガロースを塗布するためにスピンコーティング法を用いたが、第三章および第四章で用いた SU-8 などの光硬化性樹脂と異なり厚みの制御が困難であった。同じ条件でコートしても厚みに 10 μm 程度のばらつきが生じた。アガロース特有の分子構造が、粘性の高いフォトレジスト向けのスピンコーティング法によって精度が出にくいことの主要原因ではないかと考えているが、スピンコーターの回転数制御やアガロースへ添加物を加えることなどを検討し、より高精度な微細構造が構築できる技術を目指したいと考えている。

5. 5 第5章のまとめ

特別な微細加工設備を必要とせず簡単に素早く自由な形状のアガロースマイクロチャンバーの作成が可能な 1064/1480 nm 二波長レーザー集束光加熱加工装置を開発した。またマイクロチャンバー以外にも、アガロース底面の薄い光吸収層に赤外レーザービームを集光させることでトンネル構造を作成することもできた。この機能は、顕微鏡にわずかの改良を加えるだけで実現できるので、クリーンルームで使用するような微細加工設備を持たない生物学者に広く役立つものと期待している。さらに細胞の培養途中の追加加工によって細胞同士の結合の方向までも制御可能なため、基礎生物学研究および医学研究の分野における一細胞に着目した新しい培養計測技術の一つの手段として役立つものと考えている。

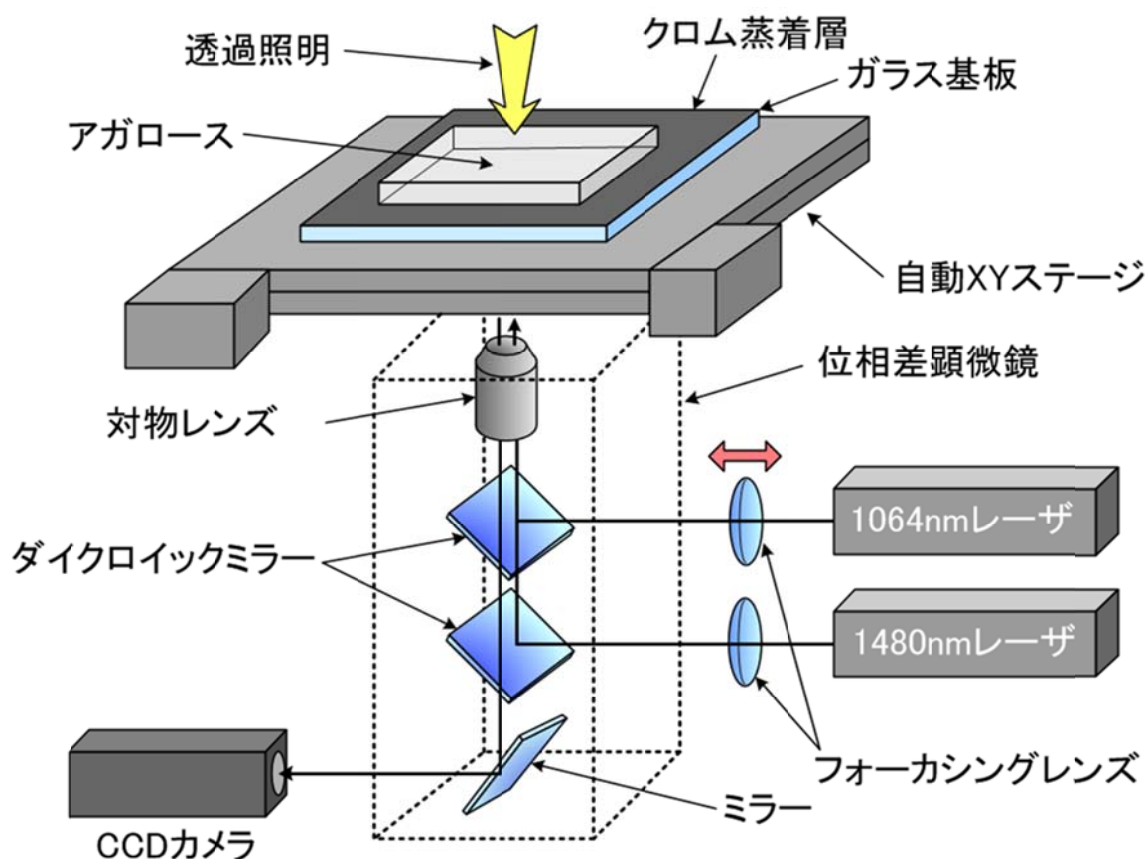


図 5-1 1064/1480 nm デュアルレーザ集束光加熱加工装置の概略図。赤外レーザによる集束光加熱加工と、加工時の位置決めや加工した領域の観察のために、可視光と 1064/1480 nm の 3 種類の波長の光に対して同時使用可能な光学系を構築した。アガロースチップは、クロムを 5nm の厚さで蒸着した厚さ 0.2mm カバーガラス上に低融点アガロースを 200 μm の厚みになるようコーティングした細胞培養用チップである。赤外レーザの集光位置は、自動 XY ステージおよびフォーカシングレンズによって水平方向と垂直方向の位置を制御できるようにした。

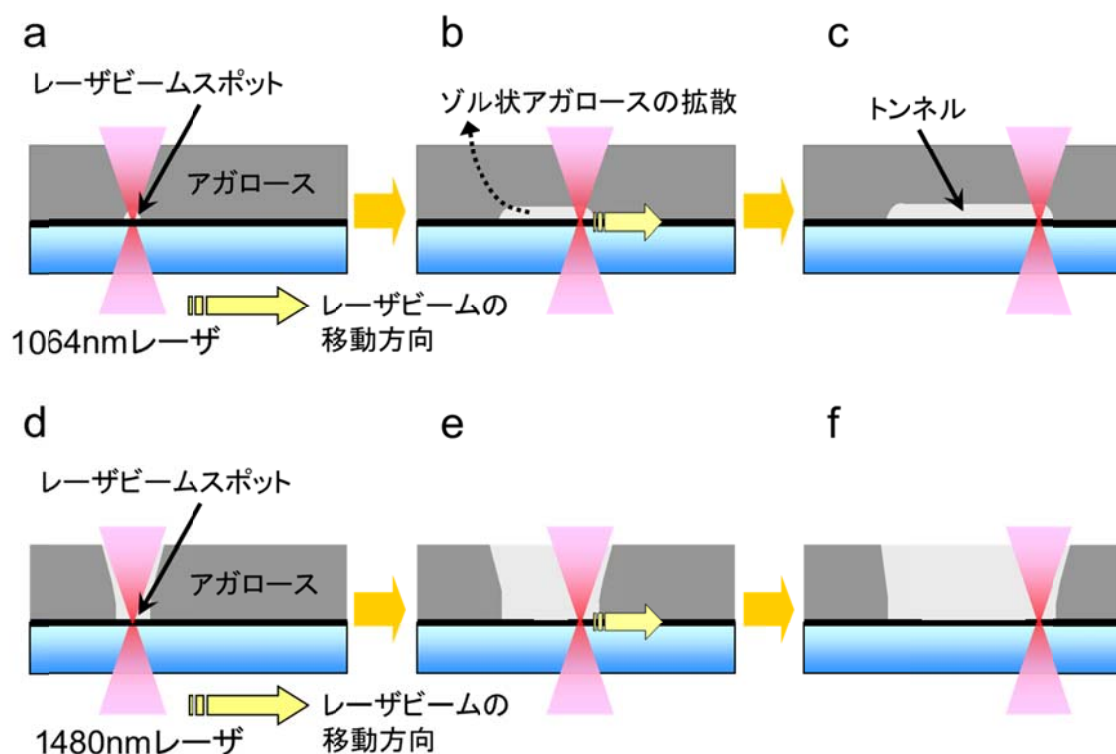


図 5-2 集束光加熱加工の原理を説明した図。まず、1064 nm 赤外レーザをカバーガラス上のクロム層に集光させる (a)。次にレーザビームの照射位置をチップ表面と平行に移動させると、クロム上の集光点近傍のアガロースがレーザビーム照射位置の移動と共に溶解し、アガロース中にトンネル状の空洞ができる (c)。一方、1480 nm 赤外レーザをアガロースチップに照射すると、レーザビームが透過する部分のアガロースが溶解し、チップ上面まで貫通した穴ができる (d)。次にレーザビームの照射位置をチップ表面と平行に移動させるとレーザビームが透過する部分のアガロースが次々と溶解する (e)。最後に、レーザビームの移動が完了するとカバーガラス上に貫通穴が形成される。

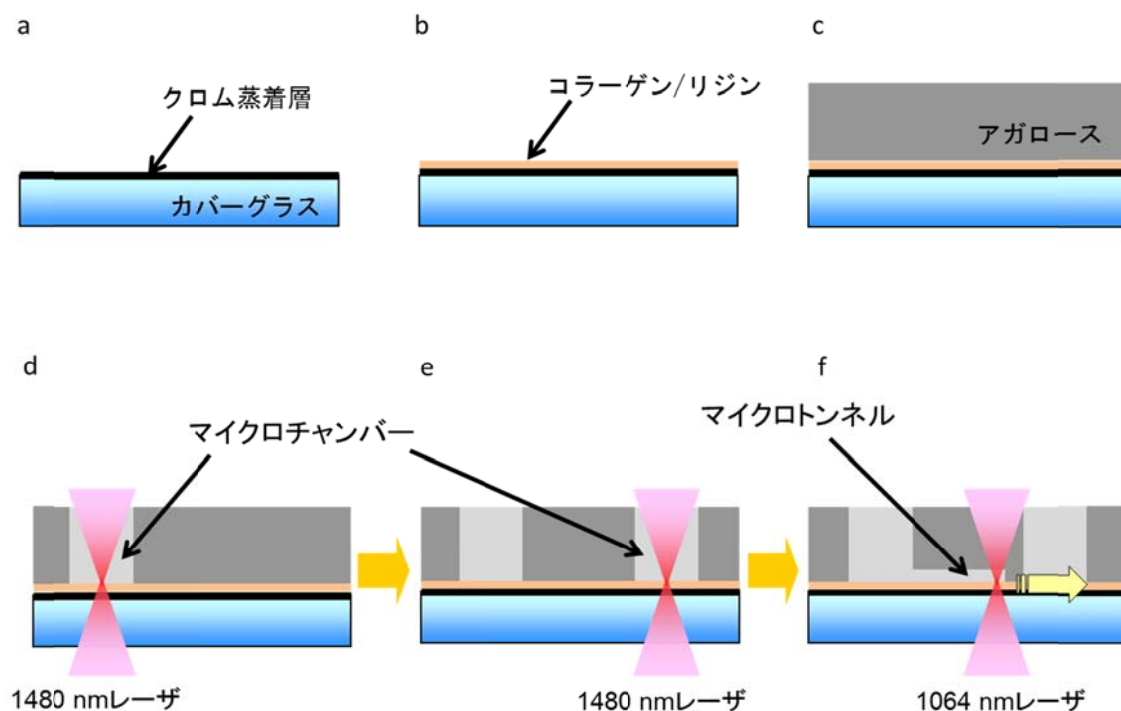


図 5-3 赤外レーザー集束光加熱によるアガロース微細構造の作成手順。(a) カバーガラスにクロムを蒸着。(b) 基板に Collagen-type I をコートした後、Poly-D-Lysine をコートした。(c) ゾル状アガロースをスピコートし、アガロースゲル薄層を形成。(d) 1480 nm レーザをアガロース層に照射し、発生した熱でアガロースゲルを溶解することで細胞を配置するマイクロチャンバーを作成。(e) レーザの照射位置を変え近接するマイクロチャンバーを作成。(f) 1064 nm レーザをクロム蒸着層に照射し XY 自動ステージによってレーザー照射位置を走査し、マイクロトンネルを作成。

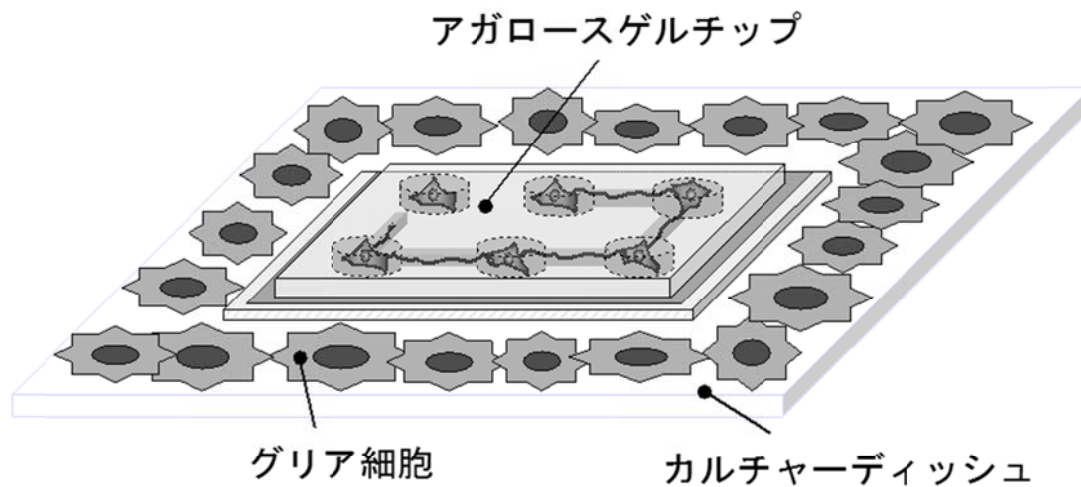


図 5-4 アガロースゲルチップ上の一細胞ネットワークにおける培養環境。

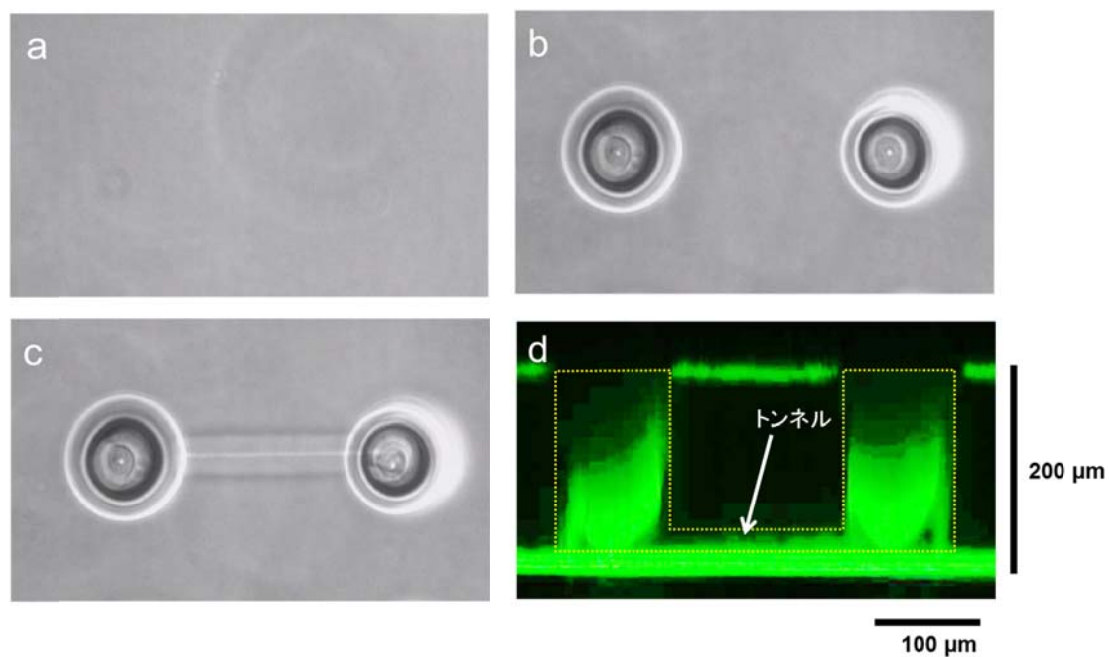


図 5-5 赤外レーザー照射によってアガロースチップ上に作成された微細構造の例。(a) 赤外レーザービームを照射する前のアガロース表面の顕微鏡写真。(b) 1480nm のレーザーを 100mW の出力で照射して作成した 2 つの穴。(c) 40mW の 1064nm レーザ照射で作成されたトンネルでつながれた 2 つの穴。(d) 赤外レーザーで加工した隙間に蛍光色素を流し込んだチップ断面の共焦点画像。

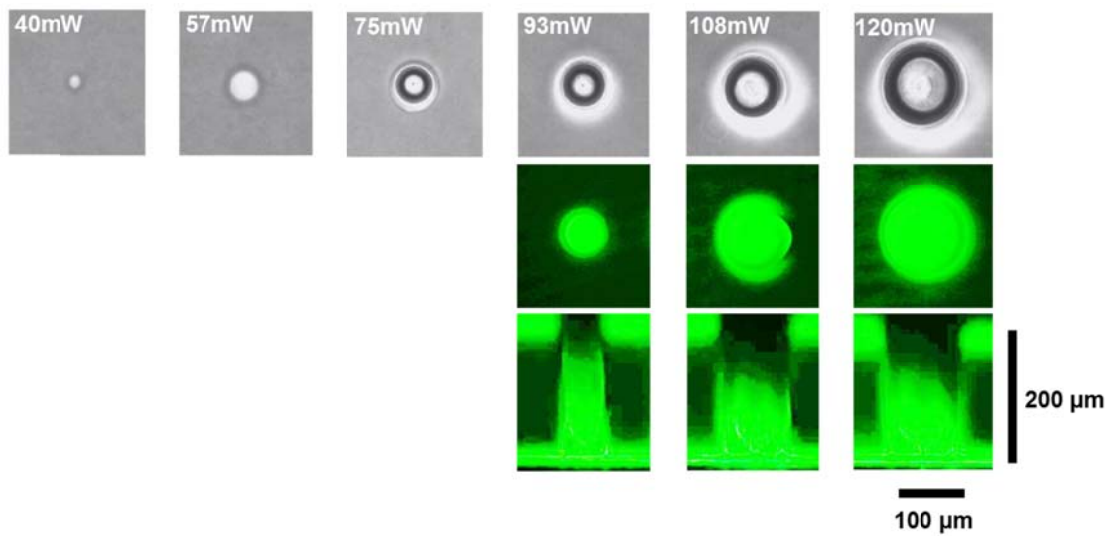


図 5-6 1480nm レーザをアガロースチップに 30 秒間照射して加工した穴の顕微鏡写真。上段の顕微鏡写真は 40mW から 120mW までのレーザ出力に対応した位相差画像。中段は上面から見たときの共焦点画像。下段はチップ断面の共焦点画像。

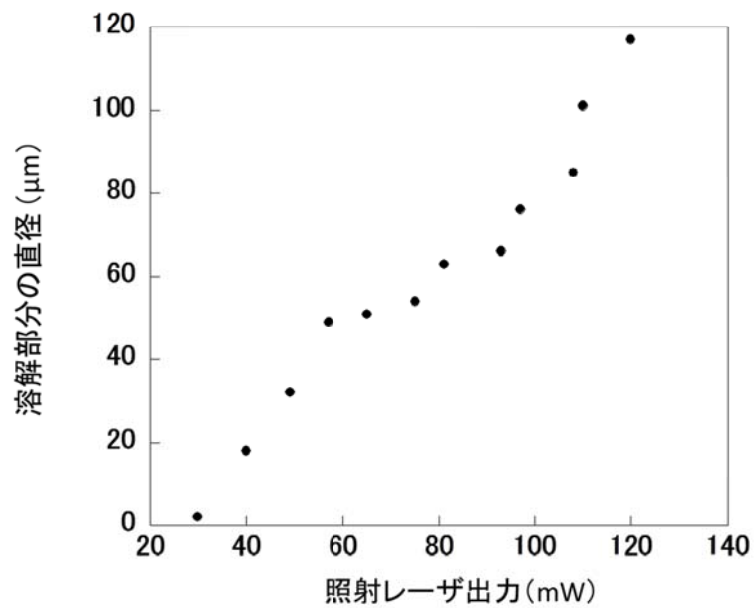


図 5-7 図 5-6 の実験結果における穴の径のレーザ出力依存性。

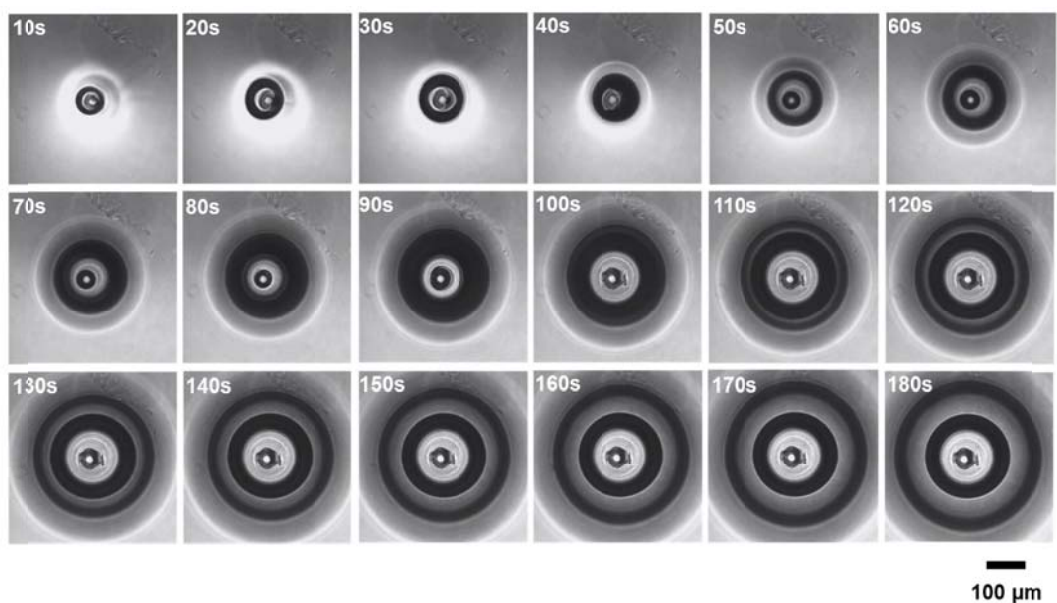


図 5-8 1480nm のレーザを 120mW の出力で照射し続けた時に生じるアガロース溶解部分の時間変化。

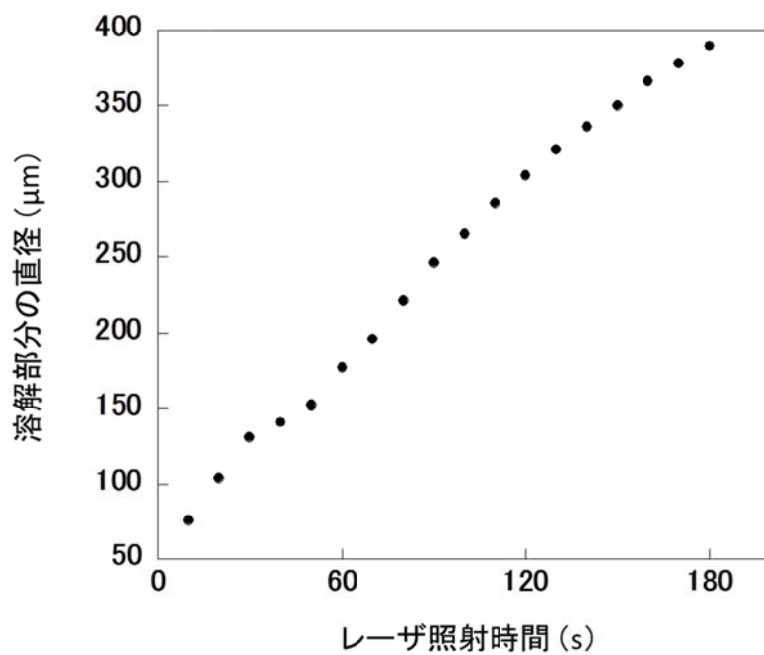


図 5-9 図 5-8 の穴径の時間変化をプロットしたグラフ。

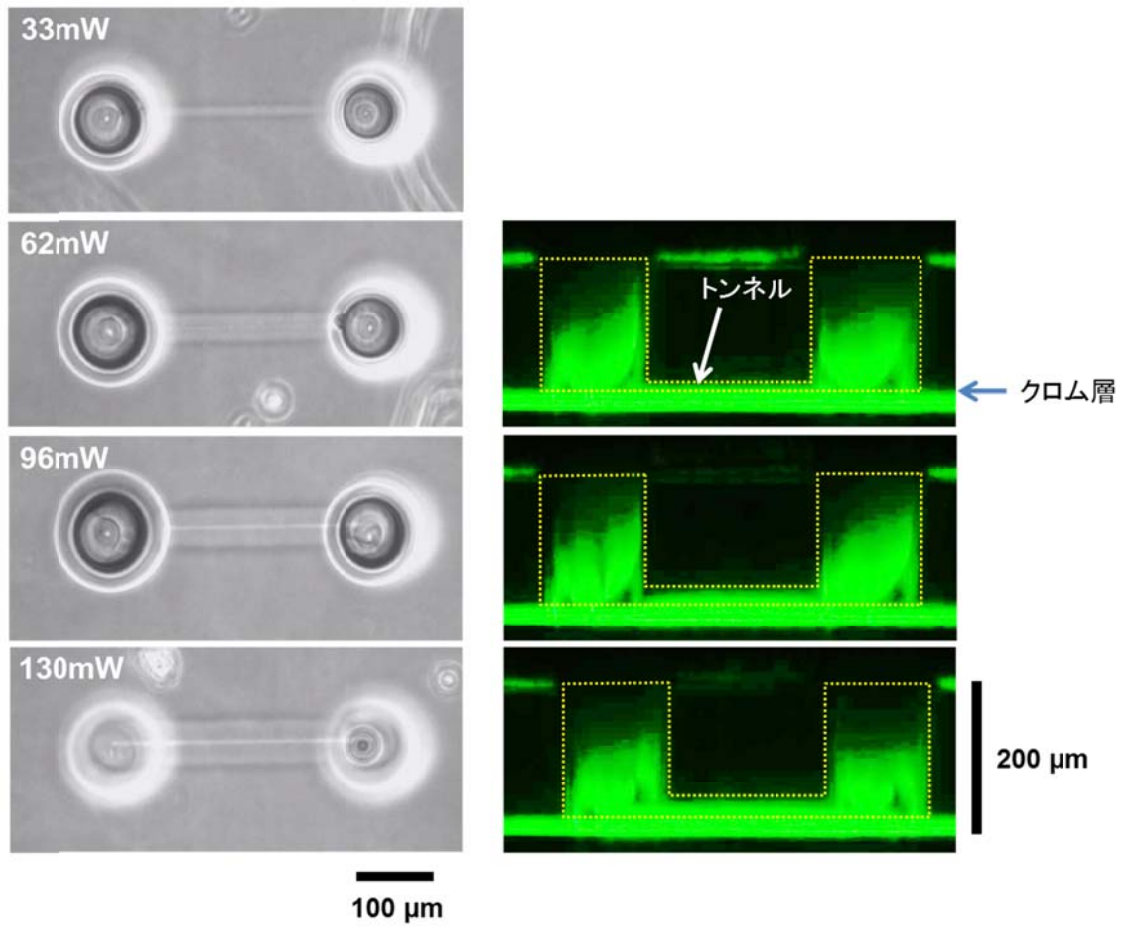


図 5-10 1480nm レーザで 2 つの穴を加工し 1064nm レーザで穴をつなぐトンネルを加工したアガロースマイクロチャンバーの位相差画像（左）と断面の共焦点画像（右）。トンネル加工時のレーザビームの移動速度は $100 \mu\text{m/s}$ 。

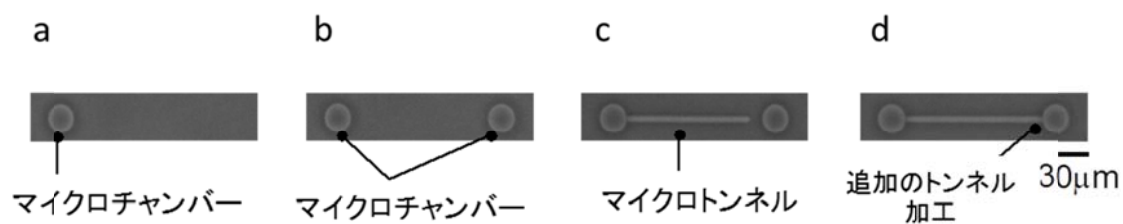


図 5-11 神経突起の方向性制御用アガロースマイクロチャンバーの加工手順。(a) 10 倍の対物レンズを用いて 1480 nm レーザをアガロースに照射し、直径 30 μm のアガロースマイクロチャンバーを作成した。(b) レーザ照射部分を移動させ、近接するマイクロチャンバーを同様に作成した。(c) 20 倍の対物レンズを用いて 1064 nm レーザを出力 17 mW、走査速度 50 $\mu\text{m}/\text{s}$ で集光させ、幅約 5 μm のマイクロトンネルを作成した。(d) 突起がマイクロトンネルに十分伸張した後、培養中に隣の細胞と接続させるために追加加工によりマイクロトンネルを近接するマイクロチャンバーまで延伸した。

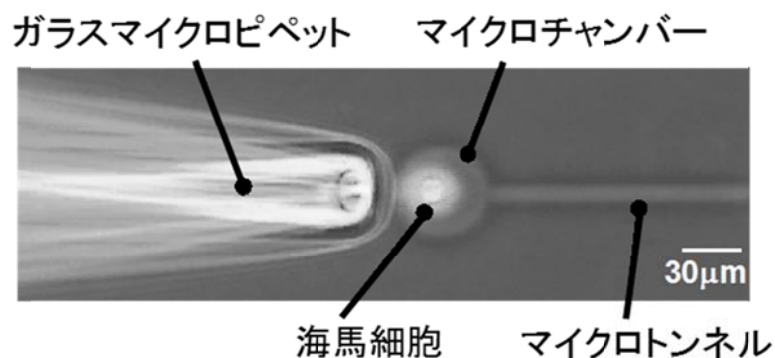


図 5-12 マイクロチャンバーへの細胞配置。作成したマイクロチャンバーに、ガラスマイクロピペットを用いて海馬細胞を一細胞ずつ配置した。

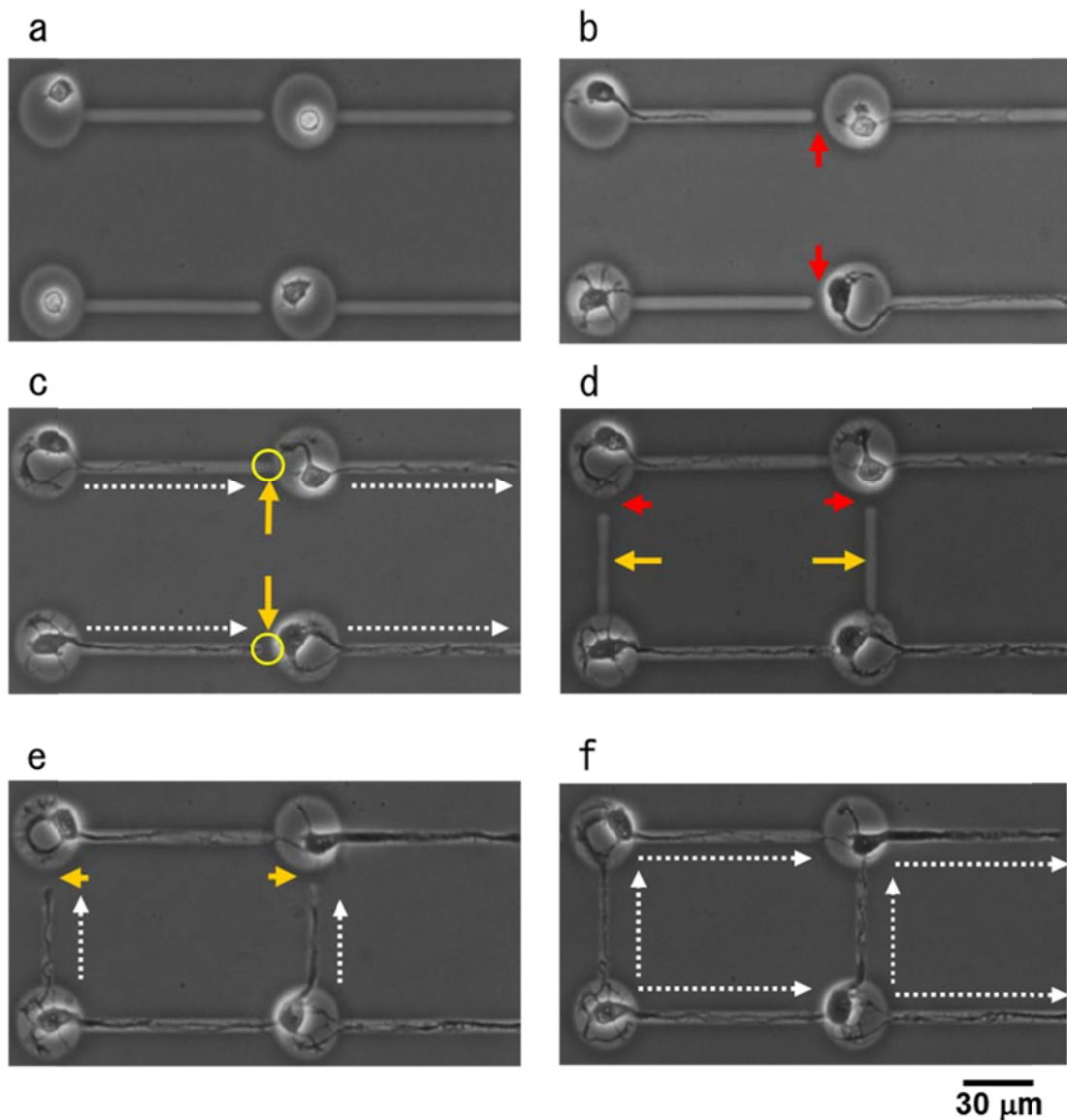


図 5-13 突起伸長方向を段階的に制御した一細胞ベースの神経ネットワークの構築。
 (a) マイクロチャンバーに一細胞ずつ配置した直後の様子。(b) 一方向に作成したマイクロトンネルを突起が伸長している様子(培養 2 日目)。赤矢印は未接続の部分。(c) マイクロトンネルに突起が十分伸びた時点で黄矢印の部分を追加加工した(培養 3 日目)。(d) (c) で追加加工した部分において細胞と突起の結合が確認された後、黄矢印部分のマイクロトンネルを加工した。赤矢印は未接続の部分。(e) (d) で加工したマイクロトンネルに突起が十分伸長した時点で黄矢印部分を追加加工した(培養 4 日目)。(f) 突起がさらに伸長し、上下の細胞間でも結合を確認できた。

第6章 本研究のまとめと今後の展望

6. 1 本研究のまとめ

本研究では、従来の細胞研究の主流であった細胞集団を対象とする手法ではなく、一細胞、さらには空間配置を制御した細胞集団を研究対象としうる技術の開発を行った。具体的には、以下のようにまとめられる。

- (1) 細胞集団ではなく、培養環境や相互作用を制御した上で特定の細胞を観察する技術。
- (2) 細胞株ではなく、多様な組織や臓器から目的とする細胞を精密に精製する技術。
- (3) 細胞の数や空間パターンを自在に制御しながら、任意の形態に連結した細胞集団を構成できる空間配置技術。

上記課題の実現のために、主に半導体製造プロセスで用いられているフォトリソグラフィ技術を中心とした微細加工技術を用いて基板上に微細構造を構築し、一細胞レベルの研究ができるオンチップ細胞計測技術を開発し、ここで開発したこれらの技術を細胞系に応用し、以下のような成果を挙げた。

- 1) カバーガラス上に光硬化性樹脂で作成した微小構造物内に大腸菌を孤立させ、細胞の運動を直接観察して画像計測したところ、大腸菌が構造物の壁に衝突する際の反応に壁への入射角度依存性があることが示唆された。(第3章)
- 2) 熱可塑性樹脂である PDMS を用いてガラス基板上に微小流路を構成し、流路を流れる細胞を高速カメラで直接観察しながらアガロースゲル電極による電気泳動力によって細胞を分離・精製するオンチップ・セルソーターを開発した。微小流路チップにおいて金属電極に代わる電極素材としてのアガロースゲル電極の評価を行った。その結果、微細構造中に自在に配置でき、電気分解を起こすことなく高電圧を印加

できるという利点を確認した。また、ポリスチレンビーズを用いた性能評価では大きさの異なる 2 種類の粒子を分離する際のエラー率は 5%未満であった。さらに、オンチップ・セルソーターの処理速度向上のために新たに 1/2,000 秒カメラを用い、FPGA による高速画像処理と高速度撮影に対応した高輝度パルス LED 光源を開発した。この結果、現在のセルソーターに比肩する処理速度である 10,000 処理/秒実現への見通しを得ることができた。また、分離した細胞をチップから取り出すことなくそのまま培養する技術についても検討し、メンブレンフィルターが細菌のコンタミネーション防止に有効であることが示された。(第 4 章)

3) 赤外レーザを熱源として用い、ガラス基板上にコートされたアガロース上に微細構造を構築できる二波長赤外レーザ集束光加熱装置を開発した。2 つの赤外レーザで異なる吸収特性を利用し、細胞培養用チャンバーとトンネルを組み合わせた三次元加工が可能であることを確認した。また、ラット海馬細胞をアガロースマイクロチャンバー内で培養し、追加加工によって細胞同士の結合のタイミングや方向性を制御できることを示した。(第 5 章)

以上のように、様々な微細加工技術を組み合わせて基板上に微細構造を構築することにより、従来の手法では不可能であった一細胞ベースの細胞計測が可能になった。

6. 2 今後の展望

本論文で述べた通り、この一連の研究は、これから「一細胞をベースにした生命科学の研究」を行うために必要な基盤技術を開発したものである。これは市販品の装置では実現できていないことが最大の理由である。今後は、この一連の技術を具体的な特定の生命現象にフォーカスして応用をすることが一つの方向性である。そしてまた、技術開発の方向性を維持して、今回開発した技術をさらに改良し続けるというのももう一つの方向性である。

自分の研究者としての背景を考えると、やはり生命科学の研究者（ユーザー）とパートナーを組み、自分自身は技術開発や運用の部分で寄与するということが個人的には向いているのではないかと考えている。そのような観点から、本論文で述べた技術開発の展開の方向性について、現在以下のようなものを考えている。

6. 2. 1 オンチップ・セルソーター

現在、1/10,000 秒カメラベースの超高速細胞画像認識技術の確立を進めている。実際の細胞における分離・精製効率の向上も含め、より高速で実用的な技術となるよう改良に努めたい。

6. 2. 2 二波長赤外レーザ集束光加熱装置

現在、数十 μm サイズの電極を集積したマルチ電極アレイ上で心筋細胞などの細胞外電位を高精度に測定可能な計測システムの開発を進めている。今後は微小電極アレイとアガロース加熱加工とを組み合わせ、任意の空間パターンに配置した細胞集団における様々な環境下での応答を計測できる実験系を構築したいと考えている。

6. 3 最後に

大学卒業後企業に就職して数年間、光学顕微鏡関連の技術開発から営業までを一貫して手がけてきたが、偶然大学の研究室で技術開発を行う機会を得たことで、遅ればせながら研究者としての道を進むことになった。そして平成 19 年度より、早稲田大学の石渡教授にご指導いただいて博士後期課程のプロセスに編入させていただくことができた。社会人として実際の業務に関わりながら、その過程で自分が担当して作ってきた技術の成果をまとめたものが本論文である。この博士課程の期間、研究をストーリーの中でまとめ上げることの大変さ、そしてまとめてみたところで感じる達成度に対する焦燥など、今後さらに精進しなければと思い知らされた三年間であった。今回、本論文で取り上げた技術開発は、どれも 1~2 年で完結するものではなく、今後 10 年、20 年かけて「継続」して必死に取り組むことで、ようやく少しは満足する結果が得られるようになるのではないかと考えている。これからも引き続き生命科学の分野で役に立つ技術を目指し、研究開発を続けてゆきたいと考えている。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、石渡信一教授には博士後期課程への受け入れから三年間、丁寧にご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

副査として本論文の審査を担当いただきました木下一彦教授、高野光則教授には、論文をまとめる上で有益なご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

学外審査員を務めていただきました東京医科歯科大学の安田賢二教授には、生物物理学の道を歩むきっかけをお与えいただき、共同研究者として10年間もの間貴重なご助言をいただきました。あらためて御礼申し上げます。

本論文作成時にコメントをいただいた東京医科歯科大学の金子智行准教授、野村典正助教に感謝いたします。

学会をはじめ数多くの場で研究内容についてディスカッションいただきました財団法人神奈川科学技術アカデミーの金賢徹研究員、寺藺英之研究員、林真人研究員に感謝いたします。林研究員には、オンチップ・セルソーターの開発に際して有益なコメントをいただきました。ありがとうございました。

ゼミなどでディスカッションいただきました、石渡研究室の皆様に感謝いたします。

これまでの研究を支えてくださったすべての方々に感謝いたします。

私に十分な教育の機会を与え、応援してくれた両親に感謝します。

子育てのさなか、今日まで支えてくれた妻弓子に感謝します。

参考文献

- [1] F. Zernike: Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica* **9**(7) (1942) 686-698.
- [2] F. Zernike: Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica* **9**(10) (1942) 974-986.
- [3] F. Zernike: How I discovered phase contrast. *Science* **121**(3141) (1955) 345-349.
- [4] K. Svoboda, W. Denk, W. H. Knox, S. Tsuda: Two-photon-excitation scanning microscopy of living neurons with a saturable Bragg reflector mode-locked diode-pumped Cr:LiSrAlF₄ laser. *Opt Lett.* **21**(17) (1996): 1411-1413.
- [5] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki: An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *PNAS* **99**(20) (2002): 12651-12656
- [6] K. J. Begg, W. D. Donachie: Changes in cell size and shape in thymine-requiring *Escherichia coli* associated with growth in low concentrations of thymine. *J Bacteriol* **133** (1978) 452-458.
- [7] A. Zaritsky, C. L. Woldringh, C. E. Helmstetter, N. B. Grover: Dimensional rearrangement of *Escherichia coli* B/r cells during a nutritional shift-down. *J Gen Microbiol* **139** (Pt 11) (1993) 2711-2714.
- [8] N. Grossman, E. Z. Ron: Apparent minimal size required for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171** (1989) 80-82.
- [9] H. E. Kubitschek: Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J Bacteriol* **172** (1990) 94-101.
- [10] K. F. Jensen, S. Pedersen: Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a

consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components.

Microbiol Rev **54** (1990) 89-100.

[11] F. J. Trueba, E. A. van Spronsen, J. Traas, C. L. Woldringh: Effects of temperature on the size and shape of *Escherichia coli* cells.

Arch Microbiol **131** (1982) 235-240.

[12] P. Canepari, C. Signoretto, M. Boaretti, M. Del Mar Lleo: Cell elongation and septation are two mutually exclusive processes in *Escherichia coli*.

Arch Microbiol **168** (1997) 152-159.

[13] H. Bremer, L. Chuang: Cell division in *Escherichia coli* after changes in the velocity of DNA replication.

J Theor Biol **102** (1983) 101-120.

[14] K. Maeda, Y. Imae, J.I. Shioi, F. Oosawa: Effect of temperature on motility and chemotaxis of *Escherichia coli*.

J Bacteriol **127**(1976) 1039-46.

[15] C.D. Amsler, M. Cho, P. Matsumura: Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth.

J Bacteriol **175** (1993) 6238-44.

[16] H.C. Berg, L. Turner: Cells of *Escherichia coli* swim either end forward.

Proc Natl Acad Sci U S A **92** (1995) 477-479.

[17] I. Inoue, Y. Wakamoto, H. Moriguchi, K. Okano, K. Yasuda: On-chip culture system for observation of isolated individual cells.

Lab Chip **1** (2001) 50-55.

[18] Y. Wakamoto, I. Inoue, H. Moriguchi, K. Yasuda: Analysis of single-cell differences using on-chip microculture system and optical trapping.

Fresenius' J. Anal. Chem **371** (2001) 276-281.

[19] I. Inoue, Y. Wakamoto, K. Yasuda: Non-genetic variability of division cycle and growth of

isolated individual cells in on-chip culture system.

Proc. Japan. Acad. **77B** (2001) 145-150.

[20] W. A. Bonner, H. R. Hulett, R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg: Development and Application of a Rapid Cell Sorter.

Clin. Chem. **19** (1973) 813-816.

[21] M. Steinberg: Reconstruction of tissues by dissociated cells.

Science **141** (1963) 401-408.

[22] A. Y. Fu, C. Spence, A. Scherer, F. H. Arnold, and S. R. Quake: A microfabricated fluorescence-activated cell sorter.

Nat. Biotechnol. **17** (1999) 1109-1111.

[23] J. Yang, Y. Huang, X. B. Wang, F. F. Becker, and P. R. Gascoyne: Differential analysis of human leukocytes by dielectrophoretic field-flow-fractionation.

Biophys.J. **78** (2000) 2680-2689.

[24] S. Fiedler, S. G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr: Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem.

Anal.Chem. **70** (1998) 1909-1915.

[25] H. Morgan, M. P. Hughes, and N. G. Green: Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis.

Biophys.J. **77** (1999) 516-525.

[26] A. Y. Fu, H. P. Chou, C. Spence, F. H. Arnold, and S. R. Quake: An integrated microfabricated cell sorter.

Anal. Chem. **74** (2002) 2451-2457

.

[27] J. Cheng, E. L. Sheldon, L. Wu, M. J. Heller, and J. P. O'Connell: Isolation of cultured cervical carcinoma cells mixed with peripheral blood cells on a bioelectronic chip.

Anal. Chem. **70** (1998) 2321-2326.

[28] P. C. Li and D. J. Harrison: Transport, manipulation, and reaction of biological cells on-chip using electrokinetic effects.

Anal.Chem. **69** (1997) 1564-1568.

[29] S. Ferree and H. W. Blanch: Electrokinetic stretching of tethered DNA.
Biophys.J. **85** (2003) 2539-2546.

[30] T. Inoue, K. Takahashi, and H. Yokoyama: Integrated Microfluidics for Chromosome Engineering Preparation, Transportation and Manipulation.
Arch. Histol. Cytol. **65** (2002) 465-471.

[31] C. A. Emrich, I. L. Medintz, W. K. Chu, and R. A. Mathies: Microfabricated two-dimensional electrophoresis device for differential protein expression profiling.
Anal. Chem. **79** (2007) 7360-7366.

[32] Y. Xia and G. M. Whitesides: Soft lithography.
Angew. Chem. Int. Ed. **37** (1998) 550-575.

[33] D. Qin, Y. Xia, and G. M. Whitesides: A rapid prototyping method for generating patterns and structures with feature sizes larger than 20 μm .
Adv. Mater. **8** (1996) 917-919.

[34] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides: Rapid prototyping microfluidics system in poly(dimethylsiloxane)
Anal. Chem. **70** (1998) 4974-4984.

[35] R. J. Jackman, D. C. Duffy, E. Ostuni, N. D. Willmore, and G. M. Whitesides: Fabricating large arrays of microwells with arbitrary dimensions and filling them using discontinuous dewetting.
Anal. Chem. **70** (1998) 2280-2287.

[36] I. S. Bhandal, R. M. Hauptmann, and J. M. Widholm: Trehalose as Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Carrot and Tobacco Cells.
Plant Physiol. **78** (1985) 430-432.

[37] T. E. Honadel and G. J. Killian: Cryopreservation of murine embryos with trehalose and glycerol.
Cryobiology **25** (1988) 331-337.

- [38] P. Ge'linas, G. Fiset, A. LeDuy, and J. Goulet: Effect of Growth Conditions and Trehalose Content on Cryotolerance of Bakers' Yeast in Frozen Doughs.
Appl. Environ. Microbiol. **55** (1989) 2453-2459.
- [39] A. Hino, K. Mihara, K. Nakashima, and H. Takano: Trehalose Levels and Survival Ratio of Freeze-Tolerant versus Freeze-Sensitive Yeasts.
Appl. Environ. Microbiol. **56** (1990) 1386-1391.
- [40] Y. Chen, R. H. Foote, and C. C. Brockett: Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm.
Cryobiology **30** (1993) 423-431.
- [41] F. Pincet, E. Perez, and J. Wolfe: Do trehalose and dimethyl sulfoxide affect intermembrane forces?
Cryobiology **31** (1994) 531-539.
- [42] H. Iwahashi, K. Obuchi, S. Fujii, and Y. Komatsu: The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
CellMol. Biol. **41** (1995) 763-769.
- [43] C. A. Behm: The role of trehalose in the physiology of nematodes.
Int. J. Parasitol. **27** (1997) 215-229.
- [44] A. Curtis and C. Wilkinson: Topographical control of cells.
Biomaterials **18** (1997) 1573-1583.
- [45] P. Clark, P. Connolly, A.S.G. Curtis, J.A.T. Dow and C.D.W. Wilkinson: Topographical control of cell behavior. I. Simple step cues
Development **99** (1987) 439-448.
- [46] P. Clark, P. Connolly, A.S.G. Curtis, J.A.T. Dow, and C.D.W. Wilkinson: Cell guidance by ultrafine topography in vitro
J. Cell Sci. **99** (1991) 73-77.
- [47] D. M. Brunette, G.S. Kenner and T.R.L. Gould: Grooved titanium surfaces orient growth

and migration of cells from human gingival explants

J. Dental Res. 62 (1983) 1045-1048.

[48] S. Metz, R. Holzer and P. Renaud: Polyimide-based microfluidic devices

Lab Chip 1 (2001) 29-34.

[49] K. Yasuda, K. Okano and S. Ishiwata: Focal extraction of surface-bound DNA from a microchip using photo-thermal denaturation

Biotechniques 28 (2000) 1006-1011.

[50] H. Moriguchi, Y. Wakamoto, Y. Sugio, K. Takahashi, I. Inoue and K. Yasuda: An agar-microchamber cell-cultivation system: flexible change of microchamber shapes during cultivation by photo-thermal etching

Lab chip 2 (2002) 125-132.

研究業績

【論文】(学位申請には、2)、10)、および 14) を用いた。)

- 1) K. Matsumura, T. Yagi, A. Hattori, M. Soloviev, and K. Yasuda
“Using single cell cultivation system for on-chip monitoring of the interdivision timer in *Chlamydomonas reinhardtii* cell cycle.”
Journal of Nanobiotechnology 8:23 (25 Sep. 2010)
- 2) A. Hattori and K. Yasuda
“Comprehensive Study of Microgel Electrode for On-chip Electrophoretic Cell Sorting.”
Jpn. J. Appl. Phys. 49 (6) 06GM04 1-4 (21 June 2010)
- 3) H. Terazono, H. Takei, A. Hattori, and K. Yasuda
“Development of a high-speed real-time PCR system using a circulating water-based rapid heat-exchange.”
Jpn. J. Appl. Phys. 49 (6) 06GM05 1-5 (21 June 2010)
- 4) H. Terazono, A. Hattori, H. Takei, K. Takeda, and K. Yasuda
“Development of 1480 nm Photothermal High-Speed Real-Time Polymerase Chain Reaction System for Rapid Nucleotide Recognition.”
Jpn. J. Appl. Phys. 47 (6) 5212-5216 (20 June 2008)
- 5) K. Shibata, H. Terazono, A. Hattori, and K. Yasuda
“Collagen Micro-Flow Channels as an for In vitro Blood-Brain Barrier Model.”
Jpn. J. Appl. Phys. 47 (6) 5208-5211 (20 June 2008)
- 6) I. Suzuki, A. Hattori, and K. Yasuda
“On-chip multi channel action potential recording system for electrical measurement of single neurites of neuronal network.”
Jpn. J. Appl. Phys. 46 (42) L1028-L1031 (26 October 2007)
- 7) S. Umehara, A. Hattori, I. Inoue, and K. Yasuda
“Asynchrony in the growth and motility responses to environmental changes by individual bacterial cells.”
Biochem Biophys Res Commun 356 (2) 464-469 (07 March 2007)
- 8) S. Umehara, A. Hattori, Y. Wakamoto, and K. Yasuda
“Simultaneous measurement of growth and movement of cells exploiting on-chip single-cell cultivation assay.”
Jpn. J. Appl. Phys. 43 (3) 1214-1217 (2004)
- 9) I. Suzuki, Y. Sugio, H. Moriguchi, A. Hattori, K. Yasuda, and Y. Jimbo
“Pattern modification of a neuronal network for individual-cell-based electrophysiological measurement using photothermal etching of an agarose architecture with a multielectrode array.”
IEE Proc.-Nanobiotechnol. 151 (3) 116-121 (2004)

- 10) A. Hattori, H. Moriguchi, S. Ishiwata, and K. Yasuda
 “A 1480-nm/1064-nm dual wavelength photo-thermal etching system for non-contact three-dimensional microstructure generation into agar microculture chip.”
 Sens & Actuat B 100 (3) 455-462 (2004)

- 11) A. Hattori, S. Umehara, Y. Wakamoto, and K. Yasuda
 “Simultaneous measurement of movement and growth of swimming cells using on-chip single-cell cultivation assay.”
 Proceedings of μ TAS 2004

- 12) K. Takahashi, A. Hattori, I. Suzuki, T. Ichiki, and K. Yasuda
 “Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time microscopic image processing.”
 Journal of Nanobiotechnology 2: 5 (03 June 2004)

- 13) A. Hattori, H. Moriguchi, S. Ishiwata, and K. Yasuda
 “A 1480-nm/1064-nm dual wavelength photo-thermal etching system for non-contact three-dimensional microstructure generation into agar microculture chip.”
 Proceedings of μ TAS 2003

- 14) A. Hattori, S. Umehara, Y. Wakamoto, and K. Yasuda
 “Measurement of incident angle dependence of swimming bacterium reflection using on-chip single-cell cultivation assay.”
 Jpn. J. Appl. Phys. 42 (7B) L873-L875 (16 May 2003)

- 15) K. Kojima, H. Moriguchi, A. Hattori, T. Kaneko, and K. Yasuda
 “Two-dimensional Network Formation of Cardiac Myocytes in Agar Microculture Chip with 1480-nm Infrared Laser Photo-thermal Etching.”
 Lab Chip 3 299-303 (2003)

【国際会議】

- 1) A. Hattori, M. Hayashi, and K. Yasuda
 “Image Recognition based Cell Sorting Device with Cultivation Chamber.”
 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2010)
 Kokura, Japan November 2010

- 2) A. Hattori, M. Hayashi, and K. Yasuda
 “A Novel Cell Purification Device based on Fast Image Analysis in Cellomics Era.”
 22nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2009)
 Sapporo, Japan November 2009

- 3) A. Hattori, H. Terazono, H. Kawase, and K. Yasuda
 “Development of a novel cell sorting system based on image recognition and microfabrication technology (I): System development.”
 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
 Okinawa, Japan November 2006

- 4) A. Hattori and K. Yasuda
 “Examination of optimum shapes of microfluidic devices for cell passage using three-dimensional control of microfluidic pathway.”

Biophysical Society 50th Annual meeting
Salt Lake City, USA, February 2006

5) A. Hattori, S. Umehara, Y. Wakamoto, and K. Yasuda
“Simultaneous measurement of movement and growth of swimming bacterium using on-chip single-cell cultivation assay.”

Biophysical Society 49th Annual meeting
Long Beach, USA February 2005

6) A. Hattori, S. Umehara, Y. Wakamoto, and K. Yasuda
“Simultaneous measurement of movement and growth of swimming cells using on-chip single-cell cultivation assay.”
8th International Conference on Micro Total Analysis System (Micro-TAS2004)
Malmö, Sweden, September 2004

7) A. Hattori, H. Moriguchi, S. Ishiwata, and K. Yasuda
“Development of a photo-thermal etching system for agar-microculture chip using dual infrared laser.”
The 21st Century COE Program Research Center for Integrated Sciences 1st International Symposium
Tokyo, Japan, November 2003

8) A. Hattori, H. Moriguchi, S. Ishiwata, and K. Yasuda
“A 1480-nm/1064-nm dual wavelength photo-thermal etching system for non-contact three-dimensional microstructure generation into agar microculture chip.”
7th International Conference on Micro Total Analysis System (Micro-TAS2003)
Squaw Valley, USA, October 2003

9) A. Hattori, I. Inoue, Y. Wakamoto, and K. Yasuda
“Development of on-chip time-lapse analysis system for continuous observation of single cells.”
Biophysical Society 46th Annual meeting
San Francisco, USA, February 2002