

フェムト秒レーザープロセッシングによる 単細胞操作チップの開発

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科
教授 細川 陽一郎
(平成 28 年度 一般研究開発助成 AF-2016225)

キーワード：バイオ応用，マイクロ流体チップ，ガラス加工，セルソーター

1. 研究の目的と背景

近年のバイオイメージング技術の発展に伴い，その対象は細胞集団から 1 細胞となり，細胞ごとの構造や機能の理解が進んできている．動物細胞の典型的なサイズは $10\ \mu\text{m}$ 程度であり，現在，その空間スケールのマイクロ流体チップの中で細胞を自在に配列制御し，操作できる技術がバイオ研究者から望まれている．細胞は主に，プラスチック（ポリスチレン）もしくはガラスなどの細胞培養基板上で培養される．顕微鏡下で集光したフェムト秒レーザーを用いることにより，これらの透明材料を 3 次元的に，かつ比熱的に加工できる．我々は薄膜ガラスをフェムト秒レーザーにより，加工してマイクロ流体チップを形成する方法を提案してきている⁽¹⁻⁴⁾．さらには，細胞培養基板上にポリマーや単分子膜を塗布し，フェムト秒レーザーにより改質することで，基板上での細胞の遊走や細胞間相互作用を制御できることを示してきている⁽⁵⁾．本研究では，上記の背景を鑑み，フェムト秒レーザープロセスを駆使した新規なマイクロ流体チップの開発を推進した．

特に近年，1 細胞を対象としたセルソーターにマイクロ流体チップ技術を応用しようとする試みが注目されている．セルソーターにおける効果的かつ高スループットな細胞選別は，生物学，医療工学，ヘルスケア工学および臨床応用における単細胞分析の重要な技術となっている．これまでに，蛍光活性化セルソーティング (FACS)⁽⁶⁾ や磁気活性化セルソーティング (MACS)^(7,8) などがあるが，これらの手法は細胞に標識を付けたり，多量な試薬，及び試薬汚染のリスクなどの問題点があり，その解決策として，マイクロ流体デバイスを用いた細胞分取が注目されている⁽⁹⁾．

マイクロ流体チップ中のマイクロ流路内で細胞を操作（分離）する方法は，大きく 2 種類に大別され，流路の形状を工夫して流路内の流れを制御し細胞を操作する方法 (Passive method) と，流路に外力作用させて細胞を操作する方法 (Active method) がある．Passive method は大量の細胞を高速に分離できるが，個々の細胞の複雑な操作は難しい．Active method は，外部制御により柔軟に一つずつの細胞を操作でき，特にサンプル中の希少な細胞の操作に適していると考えられる．我々は，Active method による細胞操作の外力として，フェムト秒レーザー誘起衝撃力とマイクロ流体デバイスを組み合わせたシステムに注目し，これまで研究開発を進めている⁽¹⁰⁻¹²⁾．

図 1 にそのシステム構成を示す．マイクロ流体デバイス内のマイクロ流路上に細胞検出用のレーザーと細胞操作のための外力を発生するためのフェムト秒レーザーが導入されている．マイクロ流路は分岐を持ち，標的細胞が検出された際，フェムト秒レーザー誘起衝撃力により，回収用の流路（図中の Collection）に誘導される．このようなマイクロ流体デバイス中での高精度な細胞操作を実現するためには，流路内で細胞を如何に整列させるかがキーテクノロジーとなる．本研究では，フェムト秒レーザーによりガラス製流路の下面に付加加工を施し，細胞を流路の特定位置に収束させる方法を検討した．

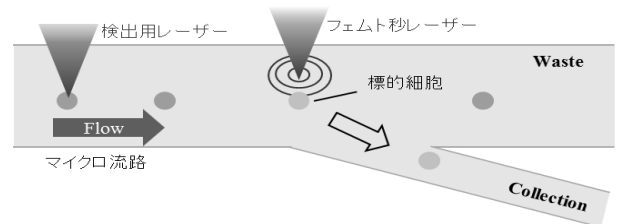


図 1 フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いた細胞分取の概略図

2. 実験方法

マイクロ流路を加工するためのフェムト秒レーザー実験システムを図 2 に示す．レーザー光源として，再生増幅器付きフェムト秒チタンサファイアレーザーシステム (Solstice, Spectra-Physics, 100fs, 800 nm, 1 kHz) を用いた．ガラス基板を倒立顕微鏡 (IX71, Olympus) の電動ステージ上に配置し，フェムト秒レーザーを 10 倍の対物レンズ (NA. 0.25) により流路の下面に集光して加工した．電動ステージと機械式シャッターをコンピューターにより制御し，流路の下面に任意の溝パターンを形成した．ガラス基板 (スライドガラス) を電動ステージに乗せ， $100\ \mu\text{m/s}$ の速度でスキャンし， $1.0\ \mu\text{J/pulse}$, $1.4\ \mu\text{J/pulse}$, $2.8\ \mu\text{J/pulse}$ のレーザーパルスエネルギーで溝構造の加工条件を検討した．

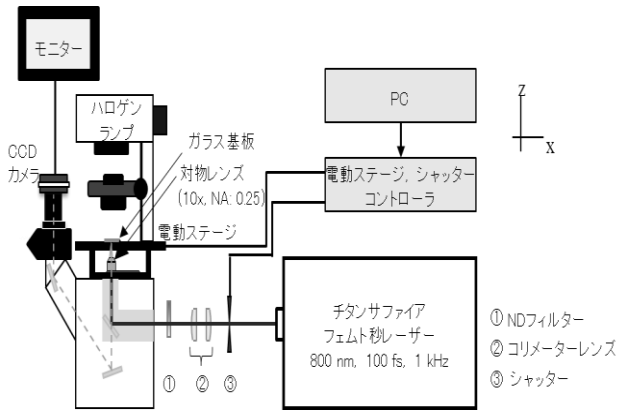


図2 フェムト秒レーザーによる構造作製のための実験系

3. 実験成果

3. 1 ガラス基板のフェムト秒レーザー加工

作製した溝構造の形状を電子顕微鏡 (SEM) で観察し、加工溝の幅と深さを測定した. パルスエネルギーごとの加工溝の幅と深さの測定結果を図3 (a) に、溝の断面のSEM像を図3 (b) に示す. 図3 (a) に示すように、加工溝の幅はそれぞれの条件で約 $3 \mu\text{m}$ であり、レーザーパルスエネルギーにほとんど依存しなかった. 深さは $1.0 \mu\text{J/pulse}$ で約 $3 \mu\text{m}$ 、 $2.8 \mu\text{J/pulse}$ で約 $10 \mu\text{m}$ であった. $2.8 \mu\text{J/pulse}$ の時、 $1.0 \mu\text{J/pulse}$ の時の約3倍となった. この結果は、パルスエネルギーに依存する自己集束効果により、溝の深さを調節できることを示唆している.

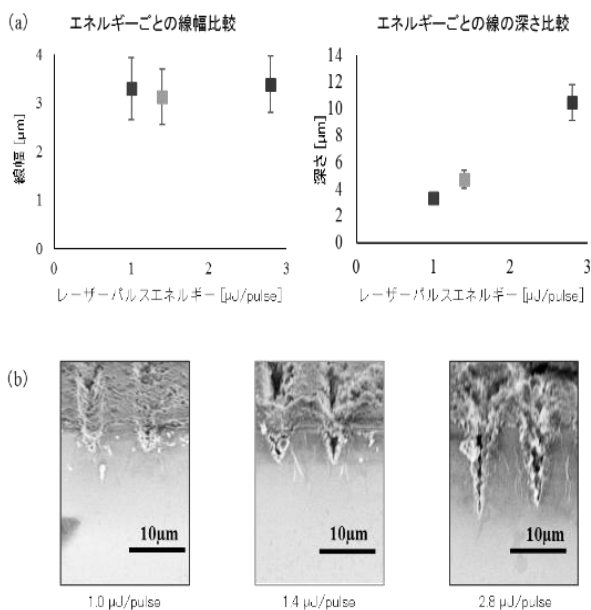


図3 フェムト秒レーザーによるガラスの溝加工. (a) 左図はエネルギーごとの加工溝の幅の比較, 右図は深さの比較を示す. 各 N 数: 20. (b) 加工溝の断面のSEM像 (1500倍).

3. 2 マイクロ流路の溝パターンの検討

流路内で細胞を収束させるための溝パターンとして、流路 (幅 $50 \mu\text{m}$, 高さ $10 \mu\text{m}$) 内に $1 \mu\text{m}$ の間隔で、連続した「く」の字パターンを作製した.

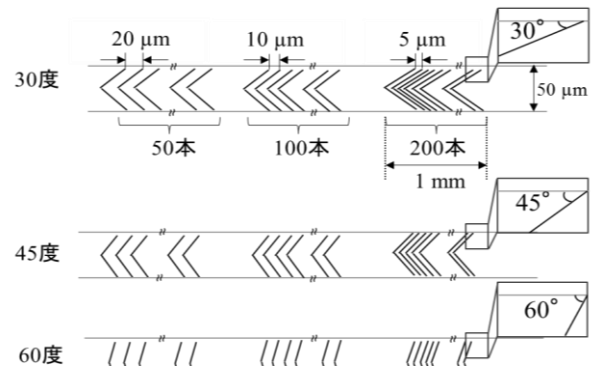


図4 フェムト秒レーザーで加工したパターン (くの字) の模式図

図4に示すように、「く」の字パターンは、流路の進行方向に対して、 30 度、 45 度、 60 度と角度を変え、それぞれの角度に対し、異なる間隔のパターンを三つ用意した. パターン形成後、加工時に発生したデブリなどを除去するために、エタノール、窒素フローを吹きかけ洗浄し、電気炉により 580 度で約5時間のアニール処理を行った.

作製した各パターンの全長は 1mm であり、その中で溝間隔を $5 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m}$ に調整し、さらに角度、深さ、流速の異なる「く」の字パターン構造をもつ試料を準備した. またレーザーパルスエネルギーを $1.0 \mu\text{J/pulse}$ と $2.8 \mu\text{J/pulse}$ で加工し、溝パターンの深さを調整した. これらの「く」の字パターン構造を通過する前後のポリマー微小球 (直径 $20 \mu\text{m}$) の挙動を図5に示す実験系により観察し、評価した.

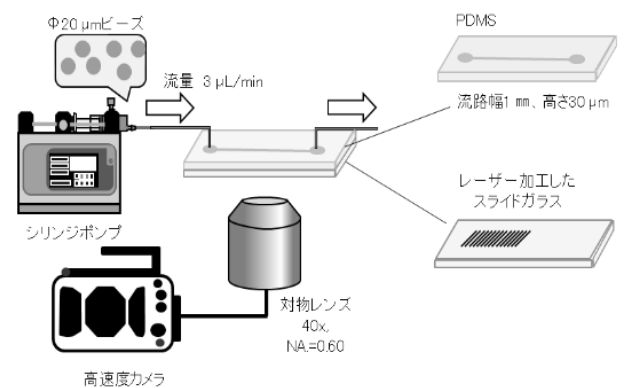


図5 加工されたマイクロ流体デバイスを通る微小球の挙動観察のための実験概略図

作製した各パターンの全長は1 mm であり, 其中での溝間隔を 5 μm , 10 μm , 20 μm に調整し, さらに角度, 深さ, 流速の異なる「く」の字パターン構造をもつ試料を準備した. またレーザーパルスエネルギーを 1.0 $\mu\text{J/pulse}$ と 2.8 $\mu\text{J/pulse}$ で加工し, 溝パターンの深さを調整した. これらの「く」の字パターン構造を通過する前後のポリマー微小球 (直径 20 μm) の挙動を図 5 に示す実験系により観察し, 評価した.

図 6 にまとめられるように, 角度の小さい, 溝の深さの深い, 流体の流速の低いパターンで, 集束効果が高い傾向が示された. これらの結果から, マイクロ流路内を流れる微小球の挙動は, 流路内の「く」の字溝構造パターンの角度, 深さ, 流体の流速により影響されることが示された.

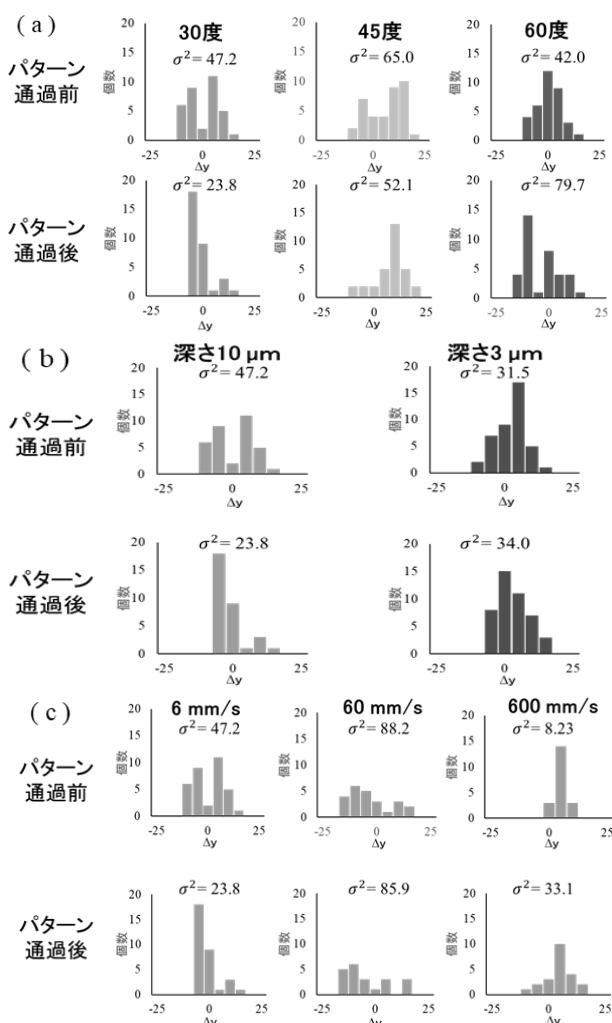


図 6 微小球の集束効果の角度, 溝深さ, 流速依存性. (a) 流速 6 mm/s, 深さ 10 μm , 間隔 10 μm で角度依存性. (b) 流速 6 mm/s, 30 度の「く」の字パターン, 溝間隔 10 μm で深さでの依存性. (c) 30 度の「く」の字パターン, 深さ 10 μm , 間隔 10 μm での流速依存性.

3. 3 マイクロ流路内の微細構造による細胞操作

図 5 のシステムに, 集束傾向の高い深さ 10 μm の 30 度の「く」の字パターン (溝間隔 5 μm と 10 μm) を加工したマイクロ流体デバイスを配置し, 細胞を用いた実験をおこなった. 細胞として, 直径 2-10 μm の藻類細胞であるクロレラを用いた. 流速 6 mm/s で, クロレラ含む試料溶液をデバイスに導入した結果を図 7 に示す. 「く」の字パターンを通過する前後のクロレラの位置を高速カメラで撮影した結果, 溝間隔が 5 μm のとき, 流路の中央付近へ, クロレラが導かれる様子が確認できた. 溝間隔が 10 μm のとき, 集束が見られなかった. クロレラのサイズは, 図 7 で検討した微小球のよりも小さく, 密度の高い構造でのみ集束効果がみられたと考えられる.

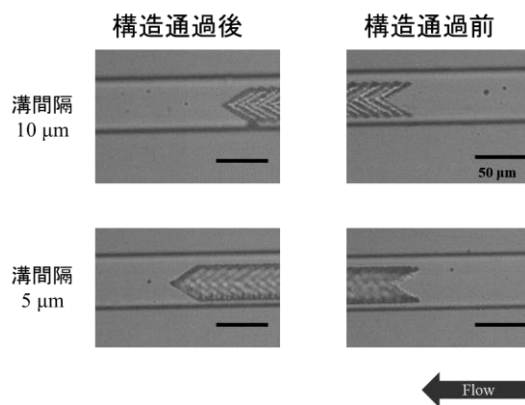


図 7 溝パターン通過前後のクロレラの位置を示す高速カメラ像

4. 結言

本研究では, フェムト秒レーザー誘起衝撃力とマイクロ流体デバイスを用いた細胞分取システムの性能向上を目指し, 既存の整列手法と組み合わせることが可能である流路内微細加工による配列手法を提案し, 検討した. 流路内をフェムト秒レーザー付加加工したマイクロ流体デバイスを作製し, 微小球とクロレラの挙動について観察した結果, 流路内の溝構造によりこれらを集束させることができる可能性を見出した.

本研究では, ガラス製のマイクロ流体デバイスに, フェムト秒レーザーにより加工を施したが, ガラス材料およびその加工プロセスをさらに検討することにより, その性能向上が見込まれる. 例えば, HF や HNO_3 に用いて, 加工しきい値以下のフェムト秒レーザーをガラス材料に照射し, ウェットエッチングを行った場合, レーザ照射により物性変化が生じた箇所が速くエッチングされることが知られている. さらに, この現象を用いて直径数 μm のマイクロチャンネルを 3 次元的に加工できることが報告されている.

既存マイクロ流体デバイスの作製ではフェムト秒レーザー加工技術は補足的な加工手法であり、マイクロ流体デバイス自身の作製に向いてない。しかし、既存手法で作成したマイクロ流体デバイスに簡便かつ迅速に付加加工を行う方法としては有効である。今後、さらなる性能向上に向けたフェムト秒レーザーを利用した、マイクロ流体デバイスの付加加工プロセスの検討を進めていく。

謝 辞

本研究は、公益財団法人天田財団の一般研究開発助成AF-2016225によっておこなわれたものであり、ここに感謝の意を表します。本研究の実施にあたり、ご協力いただきました Yalikul Yaxiaer 先生、岡野和宣先生、研究室学生の名本美寿氏、方超穎氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Y. Yalikul, Y. Hosokawa, T. Iino, Y. Tanaka: An all-glass 12 μm ultra-thin and flexible micro-fluidic chip fabricated by femtosecond laser processing, *Labo. Chip*, **16**, (2016) 2427-2433.
- 2) Y. Yalikul, N. Tanaka, Y. Hosokawa, T. Iino, Y. Tanaka: Ultrathin glass filter fabricated by femtosecond laser processing for high-throughput microparticle filtering, *Appl. Phys. Express*, **9**, (2016), 066702.
- 3) Y. Yalikul, N. Tanaka, Y. Hosokawa, T. Iino, Y. Tanaka: Embryonic body culturing in an all-glass microfluidic device with laser-processed 4 μm thick ultra-thin glass sheet filter, *Biomed. Microdevices*, **19**, (2017), 85.
- 4) N. Ota, Y. Yalikul, T. Suzuki, S. W. Lee, Y. Hosokawa, K. Goda, Y. Tanaka: Enhancement in acoustic focusing of micro and nanoparticles by thinning a microfluidic device, *Royal Soc. Open Sci.*, **6**, (2019), 181776.
- 5) K. Okano, A. Matsui, Y. Maezawa, P-Y. Hee, M. Matsubara, H. Yamamoto, Y. Hosokawa, H. Tsubokawa, Y-K. Li, F-J. Kao, H. Masuhara: In situ laser micropatterning of proteins for dynamically arranging living cells, *Labo. Chip*, **13**, (2013), 4078-4086.
- 6) H. R. Hulet, W. A. Bonner, R. G. Sweet, and L. A. Herzenberg: Development and Application of a Rapid Cell Sorter, *Clinical Chemistry*, **19**, (1973), 813-816.
- 7) S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, A. Radbruch: High Gradient Magnetic Cell Separation With MACS, *Cytometry*, **11**, (1990), 231-238,
- 8) T. M. Said, A. Agarwal, S. Grunewald, M. Rasch, H.-J. Glander, U. Paasch: Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation, *RBMO*, **13**, (2016), 336-339.
- 9) Y. Shen, Y. Yalikul, Y. Tanaka: Recent advances in microfluidic cell sorting systems, *Sens. Actuators B Chem*, **282**, (2019), 268-281,
- 10) N. Nitta, T. Sugimura, A. Isozaki, H. Mikami, K. Hiraki, S. Sakuma, T. Iino, F. Arai, T. Endo, Y. Fujiwaki, H. Fukuzawa, M. Hase, T. Hayakawa, K. Hiramatsu, Y. Hoshino, M. Inaba, T. Ito, H. Karakawa, Y. Kasai, K. Koizumi, S.W. Lee, C. Lei, M. Li, T. Maeno, S. Matsusaka, D. Murakami, A. Nakagawa, Y. Oguchi, M. Oikawa, T. Ota, K. Shiba, H. Shintaku, Y. Shirasaki, K. Suga, Y. Suzuki, N. Suzuki, Y. Tanaka, H. Tezuka, C. Toyokawa, Y. Yalikul, M. Yamada, M. Yamagishi, T. Yamano, A. Yasumoto, Y. Yatomi, M. Yazawa, D. Di Carlo, Y. Hosokawa, S. Uemura, Yasuyuki Ozeki, K. Goda, et al.: Intelligent Image-Activated Cell Sorting, *Cell*, **175**, (2018), 266-276.
- 11) T. Iino, K. Okano, S. W. Lee, T. Yamakawa, H. Hagihara, H-Z. Yi, T. Maeno, Y. Kasai, S. Sakuma, T. Hayakawa, F. Arai, Y. Ozeki, K. Goda, Y. Hosokawa: High-speed microparticle isolation unlimited by Poisson, *Labo. Chip* (2019) will be accepted.
- 12) Z-Y. Hong, K. Okano, D. Di Carlo, Y. Tanaka, Y. Yalikul, Y. Hosokawa: High-speed micro-particle manipulation in a microfluidic chip by directional femtosecond laser impulse, *Sens. Actuators* (2019) will be accepted.