

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 :インテリジェント・バイオマイクロラボラトリ

### 2. 研究者氏名 新井史人

### 3. 研究の狙い :

これまで知られている微生物の種はほんの一握りで、実在しているものはその数十倍あるいはそれ以上存在すると言われている。微生物は21世紀の有用生物資源として有望視されているが、一菌体の取り出しは極めて困難で、培養条件及び培養方法もよく分かっていない。従来の微生物研究では細胞集団の特性を大まかに捉えてその集団の特性を評価するのが主流である。しかし、個々の細胞に着目してみると、局所的には異なる環境におかれ、細胞の状態も均質ではない。細胞の特性を調査するためには個々の細胞に着目して実験を進めるための自由な空間構築が必要となる。そこで、これを実現するためのアプローチとして、オンチップで細胞集団から狙った細胞を分離し、選ばれた細胞の組み合わせや培養条件、反応条件を自由に設定し、オンチップでその場観察可能なシステム技術を開発することにした。オンチップ細胞分析、評価により、これまで未知であった細胞の特性(例えば、細胞の個体差、遺伝子の発現の様子、遺伝の仕組み、複合微生物系の仕組み、好培養条件の探索など)を解明することができると考えた。

以上により、本研究では、人間と機械が相互作用することが可能なマイクロな人工空間において、1細胞レベルでの各種相互作用を自由自在に行うことが可能なインテリジェント・バイオマイクロラボラトリを実現することを目的とした。マイクロ領域で自由かつ効率的にバイオ実験を進めるための知的空間を構築するための基盤技術として、主に微生物を対象として、マイクロチップ内にある複数サンプルの蛍光観察に基づく目標サンプルの分離及び、分離されたサンプルのオンチップ培養とその場反応評価を行うための基盤技術にフォーカスを当てた。

蛍光観察に基づく目標サンプルの分離では、選別・分離をオンチップで高速かつ高純度で行うことが課題であった。これには光ピンセットによって操作されたマイクロツールによる分離手法と、温度変化によるゾルゲル相転移を利用した分離手法を提案した。分離された微生物のオンチップ培養とその場反応評価では、オンチップで培養環境を自由に設定し、その場観察が可能な新しい培養方法を提案した。また、光硬化性樹脂プレポリマーによる安定した固定方法や環境制御方法を提案した。

### 4. 研究結果 :

マイクロ領域で自由かつ効率的に単一細胞ベースのバイオ実験を進めるための知的空間を構築した。応用分野として新規微生物や、有用微生物の有効利用を目的として、特定の微生物の分離と並列培養をオンチップで行うデスクトップ型バイオマイクロラボを構築した。このための基盤技術として、(1)蛍光観察に基づく計測と目標対象物の分離及び、(2)分離された微生物のオンチップ培養と観察評価を行うための基盤技術を構築した。

#### (1) 蛍光観察に基づく計測と目標対象物の分離

これまで、対象物を空間的に広げた中から選択して分離する手法として(1-1)マイクロツールの間接操作による分離手法と、(1-2)熱ゲル化反応を利用した分離手法を提案して実験的に有

効性を確認した。また、(1-3)マイクロピペットによる接触式の分離手法に熱ゲル化反応を利用し、新たに考案した接触センサを利用した。本研究で対象とした手法は対象物を空間的に広げることの特徴としており、サンプル同士の同時比較が可能で、対象の位置情報が保存されるところに大きな利点がある。

#### (1-1) マイクロツールの間接操作による細胞分離手法

光ピンセットによる微生物の操作において、直接レーザー照射によるダメージが懸念されていた。そこで本研究では、これを低減するためにレーザー操作されたマイクロツールによる細胞の間接操作を目的として、マイクロツールの局所配列、局所投入に成功した。マイクロツールとしてはポリスチレンビーズや光硬化性樹脂の液滴を利用した。ポリスチレンビーズを用いた場合では、自己組織化による配列にも成功した。更に、マイクロツールがあらかじめ決められた軌道を通るようにレーザーの焦点をガルバノミラーで高速に走査することで、複数のマイクロツールを独立に軌道制御する方法(同期型レーザーマニピュレーション)を提案した。この手法における安定な軌道制御のための理論解析と実験による検討を行い、ハンドリングの基盤技術を整えた。

1 本のレーザーを高速にスキャンすることによって、複数のマイクロツールを独自の軌道に沿って制御することが可能となり、これらのマイクロツールによって細胞を押しつけて搬送することが可能となった。また、表面をアミノ基や水酸基で化学修飾した付着性ビーズを用いて、その表面に細胞を付着させて搬送することも可能となった。更に、付着性ビーズ同士を付着させて複数のビーズを組み立て、1本のレーザーの光トラップ点を適切に選定して姿勢を制御し、搬送することも可能となった。付着させて牽引する手法は、安定性、スピードの面から優れている。

#### (1-2) 熱ゲル化反応を利用した細胞分離手法

温度変化により粘性が変わる熱ゲルを利用したまったく新しい分離技術を確認した。熱ゲルには生体への安全性を考慮に入れてメチルセルロースとポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を用いて、ゲルによる対象物の固定化技術を確認した。

ゲル化手法に関しては透明マイクロ電極の加熱による方法と、レーザーをフォーカスして透明マイクロ電極を加熱することで、局所的にターゲットだけをゲルで固定する技術を開発した。また、ゾルゲル相転移のヒステリシス特性を活用して、複数のターゲットを連続的にゲルに固定する技術を開発し、実験的に有効性を示した。

#### (1-3) 接触センサによる細胞分離手法

微生物の採取は顕微鏡下で、マイクロピペットによる接触式操作によって行われることがあるが、光軸方向の距離感をつかむことが難しいため、採取には長い時間と高度な技術が必要とされる。そこで、より早く、確実かつ安全に微生物を採取するために、マイクロピペット先端に取り付ける接触センサを考えた。チタン製の円筒管の表面に水熱合成法によってPZT薄膜を成膜し、駆動用電極と計測用電極をパターンニングした。駆動用電極によって共振させ、ピペット先端が接触したときのインピーダンス変化を計測用電極の出力変化として読む。センサの固定法を改良したことで、操作性を改善した。また、振動解析によって検出感度が向上するように電極配置を最適化した。検出可能な接触力は1 mN以下、感度30 V/Nを達成した。更に、熱ゲル化による目標物の固定と開放を利用して目標物を孤立化し、本接触センサを併用することで作業性が大幅に改善された。

#### (2) 分離された微生物のオンチップ培養と観察評価

微生物の固定方法や環境制御方法を提案し、これに基づき(2-1)微生物を並列に培養できるマイクロチップを設計・製作した。また、蛍光像に基づきサンプルからターゲットを選択して分離し、(2-2)培養室での培養状況をモニタリングするシステムを構築した。

#### (2-1)マイクロチップの設計・製作

マイクロチップはPDMS (Poly DiMethyl Siloxane)を用いて製作した。また、熱ゲル化反応によって捕捉するために、ガラス基板上にITO 薄膜 (Indium Tin Oxide)による透明電極を用いた。このため、微生物を倒立型光学顕微鏡で観察しながら分離、培養、反応実験が可能となった。蛍光試薬を流すことで、蛍光観察をその場で行うことができる。固定、観察実験はイースト菌や走行性を有する大腸菌やピブリオ菌で行い、有効性を確認した。

#### (2-2)培養状況のモニタリング

単一細胞の特性を調査するためには、細胞1つを顕微観察領域に固定した状態で試薬を投入し反応をモニタリングする必要がある。そこで任意の細胞を光硬化性樹脂プレポリマーで固定し、単一細胞の増殖課程を観察することに成功した。熱ゲルに比べ、光硬化性樹脂による固定力は強く、イースト菌を固定した後、溶液をポンプで循環させたが466 mm/sの流速で流しても固定した菌は外れなかった。また、光硬化性樹脂プレポリマーを局所的に硬化させ、マイクロ流路の中にマイクロ構造物を製作して、局所的によどみ点を形成することができた。これによって、安定した連続培養観察がオンチップで可能となった。

本研究では、一細胞レベルで人間とマイクロシステムとの相互作用を実現する環境を構築できた。オンチップ細胞分析、評価により、これまで未知であった細胞の特性(例えば、細胞の個体差、遺伝子の発現の様子、遺伝の仕組み、複合微生物系の仕組み、好培養条件の探索など)を解明することが期待できる。

### 5.自己評価:

これまでマイクロ空間では対象物の観察はできても、人間が自由自在に直接手出しできない閉ざされた空間であった。本研究では、大量の微生物の中から、任意に選択したものだけを選別して高速に取り出し、各種培養条件を与えて難培養性微生物に適した培養条件を、人間との相互作用により探し出すことが可能なインテリジェントバイオマイクロラボラトリを世界で初めて構築した。

この研究のきっかけは、本研究をスタートする前に3年間行った地域コンソーシアム(NEDO)であった。プロジェクトリーダーをつとめ、狙った微生物を高速、高精度に分離するための基盤技術は整っていた。しかし、微生物を蛍光観察し、分離する技術や、チップ内で培養する技術に関しては未開拓であったため、単なる従来技術の延長研究ではなく、新たな課題を解決する必要があった。本研究で着眼した斬新な課題は以下の3点に集約できる。

#### (1)細胞の選別・分離・固定・培養・反応・観察を一箇所ですべて実施することに着眼したこと。

これまでの研究は細胞を分離した後に長距離搬送して反応を観察するものである。しかし、分離した対象を長距離搬送すると、対象を見失ったり、外乱によって失う可能性が極めて高い。本研究がユニークなのは、選別した場所でその後の全ての工程(分離・固定・培養・反応・観察)を実施できる点にある。これを実現することは、これまでの技術では不可能であった。本研究では熱ゲルを用いて温度制御(加熱と自然冷却)によって簡便に行うことに成功した。この手法は特許出願した。

(2)細胞の固定技術に着眼したこと.

チップ内の実験では、環境条件を安定に制御することが極めて重要となる。ちょっとした外乱(例えば気泡の混入)でも観察対象を見失うことになる。そこで、本研究では対象物の固定方法に着眼し、新たに光硬化性樹脂を用いる方法を提案した。これによって、細胞をしっかりと固定し、連続培養しながら長時間にわたって安定してその場観察することが可能となった。この手法は特許出願した。

(3)細胞の操作と固定をレーザーによって非接触方式で一貫し、システム化したこと.

微生物はサイズが小さいので、外乱の影響を受けやすいため、非接触方式で一貫したシステムを構築することが賢明である。本研究では蛍光観察の機能を実現しつつ、光ピンセット(波長1,064nm)による操作や光硬化(波長325nm)による造形を同一システムで行う必要があるため、光学系の設計を工夫した。また、細胞の個別操作を実現するために、1本のレーザーを高速にスキャンングすることで、複数の対象を同期させながら軌道制御することにも成功した。光ピンセットに軌道制御や協調制御の考えを導入したのは世界初である。

以上のように、細胞の選別・分離・固定・培養・反応・観察をオンチップで行うことにいち早く着眼したことにより、世界にさきがけて本質的な課題を明確化でき、それに対する対策を世界で初めて考案し、有効性を実証できた。

現状では難培養性微生物の培養条件を探し出すことは人手と時間がかかる。そこで、利用する人間の経験や蓄積された知識データを利用し、人間とシステムとの情報交換を通じて、適切な培養条件を自動的に導きだすことが可能な賢い自律型ラボラトリへと拡張する必要がある。この課題に関して本研究の中で取り組むことは可能であった。しかし、ここ数年でチップ内の細胞反応解析の研究が国内外で急激に活発化してきたため、知能化のテーマは後回しにしてより本質的なテーマ(上記の特に(1)、(2))に時間を費やした。結果的には基盤技術に関して世界をリードする成果を上げることができたため、この判断は今でも間違っていないと考えている。マイクロ空間との相互作用の基礎が確立できたので、今後は自立機能を向上することによって、人間がマイクロ領域で自由かつ効率的に実験を進めるためのマイクロ版“知的空間”を進化させていくべきであると考えている。

## 6.研究総括の見解:

本研究により、マイクロツールの間接操作による細胞分離手法、熱ゲル化反応を利用した細胞分離手法、接触センサによる細胞分離手法の開発、および分離された微生物のオンチップ培養と観察評価方法を確立した。これらの手法は外国特許出願した。これにより大量の微生物の中から、任意に選択したものだけを選別して高速に取り出し、各種培養条件を与えて難培養性微生物に適した培養条件を、人間との相互作用により探し出すことが可能なインテリジェントバイオマイクロラボラトリを世界で初めて構築したことは、大きな成果であり、高く評価できる。将来、オンチップ細胞分析、評価により、これまで未知であった細胞の特性(例えば、細胞の個体差、遺伝子の発現の様子、遺伝の仕組み、複合微生物系の仕組み、好培養条件の探索など)を解明することが期待できる。

## 7.主な論文等:

発表論文

1. Fumihito Arai, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Koji Horio, and Kouichi Itoigawa, Separation of Target Microbe by Laser Manipulation and Flow Control, *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol.14, No.2, 2002, pp.133-139
2. Fumihito Arai, Hisataka Maruyama, Toshihiro Sakami, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Pinpoint Injection of Microtools for Minimally Invasive Micromanipulation of Microbe by Laser Trap, *IEEE/ASME Trans. on Mechatronics*, Vol. 8, No. 1, pp.3-9, 2003
3. Fumihito Arai, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, and Tohoru Katsuragi, Isolation and extraction of target microbes using thermal sol-gel transformation, *Analyst*, 2003, 128, 547 - 551
4. Fumihito Arai, Toshihiro Sakami, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Microchip Design and Experiment for Separation of Microbe from Continuous Sample Liquid Flow Using Optical Tweezers, *JSME International Journal*, (Accepted)
5. Fumihito Arai, Kouhei Motoo, Paul G.R. Kwon, Toshio Fukuda, Akihiko Ichikawa, and Tohoru Katsuragi, Cylindrical Micro Touch Sensor with Piezoelectric Thin Film for Microbial Separation, *Robotica*, (Accepted)
6. Fumihito Arai, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, and Tohoru Katsuragi, Separation of Single Microorganisms in Thermosensitive Hydrogel on a Chip, and Monitoring In Situ of Continuous Culture or Cell Reaction, *Electrophoresis*, (Submitted)

#### 主な国際会議発表論文

1. Fumihito Arai, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Koji Horio, and Kouichi Itoigawa, Flow Pattern Control by Flow Balancing in Microchannel for High Speed & High Purity Separation of Microbe in Microchip, *Fifth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems,  $\mu$  TAS2001*, 2001
2. Fumihito Arai, Hisataka Maruyama, Toshihiro Sakami, Akihiko Ichikawa, Naoto Kouketsu, Lixin Dong, Toshio Fukuda, Pinpoint Injection of Micro Tools Using Dielectrophoresis and Hydrophobic Surface for Minimally Invasive Separation of Microbe, *The 15th IEEE Robotics and Automation Society Conference on Micro Electro Mechanical Systems, MEMS2002*, pp.48-51, 2001
3. Fumihito Arai, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Toru Katsuragi, Fixation and Isolation of Microorganisms by Local Viscosity Control of Methyl Cellulose Solution, *The Sixth International Symposium on Micro Total Analysis System,  $\mu$  TAS2002*, pp.928-930, 2002
4. Fumihito Arai, Hisataka Maruyama, Akihiko Ichikawa, Toshihiro Sakami and Toshio Fukuda, Pinpoint Injection and Dielectrophoretic Floating of Autonomously Aligned Microtools, *The Sixth International Symposium on Micro Total Analysis System,  $\mu$  TAS2002*, pp. 548-550, 2002
5. Fumihito Arai, Akihiko Ichikawa, Hisataka Maruyama, Toshihiro Sakami, Toshio Fukuda, High Throughput Separation of Microorganisms by Pinpoint Gelation Controlled by Local Heating for Parallel Incubation on a Chip, *The 16th IEEE Robotics and Automation Society Conference on Micro Electro Mechanical Systems, MEMS2003*, pp.219-222, 2003
6. Fumihito Arai, Toshihiro Sakami, Toshio Fukuda, Synchronized Laser Micromanipulation by

High-Speed Laser Scanning - Dancing Yeasts - , The 2003 IEEE International Conference on Robotics and Automation, ICRA2003, Video Proceedings, September 14-18, 2003 in Taipei, Taiwan

7. Fumihito Arai, Hisataka Maruyama, Toshio Fukuda, Toru Katsuragi, Fixation of Microorganisms for Investigation of Their Properties on a Chip, The 7th International Conference on Miniaturized Chemical and BioChemical Analysis Systems,  $\mu$  TAS2003, October 5-9, pp.21-24, 2003, Squaw Valley, California USA
8. Fumihito Arai, Akihiko Ichikawa, Toshio Fukuda, Toru Katsuragi, Continuous Culture and Monitoring of Selected and Isolated Microorganisms on a Chip by Thermal Gelation, The 7th International Conference on Miniaturized Chemical and BioChemical Analysis Systems,  $\mu$  TAS2003, October 5-9, pp.757-760, 2003, Squaw Valley, California USA
9. Fumihito Arai, Toshihiro Sakami, Keiichi Yoshikawa, Hisataka Maruyama, Toshio Fukuda, Synchronized Laser Micromanipulation of Microtools for Assembly of Microbeads and Indirect Manipulation of Microbe, 2003 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, IROS2003, October 27-31, pp.2121-2126, 2003 in Las Vegas, USA

#### 総説 解説

1. 新井史人 , ナノ・マイクロマニピュレーションの現状と課題 , システム制御情報学会誌 , Vol.46 , No.5(2002-5) , pp.244-251 (解説)
2. 新井史人 , マイクロ・ナノマニピュレーション技術の将来展望 , 精密工学会誌 , Vol.68 , No.11 , 2002 , pp.1389-1392 (展望)
3. 新井史人 , バイオマイクロシステムにおける静電気による微小物体操作 , 静電気学会誌 , 26 巻 , 6号 , pp.250-251 , 2002 (特集解説)

#### 特許出願

1. 新井史人 , 市川明彦 , 福田敏男 , 桂樹徹 , 微小物体の回収方法及び装置 , 特願 2002-131656 , 平成 14 年 5 月 7 日
2. 国際出願番号 : PCT/JP03/00231 , 国際出願日 , 平成 15 年 1 月 3 日
3. 新井史人 , 丸山央峰 , 福田敏男 , 桂樹徹 , 微小物体の固定 , 反応 , 観察方法 , 特願 2003-326655 , 平成 15 年 9 月 18 日

#### 主な招待講演

1. Manipulation Technologies of Micro-objects for BioMEMS, BioMEMS2002, April 26, 2002
2. 「マイクロメカトロニクス技術の現状と今後期待される技術」, 広域研究会 D , 中部科学技術センター , 平成 14 年 12 月 11 日
3. Mechatronics in Bio/Nano World, Research Group on Interaction and Intelligence, Invited lectures, KAIST, 2002.12.2 & 2002.12.3
4. 「マイクロロボットとバイオテクノロジー」, 産学連携技術開発研究会 , TAMA-TLO , 平成 15 年 2 月 19 日
5. 「微小物体のマニピュレーション技術とバイオ応用」, 大阪工業大学 , バイオベンチャーフォー

- ラム ,平成 15 年 3 月 14 日
6. 「マイクロマシン技術とナノテクノロジーが拓く次世代微細作業システム」, 鶴岡高専見学会 , 基調講演 ,平成 15 年 3 月 19 日
  7. 「MEMS技術を応用した細胞ハンドリング」, 未踏・ナノデバイステクノロジー第 151 委員会 , ナノ・バイオフィュージョン分科会 ,日本学術会議 ,平成 15 年 7 月 14 日
  8. 「オンチップ細胞分離・単一細胞反応解析技術」, バイオツール (医療・分析機器等) シーズ発表会 ,東海バイオフィクトリー研究会 & SMS研究会合同シーズ発表会 ,平成 15 年 10 月 2 日
  9. Micro and Nano Robotics for Biotechnology, 2003 International Conference on Control, Automation, and Systems, ICCAS 2003, Gyeongju, Korea, Invited Talk, Oct. 24, 2003
  10. Non-contact Manipulation of Biological Cells (Indirect Laser Micromanipulation by Laser Trapped Microtools), 2003 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, Workshop (Microrobotics for Biomanipulation), Oct. 27, 2003
  11. Manipulation Technologies of Micro-object for BioMEMS (Isolation, fixation and extraction of target microbes using thermal sol-gel transformation), 2003 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, Workshop (Sensing and Manipulation of Micro and Nano Entities: Science, Engineering, and Applications), Oct. 31, 2003
  12. 「超微小物体のハンドリング技術」, 日本機械学会東海支部 ,第 22 回イブニングセミナー ,平成 15 年 11 月 14 日
  13. Micro/Nano Robotics in Biotechnology, 20th 横浜市大国際学術研究フォーラム ,平成 16 年 1 月 26 日