

## 把持機構を有する磁気駆動オンチップロボットによる卵細胞の除核

○正 市川 明彦 (名大) 学 佐久間 臣耶 (名大)  
 玉腰 貴浩 (名大) 学 杉田 真邦 (名大)  
 正 新井 史人 (名大) 赤木 悟史 (畜草研)

### Enucleation of Oocyte by On-chip robot driven by magnet with gripping mechanism

Akihiko ICHIKAWA, Nagoya University, a.ichikawa@mech.nagoya-u.ac.jp  
 Shinya SAKUMA, Nagoya University  
 Takahiro TAMAKOSHI, Nagoya University  
 Masakuni SUGITA, Nagoya University  
 Fumihito ARAI, Nagoya University  
 Satoshi AKAGI, NARO Institute of Livestock and Grassland Science

We developed a highly-functional untethered on-chip robot for cell handling and micro-knife made by Si to cut zona pellucida of oocyte. The on-chip robot has a gripping mechanism which can grasp a cell or micro-object with sufficient power. The position and handling force of the robot are controlled independently by the magnetic force. The permanent magnets and electrical magnet are assembled together, and they are put under the microfluidic chip. The micro-knife had made by grayscale lithography technique. We demonstrated a cutting of zona pellucida and pushing out a part of cytoplasm of bovine oocyte.

**Key Words:** Micro-Robot, Manipulation, Microfluidics, Enucleation, MEMS

#### 1. 緒言

近年、バイオ研究分野、特にクローニング等の細胞操作が必要な分野において、細胞単体を顕微鏡観察下にて高精度でハンドリングを行う技術が求められている。オンチップマイクロロボットは、手動操作に比べ、高精度な繰り返し操作を実現している[1]-[3]。マイクロロボットの駆動力として、磁力による操作は強い力で非接触操作が可能であり、また、低コストでシステム作成が可能である。それ故、磁気により駆動するマイクロロボットの研究が盛んに行われている[4-11]。

従来、我々は磁気により駆動する Magnetically-driven Micro-Tool(MMT)による細胞ローディング、ソーティング、そしてバルブやドロプレット発生をマイクロ流体チップ中で実現する研究を行ってきた[12-14]。これら操作はマイクロ流体チップ外部からの磁場制御によって行われていたが、磁場の on-off を行うのみであった。このような磁場の制御を精密に行うためにヘルムホルツコイルにより、高精度にマイクロロボットの3次元位置制御を行う研究が進められている[15]が、電磁石による磁場では十分な操作力を発生させることは難しく、例えば直径100ミクロンのウシ卵子の操作は困難である。そこで、我々は、永久磁石の強い磁場に着目し、永久磁石をステージ操作によって駆動させることで、電磁石での操作に比べ10倍の力で MMT を駆動させることに成功した[16]。現在では最小移動精度 1.1  $\mu\text{m}$ 、応答速度 0.02 sec の制御を実現している[17][18]。

この MMT を2本協調作業させること、細胞のハンドリング、回転、位置決め操作が可能である。しかしながら、2本の MMT が必要となるため、より複雑な操作、例えば、透明帯付きの卵子を固定し除核するような操作は困難である。そのため、細胞を単一の MMT にて固定する技術が求められている。これに対し、細胞を吸引して固定するための吸引機構付きマイクロロボットについて研究を行った[19-21]。この吸引機構付きマイクロロボットは、厚膜レジストにより中空構造を持つよう作成され、その構造体に高分子で作成した薄膜を貼り付け、さらに永久磁石を薄膜に取り付け、その磁石をツールの下部

から電磁石により操作することで、吸引を吐出の機能を MMT に組み入れることを実現した。これにより、ウシ卵子を1本の MMT にて操作することを実現した。

しかしながら、この機構は卵子のようなある程度柔軟な細胞に対して操作を行うことは可能であるが、例えば硬い細胞や柔らかすぎる細胞を操作した場合、細胞が固定されない、あるいは細胞を吸引しきってしまう問題が生じた。

本研究では、これら問題を解決するために、把持機構を有する非接触磁気駆動オンチップロボットを提案する。このロボットは、先端で細胞を挟み込むため、硬い細胞であっても細胞の操作が可能である。また、細胞が柔軟である場合も、保持力を制御することで操作が可能になる。ロボットの下部に設置した電磁石により磁力を制御することで、ロボット中央部の永久磁石を操作し、先端部の開閉が可能となる。このロボットを用いて、クローニングのための除核作業を行う。

また、このロボットを用いて除核を行うために、先端が鋭利でかつマイクロ流体チップに設置可能なマイクロナイフを提案する。従来、卵子の穿孔にはガラス管を熱により伸長したガラスニードルを用いている。しかしながら、ニードルにより透明帯を切開するには、卵子の透明帯にニードルを穿孔した後に、ニードルの側面を何かに当て透明帯を切開する必要がある、操作が煩雑となる。先鋭なマイクロナイフを用いることで、透明帯への穿孔から切開までを卵子を固定したままで行うことが可能である。

本稿では、把持機構を有するロボットの特性評価、およびマイクロナイフの設計、作製方法、および、両者を用いた卵子の切開操作について報告する。

#### 2. 卵子除核作業

オンチップロボットとマイクロナイフを用いた除核の概要を Fig.1 に示す。図は、マイクロ流体チップ内部のものである。オンチップロボットは、梁構造の中心に永久磁石を横置きに設置しており、ロボット下部の電磁石から発せられる磁場により、この永久磁石がスライドすることで先端部分のグリッ

ピングが可能となる。また、ロボットに取り付けた4個の磁石が、ロボット下部の4個の磁石に吸引されて動くことで、平面を2自由度で駆動することが可能である。マイクロナイフは流体チップの底面に固定されている。

卵子は透明帯付きのウシ卵子を用いる。ウシ卵子の直径は約  $150\ \mu\text{m}$  で、透明帯の厚みは約  $20\ \mu\text{m}$  である。ウシ卵子の除核を行う際には、極体が発生している卵子を用いる必要がある。この極体に核が隣接している。そこで、除核のためには、透明帯の切除後に、極体および周辺の細胞質を透明帯外に押し出す必要がある。これにより、除核が実現する。Fig.2にこの工程をオンチップロボット及びマイクロナイフで実現するプロセスを示す。オンチップロボットにより卵子を把持し、その後マイクロナイフ先端に近づけ透明帯を切除する。従来の除核の手法は、ガラスニードルとガラスピペットを用いており、透明帯にガラスニードルを穿刺した後に、ガラスピペットの壁面にニードルを押し付けることで透明帯を切除する。その後、切除面が顕微鏡で観察できるよう卵子を回転し、極体と周辺細胞質が切除面から押し出されるよう調整する。本手法は、細胞を切除した後に、卵子を把持したまま卵子に力を加えて細胞質を押し出すことにより、卵子を再度回転する必要がなく、従来手法に比べ工程が短縮されている。

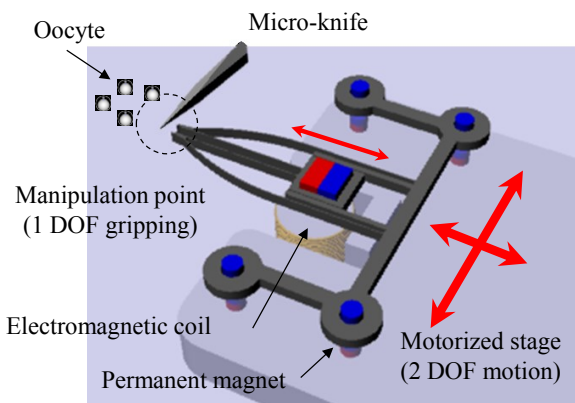


Fig.1 Concept of the enucleation by using on-chip robot and micro-knife.

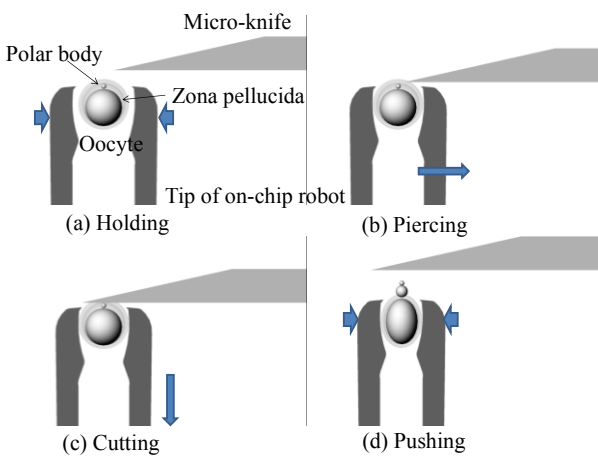


Fig.2 Enucleation process by using on-chip robot and micro-knife. This method reduces the process of the enucleation.

### 3. オンチップロボット及びマイクロナイフ作製

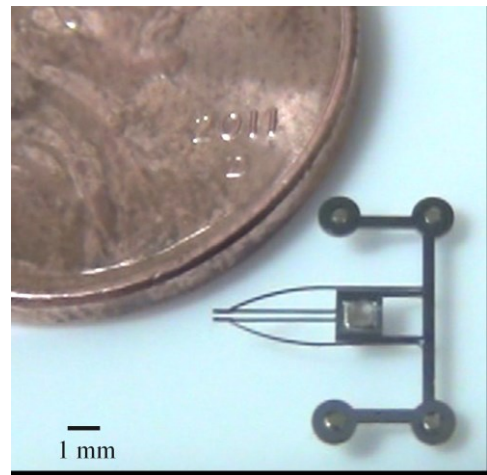
#### 3.1 オンチップロボット製作

オンチップロボットの素材としてシリコンを用いる。オンチップロボットは、マイクロ流体チップ内部で駆動することができるように薄型に作製する必要がある。また、駆動機構をミクロンオーダーの精度で加工する必要がある。また、細胞を操作するため、細胞への害が無いように生体適合性材料を用いる。以上の理由から、素材としてシリコンを用いる。シリコンをMEMSプロセスにより加工することで、大面積の高精度加工が可能である。

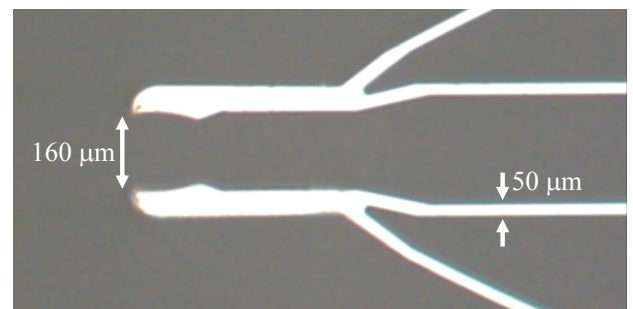
ツール作製方法を Fig.3 に、作製したツールを Fig.4 に示す。シリコンヘレジスト OFPR-800(200cp, 東京応化工業)を塗布し、露光することで、マイクロハンドのパターンをレジストでシリコン上部に作製する。次に、Deep Reactive-Ion Etching(D-RIE)によりウェハをパターン通りに掘削する。ツールを洗浄し、最後に作製したツールにネオジウム磁石を取り



Fig.3 Fabrication process of on-chip robot.



(a) On-chip robot which was assembled neodymium magnets.



(b) Microscopic image of tip of the on-chip robot.

Fig.4 Over view and microscopic image of fabricated on-chip robot.

付ける。ウェハは厚み 200  $\mu\text{m}$  の物を使用しているため、マイクロハンドの厚みも 200  $\mu\text{m}$  となる。これは、マイクロ流体チップ内部での作業は十分に可能な薄さである。駆動機構の梁の幅は 50  $\mu\text{m}$  である。使用した永久磁石は、オンチップロボット中心のものは 1.0 mm  $\times$  1.0 mm  $\times$  1.0 mm のネオジウム磁石を、駆動用には  $\phi$  0.5 mm  $\times$  0.5 mm の円柱ネオジウム磁石を用いた。オンチップロボットの位置決め精度は、底面のガラス面の状態によるが、最小で約 5  $\mu\text{m}$ 、最大で約 20  $\mu\text{m}$  であった。また、把持機構部分の精度は約 3  $\mu\text{m}$  である。対象を把持と同時にオンチップロボットそのものを駆動させることで、対象を把持したまま操作が可能となる。把持機構の先端形状については、実験的に形状を定め、透明帯付き卵子の大きさが約 150  $\mu\text{m}$  であるため、間隙を 160  $\mu\text{m}$  にし、また、透明帯切断時に卵子が把持機構から抜けられないよう先端部分に突起を作成した。

### 3.2 マイクロナイフ製作

クローニングのための卵子切開において、細胞質の膜を破損しないことが重要となる。マイクロナイフは、透明帯のみを切開し、細胞質部分へ傷を付けないよう透明帯を切開する。Fig.4 に示すように、卵子の透明帯と細胞質に隙間がある部分をマイクロナイフに近づけ、卵子を把持して動かし、透明帯のみを切断する。この手法を用いるにあたって、マイクロナイフの設計では、卵子のパラメータを考慮してマイクロナイフの設計値を決定した。マイクロナイフに必要な刃のストローク  $L$  と先端の角度  $\theta$  の関係は式(1)で表され、 $\delta$  は式(2)で定義する。

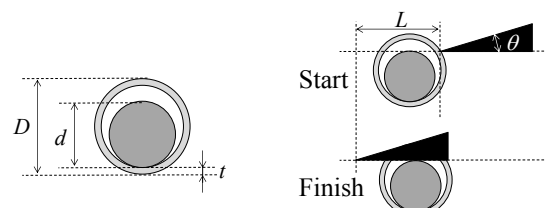
$$L = \begin{cases} \frac{D}{2\theta} + \frac{\delta}{2\cos\theta} - \frac{\delta}{2\sin\theta\cos\theta} + \frac{\sqrt{D^2 - \delta^2}}{2} & (L \leq \sqrt{D^2 - \delta^2}) \\ \frac{\sqrt{D^2 - \delta^2}}{2} & (L > \sqrt{D^2 - \delta^2}) \end{cases} \quad (1)$$

$$\delta = 2d + 2t - D \quad (2)$$

Fig.5 に(1)式をグラフ化したものを示す。卵子の各パラメータは、卵子を画像により計測し、卵子の直径は  $D=150 \mu\text{m}$ 、透明帯の厚さは  $t=20 \mu\text{m}$  とした。ストローク  $L$  は短いほどよいが、 $\theta$  が大きいほどナイフの切れ味が悪くなる。そこで、Fig.5 より、細胞質が小さいものの場合を考慮し、先端の角度  $\theta=10 \text{ deg}$ 、ストローク  $L=550 \mu\text{m}$  とした。

マイクロナイフを作製する手法には、大量生産性があり、任意の形状を作製できるという理由でグレースケールリソグラフィを用いる。作製にあたり、まずグレースケールリソグラフィのキャリブレーションを行った。その結果、OFPR-800 を 7000 rpm, 30 sec でスピコートし、90°C で 30 min プリベークする、という膜厚条件で、露光装置  $\mu$ -PG 101 (UV\_N, Heidelberg Co., LTD) の出力が 2 mW, デューティ比 70 %, h 線フィルター OFF という露光条件で、現像時間は 2 min が適当であるという条件を出した。その条件を利用し、レジストを露光、現像した Si 基板を、DRIE 加工で 100  $\mu\text{m}$  程度削った結果を Fig.6 に示す。ここでグレイ度は光量を割り振ったものであり、まったく露光されない部分がグレイ度 0 で、最も露光が強い部分がグレイ度 255 である。Fig.6 から、DRIE による Si とレジストの選択比が 120:1 程度であることが確認できる。これによって、グレイ度が 0 から 40 の部分のレジストはエッチング後も残っており、Si が削られないので、グレイ

度 40 前後から 75 を用いて、厚さ 200  $\mu\text{m}$  の Si 基板を両側から 100  $\mu\text{m}$  の DRIE 加工を行うことでニードル部分にテーパをつけて削り、作製した。作製したマイクロナイフの SEM 画像を Fig.7 に示す。



(a) Parameters of oocyte (b) Parameters of zona pellucida cutting

Fig.4 Parameters for design of the micro-knife.  $D$  is diameter of the zona pellucida,  $d$  is diameter of cytoplasm, and  $t$  is thickness of the zona pellucida. We measured bovine oocytes, and  $D$  is about 150  $\mu\text{m}$ ,  $d$  is from 80  $\mu\text{m}$  to 110  $\mu\text{m}$ , and  $t$  is 20  $\mu\text{m}$ .

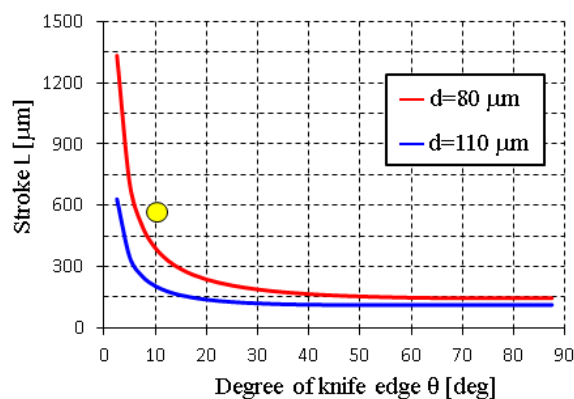


Fig.5 Relationship between degree of knife edge and stroke. From this graph, we decided  $\theta$  is 10 deg.

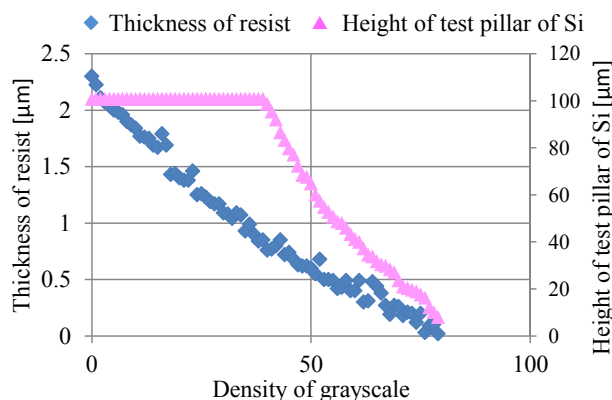


Fig.6 Gray-scale calibration data.

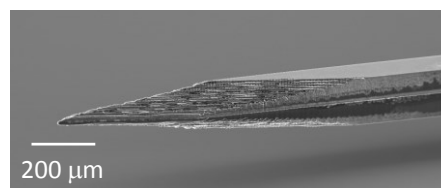


Fig.7 SEM image of fabricated micro-knife.

#### 4. ウシ卵子の透明帯切開実験

作製したオンチップロボット並びにマイクロナイフを用いて、ウシ卵子の透明帯切除と細胞質の押し出し実験を行った。実験結果を Fig. 8 に示す。ウシ卵子は、ウシ卵巣から取得して48時間培養した。その後、卵丘細胞を除去した。培地にはウシ血清入り培地 (FBS, Sigma-aldrich CO., LTD) を用いた。

ウシ卵子を投入し、オンチップロボットにより把持する。(Fig. 8 (a))ウシ卵子を把持し、透明帯と細胞質間に隙間がある部分にマイクロナイフ先端を穿刺する。(Fig. 8 (b))さらにオンチップロボットをマイクロナイフ方向に移動し、透明帯を切開する。(Fig. 8 (c))切開した状態から、把持機構を更に駆動させて、切開した透明帯部分から細胞質を押し出す (Fig. 8 (d))。この際に、押し出された細胞質が球形になっていることが顕微鏡画像から分かる。これにより、細胞質表面の細胞膜への破損が無いことが分かる。以上の実験より、作製したオンチップロボット並びにマイクロナイフにより、細胞膜の破損が無く細胞質の一部除去に成功した。

この手法を用いて、畜産草地研究所にてウシ卵子の除核実験を行った。3個の卵子を行い、3個の卵子の除核に成功した。除核された卵子を Fig. 8(g)に示す。この卵子に繊維芽細胞を移植して融合し、その後約100時間培養することで桑実胚にまで成長した (Fig. 8(h))。以上の結果より、本手法の有効性を確認した。

#### 5. 結言

本研究では、把持機構を有するオンチップロボットとマイクロナイフを用いて卵子のオンチップ除核動作を実現した。オンチップロボットは、永久磁石と梁構造を用いて先端部分の開閉制御を実現した。マイクロナイフは透明帯切開のためのパラメータ設定ならびに作製手法を確立した。両者を用い、卵子の透明帯切除並びに細胞質の押し出しに成功した。今後の課題として、透明帯切開量の制御並びに、押し出す細胞質の制御を行う。

#### 謝 辞

本研究は JST-SENTAN ならびに名古屋グローバルCOE の助成を得て行われた。

#### 文 献

[1] J. Castillo, M. Dimaki and W. E. Svendsen, *Integr. Biol.*, 1, 30-42, 2009.  
 [2] J. P. Desai, A. Pillariseti and A. D. Brooks, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9, 35-53, 2007.  
 [3] W. S. N. Trimmer, *Sens. Actuators*, 19, 267-287, 1988.  
 [4] M. Gauthier, and E. Piat, *Journal of Micromechatronics*, 2, 87-119, 2004.  
 [5] G. A. Mensing, T. M. Pearce, M. D. Graham, and D. J. Beebe, *Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. A*, 362, 1059-1068, 2004.  
 [6] J. Atencia, and D. J. Beebe, *Lab on a Chip*, 4, 598-602, 2004.  
 [7] M. Roper, R. Dreyfus, J. Baudry, M. Fermigier, J. Bibette, and H. A. Stone, *Journal of Fluid Mechanics*, 554, 167-190, 2006.  
 [8] J. J. Abbott, K. E. Peyer, M. C. Lagomarsino, L. Zhang, L. Dong, I. K. Kaliakatsos and B. J. Nelson, *Int. J. Rob. Res.*, 28, 1434-1447, 2009.  
 [9] A.-L. Gassner, M. Abonnenc, H.-X. Chen, J. Morandini, J.

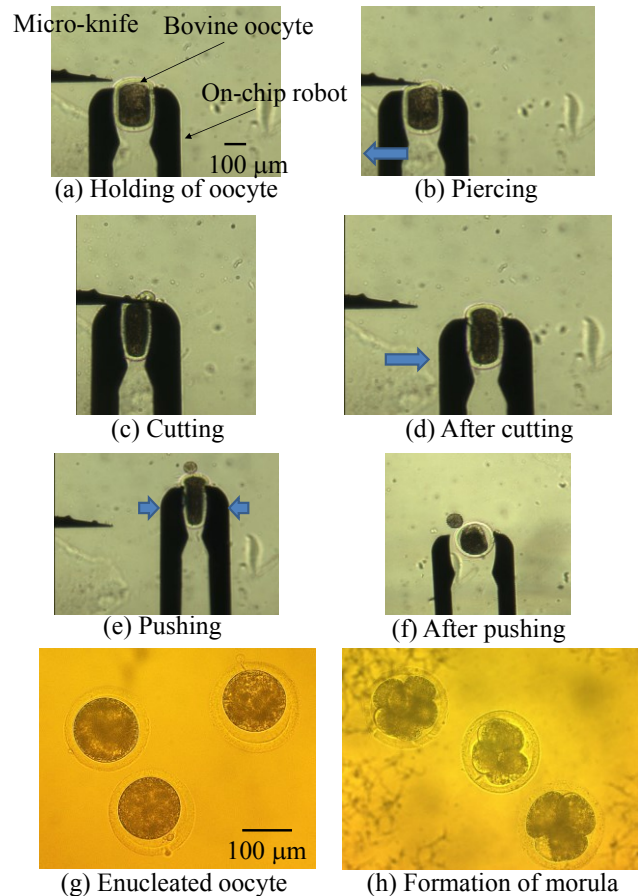


Fig.8 Result of enucleation and growth test of bovine oocyte. We succeeded in enucleation of three oocytes. These oocytes were grown to morula.

Josserand, J. S. Rossier, J.-M. Busnel and H. H. Girault, *Lab Chip*, 9, 2356-2363, 2009.  
 [10] L. Gao, N. J. Gottron, L. N. Virgin and B. B. Yellen, *Lab on a Chip*, 10, 2108-2114, 2010.  
 [11] L. Zhang, K. E. Peyer and B. J. Nelson, *Lab Chip*, 10, 2203-2216, 2010.  
 [12] Y. Yamanishi, L. Feng and F. Arai, *Advanced Robotics*, 24, 2005-2018, 2010.  
 [13] Y. Yamanishi, S. Sakuma, Y. Kihara and F. Arai, *J. Microelectromech. Syst.*, 19, 350-356, 2010.  
 [14] Y. Yamanishi, S. Sakuma, K. Onda, F. Arai, *Biomed Microdevices*, 12, 745-752, 2010.  
 [15] C. Pawashe, S. Floyd, and M. Sitti, *International Journal of Robotics Research*, 28, 1077-1095, 2009.  
 [16] N. Inomata, T. Mizunuma, Y. Yamanishi and F. Arai, *J. Microelectromech. Syst.*, 20, 383-388, 2010.  
 [17] M. Hagiwara, et.al., *APL*, 97, 013701, 2010.  
 [18] M. Hagiwara, et.al., *Lab on a Chip*, 12, 2049-2054, 2011.  
 [19] A. Ichikawa, F. Arai, *The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ-TAS2011)*, 1131-1133, 2011.  
 [20] A. Ichikawa, F. Arai, *International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, 38-40, 2011.  
 [21] A. Ichikawa, F. Arai, *Proc. of the 25th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest (MEMS2012)*, 1081-1084, 2012.