B213

マイクロウェルスライドを利用した段階的濃度分布生成デバイスの開発

Development of newly Designed Biochip for Cell Analysis Using Microfluidics Technology

学 ○堺学(北大院) 非 松井俊祐(北大院, 現: Amazon) 非 Emilie Weibull (KTH)
非 Helene Andersson-Svahn (KTH) 正 大橋俊朗(北大工)

Manabu SAKAI, Hokkaido University, N 13 W 8, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido
Emilie WEIBULL, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden
Helene ANDERSSON-SVAHN, Royal Institute of Technology (KTH)
Toshiro OHASHI, Hokkaido University

Key words : BioMEMS, Microfluidics, Concentration step, Microwell

1. 諸言

生体内では、化学物質の濃度勾配は細胞の遊走や増殖をはじめとする様々な挙動に大きな影響を及ぼすことが知られている。これまで行われてきた細胞の濃度依存性反応についての研究では、濃度勾配は生体ゲルやマイクロピペットを用いた手法で生成されてきたが、生成される濃度勾配の精度が低く、また定量的な濃度勾配形状のコントロールが不可能であった。そこで近年、マイクロフルイディクスの発達により、微量な流れの操作が高精度で可能になったことから、濃度勾配の形状や分布の範囲を制御することのできる小型デバイスが作製されている⁽¹⁾⁽²⁾。しかし、これらのデバイスにおいては生成できる濃度の幅が狭く、また一度に解析できる濃度の分布数が少ないといった欠点がある。

これまでに我々の研究室では、共同研究者である Lindström ら⁽³⁾によって開発された高処理能力を有するマイクロウェルスライドに搭載可能な段階的濃度分布生成バイオチップの開発を行ってきた。本デバイスは3層の Polydimethylsiloxane (PDMS) レイヤーとマイクロウェルスライドにより構成される。流路形状を調整して流路の圧力損失を制御することによって試薬と希釈液の混合割合を変化させ、0.1~100%の濃度分布において8段階の試薬の濃度(0.1%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100%)を生成することが可能である。これまでに本デバイスを使い松井ら⁽⁴⁾は蛍光色素を用いて8段階の濃度勾配が生成されることを検証し、実験値と計算値が良い一致をしていると報告している。本研究ではデバイス内で細胞培養を行い、それらの細胞に対する試薬の濃度が及ぼす影響について検討した。

2. 試料および方法

2. 1 デバイス概要

デバイスの概略図を図1(a)に示す。本デバイスは、試薬の送液のための微小流路が配置された1層目(最上層)、希釈液のための微小流路が配置された2層目、試薬と希釈液の予混合部、反応チャンバーおよび廃液流路が配置された3層目の合計3層のPDMSレイヤー、およびマイクロウェルスライドから構成される。マイクロウェルスライドには672個のマイクロウェルが格子状に配列されている⁽³⁾。すべてのレイヤーを統合したデバイスの写真を図1(b)に示す。3層目に配置された反応チャンバーは4つのマイクロウェルを含む領域(2.85 mm×2.85 mm)を確保し、これを8か所に設けた。反応チャンバー内マイクロウェルにおいて細胞を培養し、それぞれの反応チャンバーに異なる濃度の試薬を生成させて細胞の反応を観察した。試薬および希釈液はそれぞれの隔離された流路から5本の分岐に流入して3層目へと至り、予混合部を通過して反応チャンバーへと至る(図1(a), (c))。

Fig. 1 (a) Schematic illustrations of the device. Reagent was introduced into channels on the first layer, and dilutant was introduced into channels on the second layer. Both liquids were blended within the mixing point, and then flowed into reaction chambers. (b) Photograph of the assembled device. (c) Specifications of main channels and numbers of reaction chambers.

2. 2 流路形状の計算および加工

各流路の流路抵抗は以下のハーゲン・ポアズイユの式(1)から求めた。

$$\Delta P = \frac{32\mu L}{D^2 w d} \times Q \quad (1)$$

ここで、 ΔP , μ , L , D , w , d , Q はそれぞれ圧力差、粘度、流路長さ、代表直径、流路幅、流路高さ、流量を表す。 ΔP

を電圧, Q を電流とみると, 流路抵抗は電気抵抗に対応するので, (1)式をオームの法則に適用することができる⁽⁴⁾. 反応チャンパーにおける濃度 C は,

$$C = \frac{Q_{\text{試薬}}}{Q_{\text{試薬}} + Q_{\text{希釈液}}} \quad (2)$$

で表される. 式(2)をから各反応チャンパーでの濃度に対応する試薬と希釈液の混合比を決め, 流量比を流路抵抗比で表した連立方程式を導いた. これを解くことにより, 流路の流路幅および長さを決定した.

微小流路はフォトリソグラフィおよびソフトリソグラフィを用いて作製した. 1層目および2層目については, シリコンウエハー上にネガ型フォトリソレジスト (SU-8 3050, MicroChem) を厚さ 50 μm にスピコートし, 3層目については厚さ 100 μm のドライフィルムレジスト (感光性フィルム HM-4000, Hitachi chemical) を2重に張り付け, それぞれ露光および現像を経て鋳型を作製した. PDMS (Sylgard184, Dow Corning) の主剤および硬化剤を 10:1 の比で混合して鋳型へ流し込み, 100°C で 40 分加熱して硬化させることで微小流路を有する PDMS 層を作製した. 各層の接合表面をプラズマ処理で改質し, 75°C のホットプレート上で圧着した.

2. 3 細胞の試薬濃度依存性実験

各反応チャンパーにおいて生成された試薬の濃度に対する細胞の反応を確認するために, コンフルエント状態に至った細胞に対して試薬濃度依存性実験を行った. 試薬として細胞膜を破壊する作用を有するサポニン (Sigma-Aldrich, 1.0 mg/ml) を, また希釈液として PBS を用いて, 0.2 ml/min で 5 分間送液を行った. 30 分間室温で静置した後, PBS を同様の条件で送液し細胞を洗浄した. 細胞の生死判定を行うために, 生細胞を染色するカルセイン AM (同仁化薬) の 5 μM 溶液および死細胞を染色するエチジウムホモダイマー (Invitrogen) の 5 μM 溶液を同様の条件にて送液し, 20 分間室温にて静置することで蛍光染色した. その後, PBS を 0.2 ml/min で 5 分間送液することで洗浄した. 蛍光観察は倒立型電動リサーチ顕微鏡 (IX81, Olympus) で行い, 各反応チャンパー内に存在する全細胞に対する生細胞の割合を計測した.

3. 結果および考察

実験より得られた反応チャンパー内の内皮細胞の代表的な蛍光観察画像を図 2(a)に示す. またこれらの画像において, 全細胞数に対する生細胞数の割合を図 2(b)に示す. これらより, 100%~10%の試薬濃度ではほぼすべての細胞が死細胞であった. しかし, 試薬濃度が希釈されていくにつれて生細胞の割合が増加した. 即ち, サポニン濃度が 10% (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 以上であれば, 細胞がサポニンの毒性を感知して死に至っており, 一方でサポニン濃度が 5% (5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 以下であれば, その濃度に応じて生細胞の割合が高くなっていることが分かる. このように血管内皮細胞の細胞毒性を有する試薬に対する反応領域の検出が可能となった. 以上の結果より, 本デバイスはマイクロフレイディクスを用いて, 広範囲なステップ状の濃度勾配を生成し, 細胞に対する試薬の反応試験を行うことが可能であることが示された. 従来の手法では, 容量 2 ml の細胞培養ディッシュを用いて 8 段階の異なる濃度を生成しようとする, 少なくとも計 16 ml の試薬を必要とした. これに対して本デバイスでは, 要する試薬は計約 2 ml であるため, 概算として 8 分の 1 の試薬量で同等の実験が可能であることが示唆された. また試薬の使用量の節約と同時に, 実験に要する時間短縮の効果も確認された. 以上の結果から,

Fig. 2 (a) Fluorescence images of living cells (green) and dead cells (red). (b) The ratio of living cells against all cells on a chamber.

本デバイスを用いることにより, マイクロウェルスライド上で行う生化学実験の高効率・高速化が期待される.

4. 結言

マイクロフレイディクスを用いて, チップ内で段階的な濃度勾配を生成するマイクロウェル統合デバイスを開発した. これにより従来の手法に比べて, 10 の 3 乗オーダーに渡る広範囲の濃度分布での細胞に対する薬剤の影響を効率的に調べることが可能となった.

謝辞

本研究は, 科学技術振興機構 (JST) の戦略的国際科学技術協力推進事業 (スウェーデン) の助成を受けて行われた. MEMS加工は北海道大学創成科学研究棟オープンファシリティを使用した.

参考文献

- (1) Jeon et al., *Langmuir*, 16(22), 8311-8316, 2000.
- (2) Kim et al., *Lab Chip*, 8(3), 473-479, 2008.
- (3) Lindström et al., *Lab Chip*, 10(24), 3363-3372, 2010.
- (4) Yamada et al., *Lab Chip*, 6(2), 179-184, 2006.
- (5) 松井ら, 第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 2012.