機能性ゲルマイクロツールを用いた局所閉空間環境センシング

Local Sensing in Closed Environment Using Functional Gel-Microtool

○ 丸山 央峰 (名大)

正 新井史人 (東北大)

正 福田 敏男 (名大)

Hisataka Maruyama, Nagoya University, maruyama@robo.mein.nagoya-u.ac.jp

Fumihito Arai, Tohoku University

Toshio Fukuda, Nagoya University

A local pH sensing method in a microchip using a functional gel-microtool was newly developed. We used a salting-out gel-microtool impregnated with BromoThymol Blue (BTB), which is used as a pH indicator. The salting-out gel-microtool is made of ENT-3400, which is hydrophilic photo-crosslinkable resin. The primary constituent of this resin is polyethyleneglycol. A solution mixed with ENT-3400, BTB, and high concentrations of electrolytic solution are stirred, and a lot of microspheres impregnated with BTB are obtained. These microspheres are cured by UV illumination and adhere to the glass substrate, however, we can manipulate them one by one using the optical tweezers. Therefore, we can move and position it in the closed environment. Here we propose to use the salting-out gel-microtool with BTB as a carrier of pH indicator. We can measure pH value locally from the color of microtool using calibrated color information in YCrCb color space. We succeeded in measuring local pH value with the pH sensing gel-microtool by locating it at the desired point in the microchip.

Key Words: Gel-microtool, Salting-out, Measurement, pH, optical tweezers, Lab on a chip

1. 序論

近年、細胞個々の性質の詳細な調査を目的とした単一細胞実験への期待が高まっている[1, 2]. 従来行われてきた細胞の特性調査はフラスコやシャーレ内で大量の細胞を用いた集団細胞実験が主であった. この手法は統計的な情報を得ることが可能であるが、細胞個々に関しては平均された情報しか得ることができない. 細胞個々を直接観察する単一細胞実験では細胞個々の情報を得ることが可能である. また外乱への影響の低減や試薬消費量の低減を目的としてマイクロチップ内での実験に期待が寄せられている[3, 4]. マイクロチップ内での単一細胞実験を実現するためには、細胞1個単位での操作技術、観察技術、測定技術が必要となる.

我々は単一細胞操作技術としてマイクロツールを用いた間接レーザーマイクロマニピュレーション (ILM) 及び複数の対象を同時に操作するシンクロレーザーマイクロマニピュレーション (SLM) を提案してきた[5, 6]. レーザ操作ではレーザーにより対象に損傷を与える可能性がある[7, 8]. それを低減するために用いるレーザー駆動する中間媒体をマイクロツールと呼ぶ. SLM は1本のレーザーの高速走査により複数のマイクロツールを制御し細胞の安定搬送や回転等の姿勢制御を行う. ILM 及び SLM によりマイクロツールを用いた細胞の安定操作及び姿勢制御を実現した. またマイクロツールの高機能化を目的として、局所光造形による機能性マイクロツールのチップ内製作を提案した[9]. 疎水性樹脂の液滴を親水性光硬化性樹脂水溶液内での局所光造形により任意の形状のマイクロツールに製作することに成功した. 単一細胞の観察技術としては、親水性光硬化性樹脂溶液の局所光造形による単一細胞固定を提案し、細胞の増殖の様子等の長時間観察を実現した[10].

マイクロチップ内での単一細胞単位での測定は、細胞内に関しては蛍光プローブを用いた pH 及びカルシウムイオン濃度の測定が行われている[11, 12, 13, 14]. しかし細胞周りの局所領域の環境計測に関する研究は多くない. 細胞の内部情報を知ることは重要であるが、細胞の環境との相互作用を知るためには細胞周りの局所環境を測定することもまた重要である. マイクロチップ内での環境測定法としては pH または温度

に対して依存性を有する蛍光色素を環境内に満たし、環境に対する蛍光強度のプロファイルを作成する手法がある. この手法は観察領域全体の環境を一度に測定することが可能であるが、測定の度に蛍光試薬で環境を満たす必要がある. また蛍光試薬が細胞内に入り込んで実験を阻害する可能性も考えられる. その他の手法としては微細加工により測定プローブを環境内に製作する手法があるが、製作したプローブは移動できないためプローブ周りの環境のみ計測可能である.

我々はマイクロチップ内において pH 等の環境を局所的に測定するために、環境応答性高分子を内包し液透過性を有する機能性マイクロツールによるマイクロチップ内局所環境測定手法を提案する. 本稿ではマイクロチップ内の pH 測定を目的とした、環境応答性高分子として pH 指示薬であるプロモチモールブルー (BTB) を用い、ポリエチレングリコール (PEG) を主成分とする親水性光硬化性樹脂 ENT-3400 を指示薬の担体として用いた. ENT-3400 は高濃度電解質水溶液に導入し攪拌すると塩析によりビーズ状のゲルを生成する. この塩析ゲル内に BTB を内包して機能性マイクロツールとして使用する. このゲルツールはレーザー操作が可能であり、ガラスと容易に付着するためマイクロチップ内に pH 測定ポイントを図1に示すように任意にレイアウト可能である. BTB を用いることで明視野での pH 測定が可能である. ゲルツールの色をカラー CCD で取得し YCrCb 空間に色変換し色差情報より pH を求める. このゲルツールを用いることでマイクロチップ内の pH を測定することに成功したので報告する.

Fig. 1 A schematic of environment sensing gel-microtool

2. pH センシングゲルツール

2.1 pH センシングゲルツールの製作

pH センシングゲルツールの材料として光硬化性樹脂 (ENT-3400, 関西ペイント) を用いた。ENT-3400 は親水性の高分子である PEG のプレポリマーを主成分とし、光開始剤と混合して用いる。近紫外光 (366 nm をピークとする) の照射により重合し網目状のポリマーとなる。ENT-3400 は親水性の樹脂であり水によく混ざるが、高濃度電解質水溶液中に導入すると、塩析が生じ不溶性のビーズ状コロイドを生成する。生成した塩析ゲルは細胞やガラスに接触させると付着する。また生成した塩析ゲルは塩析ゲル同士で容易に合体するためサイズの調整が可能である。塩析ゲルの主成分である PEG の比屈折率は 1.42 で水の比屈折率の 1.33 より大きいので、ビーズ状の塩析ゲルをレーザーで操作することが可能である。

ENT-3400 を 2g と高濃度電解質水溶液を 1g とを混合し攪拌して生成した塩析ゲルをレーザー操作により塩析ゲル同士を合体させた様子を図 2 に示す。塩析ゲルの形状は紫外光による硬化により維持でき、硬化した塩析ゲルは細胞や他の塩析ゲルに付着するため、構造体の組み立てが可能である (図 3)。

塩析ゲル内に導入する BTB は、酸性 (pH6.0 以下) で黄色、中性 (pH6.0~7.8) で緑、アルカリ性 (pH7.8 以上) で青色を示す pH 指示薬である。この BTB 溶液と ENT-3400 を混合した後塩析ゲルを生成すると塩析ゲル内に BTB が内包される。BTB を内包した pH センシングゲルツールを図 4 に示す。

この塩析ゲルを用いた pH センシングゲルツールの製作及び使用手順は以下の通りである (図 5)。

- (1) BTB 溶液と ENT-3400 の混合溶液を高濃度電解質水溶液に導入して 1 分攪拌処理をして塩析ゲルツールを生成
- (2) 純水で 10 倍に希釈後、マイクロチップ内に導入 (必要に応じて水銀ランプから近紫外光を照射し塩析ゲルを硬化)
- (3) 塩析ゲルツールをレーザー操作しガラスの任意の箇所に固定
- (4) 塩析ゲルツールの色をカラー CCD カメラで取得し YCrCb 空間に変換し pH を求める。

本手法は、環境応答性高分子と担体となる親水性高分子の混合溶液を高濃度電解質水溶液に導入後攪拌するだけで試薬内包塩析ゲルツールが生成でき、従来の化学処理によりマイクロビーズ表面に環境応答性高分子を付着させる手法に比べて単純な手順で短時間での製作が可能という特徴がある[15]。

(a) Laser trapped gel-tools (b) Combined gel-tool
Fig. 2 Combining salted-out gel-microtool

(a) Trapped gel-tools (b) Binding gel-tools
Fig. 3 Binding cured gel-microtools

(a) Acid solution (pH 4) (b) Alkaline solution (pH 9)
Fig. 4 Photographs of pH sensing gel-microtool

Fig. 5 A schematic of generation of pH sensing gel-microtool

2.2 YCrCb 色空間による pH 算出

pH センシングゲルツールの色はカラー CCD により RGB 値で出力される。RGB 値では各色情報に輝度情報が含まれているため輝度が色測定に影響を与えることが考えられる。このため輝度情報と色情報を分離するため式(1)により YCrCb 空間への色変換を行い赤の色差と青の色差を算出した。Y は輝度、Cr は赤の色差、Cb は青の色差を示す。

$$\begin{aligned} Y &= 0.299R + 0.587G + 0.114B \\ Cr &= 0.5000R - 0.419G - 0.081B \\ Cb &= -0.169R - 0.419G + 0.500B \end{aligned} \quad (1)$$

本稿で用いる BTB は pH が増加するに従い黄色から青色へと変色する。これは Cr が減少、Cb が増加することを意味する。このことから予め各 pH での Cr、Cb のキャリブレーションをとることで塩析ゲルツールの画像情報から pH を求めることができる。

2.3 実験システム

本研究で用いた顕微鏡システムの光学系の構成を図 6 に示す。倒立顕微鏡で最大 3 本のレーザーを組み込むことが可能である。それぞれのレーザーの焦点は独立に調整可能で、ガルバノミラーにより走査可能である。現在システムには細胞操作用に Nd:YVO₄ レーザ (波長 1064 nm, 最大出力 > 4 W) を導入している。観察及びレーザートラップ用に開口数 1.4, 100 倍の油浸対物レンズ (オリンパス) を利用している。マイクロツール硬化用に水銀ランプ (100 W) を導入している。画像取得用のカラー CCD として XC-003 (ソニー) を用いた。マイクロチップは顕微鏡の X-Y-Z ステージ上に設置する。X-Y-Z ステージはステッピングモータにより制御する。操作者はジョイスティックでステージやレーザーの焦点を制御し、TV モニターを見ながら細胞の観察やレーザートラップした物体を操作する。

Fig. 6 A schematic of Laser micromanipulator system

3. 実験

3.1 PH センシングゲルツールの製作

本研究では高濃度電解質水溶液として飽和 KCl 水溶液を用いた. ENT-3400 と BTB 溶液を 3:1 の重量比で混合した溶液と飽和 KCl 水溶液を 1:2 の割合で混合し 1 分間攪拌処理して pH センシングゲルツールを製作した. このゲルツールは内部の試薬の色により pH を求めるため, ゲルツールのサイズ, 照明強度, 光学系及び CCD カメラの設定により影響を受けるため使用前にキャリブレーションを行う必要がある.

製作したゲルツールを用いて pH のキャリブレーションを行った. 対物レンズは UPLSAPO 100XO (オリンパス) を用いた. CCD カメラは色温度を 3200K, Gain を 0, Gamma を ON, White Balance は手動設定で R. Gain を +25, B. Gain を +70 とした. 照度は 2000 lux とした. 測定する pH は 4.8, 5.8, 6.7, 7.8, 9.0 の 5 種類とし, 色の測定はツールの赤道付近に観察焦点面を合わせて RGB 画像を取得した.

図 7 に pH 4.8 以外の各 pH でのゲルツールの様子を示す. $10 \pm 5 \mu\text{m}$ の範囲のサイズのゲルツールに対して RGB 値を取得し YCrCb 値に変換し Cr, Cb 値を求めた結果をそれぞれ図 8, 図 9 に示す. Cr, Cb は pH の増加に伴いそれぞれ単調減少及び単調増加する. pH と Cr の間には比例関係が見られ Cr の標準偏差が最大 0.51 であることから pH の計測精度は約 ± 0.1 である. Cb については同様に最大の標準偏差が 1.93 であることから pH の計測精度は約 ± 0.27 となり, 本実験環境では Cr により pH を測定するのが適当である. ENT-3400 と BTB を 2:1 の重量比で混合して製作したゲルツールについて同条件にて各 pH の Cr を求め, 図 8 の Cr 値と比較した結果を図 10 に示す. BTB の割合を大きくすると Cr 値が全体的に高くなる傾向があるが, pH に対する Cr の推移の傾向はほぼ同じであった.

Fig.7 Color shift of pH sensing gel-microtool

Fig. 8 Relation between pH and Cr

Fig. 9 Relation between pH and Cb

Fig. 10 Comparison of values of Cr by the concentration of BTB

3.2 pH センシングゲルツールのマイクロチップ内配置

pH センシングゲルツールをレーザで操作しマイクロチップ内に配置する実験の結果を図 11 に示す. ゲルツールの主成分である PEG は水より屈折率が高いためレーザ操作が可能である. ゲルツールはレーザにより水中において $150 \mu\text{m/s}$ での搬送が可能であった.

未硬化のゲルツールをマイクロチップ内で他の未硬化のゲルツールとの合体により任意のサイズに調整した後, 水銀ランプを用いて近紫外光を照射し硬化させチップ底面のガラスにゲルツールを押し付けてツールを配置した. この作業を繰

り返し行い図 11(d)に示すように pH センシングゲルツールをマイクロチップ内に配置した。

次に pH 4 の水溶液を流してゲルツールを黄色にした後、pH 9 の溶液を流してゲルツールの色の変化の様子を観察した。pH の変化に伴いゲルツールの色が変わる様子が観察でき、マイクロチップ内に pH センシングゲルツールを任意にレイアウトし局所的な環境測定が可能であることを確認した。

Fig. 11 On-chip pH sensing using pH sensing gel-microtool

4. 結論

本稿では、マイクロチップ内の pH 等の環境を局所的に測定するための機能性マイクロツールによるマイクロチップ内局所環境測定手法を提案し、pH センシングゲルツールの製作、キャリブレーション及びゲルツールのレーザ操作によるマイクロチップ内レイアウトを実現した。

マイクロチップ内において環境応答性高分子を保持するための担体として、親水性光硬化性樹脂の塩析により生じる塩析ゲルツールを用いることで、環境応答性高分子と光硬化性樹脂を混合して高濃度電解質水溶液に導入して塩析させた後攪拌するという単純な手法により短時間で容易に試薬内包塩析ゲルツールを製作することに成功した。環境応答性高分子として BTB を使い CCD カメラで取得した RGB 画像を YCrCb 色空間に変換し色差情報の pH による変化を利用することで、市販の pH 計と同等の精度でのマイクロチップ内 pH センシングが可能となった。そして pH センシングゲルツールをレーザで操作しマイクロチップの任意の場所に配置することに成功した。

今回は環境応答性高分子として BTB を用いたため、中性付近の pH のみ測定可能であったが、メチルレッドやフェノールフタレイン等の異なる pH 変色域をもつ試薬と組み合わせることで pH の計測範囲の拡大が可能であると考えており今後の課題である。

本提案手法で製作した環境センシングゲルツールを用いることで細胞近傍の局所環境測定や閉空間での環境の非接触

モニタリングが可能となるため、マイクロチップを用いた細胞実験や化学実験での計測技術の向上への貢献が期待できる。

謝辞

本研究は文部科学省の科研費（17040017）の助成を得た。

参考文献

- [1] I. Inoue, Y. Wakamoto, H. Moriguchi, K. Okano, and K. Yasuda, "On-chip culture system for observation of isolated individual cells," *Lab-on-a-Chip*, Vol.1, pp. 50-55, 2001
- [2] S. Uehara, Y. Wakamoto, I. Inoue, and K. Yasuda, "On-chip singlecell microcultivation assay for monitoring environmental effects on isolated cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.305, pp. 534-540, 2003.
- [3] T. Katsuragi, and Y. Tani, "Review: Single-cell sorting of microorganisms by flow or slide-based (including laser scanning) cytometry," *Acta Biotechnol*, Vol.21, pp. 99-115, 2001.
- [4] F. Arai, A. Ichikawa, T. Fukuda, and T. Katsuragi, "Isolation and extraction of target microbes using thermal sol-gel transformation," *Analyst*, Vol.128, pp. 547-551, 2003
- [5] F. Arai, H. Maruyama, T. Sakami, A. Ichikawa, and T. Fukuda, "Pinpoint injection of microtools for minimally invasive micromanipulation of microbe by laser trap," *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, Vol.8, pp. 3-9, 2003.
- [6] Fumihito Arai, Keiichi Yoshikawa, Toshihiro Sakami, and Toshio Fukuda: "Synchronized laser micromanipulation of multiple targets along each trajectory by single laser", *Applied Physics Letters*, 85, 19, pp. 4301-4303, 2004.
- [7] C. N. Keir, H. C. Edmund, F. L. Grace, B. Keren, and M. B. Steven, "Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps," *Biophysical Journal*, Vol.77, pp. 2856-2863, 1999
- [8] H. Liang, K. T. Vu, P. Krishnan, T. C. Trang, D. Shin, S. Kimel, and M. W. Berns, "Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping," *Biophysical Journal*, Vol.70, pp. 1529-1533, 1996.
- [9] H. Maruyama, F. Arai, T. Fukuda, "Microfabrication and Laser Manipulation of Functional Microtool using In-Situ photofabrication," *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol. 17, No. 3, pp. 335-341, 2005
- [10] H. Maruyama, F. Arai, T. Fukuda, T. Katsuragi, "Immobilization of individual cells by local photo polymerization on a chip," *The Analyst*, 130, 3, pp. 304-310, 2005
- [11] GR Bright, GW Fisher, J Rogowska, and DL Taylor, "Fluorescence ratio imaging microscopy: temporal and spatial measurements of cytoplasmic pH," *Journal of Cell Biology*, 104, pp. 1019-1033, 1987
- [12] Kazuo Tsujimoto, Marco Semadeni, Margaret Huflejt and Lester Packer, "Intracellular pH of halobacteria can be determined by the fluorescent dye 2', 7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein," *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 155, Issue 1, pp. 123-129, 1988
- [13] Atsushi Miyawaki, Juan Llopis, Rogerheim, J. Michael McCaffery, Joseph A. Adams, Mitsuhiko Ikura & Roger Y. Tsien, "Fluorescent indicators for Ca²⁺-based on green fluorescent proteins and calmodulin," *Nature*, 388, pp. 882-887, 1997
- [14] Robert V, De Giorgi F. Massimino ML, Cantini M, Pozan, "Direct Monitoring of the Calcium Concentration in the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle Myotubes," *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30372-30378, 1998
- [15] Jin Ku Cho, Lu Shin Wong, Tony W. Dean, Osamu Ichihara, Christophe Muller and Mark Bradley, "PH Indicating resins," *Chemical Communications*, pp. 1470 - 1471, 2004