単一細胞の局所反応評価のためのオンチップ実験システム*

新井 史人^{*1}, 丸山 央 峰^{*2}
福田 敏 男^{*1}, 桂 樹 徹^{*3}On-Chip Experiment System for Evaluation of
Local Reaction of a Single CellFumihito ARAI^{*4}, Hisataka MARUYAMA,
Toshio FUKUDA and Tohoru KATSURAGI^{*4} Department of Micro Nano Systems Engineering, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi, 464-8603 Japan

In recent years, single cell experiment has become very important for investigating unknown cell properties. We developed a novel technique to investigate individual cell properties on a chip using newly developed cell fixation method by the photo-crosslinkable resin. We propose three different fixation methods, that is, direct fixation method, caging method, and direct fixation with position control method. The isolated cell is fixed in the cured resin directly or inside the cage of the cured resin. The laser tweezers is employed to manipulate the target cell indirectly by using the laser trapped droplet of the resin as a microtool. The cell is positioned properly by the laser tweezers and is fixed in the cured resin. We tested the mercury lamp as well as the He Cd laser for UV ray irradiation at the local area. The fixation force of the resin is strong enough to stay with the drag force by the microchannel flow at the speed more than 466 mm/s. In experiment, we confirmed the single cell fixation by the proposed fixation methods. Then, we succeeded in a series of reaction experiments, such as culture and fluorescent reaction on a chip.

Key Words: Cell, Separation, Fixation, Photo Crosslinkable Resin, Culture, Fluorescent Dye, μ -TAS, Laser Tweezers

1. 序 論

近年のバイオテクノロジーの発展に伴い、人類に対して有用な微生物や細胞の応用が盛んに行われている。しかしこれまで応用されてきた微生物や細胞は全体の中のごく少数であった。細胞の応用には細胞の特性調査が必要となる。細胞の生物学的現象の解析手法には2種類ある。集団細胞実験に基づく手法と、単一細胞単位での直接観察に基づく手法である。従来は集団細胞実験が主であり、分裂周期間の細胞のDNA合成や細胞の体積変化等の細胞特性に関する研究が行われてきた。しかし集団細胞実験から得られる情報は、細胞単位では平均された情報である。単一細胞実験では個々の情報が得られ、細胞の空間的分布や細胞間の相互作用が特性調査の重要な要素となる。また集団細胞実験による複数の培養条件での細胞実験は長い時間や大きな実験空間を必要とするため、省エネ・省スペース化を目的としてマイクロチップ内での実験が試みられている^①。近年、大量の集団中で任意の特性をもつ細胞の高速採取が可能になってきており、単一細胞実験への期待が高まっている^{②③}。本論文ではマイクロ

チップ内で目的の細胞を1個単位で環境中へ固定し、個々の細胞の反応をモニタリングするオンチップ単一細胞実験システムを提案する。

単一細胞実験の実施には、大量のサンプルから目的の特性を有する細胞を高速分離する技術が必要である。マイクロピペット等の機械的接触型操作手法によりシャーレ内の大きさ数 μm 前後の対象を光学顕微鏡下で観察しながら採取する手法が一般的であるが、顕微鏡下で微小な生体試料を高純度で選別・回収する作業は熟練した技術を必要とし、また水中の対象の操作は困難である。フローサイトメトリーはこの用途に広く使用されているが、この手法による従来の分離は逐次式的分離であったため、分離前に多数の細胞を同時比較することは不可能であり、細胞の位置情報は分離により失われる^{④⑤}。この問題を解決するため、レーザスキャニングサイトメトリーによる単一細胞の選別が提案されている^⑥。この手法は個々の細胞の繰り返し検査や自動計測が可能であるが、単一細胞の孤立化やピペットの位置決めが困難であるため単一細胞の自動分離には向かない。

我々は顕微鏡ステージ下において、サンプル溶液から任意の単一細胞のレーザトラップ^⑦・誘電泳動力^⑧・キャピラリーフロー等の非接触操作手法による選択的かつ効率的な分離を行う、微生物高速分離システムを提案し研究を行ってきた^⑨。またレーザトラップ

* 原稿受付 2004年3月8日。

^{*1} 正員, 名古屋大学大学院工学研究科(〒464-8603 名古屋市千種区不老町)。^{*2} 名古屋大学大学院工学研究科。^{*3} 奈良先端大学大学院バイオサイエンス研究科(〒630-0101 生駒市高山町 8916-5)。

E-mail: arai@mein.nagoya-u.ac.jp

時のレーザ直接照射による損傷の低減を目的として、マイクロツールと呼ぶ中間媒体を用いた間接レーザマニピュレーションを提案した^{(10),(11)}。

単一細胞実験は特定の細胞を長時間観察する必要がある。細胞を観察空間に固定する必要がある。この目的のため温度相転移性ゲルを用いた固定や、半透膜により製作した閉空間への保持が行われている⁽¹²⁾⁻⁽¹⁴⁾。しかし従来の固定法は固定位置がチップ設計に依存するため柔軟性に乏しい。我々はレーザトラップによる単一細胞操作と光硬化性樹脂による細胞固定による単一細胞実験システムを提案した⁽¹⁵⁾。レーザトラップで任意の細胞の位置制御を行い、光硬化性樹脂を局所的に硬化させることで単一細胞を固定する。本論文では、光硬化性樹脂の硬化範囲や硬化形状の制御による単一細胞固定と固定した細胞を用いた単一細胞実験を実現したので報告する。

2. 細胞固定化法と実験システム

2・1 光硬化性樹脂を用いた細胞固定化法

本研究では、単一細胞の固定に光硬化性樹脂 (ENT-3400, ENTG-3800: 関西ペイント) を用いた。ENT-3400 はポリエチレングリコール (PEG) を、ENTG-3800 はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコール (PPG) を主成分とするプレポリマーである。これらのプレポリマーは光開始剤を混合して用いる。樹脂は近紫外線領域 (366 nm) を照射すると硬化する。

ENTG-3800 の硬化の様子を図 1 に示す。硬化した樹脂はガラスと強固に接着し、マイクロチャンネル内で 466 mm/s 以上の流速に耐える。PEG は親水性、PPG は疎水性のため、ENTG-3800 は水の混合溶液中でエマルジョンを生成する。樹脂濃度と PPG 液滴サイズの関係を図 2 に示す。生成される液滴サイズは最大で 4 μm 程度であり (図 2(a))、樹脂濃度を変えても約 4 μm の直径の液滴が生成される (図 2(b))。PPG の比屈折率は 1.456 で純水の比屈折率 1.333 よりも大きいので、溶液中の PPG の液滴はレーザトラップ可能である。このため図 3 に示すように液滴をマイクロツールとして利用可能である。

Fig. 1 Photographs of ENTG-3800 40% solution in macroscale. (Left one is before cure and right one is after cure.)

(a) Distribution of PPG droplet size (Resin content: 40%)

(b) Distribution of PPG droplet size (3 μm -4 μm) depend on resin content

Fig. 2 PPG droplet size in ENTG-3800

Fig. 3 Scheme of indirect laser manipulation using PPG droplet as a microtool

光硬化性樹脂を用いた細胞固定化手法を 3 つに分類した。分類を図 4 に示す。

- (a) 直接固定法
細胞を局所的に硬化させた樹脂のゲル中へ包括的に固定する手法
- (b) ケージ内固定法
細胞を樹脂で製作したケージの中に保持する手法
- (c) 位置制御併用法
マイクロツールを用いたレーザトラップによる位置制御後、細胞を光硬化性樹脂により固定する手法

Fig. 4 Fixation method with photo-crosslinkable resin

直接固定法の特徴は、簡便である、細胞周辺の雑菌の繁殖が抑制できることである。ケージ内固定法では細胞の運動を阻害しにくい特徴がある。これらの固定法はどれもマイクロチップ内において細胞の固定位置を細胞単位で任意に選択可能である。更に位置制御併用法は、レーザートラップを併用することによって複数の細胞間の位置決定や目的の細胞付近の余分な細胞を除去できるといった特徴が加わる。

2.2 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5に示す。観察系は倒立顕微鏡で、本システムには最大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レーザー（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1.35、100倍の油浸対物レンズ（オリンパス）を利用する。蛍光観察および樹脂硬化用に水銀ランプ（100 W）を導入している。レーザー及び水銀ランプは電動シャッターにより0.1秒単位での照射が可能である。このレーザーキャニングマイクロマニピュレータと倒立光学顕微鏡を同一菌体で用いるため、本体はダイキ

ヤストにより製作している。マイクロチップは顕微鏡のX-Y-Zステージ上に固定する。X-Y-Zステージはステッピングモータにより制御する。オペレーターは、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。

図6にマイクロチップの構造を示す。マイクロチップは、透明なシリコン樹脂であるポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いてレプリカ造型法により製作した⁽¹⁶⁾⁻⁽²⁰⁾。マイクロチップのマイクロチャンネルのサイズは深さ100 μm 、幅500 μm である。このマイクロチップは4つのポートを備えており、それぞれサンプルの導入ポート、光硬化性樹脂の導入ポート、試薬の導入ポート、廃液用のポートとなっている。サンプルなどは外部に設置したポンプによりマイクロチップ内へ導入する。

Fig. 5 A schematic diagram of the experiment system

Fig. 6 A schematic diagram of microchip

2.3 光硬化性樹脂の硬化範囲の測定

近紫外光照射時の光硬化性樹脂の硬化範囲測定の結果を図7に示す。横軸は照射時間を、縦軸は硬化範囲の直径を表す。光源は水銀ランプを用い、近紫外光の選択にはミラーユニットU-MWU2（オリンパス）を利用した。水銀ランプからの近紫外光の照射スポット径は30 μm とした。樹脂はENTG-3800（Resin content 40%）を用い、純水で希釈した際の濃度による硬化範囲の変化も測定した。

樹脂濃度及び照射時間の増加に伴い硬化範囲は大きくなる。樹脂の最小硬化範囲の直径は $7\mu\text{m}$ である。微生物の大きさは $1\sim 10\mu\text{m}$ であるので、単一細胞の固定は 1 秒未満の近紫外光の照射で可能である。

Fig. 7 Measurement of curing range of ENTG-3800 by mercury lamp

3. 実験結果

3・1 光硬化性樹脂による単一細胞固定

提案した 3 つの固定手法による細胞固定実験を行った。固定対象としてイーストを用いた。直接固定手法による結果を図 8 に示す。ケージ内固定法による実験結果を図 9 に示す。位置制御併用法による実験結果を図 10 に示す。

Fig. 8 Experiment result of direct fixation method (Resin: ENT-3400, Resin content: 20%, Light source: Mercury lamp)

Fig. 9 Experiment result of caging method (Resin: ENTG-3800, Resin content: 20%, Light source: Mercury lamp)

Fig. 10 Experiment result of direct fixation with position control method (Resin: ENTG-3800, Resin content: 20%, Light source: Mercury lamp)

提案した 3 つの固定法の全てで、単一細胞の固定に成功した。これら 3 つの固定法にはそれぞれ前述した特徴があり、我々のシステムでは目的に応じた固定法が作業時に選択できる。また本システムでの光硬化性樹脂の最大硬化範囲は直径 7 mm 、高さ 1.5 mm である。 1.5 mm 以下の物体を固定可能であり、真核細胞・原核細胞のように一般に顕微鏡で扱われる対象であれば本システムによる固定が可能である。

3・2 細胞固定化法を用いた単一細胞実験

単一細胞実験として光硬化性樹脂により固定したイーストの培養観察及び蛍光染色実験を行った。実験には直接固定手法により水銀ランプを用いて ENTG - 3400 内へ固定したイーストを用いた。

培養観察の実験結果を図 11 に示す。培養開始から 4 時間後に固定したイーストからの出芽が開始し、出芽したイーストの成長過程を細胞の位置を保存した状態で観察できた。

そこで、10 個のイーストについて、それぞれを独立に直接固定法で固定し、同様に培養実験を行った。培養時間と出芽したイーストの割合の関係を図 12 に示す。実験より 4 時間後までに全てのイーストの出芽開始を確認した。

次に、固定したイーストの蛍光染色前後の観察結果を図 13 に示す。ここでは CFDA (5 (and 6) - carboxyfluorescein diacetate) という蛍光試薬を用いた。CFDA は生細胞中のエステラーゼにより加水分解されることで蛍光性になる性質が有り、細胞の生死判別に用いられている。染色後、蛍光を確認したことから樹脂内への試薬投入が可能であること、樹脂内へ固定したイーストの生存を確認した。

Fig. 11 Observation of culture of immobilized yeast cell (Growth medium: YPD Broth (5%), pH: 6.5, Dissolved oxygen: 4.2mL, Temperature: 30°C)

Fig. 12 Growth of culture yeast cell

Fig. 13 Fluorescent dyeing of immobilized yeast cell

3・3 He - Cd レーザとの比較

2.3 で述べたように、水銀ランプの光をミラーユニットで選択して用いる場合の樹脂の硬化範囲は最小で 7 μm だったが、近紫外域の波長のレーザを用いることで分解能の向上が可能である。我々は出力 3 mW、波長 325 nm の He - Cd レーザによる樹脂硬化分解能の向上を試みた。ENTG - 3800 を用い樹脂濃度 40% にて、水銀ランプと He - Cd レーザの硬化範囲の測定結果を図 14 に示す。He - Cd レーザ利用時の最小硬化範囲は直径 5 μm となり、直径で単純に比較すると水銀ランプ利用時の約 20% まで硬化分解能が向上した。しかし今回用いた波長のレーザは一般の対物レンズでは約 95% 吸収され、レンズに損傷などの悪影響を与えるため注意が必要である。

3.2 の単一細胞の局所反応実験では、水銀ランプでも実用上は差しつかえないレベルの特性を得ることができた。一般の蛍光顕微鏡の多くは水銀ランプを有しているため、コスト的に見ても提案手法は有効であることがわかった。

Fig. 14 Comparison of curing range of ENTG-3800 using He-Cd Laser and mercury lamp (Resin content: 40%)

4. まとめ

本論文では、単一細胞実験をマイクロチップ上で行うための細胞固定化手法を提案した。光硬化性樹脂と水銀ランプを用いて、単一細胞をチップ内の任意の場所へ固定することが可能となった。また、樹脂の液滴をマイクロツールとして用いた間接レーザマニピュレーションにより、大量のサンプルから目的の細胞を分離し、樹脂中に固定することが可能となった。固定した細胞の環境条件を変えることで単一細胞の局所反応評価が可能である。例として固定したイーストの長時間培養モニタリングと蛍光染色による生死判定を行い、(1) 固定したイーストが増殖すること、(2) 樹脂内のイーストへの試薬導入が可能であること、(3) 固定したイーストが生存していることを確認した。

提案手法により、任意の個数の細胞あるいは異種細胞間の反応を観察したり、活動空間の大きさを変えて細胞活性の変化を調査することが可能であり、複合微生物系の解析・評価への応用が期待できる。また、本手法は細胞固定の手順が簡便なため、チップ内部でのその場光造形が容易に行える⁽²⁾。これに関しては別の機会に報告する予定である。

謝辞

本研究は科学技術振興機構さきがけ研究2-1の研究成果の一部である。関係各位に感謝する。

文献

- (1) N. Szita, A. Zanzotto, P. Boccazzi, A. J. Sinskey, M. A. Schmidt, K. F. Jensen, MONITORING OF CELL GROWTH, OXYGEN AND pH IN MICROFERMENTORS, Proc. of Micro Total Analysis System, Nara, Japan, 2002, pp. 7-9
- (2) A. Fuchs, A MICROELECTRONIC CHIP OPENS NEW FIELDS IN RARE CELL POPULATION ANALYSIS AND INDIVIDUAL CELL BIOLOGY, Proc. Micro Total Analysis System, California, USA, 2003, pp. 911-914
- (3) Katsuragi, T., Tani, Y., Review: Single-cell sorting of microorganisms by flow or slide-based (including laser scanning) cytometry, *Acta Biotechnol.*, 2001, 21, pp. 99-115
- (4) M. R. Melamed, T. Lindmo, and M. L. Mendelsohn, *Fow Cytometry and Sorting*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1991
- (5) Fuhr, G., Hagedorn, R., Mueller, T., Wagner, B., and Benecke, W., Linear motion of dielectric particles and living cells in microfabricated structures induced by traveling electric fields, *Proc. of IEEE Micro Electro Mechanical Systems*, 1991, pp. 259-264
- (6) Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria, *Science*, 1986, 235, pp. 1517-1520
- (7) Pohl, H. A., *Dielectrophoresis*, (1978), pp. 1-573, Cambridge University Press, Cambridge
- (8) Washizu, M., Manipulation of Biological Objects in Micromachined Structures, *Proc. IEEE Micro Electro. Mech. Systems*, (1992), pp. 196-201
- (9) F. Arai, A. Ichikawa, M. Ogawa, T. Fukuda, K. Horio, and K. Itoigawa, High Speed separation system of randomly suspended single living cells by laser trap and dielectrophoresis, *Electrophoresis*, 2001, 22, pp. 283-288
- (10) Arai, F., Maruyama, H., Sakami, T., Ichikawa, A., Fukuda, T., Pinpoint injection of microtools for minimally invasive micromanipulation of microbe by laser trap, *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, 2003, 8, pp. 3-9
- (11) F. Arai, T. Sakami, K. Yosikawa, H. Maruyama, T. Fukuda, Proc. of the 2003 IEEE/RSJ Intl. Conference on Intelligent Robots and Systems, 2003, pp. 2121-2126
- (12) F. Arai, A. Ichikawa, T. Fukuda and T. Katsuragi, Isolation and extraction of target microbes using thermal sol-gel transformation, *Analyst*, 2003, 128, 547-551
- (13) I. Inoue, Y. Wakamoto, H. Moriguchi, K. Okano, K. Yasuda, On-chip culture system for observation of isolated individual cells, *Lab-on-a-Chip*, 2001, 1, 50-55
- (14) S. Uehara, Y. Wakamoto, I. Inoue, K. Yasuda, On-chip single cell microcultivation assay for monitoring environmental effects on isolated cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305, 534-540
- (15) F. Arai, H. Maruyama, T. Fukuda, T. Katsuragi, FIXATION OF MICROORGANISMS FOR INVESTIGATION OF THEIR PROPERTIES ON CHIP, Proc. of Micro Total Analysis System, California, USA, 2003, pp. 21-24
- (16) Delamarche, E., Bernard, A., Schmid, H., Michel, B., and Biebuyck, H., Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks, *Science*, 1997, 276, 779-781.
- (17) Effenhauser, C. S., Bruin, G. J. M., Paulus, A., and Ehrat, M., Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: Analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 3451-3457.
- (18) Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., and Whitesides, G. M., Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4974-4984.
- (19) Ng, J. M. K., Gitlin, I., Stroock, A. D., Whitesides, G. M., Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems, *Electrophoresis*, 2002, 23, 3461-3473.
- (20) K. Hosokawa and R. Maeda, A pneumatically-actuated three-way microvalve fabricated with polydimethylsiloxane using the membrane transfer technique, *J. Micromech. Microeng.*, 10, 2000, pp. 415-420
- (21) 市川明彦, 新井史人, 丸山央峰, 福田敏男, 桂樹徹, オンチップ微生物培養システムに関する研究, 第8回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 早大, 2003-11, p.51