セミクローズド・マイクロチップによるプローブ操作を用いた
単一細胞解析への応用*竹内 大^{*1}, 中島正博^{*2}, 福田敏男^{*3}Semi-Closed Microchip for Probe Manipulation and
Its Application for Single Cell AnalysisMasaru TAKEUCHI, Masahiro NAKAJIMA^{*4} and Toshio FUKUDA^{*4} Department of Micro-Nano Systems Engineering, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi, 464-8603 Japan

In this paper, we propose a semi-closed microchip which can realize the probe type manipulation in the microchip. The semi-closed microchip has a bath in the middle of microchannel to allow the insertion of micropipettes into the microchip. The bath is sealed off by thin oil film to prevent the evaporation of the solution in the bath. The seal by the oil film can maintain even if micropipettes are inserted into the bath and pulled out from the bath. The seal by the oil film was evaluated by measuring the weight of the bath after 12/24 hours. To use the semi-closed microchip for cell culture and cell analysis, the exchange of the solution in the semi-closed microchip was demonstrated. The cell fixation with the thermo sensitive gel was also demonstrated by fabricating the ITO electrodes as heaters in the bath. Cell culture and the target cell harvesting were conducted by the semi-closed microchip. The proposed semi-closed microchip can be used for cell culture, cell analysis and cell harvesting under a microscope as the biological applications for single cell analysis.

Key Words: Micro-Mechanism, Biological Engineering, Semi-Closed Microchip, Micropipette, Single Cell Analysis, Oil Film

1. 緒 言

近年, 細胞解析がバイオ産業の発展と共に注目を集めるようになってきている. 特に, 個々の細胞に対して詳細な情報を得ることができる単一細胞解析は大きな注目を集めている^{(1)~(2)}.

従来行われてきた単一細胞解析としては, シャーレのようなオープンな系に外部からプローブ型デバイスを挿入することにより行う方法と, マイクロチップのようなクローズドな系を用いて行う方法^{(3)~(4)}の2つに大きく分けることができる.

オープンな系ではプローブ型デバイスによる細胞操作や細胞周囲の環境制御が単一細胞解析における重要な技術の一つとして用いられている. 本技術により, 例えばプローブ型デバイスが狙った細胞のみの採取を行うことや⁽⁵⁾, 細胞をプローブ先端に固定して細胞の接着力を測定するなど⁽⁶⁾ 任意の細胞を操作することが行われてきた. オープンな系ではマニピュレータ

のエンドエフェクタとしてプローブ型デバイスを用いることが容易であるが, 溶液の蒸発による細胞周囲の環境変化が避けられず, 長時間に亘って安定した環境を維持することが必要な実験を行うことが困難である.

一方, クローズドな系では外部の環境による影響がオープンな系と比べて小さく, 長時間に亘る実験についても細胞周囲の環境を安定して維持できる⁽⁷⁾. クローズドな系では内部環境が外部から完全に遮断されており, プローブ型デバイスをクローズドな系の内部に挿入して使用することは困難であるため, クローズドな系では非接触の細胞操作技術が用いられている. 例えばレーザトラップ^{(8)~(9)}や流体力^{(10)~(11)}などが挙げられる. しかし, レーザトラップは任意の単一細胞を容易に操作できる半面, 細胞に加えられる力が pN オーダーとプローブ型デバイスと比べ小さく, 卵細胞など 100 μm 以上の比較的大きな細胞を操作することが困難である. また, 流体力では大きな力を細胞に加えられる半面, 任意の単一細胞を操作するためには予め複雑な流路を設けておくことが必要など困難な場合がある. そのため, クローズドな系を保ちながらプローブ型デバイスの使用が可能な新たなデバイスが必要とされている.

* 原稿受付 2009年4月13日.

^{*1} 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} 正員, 名古屋大学大学院工学研究科.^{*3} 正員, フェロー, 名古屋大学大学院工学研究科.

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

Fig. 1 A schematic of the concept of the semi-closed microchip

そこで、本論文ではセミクロード・マイクロチップを提案する。これは油膜により溶液の蒸発を防ぐことで、プローブ型デバイスをマイクロチップ内部で操作でき、かつプローブを取り出した後もシーリングを保持できる新たなマイクロチップである。このセミクロード・マイクロチップを用いることにより、通常のマイクロチップと同様のクロードな系を保持し、細胞の培養など長時間に亘る実験を行いながらプローブ型デバイスによる単一細胞操作・解析を行うことが可能となる。図1にセミクロード・マイクロチップのコンセプト図を示す。

本稿では、油膜によるシーリングを実現したセミクロード・マイクロチップを提案する。この形状及び作製方法について述べ、安定したシーリングのための油膜厚の制御、油膜によるシーリングの評価について示す。また、セミクロード・マイクロチップ内で細胞を培養するための溶液置換及び感熱ゲルによる細胞固定について述べる。最後にセミクロード・マイクロチップを用いてイースト菌を固定、培養しマイクロピペットにより培養した細胞の採取実験について記す。

2. セミクロード・マイクロチップ

2.1 コンセプト 本稿で提案するセミクロード・マイクロチップを用いることにより、プローブ型デバイスをマイクロチップのシーリングを保持したまま用いることが可能となる。溶液の蒸発を防ぐ方法として、本稿で提案するセミクロード・マイクロチップでは油膜（流動パラフィン：密度（20℃）0.815~0.840 g/ml, Wako Pure Chemical Industries, Ltd）によるシーリングを用いている。

マイラーフィルムのように固体を用いてシーリングを行うのではなく⁽¹²⁾、油膜のように液体を用いてシーリングを行う利点は大きく2つ挙げることが出来る。第一にプローブの動作を制限することがなく、プロー

Fig. 2 A design of the semi-closed microchip

Fig. 3 Fabrication procedure of the semi-closed microchip (a) Make the positive relief of microchannels by photoresist. (b) Put the cylinder on the silicon wafer at the position of the bath. (c) The negative relief of PDMS was formed. (d) PDMS and glass substrate were sealed together.

ブのより広い動作範囲を実現できる点である。第二に、表面張力により穴が自然に塞がるため、プローブが取り出された後もシーリングを保持できる点である。

以上の理由より、本論文では液体である油によるシーリングを用いている。

2.2 セミクロード・マイクロチップの作製 セミクロード・マイクロチップの形状を図2に示す。このチップにはプローブ型デバイスをチップ内で使用可能にするため、マイクロ流路の中間部分に液槽を設けている。この液槽を油膜によりシーリングすることで、液槽内の溶液の蒸発を防ぐことが可能となり、通常のマイクロチップと同等のクロードな空間を保ちつつプローブ型デバイスを液槽内に挿入し、用いる。

セミクロード・マイクロチップの作製はソフトリソグラフィ技術を基にしている。図3にセミクロード・マイクロチップの作製過程を示す。まず、フォトリソグラフィーによってシリコンウエハ上にマイクロ流路（幅 500 μm, 高さ 100 μm）のパターンを施し鋳型とする。また、液槽の鋳型として円筒（直径 24 mm）をマイクロ流路のパターンが施されたシリコンウエハ

Fig. 4 Side views of the bath (a) The surface of the bath is hydrophobic condition (b) The surface of the bath is hydrophilic condition (c) The surface of the bath is hydrophilic condition as high as the water level

の液槽の位置に置く．Polydimethylsiloxane (PDMS) (SILPOT 184 W/C, Dow Corning Toray) をこのシリコンウエハ上に流し込み、硬化させ、最後にガラス基板と接着させる．

2・3 油膜厚の制御 液槽の安定したシーリングのためには油膜の形状が重要な要素となる．油膜の膜厚は液槽表面の親水・疎水性に依存する．本研究では液槽表面の親水・疎水を変化させることで膜厚の制御を行った．表面の疎水性（純水の接触角：約 90° ）から親水性（純水の接触角：約 14° ）への変化はプラズマイオンボンバーダ（PIB-10, Vaccum Device）を用いた．

図 4(a)に親水化処理を行わず、液槽表面が PDMS そのものの性質である疎水性の場合の油膜厚の断面図及び液槽側面からの写真を示す．この場合、油は壁面底面まで達しており、チップの流路を塞いでしまう．また、液槽中心部分での油膜の膜厚は非常に薄くこの状態では安定したシーリングが困難であると考えられる．

図 4(b)に液槽表面全体を親水性にした場合の油膜厚を示す．この場合、油膜の端が液槽表面に付着せず水面が外気に晒されて溶液の蒸発を防ぐことが出来ない．

そのため、液槽の底面から水面高さ（液槽に入れた水の体積を液槽の底面積で割った値）までを親水性に変化させた．この場合の油膜厚を図 4(c)に示す．この場合、油膜の端が液槽表面まで達し水面全体を覆っており、液槽がシーリングされていると考えられる．また、膜厚もほぼ均一（厚さ最大約 1.2 mm、最小約 1.0 mm）となり、安定したシーリングが可能と考えられる．

2・4 油膜によるシーリングの評価 油膜による液槽のシーリングの有効性を評価するため、図 5 に示すように水のみ、油のみ、油膜を張った水の 3 種類の液槽を用意した．また、マイクロピペットが液槽内に挿入された場合を想定し、図 6 のように上記の 3 種類の液槽それぞれについて中にガラス管（外径 1 mm、内径 0.6 mm）を挿した液槽も用意した．このとき、ガラス管には親水化などの処理は行っていない．これら計 6 種類の液槽それぞれについて 12 時間後、24 時間後の

Fig. 5 Cross-sections of the baths to evaluate the liquids evaporation

Fig. 6 Cross-sections of the baths with a glass tube

Table 1 Experimental conditions of evaluating the liquids evaporation

Condition	Volume of water [μ l]	Volume of oil [μ l]
Oil	0	600
Water	600	0
Water sealed by oil	600	700

Table 2 Evaluation of the liquids evaporation after 12 and 24 hours

Condition		Liquids evaporation [wt%]	
		After 12h	After 24h
Without a glass tube	Oil	0.0	0.0
	Water	71.8	100.0
	Water sealed by oil	0.0	0.0
With a glass tube	Oil	0.0	0.0
	Water	72.0	93.9
	Water sealed by oil	0.0	0.0

液槽重量を測定し、液槽の重量変化を求めた．なお、実験は室温（温度約 25°C 、湿度約 40 %）で行った．

各液槽に入れた水及び油の量を表 1 に示す．この量はガラス管の有無によらず共通である．各条件の液槽について 12、24 時間後の液槽の重量を測定し、蒸発した液体の重量割合を求めた．その結果を表 2 に示す．

表 2 より、水のみが入った液槽では 24 時間後にはほぼ全ての水が蒸発し無くなっていることが分かる．一方、油膜を張ったものではガラス管の有無に関わらず 24

Fig. 7 A schematic of the experimental set-up of the solution displacement

時間経過後も重量が変化していない。この結果より、油膜による液槽のシーリングはマイクロピペットが液槽内に挿入された場合でも保持されることが分かった。

3. 液槽内の溶液置換

液槽内の溶液の置換は、液槽内で細胞の培養や解析を行う際に重要な要素である。そこで、油膜を張った状態（油量約 500 μl 、油膜厚約 1.1 mm）で液槽内の溶液の置換実験を行った。実験は図 7 のようにセミクロード・マイクロチップの流路入口と出口に重力を用いてそれぞれ正圧、負圧を印加することで行った。このとき、正圧、負圧共に約 1.3 kPa となる。コンゴーレッド (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) により赤色に染色した水を予め液槽内に入れておき、無色の水へ置換したときの色の変化を観測する実験を 3 回行った。

図 8 に実験結果を示す。また、図 9 に画像処理ソフト (Image J) を用いて、画像を一定の閾値で二値化した結果を示す。これより、液槽全体の底面積に対して溶液が置換された面積の割合を求めた。図 10 に示す結果より、約 5 分で 80% 以上の溶液が置換されていることが分かる。また、溶液の置換中及び置換後に油膜の破れ、流出は観察されなかった。よって、液槽のシーリングを保持したまま中の溶液を異なる試薬や培養液に置換し、細胞の培養、解析をセミクロード・マイクロチップにより行うことが可能であると考えられる。

4. 感熱ゲルによる細胞固定

4・1 ITO 電極の作製 第 3 章で示したように、液槽内での溶液を置換する際には液槽内にある細胞等の観察対象が流されてしまうことが無いよう、細胞を固定しておくことが必要となる。また、安定した観察のためにはセミクロード・マイクロチップ内で細胞を固定した状態のまま培養が可能であることが必要である。そのため、本稿では温度依存性のゾル・ゲル変化を示す poly-(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) 溶液を用い細胞の固定を行った⁽¹³⁾。ここで、PNIPAAm 溶液がゲル化する温度は 32°C 以上と高くなく、細胞が生存可能な温度である。

Fig. 8 Photographs of the exchange of the solution in the bath (a) Before the exchange, (b) 1 min, (c) 2 min, (d) 3 min, (e) 5 min, (f) 10 minutes after the start of the exchange.

Fig. 9 Binarized image of the bath (a) Before the exchange, (b) 1 min, (c) 2 min, (d) 3 min, (e) 5 min, (f) 10 minutes after the start of the exchange.

Fig. 10 Experimental results of the solution exchange

PNIPAAm 溶液をゲル化させるためのヒータとして、本稿ではフォトリソグラフィー技術を用いて Indium Tin Oxide (ITO) 電極を作製し、用いた。ITO 電極作製のために用いたフォトリソグラフィー用マスクデザインを図 11 に示す。また、ITO 電極の作製過程を図 12 に示す。図 11 のように、電極は一つのセミクロード・マイクロチップに対し 3 つ作製し、PNIPAAm 溶液をゲル化させる領域を変え局所的な細胞固定ができるようにした。図 13 に ITO 電極を作製したセミクロード・マイクロチップと電極部分の拡大写真を示す。

作製した電極を用い、液槽に入れた PNIPAAm の 10 wt% 溶液をゲル化させる実験を行った。図 14 に中央の ITO 電極に電圧を印加した時の様子を示す。印加電圧を上げると電極付近が不透明になり、顕微鏡下でゲル化した部分を容易に観察することができる（このときの電極温度：約 35°C⁽¹⁴⁾）。これより、中央電極近傍

Fig. 11 Mask design for the ITO electrodes

Fig. 12 Fabrication procedure of the ITO electrodes (a) Resist coating (b) Masking (c) Mask development (d) Etching of the ITO

の溶液のみのゲル化が可能であると分かる。また、電圧の印加を止めると PNIPAAm は数秒でゲルからゾルへと変化し、電圧印加前の状態に戻った。

4・2 ゲルによる細胞固定 作製した ITO 電極を用い、PNIPAAm 溶液のゲル化によってイースト菌を固定する実験を行った。まず、液槽に 10 wt% の PNIPAAm 溶液を入れ、そこにイースト菌を分散させた。油膜 (油量約 500 μ l, 膜厚約 1.1 mm) を張った後、ITO 電極に電圧を印加することにより電極付近にある狙った細胞を固定した。図 15 にイースト菌をゲルにより固定した様子を示す。このように、感熱ゲルが細胞の周囲を取り囲んでいることが確認できる。また、液槽内に流れを加えると、固定されていない細胞は流されてしまうが、図 15 のように感熱ゲルに囲まれている細胞は流されなかった。これより、感熱ゲルを用いることでイースト菌を局所的に固定することに成功した。

5. 液槽内での細胞培養

セミクロード・マイクロチップ内で細胞を PNIPAAm ゲルにより固定した後、液槽内部の溶液を第 3 章に示した方法により PNIPAAm 溶液から酵母エキス (Nacalai tesque) 1%, ペプトン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) 2%, D(+)-グルコース (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) 2% よりなる培養液 (YPD 培養液) に置換し、イースト菌を液槽内で培養する実験を行った。溶液置換後、PNIPAAm ゲルにより固定したイースト菌を 1 時間培養した。

図 16 に実験結果を示す。ここに示すように、PNIPAAm ゲルで固定したイースト菌が分裂する様子が確認された。また、培養後の細胞の生存確認のため、CFDA (5-(and-6)-Carboxyfluorescein diacetate) (AnaSpec,

Fig. 13 Photographs of the fabricated ITO electrodes

Fig. 14 Photographs of the ITO electrodes (a) Applying 0 V (b) Applying 7.2 V to the center electrode

Fig. 15 Photographs of the cell fixation (a) Before the fixation (b) After the fixation

Fig. 16 Photographs of the cell culture (a) Before the culture (b) After 30 minutes (c) After 1 hour

Fig. 17 Photographs of the yeast cell (a) Before staining (b) After staining by the CFDA

Inc.) を用いた。これは生細胞を染色する蛍光プローブである。CFDA による染色を行うため、培養後に液槽内の溶液を 3.4 mM CFDA を 50 μ l 入れた YPD 培養液へと置換した。30 分後、図 17 (b) に示すように CFDA により染色された細胞が蛍光を発する様子を確認した。これより、液槽内で PNIPAAm ゲルにより細胞を固定したまま培養を行うことが可能であることが分かった。

6. マイクロピペットによる細胞採取

マイクロピペットをマニピュレータによって操作することにより、セミクロード・マイクロチップ内において感熱ゲルで固定したイースト菌を採取する実験を行った。マイクロピペット (外径約 17 μ m, 内径約 15 μ m) はホウケイ酸塩ガラス管 (外形 1 mm, 内径 0.6 mm; GD-1, Narishige) をプーラー (PC-10, Narishige) で熱を与えながら、荷重を加えて引き延ばすことにより作製した。図 18 に実験システムの概略図を示す。

図 19 に実験結果を示す。ここに示すように、マイクロピペット操作により感熱ゲルで固定したイースト菌を狙ったもののみ採取することに成功した。マイクロピペットを液槽内で操作しているとき、及び液槽から取り出したときについても油膜は保持されていた。また、マイクロピペットを挿入したことによる培地への油の混入は観察されなかった。

以上の結果より、セミクロード・マイクロチップを用いることで、細胞培養、細胞解析を行った後に狙った細胞のみを顕微鏡下でマイクロピペットを用いて採取することが可能であると考えられる。

7. 結 言

本稿では、マイクロチップ内部でのプローブ型デバイスの使用を可能としたセミクロード・マイクロチップを提案した。シーリングにおいて重要な油膜は液槽表面の親水・疎水性を制御することで、より均一な油膜厚さを実現した。また、油膜によるシーリングが有効であることを時間経過に対する液槽重量を測定することにより評価した。

セミクロード・マイクロチップ内での細胞培養、細胞解析を実現するため液槽内の溶液を置換する実験を行い、油膜によるシーリングを保持したままでの溶液置換を実現した。さらに、安定した細胞観察のため感熱ゲルで細胞を固定し、細胞培養後狙った細胞のみをマイクロピペットにより採取することに成功した。

本稿で提案したセミクロード・マイクロチップを用いることにより、細胞培養、細胞解析、細胞採取を様々な培養条件、培養時間に対して連続的に行うことが可能となり、単一細胞操作・解析技術としての応用が可能であると考えられる。

文 献

- (1) Y. Wakamoto, J. Ramsden and K. Yasuda, Single-cell growth and division dynamics showing epigenetic correlations, *Analyst*, Vol. 130, (2005), pp. 311-317.
- (2) G. T. Roman, Y. Chen, P. Viberg, A. H. Culbertson and C. T. Culbertson, Single-cell manipulation and analysis using microfluidic devices, *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 387, (2007), pp. 9-12.
- (3) X. Li and P. C. H. Li, Microfluidic selection and retention of a single cardiac myocyte, on-chip dye loading, cell contraction by chemical stimulation, and quantitative fluorescent analysis of intracellular calcium, *Anal. Chem.*, Vol. 77, (2005), pp. 4315-4322.
- (4) H. Morgan, D. Holmes and N. G. Green, High speed simultaneous single particle impedance and fluorescence analysis on a chip, *Current Appl. Phys.*, Vol. 6, (2006), pp. 367-370.
- (5) H. Takamatsu, S. Uchida and T. Matsuda, In situ harvesting of adhered target cells using

Fig. 18 Experimental System of the cell harvesting

Fig. 19 Experimental results of the cell harvesting (a) Before harvesting (b) Positioning of the micropipette (c) During the harvesting (d) After harvesting

- thermo-responsive substrate under a microscope: Principle and instrumentation, *J. Biotech.*, Vol. 134, (2008), pp. 297-304.
- (6) P. H. Tsang, G. Li, Y. V. Brun, L. B. Freund and J. X. Tang, Adhesion of single bacterial cells in the micronewton range, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 103, (2006), pp. 5764-5768.
- (7) T. M. Squires and S. R. Quake, Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale, *Rev. Modern Phys.*, Vol. 77, (2005), pp. 977-1026.
- (8) S. Maruo, K. Ikuta and H. Korogi, Submicron manipulation tools driven by light in a liquid, *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 82, (2003), pp. 133-135.
- (9) A. D. Lucio, R. A. S. Santos and O. N. Mesquita, Measurements and modeling of water transport and osmoregulation in a single kidney cell using optical tweezers and videomicroscopy, *Phys. Rev. E*, Vol. 68, (2003), pp. 041906-1 - 041906-6.
- (10) Y. Sun and X. F. Yin, Novel multi-depth microfluidic chip for single cell analysis, *J. chromatography A*, (2006), Vol. 1117, pp. 228-233.
- (11) E. A. Schilling, A. E. Kamholz and P. Yager, Cell lysis and protein extraction in a microfluidic device with detection by a fluorogenic enzyme assay, *Anal. Chem.*, (2002), Vol. 74, pp. 1798-1804.
- (12) M. Salierno, R. Cabrera, O. Filevich and R. Etchenique, Encapsulated Petri dish system for single-cell drug delivery and long-term time lapse microscopy, *Anal. Biochem.*, Vol. 371, (2007), pp. 208-214.
- (13) A. Ichikawa, F. Arai, K. Yoshikawa, T. Uchida and T. Fukuda, In situ formation of a gel microbead for indirect laser micromanipulation of microorganisms, *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 87, (2005), pp. 191108-1 - 191108-3.
- (14) Y. Yamanishi, E. Chow, J. Teramoto, Y. Magariyama, A. Ishihama, T. Fukuda and F. Arai, On-chip temperature sensing and control for cell immobilization and culture system, *Proc. 2008 Int'l Symp. Micro-NanoMechatronics and Human Sci.*, (2008), pp. 295-300.