

令和元年9月6日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04301

研究課題名(和文) トップダウン・ボトムアップ統合オンチップ細胞計測システム

研究課題名(英文) On-chip Cell Measurement System with Top-down and Bottom-up Integration Approach

研究代表者

丸山 央峰 (Maruyama, Hisataka)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60377843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、トップダウン・ボトムアップ的アプローチを統合したオンチップ細胞解析システムとして、1) 光局所加熱による超高速細胞内導入を用いたボトムアップ細胞計測として、1064 nmおよび808 nmの異なる波長の赤外光を用いた蛍光センサの光操作および光加熱による細胞導入法の実現、2) トップダウン細胞計測に用いる蛍光センサの計測寿命延長のための、ハイドロゲル内の蛍光色素の拡散現象を用いた蛍光回復を用いた長寿命なハイドロゲル光環境センサの計測方法を用いて1000回以上の蛍光環境計測の実現、といった光計測法を用いたオンチップ細胞計測に必要な基盤技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、オンチップで操作可能な蛍光センサとチップ内に集積した蛍光センサアレイにより、細胞培養、環境制御、光ピンセットによる単一ウイルスの特定細胞への感染、細胞内局所計測、細胞集団計測に至るまでの一連の細胞解析プロセスをオンチップで行う点にある。一貫してオンチップで行うことで外乱の影響を受けにくくできる特徴がある。将来、ウイルス増殖を予防する新薬等の新たな診断・治療法に関する知見が得られる可能性があり、医療技術の発展にも貢献でき世界的に大きなインパクトとなり、生物科学との学際領域におけるブレイクスルーが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, as an on-chip cell measurement system integrating top-down and bottom-up approach, 1) Manipulation and cell injection of single fluorescence microsensor using multiple wavelength lights of 1064 nm and 808 nm as bottom-up cell measurement, 2) Long-term fluorescence measurement using hydrogel fluorescence microsensor by diffusion phenomenon of fluorescent dye in hydrogel as a top-down approach of cell measurement, were achieved. We established the basic technologies for on-chip cell measurement using an optical measurement method, such as rapid and selective cell injection of fluorescence microsensor for intracellular measurement and extremely long measurement more than 1000 times using hydrogel fluorescence microsensor with fluorescence recovery in the sensor.

研究分野：マイクロ・ナノロボティクス

キーワード：ナノマイクロメカトロニクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物科学における学術的背景を述べる。インフルエンザウイルスは、細胞膜に付着すると細胞のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、膜融合により核近傍で RNP を放出する。放出された RNP は細胞質から核へマイクロチューブを經由して運ばれる。ウイルス RNA ポリメラーゼによるウイルス RNA ゲノムの転写と複製は、核内において核機能に依存して進行する。ウイルス増殖は細胞の RNA ゲノムの転写活性と強い相関があると考えられるが、転写活性に差のある不均一細胞集団を利用した実験では定量的解析が困難で推測の域を出てない。これまで、ウイルス増殖に関する解析は、ディッシュ上に培養した細胞にウイルスを播種し、一定時間経過後に細胞を回収し、ウイルスの遺伝子を PCR により増幅し解析することで行われてきた。しかしながら、実際に単一のウイルスに感染した特定の細胞の生理状態変化については計測されてこなかった。つまり、従来のウイルスの増殖に伴う細胞の状態変化、例えばウイルス増殖に伴う細胞レベルでの温度上昇については、生化学実験を用いた間接的な結果に基づく推定の域を脱していなかった。このため、研究代表者の丸山と連携研究者の新井、本田は、CREST (H20-H25) において、光ピンセットを用いた単一ウイルスの搬送と特定細胞への感染、およびウイルス感染細胞の生理状態計測に関する研究を行ってきた。これまでに、単一ウイルスの特定細胞への感染と、単一ウイルスが感染した細胞表面の温度変化をマイクロ蛍光センサにより計測し、その結果が生化学解析による ATP 消費量から推定した温度変化がほぼ一致することを明らかにした世界初の画期的な成果を挙げている。

2. 研究の目的

本研究は、これらの成果をさらに発展させ、ウイルス感染細胞の細胞質内および核内に蛍光センサを導入し、ウイルス増殖に伴う細胞の生理状態変化を計測する。これまで明らかにされてこなかった、核内でのウイルス増殖部位の特定を、ウイルス複製時に起こる ATP 消費による温度上昇に着目し、核内に温度センサビーズを導入し温度変化分布を計測することでウイルス増殖が活発な部位を特定することを目的とする。また、増殖したウイルスは細胞外に放出され周囲の細胞に再び感染し、増殖を繰り返す。この細胞間感染の時間的拡大や細胞集団の生理状態変化を、マイクロ流体チップ内に集積したマルチ蛍光センサアレイを用いて、細胞表面における温度、pH、酸素濃度、カルシウムイオン濃度を計測することで明らかにし、細胞内計測と組み合わせることで、ウイルス増殖過程に関する新しい知見を得て、生物科学の発展に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 異なる波長の赤外光を用いた光操作・光加熱による蛍光センサの細胞導入

図1に波長選択的なレーザー加熱による蛍光環境センサの細胞内導入の概念図を示す。培養環境中に導入された蛍光環境センサを、図2に示す共焦点蛍光観察が可能なレーザーマニピュレーションシステムを用い、1064 nm レーザを用いた光ピンセット操作による細胞膜への搬送後、細胞膜上で 808 nm のレーザー照射により蛍光センサを加熱し細胞質内へ導入する。この導入プロセスは全てレーザーを用いた非接触操作であり、マイクロ流体チップのような閉鎖系でも使用可能である。蛍光環境センサは、直径 1 μm のポリスチレンビーズに、温度感受性を有する蛍光色素の Rhodamine B (蛍光波長 580 nm)、808 nm の光を選択的に吸収する近赤外吸収剤の FDN-002 (山田化学工業) で導入することで作製する。ポリスチレンビーズの屈折率は 1.6 と水 (屈折率: 1.3) より高いため、1064 nm のレーザーで光ピンセットによる操作が可能である。蛍光計測は、488 nm の励起光を行い、580 nm の蛍光を CCD で計測する。

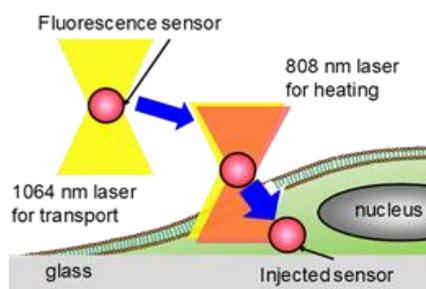


図1 蛍光センサの細胞内導入の概要

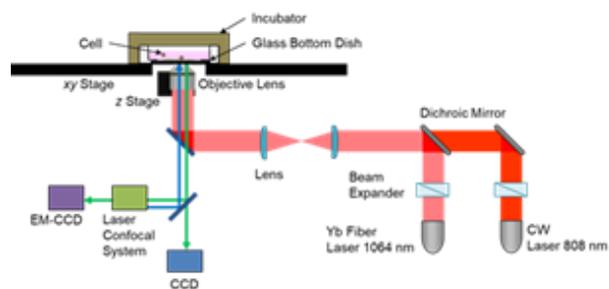


図2 実験システム

蛍光環境センサの作製プロセスを示す。

1. FDN-002 と Rhodamine B がそれぞれ 1mg/ml となるように Dimethyl sulfoxide 溶液の染色液を調整する。
2. 1 μl のアミノ基付きマイクロビーズ 100 μm を 1. で作製した溶液 1 ml に加える。
3. 2. で作製した溶液 0.5 ml を 1 ml のマイクロチューブに入れ、0.5 ml の脱イオン水を加え 1 時間静置する。

4. 遠心分離を 15000rpm で 5 分間行い、上澄み液を除去する。
5. 4. の手順を 10 回繰り返し、センサの洗浄を行う。
作製したセンサを用いて光操作・光加熱による細胞導入を行う。

(2) 蛍光回復現象を利用した長寿命ハイドロゲル蛍光センサ

ハイドロゲル蛍光センサの蛍光回復の原理を説明する(図3)。本研究では内部で色素拡散可能なハイドロゲルを基剤としたマイクロビーズ型のセンサを作製する。このセンサに焦点深度の浅いレンズを用いて励起光を照射することで、センサの赤道面で蛍光を強く励起する。観測系ではこの赤道面の蛍光強度を計測する。励起光によりこの部分で蛍光色素が最も分解され蛍光強度が低下する。しかし計測後適切な時間間隔をあけることで、退色部の周囲にある未分解の蛍光色素が退色部へ拡散蛍光が回復する。

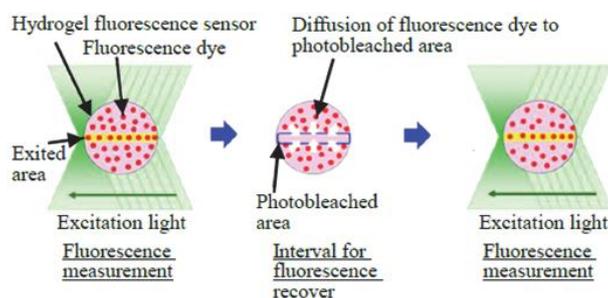


図3 蛍光回復の原理

センサの材料について述べる。ハイドロゲルとして水と生体適合性樹脂であり酸素透過性を有するポリエチレングリコール次ジクリレート (PEGDA) を、蛍光色素として酸素濃度に応じて蛍光強度の変化する $[Ru(bpi)_3]^{2+}$ を、重合開始剤として Omirad1173 (BASF) を用いた。続いてセンサの作製手順を述べる(図4)。まず、各材料を水 (910ml/l)、PEGDA (82 ml/l)、 $[Ru(bpi)_3]^{2+}$ (4g/l)、Omiraad 1173 (8 ml/l) で混合した。続いて、この混合液をミネラルオイル中で攪拌した。するとセンサ材料の混合液はオイル中で微細な液滴となった。ここへ紫外線を照射することで、ハイドロゲルを重合させ、液滴状のセンサ材料を硬化させた。その後遠心分離によりセンサを沈殿させ回収する。

このセンサを細胞内に導入、およびフォトログラフィで基板上に加工して用いる。

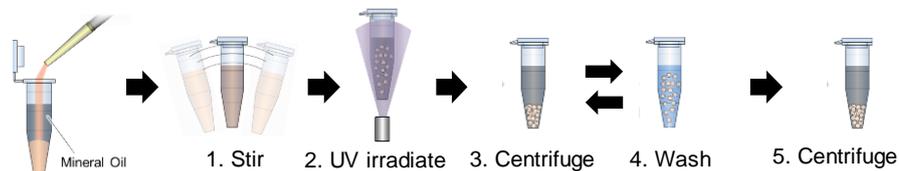


図4 ハイドロゲル蛍光センサの作製工程

4. 研究成果

(1) 異なる波長の赤外光を用いた光操作・光加熱による蛍光センサの細胞導入

図5 に作製した光環境センサの明視野および蛍光画像を示す。電気抵抗ナノパルス式の粒径分析器の qNANO を用いてセンサのサイズを計測したところ、図3(c)に示すように平均粒径 0.98 μm 、標準偏差 0.1 μm の粒径分布であった。

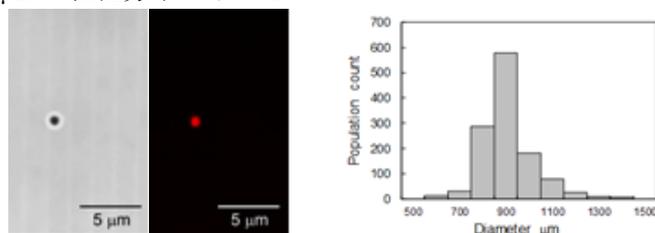


図5 作製した光環境センサ

作製した光環境センサの波長による吸収特性の違いを評価した結果を図4に示す。808nm レーザ照射時の光環境センサの加熱実験の結果を図6に示す。20 回目の計測時にレーザの照射を開始した。この光環境センサの温度感度は-1.4%と較正されており、その較正結果を用いて蛍光強度変化を温度変化に換算した。10 mW では温度上昇が確認できなかったが、40 mW においては、10 秒の加熱で約 15°C の温度上昇が確認された。実験環境は 37°C であり、従来研究で得られた細胞導入に必要な 50°C 以上への加熱が可能であることを確認した。

図7に1064 nm のレーザを用いて光環境センサを操作し、犬の腎臓細胞 (MDCK 細胞) の細胞膜上へ搬送した結果を示す。1064 nm および 808 nm のレーザ強度は、対物レンズを通過した後

で40mW になるように調整した. MDCK 細胞は, 生細胞内でエステラーゼ活性により加水分解され蛍光を発する Calcein-AM で染色している. 1064 nm のレーザによる細胞膜上へ光環境センサの搬送後, 808 nm のレーザを細胞へ照射することで光環境センサの加熱を行った. 光環境センサへの 808 nm のレーザ照射により, 細胞膜上の光環境センサの焦点が細胞膜より下に移動したことが確認された. 図 8 に 808 nm レーザによる光環境センサの加熱後に, 0.1 μm ピッチで細胞内のスライス画像を取得し, 細胞内の光環境センサを観察した結果を示す. 808 nm で加熱された光環境センサが細胞内に導入されているとともに, 導入された細胞の生存が確認され, 提案手法の有効性を確認した.

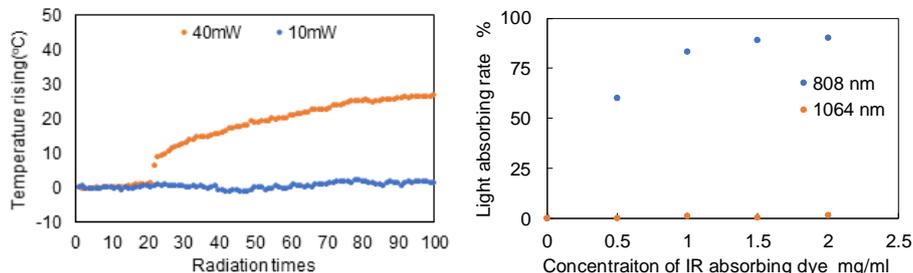


図 6 蛍光センサの光操作・光加熱

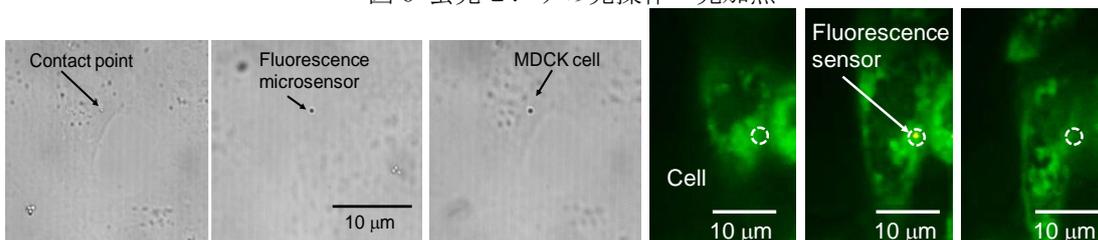


図 8 光操作・加熱による蛍光センサと細胞内導入と蛍光センサの細胞内観察

(2) 蛍光回復現象を利用した長寿命ハイドロゲル蛍光センサ

作製したセンサ (図 9) の蛍光強度と環境の酸素濃度の関係と, 作成したセンサに対し, 酸素濃度一定の環境下で繰り返し計測を行なった時の蛍光強度の変化を求める実験を行なった. まずセンサの蛍光強度と環境の酸素濃度の関係を求めた. 実験に用いた装置の構成を図 4 に示す. 実験では亜硫酸ナトリウムを用いて酸素濃度を調整した水中に作製したセンサを静置し, 蛍光強度を共焦点蛍光顕微鏡により計測した. 計測では波長 488 nm の励起光を 1 秒間照射し, 620 nm の蛍光強度を計測した. 照射した励起光の強度分布の光軸方向の半値全幅は 4.6 μm であり, 計測したセンサの直径 30 μm よりも小さい.

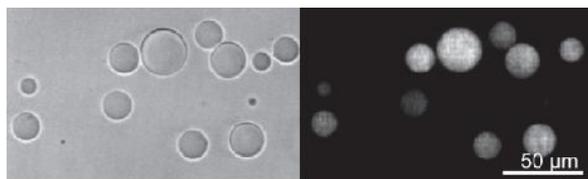


図 9 ハイドロゲル製蛍光センサ

この実験系を用いて環境の酸素濃度を 1 mg/l から 8 mg/l の範囲で 1 mg/l ずつ変化させ, 各酸素濃度での蛍光強度を計測した. 実験の結果を図 10 に示す. 図では酸素濃度 8 mg/l での蛍光強度が 1 となるよう縦軸を正規化している. 得られた結果を直線近似したところ, 近似直線の傾きは -0.047 であった. 従って作製したセンサの感度は環境の酸素濃度が 1 mg/l 上昇するごとに蛍光強度が 4.7%低下することがわかった. 酸素濃度一定の環境下で計測を繰り返した時のセンサの蛍光強度の変化を求めた. 実験系を用い, 大気開放した水中に静置したセンサの蛍光強度を 1 分間隔で 200 回繰り返し計測した. 図 11 に示した結果を直線近似した結果, その傾きは -3×10^{-5} であり従って作製したセンサは, 蛍光強度の低下が非常に小さい (200 回計測して 0.6%) ことがわかった.

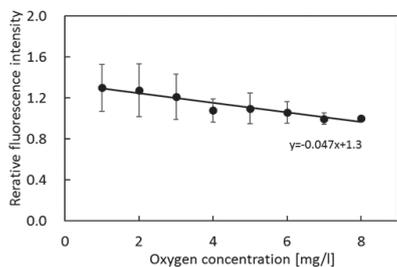


図 10 蛍光センサの酸素感受性評価

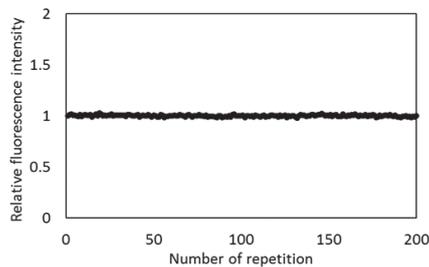


図 11 蛍光センサの繰り返し特性評価

このハイドロゲル光環境センサの機能を利用して、フォトリソグラフを用いトップダウン細胞計測用蛍光センサを搭載した細胞培養基板を作製した。蛍光環境センサを搭載した細胞培養基板の概念図を図 12 に示す。細胞培養基板は、カルシウムイオン濃度、pH、温度に感受性を有する蛍光色素を導入した親水性光硬化性樹脂のポリエチレングリコールジアクリレート (PEGDA) で作製した光環境センサを、細胞接着性を有するゼラチンでコーティングし細胞培養面を形成したものである。光環境センサは、OCP の HA への転換により生じる細胞培養環境変化の計測に用いる。OCP から HA への転換は、(1)加水分解、(2)溶解によるカルシウム吸収と再沈殿、により進行する。このため、計測するパラメータはカルシウムイオン濃度と pH とし、カルシウムイオン濃度計測に Fura-2 (励起波長: 360 nm, 蛍光波長 500 nm), pH 計測に FITC (励起波長: 488 nm, 蛍光波長 515 nm) を用いる。これらの色素は温度にも感受性を有するため、温度補償のために Rhodamine B (励起波長: 560 nm, 蛍光波長 580 nm) を用いる。以上の色素を導入した PEGDA を、ガラス基板上にフォトリソグラフィでピラー状にパターンニングし光環境センサアレイとする。光環境センサに細胞付着性を有するゼラチンをコートし細胞培養面とする。センサのサイズは 1 辺 10 μm の正方形を底面として高さ 20 μm のピラーとした。

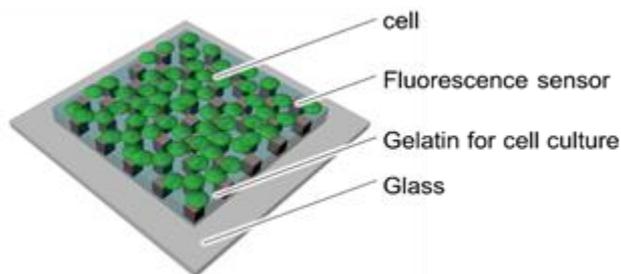


図 12 細胞培養基板の概念図

図 13 に光環境センサ搭載細胞培養基板, 図 14 に光環境センサの各励起光による蛍光画像を示す。光環境センサの材料は、PEGDA, Fura-2 溶液, FITC 溶液, Rhodamine B 溶液, 光開始剤, 純水を, 30 wt%, 5 wt%, 5 wt%, 5 wt%, 5 wt%, 50 wt% で混合したものを用いた。各蛍光試薬の蛍光強度変化と温度, pH, カルシウムイオン濃度について較正を行った。温度較正では, pH 7, カルシウムイオン濃度 0 nM の条件で, 32, 34, 36, 38 $^{\circ}\text{C}$ で較正した。pH 較正では, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$, カルシウムイオン濃度 0 nM の条件で, pH 6, 7, 8 で較正した。カルシウムイオン濃度較正では, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7 の条件で, カルシウムイオン濃度 0, 50, 100, 150 nM で較正した。較正結果を図 15 に示す。較正結果より, Rhodamine B は温度のみに感受性を示すため, FITC の温度感受性は Rhodamine B で, Fura-2 の pH 及び温度感受性は FITC 及び Rhodamine B で補償することで培養環境のマルチモーダル計測が可能となる。

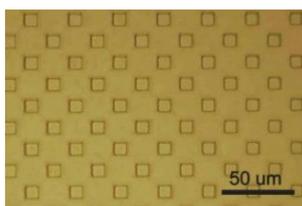


図 13 細胞培養基板

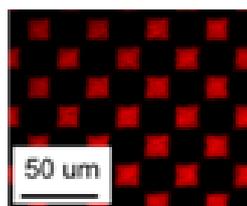
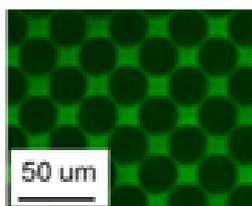
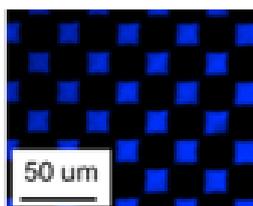


図 14 細胞培養基板の蛍光画像

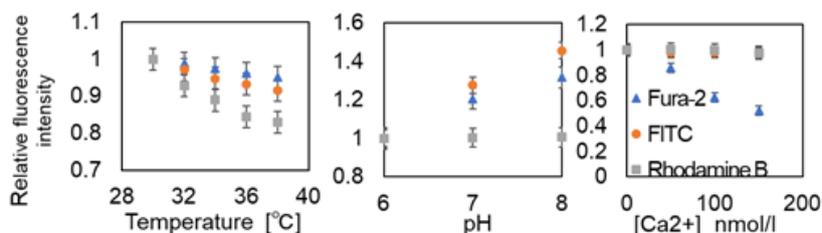


図 15 各蛍光センサの較正結果

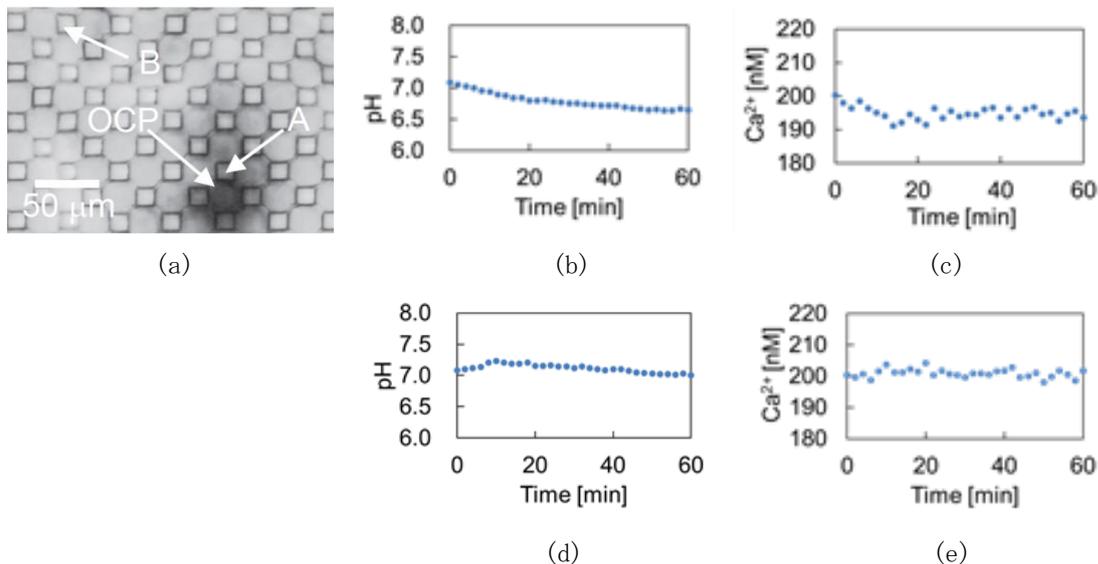


図 16 細胞培養基板上の局所環境変化計測結果 (a)培養基板上の OCP, (b) A 点の pH, (c) A 点のカルシウムイオン濃度, (d) B 点の pH, (e) B 点のカルシウムイオン濃度

細胞培養基板の上にスラリー状の OCP を設置し、37°C、pH7.1、カルシウムイオン濃度 200 nM の環境で、100 ppm のフッ素ナトリウム溶液を添加した際の環境計測結果を図 6 に示す。OCP 近傍と離れた位置での pH 及びカルシウムイオン濃度変化の違いが計測でき、局所環境計測が可能であることを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hairulazwan Hashim, Hisataka Maruyama, Taisuke Masuda, Fumihito Arai, Manipulation and Immobilization of a Single Fluorescence Nanosensor for Selective Injection into Cells, *Sensors*, 16(12), 2041, 2016.

[学会発表] (計 16 件)

1. Hisataka Maruyama, Seiji Omata, Taisuke Masuda, Fumihito Arai, Multimodal Measurement of Cell Culture Conditions using Hydrogel Culture Substrate having Fluorescence Microsensors, 2018 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2018.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：新井史人

ローマ字氏名：Fumihito Arai

研究協力者氏名：本田文江

ローマ字氏名：Ayae Honda

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。