

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18834

研究課題名(和文)光環境制御・計測が可能なマイクロ流体チップによる単一細胞解析システムへの挑戦

研究課題名(英文)Single cell analysis using microfluidic chip with optical manipulation and measurement

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、細胞内外の培養環境の計測を実現するため、蛍光回復により長期環境計測を実現するハイドロゲル光環境センサの作製では、蛍光を用いたセンサの課題である光退色を補償し、100回以上の計測が可能なセンサを作製した。ハイドロゲル光環境マイクロセンサのオンチップ作製では、マイクロ流体チップを用いて、前記のハイドロゲル光環境センサを $10 \pm 0.5 \mu\text{m}$ の範囲のサイズでの作製した。光操作・光刺激による蛍光マイクロセンサの選択的細胞導入では、異なる波長のレーザーを用いた光操作・光刺激により10秒の加熱で70%の成功率で低侵襲に細胞内へ光環境センサを導入した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内外の環境計測は、再生医療分野における細胞・組織の生理状態の可視化による好培養条件探索および刺激応答計測、インフルエンザウイルス等が感染したウイルス感染細胞内でのウイルス増殖を細胞状態を温度やpH、酸素濃度等をパラメータとして評価することで薬や治療法の対策等、等現在我々が直面している感染症への対策や、医療に関して大きな貢献が期待されるものである。

研究成果の概要(英文)：In this research, we conducted three projects. (1) A new method for the prolonged stable measurement of hydrogel fluorescence microsensors based on the measurement of fluorescence intensity was developed. Fluorescence recovery after photobleaching was used to compensate for the decrease in fluorescence intensity of microsensor. (2) The mass production method of the hydrogel fluorescence microsensor with uniformed size using a microfluidic chip was developed. Continuous fabrication of the hydrogel fluorescence microsensor of $10 \pm 0.5 \mu\text{m}$ was succeeded. (3) The manipulation and cell injection of a fluorescent microsensor using multiple wavelengths of light was developed. By using this method, manipulation and injection of the microsensor into Madin-Darby canine kidney cell using 1064-nm and 808-nm lasers were succeeded.

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

キーワード：マイクロセンサ 細胞・組織 非接触計測

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞・組織内外の環境計測に強い関心が寄せられている。例えば、図1に示すインフルエンザウイルスが人に感染すると、およそ48時間後に人体は高熱を発することが知られている。一方、細胞レベルでは、図2に示すようにウイルスに感染した細胞の細胞核内で数時間の内にウイルスゲノム由来のmRNAやタンパク質の産生が行われると同時に、増殖したウイルスが細胞外に放出され周辺の細胞への再感染が生じる。感染細胞でのウイルス増殖については集団細胞実験により多くの研究がなされているが、単一細胞レベルでの生理状態変化とウイルス増殖の関係に関する解析は十分に行われていない。

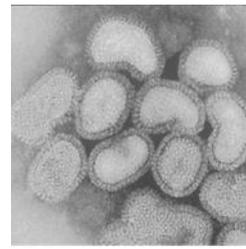


図1 インフルエンザウイルスの電子顕微鏡写真

細胞に依存して増殖するウイルスは、細胞の状態変化によりその増殖が抑制/誘導されると考えられている。細胞に加熱刺激を与えるとインフルエンザウイルスの増殖が抑制されるという報告がある一方、600 nm, 660 nm, 700 nm の光を感染細胞に照射することにより、ウイルス産生が増加する報告もなされている。このため「ウイルス感染細胞における細胞の生理状態とウイルス増殖の間にどのような相関関係があるか、細胞の生理状態を制御することでウイルス増殖を制御できるのではないか」という疑問をもった。しかし、この疑問の解決の前提となる細胞の生理状態計測と、ウイルス増殖との関連を定量的に評価することは困難であった。

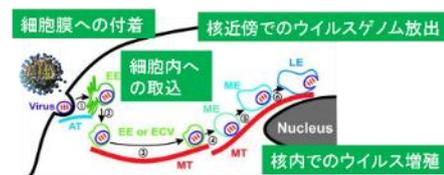


図2 インフルエンザウイルスの細胞感染・増殖メカニズム

本研究課題は、細胞に対して細胞内外の生理状態の計測結果に基づいて、ウイルス感染細胞におけるウイルス増殖の評価を可能とするための、細胞培養環境の温度や pH 等の環境計測を行うための光環境マイクロセンサの作製、光環境センサの光操作・光刺激技術を用いた細胞内導入について研究を行う。マイクロ流体チップ内に培養した細胞に対して光機能制御マイクロロボットを用いて、細胞表面及び内部の生理状態計測得られた知見を用い、光照射による細胞の機能変化により、細胞内のウイルス増殖を制御する技術基盤の確立への調整につなげる。

2. 研究の目的

上記の背景に基づいて、本研究課題では、細胞内外の培養環境計測を実現するため、細胞内外の環境の経時変化を非接触に計測可能な光環境マイクロセンサの作製、前記の光環境マイクロセンサの大量作製方法の開発、細胞内の環境計測のための光環境マイクロセンサの特定の細胞への選択的導入方法の実現に挑戦する。

上記の目的と達成するために以下の3つの項目について研究を行った。

研究項目1：蛍光回復により長期環境計測を実現するハイドロゲル光環境センサの作製

研究項目2：ハイドロゲル光環境マイクロセンサのオンチップ作製

研究項目3：光操作・光刺激による蛍光マイクロセンサの選択的細胞導入

3. 研究の方法

研究項目1：蛍光回復により長期環境計測を実現するハイドロゲル光環境マイクロセンサの作製

本研究項目では、低濃度のハイドロゲルで光環境マイクロセンサを作製し、計測時に適切な間隔をとることで、光環境マイクロセンサ内部での蛍光回復により蛍光色素の光退色を補償可能なセンサを作製する。

研究項目2：ハイドロゲル光環境マイクロセンサのオンチップ作製

本研究項目では、均一な粒径のハイドロゲル光環境センサを作製するため、マイクロ流体チップを用いた液滴作製技術を用いて、ハイドロゲル光環境センサの作製を行った。マイクロ流体チップで作製したハイドロゲル光環境センサについて、その粒径分布を従来の攪拌法で作製したセンサの粒径分布と比較を行う。

研究項目3：光操作・光刺激による蛍光マイクロセンサの選択的細胞導入

本研究項目では、細胞内に導入する光環境マイクロセンサとして、直径1 μ mのポリスチレンビーズに温度感受性の蛍光色素と808 nmの近赤外光を選択的吸収する色素を導入したセンサを作製し、1064 nmの近赤外レーザーを用いた光ピンセットによる操作と808 nmの近赤外レーザーによる局所加熱による細胞膜の融解になる選択的細胞導入を行う。細胞導入について、導入時間、成功率、細胞生存率を評価する。

4. 研究成果

研究項目 1: 蛍光回復により長期環境計測を実現するハイドロゲル光環境マイクロセンサの作製

蛍光色素が発する蛍光における強度の環境依存性を利用した光環境センシングにおいて、励起された蛍光色素の分子構造が変化し蛍光性を失う光退色により生じる同一環境状態での計測の不安定性が長期計測において大きな課題となっていた。

本研究では、低濃度のハイドロゲルで光環境センサを作製し計測時に適切な間隔をとることで、蛍光回復による退色を補償可能な光環境センサを作製した(図 3)。センサは、6 g/l の感温性蛍光色素の Rhodamine B、10%濃度のポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)水溶液、光開始剤 LAP の混合溶液をミネラルオイル中で攪拌して生成するマイクロビーズの光重合で作製した。蛍光回復は、蛍光色素濃度が低下した部位に濃度を均一とするよう周囲の色素が拡散し、退色部位の蛍光強度が回復する現象であり、蛍光回復により光環境センサの退色を補償する。

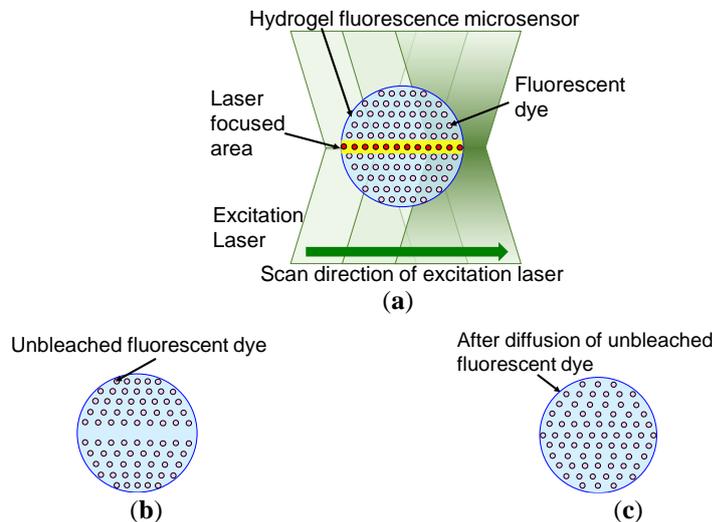


図 3 蛍光回復が生じる光環境センサの概念図, (a)励起中 (b)励起後 (c)蛍光回復後

作製したハイドロゲル光環境センサと従来のポリスチレン製光環境センサの蛍光画像を示す。蛍光色素は温度感受性を有する Rhodamine B (励起波長: 561 nm, 蛍光波長: 580 nm) である。

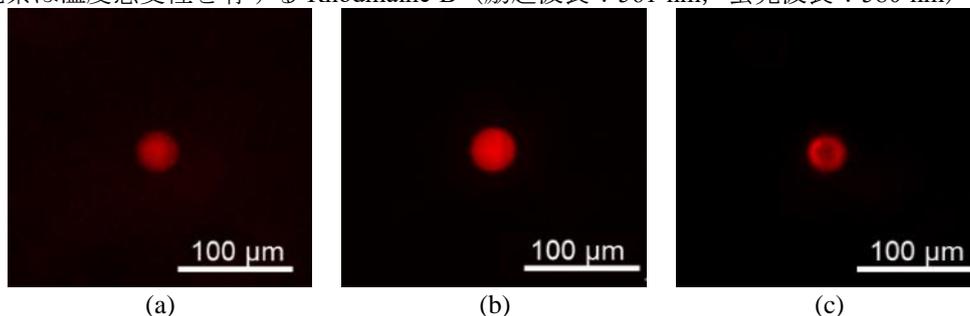


図 4 光環境マイクロセンサの蛍光画像, (a) PEGDA 濃度: 9%, (b) PEGDA 濃度: 99%, (c) ポリスチレン製センサ)

それぞれの光環境センサにおいて、励起時間 1 秒、間隔 9 秒の条件下で計測回数と蛍光強度変化を調べた結果を図 5 に示す。9%の PEGDA のセンサにおいて、100 回計測後において退色による蛍光強度低下が補償されていることが確認された。また、9%の PEGDA において間隔は 6 秒以上で十分な蛍光回復が生じることが図 6 に示すように確認された。

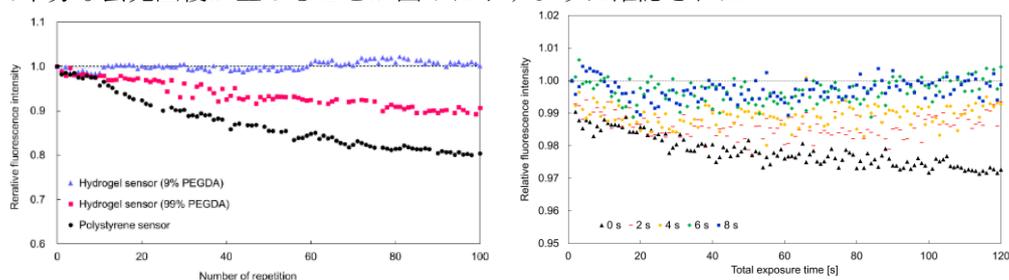


図 5 センサ材料による蛍光回復の評価 図 6 計測間隔と蛍光回復の関係

また、光開始剤濃度の蛍光回復への影響を評価したところ、図 7 に示すように 2.0%以上の光開始剤濃度で十分な蛍光回復を示すことが確認された。

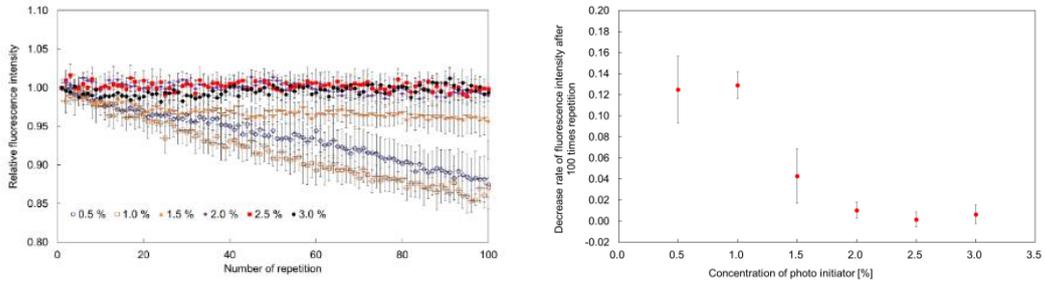


図7 光開始剤濃度と蛍光回復の関係

ハイドロゲル光環境センサの蛍光強度と温度の較正結果を図8に示す. この結果を用いて細胞培養チャンバ内の温度を変動させた際の温度変化を平均誤差 $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ での計測に成功した(図9).

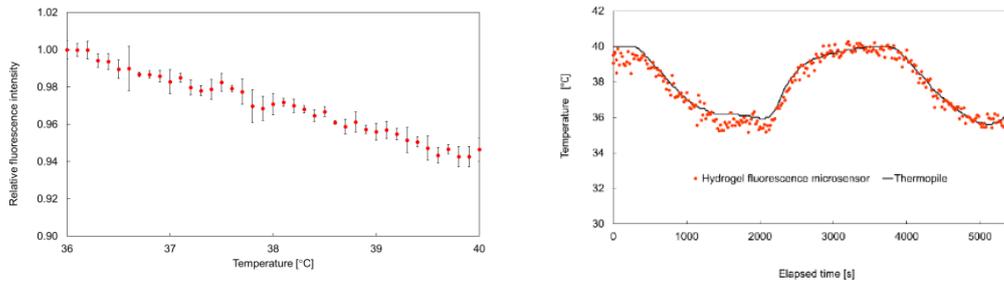


図8 センサの蛍光強度と温度の較正結果 図9 センサを用いたチャンバ内温度計測結果

以上より、長期間の培養環境計測が可能なハイドロゲル光環境センサの作製に成功した。

研究項目2：ハイドロゲル光環境マイクロセンサのオンチップ作製

光環境センサの蛍光強度はセンサ径に比例して大きくなるため、センサ径を揃えて作製することで、複数のセンサを用いた多点での環境計測が可能となる。均一な径のハイドロゲル光環境センサの作製方法として、マイクロ流体チップを用いた方法を提案した。交叉流路において、連続層となるセンサの材料と分散層となるミネラルオイルの層を形成し、センサの液滴を連続的に作製する。作製したセンサと、攪拌で作製したセンサの径の分布を比較し、有効性を検証した。

図10に作製したマイクロ流路中における光環境センサの作製の様子を示す。今回は、蛍光色素としてpH感受性を有するFITC(励起波長：488 nm, 蛍光波長：515 nm)を用いた。連続層と分散層の圧力比を制御することで、図11に示すように作製されるセンサの径を制御可能である。

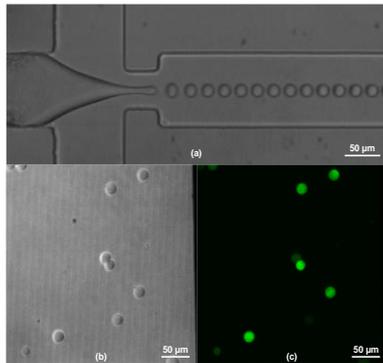


図10 マイクロ流体チップでのセンサ作製

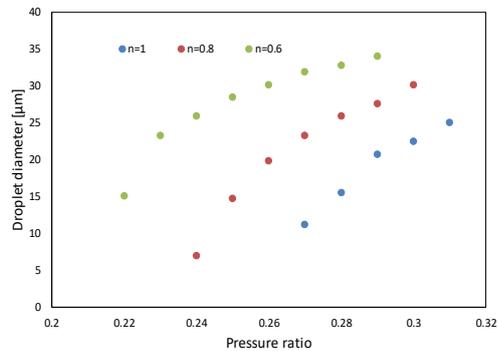


図11 圧力制御によるセンサ径の制御

マイクロ流体チップで作製したセンサのサイズ分布(図12)と攪拌で作製したセンサのサイズ分布(図13)を比較から、マイクロ流体チップでのセンサ作製の有効性を確認した。

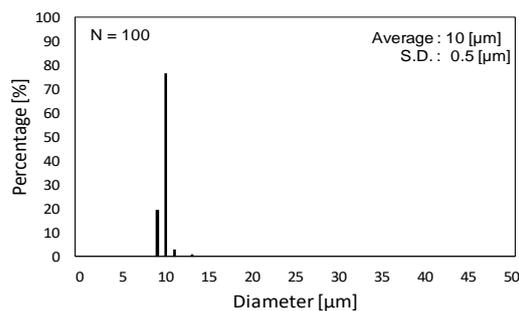


図12 マイクロ流体チップで作製したセンサ径分布

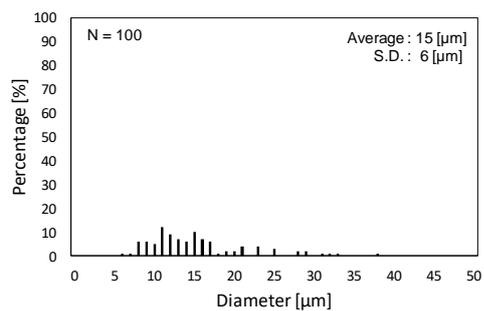


図13 攪拌で作製したセンサ径分布

研究項目 3 : 光操作・光刺激による蛍光マイクロセンサの選択的細胞導入

本研究項目では、図 14 に示すように、光環境センサを 1064 nm のレーザーによる光ピンセットで操作し、細胞膜上で 808 nm のレーザーでセンサを加熱し細胞膜を透過させる、異なる波長を用いた光操作・光刺激による選択的細胞導入を提案した。センサは直径 1 μ m のポリスチレンビーズに Rhodamine B と 808 nm の光吸収剤を導入して作製し、蛍光強度 (図 17) を用いて得られた温度の較正結果から温度の計測が可能である

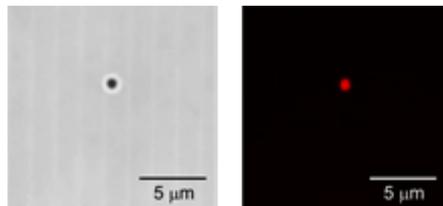
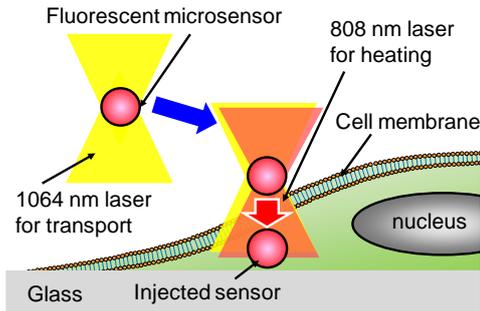


図 14 光環境センサの細胞導入の概念図 図 15 センサの明視野画像 (左) と蛍光画像 (右)

図 16 より近赤外吸収色素の 808 nm と 1064 nm の波長の光吸収性を比較した結果、808 nm を強く吸収することが確認でき、図 17 に示すように作製したセンサを 1064 nm のレーザーでトラップしても加熱されないが、808 nm のレーザーを追加すると 10 秒で 15 $^{\circ}$ C 加熱されることを確認した。

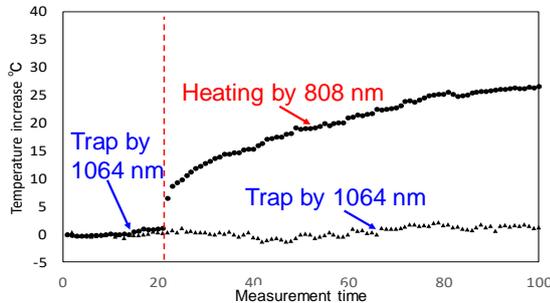
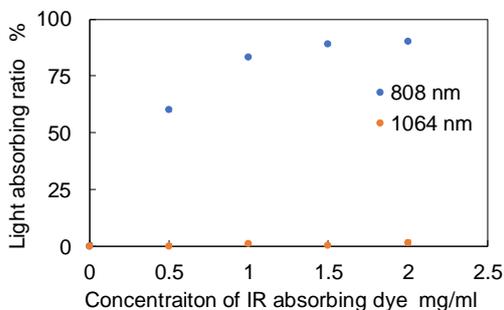


図 16 近赤外吸収色素の光吸収特性評価 図 17 1064 nm, 808 nm の光照射でのセンサ温度評価

図 18 のように作製したセンサを 1064 nm のレーザー (40mW) で操作し、犬の腎臓細胞 MDCK の細胞膜上に搬送後、808 nm のレーザー (40mW) で 10 秒加熱した結果、図 19 に示すように細胞質内へのセンサ導入に成功した。10 サンプルの実験を行い、10 秒の加熱時間で、導入成功率は 70%、細胞生存率は 100%であった。以上より、細胞内計測のためのセンサ導入に成功した。

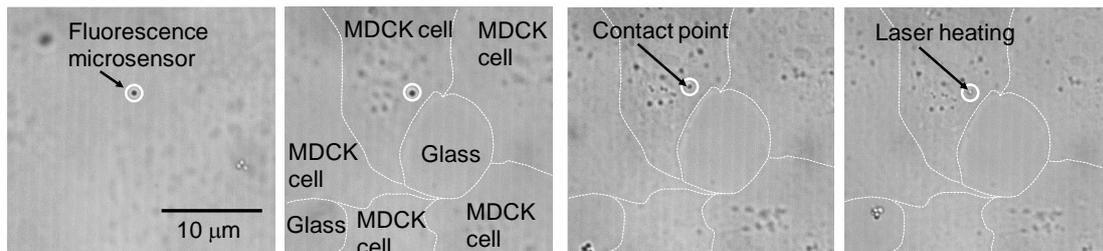


図 18 1064 nm・808 nm の光を用いた操作・刺激による光環境センサの選択的細胞導入

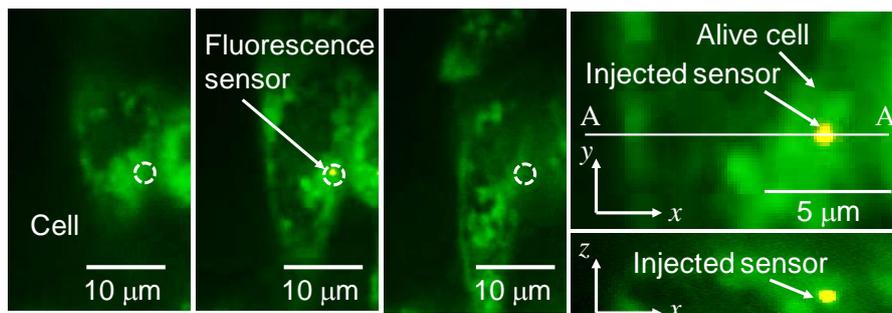


図 19 細胞内に導入された光環境センサの蛍光画像 (赤: センサ, 緑: 生細胞の細胞質)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1.Hairulazwan Hashim, Hisataka Maruyama, Yusuke Akita, Fumihito Arai	4. 巻 19
2. 論文標題 Hydrogel Fluorescence Microsensor with Fluorescence Recovery for Prolonged Stable Temperature Measurements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 5243(13 pages)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/s19235247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hisataka Maruyama, Ryota Yanagawa, and Fumihito Arai
2. 発表標題 OPTICAL INJECTION OF FLUORESCENCE MICROSENSOR TO A SPECIFIC CELL BY OPTICAL TWEEZERS AND LOCAL HEATING
3. 学会等名 MicroTAS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 RyotaYanagawa, Hisataka Maruyama, Fumihito Arai
2. 発表標題 Injection of Fluorescence Microsensor by Manipulation and Heating Using Multiple Wavelength Lasers for Temperature Measurement of Cell
3. 学会等名 MHS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田雄風, 秋田祐甫, 丸山央峰, 新井史人
2. 発表標題 単分散ハイドロゲル光環境センサ
3. 学会等名 Robomech2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----