

シングルセル分注に向けた細胞単離マイクロ流体デバイスの開発 Development of the cell isolation microfluidic device for single-cell dispensing

精密工学専攻 8号 遠藤駿文
Shumbun Endo

1. 緒言

近年のマイクロ流体技術の発達により、シングルセル(1細胞)解析と呼ばれる技術の開発が急速に進展してきた^[1]。従来の細胞解析法は、多数の細胞をすりつぶしてその内部にある物質の種類や状態を平均的に調べるものであった。しかし、個々の細胞間には大きなばらつきがあることが明らかになってくるにつれ、細胞を単離して個別に解析を行う必要性が基礎生物学のみならず医学の分野でも高まった。

このニーズは、発生学の分野においても高まっている^[2]。動物の形態形成は、未分化の細胞が神経や筋肉などの細胞へと分化しながら、正しい位置へと移動することで達成される。従って、発生の途中段階にある数千個の細胞について個々の状態を把握できれば、発生のメカニズムの理解が深まる。

1細胞解析には、細胞を一つずつ微小な区画に封入し、その中で生化学反応を行う必要がある。現在、マイクロ流路を用いて主にヒト由来の細胞(直径数十 μm 程度)の1細胞解析を多数並列で行う装置が市販されている。しかし、発生生物学の研究においてモデル生物として広く利用されているアフリカツメガエルの未分化の細胞は100 μm 以上と大きいため、既存の装置で1細胞解析することは難しい。

本研究では、100 μm 程度の細胞を効率的に単離し、一般的なウェルプレートに分注し、発現解析を行うための技術開発を行う。これを実現するために、細胞を一定の間隔で整列させ、その状態を維持したまま、デバイスの出口まで細胞を移動させることが可能なデバイスを作製する。

2. 重力トラップデバイスによるビーズの捕捉とリリース

2.1. 重力トラップデバイス

細胞は水よりも比重が大きいため、水中では重力によって沈降することを利用して細胞を捕捉する方法を試した。Fig. 1に重力による細胞の捕捉とリリース、整列の方法を示す。デバイスには傾斜のついた主流路があり、その片側に細胞を捕捉するための穴を一定の間隔を空けて取り付けました。デバイス内に細胞液が導入されると、重力によって一つの穴に一つの細胞が捕捉される(Fig. 2(a))。全ての穴に細胞が入ったことを確認して、主流路に残った細胞を出口へと押し流す(Fig. 2(b))。最後にデバイスの天地を反転させることで、穴に捕捉された細胞は、主流路の壁面に一定の間隔を空けて整列する(Fig. 2(c))。主流路には傾斜がついているため、デバイスを反転させた状態を維持すると、一定の間隔を空けたまま細胞が吐出口へと移動する。

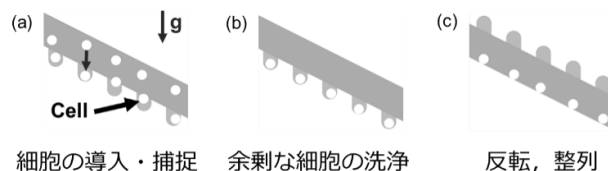


Fig. 1 細胞の捕捉・リリース手順

2.2. デバイス作製

三次元マイクロ光造形装置(ACCULAS SI-C1000, D-MEC)を使用し、樹脂製の鋳型を作製した。これを用いて型取りしたシリコーンゴム(PDMS)をスライドガラスに貼り付けることで、マイクロ流路デバイスを作製した(Fig. 3(a))。流路部の拡大写真をFig. 3(b)に示す。このデバイスは、直径600 μm の円筒形状の主流路部と等間隔に配置された複数の穴部から成る。主流路部と水平面の成す角は26.5°とし、主流路の両端には、サンプル液の注入口と吐出口を設けた。また、単一細胞捕捉には穴径が重要なパラメータになると考え、穴径が150 μm 、170 μm 、200 μm の三種類のデバイスを作製し、穴の深さはそれぞれ150 μm 、170 μm 、280 μm とした。

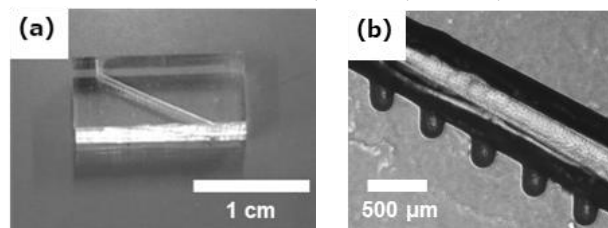


Fig. 3 (a) デバイスの写真と、(b) 流路部分の拡大図

2.3. 実験手順

重力による捕捉を行うために、穴部が流路下側になるようにデバイスを設置した(Fig. 4(a), (b))。ここに、カエル原腸胚細胞に見立てた直径90 μm のマイクロビーズ(濃度 5×10^3 個/ml)をピペットにより10 μl 流し込み、流路内をビーズ懸濁液で満たした。数分間静置してビーズを沈降させた後、主流路に水を流すことで穴部に捕捉されていないビーズを洗い流した。その後、デバイスの天地を反転させてビーズを主流路部へリリースした。

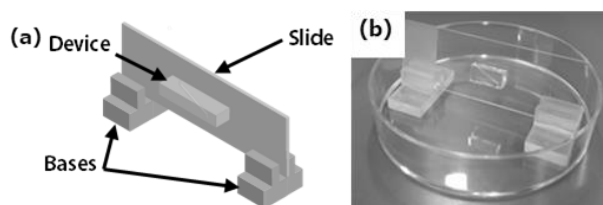


Fig. 4 (a) 実験系の模式図と(b) 実際の様子。

2.4. 結果：ビーズの捕捉

ビーズ懸濁液を導入した際の、各穴径におけるビーズの捕捉の様子を Fig. 5 に、捕捉率のグラフを Fig. 6 に示す。捕捉率は全ての穴の個数に対する1ビーズが捕捉された穴の個数として計算した。各穴径における1ビーズの捕捉率は、150 μm では47%、170 μm では75%、200 μm では21%であった。穴径が150 μm のときは穴の深さが浅く、余剰ビーズを洗い流す際に穴のビーズも流されてしまい、穴径が200 μm のときは穴径がビーズに対して大きく、一つの穴に複数個のビーズが捕捉されることが多かったため、1ビーズの捕捉率が低下したと考えられる。

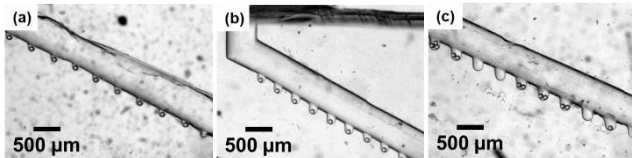


Fig. 5 捕捉の様子(a)150 μm , (b) 170 μm , (c) 200 μm

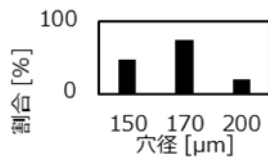


Fig. 6 各穴径における1ビーズの捕捉率

2.5. 結果：ビーズのリリースとリリース後の間隔評価

穴にビーズをトラップし、主流路をウォッシュした後にデバイスの上下を反転させた際の、各穴径におけるビーズのリリースの様子を Fig. 7 に、リリース率のグラフを Fig. 8 に示す。リリース率は、1ビーズが捕捉された穴のうち、そのビーズがリリースされた割合を表している。ブロッキング剤としてコートした BSA により、穴径に関わらずビーズがリリースされる様子が確認された。また、各穴径におけるリリース率は、150 μm で60%、170 μm で96%、200 μm で67%であった。捕捉率とリリース率はともに穴径が170 μm のときに最大値をとった。

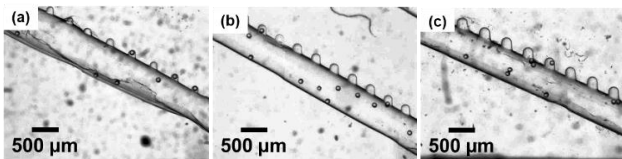


Fig. 7 リリースの様子(a)150 μm , (b) 170 μm , (c) 200 μm

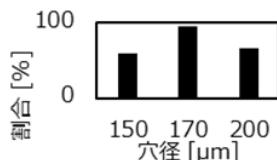


Fig. 8 各穴径における1ビーズのリリース率

シングルセル分注の際には細胞同士の間隔が一定に保たれた状態で排出される必要があるため、吐出口付近でのビーズの間隔の評価を行った。天地反転後に主流路にリリースされたビーズは、主流路の傾斜により吐出口に向かってゆっくり

と移動した。あるビーズが吐出口に到達したときの次に並んだビーズの位置を画像から確認し距離を算出した (Fig. 8)。算出した距離を100 μm ごとの区間に分けて、ヒストグラムを作成した (Fig. 9)。穴同士の間隔が190 μm であるのに対して、リリース後のビーズは中央値352 μm (平均450 μm , 標準偏差317 μm) の間隔で吐出し口を移動しており、吐出口付近ではビーズの間隔が大きくなる傾向が分かった。

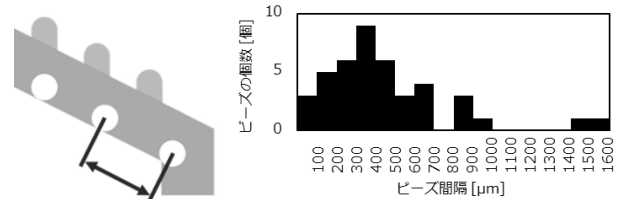


Fig. 8 ビーズ間隔の計測 Fig. 9 ビーズ間隔のヒストグラム

2.6. 主流路の傾斜と断面形状の影響

吐出口付近のビーズ間隔にばらつきが大きくなった要因として、リリースの際にビーズが垂直に落下しなかったことや主流路表面の凹凸によってビーズの速度が安定しなかった点が挙げられた。そこで、デバイスの主流路の傾斜、および断面形状や幅を変えて、ビーズの捕捉とリリースを観察した。

リリース時に主流路の反対側に落ちたビーズの位置を一時的に保持するため、傾斜のない円形断面デバイスを作製し、捕捉・リリースの実験を行った (Fig. 10)。主流路を水平にしても1ビーズの捕捉の様子に大きな変化はなかったため、主流路に傾斜をつける必要はないと考えた。

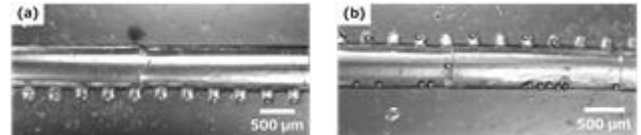


Fig. 10 傾斜のない円形断面デバイスを用いた実験の画像。

(a)捕捉時, (b)リリース時。

次に、同様に傾斜のないデバイスで、異なる断面形状を有するデバイスについて実験した。鋳型は光硬化性樹脂を積層して作製されるため、鋳型表面の凹凸を減らし、ビーズと流路の接触面積を少しでも減らすため主流路の断面形状、穴の形状も全て矩形にした。主流路幅は600 μm 、穴の幅、深さはどちらも170 μm とした。矩形断面のデバイスによる捕捉・リリースの様子を Fig. 11 に示す。捕捉の際、穴には複数のビーズが入り込み、かつ空の穴も多い結果となった。円形断面のときに比べて穴が先端に向かって細くならないため、穴の体積が円形断面の穴の体積より大きくなってしまい、複数個のビーズが捕捉される率が上がったと考えられる。

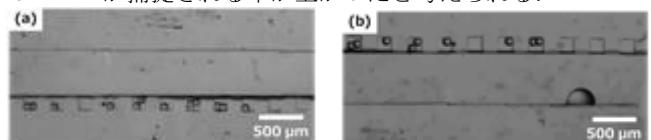


Fig. 11 傾斜のない矩形断面デバイスを用いた実験の画像。

(a)捕捉, (b)リリース

2.7. シリンジポンプを用いたビーズの導入と捕捉

これまでの実験では、操作の簡便性を重視し、マイクロピ

ペットで吸引したビーズ液を、導入口から手動で注入した。しかし、この方法ではビーズを安定して導入することが困難であったため、溶液を一定流量で送液可能なシリンジポンプによりビーズを導入する方法を試した。

流速が速いとビーズが穴を一瞬で通過してしまうため、流量は 0.01 ml/min とした。結果、ビーズはほとんど捕捉されなかった (Fig. 13)。動画を確認したところ、ビーズは穴を通過する際、穴の方に少し引き込まれながらも主流路に戻り流される様子が観察された。これは、穴の分だけ流路幅が広くなり、そちらに流れる流線にビーズがのったためこのような挙動をとったと考えられる。しかし、一部にビーズが捕捉される様子も観察された (Fig. 14)。あるビーズが穴の入り口付近を流れているとき、後ろから来た他のビーズがそのビーズを穴に押し込むことで捕捉された。

このデバイスにおいて、ビーズが穴に捕捉されるためには、ビーズが穴幅分の距離を進む間に、十分に沈降しなければならない。マイクロペットによる導入は、デバイス内にビーズが大量に存在し、かつ主流路方向の流れが 0 の状態で数分静置したため高い捕捉率が確認された。それに対し、シリンジポンプでは一定量のビーズ溶液が常にデバイス内に流れ込んでおり、流量が 0.01 mm/min のとき流速は 4.12 mm/s である。ビーズの沈降速度は理論値で 0.23 mm/s であるため、流速は沈降速度の 18 倍となる。それに対し、穴の幅は穴の深さと同じ程度しかないため、捕捉されなかったと考えられる。

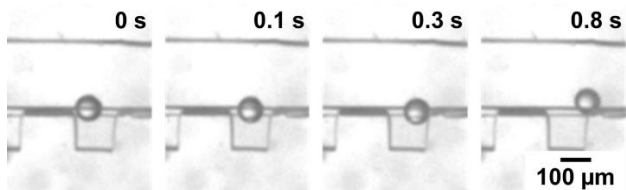


Fig. 13 ビーズの穴付近での挙動

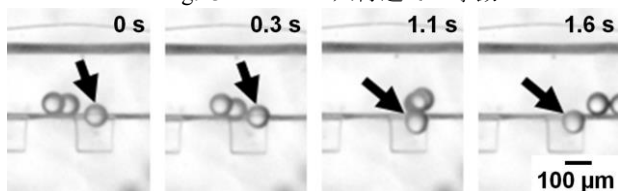


Fig. 14 ビーズが押し込まれて捕捉される様子

3. 流体カトラップデバイスによるビーズの捕捉

2 章では、細胞にみだたビーズの重力による捕捉を行ったが、そこではビーズが捕捉穴を通過する前に穴の中に沈降する必要があった。しかし圧力による導入の下でそれは困難であったため、流体力による細胞を捕捉穴に引き込む方法^[3-4]を参考にデバイスを設計した。

3.1. 流体カトラップデバイス

デバイスには水平な主流路が存在し、片側に捕捉用の穴を設けた。穴の底部にはさらに細い流路が繋がっており、その流路は主流路より広い流路とつながっている。導入された流体は主流路だけでなく穴の方にも流れ込むようになっている。この設計による流体力による捕捉の方法を Fig. 15 に示

す。流体力による捕捉のためには、穴より先の主流路方向の流れの流量 Q_a と穴方向の流れの流量 Q_b が $Q_a < Q_b$ である必要がある。流量は流路の抵抗とそれに伴う圧力降下を考慮した電気回路モデルによって決定されるため、穴方向の流路抵抗を主流路の流路抵抗より小さくなるように設計した。

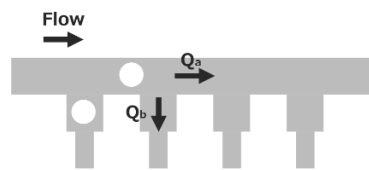


Fig. 15 流体カトラップデバイスによる細胞の捕捉

3.2. デバイスの作製

フォトリソグラフィプロセスにより SU-8 (SU-8 3050, MICRO CHEM) を用いて流路の鋳型を作製した。主流路幅は 80 μm 、高さは 50 μm として、穴幅 50 μm 、引込用流路の幅 50 μm で 400 μm の間隔を空けた穴が 10 個並ぶように設計した。作製した鋳型に PDMS を流し込んで硬化させ、導入口、引込流量の排水口となる場所に生検トレパンで穴を開けた。それとは別に板状に硬化させた PDMS を作製し、二つを貼り合わせることでトラップデバイスを得た (Fig. 16)。

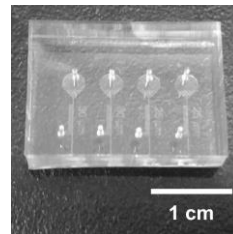


Fig. 16 デバイスの画像

3.3. 実験系と操作手順

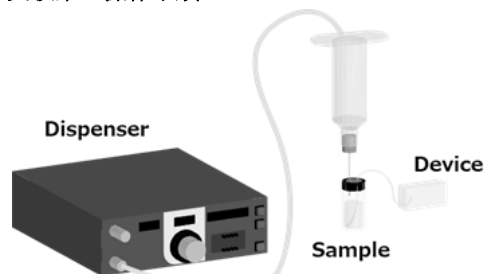


Fig. 17 実験系の模式図

作製したデバイスでビーズの捕捉実験を行った。捕捉には直径 45 μm 、濃度 1×10^3 個/ml のビーズ液を用いた。ビーズが PDMS へ吸着することを防ぐために、ビーズ液に F-68 界面活性剤を 1%v/v 混合した。ビーズ懸濁液を入れたバイアルに二本チューブを差し、一方をディスペンサ (ML5000X II, MUSASHI) と接続し、もう一方をデバイスの導入口に差し込んだ。その状態で、10 kPa の圧力をかけてビーズを導入し、捕捉の様子をカメラで撮影した。

3.4. 結果：流体力によるビーズのトラップ

10 個の穴に対して、ビーズがトラップされる様子は確認されたが、穴の深さ 50 μm のときは複数のビーズがトラップされた穴が多く、1 ビーズ捕捉の割合は少なかった。その要因として、矩形断面流路に対して球体のビーズが密着しないため、穴とビーズ間に隙間が存在し引き込みの流れが残ること、

また、穴の深さがビーズより少し大きくビーズの捕捉後に穴の上部にスペースが存在することが挙げられる。そこで、穴の深さを 25 μm , 30 μm , 50 μm と変えて捕捉の様子を観察した(Fig. 18)。その結果、シングルビーズの捕捉率はそれぞれ 83%, 67%, 63%となった(Fig. 19)。また、25 μm のデバイスは他二つのデバイスに比べて実験ごとのばらつきも少なく、安定して1ビーズの捕捉が可能であった。

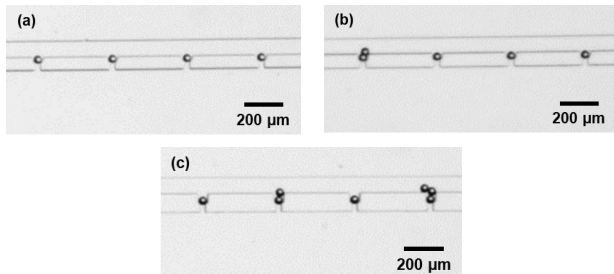


Fig. 18 穴の深さ別の捕捉の様子。

(a)25 μm , (b)30 μm , (c)50 μm .

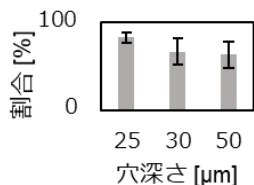


Fig. 19 穴の深さ別の1ビーズ捕捉率 (N=3)

3.5. 蛇行流路デバイスの設計と実験手順

捕捉に最適な穴の深さを決定したため、より実用的なデザインの流路を設計した (Fig. 20)。捕捉穴の数を10個から40個に増やし、吐出時に一細胞辺り 0.1 μl の分注体積を確保するために、主流路を広く長くした流路を設計した。一方で、引込流路への流れを考慮して、穴付近では主流路が幅 80 μm に狭まるようにした。

実験系は Fig. 17 の系をベースにした。直線型流路の実験と異なり、逆圧でリリースを行うため、サンプルを入れたバイアルとは別にバッファを入れたバイアルを用意した。それぞれのバイアルとディスペンサをバルブ付きコネクタで接続し、バルブを開閉することでデバイスに導入する溶液を選択できるようにした。実験には細胞に見立てたビーズ液を用い、その組成は3.3と同様のものである。

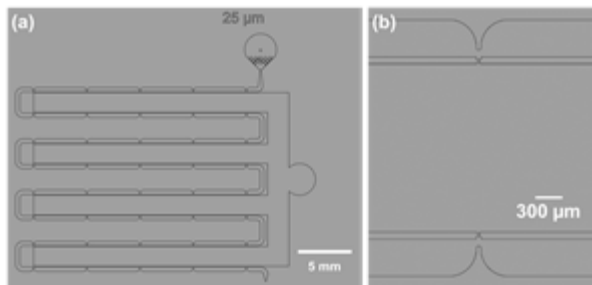


Fig. 20 蛇行流路デバイスのデザイン(a)全体図, (b)穴付近

3.6. 結果: 蛇行流路デバイスにおけるビーズの捕捉・リリース

ビーズがトラップ部に捕捉された様子を Fig. 21 に示す。シングルビーズの捕捉には成功したが、設計した40個すべての穴で捕捉することは出来なかった。導入口に近い穴では

ビーズが捕捉されたが、吐出し口に近い穴では、捕捉が行われなかった。これは、長い主流路の終盤では、主流路側の抵抗と穴側の抵抗の差がなくなり、流量比に大きな差が出なくなったこと、捕捉のたびに排水側に流路が分岐することで主流路を流れる流量が減少し、引込の力が弱くなったことが考えられる。また、リリースでは、導入口に最も近い穴のみリリースされることが多かった。これは、排水口から導入口、吐出し口に対して、最も流路抵抗の小さい穴に流れが集中し、穴ごとの流量に差が出たためと考えられる。

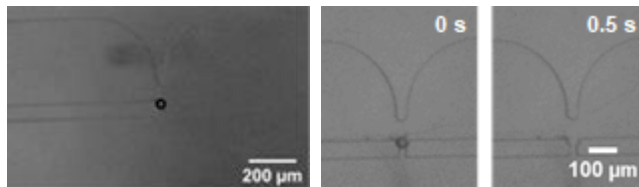


Fig. 21 ビーズ捕捉の様子 Fig. 22 リリース前後の様子

4. 結言

シングルセルを効率的に分注するために、一定間隔に配置した穴に細胞に見立てたビーズを捕捉・リリースさせることで整列させるデバイスを設計・検討した。重力による捕捉は、手動導入では捕捉・リリースともに良好な結果が得られたが、安定したビーズの導入が困難であり、シリンジポンプによる導入では、穴を通過する時間とビーズの沈降時間の関係上、捕捉が困難であった。流体力によるトラップでは、本流路デザインでは穴が10個程度であれば捕捉率は高いが、穴の数を増やすと、流量の減少や、流量比の関係で吐出し口に近いビーズがトラップされにくくなった。また、リリースも流路抵抗の影響で、流路の入り口と出口付近で違いがみられた。今後は、穴ごとの流量比と圧力差が捕捉時とリリース時ともに均一になる流路設計を行う必要がある。本研究で得られた知見を足場に、流体力トラップを適切に設計することで、画像認識等が不要で簡易的な1細胞分注技術の実現が期待できる。

参考文献

- [1] 菅野純夫(編), シングルセル解析プロトコール, 羊土社, 東京都, (2017)
- [2] James A. Briggs et al., The dynamics of gene expression in vertebrate embryogenesis at single-cell resolution, *Science*, **360**, eaar5780, (2018)
- [3] A. Ahmad Khalili et al., A Microfluidic Device for Hydrodynamic Trapping and Manipulation Platform of a Single Biological Cell, *Appl. Sci.* **6-2**(2016) 40
- [4] D. Jin et al., A microfluidic device enabling high-efficiency single cell trapping, *Biomicrofluidics*, **9-1**(2015) 014101
- [5] K. Iwai et al., A resettable dynamic microarray device, *Biomedical Microdevices*, **13**(2011) pp.1089-1094.