

オープン型マイクロ流路における細胞・粒子のペアリング及び回収システムの構築

Pairing and retrieval system of cells and particles using open microfluidics

精密工学専攻 42号 寺谷浩登
Hiroto Teratani

1. 緒言

単一レベルで異種細胞間の相互作用を調べることは、多くの生理学的・病理学的プロセスのメカニズムを明らかにする上で重要であり、新規医薬品の開発に大いに役立つことが期待される⁽¹⁾。例えば、腫瘍細胞と、自然免疫細胞の一つであるナチュラルキラー細胞の単一レベルでの相互作用では、これらの接触時間や腫瘍細胞の溶解速度などが、各々の細胞間で大きく異なる。このような現象が生じる要因として、個々の細胞の不均一性や微小環境の変動などが考えられる。細胞を集団で共培養する従来の方法は、細胞間相互作用の平均的な影響を明らかにすることはできるが、個々の細胞レベルでばらつきが大きい相互作用の詳細を知ることは困難である。

単一細胞レベルでの不均一な細胞間相互作用を調べるための有力な手法の一つとして、マイクロ流体デバイスを用いた方法が挙げられる⁽²⁾。マイクロ流体デバイスは、細胞の寸法に合わせたマイクロスケールの構造により、単一細胞の空間的な配列や異種細胞の接触、それに続く長期観察・培養を可能とする。しかし、従来のマイクロ流路は、いずれも閉鎖空間となっているため(Fig. 1)、外部からのアクセスが困難で、配列後や培養後の細胞を抽出して分析機器にかけるといった操作が困難である。

本研究では、外部アクセスが可能なオープン型マイクロ流路(Fig. 2)を用いて、異なる細胞を想定した2種類のマイクロビーズを隣同士に流体トラップし、ピックアップ装置と組み合わせることでビーズのペアを同時にピックアップしてウェルに移すためのシステムを検討した。

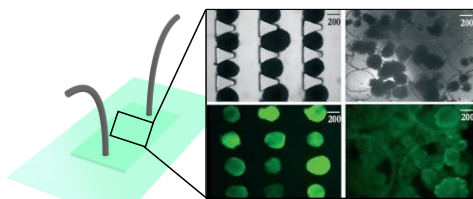


Fig. 1 Example of a closed microfluidic device for cell trapping[3].

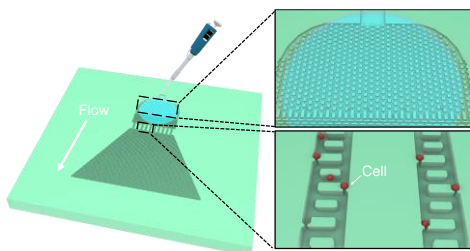


Fig. 2 Schematic of an open microfluidic device for cell trapping developed in this study.

2. オープン型マイクロ流路の設計と作製

2.1. 自発的毛管流れ

自発的毛管流れ(Spontaneous Capillary Flow, SCF)とは、ポンプなどの外圧の力を受けず、流路内の液体の濡れに起因する毛細管力のみで駆動される流れである。流路の幅を W 、深さを H 、流路壁表面での液体の接触角を θ とすると、オープン型矩形流路(溝)(Fig. 3)では、次式(1)が満たされるときにSCFが生じる⁽⁴⁾。

$$\frac{W}{2H + W} < \cos \theta \quad (1)$$

また、補足する粒子の直径を D とすると、 $D < H$ のときに粒子が流路内を流れる。よって、以下の流路設計において、これらの条件を満たすように流路断面の寸法を決定した。

2.2. 単一粒子トラップの原理

本研究では、異なる粒子を隣接させて配置するため、それぞれの粒子に合わせた流路を隣り合わせて配置し、トラップ部を近接させる方法を採用した。そのため、従来多く採用されていた蛇行型流路の中央部にトラップされるデザイン^(5,6)ではなく、粒子が流路の横端にトラップされるデザインを採用した(Fig. 4)⁽⁷⁾。この流路では、トラップ部方向への流量を Q_1 、バイパス流路方向への流量を Q_2 とすると、 $Q_1 > Q_2$ を満たすときに粒子が流体トラップされる。流れてきた粒子がトラップされると、 $Q_1 \approx 0$ となるため、次に流れてくる粒子はバイパス流路方向へと流れていく。これが繰り返し行われることで、多数の粒子を配列させることができる。

Single air-liquid interface cross section

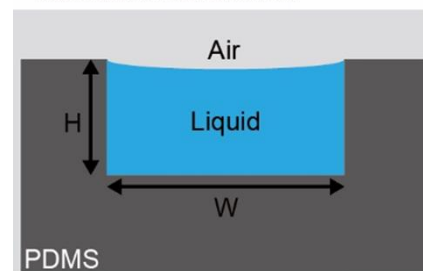


Fig. 3 Cross section of the rectangular channel.

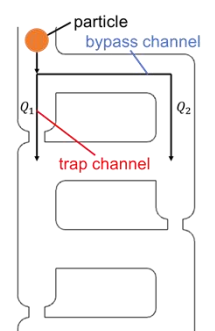


Fig. 4 Scheme of the microchannel for single particle trapping.

2.3. オープン型マイクロ流路の作製

2.3.1. PDMS 製流路の作製

2 インチのシリコンウエハに厚膜ネガ型フォトレジスト (mr-DWL40) をスピコートし、ベークした後、マスクレス露

光装置 (DL-1000, ナノシステムソリューションズ) により流路のパターンを直接露光した。その後, PM シンナー (東京応化工業) 及び2-プロパノールで現像・洗浄を行い, 鋳型を作製した。作製した鋳型と PDMS と共にシャーレに流し込みベークすることで, 流路の転写を行った。

2.3.2. PDMS の親水化法の検討

マイクロ流路の材料として広く使われている透明シリコーンゴム (PDMS) は疎水的 (未処理の状態では水の接触角は 100° を超える) であるため, 2.1 節で述べた SCF を発生させるために, 両親媒性高分子により流路内壁を親水化する。そこで, 接触角計測により, その効果を定量的に評価した (Fig. 5a)。未処理の PDMS, 1%v/v F-68 溶液で処理した PDMS, 5%w/w PVA 溶液で処理した PDMS の表面に, 流路に流す 3 種類の溶液を滴下し, それぞれの動的接触角を測定した (Fig. 5b)。この結果から, 1%F-68 溶液で処理した PDMS の接触角が最も小さくなった。よって, 以下の実験では, 1%F-68 溶液を用いてオープン流路内壁の親水化を行った。

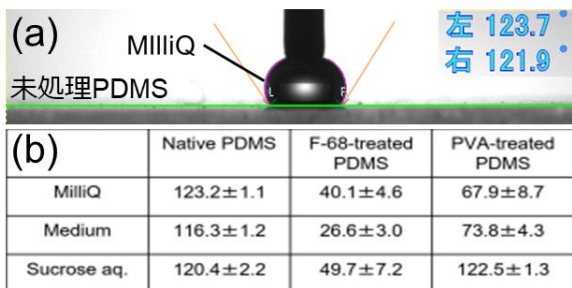


Fig. 5 Measurements of static and dynamic contact angles.

2.3.3. オープン型流路内壁の親水化処理

流路が転写された PDMS 板に O_2 プラズマ処理による親水化を行い (Fig. 6a), 未処理の PDMS 板に圧着した後, 1%F-68 溶液で流路内を満たした (Fig. 6b)。約 20 分の静置後 (Fig. 6c), 流路内の溶液を吸引除去した (Fig. 6d)。最後に, 未処理の PDMS を剥がし, 流路構造のある PDMS を 120°C で 15 分ベークした (Fig. 6e)。この操作により, 流路の内部のみに親水媒性高分子のコーティングを施した。

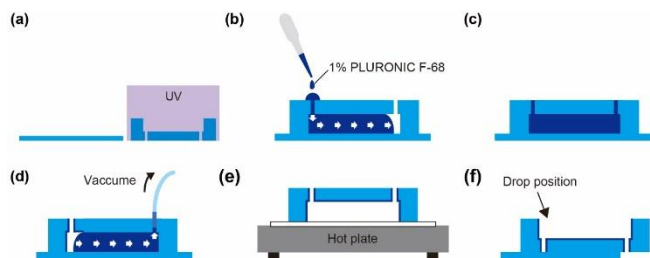


Fig. 6 Hydrophilic treatment protocol for only the inside of the open microchannel.

2.4. 粒子捕捉流路のデザイン

2.4.1. 単一粒子捕捉デバイス

デバイスは, 式 (1, 2) の条件を満たすように設計した⁽⁶⁾。流路全体は, 液滴を滴下する構造, 粒子を分離する構造, 粒子

を捕捉する構造, SCF を発生させるための構造の 4 つから構成される (Fig. 7)。

2.4.2. 異種粒子捕捉デバイス

2.4.1 節で設計した流路デザインを元にして, 大きさの異なる粒子を隣合わせに配置する流路をデザインした (Fig. 8a)。また, 細胞間相互作用は必ずしも 1:1 ではなく, 個数の比にも影響を受けることが報告されている⁽⁸⁾。そのため, 2:1 の個数で粒子を隣接配置する流路も設計した (Fig. 8b)。また, これらの流路は, 鋳型を作製する際に二重露光技術を用いて, 高さの違う流路を隣接させて作製した。

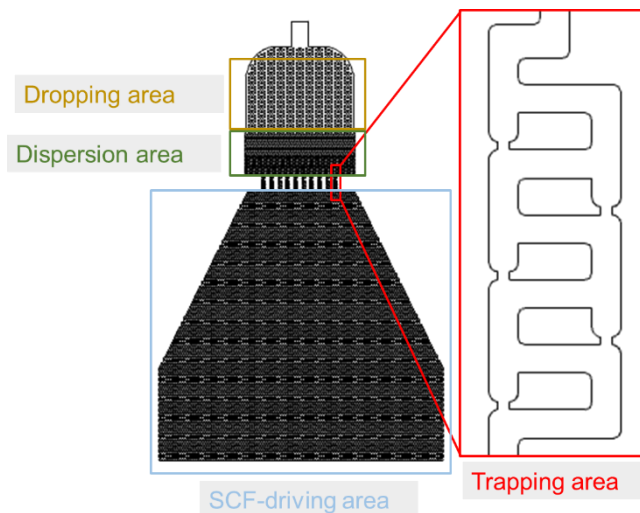


Fig. 7 Design of the single trap structure.

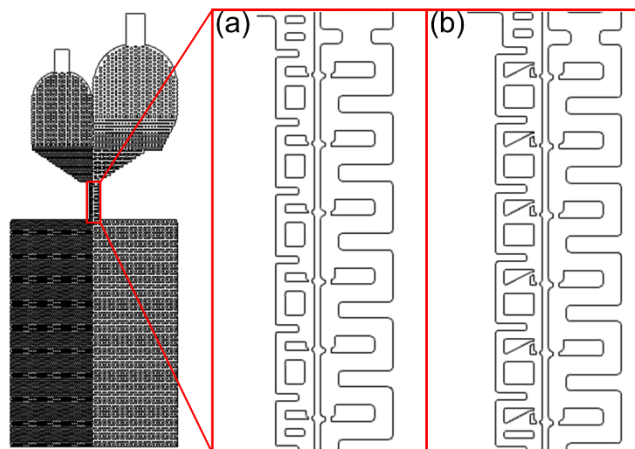


Fig. 8 Design of the pairing trap structure.

3. オープン型流路での粒子捕捉

3.1. 実験方法

細胞トラップの検証実験には, 細胞を模擬した直径 $20\ \mu\text{m}$ および $40\ \mu\text{m}$ のマイクロビーズを用いた。マイクロビーズ懸濁液は, 1%v/v F-68 の溶液中に, $20\ \mu\text{m}$ ビーズでは 2.84×10^5 [ml], $45\ \mu\text{m}$ ビーズは 4.99×10^4 [ml] になるように調整した。単一粒子捕捉の実験では, それぞれの粒子サイズに応じた流路寸法で, 50 個のトラップ部を設けた流路を設計・作製

した。デバイスの液滴下領域(Fig. 7 中の Dropping area)に、マイクロビーズ懸濁液を数 μL 滴下して、倒立顕微鏡でビーズがトラップされる様子を観察・記録した。撮影画像より、単一トラップ、複数トラップ、および空のトラップの個数を数え、トラップ率を算出した。

異種粒子捕捉の実験では、 $20\mu\text{m}$ ビーズと $45\mu\text{m}$ ビーズを一つずつ隣接配置させる流路(Fig. 8a)と、 $20\mu\text{m}$ ビーズ二つと $45\mu\text{m}$ ビーズを一つ隣接配置する流路(Fig. 8b)を設計・作製した。2種類のマイクロビーズ懸濁液を隣接する流路の先端にそれぞれ滴下し(Fig. 9), 単一粒子捕捉実験と同様に動画を記録し、トラップ率を算出した。

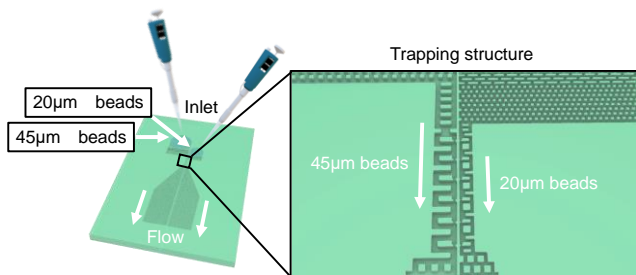


Fig. 9 Schematic of the procedure for the pairing trap of two types of particles with different sizes.

3.2. 実験結果

3.2.1. 単一粒子の捕捉

$20\mu\text{m}$ ビーズと $45\mu\text{m}$ ビーズの単一トラップ実験の結果をそれぞれ Fig. 10 の a と b に示す。どちらのケースでも、多くのトラップ部で単一の粒子が捕捉された。同一の実験を3回行いトラップ率を算出すると(Fig 11), 80%以上の高効率で単一のマイクロビーズがトラップされたことが示された。空の確率は、いずれもほぼゼロであった。また、どちらの流路でも、15%程度の複数トラップが発生した。これは、ビーズがトラップされた後も Q_1 が十分に小さくなりきらずに2個目のビーズがトラップ部に侵入してしまうことや、ビーズが2個同時に流れてきたことが要因として考えられる。

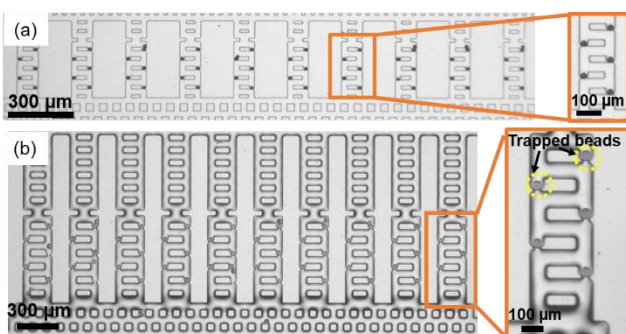


Fig.10 Results of trapping (a) $20\mu\text{m}$ and (b) $40\mu\text{m}$ polystyrene microbeads. Close-up micrographs of trapping sites, which are marked with orange rectangles, are shown on the right.

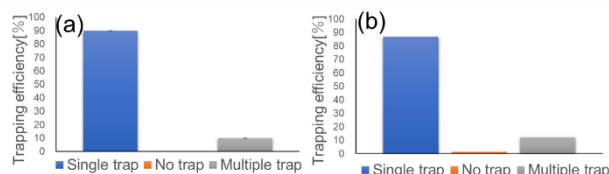


Fig.11 Trapping efficiency of (a) $20\mu\text{m}$ and (b) $40\mu\text{m}$ microbeads in trapping sites, respectively.

3.2.2. 異種粒子の隣接捕捉

3.2.1.節より流路のトラップ構造の有効性が確認できた。単一トラップの構造を元に、異なる大きさのマイクロビーズが近接するように設計した流路(Fig. 8)を用いて、3.1 に示した手順に従って2種類のマイクロビーズのトラップ試験を行った。その結果、 $20\mu\text{m}$ ビーズと $45\mu\text{m}$ ビーズが一つずつトラップ部に捕捉され、これらの近接配置が実現した(Fig. 12a)。全体として、8割以上の高確率でペアリングが実現された。一方、トラップ構造の流路幅やウェルの幅が非常に狭く、ゴミがウェルに入ってしまうとトラップできないなどの不具合があった。また、 $20\mu\text{m}$ ビーズ二つと $45\mu\text{m}$ ビーズを一つ隣合わせにトラップすることに成功した(Fig. 12b)。 $20\mu\text{m}$ ビーズの若干のサイズの不均一性から $20\mu\text{m}$ ビーズが3つトラップされてしまうことがあった。溶液のごみを除去する前処理や、粒子の不均一性への対処は、どの粒子トラップ流路においても同様の課題であり、今後の対策が必要である。

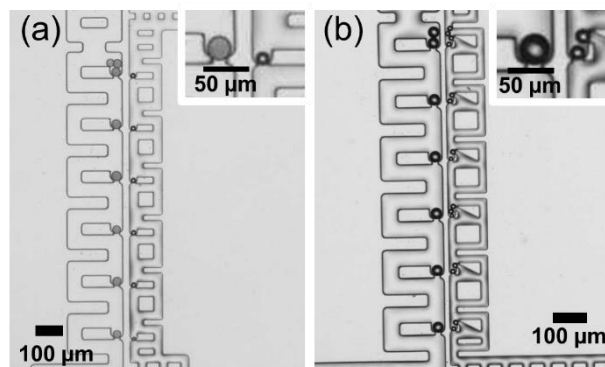


Fig.12 Results of pairing $45\mu\text{m}$ (left side) and $20\mu\text{m}$ (right side) microbeads. (a) 1:1 pairing and (b) 1:2 arrangement.

4. 捕捉粒子のピックアップ

4.1. 直接ピックアップ法

モーターによるステージ制御が可能な細胞 (スフェロイド) ピッキング装置 (Spheroid Go, エターナス) を用いて、オープン型マイクロ流路に捕捉した細胞のピックアップ (吸引による回収) を試みた。ピックアップ装置の先端にガラス細管 (内径 $30\mu\text{m}$) を取付け、液体が流れている流路から直接細胞を吸引する方法を用いた(Fig. 13)。ピックアップ効率の面では、流路に捕捉された単一細胞を 7/7, 7/7, 9/9 の高効率でピックアップすることに成功した。

しかし、この方法では、ガラス細管先端の流路上部への押し当て強さの調整に手間がかかることや、流路を流れる液体が

乾く前に細胞を全てピックアップしなければいけないことなどの課題があった。

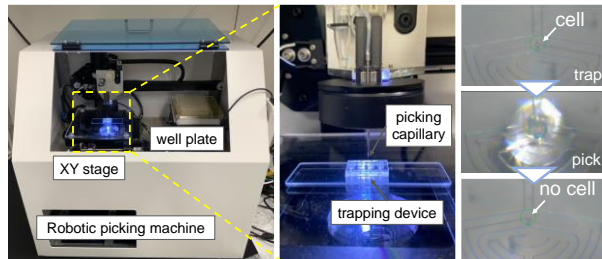


Fig.13 Robotic picking of cells with the device.

4.2. 水中環境からのピックアップ

4.2.1. 直接水中浸漬からのピックアップ

トラップ後の乾燥の問題を解決するため、細胞を捕捉した流路をディッシュに入れ、流路全体が浸るように水を入れてからピックアップする方法を検討した。この方法では、細胞の乾燥を完全に防ぐことができ、時間をかけてピックアップ操作を行うことができる。しかし、水が流路面に広がる際に発生する表面張力の影響により、捕捉された細胞が浮く現象が頻発し、トラップ率が低下した(Fig.14)。

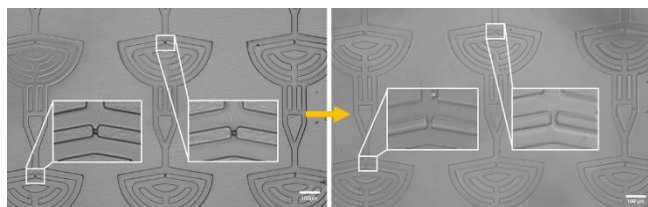


Fig. 14 Microscope images of trapping channels before and after immersion into water.

4.2.2. ゲル化を利用した細胞の固定とピックアップ

細胞が浮いてトラップ部から外れる問題を解決するため、細胞の懸濁液にゲルの前駆体高分子を混合させ、細胞のトラップ後にゲル化させて固定してから水に浸す方法⁹⁾を試した。細胞懸濁液には、紫外線でゲル化する Polyethylene Glycol Diacrylate (PEGDA)を採用し、Table 1 に示した組成・濃度で調整した。具体的には、PEGDA を含む細胞懸濁液を流路に滴下し、細胞が捕捉された後(Fig. 15a)に流路全体に紫外線を照射し、ゲル化させた後で水に浸し、ピックアップを行った(Fig.15cd)。事前検討において、懸濁させた 1 μ m のマイクロビーズの運動が停止する現象を顕微鏡下で確認し、紫外線の照射時間を決定した。

PEGDA の混合により細胞懸濁液の粘度は増加するが、3%v/v の低濃度では問題なくオープン流路を流れて細胞はトラップされた(Fig. 16a)。また、ゲル化後に(Fig. 16b)水に浸しても細胞は浮かず、固定されていた(Fig. 16c)。最終的に、水

Table. 1 Composition of cell suspension

全体量[μ L]	300
Jurkat cells[μ L]	15
1microbeads[μ L]	3
10% F-68[μ L]	30
PEGDA+Irgacure(97:3)	9
MIIIQ	243

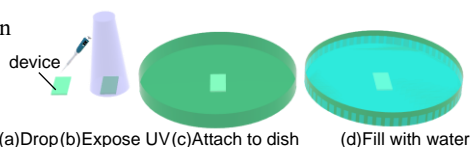


Fig.15 Procedure for picking after gelation.

に浸した後に、トラップされていた全ての細胞をピックアップすることに成功した(Fig.17)。

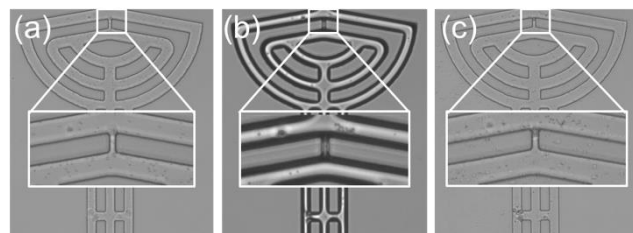


Fig.16 Gelation of liquid in open channel .



Fig.17 Robotic picking of cells fixed by a hydrogel.

5. 結言

本研究では、異種細胞相互作用の解析に向けて、オープン型マイクロ流路を用いて2種類の細胞模擬粒子を隣接させてトラップする方法を確立した。また、流路に捕捉した単一の細胞を個別にピックアップする技術を確立した。今後は4.2.2節で述べた方法で、異種粒子のペアのピックアップを試みる。さらに、実際に細胞を用いて実験を行い、オープン型マイクロ流路による流体トラップ及び個別ピックアップが可能かどうかを検証し、細胞の相互作用を個別に解析することを目指す。このシステムが細胞に対しても有効だと実証できた時、この技術が細胞の相互作用を解析するための簡素的で低コストでもある手法の一つとなり、多くの生理学的・病理学的プロセスのメカニズムを明らかにすることや、新規医薬品の開発などに大いに貢献すると考えられる。

本研究で確立した系や知見を足場に、より効率的な異種細胞の隣接及び同時回収が可能となり、多様な細胞サンプルの機能解析が促進されることが期待される。

6. 参考文献

- (1) Huang, L., et al., Cell Reports Physical Science. **3**-11((2022)), 101129.
- (2) Skelley, A. M., et al., Nature Methods, **6**-2((2009)), pp147–152.
- (3) Berthier, E., et al., Analytical Chemistry. **91**-14((2019)), pp.8739–8750)).
- (4) Nourmohammadzadeh, M., et al., Lab on a Chip, **16**-8(2016), pp1466–1472.
- (5) Tan, W.-H., & Takeuchi, S., Proceedings of the National Academy of Sciences, **104**-4 ((2007)) pp.1146–1151.
- (6) Murakami, T., et al., iScience, **26**-11((2023)) 108323.
- (7) Jin, D., et al., Biomicrofluidics, **9**-1 ((2015)), 4905428.
- (8) Subedi, N., et al., Scientific Reports, **11**-1((2021)), 17084.
- (9) Yoshino, T., et al., Analytical Chemistry, **88**-14((2016)), pp. 7230–7237.