

細胞縦断面高解像度イメージングのための硬質シリコン樹脂マイクロ流体デバイス

中央大学 理工学部 精密機械工学科 ○中野正義, 中央大学 理工学研究科 精密工学専攻 荒木誠吾
中央大学 理工学部, 日本学術振興会 津金麻実子, 中央大学 理工学部 精密機械工学科 ©鈴木宏明

要旨

細胞生物学における一般的な細胞の顕微鏡観察では、培養面水平方向に比べて垂直方向の解像度が劣る。本研究では、マイクロ流体デバイスを利用し、空間的な極性を持つ上皮細胞の断面を高解像度で観察可能な技術開発を行った。カバーガラス上にマイクロ流路を作製し、その側面に接着した細胞縦断面像を1スキャンで取得することに成功した。屈折率がガラスに近い硬質シリコン樹脂を流路材料として用い、解像度の向上を検討した。

1. 緒言

蛍光を使った細胞のライブイメージングは、細胞生物学をはじめとし、細胞を用いる様々な研究分野において必要不可欠の技術である。接着性培養細胞のイメージングは、スライドガラス上に平面的に広がった細胞を倒立型の顕微鏡で二次元的にイメージングする手法が一般的である。一方、上皮系細胞などの接着性細胞には、細胞間接着や細胞層物質透過など、培養面に対して垂直に分布する構造や動態が多くある[1]。現在、垂直方向を観察するには、共焦点顕微鏡を代表として、多数の二次元スライスから三次元情報を再構築する手法がとられている。しかし、このようにして得られる細胞縦断面画像は、平面画像に比べ取得時間と空間解像度の両面で劣る。

先行研究では、カバーガラス上にシリコン樹脂 (PDMS) をコートし、鋳型を押し付けてマイクロ流路構造を転写することでデバイスを作製した[2]。そしてマイクロ流路側面に接着した細胞を共焦点顕微鏡で観察することで、再構築手法による細胞縦断面よりも高解像度な縦断面像を取得することに成功した。しかし、得られた画像は、ガラス上に接着する細胞を観察したときに得られる平面像に比べれば解像度が低かった。原因として、PDMS 層の厚さ、屈折率の差異から生じる収差が考えられる。高倍率レンズで観察をする際、レンズの作動距離が短くなるので、PDMS 層が厚くなると、解像度に悪影響を及ぼす。また顕微鏡対物レンズと観察細胞の間に PDMS の層が存在すると、PDMS とカバーガラスの屈折率の差異から収差が生じる。そこで、屈折率がガラスに近い硬質シリコン樹脂をデバイス材料として用い、デバイス材料の厚さを薄く作製することで、解像度が向上するのではないかと考えた。

本研究では、PDMS 層の厚さによる解像度の影響を細胞平面画像の比較により調べた。また、硬質シリコン樹脂と PDMS それぞれの上に細胞を播種し、細胞平面画像の解像度を比較することで、硬質シリコン樹脂の有用性を調べた。そして、硬質シリコン樹脂で作製したデバイスと従来の PDMS で作製したデバイスによる細胞観察画像の解像度を比較し、その性能を評価した。

なお、先行研究は修士 2 年 荒木誠吾氏が行い、鈴木宏明教授、津金麻実子研究員、修士 2 年 荒木誠吾氏の指導のもと、本稿の 2-5 章の実験及び解析は登壇者が行った。

2. 解像度の評価方法

本研究では、微小管の繊維構造のコントラストを比較することで[3] 解像度を評価した。一般的に、画像のコントラストは輝度分布の急峻さに対応するため、種々の微分フィルタを用いて評価されることが多い。本報では、簡易的に一次元の輝度分布の微分値を指標とすることとし、以下の手順で評価指標を算出した。まず、各デバイスにおいて、10 細胞の拡大画像を撮影し (Fig. 1 (a))、画像解析ソフトウェア (ImageJ) を用いて細胞核領域内の微小管の 1 次元輝度分布を取得した (Fig. 1 (b))。この微分値の平均を、さらに 10 細胞について平均し、各デバイスの解像度の指標とした。

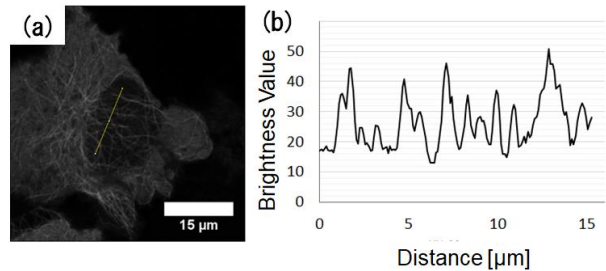


Fig. 1 (a) 細胞画像 (b) 細胞画像の黄色の直線上の輝度分布。

3. PDMS 層の厚さによる解像度の影響

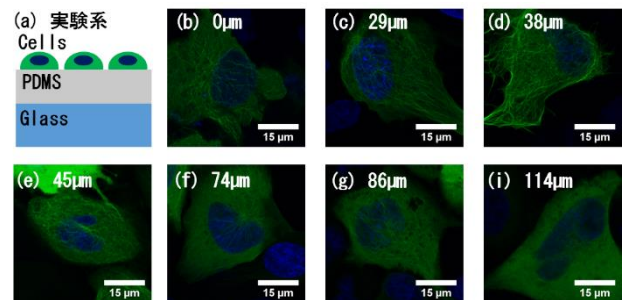


Fig. 2 (a) 実験系. (b)~(h) 異なる PDMS 厚さ (左上に記載) を持つデバイスにおける MDCK 細胞の平面蛍光画像の例。

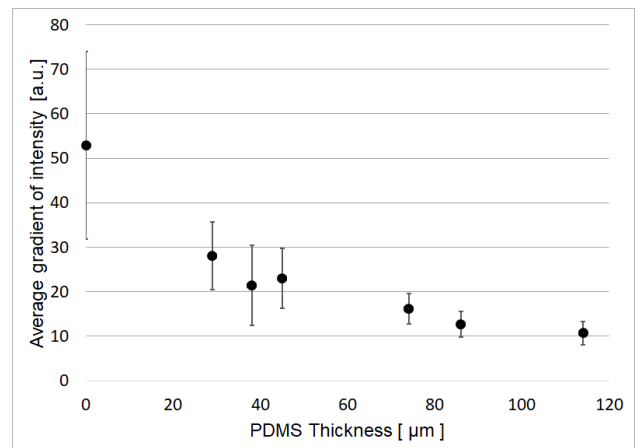


Fig. 3 PDMS 厚さによる解像度の影響

本実験では、PDMS 層の厚さに対する解像度の変化を調べた。細胞をカバーガラス上および PDMS コートしたガラス上に接着したものを観察した。観察系を Fig. 2 (a) に記す。ガラス上の細胞は微小管の繊維構造が極めて明瞭に確認できた (Fig. 2 (b))。また、PDMS 層が薄い場合も微小管の繊維構造を確認することができた (Fig. 2 (c)~(e))。しかし、PDMS 層が厚い場合、微小管の繊維構造がぼやけてしまい、確認することができなかった (Fig. 2 (f)~(h))。

次に、各 PDMS 厚さについて 10 個の細胞を撮像し、2 章で述べた解像度指標を算出した。解像度評価によって、PDMS が厚いほど輝度分布微分値の平均は小さくなることを確認した (Fig. 3)。PDMS 層の厚さが 30~50 μm 程度になると、カバーガラス上の指標値の約 1/2 倍になることがわかった。この結果より、屈折率がガラスと異なる PDMS 層が厚いほど、解像度が低下することが分かった。

4. デバイス材料の違いによる細胞平面画像解像度の比較

4.1. 実験の概要

本研究では、デバイス材料として、PDMS の代わりに硬質シリコン樹脂を用いる。そのため、硬質シリコン樹脂または PDMS の層がカバーガラス上に存在する状況をつくり、その上に播種した細胞平面画像の解像度を比較した。カバーガラスに各透明樹脂を厚さ約 100 μm になるようにスピコートしたものを準備した。具体的には、透明樹脂は、硬質シリコン樹脂 (SCR-1016, 信越シリコン)、PDMS (Sylgard 184, ダウコーニング)、PDMS (KE-106F, 信越シリコン) の 3 種類を用いた。細胞にはイヌ腎臓尿細管上皮細胞 (MDCK 細胞) を使い、細胞核を Hoechst により染色し、また緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合させたチューブリンの遺伝子を導入することで微小管を緑色に蛍光させた。

4.2. 実験結果

Fig. 4 に、3 種類の樹脂層上で培養した細胞の、微小管の蛍光画像を示す。硬質シリコン樹脂と 2 種類の PDMS (Sylgard 184, KE-106F) を比べると、硬質シリコン樹脂の方が微小管の繊維構造が鮮明であることが分かる。また、2 章で述べた解像度指標を Table. 1 に示した。輝度分布の微分値の平均も硬質シリコン樹脂が最大であり、最もコントラストが高いことが示された。以上の結果から、鮮明な細胞画像を得るためのマイクロデバイスの材料として、硬質シリコン樹脂が有用であることが分かった。

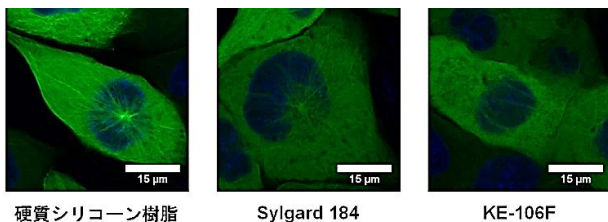


Fig. 4.3 種類の樹脂層上で培養した細胞平面蛍光画像

Table. 1. 各樹脂材料における輝度分布微分値の平均

| | 輝度分布微分値の平均 |
|------------------|------------|
| 硬質シリコン樹脂 | 25.4 |
| Sylgard 184 PDMS | 17.8 |
| KE-106F PDMS | 14.6 |

5. 硬質シリコン樹脂デバイスを用いた細胞縦断面観察

5.1. デバイスの作製

シリコンウェハ (Fig. 5 (a)) をドライエッチングすることにより作製した鋳型を PDMS へ転写し、これを中間鋳型 (Fig. 5 (b)) として硬質シリコン樹脂へ転写するという、2 回の転写プロセスにより硬質シリコン樹脂デバイス (Fig. 5 (c)) を作製した。カバーガラス上に硬質シリコン樹脂を直接シリコンウェハから離型をすると、両者とも高硬度のため離型ができない。軟質な PDMS を中間鋳型として用いることで、硬質シリコン樹脂を離型しやすくなった。また、中間鋳型となる PDMS は、高温のポストキュアをすることで PDMS の未架橋部分を封鎖し、かつ表面をフッ素系コーティング剤で処理することで硬質シリコン樹脂との離型が可能となった。PDMS と硬質シリコン樹脂での解像度の違いを比較するため、PDMS でも同一構造のデバイスを作製した。PDMS は KE-106F (信越シリコン) を用いた。2 回目の転写の際、中間鋳型をデバイス材料に押し当てることで、デバイス材料厚さを 10~20 μm の範囲で薄くすることが可能であった。

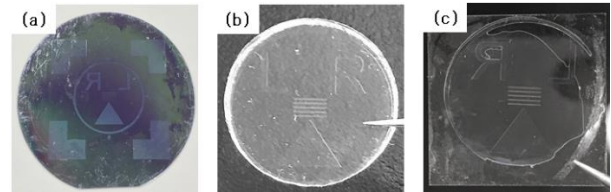


Fig. 5 (a) シリコンウェハ (b) 中間鋳型 (c) 硬質シリコンデバイス

5.2. 観察実験

硬質シリコン樹脂および PDMS デバイスの表面に細胞接着を促すタンパク質であるフィブロネクチンのコーティングを施し、細胞を播種後に 3 日間培養した。培養後、細胞核と微小管を染色して、共焦点レーザー顕微鏡による明視野および蛍光観察を行った Fig. 6 にデバイス内細胞観察方法の概略図を示す。

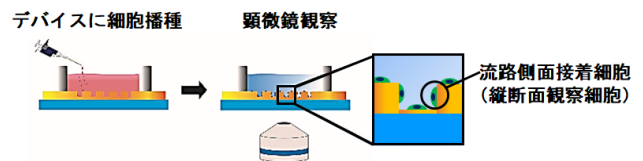


Fig. 6 デバイス観察概略図

それぞれのデバイスで撮影した 4 つの細胞縦断面画像を Fig. 7 に示す。微小管の繊維構造は、画像の中で明るく繊維状に見える部分である。流路側面に接着した細胞画像 (細胞縦断面画像) を比較すると、硬質シリコン樹脂デバイスでは PDMS デバイスに比べて微小管の繊維構造をより明瞭に観察することができた。

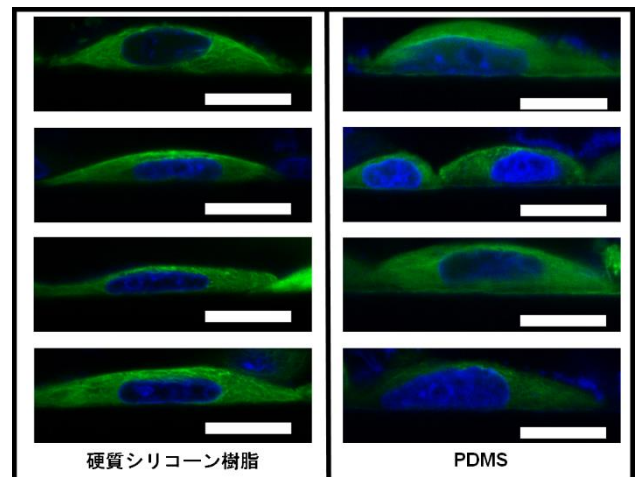


Fig. 7 細胞縦断面の比較 Scale Bar = 15 μm

6. 展望

硬質シリコン樹脂を用いることで、従来の PDMS に比べてマイクロ流体デバイス内の細胞画像の解像度が向上することが分かった。今後は、本デバイスの応用として、タイトジャンクションやアドヘレンスジャンクションなど [4] の動態の詳細な観察を行う。

7. 参考文献

- [1] 井出利憲, よくわかる細胞生物学の基本としくみ, 秀和システム, 東京, 2008, pp.196-216.
- [2] 荒木誠吾, マイクロ流体デバイスを用いた接着性培養細胞縦断面の高解像度ライブイメージング法の開発, 卒業論文, 2015.
- [3] G. Komis, et al., Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy, *Plant Physiology*, Vol. 165, 2014, pp.129-148.
- [4] T. Ooshio et al., Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions, *Journal of Cell Science*, 120, 2007, pp. 2352-2365.