

ハイドロゲルのマイクロ3次元造形を用いた 光環境マイクロセンサの作製

Fabrication of Fluorescent Microsensor using Micro 3D Fabrication of Hydrogel

○正 丸山 央峰 (名大) 王 健宇 (名大)

Hisataka MARUYAMA, Nagoya University, hisataka.maruyama@mae.nagoya-u.ac.jp
Wang Jianyu, Nagoya University

This work describes the fabrication of a fluorescent microsensor with a reference function for pH measurement using micro 3D fabrication of hydrogel. The fluorescent microsensor is constituted of hydrophilic photo-crosslinkable hydrogel with a pH-sensitive fluorescent dye and hydrophobic photo-crosslinkable resin as a barrier layer for hydrogen ions. Since PDMS does not pass hydrogen ions, reference pH microsensors do not be affected by surrounding pH. Therefore, pH is measured by comparing the fluorescent intensity of the pH sensor and that of the reference sensor. This paper demonstrated the fabrication of fluorescent microsensors by micro 3D fabrication.

Key Words: Micro 3D fabrication, hydrogel, fluorescent sensor, pH

1. 緒言

近年の再生医療やバイオアクチュエータの発展に伴い、単層培養された細胞・組織に比べて生体内の組織に近い性質を有するスフェロイドやオルガノイドなどの3次元細胞凝集体の利用に関心が寄せられている。培養中や刺激印加時における3次元細胞凝集体の機能発現や内部状態変化を調べるためには、細胞凝集体内部の培養環境(pH, 酸素濃度, 温度, 等)の計測が必要となる[1]。従来の培養環境計測に用いられてきた電気式・光学式マイクロプローブは、数~数十 μm の高空間分解能で環境を計測可能だが、内部状態計測ではプローブの挿入が必要となる。本研究では、非接触での環境計測法として環境応答性蛍光色素の蛍光強度の環境依存性を用いたハイドロゲル製の光環境マイクロセンサを提案してきた[2]。

本研究では、自作のマイクロ3D造形システムを用いたハイドロゲル製の光環境センサの作製と作製した光環境センサの評価を行った結果を報告する。

2. マイクロ3D造形システムを用いたハイドロゲル製光環境マイクロセンサの作製

図1にハイドロゲル製光環境マイクロセンサを作製するためのマイクロ3D造形システム概念図を示す。市販の倒立顕微鏡(Ti-U, Nikon)に60倍の対物レンズを搭載した光学系に、ピーク波長365nmのLED(M365LP1, Thorlabs)および観察用のCCD(VCXU-02M, Baumer)を組み込んでおり、対物レンズを通して紫外光の照射および作製の様子を観察する。ステージ底面のガラス面にはハイドロゲルの光重合を阻害する酸素阻害層としてポリジメチルシロキサン(PDMS)の薄膜層が形成されている。造形物は3軸の電動ステージに吸引固定されたガラス製の透明ホルダに固定される。紫外光はスポット光として照射されるため、ステージを移動することでハイドロゲルを任意の場所に造形する。顕微鏡ステージ上に光硬化性ハイドロゲルをホルダに組み込まれた材料導入ポートより導入し、ステージの位置制御と紫外光照射により任意の形状のハイドロゲルパターンを造形する。

図2に本システムを用いてガラス基板上に造形したpH計測用の光環境マイクロセンサの名視野画像および蛍光画像を示す。光環境マイクロセンサの材料として、親水性光硬化性樹

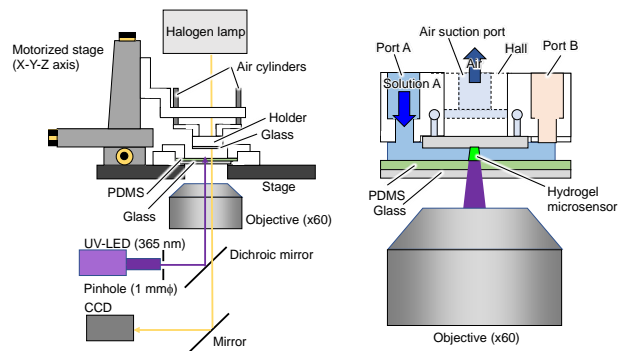


Fig. 1 A schematic of micro 3D fabrication system for fabricating hydrogel fluorescent microsensor.

脂の Polyethylene glycol diacrylate 575 (PEGDA 575) の 10% 水溶液, アミノ基と結合した pH 感受性蛍光色素の FITC (10 mg/ml in DMSO), 光重合開始剤の Omnirad1173 を用いた[2]。また, 計測時にリファレンスとして用いるリファレンス用センサにおいては, 水を透過しない層を作製するために, 光硬化性樹脂の Polyethylene glycol diacrylate 250 (PEGDA 250) を PEGDA575 で作製した pH 計測用のセンサの表面を覆う形で造形した。PEGDA 575 水溶液と FITC 水溶液を 10:1 の割合で混合し, Omnirad1173 を 1 wt% で溶解した。PEGDA 250 には Omnirad1173 を 1 wt% で溶解した。まず, ガラス基板上に, 直径 20 μm , 高さ 60 μm の円柱上の PEGDA575 製の光環境マイクロセンサを作製した図 2(a)。次に図 2(b)に示すように一方の光環境マイクロセンサに PEGDA575 を覆うように PEGDA250 を硬化させた。PEGDA250 は FITC の励起光・蛍光を透過するため, 図 2(d)に示すように計測センサとリファレンス用センサの蛍光を観察可能である。

マイクロ3D造形システムの評価として, 造形物を固定するガラス基板の平行度の評価を行った。図3に水平方向1mm毎にホルダの高さを20 μm ずつ変えて造形した際の造形物の高さを計測した結果を示す。図3(b)に示すように, ホルダの高さと造形物の高さの間には高い相関があり, ホルダの高さを1 μm 大きくすると造形物の高さは1.3 μm 大きくなることが確認された。また, 図4に一定のホルダ高さで造形した際の造形物の高さからホルダの傾きを評価した結果を示す。1mm四方の範囲では数 μm の高さの変化であり, 十分な精度で造

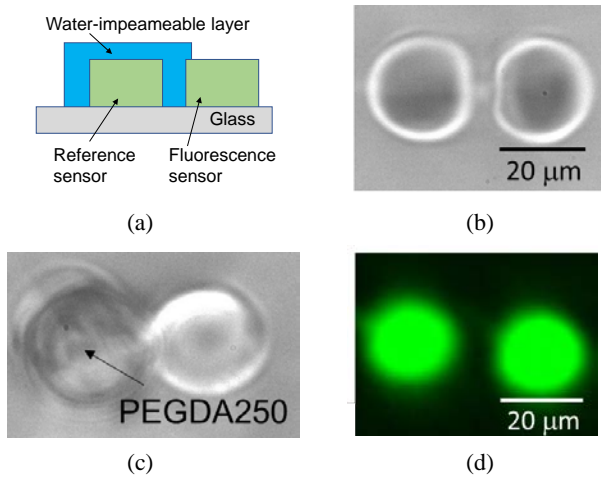


Fig. 1 Fabricated fluorescent microsensor. (a) Image of sensor structure (b) Fabrication PEGDA575 hydrogel, (c) Coat of PEGDA250, (d) Fluorescent image.

形可能であることを確認した。

3. 光環境マイクロセンサの評価

図 5 に作製したハイドロゲル光環境マイクロセンサとリファレンス用センサの蛍光強度比と pH の較正を行った結果を示す。pH6, 7, 8 における蛍光強度比から、pH と蛍光強度比には高い相関が確認され、pH 計測感度は 27%/pH、pH 計測精度は ±0.28 であった。また、FITC はタンパク質（アミノ基）の存在下では蛍光強度が変化するが、アミノ基を修飾した FITC を用いることで、タンパク質（L-Glutamine）の存在下でも pH 計測感度が影響を受けないことを確認した。また、図 6 および図 7 に示すように、pH が繰り返し変化する環境や、タンパク質濃度に変化する状況においても安定した pH 計測が可能であることを確認した。以上の結果より、本提案手法の有効性を確認した。

4. 結言

本研究では、細胞の培養環境において pH 計測を行うための計測用の光環境センサとリファレンス用の光環境センサ一体化した複合ハイドロゲル光環境センサを提案・作製し、3次元造形システムを用いた作製とセンサの評価を行った。今後は複数のリファレンス用センサを一体化し、計測環境で計測パラメータの検量線を作製し、組織内部環境の計測を行う。

5. 謝辞

本研究は、科研費（19H02096）の支援を受けた。

参考文献

- [1] H. Hashim, H. Maruyama, Y. Akita, F. Arai, "Hydrogel Fluorescence Microsensor with Fluorescence Recovery for Prolonged Stable Temperature Measurements," *Sensors*, 19, 12, pp. 5247-5259.
- [2] H. Liu, H. Maruyama, T. Masuda, A. Honda, F. Arai, "Multi-fluorescent micro-sensor for accurate measurement of pH and temperature variations in micro-environments," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 203, pp. 54-62, 2014.

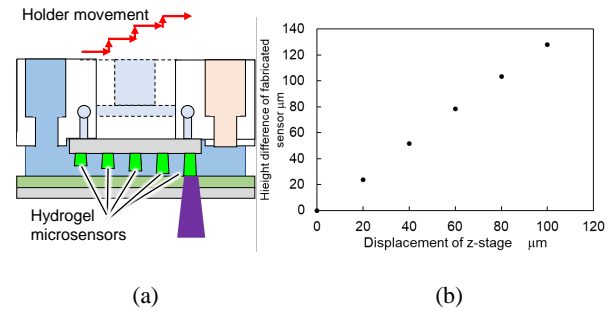


Fig. 3 Evaluation of height difference of fabricated hydrogel according to holder height. (a) Concept, (b) Result.

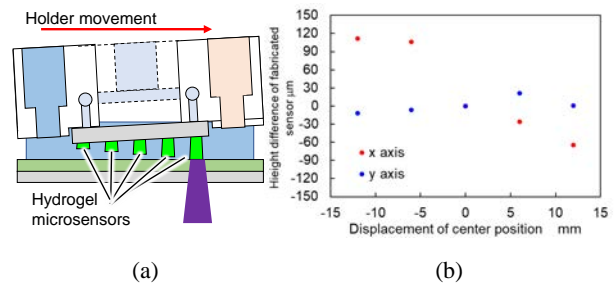


Fig. 4 Evaluation of height difference of fabricated hydrogel according to holder height. (a) Concept, (b) Result.

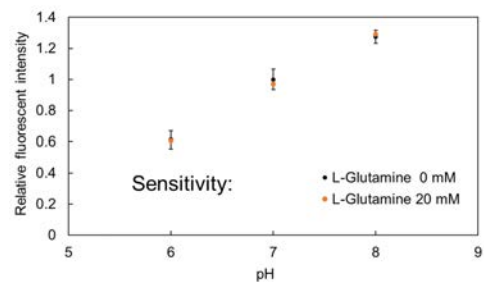


Fig. 5 pH calibration of microsensor.

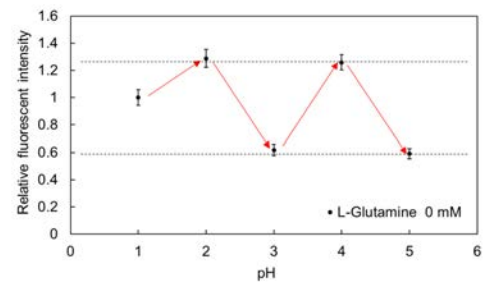


Fig. 6 Evaluation of repeatedly of microsensor.

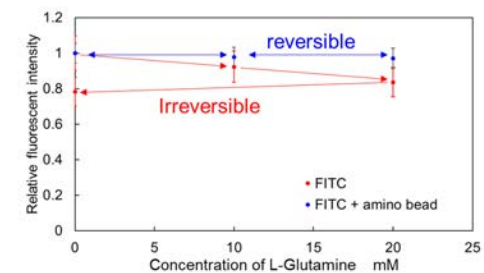


Fig. 7 Evaluation of effect of L-Glutamine.