

Title	Nano/micro Structure-based Chip Devices for Single Immune Cell Manipulation and Imaging Analysis
Author(s)	朱, 宸
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/76528">https://hdl.handle.net/11094/76528</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 ( 朱 宸 )	
論文題名	Nano/micro Structure-based Chip Devices for Single Immune Cell Manipulation and Imaging Analysis (単一免疫細胞の操作と画像解析のためのナノ・マイクロ構造を有するチップデバイスに関する研究)
論文内容の要旨	
<p>In this thesis, we discussed about the medical significance of single cells. Single cell analysis had been the main focus of studies among the scientists in the recent decades for its outstanding contribution to medical treatment. In the field of biomedical research, cell surface protein analysis was of particular interest due to their usefulness for novel phenotypic, diagnostic, prognostic, and therapeutic applications.</p> <p>Thus, in our second chapter, an alternative method had already been developed using a centrifugal microfluidic device to trap the single cell, conduct immunostaining, and measure the cell surface receptor fluorescence intensity. Among all the conventional microfluidic techniques, the centrifugal microfluidic platform provided many advantages and applications in whole blood separation, single cell and membrane protein analysis and monitoring, DNA microarray hybridization and colorimetric detection of biochemical markers in comparison to common chip-based microfluidic systems. In our research, the features of the design of our device had 1 inlet and 6 major channels. From the central inlet, the cell suspension directly flowed into the major channel. One major channel had 21 viewing areas and each area contained 93 trap sites; a total of 11,718 trap sites. To demonstrate the utility of the device, fresh cultured THP-1 and Jurkat Cells were tested and profiled with CD3, CD13, and CD31 biomarkers conjugated with PE (543 nm), APC (633 nm) and FITC(488 nm) fluorescence dyes. CD3 was selected due to its function in TCR signal transduction. The fluorescence images from each marker were obtained and analyzed using an outsourced software. The RGB intensity could be read out which realize the cell classification based on specific intensities ratio comparison. In addition, the cell size and circularity could be determined and images of the cells could be retrieved again after intensity profiling to conduct succeeding morphological assessments. This platform could greatly help in profiling cells based on a variety of cell surface receptors and also could provide information on the morphological condition and receptor protein distribution on the surfaceome of the cells.</p> <p>However, the cell surface detection was only focused on the external environment of the single cell, the detailed analysis of cell internal environment of cell cytokine secretion situation was also a significant index for better understanding of single cells. Cytokines were immunomodulating protein biomarkers secreted from immune cells and they are indicators of the functional status of the human immune system. They played critical roles in regulating cell signaling, cell differentiation, and inflammatory response in the immune system. Thus, in the next two chapter, we discussed about a method to improve the sensitivity of the COP detection film which is nanopillar surface treatment with oxygen plasma and the evaluation of the sensitivity improvement of the COP film by localized surface plasmon resonance (LSPR) technology via an easy integration with thick COP chip with 13 <math>\mu</math>m diameter microwell structure on the surface for single cell level cytokine secretion detection. In this research, the diameter of the microwell was set to 13 <math>\mu</math>m. The result showed that our fabricated device had the potential to trap single cells reaching over 60% occupancy efficiency with relatively low cell concentrations and volumes which was extremely significant in clinical diagnosis. Furthermore, the device showed the capability to detect the single cell absorbance spectrum peak red-shift caused by single cell cytokine secretions and a maximum of 2.8 nm peak shift was observed by our device through real-time cell monitoring which indicated that our improved COP detection film had a better performance and higher sensitivity compared to the old styled one.</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 朱 宸 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	民谷 栄一
	副 査	教授	関谷 毅 (産業科学研究所)
	副 査	教授	井上 康志 (生命機能研究科)
	副 査	准教授	遠藤 達郎 (大阪府立大学大学院工学研究科)

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、生物の基本単位である細胞を 1 細胞レベルで操作及び解析するための 1 細胞解析デバイスを設計・作成し、これを免疫細胞の機能解析へと応用展開したもので、以下にそれらの結果をまとめる。

- (1) 遠心操作によるマイクロ流体チップを新たに設計・作成し、8000 個の細胞を 1 細胞ごとに配置できる構造とした。これを用いて 85%の収率で 1 細胞の配置が可能であった。次にこれを免疫系の細胞である THP-1 細胞（マクロファージ由来）と Jurkat 細胞（T 細胞由来）に適用し、所定の遠心操作で 1 細胞ずつ配置できた。続いて細胞表面レセプターである CD3, CD13 を蛍光標識抗体を用いて染色し、蛍光イメージング解析を行った。その結果、FACS（蛍光フローサイトメトリー装置）で解析した結果と良い一致を示した。本手法は、FACS では困難である  $10^3$ - $10^4$  程度の微量の細胞集団の解析を可能とするだけでなく、1 細胞ずつの形状情報も入手でき、より精密な細胞解析を可能とした。
- (2) サイトカインは、免疫細胞の分化誘導に重要な機能分子であり、炎症、腫瘍など多くの病態にも関わっている。そのため、1 細胞レベルでのサイトカインの分泌活性の計測技術の開発は求められている。そこで、細胞からの分泌を直接測定できる手法として局在表面プラズモン共鳴デバイスに着目した。ここでは、COP（サイクリックオレフィンポリマー）を用いてナノインプリント法によりナノピラー構造を作成し、金薄膜を形成させた。吸収スペクトルのピーク変化量を指標に金薄膜の膜厚の最適化と酸素プラズマ照射を用いたナノ構造制御条件を検討し、感度の向上を実現した。
- (3) (2) で作成したナノピラー構造のチップを用いてサイトカインの 1 種である IL-6（インターロイキン 6）を測定するために、抗体をナノピラー上に固定化し、IL-6 の添加に伴う吸収スペクトル変化を調べたところ、10-1000ng/mL の範囲で測定できる見通しを得た。次に、1 細胞から分泌される IL-6 を計測するために、1 細胞を多数配置できるマイクロチャンバー構造を有するチップを作成した。この 1 細胞配置チップと抗体を固定化したナノピラーセンサーチップを貼り合わせることにより、所定の 1 細胞からの IL-6 の分泌活性について検討した。モデル細胞として IL-6 を多く分泌する Jurkat 細胞を 1 細胞ずつ配置し、細胞を生きた状態でスペクトルの時間変化を調べたところ、IL-6 の分泌を直接計測することが可能であった。

以上のように、本論文は、1 細胞を多数配置できるマイクロ流体デバイスを設計作成し、そのデバイス上で細胞表面レセプターの蛍光イメージング解析および細胞が分泌するサイトカインを計測するナノバイオセンサーの開発を可能にしたもので、関連する応用物理学研究に貢献するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。