

## マイクロ流路による原生動物の一細胞観察

熊野 いつか<sup>1</sup>, 末吉 真人<sup>2</sup>, 松本 佑介<sup>2</sup>, 平田 克樹<sup>2</sup>, 松本 悠希<sup>2</sup>, 細田 一史<sup>2</sup>,  
鈴木 宏明<sup>2,3</sup>, 四方 哲也<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>大阪大・工学, <sup>2</sup>大阪大・情報科学, <sup>3</sup>JST・ERATO)

### Single-cell observation of Protozoa using microfluidic devices

Itsuka KUMANO<sup>1</sup>, Makoto SUEYOSHI<sup>2</sup>, Yusuke MATSUMOTO<sup>2</sup>, Katsuki HIRATA<sup>2</sup>,  
Yuki MATSUMOTO<sup>2</sup>, Kazufumi HOSODA<sup>2</sup>, Hiroaki SUZUKI<sup>2,3</sup> and Tetsuya YOMO<sup>2,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Engn., Osaka Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Infrom. Sci. Tech., Osaka Univ., <sup>3</sup>ERATO, JST)

#### SUMMARY

Observing a single cell of Protozoa in real time is effective to meet goals of studying their division, predation, digestion, and dynamics of endosymbionts inside the Protozoan cell, but is difficult because of their high motility. In a previous study, the single cell observation was achieved by encapsulating a Protozoan cell in a microchamber with a diameter of about 100  $\mu\text{m}$ , but it still presented the problem that the Protozoan cell soon depleted the nutrient because the volume of the culture medium in the chamber was very small. For this study, we constructed a microfluidic device as a new method that enabled us to conduct continuous observation of living motile cells at single-cell level under microscope. This device was designed and fabricated using standard soft lithography method and was made of polydimethylsiloxane (PDMS). In this device, by trapping each single Protozoan cell at each gate of multiple narrow channels with a width of ca. 3  $\mu\text{m}$ , multiple living single cells were visible under constant condition with a fresh culture medium. We applied *Tetrahymena thermophila* in this channel and trapped them for several hours, observing their divisions. This device is also expected to be used for trapping varieties of other Protozoa.

**[目的]** 原生動物は運動性が高いため、顕微鏡観察をする際には主に細胞を固定化して観察が行われてきたが、この手法では同一細胞の連続観察が不可能である。原生動物の分裂や、捕食・消化の動態、また細胞内共生しているものに関しては細胞内共生者の動態など、一細胞単位での動態を調べるには、原生動物一細胞をリアルタイムで観察することが効果的である。

運動性の高い原生動物を、生きたままリアルタイムで観察する手法として、直径数 100  $\mu\text{m}$  程度のマイクロチャンパーに原生動物を閉じ込めて観察するという方法が先行研究で確立された<sup>1)</sup>。しかし、チャンパー内の栄養分を中の原生動物がすぐに使い果たしてしまい、一定条件で培養を続けられないという課題があった。これを克服する装置として、本研究ではマイクロ流路を作成した。先行研究において、幅、高さ約 30  $\mu\text{m}$  で、流路の抵抗の差を利用することで溶液を還流しながら直径 15  $\mu\text{m}$  のマイクロピエゾを流路内のトラップに固定化する技術が確立している<sup>2)</sup>。本研究ではこれを原生動物に適用するために改良し、常に新しい培地を流しながら一定条件の下で連続的観察することを試みた。具体的には、*Tetrahymena thermophila* (テトラヒメナ) の分裂などをリアルタイムに観察した。

#### [材料と方法]

##### テトラヒメナの培養条件

マイクロ流路に流すためのテトラヒメナは、合成培地もしくは Neff 培地を用い、30°C、静置条件で培養した。マイクロ流路中では温度制御はしておらず、室温で、流路に新しい培地（合成培地もしくは Neff 培地）を流して培養した。

##### 流路のデザインと作り方

マイクロピエゾの固定化に成功した流路 2 を参考にデザインした。流路の材料としては polydimethylsiloxane (PDMS) を使用した。

##### 流路へのサンプルの流し方

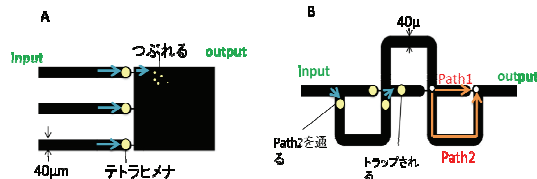
医療用シリンジ (1 ml, Terumo) と注射針 (Terumo) の先をやすりで削ったものを使用。直径  $\mu\text{m}$  のチューブを注射針とつなげ、チューブの先を流路の入り口に刺して連結した。

**[結果と考察]** まず、幅 40  $\mu\text{m}$  の流路の一部に幅 6  $\mu\text{m}$  の細い部分を作り、そこにテトラヒメナをトラップさせた (図 A) ところ、テトラヒメナが狭い流路に入る際につぶれてしまった。これはテトラヒメナが狭い流路を塞ぐと、流体の全圧力がテトラヒメナにかかってしまうためである。

これを解決するために、迂回路をもつ流路を設計した (図 B)。トラップとして機能する細い部分をも

つ直線流路 (Path1) と、迂回路として機能する方形波形の環状流路 (Path2) とを重ね合わせるように連結させた。トラップが空のときは、Path1の抵抗値 ( $R1$ ) が Path2 の抵抗値 ( $R2$ ) より小さくなる ( $R1 < R2$ ) ように設計することで、Path1 への流量 ( $Q1$ ) が Path2 への流量 ( $Q2$ ) より大きくなる ( $Q1 > Q2$ )。よって、トラップが空のときは細胞が流れに乗って Path1 に運び込まれ、細い部分の手前で止められる。すると細胞が Path1 をふさぐことで  $R1 > R2$  となり、 $Q1 < Q2$  に切り替わるため、次に流れ

てきた細胞は Path2 を通り、次のトラップに運び込まれる。このようにして、各トラップにおいて一細胞ずつ培養することができる仕組みになっている。これは先行研究でマイクロビーズをトラップできる装置<sup>2)</sup>を、原生動物用に改良したものである。この流路でテトラヒメナのトラップに成功し、その細胞分裂を観察することができた。今後はさらに、流路の幅や分岐路の本数、流速などの値を変えてデータを収集することで、トラップに最適な条件が見つかると考えられる。また、この装置は、テトラヒメナ以外の様々な原生動物を観察する装置として応用されることも期待できる。



#### [文献]

- 1) Matsumoto (2010) MS thesis Osaka Univ.
- 2) Tan and Takeuchi (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 104, 1146-1151.