

顕微 LSPR イメージングを用いた好中球の単一細胞解析

Single-cell analysis of neutrophils by microscopic LSPR imaging

○三田 大樹¹、西出 真之²、堀井 拓真¹、吉川 裕之¹、高松 漂太²、齋藤 真人¹、伊賀 光博³、熊ノ郷 淳²、民谷 栄一¹ (1. 阪大院工、2. 阪大院医、3. 横河電機 (株))

°Daiki Mita¹, Masayuki Nishide², Takuma Horii¹, Hiroyuki Yoshikawa¹, Hyota Takamatsu², Masato Saito¹, Mitsuhiro Iga³, Atsushi Kumanogoh², Eiichi Tamiya¹ (1. Graduate School of Engineering, Osaka Univ., 2. Graduate School of Medicine, Osaka Univ., 3. Yokogawa Electric Corp.)

E-mail: mita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

好中球は白血球の1種であり通常は生体を防御する一方、慢性的に活性化された状態が持続すると ANCA (抗好中球細胞質抗体; anti-neutrophil cytoplasmic antibody) 関連血管炎の原因となることで知られる。ANCA 関連血管炎の早期診断は臨床現場において望まれており、過活性の好中球の割合をリアルタイムで統計解析することが求められるが、有効な解析手法は報告されていない。一方、我々は LSPR チップに面分光システムを組み合わせ、ラベルフリーかつ高スループットの LSPR イメージングを開発してきた[1]。また細胞の不均一性を正確に捉えるため、大量の細胞を分離し、かつ個々のアウトプットを網羅的に扱う単一細胞解析に関しても取り組んできた[2, 3]。そこで本研究では、顕微 LSPR イメージングの構築とマイクロ・ナノ構造を有するプラズモンチップの作製を行い、好中球の単一細胞解析への応用を検討した。

顕微面分光システムは面分光システムと倒立顕微鏡により構築された。顕微面分光システムを用いると、対物レンズの倍率に応じた大きさの視野内の各領域における吸収スペクトルを測定することができる。マイクロ・ナノ構造を兼ね備えるプラズモンチップは、微細加工技術を利用し作製された Polydimethylsiloxane (PDMS) マイクロウェルアレイシートと金キャップナノピラー構造[4]により作製された。マイクロウェルアレイシートには直径 60 μm 、深さ 60 μm の円柱状の貫通穴が 100 μm 周期で 800 個配列されている。細胞はマイクロウェルアレイにより単離され、チップ底面の金ナノ構造により測定される。作製されたプラズモンチップの屈折率応答の平均値は 95.6 nm/RIU であった。また、プラズモンチップの単一細胞の捕捉率は細胞濃度が最適値のとき平均 35.9 %であり、平均 287 個の細胞がプラズモンチップ上に単離されると推定された。以上の顕微面分光システムとプラズモンチップを用いた測定系により、活性化因子 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) の添加された好中球の活性を単一細胞レベルで経時測定した。その結果、PMA の添加された細胞周辺においてプラズモンチップの共鳴ピークのシフトが検出された。共鳴ピークのシフトは、細胞の形態変化により引き起こされた金ナノ構造周辺の誘電率の変化に起因すると考えられる。したがって、好中球の活性を顕微 LSPR イメージングによりリアルタイムかつ単一細胞レベルで検出することに成功した。

[1] H. Yoshikawa et al., *Anal. Methods*, **7**, 5157–5161 (2015), [2] W. Espulgar et al., *Lab Chip*, **15**, 3572–3580 (2015), [3] K. Yamanaka et al., *Sensors and Actuators B*, **178**, 678–682 (2013), [4] M. Saito et al., *Anal. Chem.*, **84**, 5494–5500 (2012).