

プログラム名： セレンデピィティの計画的創出による新価値創造

PM名： 合田 圭介

プロジェクト名： 細胞分取技術開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 28 年度

研究開発課題名：

多機能細胞分取技術の開発

研究開発機関名：

奈良先端科学技術大学院大学

研究開発責任者

細川 陽一郎

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本プログラム「セレンディピティの計画的創出による新価値創造」では、ライフサイエンスにおける「砂浜から一粒の砂金」を高速・正確に発見・解析し、セレンディピティ（偶然で幸運な発見）を計画的に創出する革新的基盤技術を開発する。そのために、膨大な数（1兆個以上）の多種多様な細胞集団を1細胞の分解能で迅速・正確に複数のイメージングモダリティで画像取得・分析することで、から、稀少だが産業的・科学的に大きなインパクトを持つ細胞を迅速・正確・低コスト・低侵襲に発見し徹底的に解析する、夢の細胞検索エンジン「セレンディピター（計画的にセレンディピティを行う装置）」を開発することを目的としている。

本プログラムの目標を達成するために、マイクロチップ中での細胞分取技術は、高速イメージング解析により同定された希少で価値の高い細胞を有効に利用する上で欠かせない技術である。この技術達成のために、本プログラムではマイクロチップ中での細胞操作の研究開発動向を鑑み、その中で最も有望とされているレーザーによる細胞操作、誘電泳動等による細胞操作、ピエゾ素子を駆使した機械方式の細胞操作技術を基礎とし、高速・正確な細胞分取技術の開発が推進されることとなった。

この背景に基づき、本プロジェクトでは、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用したマイクロチップ中での多様な細胞分取技術の開発を推進した。高強度のフェムト秒レーザーを顕微鏡下で細胞培養液に集光照射すると、その集光点で数 $10 \mu\text{m}$ の領域に局在した応力波とキャビテーションバブルが発生し、細胞サイズの物体に衝撃力として作用する。細川らは、この衝撃力を利用することにより、基板に接着した培養細胞を個々に引きはがし、原子間力顕微鏡を用いてその接着力を評価することに成功している。マイクロチップ中の細胞培養液にフェムト秒レーザーを集光することにより、同様の現象が引き起こせると考えられる。キャビテーションバブルの発生時間は、 $1 \mu\text{s}$ にまで抑えられるという推定がなされており、この技術を用いることで、他の追随を許さない超高速な単一細胞分取を確立することを目的とした。

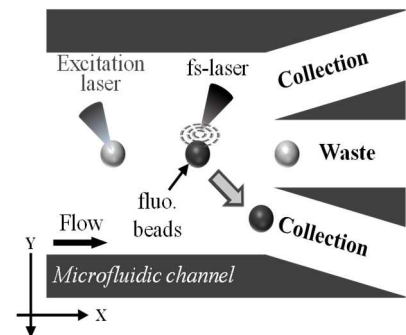


図 1 フェムト秒レーザーによるマイクロチップ内の流路での細胞分取の概要

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞分取システムの構成を検討し、マイクロチップ中にフェムト秒レーザーを集光照射し、細胞を分取できるシステムを構築した。さらに、ガラスで作製したマイクロチップに細胞を流すためのシリンジポンプを用いたマイクロ流体制御システムを構築した。

構築されたシステムの性能評価のために、分取が想定される細胞と同等の大きさをもつポリスチレン微小球により、システムの評価を行った。ポリスチレン微小球のサイズ、マイクロチップの流路幅、フェムト秒レーザーの集光条件、照射強度等により、マイクロチップ中の流路でフェムト秒レーザー誘起衝撃力により微小球の運動が如何に制御されるかについての詳細なデータを取得した。この結果を基に、動物細胞と藻類細胞を用いて分取実験を行い、衝撃力の高速弁として性能を評価した。

2-2 成果

図2に高速カメラにより撮影された蛍光微小球の分取の代表例を示す。蛍光励起用レーザーにより検出された微小球の近傍にフェムト秒レーザーが照射され、集光点で発生した衝撃力により微小球は押され、下側の回収用流路（図1のCollection）に導かれた（図2(a)）。このような分取の成功率を蛍光検出からフェムト秒レーザー照射までの信号遅延時間（ Δt ）の依存性とレーザー強度依存性を調べ、流路中にある微小球の空間選択性を評価した（図2(c)）。図2に示す条件では、フェムト秒レーザーが蛍光励起用レーザーの下流 $13 \mu\text{m}$ に集光されており、 1 m/s の微小球の速度から予測される理想条件の $\Delta t = 13 \mu\text{s}$ で分取成功率が最大となり、 $\Delta t = 10\text{--}20 \mu\text{s}$ の間で、微小球は回収用流路に導かれることが示された。 $10 \mu\text{s}$ の時間で、微小球はその

直径に相当する $10 \mu\text{m}$ の距離を流れるため、この結果は前後にある微小球にほとんど影響を及ぼさずに、標的となる微小球のみに衝撃力を作用させて分取できることを示している。微小球の流速は 1 m/s であり、本実験結果よりフェムト秒レーザー誘起衝撃力によりマイクロチップ中で、1秒間に最大10万個の微小球から標的微小球を分取できることが実証された。さらに、同等の大きさを持つ培養動物細胞に対しても同様の実験を行った結果、同等の性能が示された。現在、このような細胞を蛍光により検出し、分取する技術(FACS: Fluorescence activate cell sorter)として、マイクロキャピラリー中を流れる細胞を液滴に閉じ込め、その液滴を振り分ける方法が分取に採用されているが、この方法では1秒間に7万個程度が限界とされており、本手法はそれを上回る世界最高の性能を示している。

さらに、蛍光染色が困難であった藻類細胞に対して、フェムト秒レーザーを用いてポリペプチドにより作られた蛍光プローブを導入することに成功し、藻類細胞の代謝検出の新たな可能性を見出した。

2-3 新たな課題など

本実験に採用されたフェムト秒レーザーは、1秒間に100万発の性能をもっており、実証された秒10万個の細胞分取性能は、作製されたマイクロチップの流路中に流せる細胞数の限界により制限されている。今後、マイクロチップの改良を進め、秒100万個の細胞分取性能を実現することを目指す。一方で、ごく短時間に強い外力を作用させる本手法では、細胞へのダメージが懸念され、今後、細胞試料を用いた実験をおこなうことで、その生存率と高速性の相互関係を検証していかねばならない。

フェムト秒レーザーによる藻類細胞への蛍光プローブの導入は、静置培養条件で実証されたが、今後マイクロチップの高速流体中での導入を実現し、蛍光検出、分取と合わせた高速細胞操作システムを構築していきたいと考えている。

3. アウトリーチ活動報告

特になし。

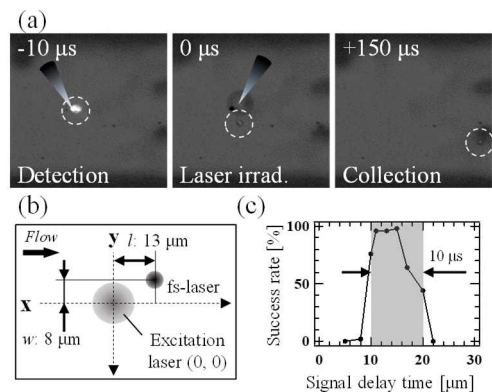


図2(a) 蛍光微小球分取の高速撮影像。(b) 蛍光励起用レーザーおよびfsレーザーの集光点の位置関係。(c) 蛍光検出からレーザー照射までの信号遅延時間(Δt)と分取成功率の関係。