

プログラム名： セレンディピ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： 基本システム開発・細胞計測技術開発・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 2 7 年 度

研究開発課題名：

セレンディピターのための細胞計測技術および細胞分取技術の開発

研究開発機関名：

国立大学法人東京大学

研究開発責任者

合田 圭介

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）の細胞集団から、稀少だが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。そのための具体的な取り組みは9つのプロジェクトからなり、当該年度に本研究開発機関が担当する各チームの目標は以下のとおりである。

プロジェクト1 チーム1 マイクロ流体チップ開発

流体デバイスの設計・製作を行ってプロジェクト2~6に供給する。同時に、全体を見通して流体デバイスやセルソーターシステムの最適化を進める。さらに、次年度における開発拠点の一元化をめざし、Serendipity Lab の設計を始める。

プロジェクト3 チーム1 STEAM 法の開発

第一四半期を目処に、Yb ファイバーレーザーを用いたSTEAMシステムを稼働させ、平成26年度に開発した信号取得系と組み合わせてイメージングサイトメトリー実験を行い、STEAMシステムのFOMを調べる。既に $N \sim 100,000$ cells/s を達成していることを鑑み、特異性Kを高めることに注力する。とくに、画像の信号対雑音比(SNR)の向上を図るとともに、位相差イメージングや微分干渉イメージングの検討を行い、プロジェクト4と連携して画像解析アルゴリズムを改良し、特異性Kを $10^4 \sim 10^6$ まで高めることを目指す。その後、更なる特異性向上を図るため、より短波長の光であるEr ファイバーレーザーの第二高調波を用いるシステムの製作を行う。

プロジェクト3 チーム2 高速蛍光イメージング法の開発

第二四半期を目途に基礎実験として静止サンプル等を用いて構築システムの性能評価を行う。その後、上記評価結果をフィードバックしてシステムの改良を必要に応じて行い、イメージングサイトメトリーの動作実証を行い、FOMを評価する。この際、高スループットの達成に主眼を置き、 $N > 50,000$ cells/s を目指すとともに、蛍光ラベルを利用することにより従来のFACSと同程度以上となる特異性 $K > 10^5$ 、感度 $S > 0.8$ を暫定目標とする。（但しK,Sについては、本開発技術が取得情報量の多いイメージングサイトメトリーであることを活用して次年度の改善検討を主眼に置く。）

プロジェクト3 チーム4 DCC 法

第二四半期を目途に基礎実験として静止サンプル等を用いて構築システムの性能評価を行う。その後、上記評価結果をフィードバックしてシステムの改良を必要に応じて行い、フローサイトメトリーの動作実証を行う。目指す目標は、シングルポイント計測で $N \sim 10,000$ cells/s とする。無標識測定の特性を活かし、従来のFACSでは計測不可能（すなわち感度 $S \sim 0$ ）である計測対象に対しての感度

を得ることを目標とする。更には、マルチプレックスな分光測定により得られる複数パラメータの情報を利用して、感度 **S** 及び特異性 **K** の向上を行う。

なお、本チームは分光・イメージングを主体とした技術開発であるため、スペクトル・イメージング情報をもとに細胞同定技術開発を行うプロジェクト 4 と密接に関係している。すなわち、プロジェクト 4 が要求するスペクトル・イメージデータの性能と、本チームの技術性能との摺り合わせが重要であり、密に議論を行う必要がある。さらに上記議論を通して本チームの課題抽出、アイデア創出を行うことで、更なる開発技術の向上を図る。

プロジェクト 5 チーム 2 高速細胞分取技術開発

信頼性の高い高速細胞分取を行う表面音響波技術を確立する。さらにプロジェクト 3 で開発される STEAM 等の高速イメージング技術との融合を図り、画像認識型セルソーターとしての検証を行う。目指すスループットは従来 SAW 技術の限界を超える $N \sim 5,000 \text{ cells/s}$ とする。上流において理想的な細胞計測・判定技術が行われたという仮定下において、 $\text{Recovery} > 0.3$ (0.3 の **S** と同等) と、 $> 99\%$ の **Purity** (~ 102 の **K** と同等) を実現可能にする実験的根拠をえる事为目标とする。

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

プロジェクト 1 チーム 1 マイクロ流体チップ開発

各プロジェクトへのチップ供給および全体設計の最適化を予定通り進めている。また Serendipiter のいくつかの技術要素を組み合わせた Serendipiter mini の企画、作成、改善に着手しており、この活動を通して全体設計に対する知見を収集している。Serendipiter Lab の設計にも着手した。

プロジェクト 3 チーム 1 STEAM 法の開発

予定通り Yb ファイバーレーザーを用いた STEAM システムを稼働させ、信号取得系、画像解析アルゴリズムと連携させてイメージングサイトメトリー実験を行った。画像の SNR 向上の工夫のほか、Er ファイバーレーザーを用いたシステム制作に着手した。

プロジェクト 3 チーム 2 高速蛍光イメージング法の開発

前年度に新規アイデアに基づき設計を行った複数の高速蛍光イメージング装置につき、システムの構築を行い、評価を行った。いずれの方式も目標とするスループット $N > 50,000 \text{ cells/s}$ に相当する速度での蛍光画像の撮像に成功した。いずれの方式でも生細胞からの蛍光画像取得に成功しており、十分な感度と特異性を有していることが見込まれる。当該年度は高スループットの達成を主眼においていたために画像取得は単色で行ったが、スループットを落とさずに多色イメージングに拡張できることが設計上明らかになっており、次年度の開発においてこれを行い、感度、特異性の向上を目指す予定である。

プロジェクト 3 チーム 4 DCC 法

GHz-DCC 法およびシングルレーザーFT-CARS 法を構築し、静止サンプルを用いて分光データを取得した。システムの改良を行い、計測速度、感度の改善を行った。また、構築した分光システムにマイクロ流体チップを導入し、フローサイトメトリーの原理検証実験を行った。プロジェクト4へのデータ提供を行い、解析法に関する議論を行った。また、フローサイトメトリーに向けた細胞トラッキング技術導入の検討を行った。

プロジェクト5 チーム2 高速細胞分取技術開発

開発を進める中で、液滴を用いた細胞分取技術も表面音響波を用いた細胞分取技術に並んで信頼性の高い技術であることが分かってきたので、両者を平行して進めることとした。表面弾性波を用いた細胞分取技術に関しては、原理検証を進めた。特に、さまざまな径を持つマイクロ粒子に対してどのような挙動を示すか検討し、知見を深めた。また、液滴を用いた細胞分取技術に関しては、原理検証だけに留まらず、細胞を用いた分取実験も成功させた。

2-2 成果

プロジェクト1 チーム1 マイクロ流体チップ開発

チップ供給などを通じて各プロジェクトの成果達成に寄与した。特にプロジェクト3では細胞を検出するために光学系の焦点位置に正確に細胞を流すことが必要となるため、超音波を用いて細胞を流路中心に集めるためのデバイスの設計・供給を行った。また、超音波を用いてチップ中でユーグレナなどの藻類を高速かつ簡便に生成する技術を開発したほか、マイクロ流路中の慣性力を利用して非常に簡易な構造で粒子のフォーカシングを行う流路デザインを考案した。これらの研究成果は次年度に向けて論文投稿準備中である。

プロジェクト3 チーム1 STEAM 法の開発

Yb ファイバーレーザーを用いた STEAM システムを稼働させ、期待通りのスループット N が得られることを確認した。また特異性 K が向上し、異なる状態のユーグレナ細胞を識別できることを確認した。この研究成果は Optics Letter 誌にて論文発表したほか、国際学会 SPIE Photonics West などで発表を行った。さらに、ユーグレナ細胞のほかに血液サンプルを用いた評価試験を進めており、次年度に向けて論文発表の準備を開始した。

プロジェクト3 チーム2 高速蛍光イメージング法の開発

複数の独自の蛍光イメージング方式（共焦点顕微鏡アプローチ、広視野顕微鏡アプローチ）において目標とするスループット 50,000 cells/s に相当する速度での画像取得に成功した。本成果は国際学会 SPIE Photonics West や第 63 回応用物理学会春季学術講演会で発表を行い、前者の発表に関連してプロシーディングスが Proceedings of SPIE 97200T に収録されている。取得された画像の質より感度、特異性の目標仕様を達成可能なことが見込まれており、次年度の開発においてより詳細な評価を行う。前

者の方式については核となるアイデアについて2件の特許出願を行った（後者については次年度前半に出願予定）。

プロジェクト3 チーム4 DCC 法

シングルレーザーFT-CARS法の開発を行い、毎秒24,000スペクトルで200-15000 cm⁻¹の広帯域ラマンスペクトルを計測する手法を実現した[Hashimoto et al., Scientific Reports 6, 21036 (2016)]。さらに、別の仕組みを用いたシングルレーザーFT-CARS法の開発を行い、高速化（毎秒50,000スペクトル）を実現した[M. Tamamitsu et al. 論文投稿中]。また、上記の技術に関する特許出願を行った。GHz-DCC法の開発も行き、毎秒10,000スペクトルを実現した。これらの高速分光システムを用いてマイクロ流路中を流れるポリマービーズのラマン分光を計測することに成功した。

プロジェクト5 チーム2 高速細胞分取技術開発

表面音響波技術を用いた高速細胞分取デバイスは基礎原理の検討を終えた。具体的には、マイクロ流路内を0.75m/sで流れるマイクロ粒子を流れ方向に対して垂直方向に40μm動かすことに成功した。液滴を用いた細胞分取技術も基礎原理の検討を終えた。具体的には、連続して流れる大きさ60μm液滴に細胞を封入して分取を行い、throughput = 5,000droplets/s、Specificity > 8×10⁴、Sensitivity > 0.85、FOM > 3.4×10⁸を達成した。

2-3 新たな課題など

プロジェクト1 チーム1 マイクロ流体チップ開発

プロジェクトやチームごとによってチップの設計や性能特性に対する要求が異なっており、単一の設計方針や製造方法に絞り込めないほか、複数のプロジェクトの技術を組み合わせた全体設計を考えるうえでの障害となっている。今後各プロジェクトの要求項目およびチップ設計のすりあわせを行い解決策を探る予定である。

プロジェクト3 チーム1 STEAM法の開発

特に無し

プロジェクト3 チーム2 高速蛍光イメージング法の開発

本チームの蛍光イメージング法や他の細胞計測技術をプロジェクト4の画像処理、プロジェクト5の細胞分取と統合する際に、マイクロ流路中の細胞速度のばらつきが分取性能（特に感度）に大きく影響することが議論により明らかになった。このため本チームで細胞流速の評価を行うためのシステムを検討し、設計を行った。次年度にこのシステムを構築し、プログラム内のオープンソースとして各メンバーが自由に使用できる環境を立ち上げることで、各プロジェクトの開発にフィードバックを行う予定である。

プロジェクト 3 チーム 4 DCC 法

特に無し

プロジェクト 5 チーム 2 高速細胞分取技術開発

研究開発を進める上で、液滴を用いることにより、Single 細胞解析などさまざまなメリットが存在することが分かってきた。セレンディピター実現に向けて、液滴の有用性を生かした細胞分取技術も可能性のひとつとして検討することで、本プログラムをさらに加速させることができると考えている。

3. アウトリーチ活動報告

日本光学会が主催する学術集会 Optics & Photonics Japan 2015 (OPJ2015) において、「高速イメージングの最前線」および「先端光技術のベンチャー事業化」の 2 本のシンポジウムを ImPACT メンバーで企画し、メンバーも発表する形で開催した。ここでは光学分野の専門家を対象に、本プログラムで取り組んでいる最先端の光学技術についての紹介およびディスカッションと、光学分野における研究と事業との橋渡しについてのディスカッションを行った。

また SPIE が主催する Photonics West BIOS において、合田 PM が立ち上げた新しいカンファレンス High-Speed Biomedical Imaging and Spectroscopy: Toward Big-Data Instrumentation and Management にて、平成 28 年 2 月に世界各国の参加者とともに、セレンディピティの計画的創出で取り組んでいる技術テーマについて交流および意見交換を行った。カンファレンスの様子は SPIE Photonic West 2016 News and Photos でも紹介され、Web に掲載されている

(<http://spie.org/about-spie/press-room/spie-photonics-west-2016-news-and-photos>)。

また、本プログラムの Facebook ページにおけるチーム紹介や成果紹介に協力した。本プログラムの Facebook ページに対しては 3 月 30 日時点で 310 件の「いいね」がついており、各チームからの情報発信が多くの方々に届けられている。