

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：オープンチップを用いた超高速細胞分取システムの開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 27 年度

研究開発課題名：

オープンチップを用いた超高速細胞分取システムの開発

研究開発機関名：

名古屋大学

研究開発責任者

新井 史人

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

膨大な数（1兆個以上）の細胞集団から、希少な細胞を高速（2,000 cells/秒）に検出し、ターゲットを正確（1 cell+1 以下）に分取するために、オープンチップを用いた超高速細胞分取システムの開発を行う。具体的には、メカトロニクス技術と微細加工技術を基盤に、オープンマイクロチャネル上への細胞配列から超高速ビジョンによる対象細胞の検出、超高速応答マイクロバルブと超精密ポンプによる細胞捕捉、超高精度ピペット制御による個別回収を行う。

H27年度の達成目標を以下に示す。

- ① 超高速流体制御技術（送液安定性：0.1%，応答速度：500 events/秒）
- ② オープンチップ分離技術（原理の確認）
- ③ 稀少細胞回収技術（回収細胞生存率：70%以上，分解能：1 cell+6 以下）
- ④ システム統合・制御技術（連続処理：5mL 以上、処理能力：2,000 cell/秒以上）

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

①超高速流体制御技術

超高速細胞分離に必要とされる、超安定な送液ポンプの開発を行い、目標である送液安定性：0.1%を達成した。また、オンチップポンプを用いた超高速細胞分取法を開発し、目標である応答速度：500 events/秒を超える 50,000 events/秒相当の性能を達成した。

②オープンチップ分離技術

オープンチップを用いた超希少細胞分離の実現のため、まずオープンチップの加工方法の確立と、オープンチップにおける安定送液を確認し、目標である本手法の原理確認を行った。

③稀少細胞回収技術

希少細胞を確実に回収するために、超高分解能のポンプを用いた一細胞回収装置の開発を行った。この装置を用いてユーグレナを対象とした細胞回収実験を行い、目標である回収細胞生存率：70%を超えた 100%の生存率を達成した。また、回収システムの吸引・吐出分解能は 1.4×10^2 cell 相当であり、目標の分解能：1 cell+6 cell 以下を達成した。

⑤ システム統合・制御技術

上記①で開発した超安定送液ポンプ及び超高速細胞分取を用いて、超高速細胞分取システムを構築し、連続処理量 10 mL 以上、及び処理能力 50,000 cell/秒相当の性能を実現した。

	KD scientific stage + Gastight syringe	MFC5-FLEX-8C-1000	Our system
			
Stability of pressure (σ)	0.386 kPa (10 kPa)	0.014 kPa (10 kPa)	0.009 kPa (10 kPa)
Response time (8 -10 kPa, step)	200 msec	2020 msec	50 msec
Max. number of ports	10	8	1

図 1 超安定送液ポンプの性能比較

	PLACS	SAW	On-chip Biotechnologies	Our system
				
Flow velocity [mm/s]	1500	< 100	500	<7500
Measurement [events/s]	No data	No data	4,000	1,000
Sorting [Hz]	23,000 (45,000)	3,000* *Droplet, estimated.	20	> 50,000* *Single shot
Purity [%]	90,000 (45,000)	No data	80	No data
Viability [%]	95.0 (82.8)	No data	No data	No data
Reference	Y. Chen et al. Analyst, 2013, 138, 7308 - 7315.	L. Schmid et al. Lab Chip, 2014, 14, 3710-3716	http://www.on-chip.co.jp/product/ps-302	

図 2 超高速細胞分取法の性能比較

2-2 成果

① 超高速流体制御技術

高精度圧力センサと、高速応答可能な圧力レギュレータを用いて超安定送液ポンプを開発した。図3に示す通り、開発したポンプの応答速度は約 50 ms、送液時の圧力安定性は 10 kPa を目標値とした際に±0.005 kPa であり、非常に安定な送液を行えることを確認した。

また、オンチップポンプをピエゾ素子により駆動する超高速流体制御技術を利用した、超高速細胞分取法の開発を行った。開発した手法の基本原則を図4に示す。開発した手法を用いて分取実験を行い、50,000 events/秒相当の速度での分取を行うことに成功した。

② オープンチップ分離技術

オープンチップでの分離を行うために、開口部を持つガラスチップの作製方法の検討を行った。サンドブラストによる開口部の作製と、プラズマ支援低温接合を用いることにより、オープンチップの作製に成功した。

③ 稀少細胞回収技術

超高分解能のポンプを用いた、一細胞回収装置を開発した(図5)。開発した装置は 1.4×10^{-2} cell 相当の吸引・吐出分解能を持ち、13体のユーグレナを対象とした回収実験を行ったところ、100%の回収成功率、及び生存率を示した。

④ システム統合・制御技術

①で開発した超安定送液ポンプと超高速細胞分取技術を用いてユーグレナを用いた分取実験を行い、50,000 cell/秒相当の分取性能を持つこと確認した。また、③で回収した一細胞回収装置を用いて分取後の細胞を回収、その後の細胞分裂を確認したところ、分取された細胞の生存率が100%であることが確認できた。

2-3 新たな課題など

本年度の成果により、超高速細胞分取技術としての要素技術は確立されたと言える。しかし、システムとしてのソーティング性能評価を行うためには、配列・検出・判別・分取技術との統合を行う必要があるため、H28年度はPJ1, PJ3及びPJ4と連携してソーティング性能の評価を行う予定である。

3. アウトリーチ活動報告

特に無し

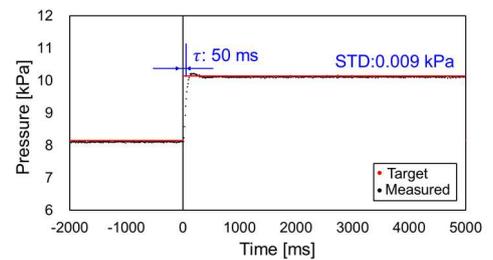


図3 超安定送液ポンプの安定性評価結果

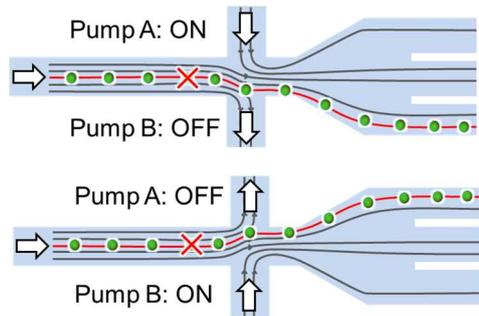


図4 超高速細胞分取法の基本原理

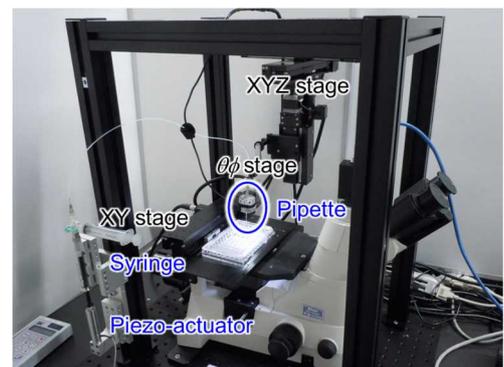


図5 一細胞回収装置

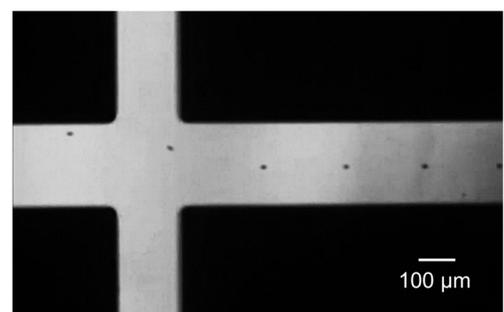


図6 開発した手法による細胞分取