

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14101

研究課題名(和文)大規模1細胞解析のための高速液滴分取デバイス

研究課題名(英文)High-throughput droplet sorting devices for large-scale single-cell analysis

研究代表者

磯崎 瑛宏 (Isozaki, Akihiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：10732555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大きな液滴の分取を従来とは桁違いに高速にできる技術を開発した。本技術では、液滴に加える力のタイミングと位置を巧みに制御することにより、壊れやすい大きな液滴を、優しくかつ高速に操作することを可能とし、従来比20倍の高速分取を実現した。さらに、本技術が得意とする100pL以上の大きさの液滴内において、藻類細胞が自由に運動できること、その藻類細胞や白血病細胞の生存率が上がること、ハイブリドーマ細胞の抗体産生量が増加することを示した。さらに本技術を用いて、母集団の約2%程度しか存在しない増殖スピードの遅い微生物を単離する原理実証を行い、本技術の有用性や汎用性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液滴分取スピードの高速化により、これまで見つけられなかったような希少な細胞を発見・単離できる可能性が大幅に向上する。これにより、微生物学、免疫学、遺伝学などの基礎科学における新たな発見や、精密医療、ウイルス検査、創薬、バイオ燃料開発、スマートセル産業などにおける効率化技術の開発といった、さまざまな応用展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：I have developed a high-speed large droplet manipulation method that is an order of magnitude faster than conventional methods. Specifically, by precisely controlling the timing and position of the force applied to droplets, the developed method enables gentle and fast manipulation of fragile, large droplets, resulting in a 20-fold increase in the manipulation speed compared to conventional methods. Furthermore, I have demonstrated that microalgal cells can move freely in droplets larger than 100 pL, which is an advantage of our method. The survival rate of their microalgal cells and leukemia cells is increased as well as the antibody production of hybridoma cells. Furthermore, I have used it to isolate microorganisms with a slow growth rate, which only exist in about 2% of the population, confirming its usefulness and versatility.

研究分野：Microfluidics

キーワード：Droplet microfluidics Single-cell analysis

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、**Droplet Microfluidics** と呼ばれるナノリットルサイズ(直径約 100 μm)の微小液滴を用いたマイクロ流体技術が 1 細胞解析技術として着目されている[1]。単一細胞を微小液滴の中で培養すると、その分泌物も同一の液滴内に留まるので、1 細胞レベルの解析が可能になる。例えば、特別な抗体を分泌する希少細胞を見つけ出し、その細胞を分取して培養・拡大することができれば、創薬に繋がる。しかしながら現在は、微小液滴を高速分取するデバイスが無いために、希少細胞を現実的な時間内に探し出して単離することができない。具体的には、0.01 nL 程度の液滴であれば 1 秒に数千個の分取が可能である一方で、1 nL 程度の液滴では 1 秒にたった数個の分取しか達成されていない。0.01 nL の液滴は細胞にとってあまりにも狭い空間であり、栄養不足などが原因ですぐに死んでしまう。液滴が大きくなるにつれて分取速度が低下することは、液滴の物理的な安定性に起因している[2]。すなわち、大きな液滴は小さな液滴に比べて、表面エネルギーが相対的に小さいために分裂しやすい。そのため、小さな力しか印加できず、分取速度が制限される。この液滴の大きさと分取速度のトレードオフを工学的に打ち破る方法があるか？ということが本提案の学術的問いとなる。

2. 研究の目的

本研究では、上記トレードオフを打ち破り、高速液滴分取装置を実現することを目的とする。具体的には、細胞培養可能な大きさを持つ液滴の高速分取デバイスを実現する。液滴の大きさは、最低でも 0.1 nL 以上とする。これは細胞培養時の細胞密度に換算すると、 10^7 cells/mL となり、細胞が増殖する限界密度に近い値またはそれ以上の値である。理想的には 1 nL の液滴の大きさの高速分取を実証することを目標とする。

3. 研究の方法

目的を達成するために、従来の単一電極ではなく、電極アレイ構造を用いる。電極への印加電圧が作り出す電場の空間的傾きにより、液滴は電極に引寄せられる。従来の単一電極では、高速に流れてくる液滴に「短い時間、強い力」を加えることにより、液滴の高速分取を実現しようとしてきた。しかしながらこの方法では、液滴がすぐに壊れてしまう。一方で電極アレイ構造では、流れている液滴を追いかけるようにして、「長い時間、弱い力」を加える続けることで、液滴を壊すことなく高速に分取できる。この技術は、抗体産生能を有する細胞の分取だけでなく、特定の薬剤に耐性のある細胞を分取したり、バイオ燃料への応用が期待される藻類を分取したり、様々な応用が考えられ、1 細胞解析技術の発展に貢献できる。

4. 研究成果

(1) 液滴分取デバイスの作製

電極アレイ構造を持つ液滴分取デバイスを、上記の方法に従って設計し、ソフトリソグラフィ技術を用いて作製した。作製したデバイスの概念図を図 1 に示す。作製したデバイスは 10 本の駆動電極からなる電極アレイを有しており、液滴に徐々に力を加えることにより高速に液滴を分取できるようになっている。さらに、マイクロ流路に傾斜をつけることにより、流体力学的力も利用して液滴分取速度の向上も図った。この時、液滴がマイクロ流路内を流れるのに従って駆動電極をオンオフする必要があるが、その精密制御を、**Field-Programmable Gate Array (FPGA)**を用いて行っている。このことにより、高速に流れてくる液滴を瞬時に判別し、時空間的に複雑な制御が必要になる電極アレイ制御をリアルタイムに行うことができる。

液滴分取における分取対象の液滴か否かの判断は、液滴内部に封入されている細胞の持つ(または細胞から分泌される)化学物質の蛍光情報を、励起レーザー光により励起して高感度光検出器により検出することにより行っている。本研究においては、励起レーザーとして 480 nm のレーザーと 532 nm のレーザーを切り替えて使用できるような光学セットアップを作製した。

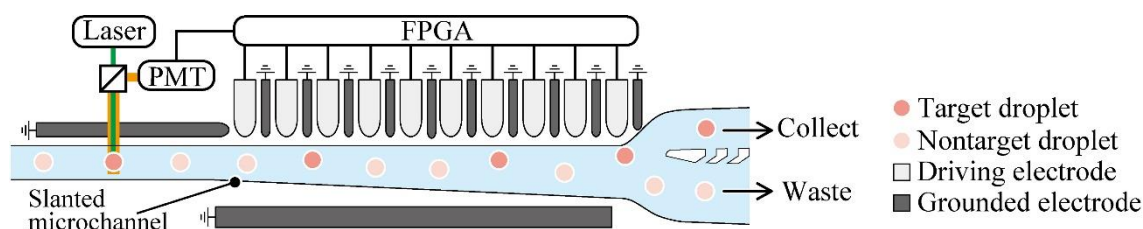


図 1 液滴分取セットアップ。励起レーザーと高感度光検出器 (PMT: Photomultiplier tube) により構成された光学系により、液滴内の蛍光情報を取得し、電気的な情報へと変換して FPGA に送られる。FPGA において目的液滴か否かが判定し、電極アレイを制御して液滴を分取する。

(2) 液滴分取の様子

作製したデバイスを用いて、液滴分取実験を行った様子をハイスピードカメラで撮影し、連続写真として図 2 に示す。ここでは、1nL の大きな液滴を使用した。ストレート構造を有するマイクロ流路を用いた液滴分取の様子と、傾斜構造を有するマイクロ流路を用いた液滴分取の様子をそれぞれ示している。ストレート構造を有するマイクロ流路を用いた場合 (図 2a)、液滴に電極からの力が加わっていない場合は流路中心をまっすぐに流れていくが、赤矢印で示している目的となる液滴が流れてきた場合、液滴が各電極で徐々に上方に引き寄せられ、Collection ポートに入っていく様子が分かる。このことにより、従来よりも高速で液滴を分取することに成功した。一方で、傾斜構造を有するマイクロ流路を用いた場合 (図 2b)、液滴に電極からの力が加わっていない場合でも流路下方に引き寄せられていることが分かる。この流体力学的力を組み合わせることにより、さらなる液滴分取速度の高速化に成功した。

(3) 従来法との比較

試作したデバイスを用いて得られた液滴分取スループットは、図 3 に示すように、従来の限界を大きく上回り、同一の体積を持つ液滴で評価すると、約 20 倍のスループット向上に成功した。より詳細には、次のように説明される。図 3 において灰色で示したデータは従来法による他のグループが取得した液滴分取速度をプロットしたものである。これらのデータから、液滴体積と分取速度の間に明らかなトレードオフがあることが見て取れる。液滴体積と分取速度の積を性能評価指標の一つと考えて対数グラフ上に直線を引くと、従来法はその積が 20,000 となるあたりにプロットされることが分かる。その一方で、赤色で示した我々のデータは、上記性能評価指数で示すと 400,000 以上となり、従来比 20 倍以上となっていることが分かる。

(4) 増殖の遅い酵母細胞の分取実験

試作したデバイスの有用性を示すために、増殖の遅い酵母細胞と速い酵母細胞を 1:49 の割合で混ぜた溶液から増殖遅い酵母細胞を単離する実験を行った。具体的には、1 nL の大きさの液滴に単一酵母細胞を封入して、培養して、分取する実験を行った。その結果、図 4 に示すように約 46 倍の濃縮に成功し、本研究の有用性を示すことに成功した。

<引用文献>

[1] Wang et al. Nature Biotechnology 32, 473-478 (2014). [2] Beneyton et al. Scientific Reports 6, 27223 (2016). [3] Sciambi and Abate, Lab on a Chip 15, 47-51 (2015). [4] Ahn et al., Applied Physics Letters 88, 024104 (2006). [5] Baret et al., Lab on a Chip 9, 1850-1858 (2009). [6] Kintses et al., Chemical Biology 19, 1001-1009 (2012). [7] Best et al., Analytical Chemistry 88, 10445-10451 (2016). [8] Mazutis et al., Nature Protocols 8, 870-891 (2013). [9] Clark et al., Lab on a Chip 18, 710-713 (2018). [10] Isozaki et al., Science Advances 6, eaba6712 (2020).

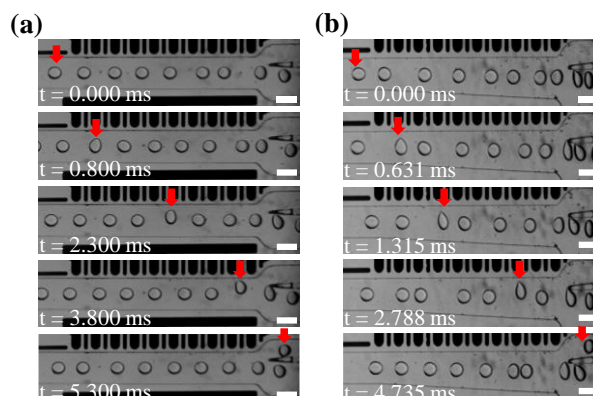


図 2 ハイスピードカメラで観察した液滴分取動作。(a) ストレートマイクロ流路を用いた場合。(b) 傾斜マイクロ流路を用いた場合。スケールバーは 20 μm 。

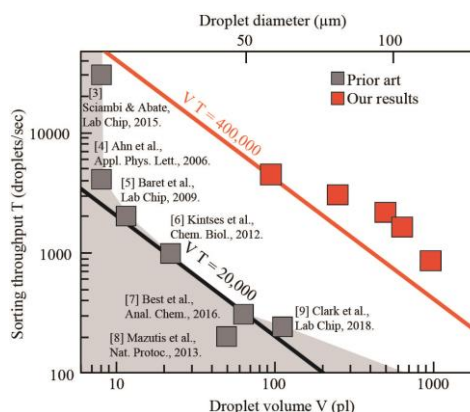


図 3 液滴体積と液滴分取速度の関係。従来研究のデータ [3-9] と本研究で得られたデータをプロットした。このグラフは研究代表者らの論文の図を基に改変した [10]。

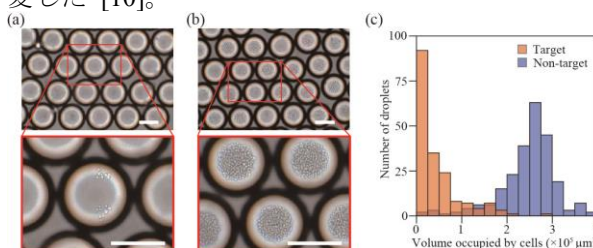


図 4 増殖の遅い酵母細胞の分取。(a)分取された増殖の遅い酵母細胞。(b)分取された増殖の速い酵母細胞。(c)分取性能の定量評価。約 46 倍の濃縮に成功。このグラフは研究代表者らの論文の図を基に改変した [10]。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯崎 瑛宏、中川 悠太、Mun Hong Loo、芝田 悠大、田中 直樹、Dwi Larasati Setyaningrum、Jee-Woong Park、白崎 善隆、三上 秀治、上村 想太郎、Dino Di Carlo、合田圭介
2. 発表標題 電極アレイを用いた高速液滴分取
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chenqi Zhang, Mun Houg Loo, Yuta Nakagawa, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda
2. 発表標題 ow-loss droplet picking for high-throughput rare-cell sorting
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Nakagawa, Mun Hong Loo, Shinsuke Ohnuki, Yoshikazu Ohya, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda
2. 発表標題 A droplet microfluidic platform for separation of cells with low proliferative activity
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯崎 瑛宏, Dunhou Huang, 合田 圭介
2. 発表標題 電極アレイを用いた多分岐高速液滴分取
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 悠太
2. 発表標題 電極アレイを用いた超高速液滴分取とその応用
3. 学会等名 日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Loo Mun Hong
2. 発表標題 An electrode-array-based high-throughput nano-liter-droplet sorter assisted by a slanted microchannel
3. 学会等名 日本化学会春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯崎瑛宏
2. 発表標題 微小液滴内におけるハイブリドーマの抗体産生量
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第38回研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------