

令和 7 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H01453・23K22724

研究課題名（和文）プロトプラスト再生理解のためのオンチップ機械指標活性化型細胞ソーティングの学理創成

研究課題名（英文）On-chip mechano-index activated cell sorting to understand protoplast regeneration

研究代表者

佐久間 臣耶（Sakuma, Shinya）

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：40724464

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プロトプラスト再生の理解のために、オンチップ機械指標活性化型細胞ソーティングの学理創成を目的とし、マイクロ流体チップ内にロボット構造体を統合したロボット統合型マイクロ流体チップを用いた細胞操作・計測技術を活用・深化させ、以下の4つの観点から研究を行い、粒子の操作・計測技術を創出した。(I) 細胞を一定間隔で流路内の細胞計測部に搬送する技術（細胞ローディング）、(II) ハイスループットな細胞の機械指標計測技術、(III) 細胞を複数のグループにソーティングする技術（マルチソーティング）。そして、これら基盤技術を用いた、(IV) プロトプラスト再生の数理解析の実施を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロトプラスト再生における機械指標の取得は、植物細胞が二酸化炭素を吸収して細胞壁に変換する反応について、単一細胞レベルでの新しい原理的理解を提供する。その理解に基づき、植物細胞培養の好適条件を決定すれば、カーボンニュートラル社会へ向けた二酸化炭素の資源化が加速され、世界規模での社会貢献が期待できる。本研究で世界に先駆けて提案した、機械指標活性化型細胞ソーティングは、プロトプラストの機械指標をハイスループットに計測・解析するための基盤的技術として、プロトプラスト再生理解の学理創成に貢献するのみならず、例えば、微細加工技術や、超高速流体制御技術などの関連分野においてインパクトの大きいものである。

研究成果の概要（英文）：This research aims to establish the on-chip mechano-index activated cell sorting for understanding protoplast regeneration. By utilizing and advancing the technologies of single cell manipulation and analysis based on a robot-integrated microfluidic chip, which integrates robotic structures within a microfluidic chip, we conducted this research from four perspectives.

(I) Technology for transporting cells at regular intervals to the cell measurement section within the flow channel (cell loading), (II) High-throughput mechanical index measurement technology for cells, (III) Technology for sorting cells into multiple groups (multi-sorting), (IV) Mathematical analysis of protoplast regeneration

研究分野：ロボティクスおよび知能機械システム

キーワード：マイクロ・ナノロボティクス マイクロ・ナノフルイディクス マイクロ・ナノメカトロニクス プロトプラスト microTAS MEMS

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物はあらゆる組織が「分化全能性」を持つ生物として知られている。根・茎・葉・花弁など、さまざまな組織に植物ホルモンを処理すると「カルス」と呼ばれる「脱分化」状態の組織に遷移し、諸条件が満たされると、カルスから再度、根・芽・胚などの組織が分化(再分化)して最終的には個体となる。現在、カルスへの脱分化と再分化は、組織片(細胞の塊)を用いた生物学的オミクス指標計測に加え、カルスの分裂過程の目視確認を基盤として行われており、1細胞レベルでの細胞動態の理解に期待が高まっている。植物細胞は、細胞壁で細胞同士が癒合しているため、細胞壁を溶解させた「プロトプラスト」とよばれる状態にして、はじめて1細胞ずつ取り扱うことが可能となる。プロトプラストからカルスを誘導する(ここではプロトプラスト再生とよぶ)過程において、光合成により大気中の二酸化炭素を多糖類として固定し、細胞壁再生が行われる。さらに、細胞壁が再生した細胞のうち、好適な条件の細胞のみが分裂を開始し、細胞分裂が続くと、組織片由来と同じような見た目のカルスを形成する。最終的に、このカルスのうちの一部のみが、芽・根などの組織を分化させる。しかし、細胞培養の好適条件の検討が難しさなどの要因から、プロトプラスト再生の理解は進んでいない。例えば、プロトプラスト再生に要する時間は、動物細胞の分化・誘導解析に比べ、非常に長いことから、一般的なオミクス解析は、細胞固定や細胞溶解などを経て、エンドポイントとして実施される。そして、これらの結果を受けて、再度、植物種・生育条件、培養条件が決定されるため、1回のトライアルのサイクルが非常に長い。このサイクルを加速するためには、プロトプラストをライブ状態で計測し、培養条件のスクリーニングを早期に実施できる新しいモダリティの創成が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、新たな解析モダリティとして、機械指標に注目した。機械指標計測は、細胞固定や細胞溶解などの処理を必要としないため、ライブ状態での細胞解析を可能とし、プロトプラストの細胞壁再生においては、劇的に変化すると想定される細胞全体の機械指標を用いて定量的に評価することができると考えられる。そこで本研究では、プロトプラスト再生の理解のために、オンチップ機械指標活性型細胞ソーティングの学理創成を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、プロトプラスト再生の理解のために、オンチップ機械指標活性型細胞ソーティングの学理創成を目的とし、マイクロ流体チップ内にロボット構造体を統合したロボット統合型マイクロ流体チップを用いた細胞操作・計測技術を活用・深化させ、以下の粒子の操作・計測技術を創出した。(I) 細胞を一定間隔で流路内の細胞計測部に搬送する技術(細胞ローディング)、(II) ハイスループットな細胞の機械指標計測技術、(III) 細胞を複数のグループにソーティングする技術(マルチソーティング)。そして、これら基盤技術を用いた、(IV) プロトプラスト再生の数理解析の実施を行った。次項にその詳細を記す。

(I) 細胞ローディング技術

ハイスループットな機械指標計測を目的として、図1(a)に示すような、細胞を等間隔に計測部へと搬送するための細胞ローディング技術の確立を行った。本技術では、まず、対象粒子をチップに導入した後、超音波を用いた音響フォーカシング技術により、粒子をマイクロ流路内中心に一列に配列する。この時、粒子の空間的間隔はポアソン分布に従う。その後、流体制御により、流路内の流体を吸引することで粒子間の間隔を狭める。そして、粒子間に高速な局所流を導入し、その圧力場を用いて、粒子に停止・搬送を促すことで、局所流の生成周期に粒子の時間間隔に統制する。この操作をもって、ポアソン分布を打破する。

この細胞ローディング技術を実証するべく、ガラス-シリコン系の材料で構成した高剛性マイクロ流体チップを作製した(図1(b))。本デバイスと音響フォーカサー及びピエゾアクチュエータを統合したマイクロ流体システムを構築し、粒子間隔制御の基礎検討を行った。まず、粒子間の間隔を狭めるための、音響フォーカシングおよび流体吸引操作の評価を、100 μm のポリスチレンビーズを用いて行った。なお、1度に大量の流体を吸引すれば、粒子の吸引用流路への誤った流入が発生する。これを防ぐ目的で、当該流路は、多数の配列流路で構成されており、流れ方向に対してその幅が狭まるように設計されている。本設計により、流量が線形に減少することは、有限要素解析により実証しており、実験においては、ミリ秒スケールの高速流体環境で粒子間隔を狭められることを示した(図1(c))。とりわけ、0.9 m/s の高速流れ中で、最大8倍程度まで粒子間距離を縮小できることを実証した(図1(d))。続いて、局所流生成による粒子間統制の評価を行った。評価においては、局所流をエタノールによって可視化し、粒子の運動をハイスピードカメラによって観察した。なお、局所流は、ピエゾ駆動型オンチップメンブレンポンプによって2ミリ秒毎に生成・制御した。その結果、局所流の生成に合わせて、粒子が停止・搬送され、その粒子間隔が統制できることを確認した(図1(e))。この局所流生成前後の粒子の時間間隔を画像解析によって計測した結果、生成前はランダムであった粒子の時間間隔が、生成後には、

生成周期である 2 ミリ秒の倍数に集中していた (図 1 (f)) 。このことから、本システムは 500 個/秒相当の速さで粒子の時間間隔を統制し、ポアソン分布を打破することが可能であることを実証した。既存のオンチップローディング技術は動物細胞のような数十 μm の粒子を対象としており、100 μm を超える大型微粒子を 100 個/秒以上の速さで間隔統制した報告はみられない。以上から、確立した粒子操作技術は、既存の技術がカバーしていない粒径に対して、高速に間隔統制が可能な技術である。

(II) ハイスループット機械指標計測技術

図 2 (a) に示すように、力センサーをマイクロ流体チップに統合した、ロボット統合型マイクロ流体チップを用いることで、ハイスループットな機械指標計測を実施した。本技術は、チップ内に流入する細胞を高感度力センサプローブで圧縮し、その反力をプローブの変位として計測することで、機械指標計測を連続的に行う。

本計画を実施するべく、まず、ロボット統合型マイクロ流体チップの設計・作製を実施した。従来のロボット統合型マイクロ流体チップ作製の時間的・経済的コストが高かったことを考慮し、本研究では、エンジニアリングプラスチックを基盤材料としたデバイスの新規作成プロセスを確立した。具体的には、機械加工のみでマイクロ構造および入口/出口を加工したシクロオレフィンポリマー層と、レーザーアブレーションにより力センサプローブを組み込んだポリイミド層からなるマイクロ流体チップを作製し、これにより作製における時間的・経済的コストをそれぞれ 10 倍以上、削減することに成功した (図 2 (b)) 。なお、単一細胞レベルの力計測には、プローブの高分解能の変位計測が求められる。そこで、プローブ表面上に周期的な幾何形状のパターニングを施すことで、サンプリングモアレ法に基づいた、カメラの空間分解能を克服する、高分解能計測を実現した。そして、本デバイスにおける機械指標計測の基礎検討を、藻類の一種であるボルボックスを用いて行った。その結果、細胞の変形率に対する反力の計測に成功し、さらには、個体によって機械特性が異なっていたことから、個体差の計測が可能であることを実証した (図 2 (c)) 。

以上の成果に加えて、申請者は、計測のスループットのさらなる向上を目指して、超音波を用いた細胞の音響インピーダンス計測に基づいた高速細胞機械指標計測システムの構築を行った。本システムでは、細胞の機械指標を流れ環境下において非接触に計測可能であることから、従来の接触式計測における、粒子の位置制御・プローブによる圧縮・計測後の搬送に伴う、計測時間の増大を解決し、よりハイスループットな計測が見込める。なお、本計測においては、超音波の照射によって得られる反射波形の強度から音響インピーダンスの算出が可能であり、この指標は対象の弾性と相関がある機械指標である。図 3 (a) に構築したシステムを示す。本システムは、直径 40 μm 程度の超音波照射用微小孔を設けたガラスキャピラリーを基盤として構成した。キャピラリーに統合した音響フォーカサーは、粒子を流路中央に配列しながら微小穴への搬送を可能とするため、超音波プローブと粒子間の距離を一定に保ち、計測条件を統制することができる (図 3 (b)) 。構築したシステムの基礎評価を実施した結果、機械指標計測のサンプリング周波数は 30 kHz 程度であ

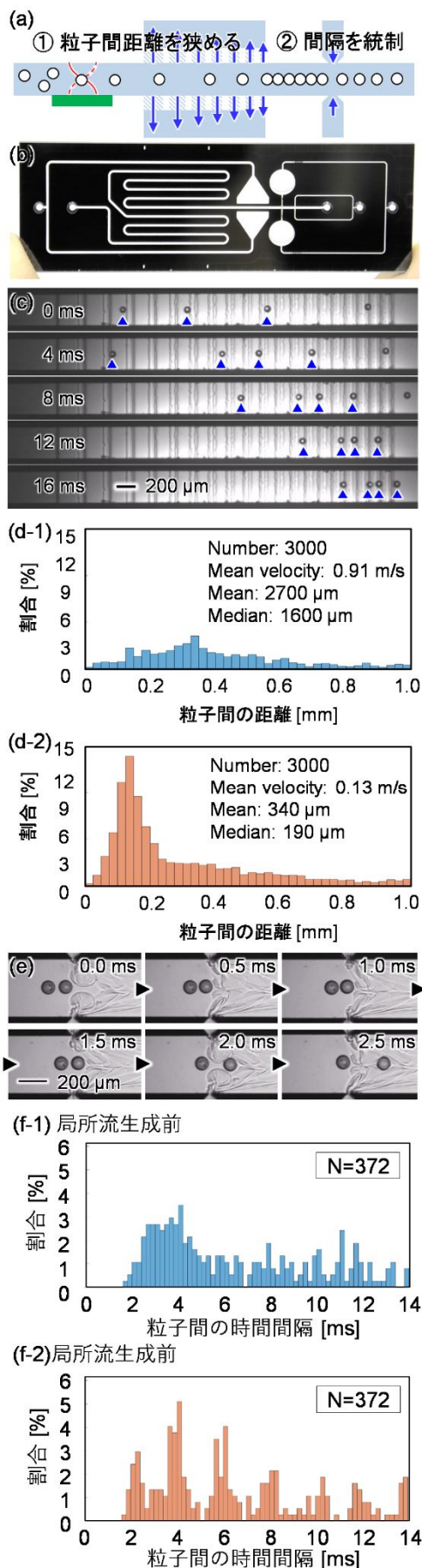


図 1 細胞ローディング技術 . (a) 概念図 . (b) 作製したマイクロ流体チップ . (c) 粒子間隔縮小の様子 . (d) 流体制御前後における粒子間の距離の変化 . (e) 局所流による粒子間隔統制の様子 . (f) 局所流前後における粒子間隔の変化 .

り、理論上、従来の 1000 倍以上のスループットでの計測が達成可能である。続いて、提案手法の原理検証のため、ガラスビーズとハイドロゲルビーズを用いた反射強度の計測を実施した。その結果、図 3 (c) に示す通り、材料の機械特性に応じて強度の異なる反射波形が取得できることを実証した。さらに、本手法を、微細藻類であるユーグレナに適用したところ、反射波形の取得に成功し、細胞へ適用が可能であることを確認した。また、取得波形から算出された音響インピーダンスは、ガラスビーズが 13.6×10^6 kg/m²s、ハイドロゲルビーズが 2.7×10^6 kg/m²s、ユーグレナが 3.0×10^6 kg/m²s であった。以上のことから、本技術は、細胞の物理量を取得可能な既存のオンチップ機械指標計測技術の中で、極めてハイスループットな計測技術であり、微粒子の種類を超えて機械指標を取得することが可能である。

(III) オンチップ細胞マルチソーティング技術

提案するオンチップ細胞マルチソーティング技術では、局所的に打ち出された少量の高速な流体が、流路壁との物理的な相互作用により渦を生成し、この渦が周りの流体を巻き込みながら成長することで圧力の壁として、粒子が搬送される分取流路を高速に切り替える。

本手法を実証するべく、高剛性樹脂材料を基盤としたマイクロ流体チップ、サンプル導入を行う流体系、粒子の蛍光を検出する光学系、検出値に基づいて渦サイズを制御し、粒子を分取する電気系、からなる蛍光活性型オンチップマルチソーティングシステムを構築した(図 4 (a))。具体的には、サンプル導入とシースフローによるサンプル集束の流体制御を可能とする圧力制御ポンプ、粒子の蛍光励起および検出を担うダイオードレーザーと光電子倍增管、検出値に基づいてポンプの駆動波形を生成・送信する計算器と増幅器、以上を一つシステムに統合し、倒立顕微鏡上に組み込んだ。マイクロ流体チップ中には、渦生成のためのオンチップメンブレンポンプを組み込み、粒子を 4 つのグループに分けるための、7 分岐 4 出口の分取流路を設計した(図 4 (a)右下写真)。構築したシステムを用いて、まず、分取操作の鍵となる渦の生成およびそのサイズ制御の基礎評価を行った。オンチップメンブレンポンプにエタノールを充填し、超純水に対して局所流を印加することで、渦の可視化を行い、マイクロ渦の生成を顕微鏡にて確認した(図 4 (b-1))。このとき、有限要素解析による、局所流れの流速推定を行ったところ、6 m/s 程度であった。これは、800 以上のレイノルズ数に相当することから、本流体制御手法は、マイクロスケールの超高速流れをサブミリ秒の時間スケールで制御ができる、これまでに類を見ない高速流体制御技術である。続いて、ポンプの駆動電圧に基づく渦の変位制御を行ったところ、グループへ 0 から 3 への粒子の軌道切り替えに相当する、変位制御が可能であることを確認した(図 4 (b-2))。さらに、160 μm の蛍光ビーズを用いて、大型微粒子のマルチソーティングを行ったところ、4 グループへの分取操作を達成し、その応答速度から、313 個/秒相当のスループットが達成可能であることを示した(図 4 (c))。既存のオンチップマルチソーティングの最大粒径は 100 μm であり、そのスループットは 10 個/秒である。このことから、確立したソーティング技術はこれまでカバーされていなかった大型微粒子を高速に選別する処理能力を有しており、プロトプラスト

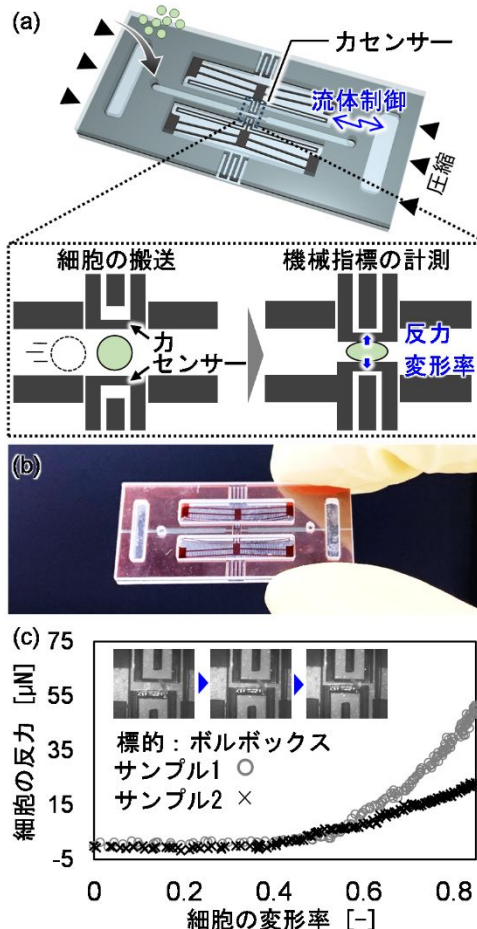


図 2 ロボット統合型マイクロ流体チップによるオンチップ機械指標計測。(a)概念図。(b)作製した樹脂製マイクロ流体チップ。(c) ボルボックスの機械指標計測。

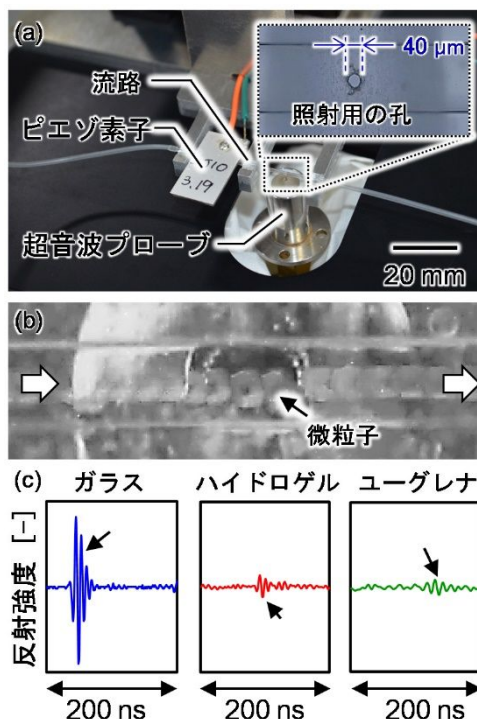


図 3 超音波計測に基づくオンチップ機械指標計測。(a)システム図。(b)計測の様子。(c)取得した各微粒子の反射波形。

だけでなく、細胞凝集体や花粉の化石といった様々な学術領域における重要な大型微粒子の選別に貢献することが期待できる。

(IV) プロトプラスト再生の数理解析

プロトプラスト再生の定量的理解に向けて、プロトプラストの機械指標計測を行った。プロトプラストの細胞壁再生に伴う機械指標計測においては、膜が破裂するまでの力学的挙動を取得することが望ましい。しかし、従来の力学モデルの多くは、微小変形領域での測定を前提としており、膜の破裂まで考慮した機械指標の取得は困難であった。そこで申請者は、現在までに構築した高分子理論に基づく非線形の変形モデルをプロトプラストの計測に適用した。これにより、変形率 60% までをカバーした大変形領域の応力に基づく機械指標を取得することが可能である。実際に、ロボット統合型マイクロ流体チップを用いてプロトプラストの機械指標計測を実施した結果を図 5 に示す。流体制御により、プロトプラストの位置を制御し、力センサプローブによって圧縮することで、微小変形から破裂までの細胞の反力と変形率を計測することに成功した (図 5 (a))。画像解析に基づき、細胞の変形率と力センサプローブの変位から算出される細胞の反力を計測した結果を図 5 (b) に示す。プロトプラストの変形率に対して反力が增大する様子が観察される。先述の力学モデルに基づき計測値へのフィッティングを行うことで、機械指標の一つであるヤング率を算出し、0.16 kPa の値を得た。本計測は、プロトプラストの細胞壁再生過程におけるヤング率を単一細胞レベルで計測した先駆的な例であり、プロトプラスト再生の理解に貢献することが期待できる成果である。

4. 研究成果

総括して、以下の成果を得た。(I) 細胞ローディング技術の創出：既存の技術ではカバーされていない、粒形 100 μm の大型粒子を対象として、最大 500 個/秒のスループットで間隔統制を実現した。(II) ハイスループット機械指標計測技術：エンジニアリングプラスチックを基板材料とした新規のマイクロ流体チップ作製プロセスを実現し、高剛性樹脂材料によるロボット統合型マイクロ流体チップを創出。本デバイスにより、単一細胞レベルでの機械特性計測に成功。さらに、既存技術に対して、1000 倍以上のスループット改善が見込める、超音波型非接触式機械特性計測技術を開発し、高速な微粒子・細胞の音響インピーダンス計測を実現。(III) オンチップマルチソーティング技術：数百のレイノルズ数をサブミリ秒で制御する、超高速オンチップ流体制御を達成し、マイクロ渦生成・制御に成功。さらに、既存の技術ではカバーされていない、粒形 160 μm の大型粒子を対象として、300 個/秒相当のスループットで 4 グループに選別することに成功。(IV) プロトプラスト再生の数理解析：プロトプラストの機械特性計測を実施し、これまで見込みに乏しかったプロトプラストのヤング率の計測に成功。

以上により、ロボット統合型マイクロ流体チップを基盤とした、既存の技術を大きく超える、細胞の操作・計測技術を確立するとともに、プロトプラストの機械特性を単一細胞レベルで評価し、プロトプラスト再生に関連する新たな計測値と機械的特性の知見を得た。

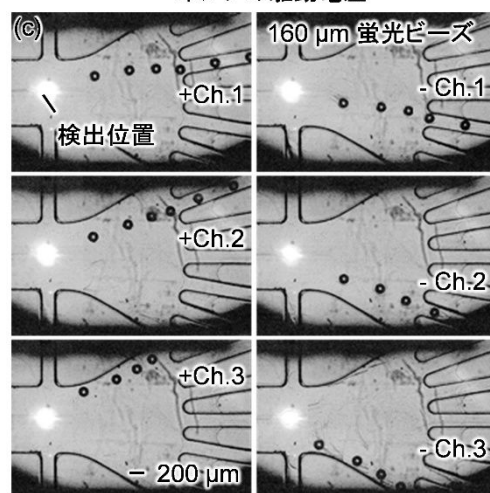
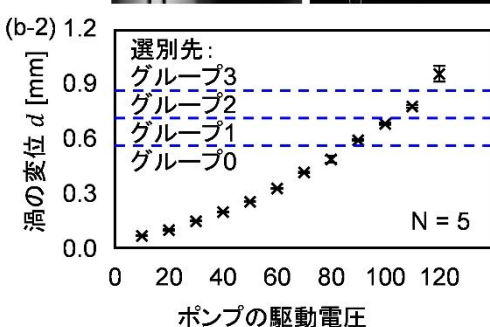
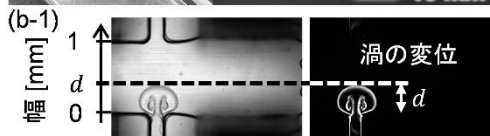
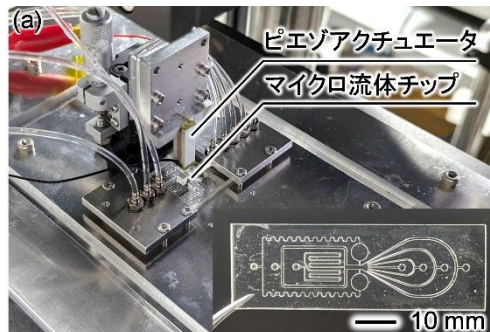


図 4 オンチップ細胞マルチソーティング技術。(a) 蛍光活性型オンチップマルチソーティングシステム。(b) 渦生成の様子。(c) 大型微粒子の高速オンチップマルチソーティング。

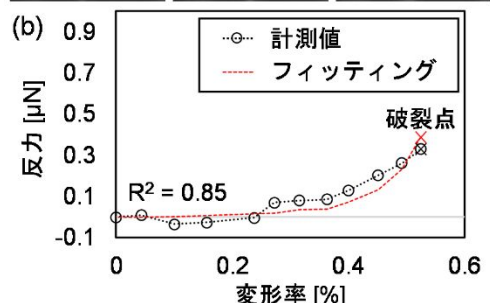
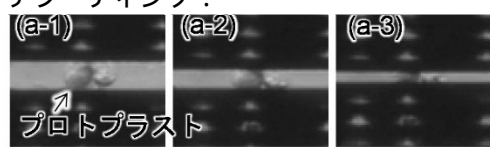


図 5 プロトプラストのオンチップ機械指標計測。(a) 計測の様子。(b) 応力-ひずみ線図。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Makoto Saito, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
2. 発表標題 High-speed repetitive osmotic stimulations to a single cell by utilizing micro-vortices
3. 学会等名 The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Makoto Saito, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
2. 発表標題 On-demand Local Liquid Replacement by Utilizing Microvortex
3. 学会等名 The 34th 2023 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Yuki Goto, Niko Kimura, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
2. 発表標題 Non-contact mechano-indexing of microparticles utilizing ultrasound microscopy
3. 学会等名 Materials Today Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Nariaki Kiyama, Makoto Saito, Yoko Yamanishi, and Shinya Sakum
2. 発表標題 Fully polymer-based robot-integrated microfluidic chip for mechanical characterization of single particles
3. 学会等名 The 37th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2024) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Nariaki Kiyama, Makoto Saito, Niko Kimura, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
2. 発表標題 Flow cytometric mechano-indexing reveals time-transition of bioparticles
3. 学会等名 The 37th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2024) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 木山誠啓, 室岡大晴, 齋藤真, 山西陽子, 佐久間臣耶
2. 発表標題 細胞の機械特性計測のための樹脂製ロボット統合型マイクロ流体チップ
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2023 in Nagoya (ROBOMECH2023)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 木山誠啓, 山西陽子, 佐久間臣耶
2. 発表標題 樹脂製ロボット統合型マイクロ流体チップを用いた細胞の力学特性計測
3. 学会等名 第14回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Nariaki Kiyama, Makoto Saito, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
2. 発表標題 High-speed on-chip flow control utilizing cyclo-olefin polymer membrane pump
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Saito, Yoko Yamanishi, Fumihito Arai, Shinya Sakuma
2. 発表標題 Ordering of large particles to regulate event intervals by utilizing high-speed flow control
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Goto, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
2. 発表標題 Single-point ultra-sound microscopy for flow cytometric non-contact mechanical indexing of microparticles
3. 学会等名 The 33rd 2022 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Saito, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
2. 発表標題 High-speed On-chip in-liquid dispenser by utilizing traveling vortex
3. 学会等名 The 33rd 2022 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤真, 笠井宥佑, 新井史人, 佐久間臣耶
2. 発表標題 超高速流体制御を用いたマイクロ輸送渦の時空間的生成
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第45回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤真, 山西陽子, 佐久間臣耶
2. 発表標題 輸送渦を用いた超高速in-liquidディスペンサー
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤友希, 山西陽子, 佐久間臣耶
2. 発表標題 超音波顕微鏡を用いた微粒子の非接触機械指標計測システム
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	菅野 茂夫 (Sugano S. Shigeo) (60726313)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級 主任研究員 (82626)	

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
---------	---------