

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710126

研究課題名（和文）マイクロウェルによる微小分割を用いた細胞単離に基づく一細胞PCR用ディスクの開発

研究課題名（英文）Development of a digital PCR assay using single cell isolation by large arrays of microwells on a lab-on-a-disk

研究代表者

永井 秀典（NAGAI HIDENORI）

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：40357596

研究成果の概要（和文）：診療現場での癌など各種疾患の早期診断を目指して、既存の大型で高価なセルソーターを利用せず、小型化が容易な遠心力による送液と簡便な微小分割による細胞単離を組み合わせて、正常細胞群に僅かに混在する病変細胞を高感度に検出可能な一細胞PCR用ディスクの開発を行った。ヒトTリンパ腫細胞を対象としたリアルタイムPCR法を用いて、開発したディスク上で細胞単離後、そのままマイクロウェル中でPCRすることにより、個々のマイクロウェルの蛍光強度変化から標的遺伝子を有する細胞数を定量可能とした。

研究成果の概要（英文）：Aiming at the early detection of various diseases, such as cancer, a centrifugal disk for a single-cell PCR assay was developed. Instead of the large-sized and expensive cell sorter, the cell isolation based on a simple minute division was achieved by using large arrays of microwells on the compact-sized disk for PCR detectable to high sensitivity for the pathological change cell slightly intermingled in a healthy-cells group. The numbers of cells which have a target gene from fluorescence intensity change of each microwell could be counted by realtime PCR for a human T-lymphoma cells in the microwells as it is after cell isolation on the developed disk.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロバイオシステム・一細胞アッセイ

1. 研究開始当初の背景

老化に伴う癌や種々の感染症のように後天的な疾患のほとんどは、生体を構成する細胞集団の全細胞が病変するのではなく、数万細胞に1個以下と極めて僅かな細胞のみが変性することによって引き起こされる。そのため、癌や感染症等の各種疾患の早期発見には、病変細胞1個に生じた変化が大多数の正常細胞の情報に埋没されるため、あらかじめ単一

細胞レベルに分画して個々の細胞ごとに生じた変化を知る手法が重要である。現在、セルソーターによって細胞を個々に分画しているが、大型かつ高額な装置であることから現場での簡便な分析が困難であるため、発症前診断や早期発見の用途には適していない。

そこで、安価で簡便かつ現場での利用を目指して、セルソーターをマイクロデバイス化する研究が、この数年多くの研究者により報

告されている。しかし、これらはセルソーターの原理はそのままに、標識細胞を振り分ける分取機構のみを微小化する研究がほとんどであり、セルソーターに不可欠な細胞を一行に並べるための流体制御として、複数のポンプやコンプレッサー、バルブ等の周辺装置が利用され、装置全体としての小型化には至っていない。さらに、既存のセルソーターに比べ分取速度が遅く（最速でも毎秒十個以下）、正確性を維持したまま流速を高速化できないことから処理能力が著しく低く実用化にはまだ多くの課題が残っている。

一方、提案者らはこれまで、細胞懸濁液を、大規模集積化したマイクロウェルのアレイ中に封入することで微小空間ごとに細分化し、極めて簡便に多数の細胞を同時に単離し、さらにPCR法により遺伝子増幅する手法を開発してきた（図1）。半導体微細加工により血球細胞と同サイズの4万個のマイクロウェルを2 cm 角の基板上に二次元で周期的に集積化したアレイを作製し、アレイ全体を覆うように細胞懸濁液を滴下後、1枚のガラスプレートにより全てのマイクロウェルをカバーすることで、ポアソン分布に則って同時に千個以上の細胞の単離が可能である。しかし、マイクロウェルに入りきらなかった大部分の液量が失われる手法であるために、細胞の単離について低い収率が問題であった。

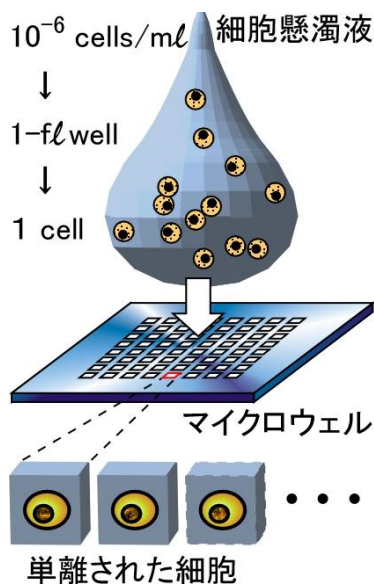


図1. マイクロウェルアレイによる微小分割を用いた細胞単離のイメージ

2. 研究の目的

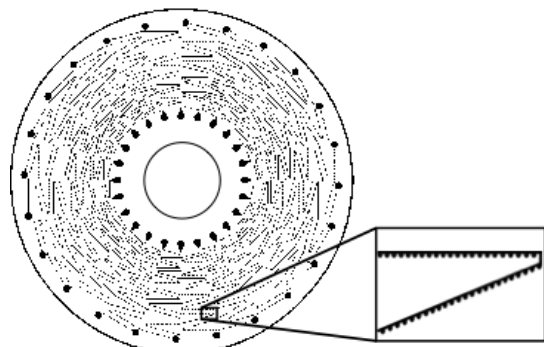
そこで本研究では、微小流路により全てのマイクロウェルを連結し、逐次、細胞懸濁液を分配していく構造とし、特に最後の1滴までとなる極微量の溶液量であっても送液可能な遠心力を利用することで、試料中に含ま

れる細胞を高い収率で単離できるディスク型のマイクロデバイスを開発する。また、個々に単離された細胞のアッセイには、変異配列等の標的遺伝子を高い選択性で検出できるリアルタイムPCR法を利用することとし、開発するディスク上で単離後、そのままマイクロウェル中でPCRすることで、個々のマイクロウェルの蛍光強度変化から標的遺伝子を有する細胞の定量法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞単離用マイクロウェル集積化ディスクの開発

図2に示すような、ディスク中央から外周部に向かって螺旋状もしくはジグザグ状に形成した微小流路に沿って、ポケット型のマイクロウェルを多数個、周期的に外周側に配置させた構造のマイクロウェルアレイを設計・製作し、中心側の流路末端から導入した細胞懸濁液が正確に測りとられてながら分配されていく条件を検討する。特に微小分割において細胞を単離する場合、その分配はポアソン分布に従うため、細胞懸濁液に含まれる細胞が全てのウェルに均等に分配されるためには、微小流路の上流と下流にて細胞の濃度が一定でなければならない。つまり、上流側で細胞だけがトラップされる様なマイクロウェル及び微小流路の形状ではなく、流れの中にデッドボリュームが一切なく、上流から下流まで細胞がスムーズに流れた後、流れの終焉側からポケット状のマイクロウェルに細胞懸濁液が“ちぎり取られる”構造でなければならない。そのため、細胞懸濁液の粘性や流路表面との接触角を考慮したデザインや材質の最適化を図る。なお、多数の細胞を1枚のディスクで同時に単離出来る処理能力は、マイクロウェルの集積度が高いほど良い。そのため、実用的な直径4インチサイズのディスクを用いて数千個以上集積化できる構造についても同時に検討し、単離さ



れる細胞数が最大となる構造を検討する。

図2. ディスク上流路に沿いマイクロウェルを集積化したディスクイメージ

また、細胞単離後に連続してPCRを行うためには、マイクロウェルに分配された微量の溶液が、PCRに必要な95°Cまでの加熱によって蒸散してはならない。そのため、細胞懸濁液を分注後、オイルやフッ素系溶媒等により、マイクロウェル以外の微小流路の空間のみを充填できるかについて検討し、30サイクルのサーマルサイクル後も溶液を維持できるかどうか検討する。

(2) マイクロウェル集積化ディスクを用いたリアルタイムPCRの検討

開発した流路構造を用いて、PCR溶液に希釈した細胞懸濁液を遠心力で分注し、マイクロウェルに細胞を単離後、リアルタイムPCRによる遺伝子増幅を検討する。PCRは、プレートのPCRが可能な既存のin-situ PCR用サーマルサイクラーを利用し正確な温度制御を実現する。

リアルタイムPCRのモデルとしては、まずヒトTリンパ腫細胞であるJurkat cellの18S rDNAを標的遺伝子とし、市販のリアルタイムPCRキットによる蛍光強度変化を、蛍光顕微鏡及び蛍光イメージスキャナーにより計測することで、PCRの成否を確認する。Jurkat cellは培養が容易な浮遊細胞であり、また、18S rDNAは細胞中に多数存在する遺伝子であるから、一細胞からでも増幅が容易な標的遺伝子であるため、細胞単離からリアルタイムPCRまでの条件検討のモデルに最適である。これにより、マイクロウェル集積化ディスク上で単離された細胞数と、リアルタイムPCR後の蛍光増幅したマイクロウェル数が同じであることを確認し、単一細胞からのPCRについて検証を行う。

4. 研究成果

(1) 細胞単離用マイクロウェル集積化ディスクの開発

微小分割を用いた細胞単離の条件検討のため、図2に示すディスク中央から外周部に向かってジグザグ状に形成した微小流路に沿って、400 μm幅、300 μm深さのマイクロウェルを約2,700個、周期的に外周側に配置させた構造のマイクロウェルアレイを設計した。まず、流路デザインに合わせフォトマスクを作製し、それを用いてフォトリソパターンを4インチのシリコンウエハー上に造影後、BOSCHプロセスにより流路を形成し、同サイズで流路の両端位置にサンドブラストにより貫通孔を設けたパイレックスガラスを陽極接合によりカバーすることで、図3に示すマイクロウェルアレイ集積化ディスクを作製した(図3)。また、ディスクの材質の検討を図り、シリコン/ガラス系と樹脂系の2種類のディスクを開発し、比較検討を行ったところ、樹脂系材料を利用した場

合には、物理的吸着やぬれ性に依存する溶液の残存が確認され、細胞単離に利用するには改良が必要であることが判明した。

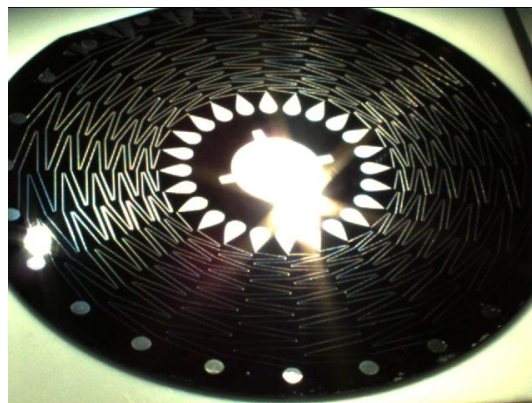


図3 作製したシリコン/ガラス製マイクロウェル集積化ディスク

作製したマイクロウェル集積化ディスクを用いて、PCRに必要なサーマルサイクルを経ても、溶液を各マイクロウェルに維持できるかについて検討を行った。PCR溶液をディスク中心側の入口から注入し、遠心力により各マイクロウェルに分注後、流路両端を接着剤により封入した。そのままディスク全体に対して30サイクルのサーマルサイクルを行ったところ、図4に示すとおり、溶液は各マイクロウェル中に維持されており、かつ蒸発による液のロスもほとんど見られないことから、作製したマイクロウェル集積化ディスクのデザインにおいて、流路中の蒸気圧を維持し、試料溶液の蒸散を防げることが確認された。

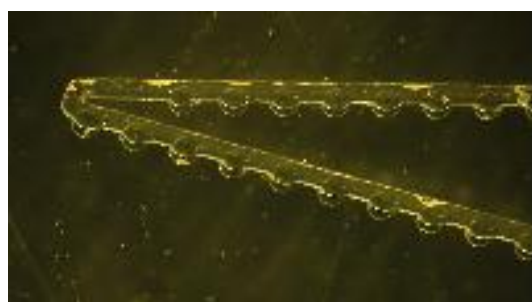


図4 サーマルサイクル後の溶液の様子

微小分割において細胞を単離する場合、その分配はポアソン分布に従うため、細胞懸濁液に含まれる細胞が全てのマイクロウェルに均等に分配されるためには、微小流路の上流と下流にて細胞の濃度が一定でなければならない。そのため、マイクロウェルの形状を楕円形状とすることにより、上流から下流まで細胞がスムーズに流れることにより、上流側で細胞が過剰にトラップされず、一定の

密度で流路出口まで流れる細胞単離に最適なデザインを実現した。これにより、サルモネラ菌について、遠心制御のみで多数の細胞を同時に単離出来ることを顕微鏡観察により確認するとともに、その分布がポアソン分布に従うことを確認した(図5)。

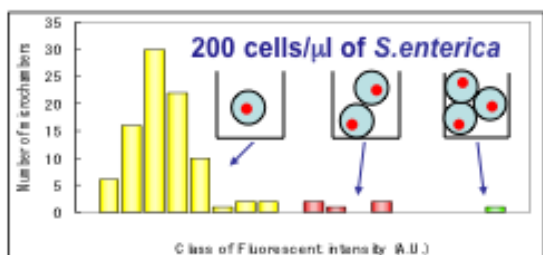
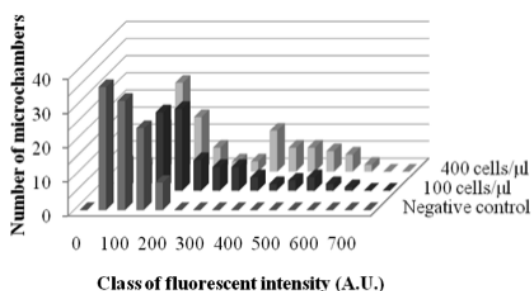


図5 マイクロウェル集積化ディスクによる *S. enterica* 単離の結果

(2) マイクロウェル集積化ディスクを用いたリアルタイムPCRの検討

マイクロウェル集積化ディスク上で細胞懸濁液を単離後、そのままリアルタイムPCR法を利用することにより、個々のマイクロウェルの蛍光強度変化から標的遺伝子を有する細胞を定量可能かについて検討を行った。実際に、ヒトTリンパ腫細胞である Jurkat cell を、PCR溶液と混合後、マイクロウェル集積化ディスクにより単離したところ、ポアソン分布に従ってマイクロウェル中に分配され、遠心力のみで簡便に単離が可能であった。さらに、18S rDNA 遺伝子を標的としたリアルタイムPCRによる蛍光強度変化を、蛍光顕微鏡や蛍光イメージスキャナーにより計測したところ、一部のマイクロウェルにおいて蛍光が増幅されることが確認された(図6)。さらに、マイクロウェル集積化ディスク上で単離された細胞数と、リアルタイムPCR後の蛍光増幅したマイクロウェル数が同じポアソン分布に従うことを確認し、単一細胞からPCRされたことが



明らかとなった。

図6 一細胞PCRにおける濃度の比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① 古谷俊介、永井秀典、高村禪、青山由利、久保いづみ、Detection of expressed gene in isolated single cells in microchambers by a novel hot cell-direct RTPCR method、Analyst、査読有、137 巻、2012、2951-2957
DOI: 10.1039/C2AN15866C
- ② Gang Chan、森芳直、森里織、入江隆、永井秀典、後藤達志、達吉郎、今石浩正、森垣憲一、Microarray of human P450 with an integrated oxygen sensing film for high-throughput detection of metabolic activities、Analytical Chemistry、査読有、84 巻、2012、5292-5297
DOI:10.1021/ac300355w
- ③ 古谷俊介、永井秀典、高村禪、久保いづみ、Compact disk (CD)-shaped device for single cell isolation and PCR of a specific gene in the isolated cell、Analytical and Bioanalytical Chemistry、査読有、398 巻、2010、2997-3004
DOI: 10.1007/s00216-010-4205-7

〔学会発表〕(計7件)

- ① 川井隆之、Rotatable reagent cartridge for high-performance microvalve system on a centrifugal microfluidic device、Pittcon 2013、2013年03月17日、Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)
- ② 古谷俊介、CD型細胞単離デバイス上での Hot cell-direct RT-PCRによる単一細胞の発現遺伝子検出、日本化学会第92春季年会、2012年3月28日、慶應義塾大学(東京都)
- ③ 古谷俊介、Cell isolation and cell-direct RT-PCR on a compact disk (CD)-shaped device、Single Cell Analysis Summit 2011、2011年9月30日、South San Francisco Conference Center (San Francisco, USA)
- ④ 永井秀典、簡便な遺伝子検査を目指した微小流体デバイスの開発、電気学会量子ビームによるナノバイオ物理応用技術調査専門委員会、2011年6月30日、産業技術総合研究所四国センター(香川県)
- ⑤ 古谷俊介、RT-PCR of GAPDH in Jurkat cells isolated on a Compact Disk (CD)-shaped device、ISMM 2011、2011年6月2日、Hotel Seoul Kyoyuk Munhwa Hoekwan (Seoul, 韓国)
- ⑥ 古谷俊介、Single cell separation and characterization on compact disk (CD) shaped micro fluidic device、The 2010 International Chemical Congress of

Pacific Basin Societies、2010年12月
18日、Hawaii convention center
(Honolulu, USA)

- ⑦ 永井秀典、簡便な遺伝子検査を目指した
微小流体デバイスの開発、産総研オー
ンラボ 2010、2010年10月15日、産業技
術総合研究所（茨城県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 秀典 (NAGAI HIDENORI)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・
主任研究員

研究者番号：40357596