

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

(1/3)

研究題目	大規模単一細胞解析の普及へ向けた音響型細胞整列マイクロ流路プラットフォームの構築	報告書作成者	磯崎 瑛宏
研究従事者	磯崎瑛宏、林実加、合田圭介		
研究目的	<p>食料問題やエネルギー問題は、QOL の根幹を成す問題である。これらの問題を解決し得る素材として、近年では藻類(ユーグレナやクラミドモナス、ヘマトコッカス)が着目されている。現在の主な藻類の研究方法は、細胞をひとつひとつ顕微鏡で観察することにより、形質の変化など確認することである。一方で、近年では大規模単一細胞解析研究が盛り上がりを見せている。細胞にも個性があるため、全体の平均ではなく、ひとつひとつの細胞を丹念に見ていくことが必要であり、かつ数千から数十万個の細胞を見ることで、細胞の特性を理解しようという研究分野である。この分野の近年の発展は目覚ましく、特にマイクロ流路を用いて細胞をひとつひとつ操作することで観察・分取する試みは多数行われている。研究代表者も近年、ガラスとシリコンを組み合わせたマイクロ流路を用いた高度大規模単一細胞解析装置の開発を進めている(Nitta et al., Cell 175, 266, 2018; Isozaki et al., Nature Protocols 14, 2370, 2019; Suzuki et al, Proceedings of the National Academy of Sciences 116, 15842, 2019)。これらは最先端の装置を組み合わせた大規模単一細胞解析装置であり、マイクロ流路も高度半導体プロセス装置を多数用いている。その一方で、より簡便なマイクロ流路を用いた大規模単一細胞解析装置も開発してきた(Miura et al., Biomedical Optics Express 9, 3424, 2018; Lei et al., Nature Protocols 13, 103, 2018; Isozaki et al., Science Advances 6, eaba6712, 2020)。ここで使われたマイクロ流路は、シリコーンゴムというフレキシブルな素材を用いて簡易的な数個の半導体プロセス装置を用いるだけで作製できる。しかしながらこれらの成果に繋がる実験を行う中で、このような技術の利用には専門外の研究者にとっては高度・高価なマイクロ流路およびマイクロ流路作製装置が必要という参入障壁が存在すると認識されており、この分野のさらなる拡大および普及を妨げる一因となっていることを実感した。</p> <p>そこで本研究は、音響波を利用した簡易・安価なマイクロ流路で参入障壁を取り除き、藻類の大規模単一細胞解析研究の裾野を広げて研究分野の発展に貢献することを目的とする。特に、マイクロ流路に使用する素材は化学薬品に対して安定であり、顕微鏡観察に適しているガラス素材を使用するという条件のもとで目的を達成する。また、マイクロ流路作製にかかる値段も極力抑える方法を探索する。これらを通して、簡易マイクロ流路の作製方法およびそれにより実行可能な細胞解析実証実験を行う。</p>		

研究内容	<p>上述のように、本研究では、大規模単一細胞解析(図 1)の裾野を広げることのできるプラットフォーム開発を目的としている。本研究で行った内容は、2つの研究内容に分けられる。1つ目はマイクロ流路の作製方法の確立とその性能評価であり、2つ目はラマン計測系との組み合わせによる大規模単一細胞解析の実証実験プラットフォームの構築とその性能評価である。以下でそれぞれに関して説明する。</p> <p>【マイクロ流路の作製方法の確立とその性能評価】</p> <p>まずはマイクロ流路のもとになるガラスキャピラリーの選定を行った。最終的に、VitroCom 社製のガラスキャピラリーを使用した(型番: 8320; Square ID: 0200 mm; Wall 0.100 mm; Square OD: 0.400 mm)。次に、ガラスキャピラリーと、細胞を押し出すためのシリンジを接続する方法を検討した。この検討の結果、柔軟性に優れたシリコンチューブを用いることが重要であることを見出した。さらに細胞を整列させるための音響波発生基板 PZT(株式会社富士セラミックス製、3.66Z20*20S-SYX)をガラスキャピラリー部分に貼り付けた。また、流路全体を扱いやすくするためにスライドガラスに固定した。これらの知見をもとに作製した細胞整列マイクロ流路を図 2a に示す。図 2b はポリスチレン粒子を流したときのハイスピードカメラ像である。音響波を ON にした際に粒子が良く整列されていることが確認できる。細胞解析のためにレーザーを使用することを想定した大規模単一細胞解析の動作原理を図 3 に示す。図 3a はマイクロ流路の流れ方向の断面図である。PZT により発生させた音響波は、流路内で定在波が発生するように周波数が調整されている。この場合、内径が 0.2 mm なので、約 3.6 MHz を使用する。PZT 上を通過した細胞は音響定在波のノード部分(図 3b)である流路中心に集まって一列に並んで流れる。一列に並んだ先で細胞を観察する。この原理のもと、粒子と藻類細胞の整列性能評価を行った(図 4)。</p> <p>【ラマン計測系との組み合わせによる大規模単一細胞解析の実証実験プラットフォームの構築とその性能評価】</p> <p>ラマン信号計測技術を用いて、本技術の有用性を実証することを試みた。ラマン信号とは、分子振動の情報を計測することにより分子の同定を染色などのラベリングなしで行うことができる技術であり、細胞への応用に対する期待が近年非常に高まっている。しかしながらラマン計測技術は、非常に高度な光学的知識が無いと構築できない。さらに、そのような高度な光学的知識とマイクロ流路作製技術の両方を併せ持つ研究グループは非常に限られており、マイクロ流路とラマン計測技術の融合例は限られている。このような背景は、本研究が解決すべき問題点と状況が一致しており、実証実験に適している。研究代表者らは実際に作製した細胞整列マイクロ流路を自作ラマン計測装置に組み込み(図 5)、ポリスチレン粒子と藻類(ヘマトコッカス)細胞の計測を行い、想定通りのラマン信号が得られることを確認した(図 6)。</p>
------	---

<p>研究のポイント</p>	<p>研究のポイントは下記の通りである。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 近年、大規模単一細胞解析に関する研究が盛んだが、高度・高価マイクロ流路が必要という参入障壁がある ・ <u>音響波を利用した細胞整列マイクロ流路技術</u>が有効である ・ ガラスキャピラリーを用いることで細胞整列マイクロ流路が実現できる ・ ガラスキャピラリー(200 円/本)は、市販の流路(20 万円/個)と比較して 1,000 分の 1 の価格である ・ ラマン計測技術と組み合わせて <u>大規模単一細胞解析の基礎的な実証実験</u>に成功した
<p>研究結果</p>	<p>本研究ではまず、音響型細胞整列マイクロ流路を作製した(図 2)。マイクロ流路の素材は、1 本 200 円程度で購入可能な市販のガラスキャピラリーを用いた。この価格は、市販のガラスマイクロ流路と比較すると約 1000 分の 1 の価格である。流路作製後は最初に、漏水なく流路が動作することを確認した。さらに、この流路を用いて、ポリスチレンマイクロ粒子およびユーグレナ細胞の細胞整列性能を評価した。その結果、図 4 に示すように細胞計測を行うに十分な細胞整列性能を示すことが分かった。さらに、音響型細胞整列マイクロ流路を用いた大規模単一細胞ラマン信号計測にも挑戦した。これを行うためにまず、ラマン計測セットアップを自作し、作製した流路を組み込んだ(図 5)。ポリスチレン粒子のラマン信号を図 6a に示す。1001 cm^{-1} に特徴的なピークが表れていることが確認でき、時間軸で見ると、信号のピークが秒間 8 個(平均)確認できる。さらに藻類(ヘマトコッカス)細胞を計測してみると、図 6b に示すように、1006 cm^{-1} と 1157 cm^{-1} にアスタキサンチンという工業応用可能な物質に対する特徴的なピークが観察された。</p>
<p>今後の課題</p>	<p>本技術をさらに広く使ってもらえるようにするためには、システム全体の更なるコストダウンが必要である。例えば、現在は音響波を出すために、高額な電気信号増幅装置を用いているが、これを簡易的な電気回路に置き換える必要がある。これには、トランスの増幅性能を応用した回路が有用であり、その基礎的な技術はすでに公開済みである(Isozaki et al., Science Advances 6, eaba6712, 2020)。また、流路製作にあたり、接着剤の使用など、手作りの個所が多いが、適当なアダプターを用意することも重要である。理想的には、現在市販されているアダプターから転用できると良い。また、本技術を用いた応用研究の例を多数発表することも重要である。それにより、多くの研究者が本技術の有用性に着目して応用の幅が広がるからである。本研究では、その一環としてラマン計測を行うことができた。さらに、ユーザーを探す努力も必要である。学术界に限らず、立上げ直後のベンチャー企業や、小学校や中学校の理科の授業など、幅広いユーザーが想定できる。このような視点で本技術を用いて大規模単一細胞解析に関する研究の裾野を広げることが今後の課題である。</p>

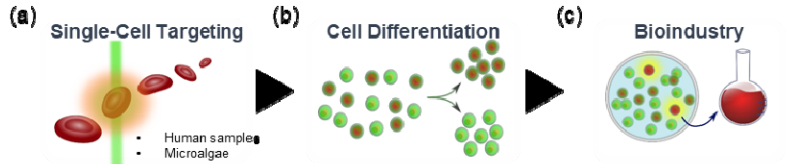


図1 大規模単一細胞解析。多くの細胞をひとつひとつ観察することにより(a)、細胞間の違いが明らかになる(b)。それにより、例えばバイオインダストリーに有用な細胞を見つけ出すことができる(c)。

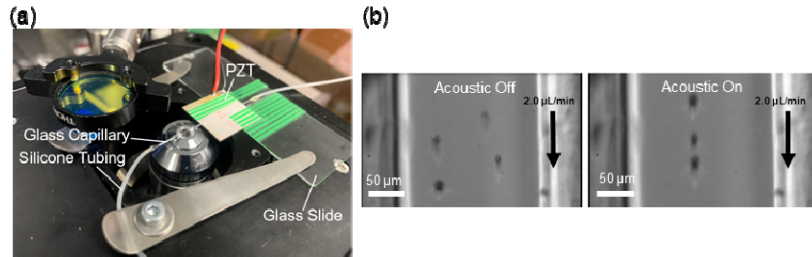


図2 自作顕微鏡の上に設置した細胞整列マイクロ流路。(a)ガラスキャピラリーにフレキシブルなシリコンゴムと音響波発生基板 (PZT) が取り付けられている。(b)ポリスチレン粒子を流したときの粒子の様子。

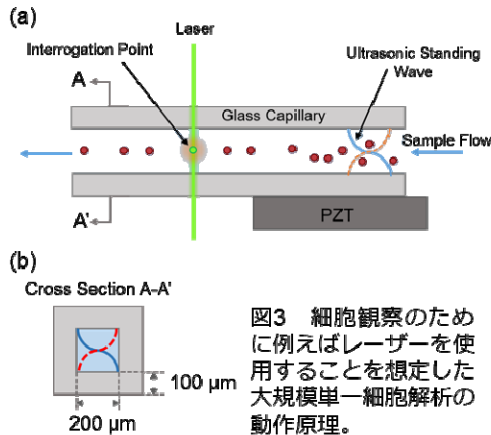


図3 細胞観察のために例えばレーザーを使用することを想定した大規模単一細胞解析の動作原理。

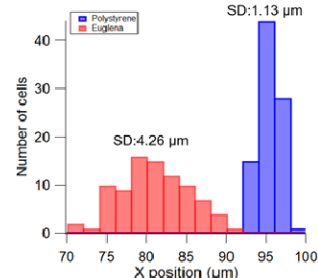


図4 ポリスチレン粒子と藻類 (ユーグレナ) 細胞の整列性能評価結果。

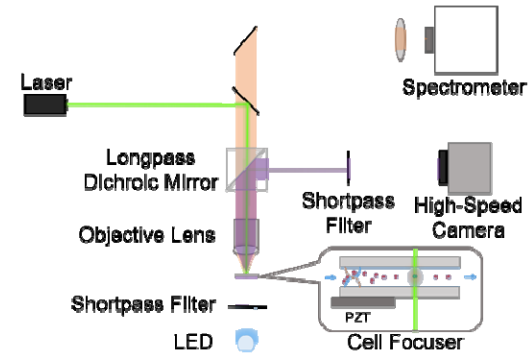


図5 ラマン計測光学系に細胞整列マイクロ流路を組み込んだ概念図。ラマン計測装置は、レーザー光をマイクロ流路中に集光させ、細胞からのラマン散乱光を分光器により分光計測できるように組まれている。今回、561nmのレーザーを使用した。また、粒子の動きを同時に観察できるように、LEDとハイスピードカメラが備えてある。

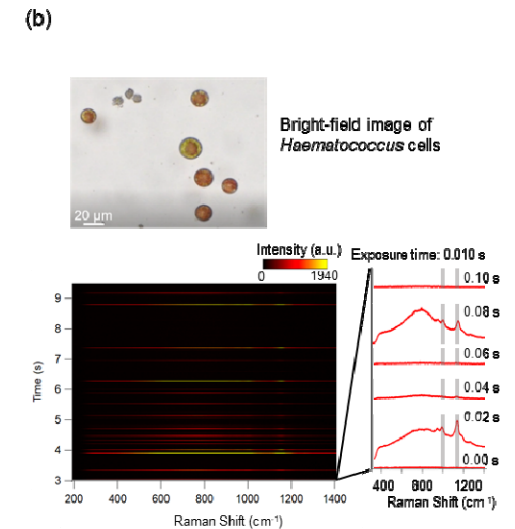
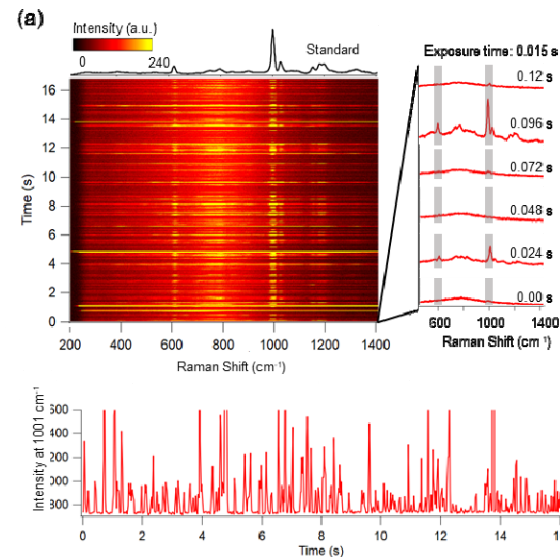


図6 ラマン計測の実証実験。(a)ポリスチレン粒子のラマン信号。(b)ハマトコッカス細胞のラマン信号。