

オンチップ・セラミクス プロジェクト

## 研究概要集

平成 28 年 3 月 31 日

公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー

# 総 括

## 1. 基本構想

生命科学研究の流れは、従来の平均化された細胞集団の情報解析研究からさらに歩を進め、個々の細胞や細胞の空間的ネットワーク配置に蓄えられた情報を如何に解析するかを競う段階にきている。ここで鍵となるのは、個々の細胞の分子発現状態や「個性」を如何に高感度かつ定量的に計測できるかという、技術の開発となる。本プロジェクトは2008年4月に創造展開プロジェクトとして発足し、この間、1細胞の個性を定量計測する技術開発に取り組んできた。その結果、多数の細胞の中に微量存在する目的細胞を、細胞の形状情報を指標として検出し回収することが可能なオンチップ・イメージングセルソータ技術、回収した細胞の遺伝情報を高速解析することができる超高速遺伝子解析技術、1細胞が発現する分子を、空間分布情報を保持したまま網羅的に無増幅検出するための1細胞分子発現情報計測技術など、1細胞の個性や機能を解析するための様々な要素技術開発に成功してきた。2012年4月からは創造展開プロジェクトに引き続く短期集中型実用化プロジェクトとして新たに出発し、創造展開プロジェクトの間に開発してきた1細胞計測要素技術の具体的な応用用途として、血中循環がん細胞（Circulating tumor cells, 以下 CTC）の検出技術開発を主な目的とし、技術の改良と最適化を進めてきた。がんは現在、日本において2人に1人が生涯のうちに罹患する病気であり、その発症や転移メカニズムの研究と共に、生存率を向上させるための早期発見技術の開発や、がん手術後の再発有無の診断技術開発が急務となっている。現在のがん診断方法の主流は、細い針を患部に挿入して一部の組織を採取し解析を行う生検法（バイオプシー）となっているが、組織採取のために手術が必要など患者の身体的負担が大きい上、体内深部の組織には適用不可能という問題がある。また、PETやMRIに代表される画像診断法は早期がんの発見に対して有効性が高いことが示されているが、コスト面の観点から、健診目的のための定期的な大規模診断は難しいのが現状である。そのような中、現在注目されている診断方法のひとつに血液採取による診断（リキッドバイオプシー）があり、これは患者から微量の血液を採取してその中に悪性の転移がん細胞が含まれているかを解析する技術で、患者の身体的負担が少なくまたコストも相対的に安価に抑えられるため、日常の定期健診で実施できる可能性があるなどという観点から、現在盛んに研究が進められている。血液採取によるがん診断法の現在の主流は、がん細胞が発現する分子マーカーに対して標識を行い、標識された細胞の有無をもってCTCの存在有無を決定するものであるが、がん細胞の種類や分子発現状態が極めて多様であるため、特定のがんには有効であるが別のがんは検出不可能など検査に対する擬陽性・擬陰性の可能性が問題となっている。そこで本プロジェクトでは、従来のがん分子マーカー標識による検出に加えて、細胞の形状情報、「イメージングバイオマーカー」を指標とした検出を新たに開発することで、多角的な視点からCTCを高感度かつ網羅的に検出し回収解析するための技術開発を行ってきたので、ここではその詳細について報告する。

## 2. 全体計画と遂行方針

本プロジェクトは2008年4月から2012年3月まで推進した4年間の創造展開プロジェクトに引き続いて2012年4月に発足したものであり、創造展開プロジェクトの期間中に開発した要素技術を、CTC診断技術開発のために改良し最適化することを目的とした。具体的には4つの研究課題、①標的細胞前処理技術の開発、②標的細胞画像ベース識別・回収技術の開発、③標的細胞機能解析技術の開発、④組織切片中の1細胞の機能情報を分子レベルで解析するためのマルチレベル技術と電顕技術の開発を設定し、それぞれについて技術開発を推進してきた。最終目標は血液前処理からCTC検出回収、解析までが行える統合型CTC診断技術の開発と社会普及であるが、個々の要素技術についてもそれぞれ独立に技術の実用化橋渡しを目指して、神奈川県下の医療機関や企業などを中心に共同研究開発を推進してきた。

## 3. 研究体制及び組織

本プロジェクトは当初、創造展開プロジェクト期間中の研究体制に引き続き、2012年度からかながわサイエンスパーク（KSP）東棟の研究室にて、実験と装置試作評価を推進した。2012年度開始当初のメンバー構成は常勤研究員2名、非常勤研究員4名、研究補助員5名であった。その後、本プロジェクトの主目的のひとつであるがん診断技術の開発、特に臨床サンプルを用いた測定と検証を推進する目的で、2013年度に京浜臨海地区の殿町に新たに研究室を設置し、さらに文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム採択と共に研究体制を強化し、常勤研究員4名、研究補助員1名を新たに追加して研究を推進した。

## 4. 研究成果の概要

### 4. 1 標的細胞前処理技術の開発

本研究課題は、血液中に存在するCTCなど、微量の細胞を取りこぼすことなく効率的に選択標識して発見することが可能な、サンプル前処理プロトコルを開発することを目的とした。ここでは特に、我々のオリジナル技術としてこれまでに

開発してきた、アプタマーを酵素処理により積極的に分解することで可逆的な標識・脱標識を行う技術について、具体的ないくつかの種類の標的細胞に対して適用し、技術の検証と問題点の抽出、改良を行うことを主な目的として実験を推進した。また、血液中の CTC を効果的に検出し回収するために、不要な細胞を取り除く技術、測定に最適な溶媒組成の検討と選択について評価を行った。

アプタマー標識技術では、これまでに従来の Cell SELEX 法を改良し、不要な核酸分子の混入を防ぐ目的でアプタマー精製時に細胞をプロテアーゼ処理して細胞表面分子（とそれに結合したアプタマー）のみを回収する技術を開発したが、この技術をがん細胞等に適用することで、開発技術が目的とする細胞のみを選択的に回収精製できるか実証するための実験を推進した結果、想定通りの結果を得ることができた。

次に、血液中の CTC を効果的に検出し回収するための血液前処理技術として、不要な赤血球を取り除くための溶血処理を行った後に細胞を再懸濁する溶媒組成の最適化を推進した。溶媒組成に必要な条件としては、CTC を含む細胞にダメージを与えないことに加えて、オンチップ・イメージングセルソータを用いた電圧印加により細胞回収を効率的に行えるよう電気伝導率が低いことが要求される。いくつかの溶媒について細胞の生存率や細胞回収率を定量的に調べた結果、本測定に最適な溶媒の開発に成功し、これにより計測スループットと細胞回収効率を飛躍的に向上させることに成功した。

#### 4. 2 標的細胞画像ベース識別・回収技術の開発

本研究課題は、従来の蛍光標識による細胞の検出に加えて、細胞に全く標識を施すこと無くインタクトな状態のまま、細胞の形状情報に基づいて CTC を検出する技術を開発することを目的とした。我々はこれまでに、超高速カメラを用いて測定サンプル中の細胞ひとつひとつの画像を取得した後、得られた画像から細胞の形状情報、「イメージングバイオマーカー」をリアルタイムで抽出して、回収を望む細胞の特徴と合致した細胞に対してパルス電圧を印加することで目的細胞を回収することができる、オンチップ・イメージングセルソータシステムを開発してきた。このシステムをさらに改良する目的で、明視野画像と蛍光画像（細胞核形状像）を同時取得できるマルチビューシステムを組み合わせることにより、細胞全体の形状と細胞核の形状双方のイメージングバイオマーカーを同時抽出し組み合わせ、より高精度に目的細胞を特定・回収することができる「オンチップ・マルチイメージングセルソータシステム」へと発展させることに成功した。さらに、取得した画像中から目的細胞の位置や輪郭をより正確に抽出可能な画像処理アルゴリズムの開発、測定ノイズを減らすことで効率的に細胞を回収可能なマイクロチップ形状の検討と試作を推進することにより、細胞の検出・回収効率を向上させることに成功した。

この開発したシステムを用いた上で、ラットに対して前立腺がん由来がん細胞株を移植した後に採取した血液や、ヒト臨床血液に対する測定を行った。サンプル準備、および得られた結果の詳細な解析に関しては、県内医療機関をはじめとする各研究機関と協力体制を構築した上で推進した。サンプル血液中の全細胞画像を取得できる長所を活かし、がん細胞移植モデルラット血液に含まれる細胞をくまなく調べた結果、正常ラット血液中にはばらばらの単一細胞しか含まれていないのに対し、がん細胞移植ラット血液中にはクラスターを形成している細胞が一部含まれていることを発見した。我々はこのクラスターを形成している細胞に着目し、開発システムを用いてがん細胞移植ラット血液から細胞クラスターをソーティングにより回収した上で遺伝子解析を行った結果、これら細胞クラスターの中に移植したがん細胞、すなわち CTC が含まれることを突き止めた。

#### 4. 3 標的細胞機能解析技術の開発

本研究課題は、回収した微量の細胞に対して、遺伝子発現やマーカー分子発現、生理機能などの解析を行うことにより、回収した細胞の種類や機能的特徴を特定する技術開発を行うことを目的とした。我々はこれまでに、液体を高速に循環させることでサンプル温度を高速に変換することが可能な、液体環流型超高速 PCR 装置の原理技術を開発してきた。本装置技術を用いて、がん細胞をはじめとする様々なサンプル中の遺伝子について実際に増幅検出実験を繰り返し検証と課題抽出を行った結果、反応温度や時間などについて適切な条件を設定することにより、従来 PCR 技術と全く同様に増幅検出を行うことができるという結果が得られ、これにより従来技術に対して我々が開発した技術の測定時間に対する優位性を実証することができた。さらに、同時増幅可能なサンプル数の増加や、複数サンプルの反応進行に伴う蛍光輝度増幅を高速に検出する検出系の開発などを推進することにより、より実用的な装置システムの試作に成功した。

#### 4. 4 組織切片中の 1 細胞の機能情報を分子レベルで解析するためのマルチラベル技術と電顕技術の開発

本研究課題は、組織切片中でヘテロに分布する細胞集団中からターゲット細胞の空間分布を、細胞表面に発現している多数の蛋白質の構成の組み合わせや、細胞内発現遺伝子の組み合わせから、1 細胞レベルで詳細に解析する技術を開発することを目的とした。我々はこれまでに、真空蒸着法を応用して鋳型ポリスチレン球に金属薄膜を複層形成することで、粒径・元素が異なる 500 種類以上の微粒子の作製に成功し、さらに FE-SEM 反射電子計測を応用することで、これら粒子を高速かつ高分解能で識別できる技術開発に成功した。FE-SEM 計測による粒子の識別では、作製した微粒子の金属材質の他に観察時の入射電子エネルギーや粒径などが識別分解能に寄与することがこれまでに明らかになっていたが、それに

加えて金属薄膜の膜厚が粒子識別に与える寄与について評価を行った結果、膜厚が厚くなるにつれて反射電子像中での輝度が向上し、予め規格化を行うことで定量識別することができることを明らかにした。

また、これまで微粒子の作製と FE-SEM による識別技術は、1 細胞内に発現する分子を網羅的に標識して空間分布情報を保ったまま無増幅検出する目的で開発を進めてきたが、微粒子を作製する技術を検討していた際にカップ形状の特徴的な微粒子作製に成功したため、この新規微粒子に機能を付加した新たな応用用途について検討を行うこととした。具体的には、磁性体薄膜で構成され、細胞と同程度の粒径のカップ形状微粒子「magcup」を新たに開発し、magcup 内部に細胞を捕獲して回収する技術開発を推進した。様々な粒径の magcup を作製して細胞捕獲回収実験を行った結果、magcup 内径が細胞直径より小さな場合は細胞が一切回収されず、magcup が厳密なサイズフィルタとして機能することを確認できた。このサイズ選択性の厳密さは粒径が均一な magcup を作製できたことに由来し、真空蒸着を応用した粒子作製法を用いたため実現できたことである。さらに、magcup で回収した細胞を培養培地中で再培養したところ、細胞は通常通り分裂増殖したため magcup による回収は細胞に対するダメージがほぼ無いこと、magcup 内への細胞捕獲は排除体積効果に基づいたエントロピー由来の駆動力が寄与しているらしいことを明らかにした。

## 5. 課題及び今後の展望

本プロジェクトでは以上のとおり、特に CTC を高速かつ高精度に検出診断するための要素技術開発に取り組み、その結果、一部の CTC が血液中でクラスターを形成し循環している可能性を発見するなど、今後の次世代リキッドバイオプシー開発につながる成果を得ることができた。また、開発した各要素技術はがん診断のみでなく、様々な生命科学研究や診断技術に応用可能であるため、広範囲での社会的普及が期待できる。

最後になりましたが、創造展開プロジェクトから続く本プロジェクトで得られた多数の成果は、研究補助員、事務補助員皆様の努力とご協力があったために得られたものです。ここに感謝申し上げます。

## 6. 業績

### 【原著論文（査読有）】

1. Hyonchol Kim, Hiroyuki Takei, Tsutomu Negishi, Masato Kudo, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Contribution of Metal Layer Thickness for Quantitative Backscattered Electron Imaging of Field Emission Scanning Electron Microscopy, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, 10, 301-304 (2012)
2. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Masahito Hayashi, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, A Non-destructive Culturing and Cell Sorting Method for Cardiomyocytes and Neurons Using a Double Alginate Layer, *PLoS ONE*, 7 (8), e442485 (2012)
3. Kenji Yasuda, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Masahito Hayashi, Hiroyuki Takei, Tomoyuki Kaneko, Fumimasa Nomura, Non-Destructive On-Chip Imaging Flow Cell-Sorting System for On-Chip Cellomics, *Microfluidics and Nanofluidics*, 14 (6), 907-931 (2013)
4. Hideyuki Terazono, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Hiroyuki Takei, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, Temperature-Shift Speed Dependence of Nonspecific Amplification of Polymerase Chain Reaction Examined by 1480 nm Photothermal Transition Speed Controllable High-Speed Polymerase Chain Reaction System, *Japanese Journal of Applied Physics*, 52 (6), 06GK02 (2013)
5. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, DNA Hybridization Efficiency on Concave Surface Nano-Structure in Hemispherical Janus Nano-Cups, *Langmuir*, 30 (5), 1272-1280 (2014)
6. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Fabrication of Multilayered Superparamagnetic Particles Based on Sequential Thermal Deposition Method, *Japanese Journal of Applied Physics*, 53 (6S), 06JJ01 (2014)
7. Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Masao Odaka, Mathias Girault, Kenji Yasuda, Identification of Cells Using Morphological Information of Bright Field/Fluorescent Multi-Imaging Flow Cytometer Images, *Japanese Journal of Applied Physics*, 53 (6S), 06JL03 (2014)
8. Hideyuki Terazono, Kenji Matsuura, Hyonchol Kim, Hiroyuki Takei, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Homogenous Measurement During a Circulation-Water-Based Ultrahigh-Speed Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis Device, *Japanese Journal of Applied Physics*, 53 (6S), 06JM08 (2014)
9. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Yoshiyasu Nakamura, Kazuko Sakai, Akihiro Hattori, Masao Odaka, Mathias Girault, Tokuzo Arao, Kazuto Nishio, Yohei Miyagi, Kenji Yasuda, Development of On-Chip Multi-Imaging Flow Cytometry for Identification of Imaging Biomarkers of Clustered Circulating Tumor Cells, *PLoS ONE*, 9 (8), e104372 (2014)
10. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Cup-Shaped Superparamagnetic Hemispheres for Size-Selective Cell Filtration, *Scientific Reports*, 4, 6362 (2014)
11. Masao Odaka, Hyonchol Kim, Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hideyuki Terazono, Kenji Matsuura, Kenji Yasuda, Evaluation of Imaging Biomarkers for Identification of Single Cancer Cells in Blood, *Japanese Journal of Applied Physics*, 54 (6S1), 06FN04 (2015)
12. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Depletion Effect on Concave Microstructure upon Size-Specific Target Particle Collection, *Japanese Journal of Applied Physics*, 54 (6S1), 06FL02 (2015)
13. Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Algorithm for the Precise Detection of Single and Cluster Cells in Microfluidic Applications, *Cytometry part A*, in press.

### 【口頭発表】

〈招待講演〉

1. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Nano-Cups: Fabrication and Application of Cup-Shaped Functional Nano-Particles for Cell Biology, 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications, 2014.1.20
2. Kenji Yasuda, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Two-Dimensionally Indexed Precise-Size-Controlled Multi-Metal Nano-Particle Probe Set with Adaptive-Electron Microscopy for Identification of Genome/Proteome Expression Profiles, 1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications, 2014.1.20

〈国際会議発表〉

1. Kenji Yasuda, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Tokuzo Arao, Takashi Ohtsu, Yoshiyasu Nakamura, Yohei Miyagi, Kazuto Nishio, Development of on-chip imaging flow cytometry technology for circulating tumor cell, The 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2012.9.21
2. Hideyuki Terazono, Masahito Hayashi, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, A Non-destructive Culturing and Cell Sorting Method for Cardiomyocytes and Neurons Using an Alginate Layer, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2012.9.24
3. Hyonchol Kim, Hiroyuki Takei, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Fabrication of Superparamagnetic Janus Particles Having Various Size and Its Application for Non-Destructive Cell Sorting, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2012.9.24
4. Hideyuki Terazono, Masahito Hayashi, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, Toward Quasi-In Vivo from In Vitro Assay (V): Noninvasive Precise Purification of Ventricular Cells from Mixture of Differentiated Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using Spot Digestion of Double Alginate Layers on a Multielectrode Array Chip, SPS2012, 2012.10.2
5. Hideyuki Terazono, Masahito Hayashi, Hiroyuki Takei, Akihiro Hattori, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, Ultra high-speed microdroplet polymerase chain reaction system for three-step reverse transcription of single cells using on-chip three-channel switching high-speed liquid circulating module, 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2012.11.1
6. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Fabrication of Superparamagnetic Nano-Particles Having Various Diameters by Strict Controlling of Magnetic Material Thickness, 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2012.11.1
7. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, Non-invasive/destructive single cell purification method for re-cultivation of functionally identified specific cells using spot digestion of double alginate sol layers on a multi-electrode array chip, 2012 American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2012.12.17
8. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Development of "Adaptive SEM" Technology for Genome/Proteome Expression Analysis in Single Cell Level, 57th American Biophysical Society Annual Meeting, 2013.2.6
9. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Tomoyo Hamada, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Toward Quasi-In Vivo from In Vitro Assay (III): Noninvasive Identification and Purification Method of Target Cardiomyocyte Cells Using Nuclease Digestive Magnet-Beads-Attached ssDNA Aptamers, Safety Pharmacology Society 13th Annual Meeting, 2013.9.17
10. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Tomoyo Hamada, Kenji Yasuda, Toward Quasi-In Vivo from In Vitro Assay (IV): Fabrication of Direction-Controlled Artificial Neuronal Networks Using Agarose-Microetching Method and Single-Cell-Electrodes for Quantitative Evaluation of Neuropsychiatric Disorders, Safety Pharmacology Society 13th Annual Meeting, 2013.9.17
11. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Fabrication of Superparamagnetic Metal Cups for Size-Selective Cell Collection, The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.28
12. Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Masao Odaka, Mathias Girault, Kenji Yasuda, Development of On-chip Flow Cytometer using Real-time Bright Field/Fluorescent Dual Image Analysis, The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.28
13. Mathias Girault, Hisayuki Arakawa, Gerald Gregori, Fuminori Hashihama, Hyonchol Kim, Masao Odaka, Kenji Yasuda, Flow cytometry identification of nanocyanobacteria and their limiting factors in the North Pacific Subtropical Gyre, The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.28
14. Masao Odaka, Mathias Girault, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Akihiro Hattori, Kenji Yasuda, Real time image analysis technology for identification and collection of clustered cells using on-chip multi-imaging cell sorter, The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.28
15. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Non-invasive identification and purification method of target cardiomyocyte cells using cell-surface-binding ssDNA aptamers, The 51th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.30
16. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Fabrication of Cup-Shaped Superparamagnetic Metal Hemispheres for Size-Selective Target Cell Collection, 26th International Microprocesses and

Nanotechnology Conference, 2013.11.6

17. Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Kenji Yasuda, Development of On-chip Flow Cytometry System based on Bright Field/Fluorescent Dual-image Analysis, 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2013.11.8
18. Kenji Matsuura, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Tomoyo Hamada, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Quantitative Evaluation of Origin of Changes in Electrophysiological Properties of Cells on Micro Electrodes using Impedances Analysis Measurement Setup, 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2013.11.8
19. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Hiroyuki Takei, Akihiro Hattori, Kenji Yasuda, Development of Ultra-high-speed Microfluidic Submicron-droplet PCR Device using Circulating Water System and a photo detector, 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2013.11.8
20. Hideyuki Terazono, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Hiroyuki Takei, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Temperature-Shift Speed Dependence of Nonspecific Amplification of Polymerase Chain Reaction by 1480 nm Photothermal Transition Speed Controllable Ultra-High-Speed Polymerase Chain Reaction System, 2013 American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2013.12.17
21. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Application of Cup-Shaped Superparamagnetic Hemispheres for Size-Selective Cell Purification, American Biophysical Society 58th Annual Meeting, 2014.2.18
22. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Development of "Adaptive SEM" Technology for in situ Genome/Proteome Expression Analysis in Single Cell Level, International Microscopy Congress 2014, 2014.9.10
23. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Akihiro Hattori, Masao Odaka, Mathias Girault, Kenji Yasuda, Imaging biomarkers for identification of target cells: Identification of clustered circulating tumor cells as an example, The 52th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.26
24. Masao Odaka, Mathias Girault, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Kenji Matsuura, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Development of the cell imaging biomarker identification algorithm for on-chip multi imaging cell sorter system, The 52th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.26
25. Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Optimization of the single cell encapsulation in the water droplet using 3D microfluidic structure, The 52th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.26
26. Kenji Matsuura, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Non-firing impedance-based electrophysiological analysis of single cells on micro-electrode arrays, The 52th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.26
27. Akihiro Hattori, Hideyuki Terazono, Kenji Matsuura, Hyonchol Kim, Masao Odaka, Mathias Girault, Kenji Yasuda, Investigation of wide range optical set-up for simultaneous real-time analysis of 96-well SBS formatted samples, The 52th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.26
28. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Yoshiyasu Nakamura, Kazuko Sakai, Akihiro Hattori, Masao Odaka, Mathias Girault, Kazuto Nishio, Yohei Miyagi, Kenji Yasuda, Development of On-Chip Multi-Imaging Cell Sorter System for Identification of Clustered Circulating Tumor Cells, Advanced Circulating Tumor Cells 2014, 2014.10.10
29. Masao Odaka, Hyonchol Kim, Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hideyuki Terazono, Kenji Matsuura, Kenji Yasuda, Development of the algorithm for recognition and identification of target cells using imaging biomarkers for on-chip multi-imaging cell sorter, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2014.11.6
30. Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Susumu Kawada, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Studies on size control of pressure-driven micro-droplet formation in microfluidic system, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2014.11.6
31. Kenji Matsuura, Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, High-throughput nano-droplet array polymerase chain reaction system with fast and homogeneous temperature control for 24/96/384 sample plate, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2014.11.6
32. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Size-Specific Target Cell Purification Exploiting Depletion Effect on Cup-Shaped Superparamagnetic Hemispheres, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2014.11.7

33. Mathias Girault, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Akihiro Hattori, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Target imaging droplet sorting system: a shape identification method for recognition and sort target droplet with cell in real time, The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.9.13
34. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Ahikiro Hattori, Kenji Matsuura, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Contribution of depletion effect to size-specific target cell purification using micrometer-sized concave structures, The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.9.14
35. Masao Odaka, Hyonchol Kim, Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hideyuki Terazono, Kenji Matsuura, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Evaluation of imaging biomarkers for identification of single cancer cells in blood by on-chip multi imaging cell sorter system, The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.9.14
36. Kenji Matsuura, Fumimasa Nomura, Akihiro Hattori, Hiromi Kurotobi, Masao Odaka, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Development of impedance measurement system for identification of cells, The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.9.14
37. Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Masao Odaka, Kenji Matsuura, Mathias Girault, Kenji Yasuda, Studies on identification of cells using visible morphological information using bright field/fluorescent multi-imaging flow cytometer, The 53th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.9.15
38. Hyonchol Kim, Masao Odaka, Mathias Girault, Hideyuki Terazono, Akihiro Hattori, Kenji Yasuda, Bright Field/Fluorescent Dual Imaging Cell Sorter System for Precise Purification of Circulating Tumor Cells, 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2015.11.12
39. Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Susumu Kawada, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Morphology Imaging Microdroplet Sorting System for Identification and Acquisition of Target Objects in Droplets, 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2015.11.12
40. Masao Odaka, Hyonchol Kim, Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hideyuki Terazono, Kenji Matsuura, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Identification of Cell Clusters in Cancer Cell-implanted Rat Bloods Based on Measurements of Imaging Biomarkers Using on-Chip Multi-Imaging Flow Cytometry System, 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2015.11.12
41. Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Mathias Girault, Kenji Yasuda, Predictive Human Cardiotoxicity Measurement Assay Using a Lined-Up Thousand Cardiomyocyte Cell Network, 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2015.11.13
42. Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, Kenji Yasuda, Automatic sorting system and incubation at single cell level using microfluidic devices, The 16th Japanese-French Oceanography Symposium, 2015.11.20
43. Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda, Contribution of Depletion Effect for Size-Selective Target Cell Acquisition in Cup-Shaped Microstructures, 60th American Biophysical Society Annual Meeting, 2016.2.28

〈国内会議発表〉

1. 金賢徹、竹井弘之、寺菌英之、安田賢二、1細胞 *in situ* ゲノムプロテオーム計測のための FE-SEM 定量反射電子分析法の開発、日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会、2012.5.14
2. 金賢徹、竹井弘之、寺菌英之、安田賢二、様々な粒径・材質のヤヌス粒子に対する機能付加法の検討、第 73 回応用物理学会学術講演会、2012.9.13
3. 金賢徹、竹井弘之、寺菌英之、安田賢二、金ナノ粒子標識と FE-SEM 計数計測を組み合わせた生体分子高感度検出法の開発、日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会、2013.5.20
4. 金賢徹、寺菌英之、竹井弘之、安田賢二、超常磁性カップの作製とサイズ選択的細胞回収、第 75 回応用物理学会学術講演会、2014.9.19
5. 金賢徹、寺菌英之、竹井弘之、安田賢二、様々な元素で作製された機能的微粒子の 1 細胞計測技術への応用、日本応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会、2015.5.28

【特許】

国内特許出願 7 件

1. 特願 2012-207517、「イメージングセルソーター」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2012.9.20

2. 特願 2013-543025、「磁気ナノ粒子」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2012.11.8
3. 特願 2012-272009、「微小体の配列方法」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2012.12.13
4. 特願 2013-556096、「イメージングセルソーター」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2013.3.29
5. 特願 2013-188879、「高速遺伝子増幅検出装置」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、2013.9.11
6. 特願 2013-213169、「イメージングセルソーター」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2013.10.10
7. 特願 2014-214671、「イメージングセルソーター」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2013.3.29

#### 国際特許出願 15 件

1. US14/355731、「磁気ナノ粒子」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2012.11.8
2. CA2857146、「液体環流型高速遺伝子増幅装置」、安田 賢二、寺菌 英之、2012.11.27
3. CN201280067750、「液体環流型高速遺伝子増幅装置」、安田 賢二、寺菌 英之、2012.11.27
4. EP12853365、「液体環流型高速遺伝子増幅装置」、安田 賢二、寺菌 英之、2012.11.27
5. US14/360741、「液体環流型高速遺伝子増幅装置」、安田 賢二、寺菌 英之、2012.11.27
6. CA2870521、「高速遺伝子増幅検出装置」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、2013.3.5
7. CN104245915、「高速遺伝子増幅検出装置」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、2013.3.5
8. EP13757236、「高速遺伝子増幅検出装置」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、2013.3.5
9. US14/382638、「高速遺伝子増幅検出装置」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、2013.3.5
10. PCT/JP2013/059172、「細胞配置装置および方法」、寺菌 英之、安田 賢二、金 賢徹、2013.3.28
11. PCT/JP2013/059173、「細胞機能制御方法」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、2013.3.28
12. EP13769361、「イメージングセルソーター」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2013.3.29
13. US14/388154、「イメージングセルソーター」、安田 賢二、金 賢徹、寺菌 英之、2013.3.29
14. PCT/JP2014/73937、「高速遺伝子増幅検出装置」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、服部 明弘 2014.9.10
15. PCT/JP2014/77198、「イメージングセルソーター」、安田 賢二、寺菌 英之、金 賢徹、服部 明弘 2014.10.10

#### 【共同研究】

契約 7 件

#### 【記者発表・取材】

1. 日本経済新聞「がん再発・転移 血液で早期診断」、2012.9.20
2. 化学工業日報「血液検査で転移がん早期発見」、2013.6.25
3. テレビかながわ「Love かわさき」、2013.8.17

#### 【展示】

1. 「複層構造の機能的金属ナノ粒子作製技術」NanoTech2013、2013.1.30-2.1
2. 「1 細胞レベルでの超高速超高精度機能解析技術の開発」BioTech2013、2013.5.8-5.10
3. 「血中循環がん細胞診断システムの開発」NanoTech2014、2014.1.29-1.31

4. 「ナノカップを用いた細胞精製、in situ ゲノム・プロテオーム解析技術の開発」、安田賢二、BioTech2014、2014. 5. 15

## プロジェクト参加者一覧

〔氏名〕	〔役職〕	〔在籍期間〕
安田 賢二	プロジェクトリーダー（東京医科歯科大学 教授）	2012年4月～2015年11月
金 賢徹	常勤研究員・サブリーダー	2012年4月～2016年3月
寺菌 英之	常勤研究員	2012年4月～2013年3月
	非常勤研究員（東京医科歯科大学 助教）	2013年4月～2016年3月
服部 明弘	常勤研究員	2013年8月～2016年3月
Mathias Girault	常勤研究員	2013年8月～2016年3月
松浦 賢志	常勤研究員	2013年9月～2016年3月
尾高 正朗	研究補助員	2013年4月～2013年8月
	常勤準研究員	2013年9月～2016年3月
竹井 弘之	非常勤研究員（東洋大学生命科学部 教授）	2012年4月～2016年3月
金子 智行	非常勤研究員（東京医科歯科大学 准教授）	2012年8月～2013年3月
野村 典正	非常勤研究員（東京医科歯科大学 助教、准教授）	2012年8月～2016年3月
Babak Gharizadeh	非常勤研究員（Stanford 大学）	2012年9月～2013年2月
三神 裕美	研究補助員	2012年4月～2015年12月
麻生 くみ	研究補助員	2012年4月～2016年2月
細川 ゆり子	研究補助員	2012年6月～2016年1月
長沼 麻衣	研究補助員	2012年6月～2016年2月
長谷川 雅美	研究補助員	2014年5月～2015年9月
川田 前	研究補助員	2012年4月～2016年3月
山本 弘子	事務補助員	2012年4月～2015年5月
川村 以子	事務補助員	2015年5月～2016年3月

# 細胞表面特異的結合 DNA アプタマーの開発

寺菌 英之、金 賢徹、安田 賢二

## 1. はじめに

アプタマーは DNA あるいは RNA、プロテイン等の一本鎖からなる物質で、自身の高次構造により様々な物質に特異的に結合し、抗体に似た性質を示す。

アプタマーの大きな特徴として、①人工核酸で合成可能なため、抗体に比べ品質が安定で大量に生産可能なこと、②核酸分解酵素 (DNase/RNase) によって分解すること、③人工合成により様々な修飾が簡便であることが挙げられる。②の核酸分解酵素による分解はアプタマーを薬剤として使用する場合など効果の持続を目的とした用途としては分解されにくい処理が施されるが、逆に、細胞を特定する標識剤として利用する場合などにおいては、細胞への障害性が少ない可逆的な細胞標識方法として利用することが出来る。抗体など一度ラベリングしてしまえば細胞を生かしたまま剥がすことが難しく、細胞へ障害を与える。我々はこれまでに②の性質を活かして一度標識した細胞に負荷を与えることなく脱標識する新規の技術を開発した[1]。

近年、iPS 細胞、ES 細胞、がん幹細胞の研究領域において、細胞集団は同じ性質を持った細胞集まりではなく一細胞毎に個性を持った細胞の集まりであり、それぞれの細胞周期や分化程度は異なることが明らかとなってきた。また、集団の中で鍵となる極少数の細胞が極めて重要な役割を果たすことが近年明らかになりつつある[2, 3]。

そこで、我々は様々な種類が混在する細胞集団から特定の細胞を非侵襲的に回収するため細胞表面特異的に結合する一本鎖 DNA アプタマー (ssDNA アプタマー) の作製を試みた。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 Cell-surface-SELEX 法による細胞表面結合性 ssDNA アプタマーの作製

細胞表面結合性 ssDNA アプタマーを作製する手法として細胞に対し約  $10^{24}$  種類の人工合成した核酸ライブラリーを混ぜ、結合した物だけを回収する試験管内進化法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment: SELEX 法) を用いて行われる。対象物が細胞であり細胞表面物質をターゲットにした場合で行う事を Cell-SELEX と呼んでいる。通常の Cell-SELEX 法は核酸ライブラリーと細胞を反応させた後、結合したアプタマーと細胞を丸ごと回収し、精製作業を行っていた。しかしながらこの作業は核酸ライブラリーが細胞内部のタンパク

質と反応するため細胞表面以外のアプタマーも回収してしまう。そのため、我々は SELEX による精製過程において細胞をつぶさずにタンパク分解酵素で細胞表面のタンパク質を分解するだけで細胞表面に結合した DNA アプタマーを回収する作業を行い、SELEX を行った。さらに、SELEX の工程を終えたあと、回収した DNA アプタマーの塩基配列をその工程を以下に示す。

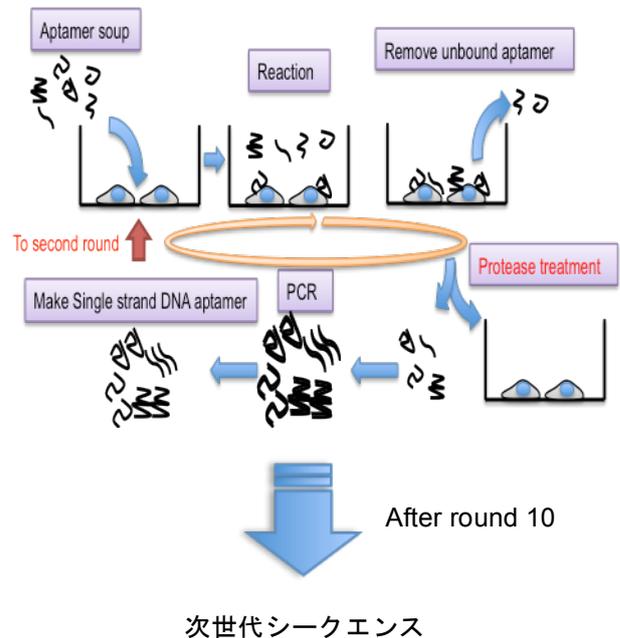


図 1. Cell-surface-SELEX の方法。アプタマースープと呼ばれる核酸ライブラリーをターゲット細胞に暴露させ結合していないアプタマーを除いた後、タンパク分解酵素にて細胞表面のタンパク質のみ消化し、結合アプタマーを回収する。その後、遺伝子増幅を行い、増幅したアプタマーを改めてターゲット細胞に暴露する。この一連の流れを 1 ラウンドとして 10 ラウンド繰り返すことで細胞表面に結合した ssDNA アプタマーを精製する。精製したアプタマーを次世代シーケンスで網羅的に読みとることで細胞表面アプタマーの配列を解析する。

結果としてターゲットになる細胞が様々な細胞の種類から構成されること、また、細胞表面にも様々なターゲット物質が存在することから、次世代シーケンスで読み取った配列は数十万種類の配列を読み取ることが出来た。得られた配列を元にバイオインフォマティクス技術を利用した独自のアルゴリズムを構築し、特徴的な配列をクラスター化した。その結果、数百種類の特徴的な配列を導き

出すことに成功した。

## 2. 2 次世代シーケンスによるアプタマー解析

Cell SELEX により得られた ssDNA アプタマー配列を次世代シーケンスにより網羅的に解析した。

その結果を図 2 に示す。その結果、ラウンドを重ねる毎に、配列のバリエーションが少なくなり精製過程が進んでいることが明らかになった(図 2-a)。また、ラウンドを重ねる毎に相同性が高い配列が濃縮されている様子も確認できた(図 2-b)。また、相同性はおよそラウンド 9 でプラトーに達成していることが明らかとなった(図 2-b)。さらに、ラウンド 10 における配列の相同性を解析し、代表配列を生物進化の研究で使われる系統樹作製法を応用し、配列解析を行った。その結果、大きく分けて 7 種類の配列に区別できることが明らかとなった(図 2-c)。

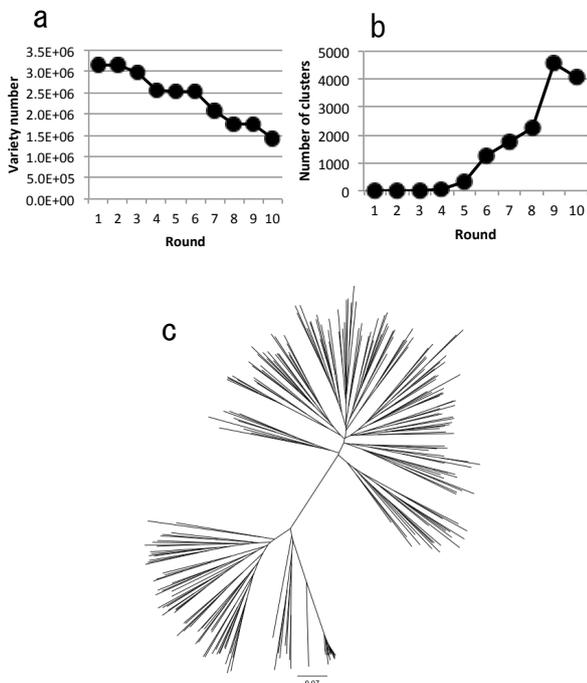


図 2. Cell-surface-SELEX を用いて取得した細胞表面結合性 ssDNA アプタマーによる細胞回収結果。Round10 で回収した ssDNA アプタマーによりターゲット細胞の回収が可能であることが確認された。

## 2. 3 DNA アプタマーによる細胞回収

Cell SELEX により得られた ssDNA アプタマー配列を用いてターゲット細胞表面に結合するか検討した。

その結果を図 3 に示す。手法として合成 DNA の 5' 側に biotin 標識を施し、ストレプトアビジンコートした磁性ビーズと結合させる事により Round 10 アプタマーを磁性標識しその上でターゲット細胞に暴露した。その結果、

Round 10 のアプタマーにより特定の細胞を回収できることに成功し“DNA アプタマーによるセルソーティング”技術を開発できる可能性が示唆された。

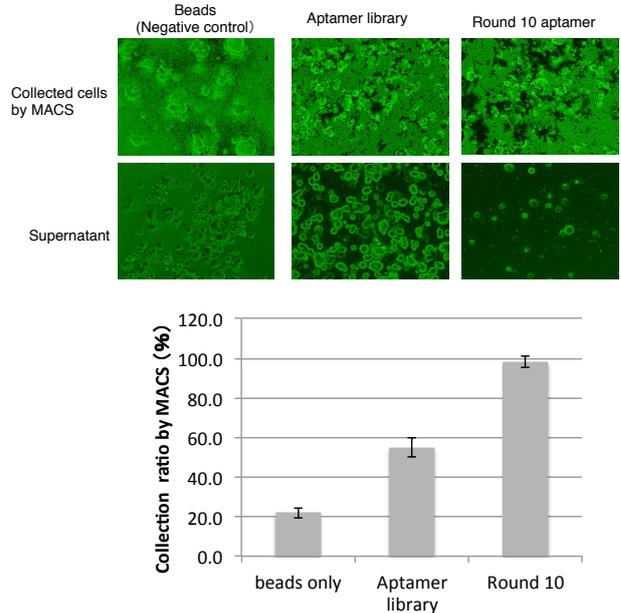


図 3. Cell-surface-SELEX を用いて取得した細胞表面結合性 ssDNA アプタマーによる細胞回収結果。Round10 で回収した ssDNA アプタマーによりターゲット細胞の回収が可能であることが確認された。

手法として合成 DNA の 5' 側に biotin 標識を施し、ストレプトアビジンコートした磁性ビーズと結合させる事により Round 10 アプタマーを磁性標識しその上でターゲット細胞に暴露した。その結果、Round 10 のアプタマーにより特定の細胞を回収できることに成功し“DNA アプタマーによるセルソーティング”技術を開発できる可能性が示唆された。

## 3. 考察及び今後の展望

今回行った方法により、細胞表面をターゲットにした DNA アプタマーを作製出来る事に成功した。

DNA アプタマーは人工的に簡便に医療に応用することが出来る。これは、動物を用いて作製する抗体とは異なりロット差が少なく安定的に供給できるという点で優位である。また、前年度報告したとおり、アプタマーは核酸分解酵素で簡便に分解することができ、精製前の細胞表面状態に戻すことが出来る。これは抗体では出来ない技術である。我々が開発した技術を組み合わせることで、特定の細胞を非侵襲的に精製することが可能になる。本技術はこれから発展していく再生医療に欠かせない技術なる。

### 【参考文献】

1. H. Terazono, *J. Nanobiotech.*, 8:8 (2010)
2. P. B. Dirks, *Nature*, 444, 687 (2006)
3. J. E. Dick, *Nat. Biotech.*, 27, 44 (2009)

# 画像認識型オンチップ細胞精製技術開発と

## 血中循環がん細胞診断への応用

金 賢徹、尾高 正朗、Mathias Girault、服部 明弘、寺菌 英之、安田 賢二

### 1. はじめに

高齢化社会が進んだ現在の日本において、がんは2人に1人がかかる病気となっており、その対策が急務となっている。具体的に対応すべき課題としては、がん早期発見のための診断法開発、転移の有無の判定法開発、適切な抗がん剤選択方法の開発、がん切除後再発有無の診断法開発など多岐に渡るが、いずれも開発状況が十分であるとは言い難いのが現状であり、その原因のひとつは、がん細胞の多様なバラエティによるものである [1]。例えばがん早期発見の診断方法としてはがん細胞表面に発現するマーカー分子を標的とする方法があるが、あるがんには効果的であるのに別のがんは検出できないなど、全てのがんに対して網羅的に適用できるわけではないことが課題となっている。また PET (Positron emission tomography) 検査でも発見が難しいがんの種類や炎症との誤認の問題などが分かっており、検査費用も高く現状では普遍的であると言えない。検査を受ける患者の心理的、身体的負担が少なく、安価であり、かつ由来臓器に依存せず網羅的にがんを発見できる次世代がん診断技術の開発が待ち望まれている。

そのような中で注目を集めている技術のひとつが、血中循環がん細胞 (Circulating tumor cells, 以下 CTC) 診断である。原発巣で変異を獲得し別の部位へと転移する悪性がんは、転移する際に血流中を移動して別の臓器へと漂着し転移することに着目して、患者から数 mL 程度の少量の血液を採取し、その中にがん細胞が含まれているかを調べる診断技術で、従来法に比べて患者への侵襲性が低いことから身体的負担が少なく、また大掛かりな装置も不要であることから検査費用も抑制できる可能性が高いなどの特長がある。本技術の実用化と普及にあたり、要となるのが血液中の正常細胞と CTC の判別であるが、現状ではいくつかのがんマーカー分子を標的として CTC のみを染色し発見する方法が採用されているため、ある種のがん発見には大きな威力を発揮する一方、別の種類のがんは見落とされてしまうといった問題点があった。そこで我々はこれまでに開発を進めてきた画像認識型オンチップ細胞精製技術 [2] を応用し、がんマーカー分子標識でのがん診断に加えて、血液中の細胞画像情報から CTC を発見する新たなアプローチについて検討を進めており、以下ではその開発進捗状況について報告する。

### 2. 実験と結果

#### 2. 1 画像認識型オンチップ細胞精製技術

溶液中に存在する多数の細胞中から目的の細胞を発見し精製する技術のうち、フローサイトメトリーを利用する方法は大量の細胞を高速に全量検査できるという観点から優れている。一般的なフローサイトメトリーでは目的の細胞を蛍光色素で選択的に標識し検出するのが主流であるが、先述のとおり CTC は由来する臓器の種類や獲得した遺伝子変異の種類に依存してバラエティが極めて豊富であるため、全種類の CTC の画一的な蛍光染色は難しい。そこで我々は、従来の蛍光輝度計測に加えて、マイクロチップ中で細胞の画像情報を高速カメラで取得し、リアルタイム画像処理により細胞の形態的特徴を抽出した上で、がん細胞の特徴と一致した場合 (あるいは正常な血球細胞の特徴と一致しなかった場合) にフィードバック制御によりその細胞を回収する原理技術開発と試作機の制作を行った。図 1 は開発した試作機とマイクロチップである [3]。マイクロチップには直径数十ミクロンの微細流路が作製されており、試料導入口に血液を挿入した後、加圧によりマイクロチップ中に血液が導入されるようになっている。微細流路中流部には蛍光計測用の励起レーザと明視野画像計測用の LED パルス光が照射されており、チップ下方にセットした対物レンズを通して蛍光は蛍光検出器で、明視野画像は高速 CCD カメラでそれぞれ検出する。得られた蛍光輝度情報と明視野画像情報は全て 10,000fps の頻度でリア

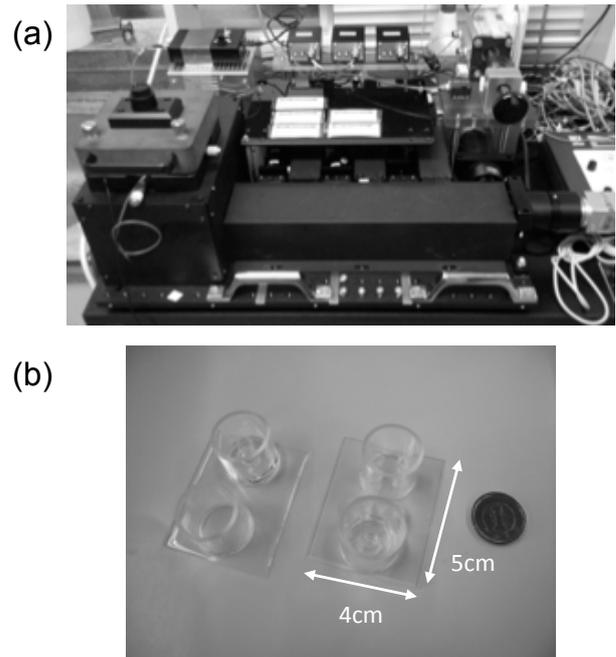


図 1 画像認識型オンチップ細胞精製システム試作機 (a) と搭載するマイクロチップ (b) [3]。

ルタイム処理され、目的の細胞の条件と一致した場合は微細流路中流部の蛍光・明視野画像検出領域の下流に配置した電極に電圧が印加され、直流パルス電圧を細胞に印加して微細流路中での流路進行方向を変化させることにより、目的細胞を回収口へと導き回収する。試作機には現在 3本の蛍光励起レーザ（375nm, 488nm, 515nm）と高速カメラが同時に設置されており、それぞれの蛍光輝度値と画像パラメータ値（細胞面積や周囲長など）の組み合わせから目的細胞を複合的に判定回収できるようになっている。

また我々は、細胞の明視野画像情報に加えて細胞内小器官（細胞核やミトコンドリアなど）の形状情報を合わせて取得し、細胞全体の情報と細胞内微細構造情報を組み合わせることでより複合的な視点から目的細胞を同定するために、マルチビュー計測システムの開発を推進した。図2はそのシステムの原理図である [3, 4]。これは、ある波長（例えば赤色）の画像情報と別の波長（例えば青色）の画像情報の光を共に高速 CCD カメラ方向に導き、カメラ前方に取り付けたミラーユニット内でふたつの波長の光をそれぞれ別の光路へと分けた後、反射ミラーの角度を調節して最終的にふたつの波長の画像が CCD カメラ素子の異なる部分にそれぞれ投影されるよう調整することにより、ふたつの波長の画像情報を同時取得できるようにしたシステムである。現在、我々が開発した試作機では赤色 LED 光源による明視野画像と青色蛍光による蛍光画像（細胞内小器官形状像）を同時取得できるようになっており、ソフトウェアも試作機に最適化して新規製作したためふたつの画像の組み合わせから目的細胞をリアルタイム選別でき、さらにはミラーユニットを拡張することで 3 つ以上の異なる色の画像も同時取得できるよう改良を進めている。

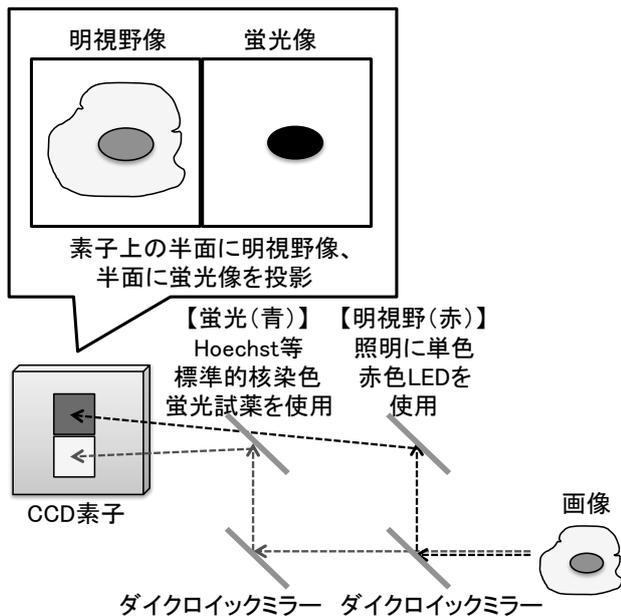


図2 マルチビューユニット計測による多数の画像情報同時取得の原理 [3]。図では 2 画像同時取得の例を示している。

## 2. 2 マルチビュー計測によるがん細胞の検出

以上の新規試作改良した細胞精製システムを用いて、がん細胞を選択的に検出するための原理検討を行った。正常な血球細胞と比べた場合のがん細胞の形態的特徴を明らかにするために、まずはヒト白血病細胞株 (HL60) を用いてがん細胞の画像情報取得を行った。明視野画像情報に加えて細胞核の形状情報取得を行うために、HL60 細胞を 10  $\mu$ g/mL 濃度の Hoechst33258 で 5 分間処理することにより細胞核を蛍光染色した上で、マイクロ流路中に細胞を流し、明視野像と蛍光像（細胞核像）の同時取得を行った。図3はマルチビュー計測により得られた細胞画像の代表的な例である。がん細胞は無限増殖能の獲得により細胞核形状に異常をきたしている場合があるが [5]、計測の結果、一般的な形状に加えて 1 細胞内に細胞核が複数存在する多核細胞（図 3b）が存在することが確認された。また、従来の蛍光輝度計測や蛍光画像のみの計測では識別することが困難である、1 細胞内に複数個の核が存在する多核細胞（図 3b）と、単核の 2 つの細胞が単に近接している場合（図 3c）を容易に識別することができた。これは蛍光画像と同時に明視野画像を同時取得して 1 対 1 対応で確認することができるため実現できたことである。以上のとおり、マルチビュー計測によりがん細胞の明視野画像情報と細胞核形状情報を同時取得することで、多核化といった異常な細胞核形状を持つ細胞を選択的に検出回収することが、血液中から CTC を選択的に回収するための新たな指標候補のひとつとなり得ることを実証できた。

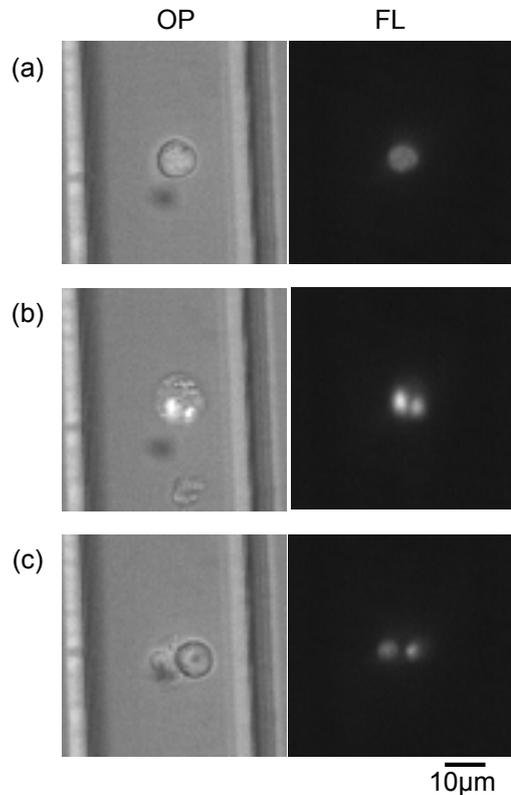


図3 マルチビュー計測による HL60 細胞の明視野像と蛍光像の同時取得。(a) 一般的な核形状の細胞、(b) 多核細胞、(c) 単核の 2 細胞。左 (OP) : 明視野像、右 (FL) : 細胞核染色像。

### 3. 考察および今後の展望

CTC 診断は実現した場合の恩恵の大きさから期待値が極めて高いにもかかわらず、研究進捗としては CTC が血液循環中にどのような細胞生物学的特徴を持つのか、がんのどのステージから CTC が何細胞程度流れるのかなど、ほとんど明らかになっていないのが実情である。その原因の一端は CTC の豊富なバラエティにあり、様々な臓器由来のがん細胞を網羅的に検出することを一層困難にしている。今回の研究推進により、血中を流れる細胞の核形状を指標とすることが CTC 発見の有効なパラメータとなり得ることが示唆されたが、全ての CTC が細胞核形状に特徴的な異常をきたしているわけではなく、従来のがんマーカー検出やその他のパラメータと共に組み合わせて複合的な視点から計測してこそ、網羅的な CTC 検出技術になり得ると考えている。その観点から、我々が試作した装置システムは複数の画像情報と蛍光輝度情報を全て同時に取得でき、かつリアルタイム処理によるフィードバック制御で回収まで可能となっているため、まさに CTC 網羅的検出回収に向けたシステムとしてふさわしいものであると考えている。すでにいくつかのモデル動物を使用した CTC 検出回収実験評価にも着手しており [3]、今後はより複雑な未知の性質のがん細胞を血中から効率的に発見回収すべく、技術評価を進めていく予定である。

#### 【参考文献】

- [1] N. Sethi, Y. Kang, *Nat. Rev. Cancer*, 11, 735 (2011)
- [2] K. Yasuda, A. Hattori, H. Kim, H. Terazono, M. Hayashi, T. Kaneko, F. Nomura, *Microflu. Nanoflu.*, 14, 907 (2013)
- [3] H. Kim, H. Terazono, Y. Nakamura, K. Sakai, A. Hattori, M. Odaka, M. Girault, T. Arao, K. Nishio, Y. Miyagi, K. Yasuda, *PLoS ONE*, 9, e104372 (2014)
- [4] K. Kinoshita Jr., H. Itoh, S. Ishiwata, K. Hirano, T. Nishizaka *et al.*, *J. Cell Biol.*, 115, 67 (1991)
- [5] F. Abdalla, J. Boder, R. Markus, H. Hashmi, A. Buhmeida, Y. Collan, *Anticancer res.*, 29, 1771 (2009)

# 明視野・蛍光デュアルイメージングによるオンチップ・マルチイメージングセルソーターの開発

服部 明弘、金 賢徹、松浦 賢志、尾高 正朗、Mathias Girault、安田 賢二

## 1. はじめに

人体から血液を採取して、血中に異常な細胞等が存在しないか調べることは、がんや免疫などの診断において非侵襲的な健康診断法として広く普及している。例えば、血中循環腫瘍細胞(CTC)は、腫瘍が体内のどこかで成長する前兆と考えられており、血中から CTC を定量的に検出できれば従来の生検法に代わり、人体への侵襲を最小限にするがん診断を確立できるものと期待されている。異常細胞を検出する代表的なアプローチとしては、細胞表面の特定の分子に抗体を吸着させ目印として利用する方法がある。しかしながら、この方法では標的とする細胞における分子発現の多様性が原因で、正しく検出できないことがある。

この課題を解決するために、本プロジェクトではマイクロ流路チップと明視野・蛍光デュアルイメージングを用いたオンチップ・イメージングセルソーターの開発を行った。この装置システムでは、細胞試料を、マイクロ流路チップ内に作製されたマイクロ流路に流しながら高速カメラによって細胞の画像を撮影し、細胞の面積や周囲長といった形状的特徴によって標的細胞を識別するものである。これら形状的なパラメーターは、標的細胞を識別する新たな指標（以後、「イメージング・バイオマーカー」と呼ぶこととする）となる。例えば、巨大化した細胞はいくつかのがん細胞の特徴を示し、また通常細胞と比べて巨大な核を持つものは、がん細胞であることを示す一つの特徴的な表現系であることが知られている。したがって、特に細胞の大きさや核の形態といったイメージング・バイオマーカーを用いた標的細胞の探索は、がん細胞の識別において有用である。本稿では、細胞全体の形状情報を反映する明視野画像と、核の形状情報を反映する蛍光画像の同時処理を行い、イメージング・バイオマーカーとしてリアルタイム解析するオンチップ・マルチイメージングセルソーター、および血液サンプルにおける異常細胞、特に細胞塊の識別について評価した結果について報告する。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 マイクロ流路チップ

図 1 に、マイクロ流路チップの概要を示す。実験に用いたマイクロ流路チップは、これまでの研究[1-3]と同様に、以下のような手順で作製した。ガラス基板上に紫外線硬化

樹脂を  $25\mu\text{m}$  の均一な厚さになるよう塗布し、紫外線を流路パターンの形に照射して硬化させ、流路形状以外の部分の紫外線硬化樹脂を取り除き、マイクロ流路の鋳型となる基板を作製した。次に、マイクロ流路チップの本体の基材となる熱可塑性樹脂のペーストを先の鋳型基板上に滴下した後に加熱・硬化させ、マイクロ流路の形状が転写された樹脂シートを作製した。最後に、この樹脂シートに対してサンプルやバッファの注入口や排出口となる穴を開け、バッファ類を蓄えておくリザーバとするためのプラスチックパイプを樹脂シート上に取り付けてマイクロ流路チップを作製した。なお、2014 年度は明視野と蛍光のデュアルイメージングによる細胞識別の検討用に下流側の流路が一本のみのフローサイトメトリー用チップを用いたが、2015 年度はソーティング機能を実装するためにゲル電極用流路を追加し、下流側が回収用と廃棄用に枝分かれした設計のマイクロ流路チップを作製して実験に用いた。

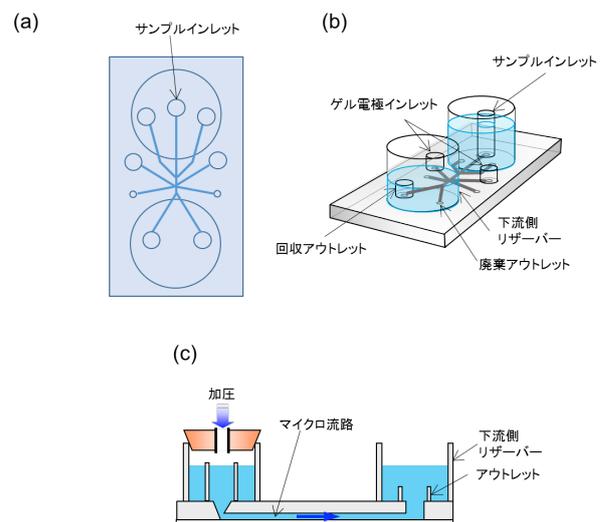


図 1 マイクロ流路チップの概要。(a)チップの模式図。チップの大きさは、50mm 開ける 40mm。(b)チップ全体の鳥瞰図。(c)チップの断面図。

### 2. 2 血液サンプルの精製

本研究では、がんのモデル細胞としてラット前立腺がんの細胞株である MAT-LyLu を用いた。血中にごん細胞を

含んだサンプルとするために、まず $5 \times 10^6$ 個のMAT-LyLu細胞を200 $\mu$ L調製し、月齢6週間の雄コペンハーゲンラットの脊髄皮下組織に移植した。移植して2週間後にラットの鎖骨下動脈から血液を回収し、溶血処理を行った。次にリン酸バッファー溶液で洗浄した後、核染色試薬を用いて細胞核を染色し、再度洗浄した上で5%グルコース溶液中に懸濁して血液サンプルとした。

### 2. 3 フローサイトメトリー

調製後の血液サンプル50 $\mu$ Lをマイクロ流路チップのサンプル注入口に分注し、血液サンプルの調製で用いた5%グルコース溶液をシースバッファーとして、マイクロ流路チップ上のシースバッファー用注入口に分注した。次に、シリンジポンプを用いてサンプル注入口およびシースバッファー注入口に対して圧縮空気によって同時加圧すると、マイクロ流路が上記溶液で満たされて細胞が流路中を流れるので、流路中の流速を3mm/秒に調整し、200フレーム/秒で高速撮影した。

### 2. 4 オンチップ・マルチイメージングセルソーター

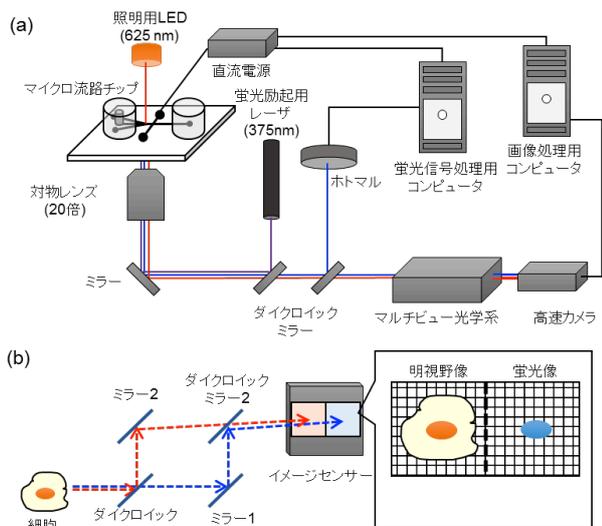


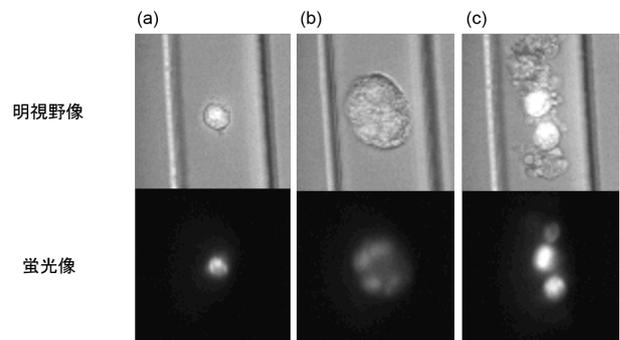
図2 オンチップ・マルチイメージングセルソーターの構成。(a)装置全体の模式図。(b)明視野/蛍光マルチイメージングの原理。マルチビュー光学系内のダイクロイックミラーによって明視野像の光路(赤)と蛍光像の光路(青)が分離され、高速カメラのイメージセンサー上に並べて投影される。

図2(a)に、オンチップ・マルチイメージングセルソーターの概要を示す。明視野観察用照明光源は、波長625nmのLEDがマイクロ流路チップの上方に配置し、流路中を流れる細胞に対して透過照明を行えるようにした。LEDの波長が核染色された細胞からの蛍光波長と大きく離れているために、明視野と蛍光の同時観察を行っても蛍光画像に影響が及ばないようになっている。装置には、倍率20倍の対物レンズが組み込まれており、0.75の開口数を

有するため明るく解像度の高い画像を撮影することができる。装置には蛍光励起光源として375nmレーザを搭載し、さらにホトマルを組み込んだ。これにより、画像だけでなく蛍光信号も検出でき、従来のバイオマーカーを用いたの蛍光検出にも用いることができるようにした。制御系としては、2つの独立したコンピュータを用い、ひとつは蛍光信号の演算用で10,000回/秒の処理が、そしてもうひとつはマルチビュー光学系で得られたイメージング・バイオマーカーの処理用で、細胞を200フレーム/秒で明視野ならびに蛍光像として撮影し、リアルタイム画像処理によって明視野像からは細胞の面積と周囲長を、そして蛍光像からは核の面積と個数を算出できるようになっている。図2(b)はマルチビュー光学系によって細胞の明視野ならびに蛍光像が同時に得られる原理を示したもので、光学系内のダイクロイックミラーによって明視野像と蛍光像を構成する波長成分を分割し、高速カメラのイメージセンサー上に並べて投影することで実現している。

### 2. 5 明視野・蛍光デュアルイメージングによる細胞の同時画像取得

図4に、実際にオンチップ・マルチイメージングセルソーターで撮影された様々な形態の核染色されたHeLa細胞の明視野ならびに蛍光画像の例を示した。これらの画像は、3種類の典型的な細胞像を含んでいる。すなわち、一つの核を持った単一細胞(図4(a))、複数の核を持った単一細胞(図4(b))、そして凝集した複数細胞(図4(c))の3種である。



### 2. 6 イメージング・バイオマーカーによるがん移植ラットの血中細胞塊の識別

イメージング・バイオマーカーによる標的細胞の識別を定量的に評価するため、ラット前立腺がんの細胞株であるMAT-LyLuを移植したラットの血液をモデルサンプルとして実験を行った。図3および図4は、がん細胞を移植したラットの血液サンプル(N=4375)、および健康ラットの血液サンプル(N=1599)における細胞の合計面積(S)、および核の合計面積(S<sub>n</sub>)のヒストグラムである。これらの結果から、2つのしきい値が設定できることがわかった。すなわち、細胞の面積が140 $\mu$ m<sup>2</sup>より大きいもの、そして核の面積が80 $\mu$ m<sup>2</sup>より大きいものは細胞塊であった。ま

た、細胞の面積が  $200\mu\text{m}^2$  を超えるもの、そして核の面積が  $90\mu\text{m}^2$  を超えるものは、がん移植ラットの血液サンプルにのみ見られ、多くの場合、4 個以上の細胞で構成される特徴を持つことが分かった。

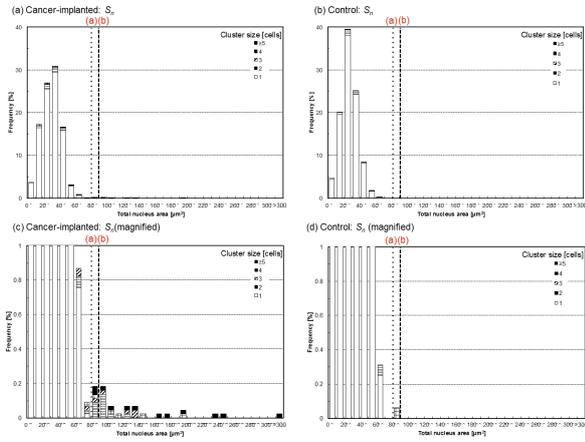


図 3 がん移植ラットと健常ラットの血液サンプルにおける細胞の合計面積 ( $S$ ) のヒストグラム。

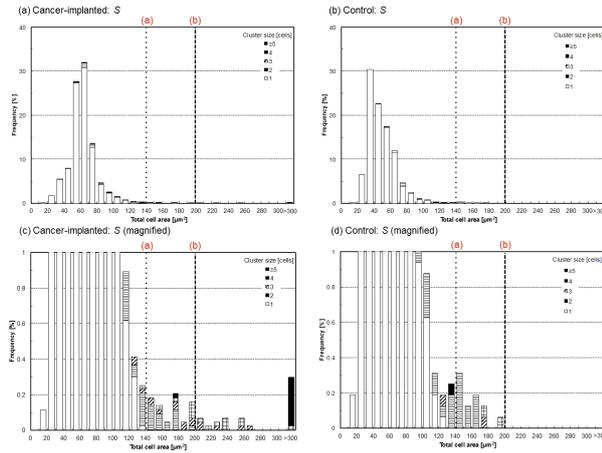


図 4 がん移植ラットと健常ラットの血液サンプルにおける核の合計面積 ( $S_n$ ) のヒストグラム。

一方、システムで撮影された細胞画像を、そこに含まれる核の個数 ( $N_n$ ) に着目して詳細に解析した結果、図 5(a) に示すように、健常ラットの血液サンプルにおいて 99% を超える画像では核は 1 つのみであり、4 個以上の核を持つものは含まれていなかった。そして、図 5(b) に示すように、がん移植ラットの血液サンプルでは細胞塊が大きくなるほど多くの核が含まれていることが分かった。このように核の個数は、細胞塊を識別するための有力なイメージング・バイオマーカーとなることが分かった。しかしながら、がん移植ラットの血液サンプル中には、単一細胞で複数の核を有するものも存在するため、核の個数のみで細胞塊を判定するには不十分である。そこで新たに周囲長比 ( $R$ )

というイメージング・バイオマーカーを定義して評価を行った。 $R$  は、細胞の実際の周囲長と、細胞と同じ面積を持つ円の周囲長との比を取ったものとして定義した。低い  $R$  の値は、細胞の形が真円からより歪んでいることを意味する。このことはすなわち、細胞塊であることが期待される。図 6 は、がん移植ラットの血液サンプルにおける  $R$  の平均値と細胞塊の大きさの関連性を示したものである。単一細胞では  $R$  が 0.9 より大きく、 $R$  が 0.9 未満の場合は細胞数が 2 個以上の細胞塊であった。以上の結果から、4 個以上の細胞で構成され、4 個以上の核を持つ大きな細胞塊はがん移植ラットの血液サンプルにのみ含まれ、 $R$  が 0.9 未満であることが明らかになった。

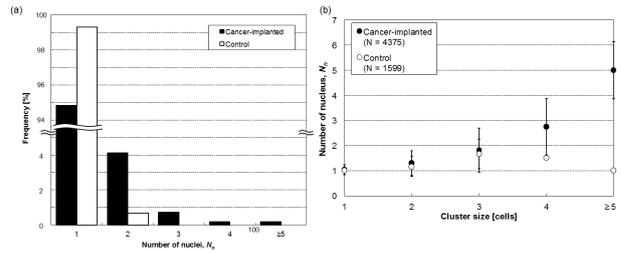


図 5 核の個数 ( $N_n$ ) についてのまとめ。(a) がん移植ラットおよび健常ラットの血液サンプルにおける  $N_n$  のヒストグラム。(b)  $N_n$  と細胞塊の大きさとの関係。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、明視野像および蛍光像の同時イメージングによりソーティング可能なオンチップ・マルチイメージングセルソーターの開発を行い、4 つのイメージング・バイオマーカー、すなわち、細胞の面積、核の面積、核の個数、そして周囲長比について、ラット血液中に含まれる細胞塊の識別評価を実施した。その結果、これらイメージング・バイオマーカーが血中のがん細胞塊の識別に有効であることが確認出来た。今後の展望としては、識別した細胞塊が発現している遺伝子を詳しく調べると共に、がん細胞塊が巨大化するダイナミクスを明らかにするために、がん細胞を移植してからの経時的な計測に取り組む予定である。

#### 【参考文献】

1. A. Hattori, K. Yasuda, *J. Appl. Phys.*, 49, 06GM04, (2010).
2. A. Hattori, H. Kim, H. Terazono, M. Odaka, M. Girault, K. Matsuura, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, 06JL03, (2014).
3. F. Nomura, T. Kaneko, A. Hattori, K. Yasuda, *J. Bioprocess. Biotech.*, S3, 003 (2011).

# 血液中の単一がん細胞を認識するための

## オンチップ・マルチイメージングバイオマーカーの評価

尾高 正朗、金 賢徹、Girault Mathias、服部 明弘、  
松浦 賢志、寺菌 英之、安田 賢二

### 1. はじめに

血液中を循環しているがん細胞は、循環血中腫瘍細胞 (Circulating tumor cell, CTC) と呼ばれ、転移が進むがんでは、細胞は血液やリンパ液の流れに乗って循環し、離れた臓器にまで転移をおこすと考えられている[1]。したがって、末梢血液中のがん細胞を正確に同定することで低侵襲性がん診断が可能になると考えられている。この目的のために、既に多数のアプローチ方法が開発され、実際に診断に用いられ始めている。例えば、標的分子バイオマーカーの検出です。しかしながら、この方法では既知となったバイオマーカーのみに有効である[2]。

一方、我々は細胞自身を検出するオンチップ・マルチイメージングフローサイトメトリーシステムを開発し、形態学的特徴をイメージングバイオマーカーにより細胞を視覚的パラメータで同定する技術を開発中である[3] (図 1 a, b)。この技術は従来の分子バイオマーカーだけでは同定できないクラスタリングした細胞を見出すことができ、実際に、このオンチップ・マルチイメージングフローサイトメトリーシステムで、ラット前立腺がん細胞株 (MAT-LyLu) を移入したがん転移のモデルラットの血液中からクラスタリングした細胞の同定に成功している[4]。

本研究では、この研究成果を補完するため、血液中の単一細胞の同定方法を3つのサンプル(通常血液 : Normal、培養がん細胞 : Cancer、および培養がん細胞移入血液 : Cancer-implanted) で比較して評価した。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 マイクロチップの試作

本研究で利用したオンチップ・マルチイメージングフローサイトメトリーシステムのためのマイクロチップは、高さ  $25\mu\text{m}$  のマイクロ流路が転写し、硬化したポリジメチルシロキサン (PDMS) をカバーガラスに貼り付けて作成した (図 1 c, d)。

#### 2.2 マイクロチップの試作

用いた培養がん細胞は、ダニング R3327 腫瘍から確立された MAT-LyLu を利用した。この細胞をペニシリンおよび

ストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清存在下の RPMI 1640 中で、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  で培養した。

健康ラットと培養がん細胞を移入したラットの血液 (通常血液、または培養がん細胞移入血液) は、神奈川県立がんセンターの動物実験委員会によって承認された手順に従って、採血された血液を利用した。これらの血液サンプルを溶解試薬で赤血球を溶血し、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で懸濁したものを利用した。オンチップ・マルチイメージングフローサイトメトリーシステムで細胞核を可視化するためにヘキスト染色試薬で細胞核を染色した。

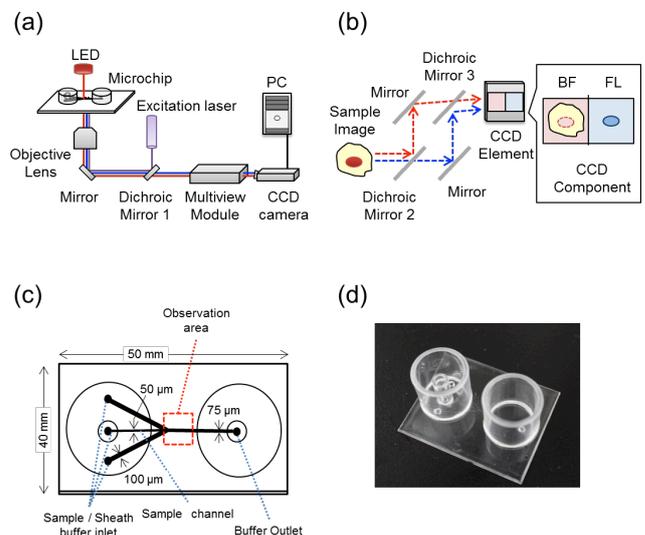


図 1 オンチップ・マルチイメージングフローサイトメトリーシステムの概要 (a) 光学系システムの概要、(b) マルチビューモジュールの光路図、(c) マイクロチップの流路のデザイン、(d) 実際のマイクロチップの写真。

#### 2.3 フローサイトメトリーの手順

シース緩衝液として 1%BSA/PBS を用いて、調製したサンプルをマイクロチップに注入した。その後、空気圧を上げてサンプルをマイクロ流路に流し込み、測定を行った。

測定は、明視野 (BF) 及び蛍光 (FL) 画像の両方を取得するために、マルチビューユニットを通して 200 FPS のカメラ設定で画像を撮影した。3つのサンプル、通常血液、培養がん細胞、および培養がん細胞移入血液を本装置で、同一条件可下で測定した。

## 2. 4 画像データ分析

8つのイメージングバイオマーカーとして、①細胞面積 ( $S_C$ )、②細胞核面積 ( $S_N$ )、③細胞核面積と細胞面積の比 ( $S_N/S_C$ )、④細胞重心と細胞核重心の距離 ( $D$ )、⑤細胞周囲長 ( $P_C$ )、⑥細胞核周囲長 ( $P_N$ )、⑦・⑧細胞と細胞核の面積 ( $S_C \cdot S_N$ ) から計算される周囲長とそれぞれの実測値 ( $P_C \cdot P_N$ ) との比率、 $R_C$  と  $R_N$ 、(ここで、周長比  $R_X$  ( $X=C, N$ ) は、真円度を示す。つまり、 $R_X = 1$  粒子が真である場合に円) を算出し、評価した。3つのサンプルの測定で、得られた単一細胞のみが認識されている画像を各サンプルについて 100 画像以上を今後の解析に利用した。

得られた単一細胞のみが認識されている画像とそれらのマルチイメージングバイオマーカー値を図2に示す。さらに、3つのサンプルごとに  $S_C$  と  $S_N$  の相関図を図3に示した。これより、培養がん細胞は、細胞面積と細胞核面積の相関図より、通常血液中の細胞から明確に区別が可能となった。

また、詳細検討のため2つのカテゴリーに大別した。カテゴリーIは  $S_C \leq 58 \mu\text{m}^2$ 、 $S_N \leq 43 \mu\text{m}^2$  で、カテゴリーIIは、 $S_C > 58 \mu\text{m}^2$ 、 $S_N > 43 \mu\text{m}^2$  (それぞれの数値は通常血液の細胞の最大値) に分類し、それぞれの統計値を表1にまとめた。

	ID	BF	FL	$S_C$ $\mu\text{m}^2$	$S_N$ $\mu\text{m}^2$	$S_N/S_C$	$D$ $\mu\text{m}$	$P_C$ $\mu\text{m}$	$R_C$	$P_N$ $\mu\text{m}$	$R_N$
normal	a			36.2	17.9	0.50	5.9	21.9	0.97	15.4	0.98
	b			43.0	31.2	0.73	2.7	23.7	0.98	20.6	0.96
	c			48.6	43.3	0.89	2.9	25.5	0.97	24.1	0.97
cancer	d			109	99.4	0.91	0.49	39.5	0.94	37.2	0.95
	e			115	50.2	0.44	2.4	39.0	0.97	26.6	0.95
	f			173	103	0.60	2.3	47.8	0.98	38.9	0.92
	g			248	102	0.41	2.2	57.3	0.98	37.7	0.95
	h			277	159	0.57	1.5	61.7	0.96	46.5	0.96
	i			274	48.1	0.18	0.60	60.3	0.97	28.5	0.86
cancer-implanted	j			421	134	0.32	1.5	76.5	0.95	42.9	0.95
	k			26.4	19.7	0.75	2.0	18.9	0.96	16.2	0.97
	l			51.2	30.9	0.60	1.3	26.2	0.97	20.8	0.95
	m			84.9	49.3	0.58	1.6	33.7	0.97	25.7	0.97

図2 典型的な単一細胞画像とマルチイメージングバイオマーカー値 (a-c) 通常血液、(d-j) 培養がん細胞、(k-m) 培養がん細胞移入血液。白バーは  $10 \mu\text{m}$

また、マルチイメージングバイオマーカーの有力な候補である  $S_N/S_C$ 、 $D$ 、 $R_C$ 、 $R_N$  について3つのサンプルのヒストグラム分析を図4に行った。これより  $S_N/S_C$ 、 $D$ 、 $R_C$  は3つのサンプルで有意な差は認められないが、 $R_N$  は培養がん細胞の一部で0.9よりも小さいものが認められた。

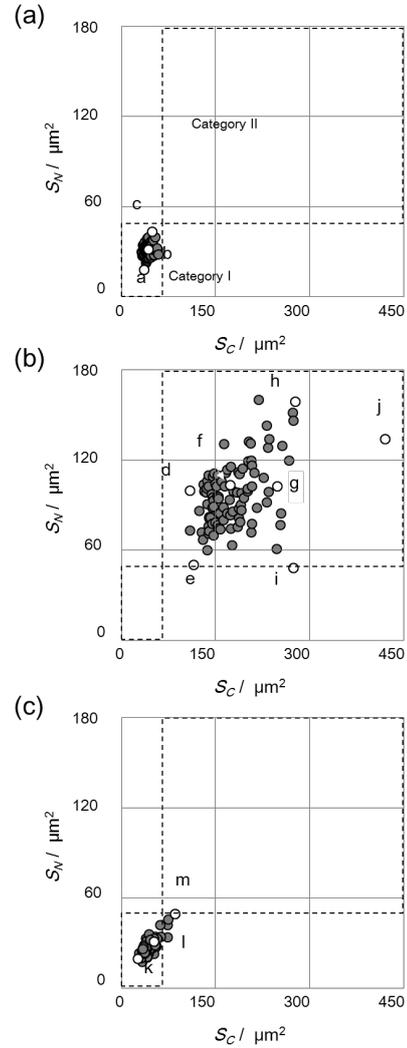


図3 細胞面積と細胞核面積の相関図 (a) 通常血液、(b) 培養がん細胞、(c) 培養がん細胞移入血液。図2中のID対応するドットを白色点として示す。

## 3. 考察及び今後の展望

以上の結果より (1) 培養がん細胞は、細胞面積と細胞核面積の相関図より、通常血液中の細胞から明確に区別することができ、(2) 細胞核面積と細胞面積の比、細胞重心と細胞核重心の距離、細胞の真円度を示す比率  $R_C$  は3つのサンプル間で有意な差はなく、(3) 培養がん細胞の一部は  $R_N$  が0.9よりも小さかった。これらの結果は、イメージングバイオマーカーの測定で、血液中のがん細胞を同定できる可能性を示す。したがって、我々はこのマルチイメージングバイオマーカーは CTC の検出技術に活かされると確信している。

表 1 マルチイメージングバイオマーカー統計値

	Number	Cellular area	Nuclear area	Area ratio	Distance of mass center	Cellular Perimeter	Cellular Perimeter ratio	Nuclear Perimeter	Nuclear Perimeter ratio
		( $S_C$ ) $\mu\text{m}^2$	( $S_N$ ) $\mu\text{m}^2$	( $S_N/S_C$ )	( $D$ ) $\mu\text{m}$	( $P_C$ ) $\mu\text{m}$	( $R_C$ )	( $P_N$ ) $\mu\text{m}$	( $R_N$ )
Normal All: Category I n=100	Mean	43	31	0.74	2.9	24	0.97	21	0.96
	S.D.	5.2	4.0	0.11	0.87	1.4	0.0083	1.4	0.016
	Median	43	31	0.75	2.8	24	0.97	21	0.97
	Max	58	43	0.99	5.9	28	0.98	24	0.99
	Min	32	18	0.48	1.0	21	0.93	15	0.91
Cancer All: Category II n=100	Mean	180	97	0.56	1.7	49	0.97	38	0.92
	S.D.	48	22	0.13	0.78	6.3	0.0088	4.0	0.035
	Median	170	96	0.55	1.7	48	0.97	38	0.93
	Max	421	160	0.91	3.8	77	0.98	47	0.97
	Min	109	48	0.18	0.28	38	0.92	27	0.82
Cancer-implanted n=100	Mean	44	28	0.64	1.4	24	0.97	19	0.96
	S.D.	10	5.1	0.087	0.31	2.6	0.0089	1.8	0.017
	Median	42	27	0.64	1.4	24	0.97	19	0.97
	Max	85	49	0.64	2.4	34	0.99	26	0.98
	Min	26	17	0.44	0.55	19	0.92	15	0.91
Cancer-implanted Category I n=94	Mean	42	27	0.65	1.4	24	0.97	19	0.96
	S.D.	6.6	3.6	0.086	0.29	1.9	0.010	1.3	0.016
	Median	42	27	0.64	1.4	24	0.97	19	0.97
	Max	56	36	0.84	2.0	28	0.99	22	0.98
	Min	26	17	0.44	0.55	19	0.92	15	0.91
Cancer-implanted Category II n=2	Mean	80	48	0.60	1.5	33	0.97	25	0.97
	S.D.	7.1	2.6	0.021	0.11	1.3	0.0031	0.67	0.00031
	Median	80	48	0.60	1.5	33	0.97	25	0.97
	Max	85	49	0.61	1.6	34	0.97	26	0.97
	Min	75	46	0.58	1.4	32	0.96	25	0.97

【参考文献】

1. N. Aceto, A. Bardia, D. T. Miyamoto, M. C. Donaldson, B. S. Wittner, J. A. Spencer, M. Yu, A. Pely, A. Engstrom, H. Zhu, B. W. Brannigan, R. Kapur, S. L. Stott, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, C. P. Lin, M. Toner, D. A. Haber, and S. Maheswaran, *Cell*, 158, 1110 (2014).
2. F. Tanaka, K. Yoneda, N. Kondo, M. Hashimoto, T. Takuwa, S. Matsumoto, Y. Okumura, S. Rahman, N. Tsubota, T. Tsujimura, K. Kuribayashi, K. Fukuoka, T. Nakano, and Hasegawa S. *Clin. Cancer Res.*, 15, 6980 (2009).
3. A. Hattori, H. Kim, H. Terazono, M. Odaka, M. Girault, K. Matsuura, and K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.* 53, 06JL03 (2014).
4. H. Kim, H. Terazono, Y. Nakamura, K. Sakai, A. Hattori, M. Odaka, M. Girault, T. Arao, K. Nishio, Y. Miyagi, and K. Yasuda, *Plos One* 9, e104372 (2014)

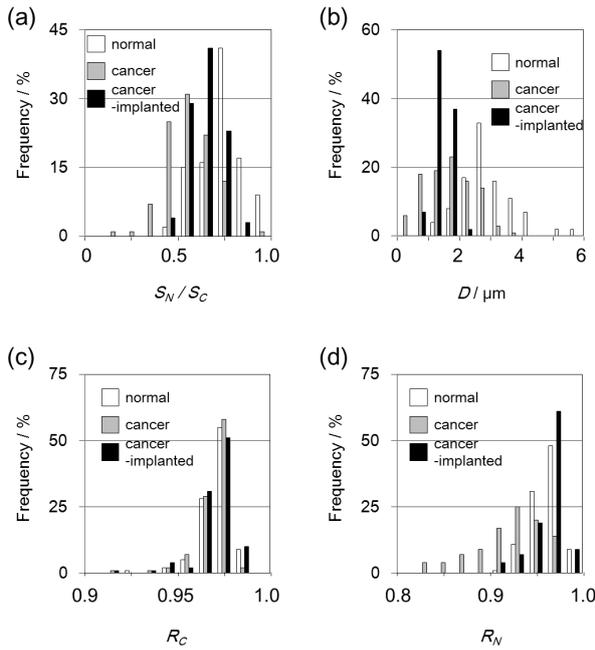


図 4 ヒストグラム分析 (a) 細胞核面積/細胞面積の比 ( $S_N/S_C$ )、(b) 細胞重心と細胞核重心の距離 ( $D$ )、(c) 細胞、(d) 核の面積から計算される周囲長とそれぞれの実測値との比  $R_C$  と  $R_N$ 。

# Controls of pressure-driven micro-droplet formation and optimum encapsulation in microfluidic system

Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, and Kenji Yasuda.

## 1. Introduction

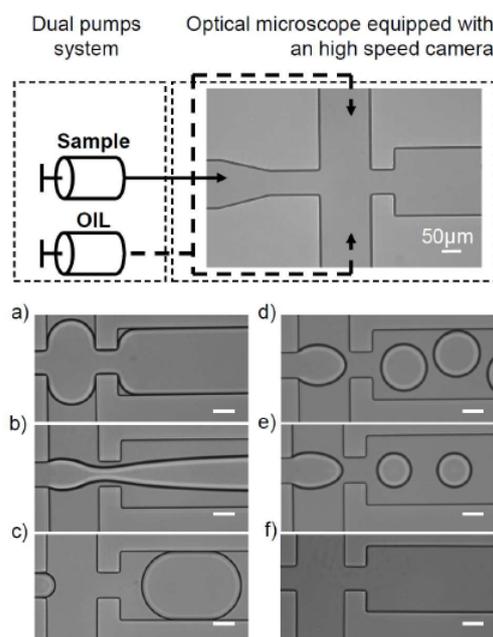
As a part of the on-chip cellomic project, a complementary microfluidic method was investigated in order to compartmentalize sample into constant volume. To reach this goal, we examined the creation of reproducible water-in-oil droplets capable to encapsulate object such as cell clusters. In the literature, the formation and encapsulation of objects are often limited to the random case and can be modelled by using the Poisson's distribution. This approach expects that the flow in the channel prior to encapsulation can carry objects without sedimentation. However, this statement is often violated in the low range of pressures and contributes to separate encapsulation and sorting chips to overcome this phenomenon. Although the sedimentation was not fully investigated by comparison to other parameters such as droplet speed or sorting mechanisms, it appeared to be crucial that the development of integrate chip needs a better characterizing of the range of pressures and an exploration of the relationships between parameters monitored in 'real-time' and the flow pattern.

In this project, we investigated a method using a pressure-controlled system in order to create an emulsion of homogenous micro-droplets able to contain objects with a diameter size up to 20  $\mu\text{m}$ . This study also describes the different flow regimes with a particular focus on the generation of stable droplet flow, needed to develop sorting microfluidic applications. This detailed approach could lead to find the most suitable experimental setting capable to control the encapsulation of object in a stable droplet flow.

## 2. Material and methods

A dual pumps system composed of two independent compact air cylinders was used to generate the droplet by flow focusing an aqueous stream with two streams of fluorinated oil containing a surfactant. All pressures are reported relative to the atmosphere. Inverted microscope equipped with a CMOS camera was used to capture digital images during

droplet formation. This camera was connected to the computer where LabVIEW 2013® software was installed. The stable droplet flow pattern is defined as a single droplets flow centred in the microchannel and moving linearly through the channel. In contrast, the unstable droplet flow is defined as multiple flows of droplets which linearly or not moved in the microchannel.



**Figure 1:** Schematic drawing of the experimental devices and pictures of the six different flow regimes (scale bar 50 $\mu\text{m}$ ). (a) is the micrograph of the channel filled with sample (sample only), (b) an annular flow pattern, (c) the droplet with diameter size higher than the channel width (plug pattern), (d) the unstable droplet pattern where the droplets are not centred in the channel, (e) the droplet centred in the channel (stable droplet pattern), (f) shows the channel only fill with oil (oil only).

## 3. Results and discussion.

### 3.1 A competition between the inertial and the viscous forces in a fixed geometry

By using the dual pump system, combinations of 400 different pressures were measured and the associated two-phase flow patterns were recorded. Flow patterns were discriminated into six different cases characterizing either droplet types or single phase flows (Figs. 1, 2). Then, droplet flow types

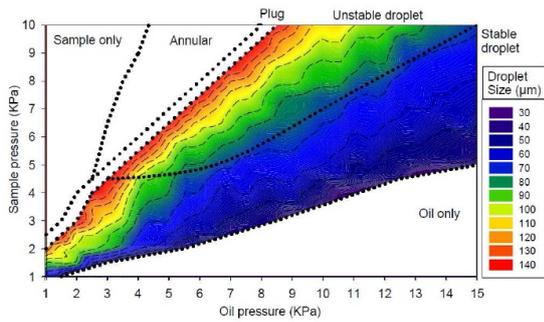


Figure 2: Relationship between droplet shape and the pressures applied on the sample and oil inlets. The different flow regimes observed in the range of pressure used were delimited by the black dotted lines.

were categorized into stable and unstable droplet patterns (Figs. 1d and 1e, respectively). Among the different flow regimes, the minimum droplet size ( $\approx 30 \mu\text{m}$ ) of the chip was slightly smaller than the flow focusing contraction width ( $50 \mu\text{m}$ ) and indicated the strong geometry dependence in the pressure-controlled system. Moreover, results showed that the droplet diameter was limited to  $\sim 70 \mu\text{m}$  in the stable droplet regime flow at the frequency higher than 2 Hz. The specific diameter of the droplet corresponding to the half of the channel could be linked to the change in dominant force between the inertial and the viscous forces<sup>1)</sup>. In this context, calculations of the Re numbers were performed according to the geometry of the microfluidics devices in view to verify if any possible increases of the Re numbers can describe any change in the flow regimes. With a Re number lower than 0.5, the flow should be laminar in the channel and droplets are expected to move straight through the channel. As unstable flow was observed, this result suggested that flow regime can not only depend on the formation area but also to the subsequent parts of the microfluidic device. This integrative approach was in agreement with the study of Lee et al. (2009)<sup>2)</sup> which reported that droplet formation could depend on either the upstream geometry and associated flow field or the geometry and flow field in the downstream channel. Consequently, our results indicated that precise control of the droplet flow type can be reached by taking into account the entire geometry of the channel and illustrated the complexity of the flow type prediction based on the single Reynolds number value calculated at the droplet formation area. As we observed that

the Re numbers can not easily describe the change between the stable and unstable droplet flows, additional indexes were investigated to better identify the range of stable droplet domain.

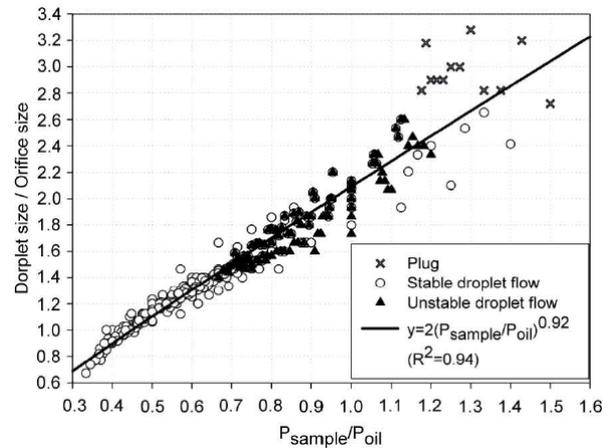
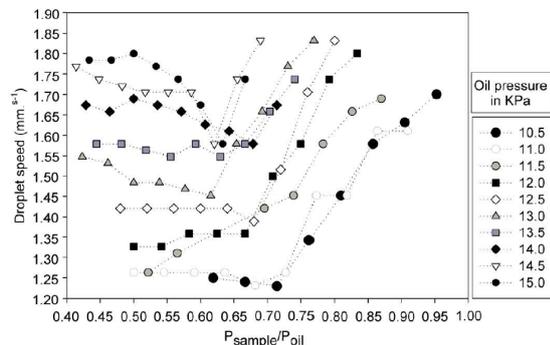


Figure 3: Relation between the droplet to the orifice size of the sample channel and the sample to oil pressures. The cross symbols are the plug flow regime (fig. 1c), the white circles are the stable droplet pattern (Fig. 1d) and the black triangles shows the unstable droplet pattern (Fig. 1e). The black line is the power regression curve calculated using the entire data set ( $n=382$ ).

### 3.2 Limit between the stable and unstable droplet flows

Abrupt change between the stable and the unstable flows is difficult to quantitatively describe in the small channel because of the lack of velocimeter that can measure turbulence in microchannels without beads addition. This limit is also particularly important for common microfluidic applications, where the position of object must follow a specific path through the channel such as in sorting experiments<sup>3)</sup>. The figure 4 shows the droplet speed at different constant oil pressures depending on the pressure ratio  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ . By fixing the oil pressure and increasing the dispersed phase fluid, the hydrodynamics of the two phases flow was characterized by two phases, i) a first phase, where the droplet speeds were nearly constant or tended to decrease (up to  $200 \mu\text{m s}^{-1}$ , oil pressure: 15 kPa), and ii) a second phase, where a sudden increase of speeds were measured between  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$  0.6 and 0.8. Excepted for the oil pressures equalled to 11.5 to 12 kPa, these two phases characterized by a minimum of the droplet speed mainly ranged between  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$  equal 0.6 and 0.8 correspond precisely to the transition between the stable and the unstable droplet flow regimes. The critical value of the minimum of the

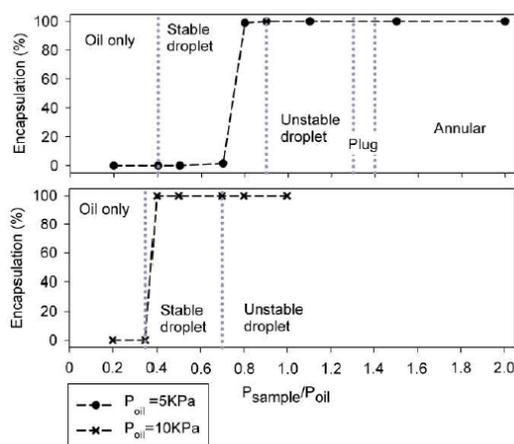
droplet speed also suggested that the increase of pressure on dispersed phase not necessary led to an increase of droplet speed moving through the channel.



**Figure 4:** Droplet speed ( $\text{mm s}^{-1}$ ) at different constant oil pressures (kPa) depending on the pressure ratio  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ .

### 3.3 The suitable flow regime for encapsulation

The percentage of encapsulation of the  $20 \mu\text{m}$  beads depending on the pressures ratio  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$  is shown in Fig. 5. The percentage of encapsulation is characterized by a drastic increased (0-100 %) in the stable droplet phase. This rapid increase was found in the range of pressure lower than 0.1 kPa which is the detection limit of the pressure sensor. The limit between the oil-only flow and the stable droplet regimes shows the lower percentage of droplet encapsulation (0 %) when the oil pressure was maintained either at 5 kPa or 10 kPa.



**Figure 5:** Encapsulation of  $20 \mu\text{m}$  standard beads (%) depending on the ratio  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$ . The upper (black dots) and the bottom panels (black crosses) are the encapsulation of beads when  $P_{\text{oil}}$  was fixed to 5 kPa and 10 kPa, respectively. The dotted gray lines show the limit between the different flow regimes.

In contrast, the limit between the stable and unstable droplet regimes was characterized by the higher encapsulation percentage ( $\sim 100\%$ ). These results indicated that the most robust encapsulation of the beads  $20 \mu\text{m}$  (high frequency and the speed of droplets) was found in the higher  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$  ratio and suggested that the higher  $P_{\text{sample}}/P_{\text{oil}}$  ratio of the stable droplet regime located near the limit stable-unstable droplet flow regimes appeared to be the most suitable range of pressures for the sorting experiment using our microfluidic device.

### 4. Conclusions

By using a pressure-controlled flow focusing device two single phases and four different multiphase flow regimes were observed and their conditions were examined. Although the Reynolds number was always lower than 1 in the droplet formation area, unstable droplet regime flow was observed and suggested that in addition to the viscosity, the channel geometry in small microfluidics is important and should integrate the entire chip design either than a single section. Results also highlighted that the limit between the unstable and stable droplet regimes was the most suitable for sorting application due to the compromise between the droplet size, frequency, distance between two consecutive droplets and encapsulation of beads. The limit can be detected using the drastic change of the droplet speed found at the threshold between the two regimes. Finally, our results showed that the increase the sample inlet pressure not necessary increases the droplet speed underlying the difference in speed between the carrier fluid and the droplet flow.

### References

1. J.F. Edd, J Di Carlo, K. J. Humphry, S. Köster, D. Irimia, D.A. Weitz, M. Toner, *Lab Chip*, 8:1262-1264, (2008).
2. W. Lee, L.M. Walker, S.L. Anna, *Phys. Fluids*, 21:032103, doi: 10.1063/1.3081407, (2009),
3. L. Mazutis, J. Gilbert, W.L. Urig, D.A. Weitz, A.D. Griffiths, J.A. Heyman, *Nat. Protocols*, , 8: 870-891, (2013)

# Algorithm for the precise detection of single and cluster cells in microfluidic applications

Mathias Girault, Akihiro Hattori, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Masao Odaka, Hideyuki Terazono, and Kenji Yasuda.

## 1. Introduction

As a part of the on-chip cellomic project, a complementary microfluidic method was investigated in order to compartmentalize sample into constant volume. Control of creation of each compartment was achieved within this past year. This stable dual-flow system opened several opportunities in the field of the cell biology. However, detection of cell in each compartment was particularly difficult without suitable algorithm capable to track a target in the flow of images<sup>1)</sup>.

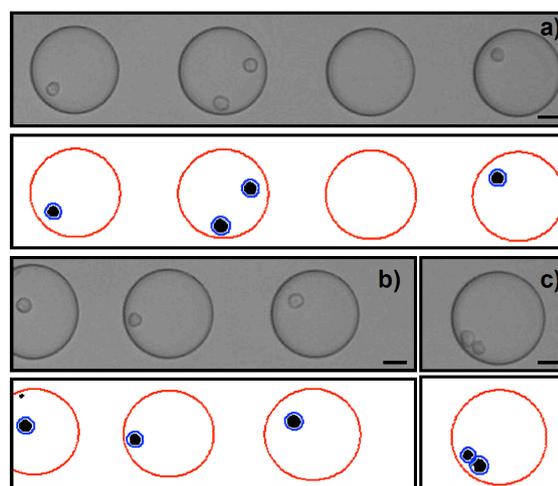
To reach this goal, we developed a new and an original algorithm capable to detect cell in an image. In contrast to currently existing algorithms, we herein proposed the identification and reconstruction of cell edges based on original approaches that overcome frequent detection limitations such as halos, noise, and droplet boundaries in microfluidic applications<sup>2,3)</sup>. Reconstructed cells are then discriminated between single cells and clusters of round-shaped cells, and cell information such as the area and location of a cell in an image is output.

The method developed in the present study is the first image processing algorithm designed to be flexible in use (*i.e.* independent of the size of an image, using a microfluidic droplet system or not, and able to recognize cell clusters in an image) and provides the scientific community with a very accurate imaging algorithm in the field of microfluidic applications.

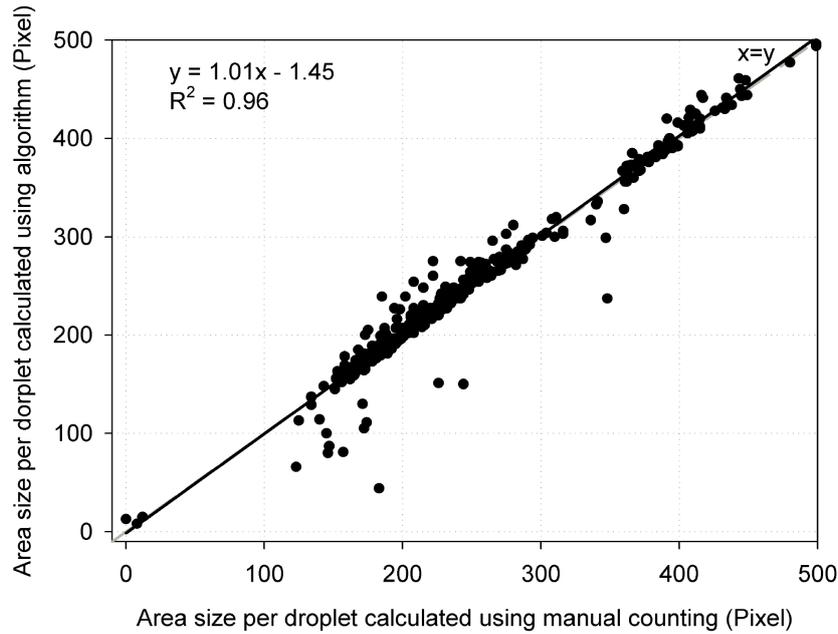
## 2. Material and methods

The algorithm proposed in this study was deconstructed into the ten different steps described in detail in additional notes 1 and 2 of the paper (in press). Briefly, these steps firstly defined the minimum gradient of the light condition from a background image. Using this gradient, wavelet decomposition and fusion were processed on each image captured with the camera. Three correction methods were proposed in order to eliminate the false positive edge caused by a change in light intensity in the background, undesirable

small particles in the image (size lower than four pixels), and halos around cells. The detection of cell clusters and possible droplets was computed using the Hough circular transform. Following the detection of circular objects, three linking methods were performed in order to link the different parts of the edge. These methods: *i)* connected two edge pixels separated by a pixel undetected as an edge; *ii)* detected the ends of the existing edges and continued them where the smallest distance in the neighboring pixels was found; *iii)* linearly continued the edges in eight different possible directions based on the angles of the existing edges. A flood fill algorithm was then added in order to complete the cell structure and output morphological parameters such as the cell area and cluster detection for common microfluidic applications. In the case of microfluidic applications with droplets, a comparison of the distance between the centroids of the cell and the droplet detected was used to locate and output morphological information of the cell for each droplet.



**Figure 1.** Examples of images of cells encapsulated in a droplet and the result of the image processing algorithm developed in this study (scale bars are 30  $\mu\text{m}$ , red and blue circles are droplets and cells, respectively). a is an image of four entire droplets captured with a camera mounted on a microscope. b shows the result of the algorithm of three droplets in which the left one is partially masked. c displays two cells in contact encapsulated in a single droplet.



**Figure 2.** Relationship between the size area (pixel) of cell(s) encapsulated in a droplet measured manually and the area calculated using the algorithms tested. The dashed grey line shows the theoretical line at which the manual count of the area equals the area calculated using the algorithm. The black line is the linear regression calculated using the data set of 500 droplets.

To test the accuracy of the algorithm a set of 500 images of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) were captured and tested using our proposed algorithm. Using the toolbox of the ImageJ software, the area of a cell was estimated by manually drawing the edge and counting the number of pixels as part of the cell. Decisions regarding cell edges were made by visual inspections and the contrast between the regions of the cell and background.

### 3. Results and discussion.

Figure 1 shows three common examples of images of a cell encapsulated in a droplet. The large red circles displayed the droplets, whereas the small blue circles represented the locations of the cells detected. These examples showed that the algorithm developed in this study was capable of detecting multiple cells inside the same droplet and also a cell in a partially masked droplet. Using the Hough transform, the droplet-sheath boundary was masked with accuracy and the cell was correctly isolated (Fig. 1). The small spot observed in the partial droplet in the bottom panel also confirmed that the Hough transform had the ability to correctly identify a cell and disregard particles with smaller diameters. When a set of 500 images of cells encapsulated in droplets was processed, comparisons

between the size areas of the cells calculated using our algorithm and the manual counting method showed a significant linear relationship ( $y=1.01x-1.45$ ;  $R^2=0.96$ ,  $n=500$ , Fig. 2). The high coefficient of the determination associated with the value of linear regression close to 1 confirmed the efficiency of the proposed algorithm to overcome the droplet boundary limitation and return accurate morphological information.

### 4. Conclusions

We herein developed a new algorithm capable of detecting the edges of cells with complex shapes in an image in the presence or absence of a droplet using the Hough transform and gradient method. Since the gradient method alone cannot detect a continuous cell wall, additional linking steps were included in the image processing algorithm. These linking steps consisted of exploring the minimum distance in each neighboring pixel at the end of the already detected edge in order to extend the edge. Moreover, linking processes using straight lines appeared to overcome the issue of cell parts with brightness close to the halo. Comparisons of the sizes of cell areas with five common edge detector-based algorithms revealed the high efficiency of the proposed algorithm for detecting the edge and the linking process in isolated or droplet encapsulated cells. The

algorithm was also tested on cluster cell images, and the results obtained showed that it contributed mathematically to detecting the morphology of round-shaped cells aggregated in clusters and output a precise area value. The algorithm proposed in this study may be integrated in an imaging cell sorter in order to more accurately identify targeted cells or clusters flowing in microfluidic devices after conversion in a low level programming language.

Results of this study were accepted for publication in the journal *Cytometry Part A*.

### **References**

1. L. Mirosław, A. Chorazyczewski, F. Buchholz, R. Kittler. Correlation-based method for automatic mitotic cell detection in phase contrast microscopy. In: Kurzynski M, Puchala E, Wozniak M, Zolnierek A (Eds) *Computer recognition systems*. Springer, Berlin, 2005:627–634.
2. S. Chen, M. Zhao, G. Wu, C. Yao, J. Zhang. Recent advances in morphological cell image analysis, *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012;101536:1-10.
3. M. A. El-Shenawy. Automatic detection and identification of cells in digital images of day 2 IVF embryos, *PhD thesis, University of Salford*, 2013:1-260.

# 超音波放射圧による生体微粒子の 非接触マニピレーション

松浦賢志、野村典正、金賢徹、寺菌英之、服部明弘、安田 賢二

## 1. はじめに

近年関心を集める技術分野の一つとして、光ピンセットなど、光波または超音波などの波動を制御し、微細粒子を $\mu\text{m}$ オーダーの微小空間サイズで非接触制御する技術の利用が広がっている。そして機械的に直接把持することが困難な微小世界の現象の計測、例えばタンパク質1分子の発生力の計測、或いは微細加工技術で作成された微小構造体の移動や精製などに利用されるようになってきている。

### 1. 1 研究目標

以上述べたように、本プロジェクトの研究目標に必要な関連技術の一環として、超音波に着目し、その利用法として、超音波放射圧による生体微粒子マニピレーション、及び超音波放射圧の可視化による計測技術開発を試みる。

### 1. 2 研究内容

最初の段階として、超音波利用技術の再現性を試みる。まず超音波を発生させるための簡潔な装置を、圧電体素子、表面弾性波デバイスなどの超音波発振素子を用いて構築し、それらの素子の形状をフレキシブルに変化させられる柔軟なシステムとして構築することを試みる。

そして、次の実験段階として、微小容器内の懸濁液中の微粒子を超音波の放射圧によって非接触に捕獲したり、あるいは特定の方向に配列、配向させる制御ができるようにする。そしてさらに超音波の性質の理解を深めるため、超音波放射圧の測定を試みる。以上の研究内容となる。そして本稿において、本研究における超音波放射圧の生体試料への応用の可能性について紹介する。

## 2. 超音波マニピレーション

### 2. 1 微粒子が受ける超音波放射圧

定在波中における超音波放射圧は、微粒子の粒径の3乗に比例して減少してゆき、最終的にはブラウン運動のために捕獲できなくなってしまうが、果たして $\mu\text{m}$ サイズの微粒子の場合においても同様な結果が得られるだろうか。

実際にポリスチレン微粒子を用いて一定強度の超音波源から照射される超音波に対する超音波放射圧の粒径依存性を調べると、興味深いことがわかった。すなわち微粒子の粒径が $\mu\text{m}$ 領域になると、微粒子が受ける力の減少の割合が減ってきて、一定の値に漸近するのである(図1)。原因は、粘性流体の効果によって微粒子の粒径が $\mu\text{m}$ 以下になるといわゆる粘性流体の殻が微粒子の受ける超音波放射圧の強さを増幅するためと考えられる。例えば粘性流

体の境界層の厚さ $h$ を考えると、以下の(1)式が成り立つ。

$$h = \sqrt{\frac{2\eta}{\rho\omega}} \quad \dots (1)$$

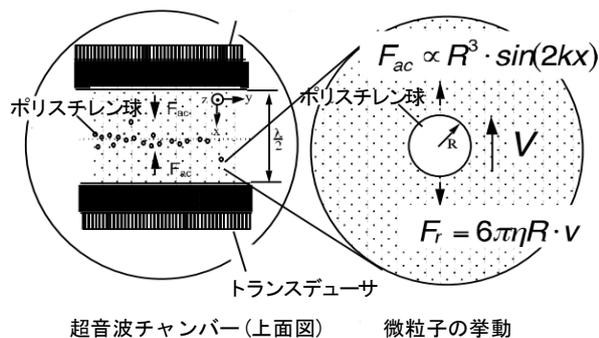
例えば500kHzの定在波のとき、微粒子を取り囲む水の殻の厚さは $0.8\mu\text{m}$ 程度である。ただし、 $\eta$ は水の粘性係数である。

これは、実験結果( $1.5\mu\text{m}$ )に近い値であり、mmサイズの大きな微粒子では影響が無視できるが、数 $\mu\text{m}$ 程度の粒径の微粒子で初めて観察できるものである。従来、超音波放射圧は微粒子の粒径の3乗(体積)に比例して急激に減少するため、 $\mu\text{m}$ 未満の小さな微粒子は捕獲が難しいと考えられていたが、この効果によって超音波放射圧は理論で予測されていた粒径より小さい微粒子を効果的に捕獲することが可能であることが示唆された。また蛍光色素のような分子量数百程度の小さな分子に対して超音波放射圧がどのような効果をもたらすかも検討され、超音波の放射圧によって蛍光色素のような蛍光高分子も超音波放射圧の力を受けて分散することも明らかにしている。

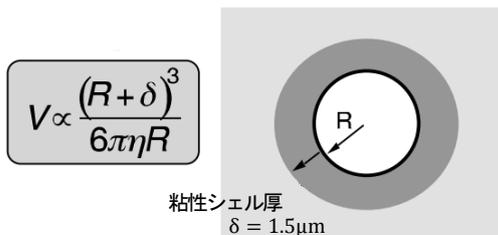
### 2. 2 定在波を用いたDNA濃縮・血球濃縮

超音波定在波中における微粒子捕獲・濃縮技術は超音波放射圧を用いた微粒子操作技術の中でも最も特徴的なものの一つである。水中での音速は $1,500\text{m/s}$ であることから、1MHz程度の超音波を用いたときの水中での波長は $1.5\text{mm}$ 、100MHzの超音波を用いたときに、 $15\mu\text{m}$ となる。このように $\mu\text{m}$ からmmオーダーまでの幅広いポテンシャル場を選択できることが、超音波を微粒子の単なる捕獲技術として用いるだけでなく、幅広いポテンシャル場の裾野によって濃縮を効率的に行うことを可能にしている。たとえば、従来は遠心分離で行っていたDNA分子の捕獲・濃縮も超音波放射圧によってmmオーダーの微小な容器内で同様に行うことが可能となる。

生体物質、とりわけDNA等の核酸にとって超音波は、その破碎の手段として広く使われてきた。また超音波放射圧の捕獲力は微粒子が小さくなると微粒子の粒径の3乗に比例して減少してゆき、最終的にはあるサイズまで小さくなったところでブラウン運動に打ち勝つことができなくなり、捕獲出来なくなってしまう。従って顕微鏡でも見ることができないほど小さなDNA分子を捕獲するためにはかなり強力な超音波を照射する必要があると考えられる。しかし、実際には、DNAなどの微粒子は疎水適合条件において超音波によって互いに衝突・凝集しながら



(a) 計測方法



(b) 最大移動速度と換算粒径との関係

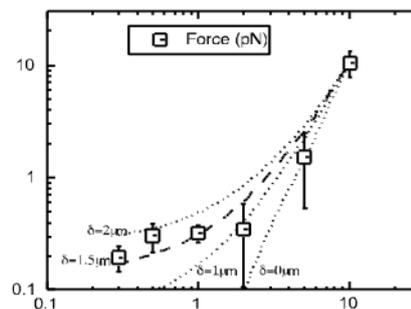
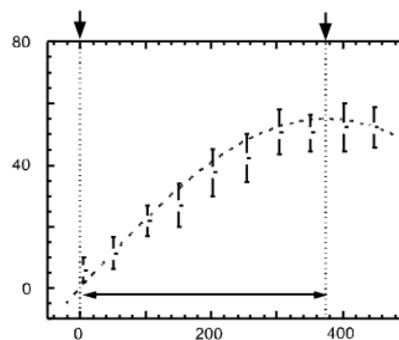
図1 超音波放射圧を受ける微粒子の周囲を囲む流体の殻。定在波中での微粒子の移動速度から微粒子が実際にどの程度の粒径に換算されるかを見積もることができる。その結果、水の殻の影響は粒径が小さくなるほど顕著になり、この例では水の殻の厚さ  $\delta$  は  $1.5\mu\text{m}$  程度であると見積もられる。

徐々に巨大な塊となっていき、最終的には巨大なDNA塊として効率的に濃縮、回収することが可能である。図2がその例である。この実験では、エタノール溶媒中で分子量  $2.7\text{kbp}$  のDNA分子の凝集条件において、周波数  $500\text{kHz}$  の超音波を導入すると、溶液中に分散していたDNAの微小クラスターが定在波の節の位置に進行しながら互いに衝突し、その粒径が徐々に大きくなってゆき、最終的に定在波の節の位置に濃縮されるのが観察される。また超音波照射後DNAは損傷を受けていれば分子量の短い成分が多数発生するはずであるが、電気泳動の結果からキャビテーションが発生しない限りDNAなどの核酸は損傷を受けていないことが確認されている(図2)。

この超音波濃縮技術を用いて血液中の赤血球などの生体粒子も損傷をほとんど与えることなく定在波の節の位置に濃縮することもできる。5) このときもキャビテーションが発生しない条件下では赤血球内の成分はほとんど溶出しなかったことが確認されている。また、定在波に高調波成分を重ね合わせる事で、細胞に損傷を与えることなく濃縮効率を改善することもできる。

### 2.3 超音波放射圧と静電気力の拮抗を用いた微粒子分離

微粒子に超音波放射圧を与えるとこれらを濃縮することができることを示した。この超音波放射圧にもう一つ異なる種類の力を拮抗するように加えると、微粒子を粒径、組成の違いに応じて分離することができるようになる。



微粒子が受ける超音波放射圧は、微粒子の密度と圧縮率、そして粒径の3乗に依存して決定するが、これに電場を加えた場合、微粒子はその表面のゼータ電位と粒径の2乗に依存した力を拮抗して受けることとなる。従って微粒子はその密度、圧縮率、表面の状態(ゼータ電位)、粒径の違いによって異なる釣り合いの位置を持つこととなり、異なる場所に並ぶことで簡単に分離されることになる(図3の数式(2)参照)。

図3は実際に周波数  $500\text{kHz}$  の定在波と静電場とを組み合わせ粒径  $10\mu\text{m}$  と粒径  $20\mu\text{m}$  のポリスチレン球を分画した例である。まず超音波のみを照射すると粒径  $10\mu\text{m}$  と粒径  $20\mu\text{m}$  のポリスチレン球はともに定在波の節の位置に一直線に並ぶ。つぎに超音波を照射しながら静電場を印加すると微粒子は粒径の違いに応じて定在波の節の位置から移動し、それぞれの釣り合いの位置に静止する。計算より求めた粒径  $10\mu\text{m}$  のポリスチレン球に対する粒径  $20\mu\text{m}$  のポリスチレン球移動量の比は  $0.5$  であり、実験結果 ( $0.6$ ) とほぼ同じ結果となっている。

### 2.4 マイクロ加工技術と超音波放射圧とを組み合わせた試料濃縮技術

超音波放射圧による濃縮技術が、もっとも効果的に利用できるのは、マイクロ流体デバイス(チップ)での連続濃縮処理プロセスでの応用である。何故なら濃縮・分離技術は、微粒子に諸々な操作をする上で必須の操作であるにもかかわらず、従来の濃縮技術手法の主力は遠心分離技術やフィルター技術であり、マイクロ流路での連続処理に組み込むことが困難だったからである。

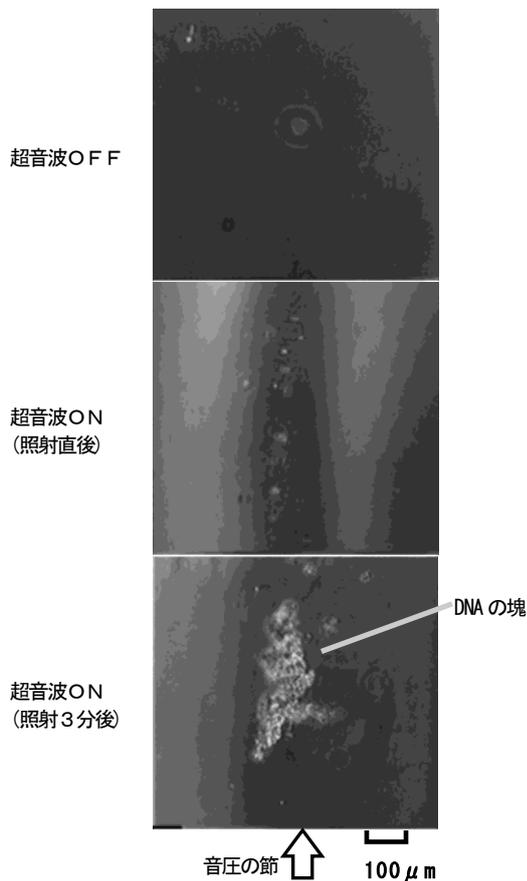
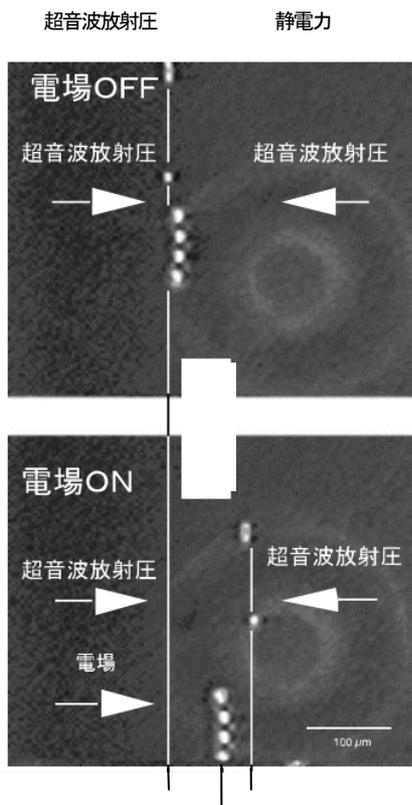


図2 超音波放射圧によるDNA濃縮過程の顕微鏡写真。上図は超音波照射前、中図は超音波照射直後、下図は超音波照射開始3分後のDNAクラスターの分布を示している。超音波照射により定在波の音圧の節に集まったクラスターが会合して大きくなってゆくの分かる。

$$0 = \frac{4\pi}{3} R^3 k E_{ac} A \sin(2kx) - 4\pi \epsilon \kappa R^2 \Phi_0 E_e \quad \dots (2)$$



まだ構想段階であるが、本研究の一環として、微細加工技術によって作成したマイクロサイズの分岐流路の分岐点に超音波を作用させ、微細粒子試料を選択的に分岐路の1つの流路に濃縮かつ搬送させる機能を持つ流体チップの試作も検討している。

### 3. 考察及び今後の展望

超音波の生体利用の実用化の分野として、微細加工技術と超音波放射圧を組み合わせた濃縮、分離、精製技術の利用が期待されており、キャビテーションが発生しない状況では生体試料のような損傷に敏感な試料であっても安全に操作できることが示唆されている。今後は、いかに効率的にキャビテーションを防ぎながら捕獲・操作できる技術が開発できるか、マイクロ流体デバイスの特徴を駆使した血中白血球の捕獲、精製への応用を検討中である。また、より高精度及び高分解能のでのマニピュレーションを目指すため、超音波放射圧を液晶に照射し、液晶形状変化の可視化による測定方法の確立を目指したい考えである。

#### 【参考文献】

1. M. Ohtsu, *Optoelectronics*, 10, 147(1995).
2. P. Debye, H. R. Anderson, H. Brumberger, *J. Appl. Phys.*, 28, 679 (1957).
3. A. Gossler, A. L. Joyner, J. Rossant and W. C. Skarnes, *Science*, 244, 463 (1989).

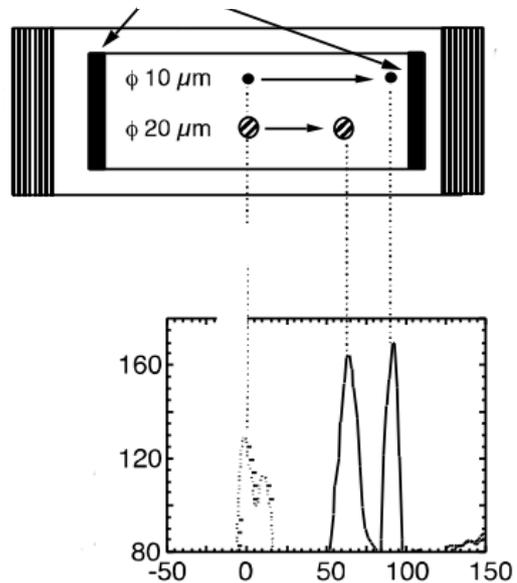


図3 超音波放射圧と静電気力とを用いた微粒子分画。超音波のみを照射したとき粒径  $10\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$  の微粒子は、ともに定在波の音圧の節に一直線に並ぶ (上写真 a)、右グラフ d) の点線)。さらに電場を加えると微粒子はその粒径に応じて音圧の節から移動する (下写真 b)、右グラフ d) の実線)。(図中上の(2)式で R: 微粒子の半径、 $k$ : 超音波の波数、 $E_{ac}$ : 超音波のエネルギー密度、 $A$ : 定数、 $x$ : 微粒子の位置、 $\epsilon$ : 溶媒の誘電率、 $1/\kappa$ : 微粒子のまわりの電気二重層の厚さ、 $\Phi_0$ : 微粒子の表面の電位、 $E_e$ : 印加する電界強度)

# 液体循環型高速遺伝子増幅・解析装置の開発

寺菌 英之、松浦 賢志、服部 明弘、竹井 弘之、金 賢徹、安田 賢二

## 1. はじめに

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction: PCR) は細胞が持つ遺伝子情報(DNA, mRNA)を簡易的に調べる手段として有用な計測方法である。その応用範囲は分子生物学といった生命科学の分野に留まるだけでなく、インフルエンザやがん細胞の同定、食品の微生物検査にも及ぶ。

現在、我々は、細胞内で起こる生命現象や疾患メカニズムの解明を推進するため、生命を構成する基本単位である細胞内の生体分子の発現量・空間分布を一細胞レベルから把握することに取り組んできた。我々は現在までに PCR の原理を利用し一細胞単位でターゲット遺伝子の発現を超高速に高精度に解析する装置を開発してきた。具体的には、高温条件下と低温条件下をできる限り迅速に変化し、温度勾配を急激に行う事で非特異的な遺伝子増幅を防ぎ、一細胞内の極微量な DNA あるいは mRNA を特異的に高感度検出すること、PCR を高速に行う事により多種類の遺伝子発現をより多く解析することができることを目的としている。

我々はこれまでに近赤外線集束光レーザーを利用した光加熱型、循環水を利用した超高速 PCR 方法の開発に成功した [1,2]。さらに簡便に利用しやすいように小型高速 PCR 装置を開発してきた。さらに、循環水を用いた超高速 PCR の安定化に関する検討、超高速 PCR 装置の高速性という優位性を高めるためリアルタイム PCR に利用する蛍光検出装置を独自に開発し一体型の装置を開発した。また、新たに遺伝子増幅の応用範囲を広げるため融解曲線分析モジュールの開発を行った結果について報告する。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 小型超高速リアルタイム PCR 装置の開発

これまで開発を進めてきた原理検討の結果を踏まえて、より熱変換の安定を目指した配管の設計、装置構成の変更を行った。また、さらなる小型化と実用化を目指し、原理検討機では装置の外部にあった温度コントローラーを装置内に組み込むことで実用に耐える装置構成を目指した。さらに、本装置の利点である構成を活かすために蛍光色素によるリアルタイム計測が出来るように、今回独自に蛍光検出器を開発し、装置内部に組み込むことに成功した。

結果として、組み上げた装置で原理検討機と同様のスピードで超高速 PCR を行う事に成功した。また、新たな蛍光検出器で検出にも成功した。

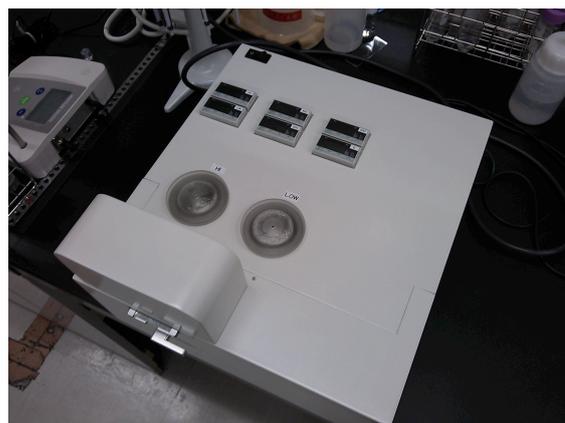


図 1. 一体型超高速リアルタイム PCR 装置実機。新規に開発した蛍光検出器を内蔵している。

### 2. 2 循環水スピードの違いにおける反応槽での熱安定性の検討

通常の PCR 装置で使用されているペルチエ素子や温風を用いた装置に比べ、循環水を用いたタイプは流速に依存して反応槽の熱安定性に影響を及ぼす可能性がある。そこで、2 温度型における反応槽での熱安定性について流速を変えることで確かめた。方法として赤外線カメラを用いて反応槽を 2 次的に測定し温度変化における温度分布を測定した。高温を 94℃、低温を 60℃に設定し流速を 2, 4, 6, 8, 10mL/秒で検討した。

その結果、流速 10mL/秒の時、測定領域全体が設定温度に急激に変化し、安定的に推移した。一方、流速を落とすに従い、設定温度に到達するまで時間がかかるようになりさらに測定領域の温度分布にムラが発生した。2mL/秒においては設定温度に到達しない領域まで発生した。これらの結果によりおおよそ 10mL/秒において安定して超高速 PCR ができる事が明らかとなった。

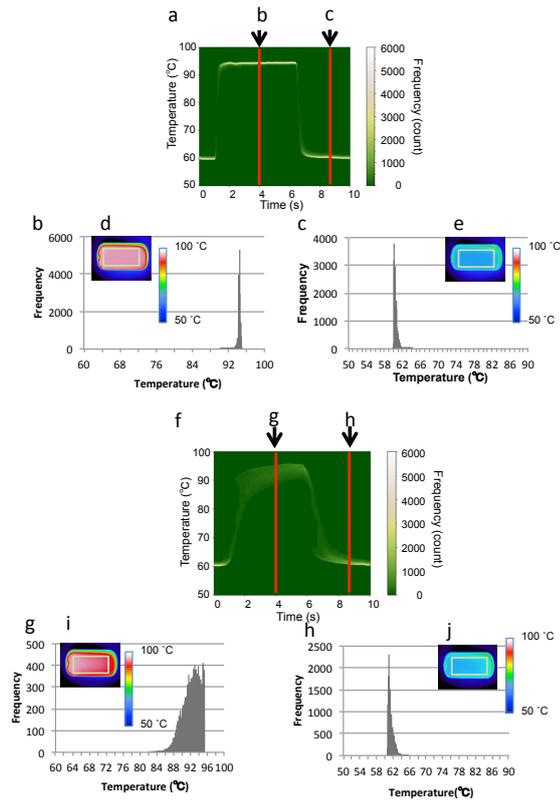


図2. 循環水の流速の違いによる反応槽での温度分布安定性  
a-e までは 10mL/秒での温度分布、f-h までは 2mL/秒における温度分布。b と c は各反応領域内での温度分布をヒストグラムにした物。a は分布のヒストグラムを時系列にまとめたもの。f-h は 2mL/秒における同様の表示。循環水の流速を下げることで温度分布にムラが起きることが明らかになった。

また、この温度変化を 2, 4, 6, 8, 10 mL/秒で検討した結果を図3に示す。

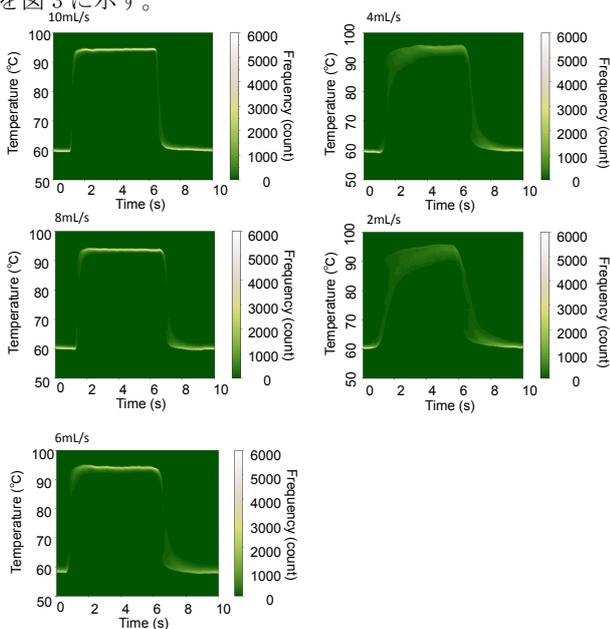


図3 循環水の速度の変化による PCR 反応部の熱分布と均一性。

結果として、流速 8mL/s 以上であれば測定領域全体が設定温度に急激に変化し、安定的に推移した。一方、流速を落とすに従い、設定温度に到達するまで時間がかかるようになりさらに測定領域の温度分布にムラが発生した。6mL/s においては設定温度に到達しない領域まで発生した。

### 2.3 超高速 PCR 装置の原理を利用した融解曲線分析モジュールの開発

これまで開発を進めてきた循環水型の超高速 PCR 装置はサンプル間の温度均一性にすぐれていることがわかった。この原理を利用すれば、現在市販されているリアルタイム PCR 装置の機能の一部として搭載されている融解曲線分析も可能になることを示唆している。融解曲線分析とは PCR で増幅した遺伝子産物に対し、温度を低温から徐々に上げていくことで遺伝子の二重鎖が乖離する温度を計測することで、増幅した遺伝子産物の一塩基多型等を測定する事ができる分析手法である。

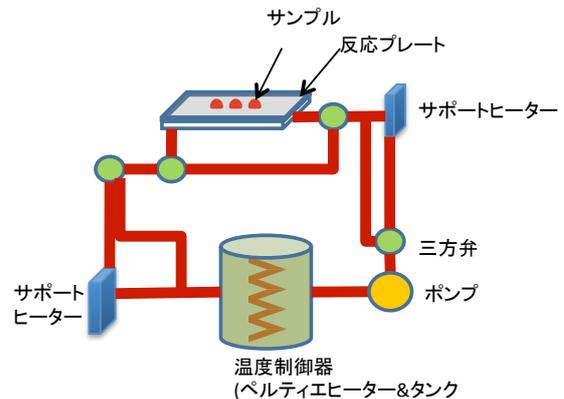


図4 循環水を用いた融解曲線分析モジュール  
そこで、循環水の原理を利用して、融解曲線分析が可能な装置の作製を行った。図4は開発した装置の模式図を示している。

次に、作製した装置の熱分布の安定について検討した。

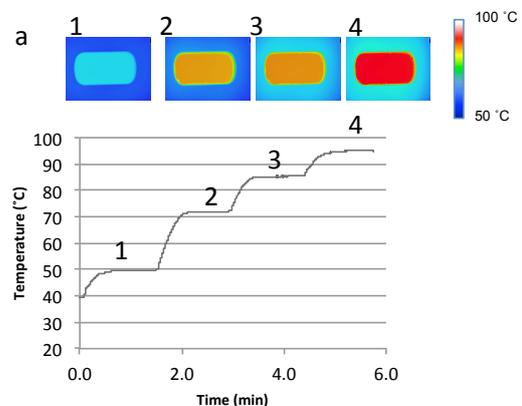


図5 融解曲線分析モジュールでの熱応答性

その結果、各設定温度(50,72,85,95°C)に対して均一な熱分布を示すことがわかった。

次に、開発した融解曲線分析モジュールでの分析の均一性を検証した。

各 9 ポイントの場所において同じサンプルを用いて融解曲線分析を行ったところ、各ポイントともほぼ同じ温度 {82.9 °C (standard deviation: 0.4 °C)} においてピークを有することがわかり、融解曲線分析モジュールとしての機能を高精度に持っていることが明らかとなった。

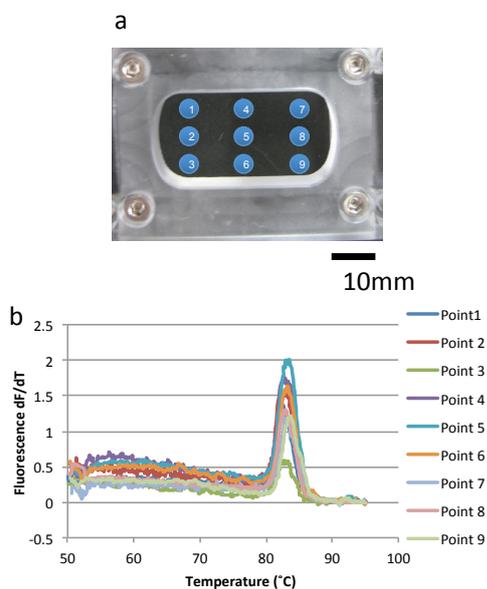


図 6 融解曲線分析モジュールの反応安定性の検討

### 3. 考察及び今後の展望

今回の改良により、安定した超高速 PCR 装置の実用化の可能性、測定できる遺伝子の種類を拡大できる可能性を明らかにした。今後の取り組みとして、1 細胞内の生体分子の発現量を迅速に検出できる感度を向上させるキャリブレーション技術の実用化に向けた具体的な装置開発を目指す。近年、PCR の高速検出はトピックになりつつあり、装置だけではなく、高速 PCR に対応した試薬も開発されつつある。これら試薬との相乗効果によりより応用範囲の広い装置の開発を目指す。

#### 【参考文献】

1. H. Terazono, A. Hattori, H. Takei, K. Takeda and K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.* 47 no. 6 5212 (2008)
2. H. Terazono, H. Takei, A. Hattori, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.* 49 no. 6 06GM05 (2010)

# 薄膜状金属ナノ粒子の FE-SEM 反射電子像コントラストに 対する膜厚と曲率の寄与

金 賢徹、竹井 弘之、寺菌 英之、安田 賢二

## 1. はじめに

生命を構成する基本単位である細胞は多数のタンパク質や核酸分子などで構成されており、それらが自己組織化や選択的分子認識を繰り返す結果が細胞の応答として反映される。例えばがん細胞では、正常細胞と比較した場合に特徴的ながんマーカー分子の発現数が顕著に増加もしくは減少しており、このことから細胞を構成する各分子の発現数や分布、それらの働きが細胞の性質を特徴付けることは明らかである。したがって、分子認識や分子間の選択的結合と細胞応答の関係という生命の基本過程を理解するためには、細胞を構成する多数の生体分子の結合・解離状態、さらにそれら分子の数と空間局在分布を個々の細胞単位で定量計測することが必須となる。

我々は、生体分子の空間局在分布を 1 細胞単位で網羅的に計測するために、様々な粒径・元素の微粒子状標識プローブを作製して標的分子を網羅的に標識し、電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) でその存在位置と微粒子状標識の材質を高空間分解能で計測する方法の開発を進めてきた。その結果、ポリスチレン球表面に金属を真空蒸着により堆積させることで様々な粒径・元素のナノ粒子を作製できること[1]、作製したナノ粒子に対してさらに有機物分解処理を行うことにより、カップのような形状をした薄膜状中空金属ナノ粒子を作製できること[2]、これら薄膜状金属ナノ粒子に対して FE-SEM 反射電子計測を行うことにより、像中の輝度コントラストの差として金属の種類を識別可能 (一般に原子番号が大きい元素ほど電子を多く反射するため明るくなる) であること[3]を明らかにしてきた。これまでの研究では FE-SEM 反射電子計測により薄膜金属の種類を識別特定できることが分かったが、同じ種類の金属で薄膜ナノ粒子の膜厚が異なる場合、FE-SEM 反射電子輝度コントラストにどのような影響が表れるか定量的な評価が為されていないため、本研究では金属薄膜の膜厚と FE-SEM 反射電子像コントラストの関係の定量評価を行った。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 薄膜状金属ナノ粒子の作製

金属ナノ粒子は、基板上に単層配置したポリスチレン球

表面に真空蒸着により金属を堆積させた後、有機物分解処理を行いポリスチレン球を分解除去することで作製した[2]。ポリスチレン球はサイズ校正用として用いられる粒径 200nm と 300nm の市販品を利用しており、変動係数 (CV 値) は 3% 以下である。それらの表面に Au を 5, 10, 15 または 20nm 堆積させたものをそれぞれ作製した上で UV-オゾン処理を行いポリスチレン球を分解除去した。それにより、粒径が 200nm または 300nm、膜厚が 5, 10, 15 または 20nm の、合計 8 種類の半球カップ状 Au 薄膜ナノ粒子を作製した。作製した薄膜状 Au ナノ粒子は一旦水中に分散させた上で平坦な Si 基板上に滴下し再度乾燥させた上で FE-SEM 計測を行った。また比較のために、平坦な Si 基板上に Au 薄膜を同様の膜厚で堆積させた物 (以下、Au 平坦膜) を作製し、半球カップ状薄膜ナノ粒子と反射電子輝度を比較することにより、ナノ立体構造の反射電子輝度への寄与を評価した。

### 2. 2 FE-SEM 反射電子像の輝度定量化方法

作製した薄膜状金属ナノ粒子はそれぞれ加速電圧 5kV の条件で FE-SEM 反射電子計測を行った。画像は 8 ビットグレースケールとして得られ、画像解析ソフトを利用して背景の Si 基板や Au 薄膜ナノ粒子の輝度値をそれぞれ定量化した。各反射電子像中の Au ナノ粒子輝度コントラストを比較する際、装置の設定条件や試料表面の帯電状態など各測定条件間での差を排除するために、次の様な規格化を行った上で、同じ粒径で異なる膜厚の Au ナノ粒子 (と Au 平坦膜) 間での輝度値の定量的比較を行った[3]。

まず、反射電子像中で最も明るい 20nm 膜厚の Au 薄膜の輝度実測値を  $I_{max}$ 、最も暗い背景の Si 基板部分の輝度値を  $I_{min}$  とし、任意の膜厚 (この実験では 5, 10 または 15nm) の Au 薄膜輝度実測値を  $I_z$  とした上で、次の式から任意の膜厚の Au 薄膜の相対輝度値  $\tilde{I}_z$  を計算した。

$$\tilde{I}_z \equiv (I_z - I_{min}) / (I_{max} - I_{min})$$

得られた  $\tilde{I}_z$  は規格化補正されたものであり、異なる膜厚間の  $\tilde{I}_z$  を膜厚の関数としてプロットし、膜厚増加に対する FE-SEM 反射電子コントラストの変化を求めた。

### 2. 3 薄膜状金属ナノ粒子の膜厚と FE-SEM 反射

## 電子像輝度の関係

以上のような試料作製と解析方法の検討を行った上で、膜厚が 5, 10, 15, 20nm の Au 平坦膜、粒径 200nm の Au ナノ粒子、粒径 300nm の Au ナノ粒子それぞれの FE-SEM 反射電子計測を行った。図 1 は得られた各試料の反射電子像であるが、Au 膜厚が 5nm から 20nm へ増加するにつれて反射電子像中の輝度が明るくなる様子が観察された[4]。これらを定量比較するために各粒径、各膜厚のナノ粒子および平坦膜の  $\bar{I}_Z$  を計算し、Au 膜厚の関数としてプロットした。図 2 はその結果をグラフとしてまとめたものであり、同時に線形近似直線を示した[4]。図 2 が示すように、Au 膜厚が増加するにつれて相対的反射電子輝度  $\bar{I}_Z$  もほぼ線形に増加 ( $R^2 > 0.93$ ) し、その輝度の増加の傾きは Au 平坦膜が 3.61%/nm、200nm Au ナノ粒子が 2.24%/nm、300nm Au ナノ粒子が 2.58%/nm であった。

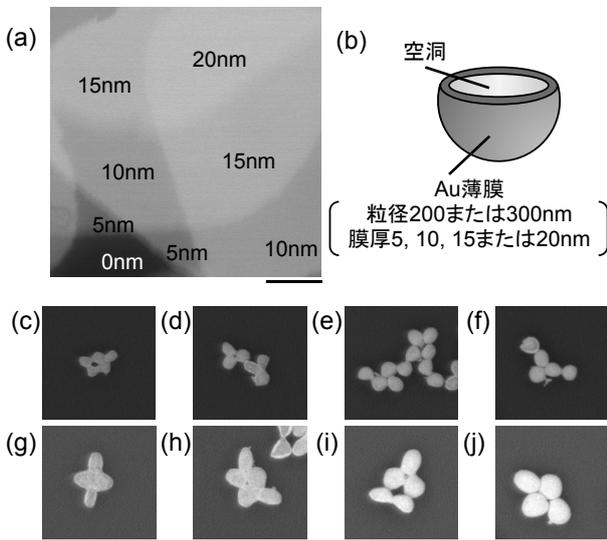


図 1 作製した薄膜状 Au ナノ粒子および平坦膜の FE-SEM 反射電子計測像[4]。(a) Si 基板 (0nm) 上に作製した 5, 10, 15, 20nm の Au 平坦膜。Bar, 50  $\mu$ m。(b) 作製した中空状薄膜 Au ナノ粒子の模式図。(c-j) 粒径 200nm の膜厚 5nm (c), 10nm (d), 15nm (e), 20nm (f)、および 300nm の膜厚 5nm (g), 10nm (h), 15nm (i), 20nm (j) の薄膜 Au ナノ粒子。Bar, 500nm。

はじめに、200nm 粒子と 300nm 粒子の輝度増加分の平均値 (2.41%/nm) に対して、平坦膜の輝度増加分 (3.61%/nm) は 1.5 倍大きかったが、この差は Au ナノ粒子の内部空洞の影響によると考えることができる。図 1 に示したとおり、作製した Au ナノ粒子は半球状で内部に空洞を有するカップ状構造をしているが、FE-SEM 反射電子計測では計測した領域に入射電子が侵入してそこから反射された電子量の平均値が輝度として反映されるため、中空状の構造体を計測した場合は空洞部分の存在が反射電子輝度コントラストに寄与し、その結果平坦膜との差として表れたと考えられる。次に、200nm 粒子と 300nm 粒子間の輝度増加分の差は 15%であったが、これらは共に空洞を有する同等の構造体から得られた結果であることから、輝度増加分の差はナノ粒子曲率の差を反映したものであると考えることができる。即ち、粒径が 1.5 倍異なること

により、反射電子輝度には 15%の誤差が生じることが分かった。以上をまとめると、FE-SEM 反射電子像コントラストにおいて、薄膜状ナノ構造体の膜厚が増加すると輝度が概ね線形に増加すること、ナノ構造体のサイズが 1.5 倍になると輝度が約 15%変化することが分かった。

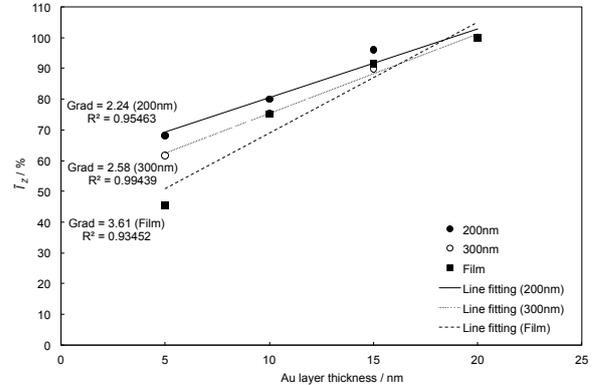


図 2 薄膜状 Au ナノ粒子および平坦膜の FE-SEM 反射電子相対輝度  $\bar{I}_Z$  と Au 膜厚の関係[4]。

## 3. 考察及び今後の展望

FE-SEM 反射電子計測において、様々な粒径、元素で作製した薄膜状金属ナノ粒子を生体分子に対する標識として同時利用することを想定した場合、同一条件 (同粒径、同元素) のナノ粒子は全て同じ輝度コントラストである必要があり、同一粒子の輝度ばらつきを抑えることが標識のバラエティ増加につながる。本研究の結果から、Au を例とした場合、1nm の膜厚差が約 2.4%の反射電子輝度誤差となり、また 1.5 倍の粒径差が約 15%の反射電子輝度誤差となることが明らかになったことから、標識ナノ粒子を作製する際に、如何に粒径や金属膜厚を均一にするかが鍵となることが明確になった。我々のナノ粒子作製法では、真空蒸着を利用してサブナノメートルレベルで膜厚を制御しつつ金属薄膜を作製しており、またサイズ校正用として利用されているポリスチレン球を鋳型として利用しているため粒径誤差は 3%以下と均一であることから、まさに FE-SEM 反射電子計測における標識用ナノ粒子を作製するのに適したプロセスであることが確認された。今後はこの利点を生かして、同時識別使用が可能なナノ粒子標識のバラエティを一層増やしていく予定である。

### 【参考文献】

1. H. Kim, K. Yasuda, H. Takei, *Sens. Actuators B*, 142, 1 (2009).
2. H. Kim, H. Takei, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 49, 048004 (2010).
3. H. Kim, T. Negishi, M. Kudo, H. Takei, K. Yasuda, *J. Electr. Microsc.*, 59, 379 (2010).
4. H. Kim, H. Takei, T. Negishi, M. Kudo, H. Terazono, K. Yasuda, *e-J. Surf. Sci. Nano Technol.*, 10, 301 (2012).

# 細胞回収用途を想定したカップ形状磁性構造体の物性評価

金 賢徹、寺菌 英之、竹井 弘之、安田 賢二

## 1. はじめに

ヘテロな細胞集団の中から目的の細胞のみを選択的に回収精製する前処理技術は、生命科学研究において最も基本的工程のひとつである。目的細胞を回収するための代表的な方法のひとつはフィルタ膜を使用した濾過法であり、特定直径の穴が開いたフィルタ膜に細胞懸濁液を通過させることで、穴の直径より大きな細胞を濾しとる方法である。簡便な方法であるため広く利用されているが、フィルタ膜を通過させる際に細胞懸濁液に対して加圧をする必要があり、そのためフィルタ膜上で多数の細胞が破砕してしまうという問題点がある。一方、別の方法としては磁気微粒子を用いた細胞回収法があり、直径数ミクロン程度の磁気微粒子表面を抗体など目的細胞と結合するプローブ分子でコートした後に細胞懸濁液と混合することで、磁気微粒子が目的細胞表面に結合する。その後、細胞懸濁液に磁場を印加すると磁気微粒子が付着した目的細胞が回収精製されるという仕組みである。回収特異性が高く手順も簡便であることから広く利用されているが、選択的に結合するプローブ分子が特定されていない細胞に対しては適用不可能である。

本研究では上記フィルタ濾過法と磁気微粒子精製法の長所を兼ね揃えた、新しい細胞精製法に関する開発を目指し、お椀のようなカップ形状の磁気微粒子（以下、“magcup”（マグカップ））を作製する方法、magcup 材質と磁場応答性の関係、magcup 内部へのプローブ分子を固定化の際の固定化密度と magcup 直径の関係について研究を行ったので、祖の結果を報告する。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 magcup の作製方法

magcup の作製では、これまでの研究[1]に倣い、ポリスチレン球を鋳型として真空蒸着法を応用した方法で作製した。はじめに作製を望む直径のポリスチレン球をシリコン基板上に単層配置した。粒径としては、magcup を細胞回収用途として用いる場合は約 10 $\mu\text{m}$  から 100 $\mu\text{m}$ 、細胞内小器官など微小な物質捕獲を目指す場合は約 100nm から 1 $\mu\text{m}$  径の物を用いた。次に、基板上に配置したポリスチレン球を真空蒸着装置内に入れ、半球部分のみ磁性体金属を望む膜厚だけ堆積させた。磁性体金属としてはニッケル (Ni) を用い、膜厚は 2nm から 20nm の範囲で、1nm 単位で厳密制御した上で磁性体膜をポリスチレン球上に作製

した。磁性体膜を 1 粒子あたり複数層形成する場合は、Ni を真空蒸着した後に絶縁体を真空蒸着し、さらに Ni を再度蒸着することで二つの Ni 層を分離した積層構造を作製した。本研究では絶縁体として二酸化ケイ素 ( $\text{SiO}_2$ ) を用い、二つの Ni 層を分離させる場合にはその間に 15nm の  $\text{SiO}_2$  層を形成した。この工程を数回繰り返すことにより、Ni 層と  $\text{SiO}_2$  層が交互に堆積した積層構造をポリスチレン球上に作製した。また、magcup 内部にプローブ分子を固定化する場合は、最初にチオール基を標的としてプローブ分子を容易に固定化できる金 (Au) を 5nm の膜厚で予め真空蒸着しておき、その後 Ni と  $\text{SiO}_2$  を順次蒸着した。最後に Ni と  $\text{SiO}_2$  (および必要に応じて Au) 層を形成したポリスチレン球を高温電気炉内に配置し、温度 500 $^{\circ}\text{C}$  下で 17 時間処理し、ポリスチレン球を熱融解除去することにより、Ni 層と  $\text{SiO}_2$  層で構成された半球状の magcup を得た (図 1)。

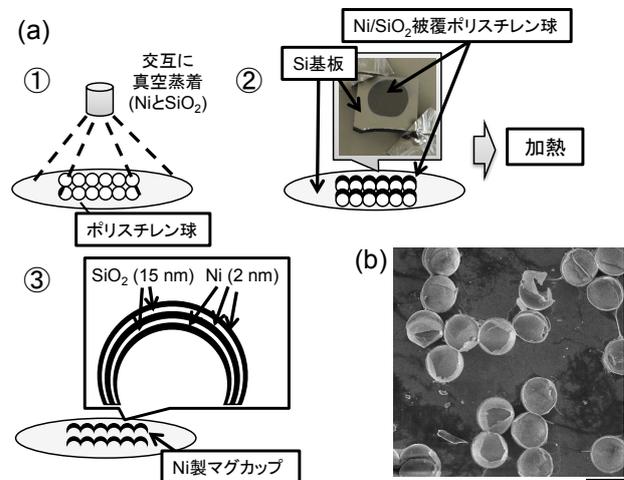


図 1 magcup の作製方法。(a)ポリスチレン球を鋳型として Ni と  $\text{SiO}_2$  を交互に真空蒸着して積層構造の magcup を作製する手順の概要。(b) 作製した magcup の走査型電子顕微鏡写真。Bar, 10 $\mu\text{m}$ 。

本作製方法の特長はポリスチレン球を鋳型として用いている点であり、市販ポリスチレン球は様々な粒径のものが容易に入手可能であるのみならず、粒径精度が変動係数 5%以下と均一であるため、それを鋳型とした magcup も同様に直径が均一であり、その結果、厳密なサイズ依存的細胞回収が可能となった。また真空蒸着法を用いることにより、Au や Ni、 $\text{SiO}_2$  といった異なる元素で構成された積層薄膜を容易に作製でき、さらに膜厚を精度 1nm 以下で厳密に制御できるため、それにより作製された magcup の物性（強磁性や超常磁性）を制御できる点も特長である。

## 2. 2 magcup 薄膜層状構造と磁場応答性の関係

作製した magcup は Ni と SiO<sub>2</sub> が交互に積層した複数層構造となっているが、電磁気学におけるガウスの法則によると Ni 層数が増えるにつれて 1 カップ当たりの磁性体含有量が増加し磁場応答性が線形的に向上することが期待されるため、手始めに各カップの Ni 層数と磁場応答性の関係について評価を行った[2]。Ni と SiO<sub>2</sub> の膜厚はそれぞれ 2nm と 15nm に固定し、Ni 層数が 1、2、3、4、5 の magcup をそれぞれ作製した上で、水系溶媒に分散させた状態でガラス基板上に分散液を滴下した。ガラス基板底面からネオジウム磁石 (620mT) を近づけると、作製した magcup が磁場に応答し磁石方向へ吸い寄せられるが、溶媒の粘性抵抗と釣り合うことによりほぼ一定の速度となり磁石方向へ移動する。この時、磁場による magcup の引力  $F$  は釣り合った粘性抵抗力とほぼ等しいと見なせるため、以下の式より求まる。

$$F = 6\pi\eta r v \quad (1)$$

ここ  $\eta$  は溶媒の粘性係数、 $r$  は粒子半径、 $v$  は粒子速度である。すなわち、粒子移動速度を CCD カメラ動画から見積もることにより  $F$  が求まり、その結果、粒子の磁荷  $q_m$  は以下のクーロンの法則から見積もることができる。

$$q_m = 4\pi\mu R^2 F / Q_m \quad (2)$$

ただし  $\mu$  は透磁率、 $R$  は粒子と磁石間の距離、 $Q_m$  は磁石の磁荷である。図 2 は上記計算式を用いて見積もった 1 粒子あたりの磁荷と Ni 層数の関係である。Ni 層数が増えるにつれ磁荷が線形的に増加 (傾き 2.1、 $R^2=0.93$ ) したことから、積層構造とし Ni 層数を増やすことにより、理論通り磁場応答性の高い magcup を作製できることが明らかになった。

次に、1 層あたりの Ni 膜厚と作製される magcup 物性の関係について調べた[2]。Ni は磁性体であり一般的には強磁性的性質を示すが、Ni 構造体体積をナノサイズまで小さくすると構造体内に磁区が一つしかできず、その結果磁場を印加した時のみ強磁性的性質を示し、ヒステリシスを

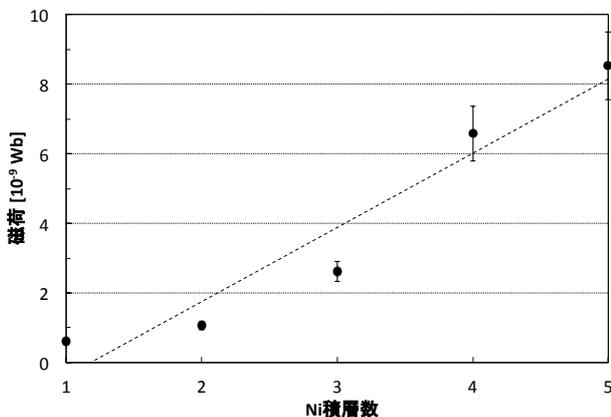


図 2 1 粒子あたりの磁荷と Ni 積層数の関係[2]。

全く持たない超常磁性となる。細胞回収用途に用いる場合は、反応後に粒子が再分散する超常磁性であると都合が良いため、本研究では超常磁性と強磁性の境界となる Ni 膜厚を明らかにすることを目的とした。先の積層評価実験と同様に magcup を水系溶媒に懸濁した後、ネオジウム磁石を用いて磁場を 30 秒間印加し、その後磁場印加を止めて分散液を十分に攪拌した。その分散液をガラス基板に滴下し、顕微鏡観察により粒子のクラスター化状態を評価した。粒子がばらばらの単一状態で分散しているときは超常磁性、寄り集まってクラスター化しているときは強磁性であることを示唆している。図 3 は単一状態で分散している粒子の割合と Ni 層膜厚の関係である。膜厚が 3nm 以下であればほぼ全ての粒子が単分散状態で存在するが、4nm 以上となると単分散粒子に加えて凝集クラスターが出現しはじめることが明らかになった。以上の結果、magcup の物性を超常磁性とするためには Ni 層膜厚が 3nm 以下である必要があると明らかになり、本研究では以降の評価で Ni 膜厚を 2nm に設定した上で実験を進めた。

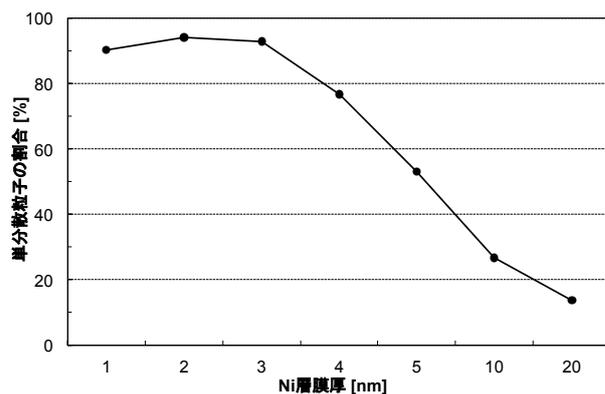


図 3 単分散粒子の割合と Ni 膜厚の関係[2]。

## 2. 3 magcup 凹面曲率と分子固定化密度の関係

作製した magcup は内部空洞の形状を利用してサイズ選択的に目的細胞を回収できるが、それに加えてカップ内部にプローブ分子を固定化すると従来の磁気微粒子精製法と同様に標的分子を認識して細胞を選択的に捕捉できるので、さらに回収細胞の選択性が増す。このサイズと分子認識の 2 段階細胞選択回収を実現するための基礎検討として、カップ内部にプローブ分子を固定化する際の分子固定化密度に対する magcup 凹面曲率の寄与について評価を行った[3]。本評価を行うにあたっては凹面曲率の寄与がより顕著に表れ易い微小なカップ (直径 1 $\mu$ m 以下) を用いた上で、カップ内面を Au、カップ外面を Ni とし、5'末端にチオール基を有するターゲット DNA をカップ内面に選択的に固定化した。次に、カップ内に固定したターゲット DNA と相補的配列を持つプローブ DNA で表面を被覆した直径 20nm の金ナノ粒子を同カップと反応させた後、カップ内部 (のターゲット DNA) と結合した金ナノ粒子

の数密度を走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) で計数した (図4)。この計数評価を直径 140nm から 800nm までのカップに対して行い、カップ内部での DNA 結合反応のし易さ(すなわちカップ内部でのターゲット DNA 固定化密度) と凹面曲率の関係について考察を行った。

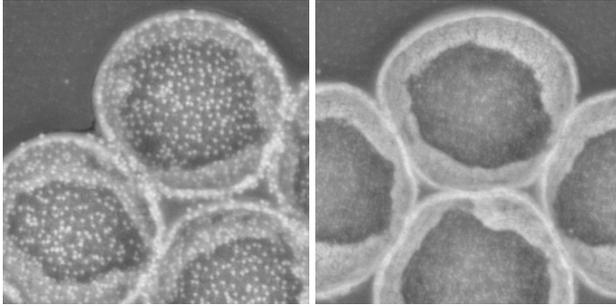


図4 magcup 内部に固定化したターゲット DNA に対し、プローブ DNA を固定化した金ナノ粒子を作用させた後に得た FE-SEM 写真の例 [3]。左はターゲット DNA に対して相補的なプローブ DNA を金ナノ粒子に固定化して反応を行った場合、右は相補的でないプローブ DNA を用いた場合。左の写真ではハイブリダイゼーション反応により結合した金ナノ粒子が白い輝点として観察されている。カップ直径は 800nm、Bar, 200nm。

図5は FE-SEM 計測結果から得られた金ナノ粒子密度と magcup 直径の関係を示したものである。グラフ中には比較として平坦基板上で同様の DNA 結合反応を行った際の金ナノ粒子密度を示した。粒径が 200nm 以下の小さなカップでは、DNA 結合反応密度が平坦基板とほぼ同様であったが、カップ直径が大きくなるにつれて密度が低下し、最終的に平坦基板の約半分となることが明らかになった。

我々はこの結果がカップ側面での DNA 結合反応効率低下に起因するのではないかと予測し、それを検証するためにカップ底面中央部 25% の金ナノ粒子数密度  $D_{25\%}$  を計算した上でカップ全体の数密度  $D_{100\%}$  との比較を全カップ粒径に対して行った [3]。図6は  $D_{100\%}$  と  $D_{25\%}$  の比に対する magcup 直径の関係を示したものである。 $D_{100\%}$  と  $D_{25\%}$  の比が 1 であれば、カップ全体で DNA 結合反応が斑無く起きていることを意味する。また、もし DNA 結合反応がカップ中心からの立体角  $\theta$  に依存して低下するのであれば、 $\theta$  での密度  $D_\theta$  はカップ中央部での密度  $D_0$  に比べ、

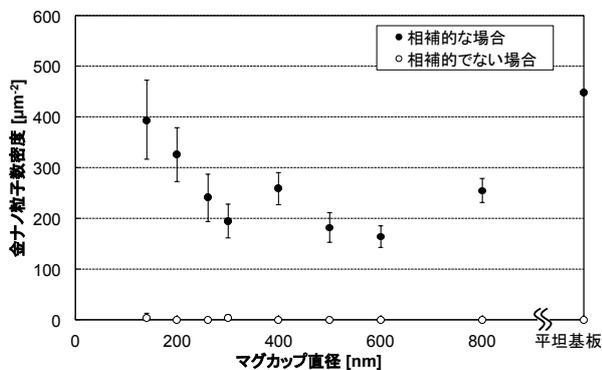


図5 magcup 内部に固定化したターゲット DNA と結合したプローブ金ナノ粒子密度とカップ直径の関係 [3]。

$$D_\theta = D_0 \sin^2\theta / 2(1 - \cos\theta) \quad (3)$$

だけ低下すると予想され、その結果、 $D_{100\%}$  と  $D_{25\%}$  の比はカップ全体では 57% になると予想される。これらを考慮した上で図6を解析すると3つの領域に分けられることが明らかになった。すなわち、領域1：カップ全体にわたり DNA 結合反応が均一である領域(カップ直径 140-200nm)、領域2：カップ側面での DNA 結合反応が徐々に低下する遷移状態 (200-400nm)、領域3：カップ側面での反応効率が式 (3) に従い中央からの立体角に依存して低下する領域 (400-800nm) である。この結果はまず、我々の予測通りカップ側面部分では立体角に応じて DNA 結合反応効率が低下することを示している。さらに、領域1に相当する微細な凹状構造 (DNA 結合反応では直径 20nm の金ナノ粒子を作用させているため、カップ内にアプローチする物質直径の 10 倍以下) では、側面での反応効率低下がほとんど表れず、カップ内全体で均一な反応が起こることを示している。後者については、magcup 内へプローブ分子を均一に固定化できることが明らかになったのみならず、例えば平坦基板上に微細な凹状構造を製作することにより、マクロな視点での投影面積を増やした上でさらにプローブ分子も結合密度が低下すること無く均一に高密度固

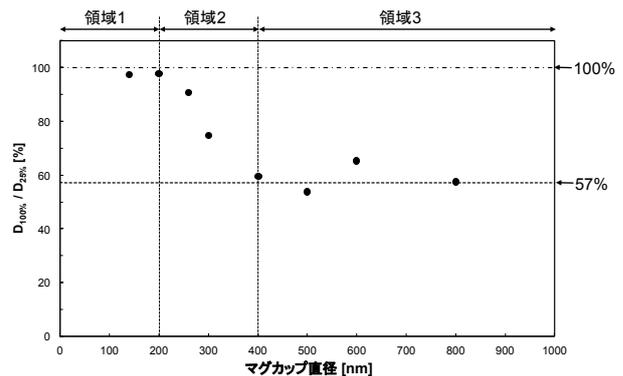


図6 カップ底面中央部 25% の金ナノ粒子数密度  $D_{25\%}$  とカップ全体の数密度  $D_{100\%}$  との比と、カップ直径の関係 [3]。3つの領域、および  $D_{25\%}$  と  $D_{100\%}$  の比が 1 になる場合 (100%) と式 (3) に従い低下した場合 (57%) を点線で示している。

定化できることが明らかになったため、DNA マイクロアレイなど分子を捕捉するチップ基板を設計する上でも有益な情報となる。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、従来のフィルタ濾過法と磁気微粒子精製法の長所を兼ね揃えた、新しい細胞回収法の開発を想定し、カップ形状の磁性構造体 magcup の開発とその物性評価を行った。magcup はポリスチレン球を鋳型とした上で真空蒸着法を応用した技術で作製しているため、低価格で大量の粒子を提供することが可能である。またカップ内部へプローブ分子を固定化し、従来の磁気微粒子精製法と同様な分子認識による回収も可能であることを示した。まさにフ

イルタ濾過法と磁気微粒子精製法の長所を合わせ持った、新たな次世代細胞回収技術につながる微細構造体の作製に成功した。

今後の計画としては、**magcup** 作製技術の改良を行うと共に、産業化を見据えた低コスト化や作製方法の効率化に取り組む予定である。

【参考文献】

1. H. Kim, H. Takei, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 49, 048004 (2010).
2. H. Kim, H. Takei, K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53, 06JJ01, (2014)
3. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda, *Langmuir*, 30, 1272, (2014)

# カップ形状超常磁性微粒子“magcup”を用いた サイズ選択的細胞回収技術の開発

金 賢徹、寺菌 英之、竹井 弘之、安田 賢二

## 1. はじめに

様々な種類の細胞が混在する集団の中から目的の細胞のみを回収する作業は、生命科学研究において最も基本的かつ重要な前処理工程のひとつである。ここでは、フィルタ濾過法のサイズ選択性と磁気微粒子精製法の簡便性の両者を兼ね揃えた、新しい細胞回収技術の開発について紹介する。具体的には、お椀のようなカップ形状の超常磁性微粒子（以下、“magcup”）を作製した上で、magcup 内部の凹面空間に目的細胞をサイズ選択的に捕獲し、磁場を印加することで細胞を回収する技術開発について紹介する。magcup の作製方法と物性については前項で詳しく紹介したため割愛し、magcup によるビーズと細胞のサイズ選択的な回収、および回収細胞の再培養結果について報告する。

## 2. 実験と結果

### 2. 1 magcup によるビーズのサイズ選択的回収

はじめに、サイズ校正用として広く一般的に利用されているポリスチレンビーズ（CV 値 5%以下）を回収対象のモデルとし、magcup による標的回収のサイズ選択性について評価を行った。図 1 は直径  $7\mu\text{m}$  から  $80\mu\text{m}$  の magcup を作製した上で直径  $10\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズと混合し、回収率（magcup 内部にビーズが捕獲された割合）をまとめたものである[1]。ビーズの直径が  $10\mu\text{m}$  であるのに対して、ビーズ直径より小さい、もしくは同じ大きさの直径  $7\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$  の magcup を用いて回収実験を行った際にはビーズが全く回収されず、ビーズ直径より magcup 直径が大きくなるにつれて、徐々に回収率が向上するという結果が得られた。すなわち、magcup の内部空間が回収標的に対してサイズフィルタとして機能することが確認された。図 1(b) に示したとおり、magcup のサイズフィルタ機能は極めて厳密であることが分かる。これは、magcup 作製においてやはりサイズ分布が均一（CV 値 5%以下）なポリスチレン球を鋳型として用いているので、作製された magcup のサイズ分布も同様に均一であるためである。

図 2 は直径  $20\mu\text{m}$  から  $50\mu\text{m}$  の magcup を作製した上で直径  $10\mu\text{m}$  と  $40\mu\text{m}$ （図 2a）、 $20\mu\text{m}$  と  $40\mu\text{m}$ （図 2b）、 $30\mu\text{m}$  と  $40\mu\text{m}$ （図 2c）の、それぞれ 2 種類のポリスチレンビーズ混合物と magcup をさらに混合し、各直径のポリスチレ

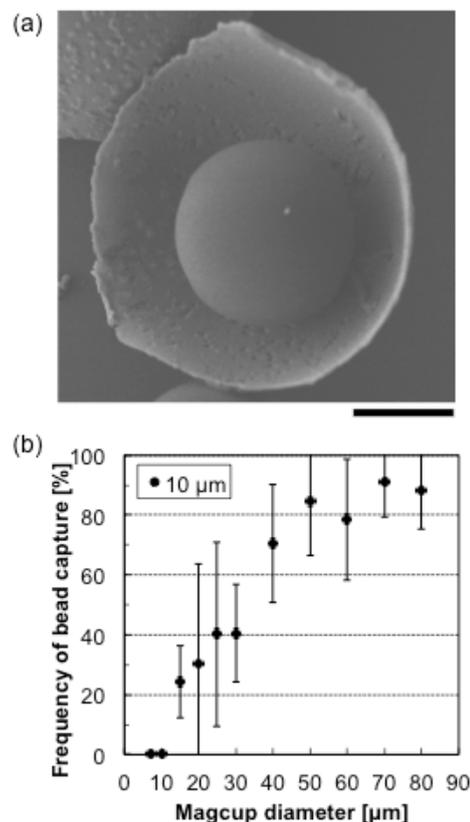


図 1 magcup による直径  $10\mu\text{m}$  ポリスチレンビーズのサイズ選択的回収結果。(a) 直径  $20\mu\text{m}$  の magcup によりビーズを回収した例の走査型電子顕微鏡像。Bar,  $5\mu\text{m}$ 。(b) 直径  $7\mu\text{m}$  から  $80\mu\text{m}$  の magcup を用いてビーズを回収した場合の回収率。

ンビーズそれぞれに対して回収率（magcup 内部にビーズが捕獲された割合）をまとめたものである[1]。はじめに、magcup 直径より大きなビーズは全く回収されないという結果が、図 1 の場合と同様に得られたことから、magcup のサイズフィルタとしての機能が再確認された。次に、両方のビーズが回収される条件の場合（すなわち magcup 直径が  $50\mu\text{m}$  の場合）、magcup 直径により近いビーズ（すなわち  $40\mu\text{m}$  ビーズ）がより高頻度に回収されることが明らかになった。この理由についてはさらなる検討が必要であるが、ひとつの可能性として排除体積効果の寄与が考えられる[2]。

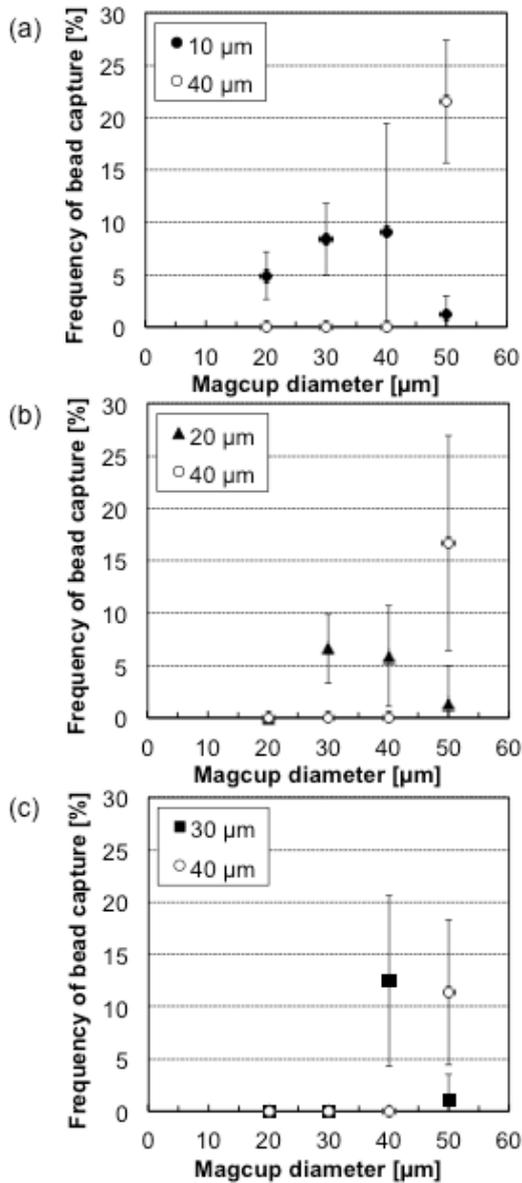


図2 magcupを用いて直径10μmと40μm (a)、20μmと40μm (b)、30μmと40μm (c) の、2種類のポリスチレンビーズ混合物を回収した場合の回収率。

## 2. 2 magcupによる細胞のサイズ選択的回収

ポリスチレンビーズをモデルとして用いた基礎検討結果を踏まえた上で、次にmagcupを用いて細胞をサイズ選択的に回収することが可能であるか評価を行った。培養ヒト血球系細胞 (CCRF-CEM、平均直径  $12 \pm 2 \mu\text{m}$ ) を回収のモデル標的とし、ビーズの場合と同様、まずは直径  $7 \mu\text{m}$  から  $80 \mu\text{m}$  のmagcupを作製した上で細胞と混合し、各直径magcupの回収率を評価した。図3はそれをまとめた結果よりmagcup直径が大きくなるにつれて、徐々に回収率が向上するという結果が得られた。すなわち、細胞を回収標的として用いた場合でも、magcupの内部空間がサイズフィルタとして機能することが確認された。

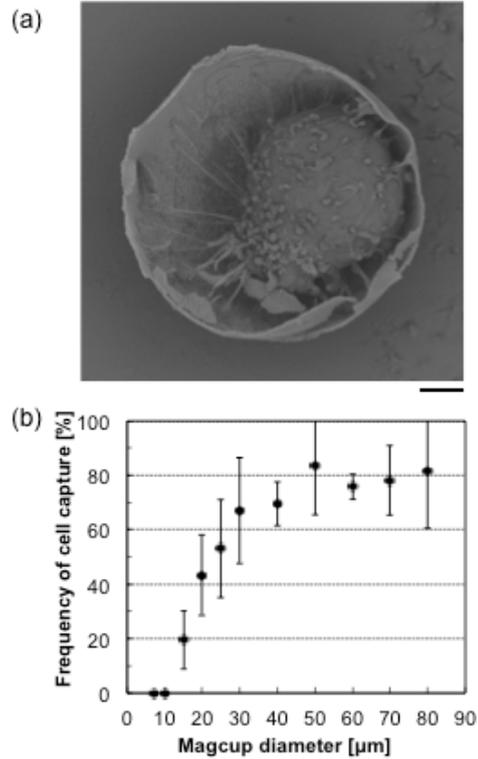


図3 magcupによるCCRF-CEM細胞のサイズ選択的回収結果。(a) 直径  $15 \mu\text{m}$  のmagcupによりビーズを回収した例の走査型電子顕微鏡像。Bar,  $2 \mu\text{m}$ 。(b) 直径  $7 \mu\text{m}$  から  $80 \mu\text{m}$  のmagcupを用いて細胞を回収した場合の回収率。

Magcupによる細胞回収では、magcup表面を抗体で修飾し細胞を強固に結合させることなどは一切せず、凹面の構造を使って細胞を物理的に回収しているため、回収後も細胞に対するダメージが少ないことが期待される。このことを確かめるために、直径  $15 \mu\text{m}$  のmagcupで細胞を回収した後、回収細胞をmagcupに捕獲された状態のまま培養液中に移して経時観察を行いつつ、再培養を行った。図4は、細胞回収直後から10分間隔で経時的に観察を行いつつ、再培養を行った結果である[1]。図4中の細胞はたまたま分裂期に入る直前であったと考えられるが、回収80分後に自発的にmagcupの外に抜け出した後、120分後に分裂する様子が確認された。この結果から、magcupによる細胞回収、および細胞回収後にmagcup共存下で再培養を行うことによる細胞ダメージは無いことが明らかになった。

## 3. 考察及び今後の展望

本研究では、フィルタ濾過法のサイズ選択性と磁気微粒子精製法の簡便性の両者を兼ね揃えた、新しい細胞精製技術の開発を推進し、その結果、magcupの作製と目的細胞のサイズ選択的回収、さらに回収細胞の再培養に成功した。本技術を用いれば、標的細胞に対して一切の化学処理を行わずインタクトな状態のまま回収を行い、さらに再培養を行うことで細胞数を増やし、その後の解析を円滑に行うことが可能となる。今後の計画としては、様々な種類の細胞が混在した集団の中から目的細胞のみを精度良く回収す

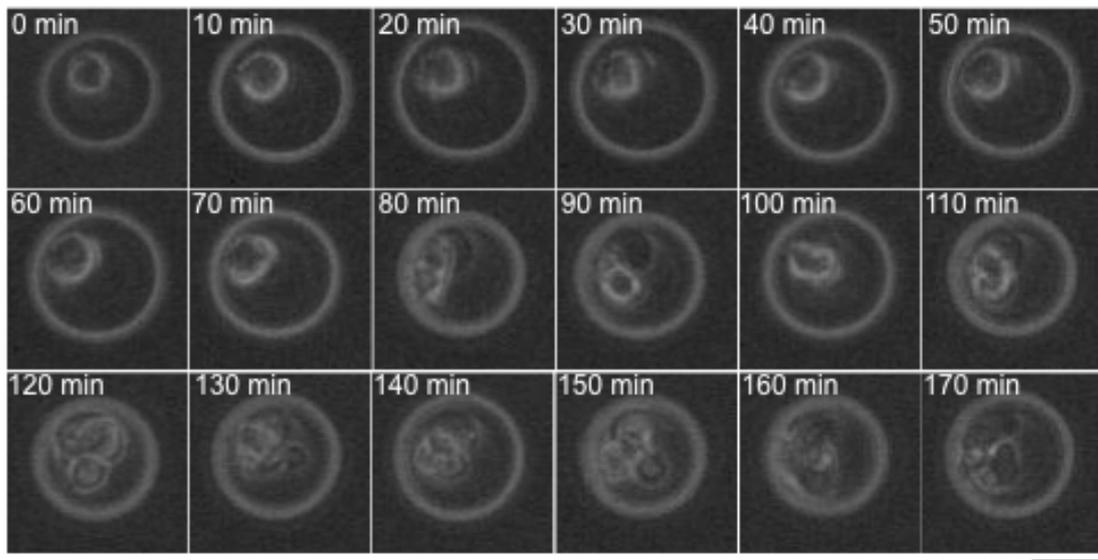


図4 magcupを用いて回収した細胞の再培養結果。30  $\mu\text{m}$  径のチャンバ（白い円形の枠）内にmagcupと細胞の複合体を閉じ込めた上で、10分毎に画像を取得しつつ培養を行った。Bar, 20 $\mu\text{m}$ 。

ることが可能であるか、引き続き評価を進める予定である。

本研究は、村上麻希補助員、長沼真衣補助員の多くの研究補助をいただき推進されました。また、本研究は、科学研究費補助金若手研究（A）のご支援をいただき行われました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

1. H. Kim, H. Terazono, H. Takei, K. Yasuda, *Sci. Rep.*, 4, 6362 (2014).
2. S. Asakura, F. Oosawa, *J. Chem. Phys.*, 22, 1255 (1954).