



流体制御による高効率細胞 トラップデバイスの開発

早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構
ナノテクノロジー研究所
次席研究員(研究院講師)
田中大器

2023年 7月 25日

■ マイクロ流体デバイスとは？

マイクロ流体デバイスのバイオ応用

■ マザーマシンデバイス：一細胞トラップデバイス

バクテリアの格納デバイス

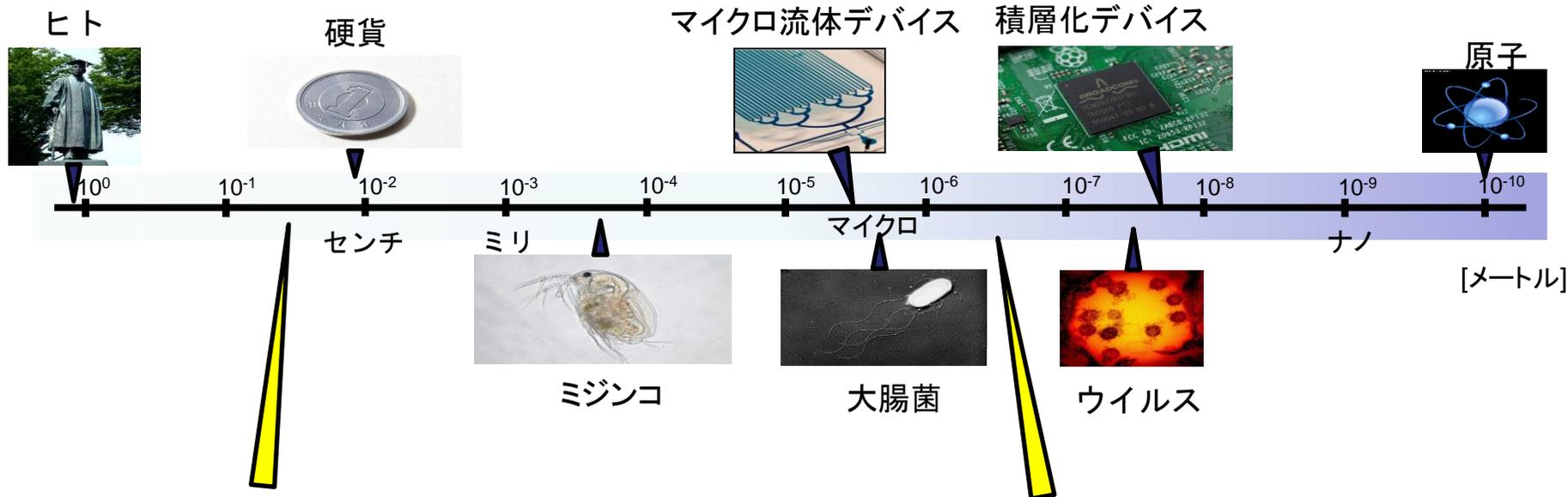
■ マイクロ液滴：一細胞トラップ&取り出しデバイス

バクテリアの取り出しデバイス

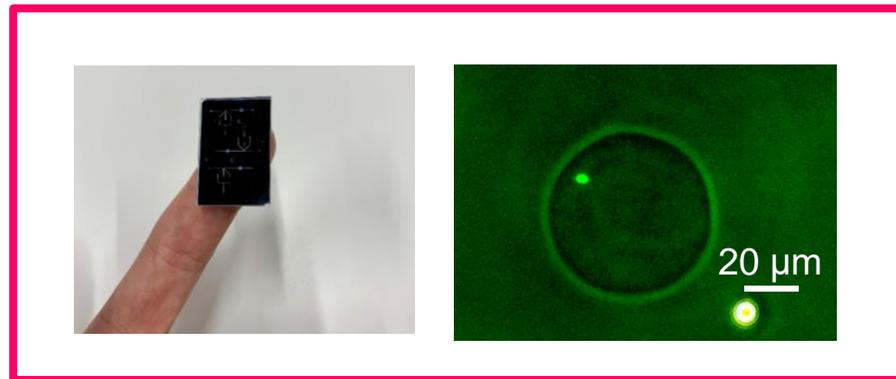
■ まとめと今後の展開

マイクロ流体デバイスとは？

ナノ・マイクロテクノロジー

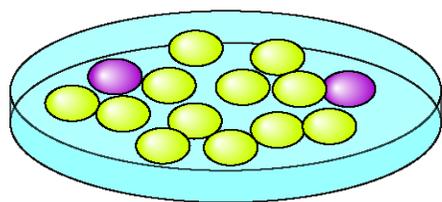


ヒトの手による操作

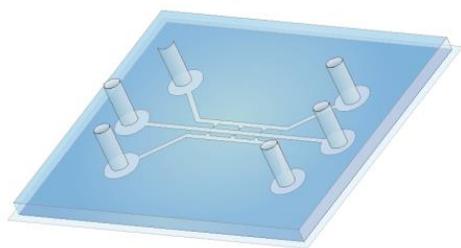
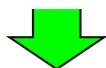


デバイスによる自動化

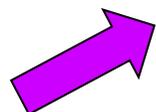
一細胞からの生体分子・タンパク質の解析



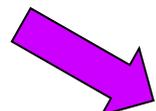
多数の細胞



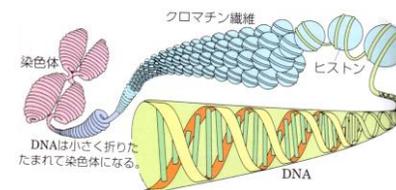
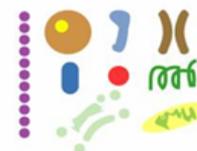
マイクロデバイス



個々の細胞を
破碎・抽出

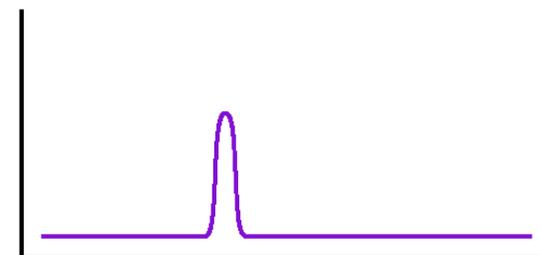


細胞を刺激し特定
タンパク質を抽出



オルガネラ・DNAの抽出

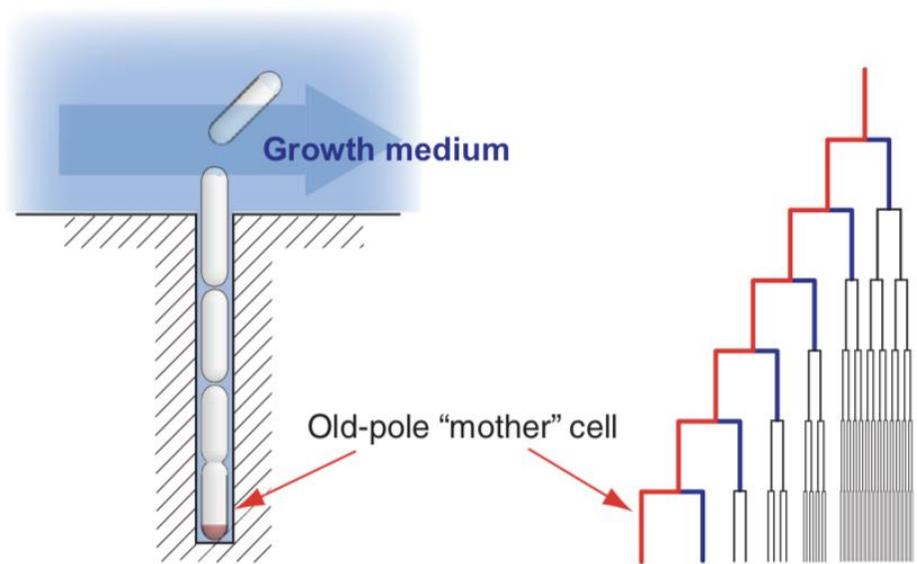
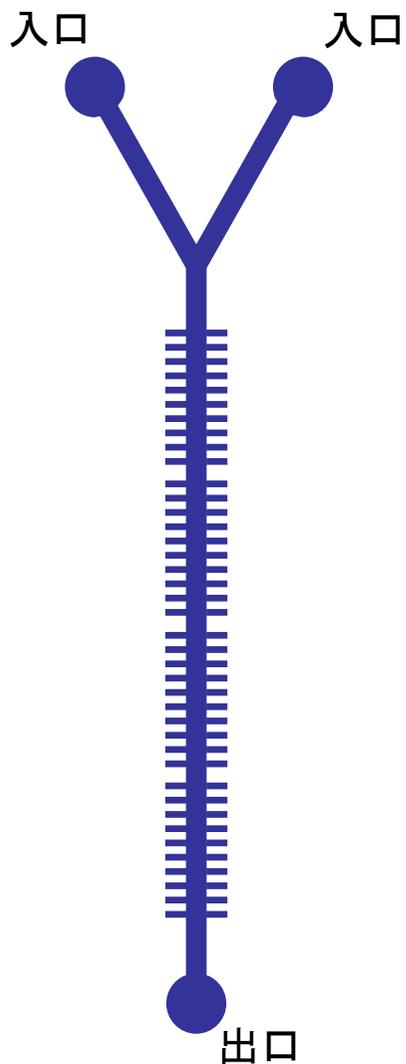
Signal



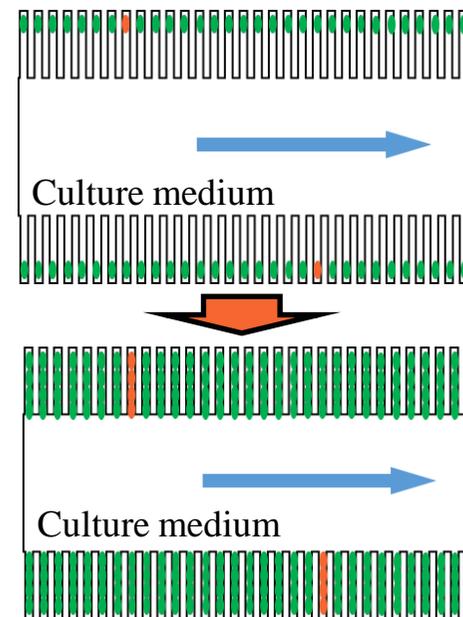
タンパク質の分析

- マイクロ流体デバイスとは？
マイクロ流体デバイスのバイオ応用
- **マザーマシンデバイス：一細胞トラップデバイス**
バクテリアの格納デバイス
- マイクロ液滴：一細胞トラップ&取り出しデバイス
バクテリアの取り出しデバイス
- 今後の展開

マザーマシンデバイスの応用

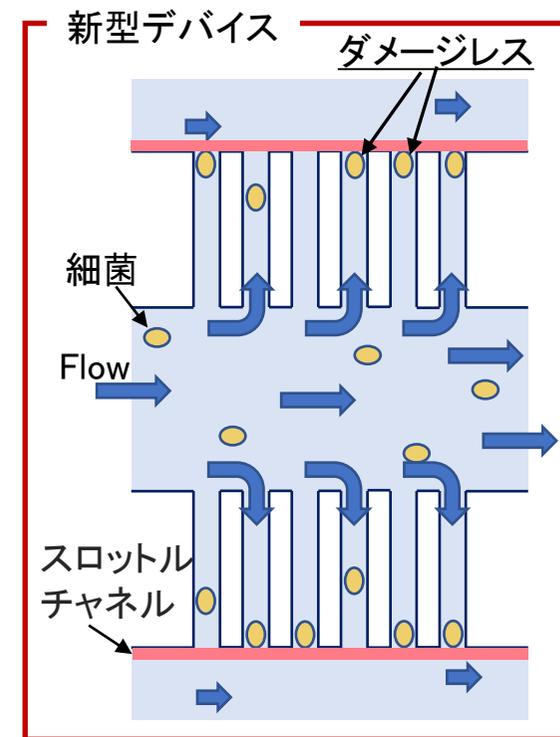
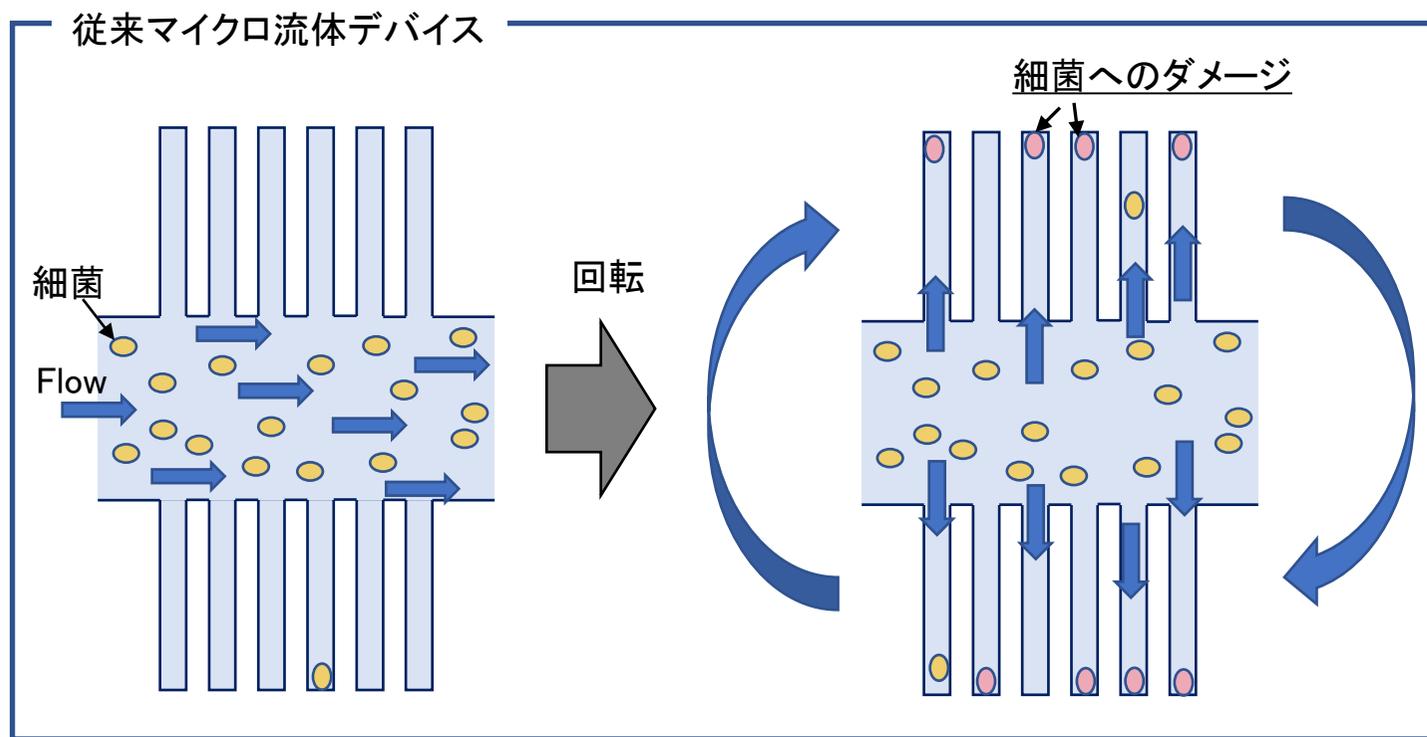


The old-pole mother cell is trapped at the growth channel

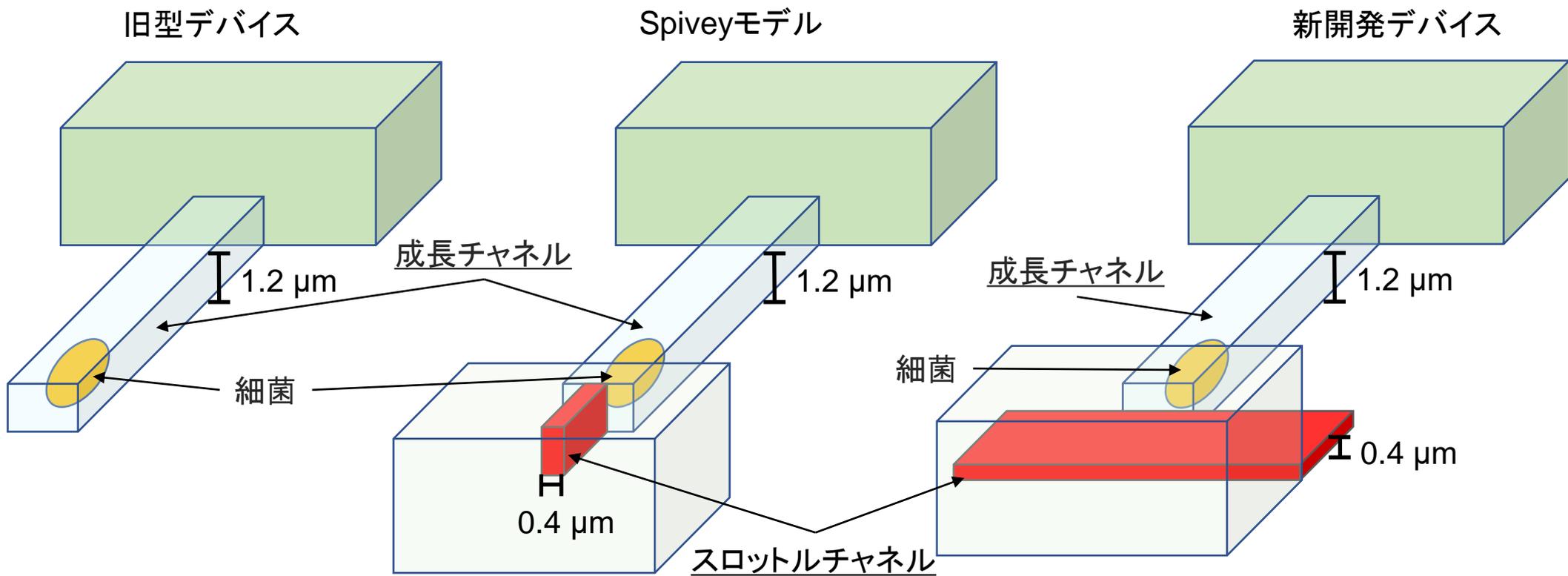


**Difficult for bacteria
to enter the channels**

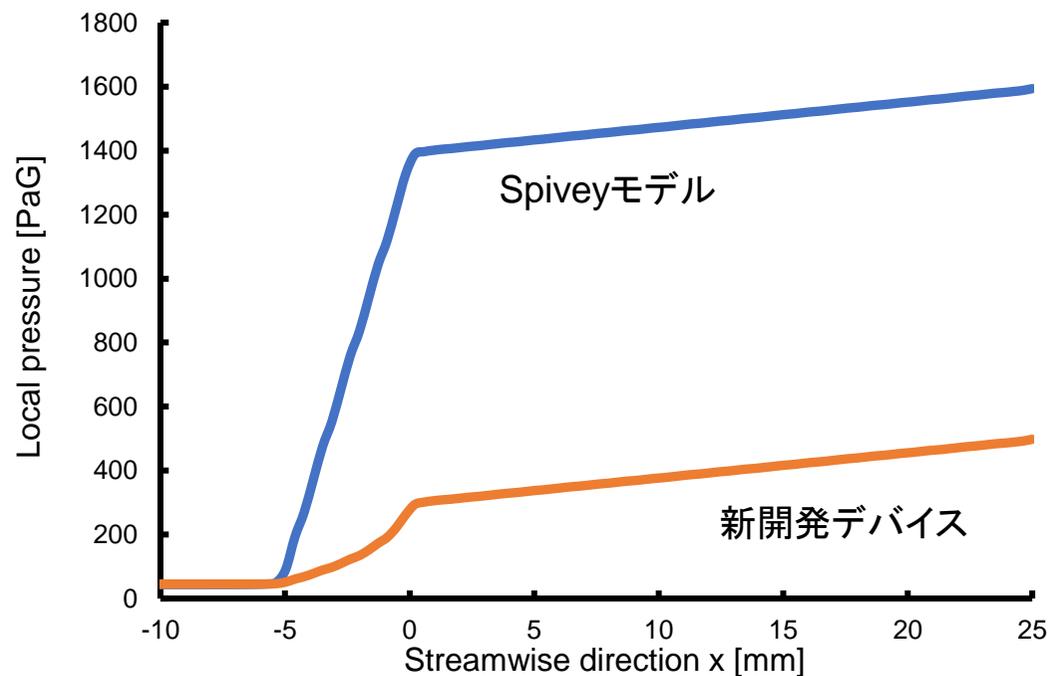
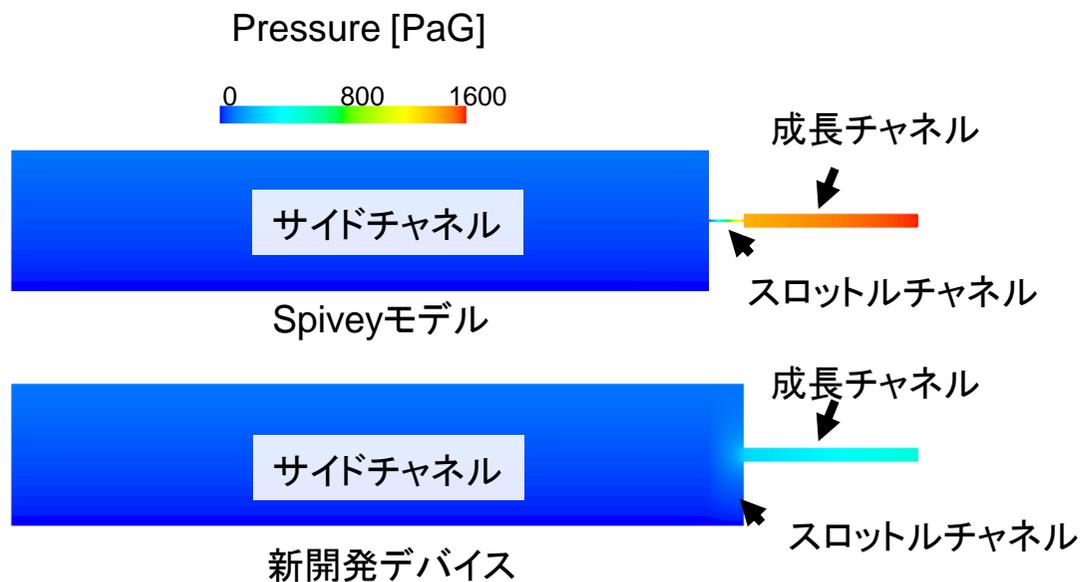
従来技術の問題点



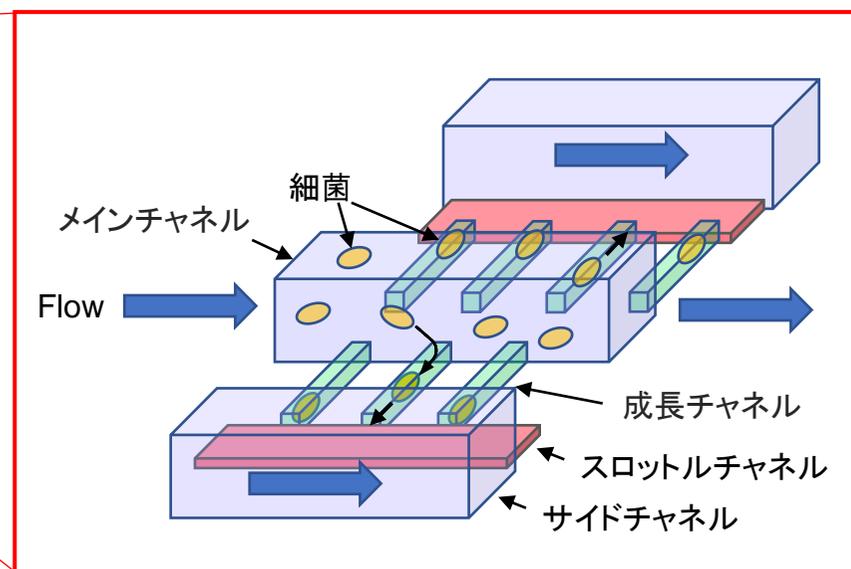
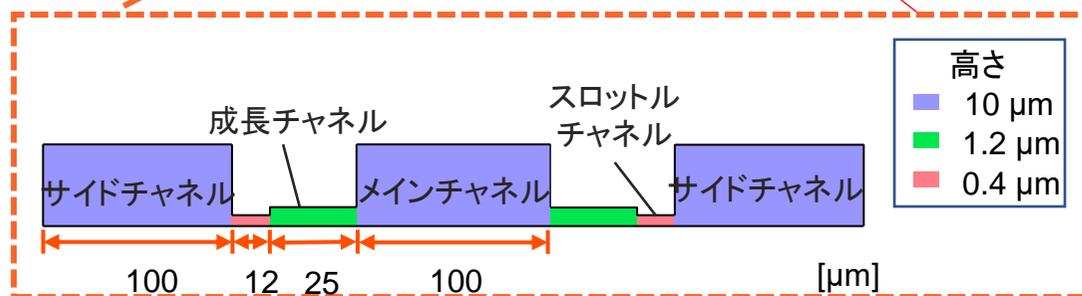
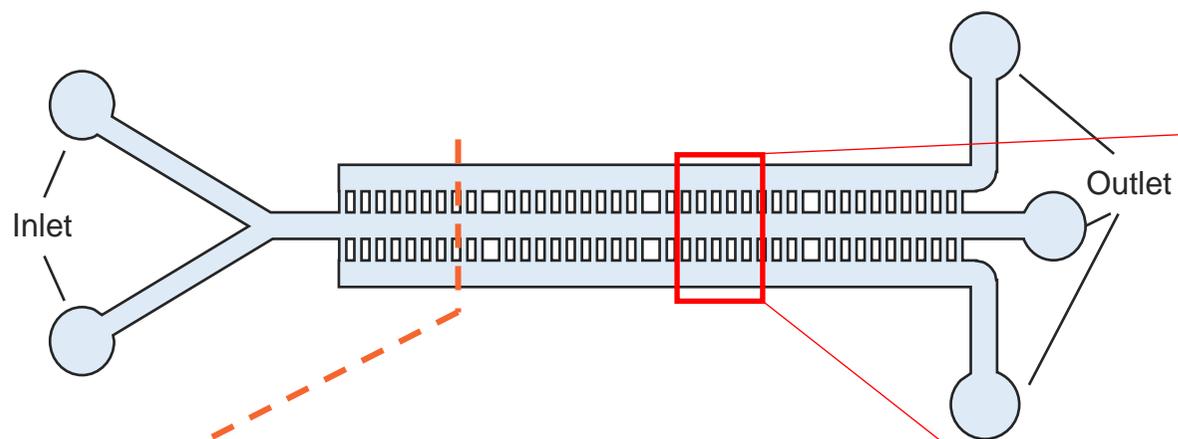
従来技術との比較



流体シミュレーション

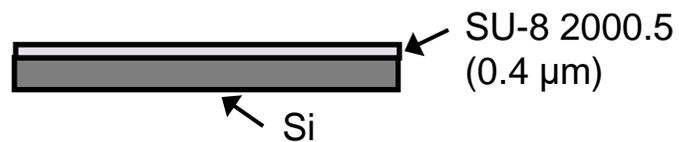


新デバイスの概要

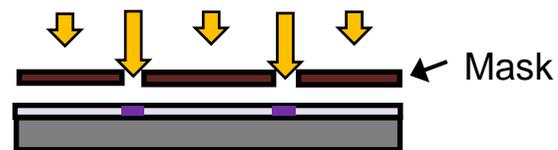


デバイス作製プロセス

① スピンコート(1段目)



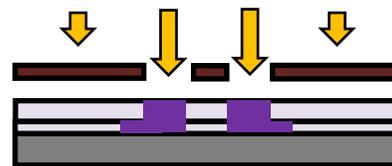
② フォトリソグラフィ



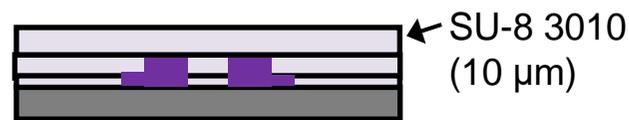
③ スピンコート(2段目)



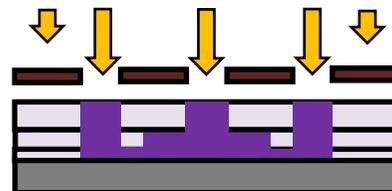
④ フォトリソグラフィ



⑤ スピンコート(3段目)



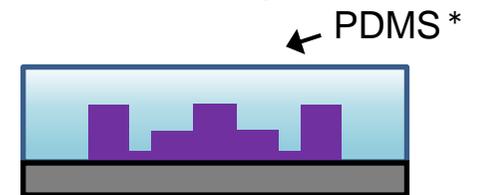
⑥ フォトリソグラフィ



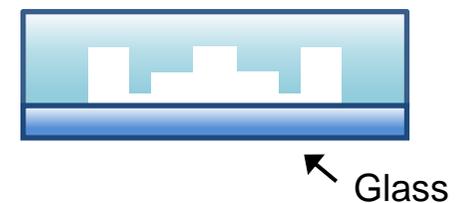
⑦ 現像



⑧ PDMS*モールドイング



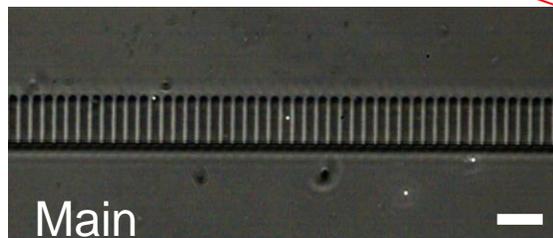
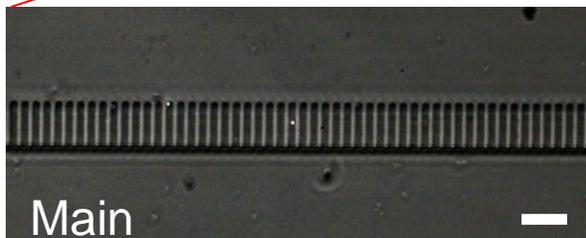
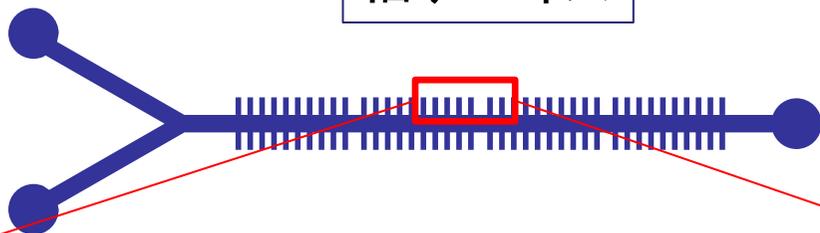
⑨ Plasma bonding



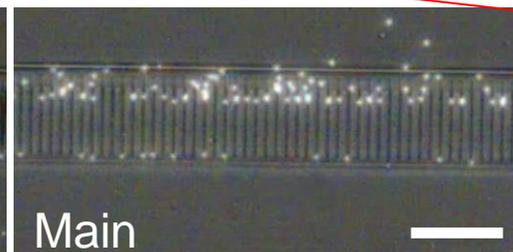
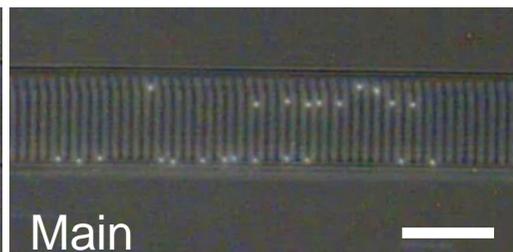
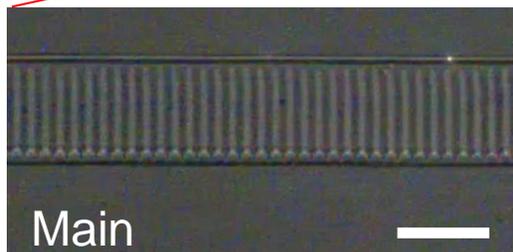
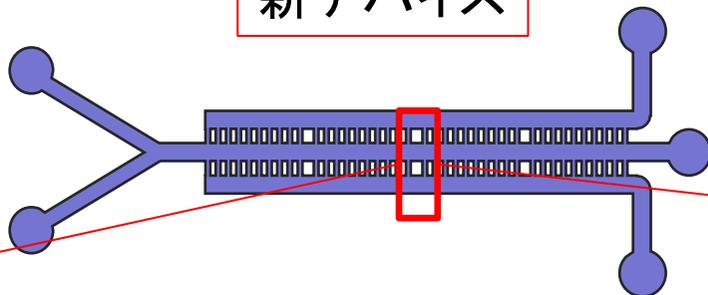
* Polydimethylsiloxane

新旧デバイスの比較

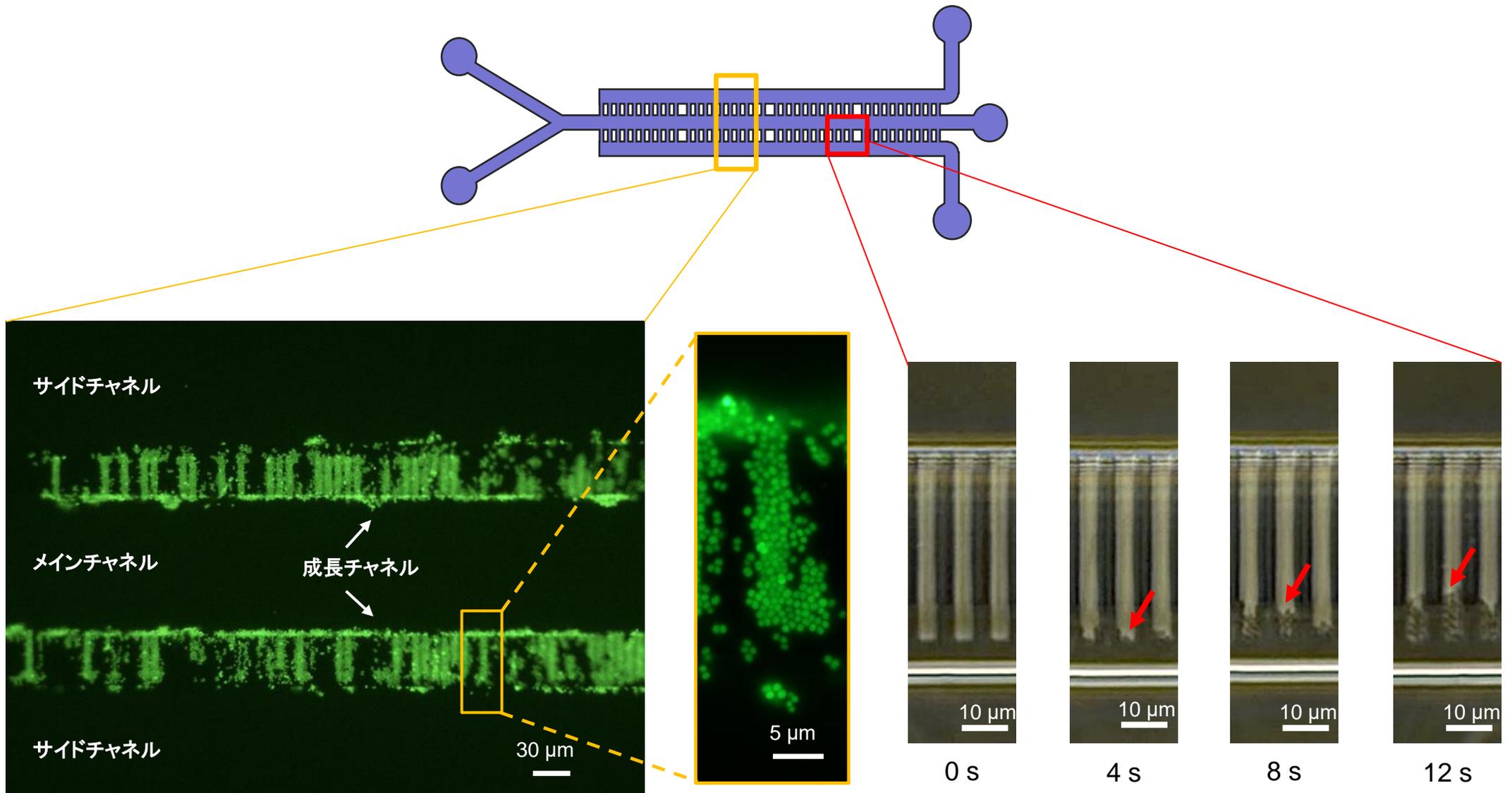
旧デバイス



新デバイス



バクテリアを用いた流体実験



黄色ブドウ球菌

サルモネラ

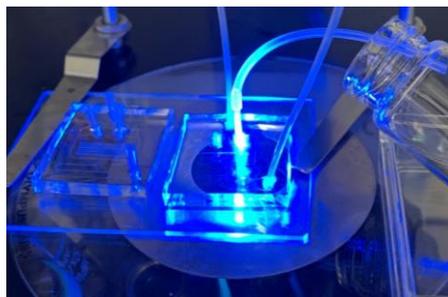
新技術開発で可能になったこと

- 流路構造を工夫することで効率的な細菌の格納が可能になった
- 作製プロセスはシンプルで大量生産が可能である
- 様々なサイズの細菌やカビ類の培養実験に応用できる

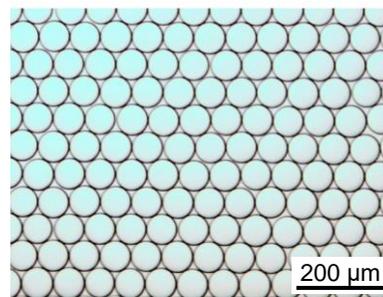
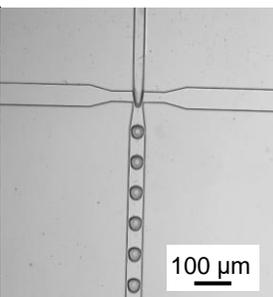
- マイクロ流体デバイスとは？
マイクロ流体デバイスのバイオ応用
- マザーマシンデバイス：一細胞トラップデバイス
細菌の格納デバイス
- **マイクロ液滴：一細胞トラップ&取り出しデバイス**
細菌の取り出しデバイス
- 今後の展開



マイクロ液滴の応用



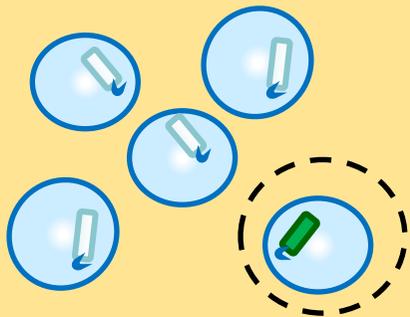
マイクロ流体デバイス



マイクロ液滴

- ✓ 細胞集団の単離
- ✓ 細胞保護
- ✓ 効率的な観察

液滴中で細胞の解析



- ・マーカーによる標的の発見
- ・薬液による反応観察

特定の液滴を
抽出



デバイス外で更に解析



- ・RNA-seq などの遺伝子解析

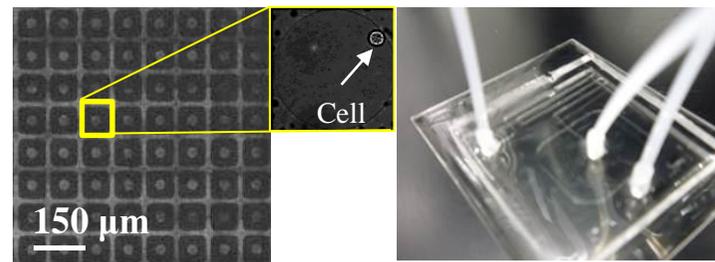
デバイスから特定の液滴を取り出せる機能が求められている

マイクロ液滴による一細胞解析



ディッシュ

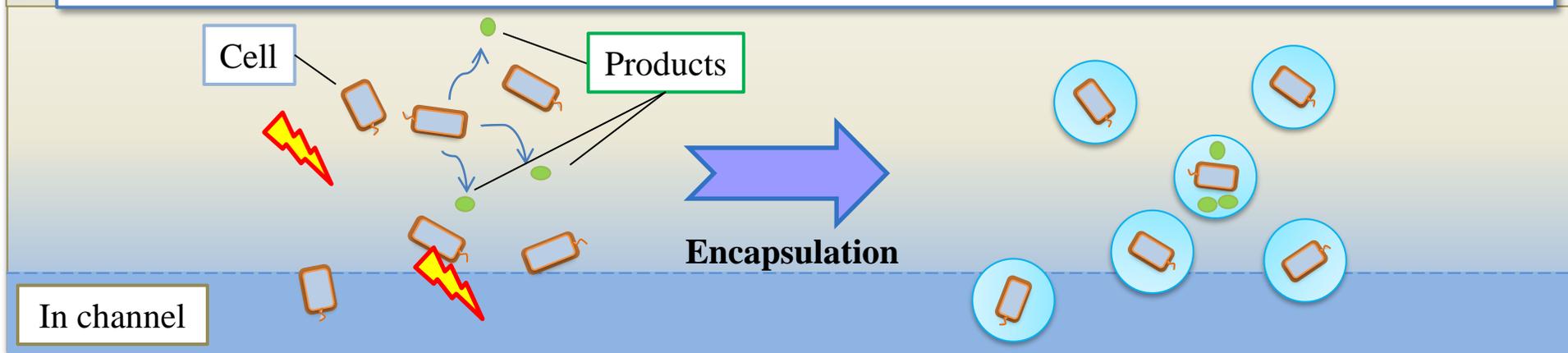
- ヒトの手で操作 → コンタミ影響
→ 低効率
- 大量の試薬の使用
- 細胞コロニー



マイクロ流体システム

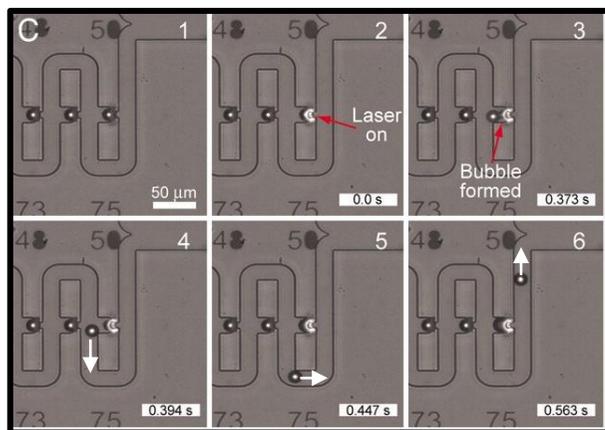
- ハンドリング → コンタミの影響がない
→ 高効率
- 少量の試薬
- 一細胞での分析

効率的な一細胞解析におけるカプセル化の有効性

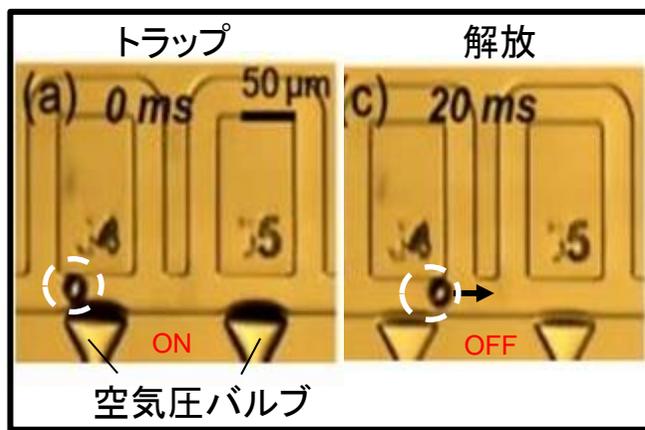


従来の技術の問題点

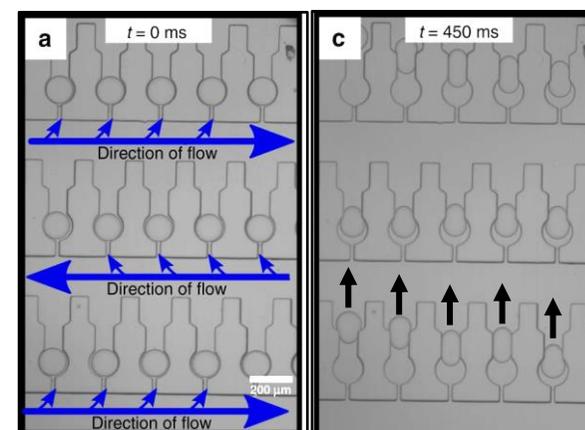
レーザ照射



空気圧バルブ



キャリアの逆流



✓ 液滴の選択的な抽出

× サンプルへのダメージ

× 高精度な外部機器が必要

✓ ダメージレス

× 高精度な外部機器が必要

× 選択的な取り出しが困難

✓ ダメージレス

✓ 外部機器が不要なし

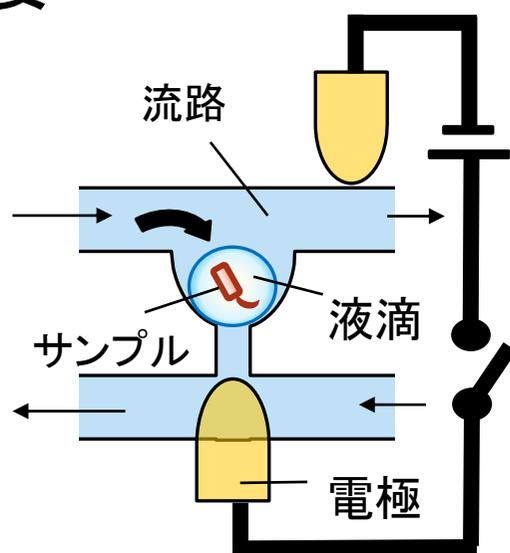
× 選択的な取り出しが困難

シンプルでサンプルへダメージを与えずに選択的な液滴の抽出が可能な
マイクロ流体デバイスが求められている

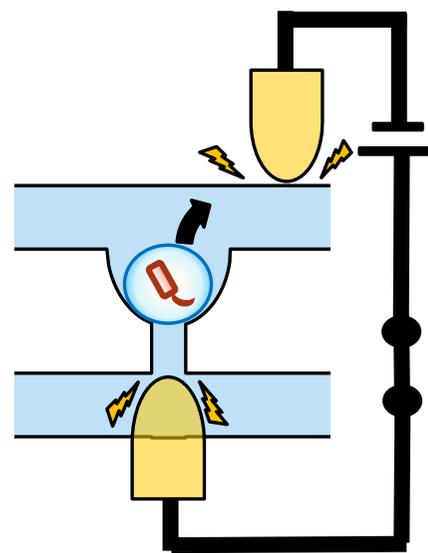
新しい技術

誘電泳動を用いた液滴の選択的抽出が可能なマイクロ流体デバイスの開発に成功

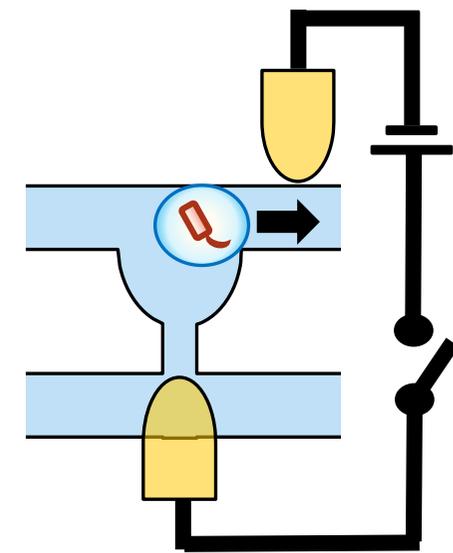
概要



1. 液滴のトラップ



2. 電圧の印加



3. 液滴の抽出

原理

誘電泳動(Dielectrophoresis"DEP")

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}(CM) \nabla |E|^2$$

$\text{Re}(CM)$: Clausius-Mossoti 係数

ϵ_m : 周囲の溶液の誘電率

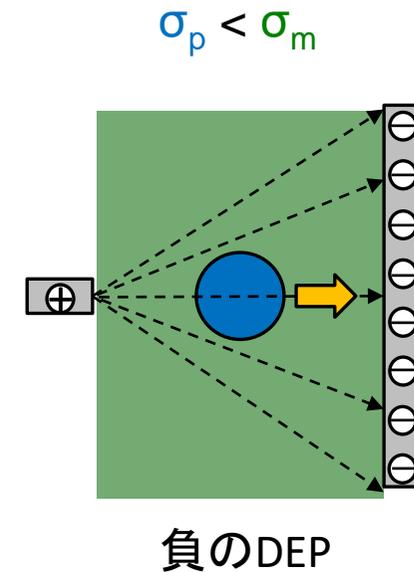
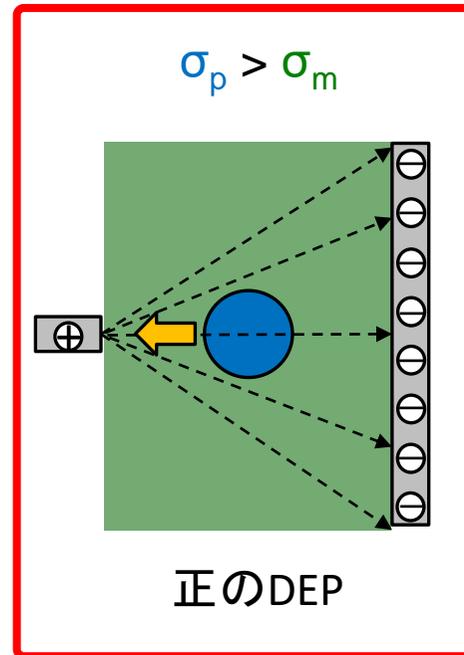
r : 微粒子の半径

E : 電界

DC 電場の場合 $(CM) = \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m}$

σ_p : 微粒子の電気伝導率

σ_m : 周囲の液体の電気伝導率

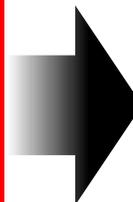


本研究では...

σ_p : 液滴 (アガロース)

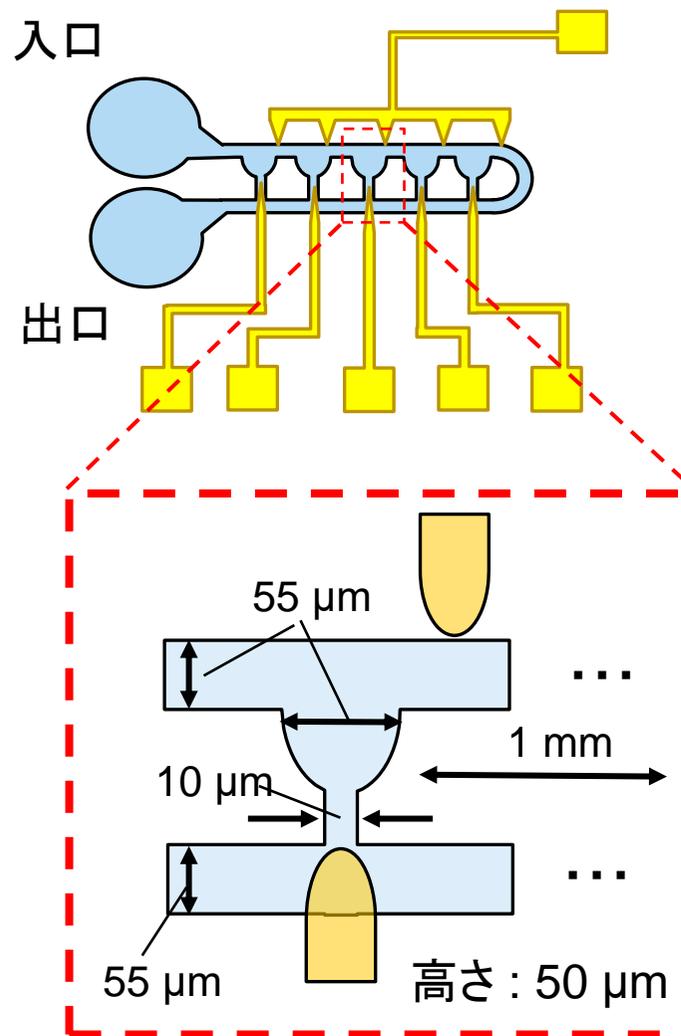
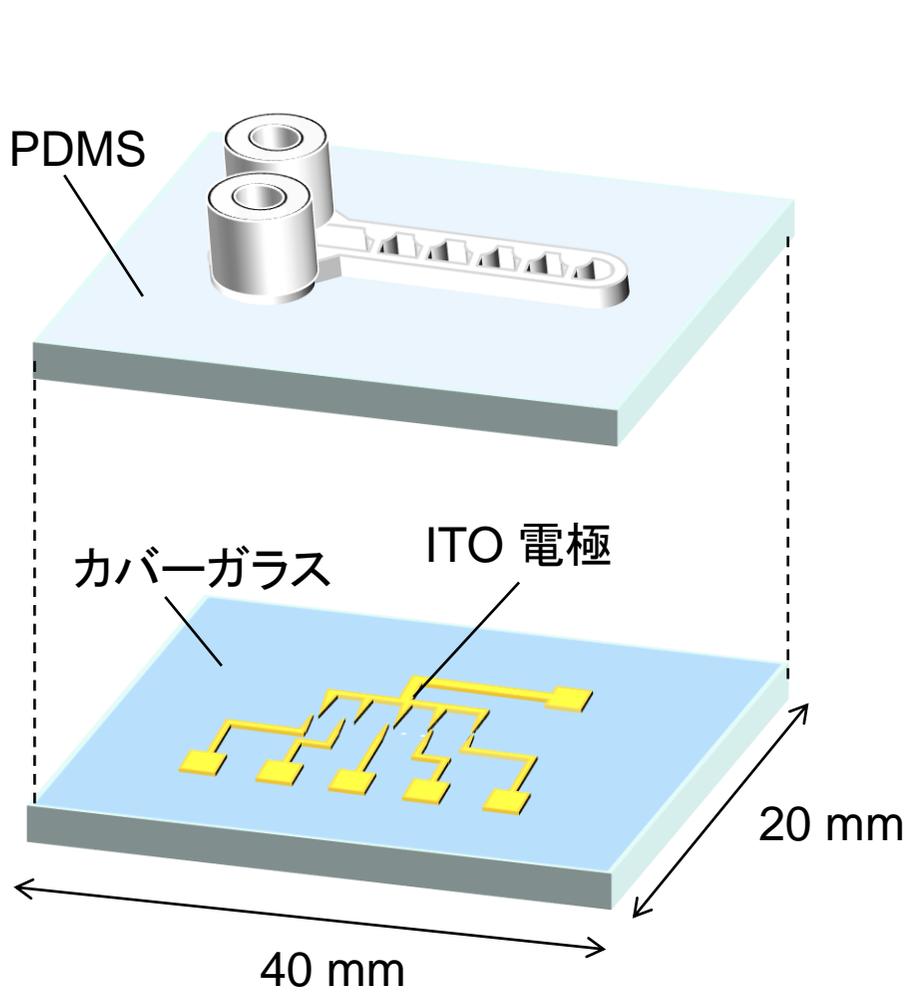
σ_m : キャリア (ミネラルオイル)

$$\sigma_p > \sigma_m$$



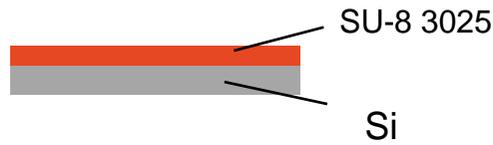
正のDEP
液滴は電界強度の強い方へ移動する

全体図

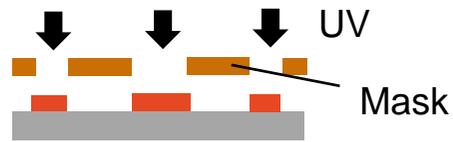




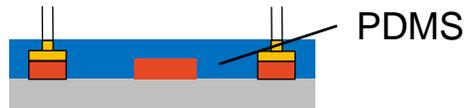
1. レジストスピコート



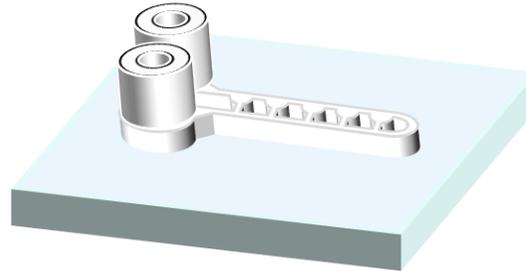
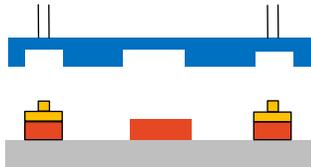
2. フトリソグラフィ



3. PDMS モールドイング



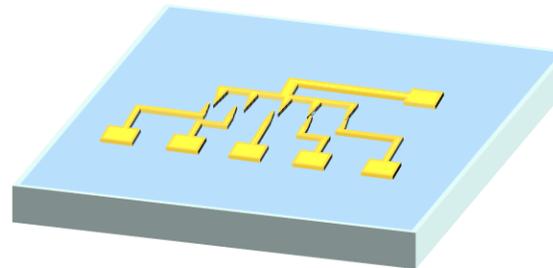
4. PDMS 剥離



マイクロ流路

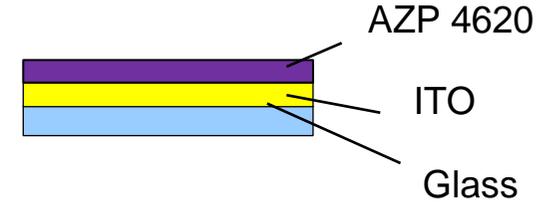


プラズマ接合

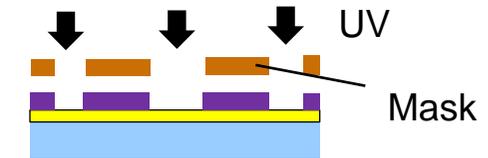


ITO電極つきガラス

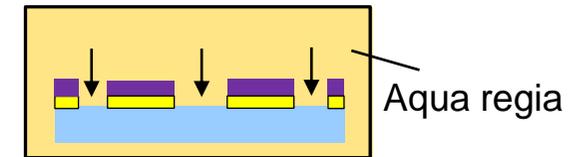
1. レジストスピコート



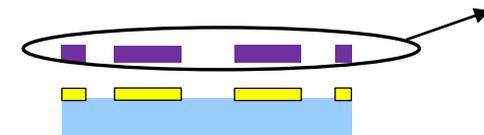
2. フトリソグラフィ



3. ウェットエッチング

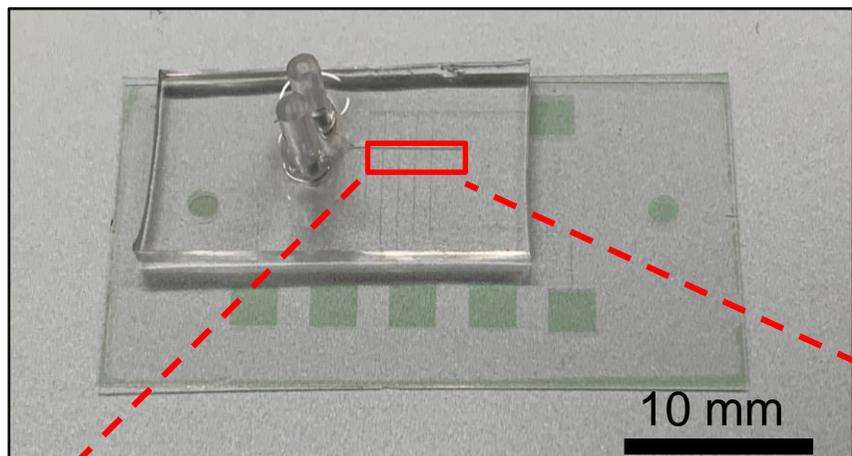


4. レジスト除去

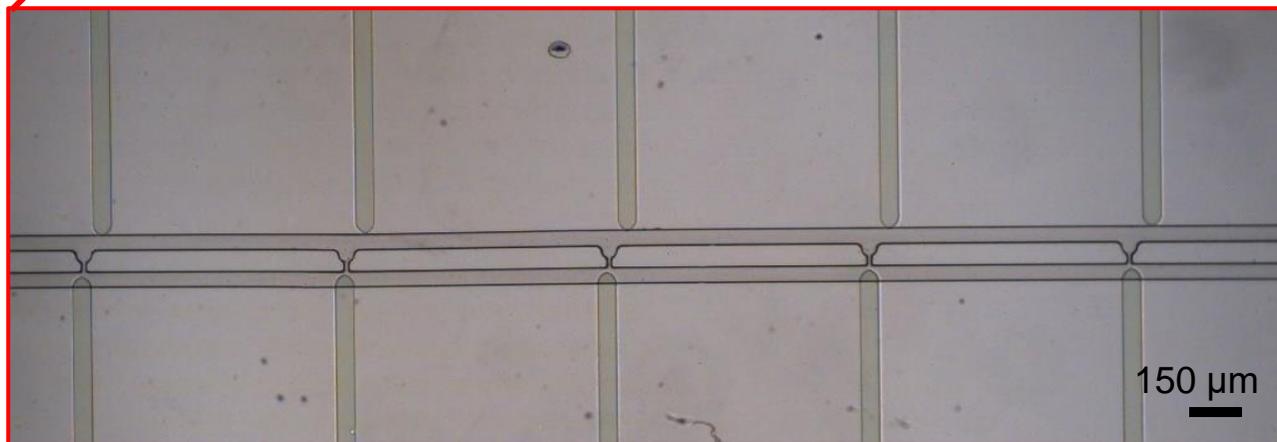
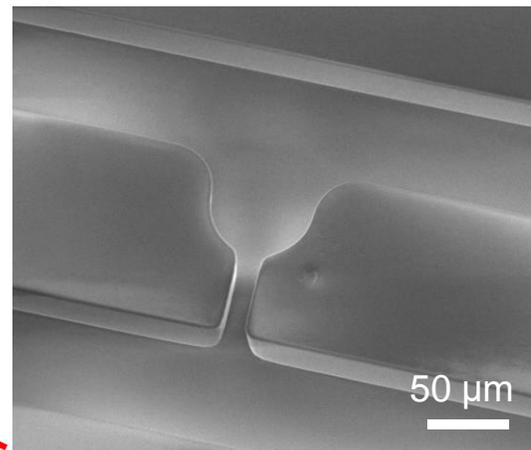


マイクロ液滴デバイスの顕微鏡像

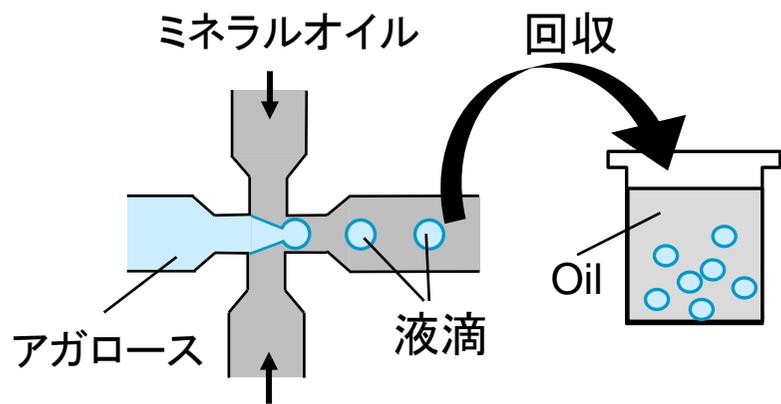
全体図



PDMS流路 (SEM 画像)

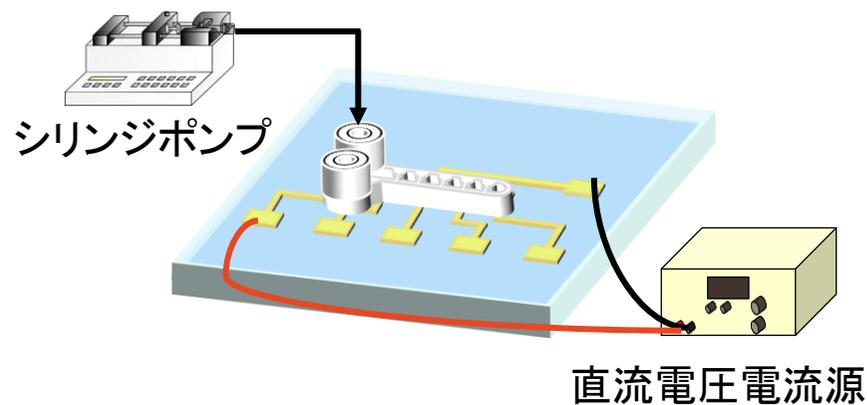
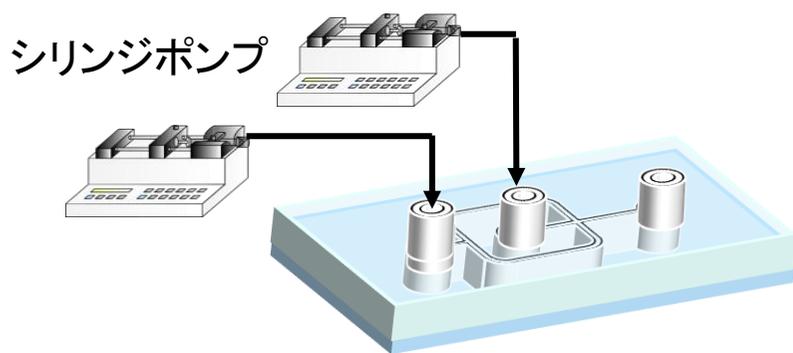
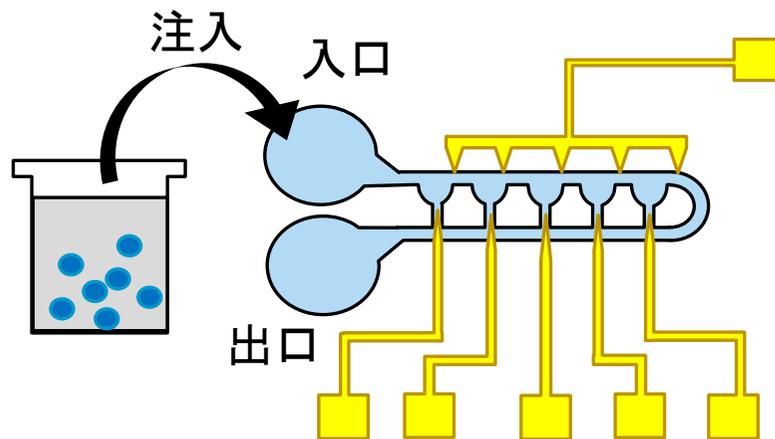


(1) 液滴の生成 & 回収

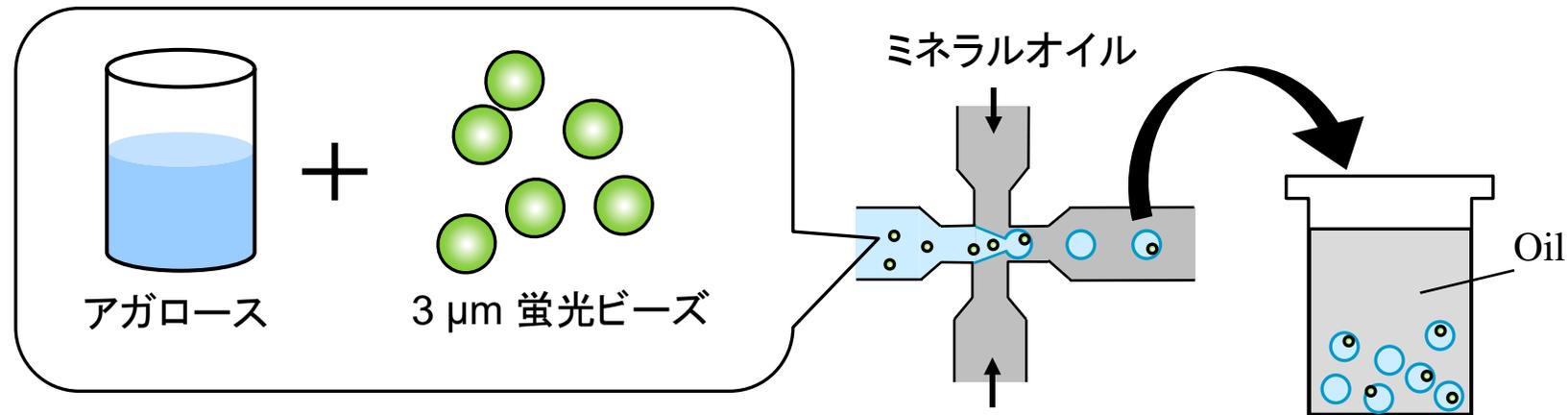


冷却 (4 °C)
液滴ゲル化

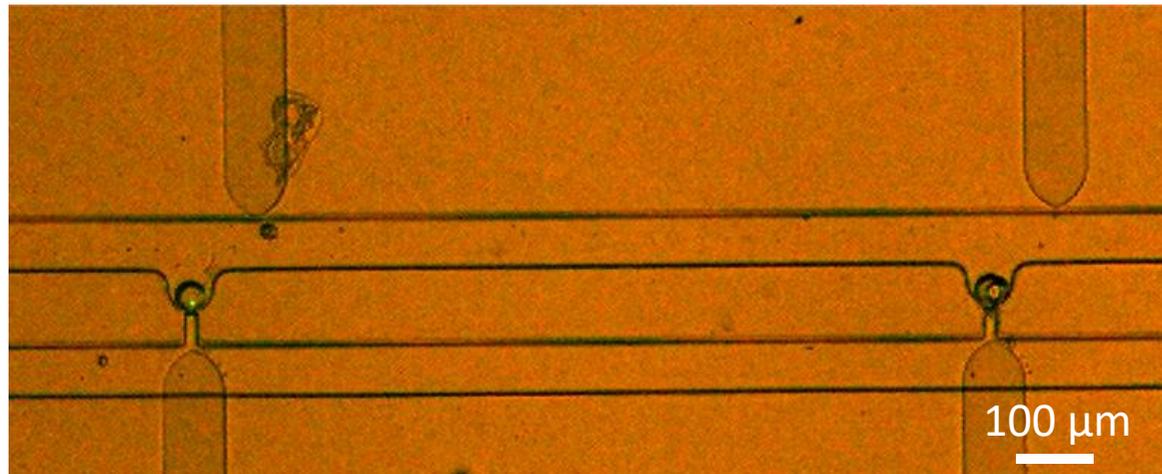
(2) 液滴のトラップ & 抽出



マイクロビーズを用いた予備実験



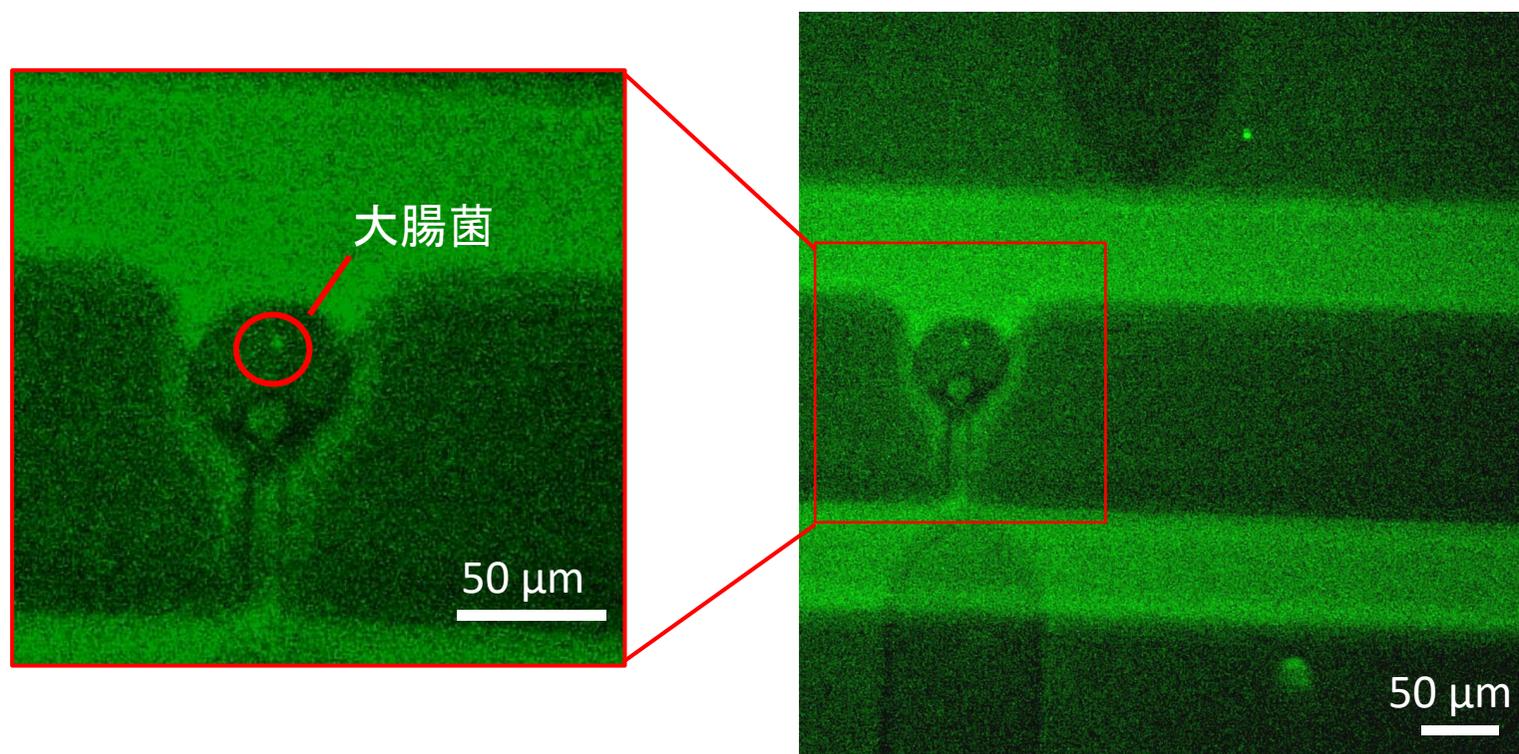
Flow rate : 0.2 μl/min Voltage : 500 V



蛍光ビーズ入り液滴のみの取り出しに成功

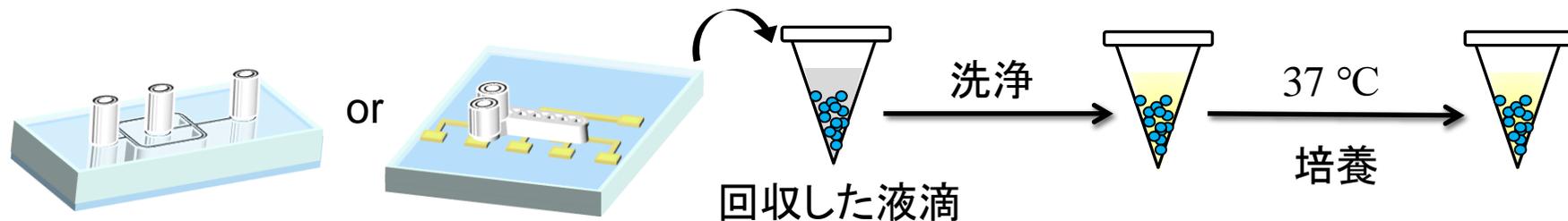
大腸菌一細胞の取り出し

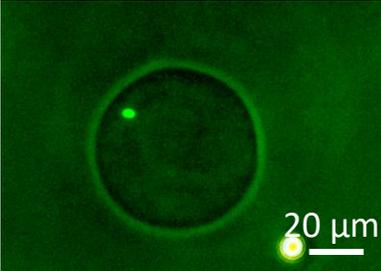
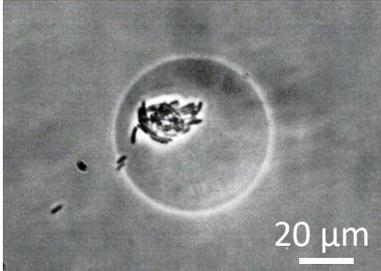
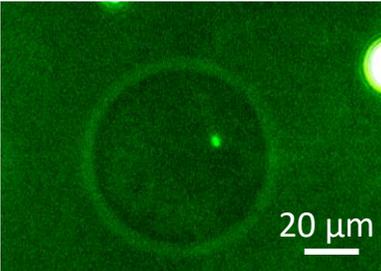
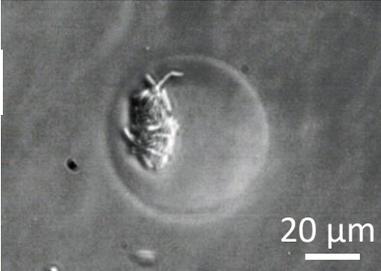
Flow rate : 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ Voltage : 500 V



単一の大腸菌が含まれた液滴の取り出しに成功

大腸菌へのダメージ



	0 時間後	15 時間後
電圧を印加していない液滴	 平均 0.9 個 (n= 15)	 平均 17.8 個 (n= 15)
電圧を印加した液滴	 平均 1.3 個 (n= 15)	 平均 21.8 個 (n= 15)

電圧による大腸菌への影響は無し

新技術開発で可能になったこと

- 誘電泳動を利用することで任意の一細胞の取り出しに成功した
- 取り出した細胞は電流等の影響を受けていない
- 様々なサイズの細菌やカビ類の培養実験に応用できる

- マイクロ流体デバイスとは？
マイクロ流体デバイスのバイオ応用
- マザーマシンデバイス：一細胞トラップデバイス
細菌の格納デバイス
- マイクロ液滴：一細胞トラップ&取り出しデバイス
細菌の取り出しデバイス
- 今後の展開

新技術の応用展開に向けた課題

- デバイス製造の最適化
- 細菌以外への応用
- 細菌のトラップや取り出しの再現性の向上

新技術の応用展開

- 流体デバイスの多チャンネル化、大型化
- 流体デバイスと光学分析機器との組み合わせ
⇒ 光学機器技術を持つ企業との共同研究を希望
- 抗菌薬を開発中の製薬企業など、医薬品分野への応用展開が有効だと考えられる

- 発明の名称 : 捕捉装置
- 出願番号 : 特願2021-094696
- 出願人 : 学校法人早稲田大学
国立大学法人千葉大学
- 発明者 : 庄子習一、田中大器ほか

- 2018年-2022年: キヤノンメディカルシステムズと共同研究を実施(チームリーダー)
- 2023年-2024年: JST 早稲田大学PoCファンド採択

お問い合わせ先

早稲田大学

リサーチイノベーションセンター

知財・研究連携支援セクション(承認TLO)

TEL 03-5286-9867

FAX 03-5286-8374

e-mail contact-tlo@list.waseda.jp