

交換型マイクロ流路チップ・セルソーターを中心としたアプリケーション集

マイクロ流路チップを採用したフローサイトメーターを中心に、エマルジョンの封入やシングルセル分注を組み合わせることで、従来のフローサイトメーターでは実現できなかったアプリケーションをご紹介します。



On-chip Sort

交換型マイクロ流路チップ・セルソーター



On-chip Droplet Generator

細胞/細菌や遺伝子のシングル封入された
エマルジョンを大量作製



On-chip SPiS

簡単・確実にシングルセルをウェルプレートに分注
(ハイブリドーマ、ゲノム編集細胞など)

※製造元: 株式会社 オンチップ・バイオテクノロジーズ

アプリケーション

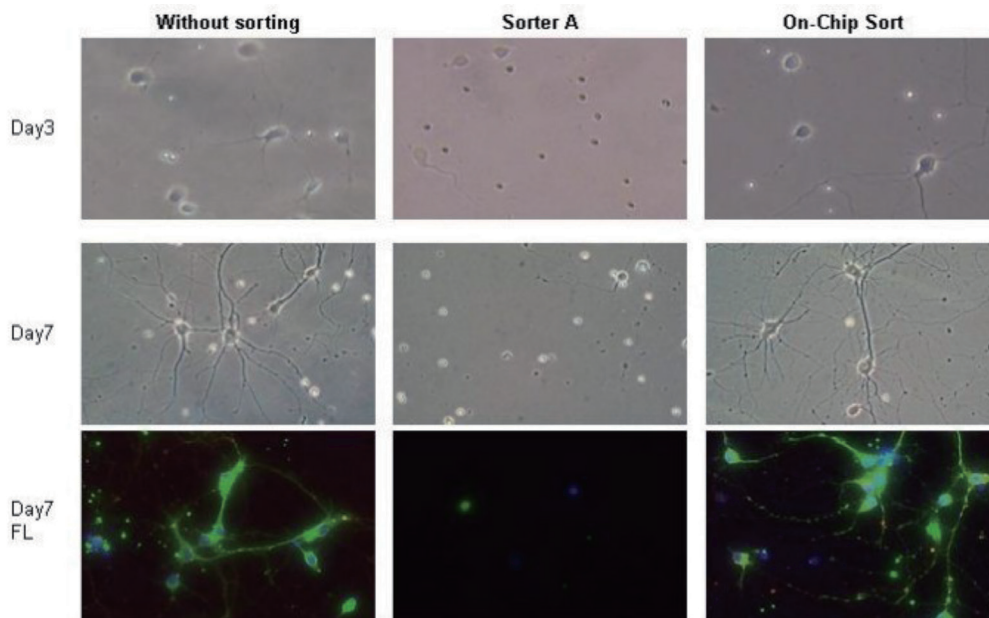
- ダメージフリー セルソーティング
培養・形態変化の評価
遺伝子変化の評価
- 大型細胞の分離
スフェロイド
原生生物

- レアセル ソーティング
Circulating tumor cells
ネガティブソーティング
- シングルセル培養
ゲノム編集細胞の選抜
- 微生物叢からの分離
大腸菌(エマルジョン・ハイドロゲルボール)
テトラヒメナ(エマルジョン)
土壌微生物(エマルジョン)

ダメージフリー

培養・形態変化の評価

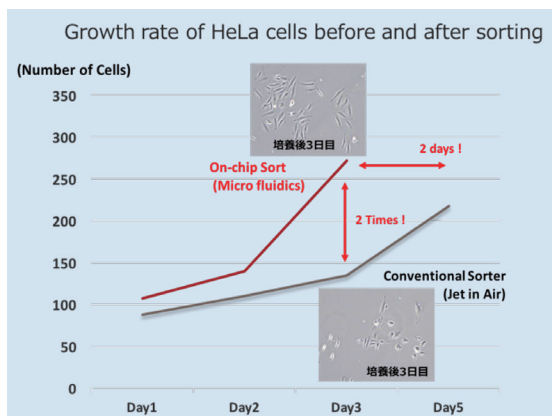
■ ラット胎児の脳海馬より回収した神経細胞による比較



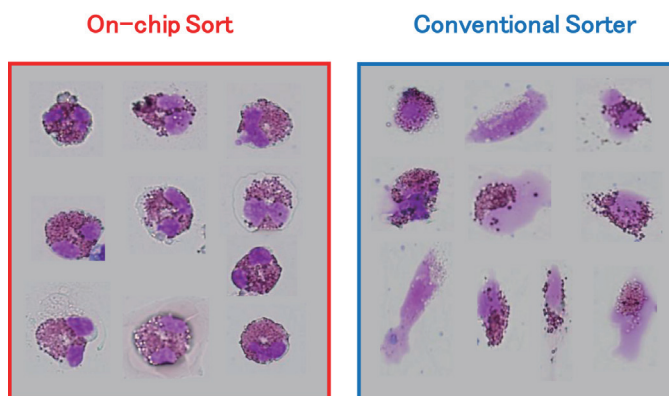
Collaboration with Dr. SUZUKI Ikuro, Tokyo University of Technology

胎児ラット海馬から細胞を調整し、ソーティング無し、従来のセル・ソーターで分取したもの、On-chip Sortを用いて分取し、7日間培養を行った。

■ HeLa細胞と末梢血好酸球による比較



ソーティング後のHeLa細胞の増殖曲線。
横軸は播種後の日数、縦軸は細胞数。写真は3日目に撮影したもの



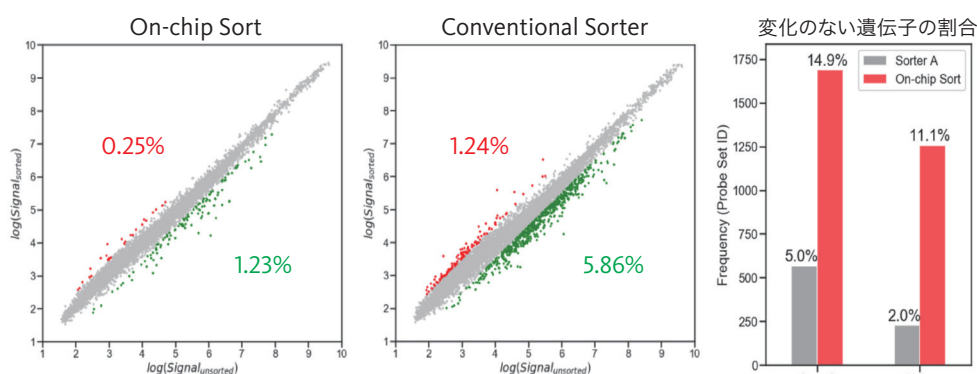
末梢血好酸球のソーティング後サイトスピンで標本化したときの形態。左がOn-chip Sort後、右が従来のソーティング後

On-chip Sortを用いてソーティングした細胞は、各細胞特有の形態を保っており、細胞増殖に及ぼす影響を最小限にして分取可能であった。

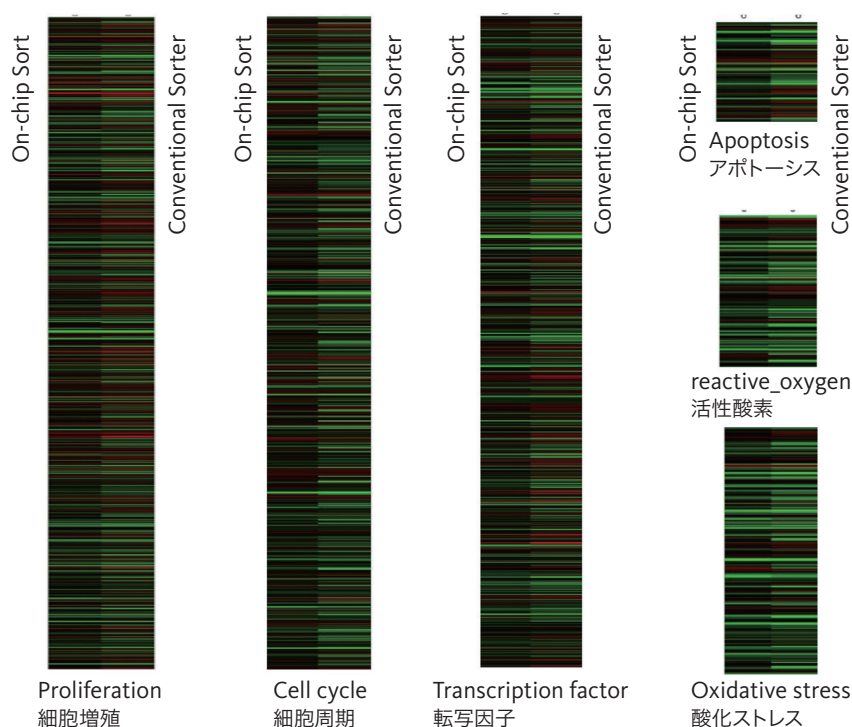
ダメージフリー

遺伝子変化の評価

■ Caco-2細胞とHeLa細胞による評価



(図左・中) 赤・緑の点はコントロール(ソート無し)のものと比較して大きく遺伝子発現量が変化したものを表す(数字は全データに対する割合)。(図右) 各プロパティ(apoptosis, cell adhesion, cell cycle, etc)で分類されている生データをすべて統合したデータのうち、発現量の変化(ソートした細胞のシグナル強度/ソートしていない細胞のシグナル強度)をヒストグラムとして、HeLa、Caco-2でプロットした結果。



主に差が認められる分類ごとの解析。

左がソーティングなしと比較したOn-chip Sort。右がソーティングなしと比較したConventional Sorter。黒が差がなし。緑が低下。赤が上昇。

遺伝子発現パターンから、細胞増殖、細胞周期、アポトーシスでの変化は見られており、増殖曲線が異なる現象を補足するデータであった。また、転写因子にも影響を与えていることから、ソーティング後の2次解析の解釈にも影響する可能性が示唆された。

On-chip Sortによるソーティングは、細胞の遺伝子発現に与える影響が少ないことが示唆された。

マイクロアレイ解析協力: 株式会社セルイノベーター受託研究部 安田様、萩原様、九州大学 田代康介先生

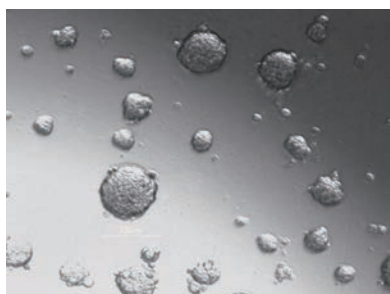
大型細胞の分離

スフェロイド

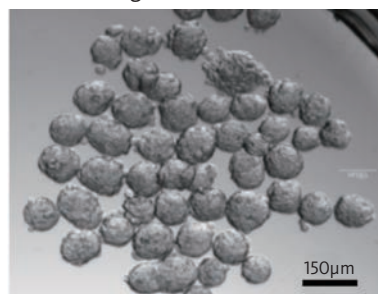
■ 癌幹細胞スフェロイド・ソーティング後の薬剤感受性試験

不均一なスフェロイド

Before

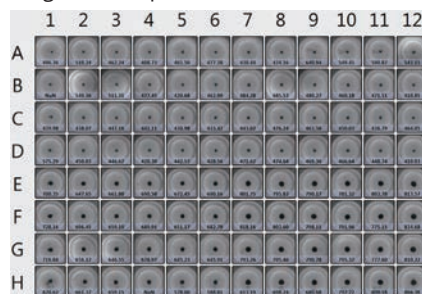


After Sorting

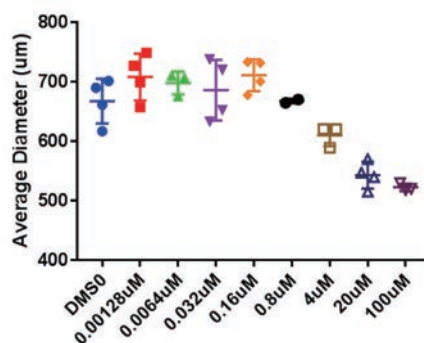


均一なサイズで高精度な薬効評価

Single cell dispense



On-chip Sortの150 µm流路ソーティングチップにより一定サイズのスフェロイドをソーティングし、On-chip SPISによりスフェロイドをひとつずつ分注することで精度の高い薬剤スクリーニングが可能であった。



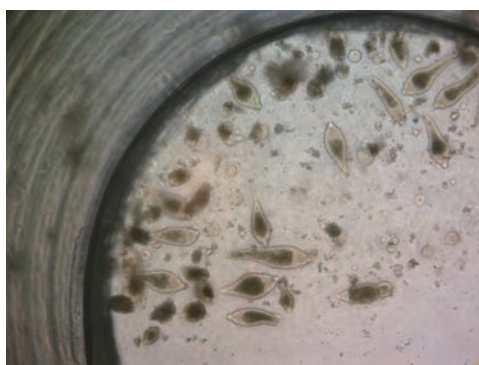
Collaboration with Mitchel Cancer Institute, USA

原生生物

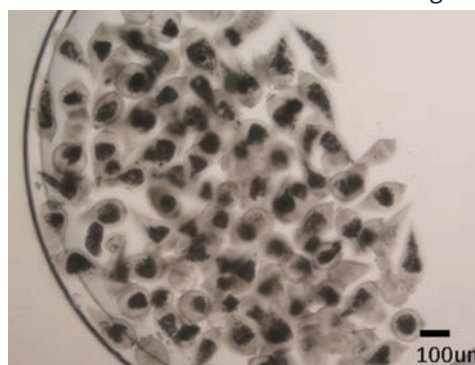
■ シロアリ体内に生息する腸内原生生物のソーティング

Sample : イエシロアリの腸内原生生物※1

Before※2



After Sorting※3



シロアリ腸内に寄生する原生生物は、通常のセルソーターではサイズが大きすぎることや、浸透圧によって破裂してしまうことで分取が困難である。

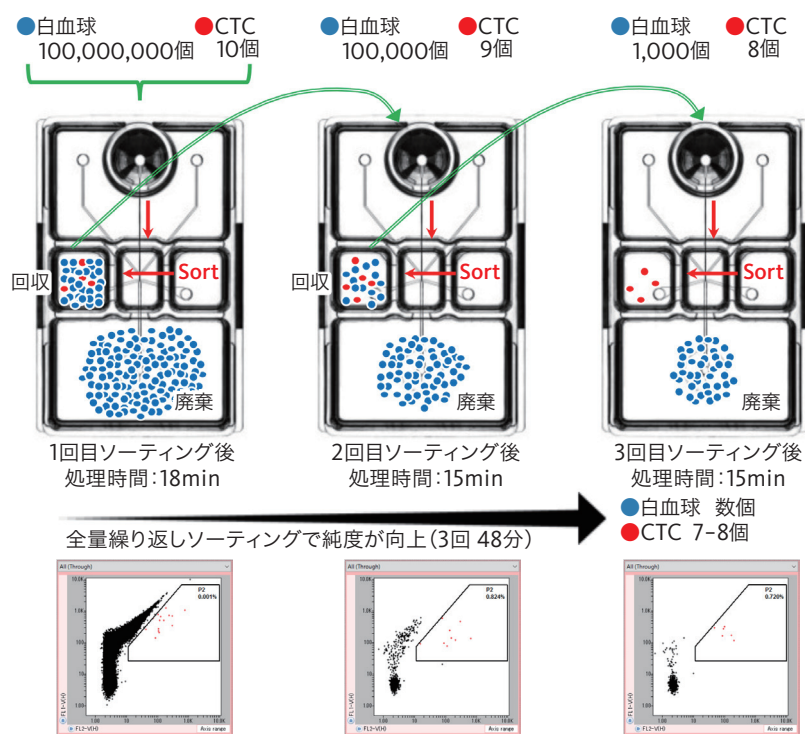
On-chip Sortの150 µm流路ソーティングチップおよび適切なシース液を用いることで原生生物をソーティングすることが可能であった。

※1 wikipediaより検索ワード「シロアリ」参照
※2,3 理化学研究所 雪先生より 画像提供

レアセル ソーティング

Circulating tumor cells

■ サンプル数個/mL中のレアセルを濃縮

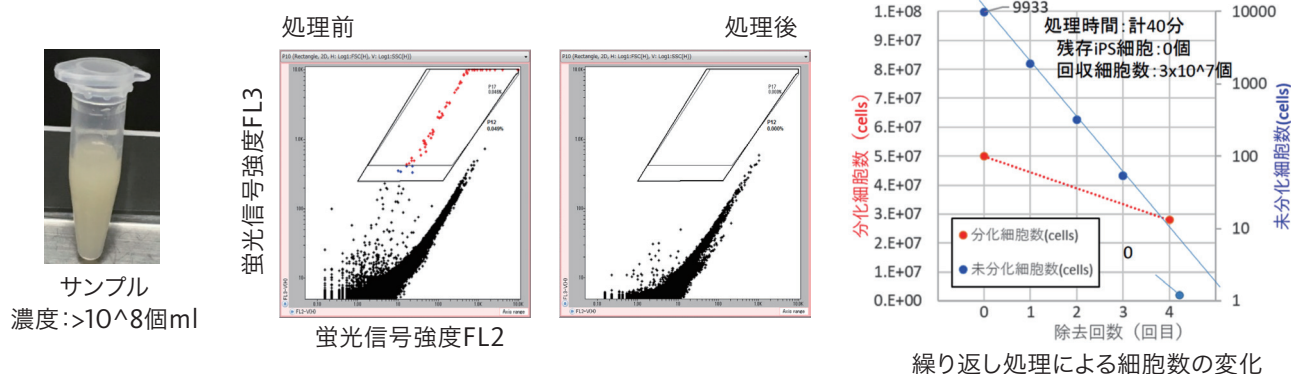


ダメージフリーのソーティングを繰り返すことにより
Circulating tumor cellsなどの超レア細胞の解析分離が可能であった。

ネガティブソーティング

■ iPS未分化細胞の除去

浮遊系培養細胞 10⁸個に対して、iPS細胞 10⁴個のスパイク試験
→廃液に対して4回の繰り返しソーティングにより、残存iPS細胞は0個となった。



ネガティブソーティングを繰り返すことにより、存在比率が低い細胞の除去に対して有効であった。

京都大学ウイルス再生研と共同研究成果(NEDO)

シングルセル培養

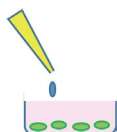
ゲノム編集細胞の選抜

■ 薬剤セクションが不要となるノックアウト細胞株樹立

CRISPR/Cas Systemを用いてトランスフェクションした細胞をOn-chip SPISにて分注した。



Transfection

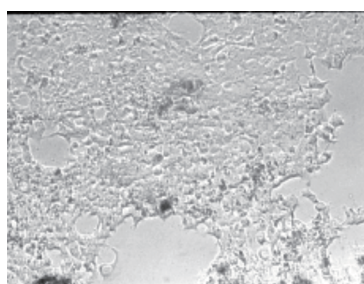


- crRNA + tracrRNA Complex
- Cas9発現HEK293

細胞培養
72hr

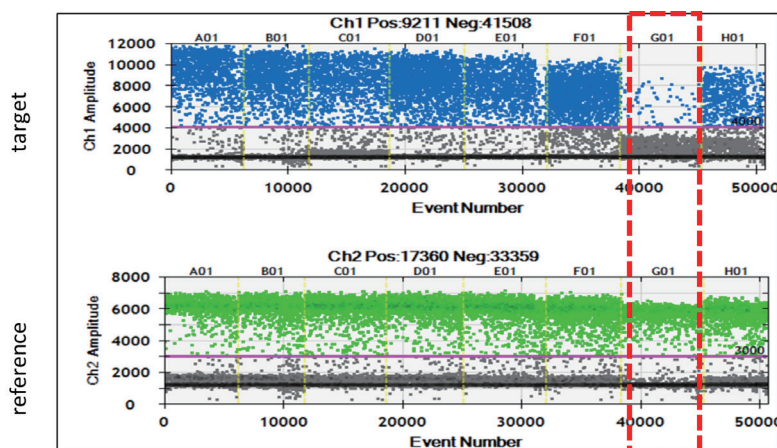


生着した細胞



増殖後細胞株(2weeks)

	撒いた ウェル数	生着した ウェル数	2週間後に 十分に増殖 したウェル数
Plate NO.	48	15	7
Plate NO.	48	12	6
Plate NO.	48	18	9
Plate NO.	48	22	6
Total	192	67	28
割合 (%)		34.9%	14.6%



2週間後細胞が十分に増殖したウェルのみddPCR (droplet digital PCR)で目的物のノックアウトを確認した。28ウェル中3ウェルでノックアウトを確認した。

本確認方法では目的配列プローブを使用してddPCRをかけて増加してこないものをノックアウトしたと判断している。

下の緑のドットがReference(BCHDKA)、上の青のドットがターゲットのプローブを使用したときの結果である。

トランスフェクション後に薬剤セクション不要でノックアウト細胞株を樹立できることがわかった。

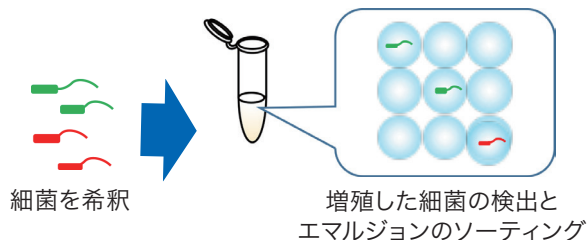
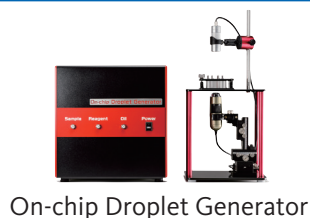
しかし生着および増殖してくるウェル数が減少することから、シングルセル培養のような少数細胞培養からの細胞増殖は培養条件の最適化が課題としてあることもわかった。

国内のお客様による実験事例

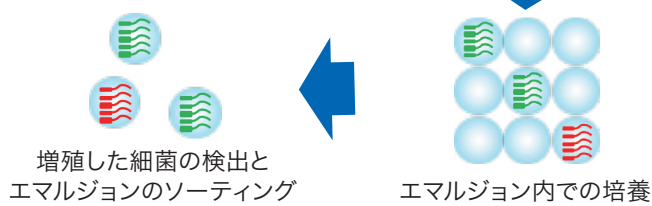
微生物叢からの分離

■ 微生物叢サンプルを用いた、エマルジョン封入から単離まで実施

1. 細菌のエマルジョンへの封入



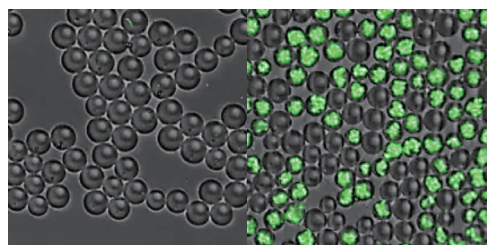
2. エマルジョン中の細菌培養とソーティング



3. 細菌封入エマルジョンの一個分注

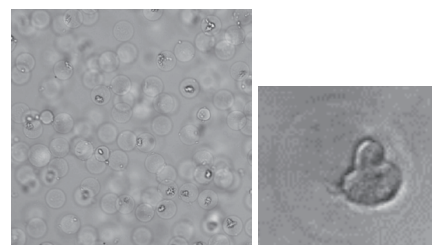


■ GFP発現大腸菌の封入と培養(ミネラルオイル)

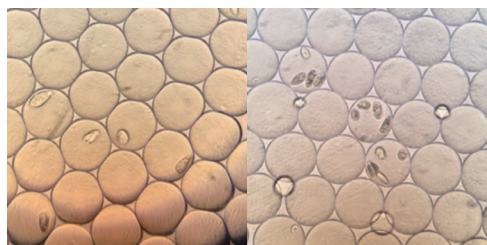


試薬
E.Coli expressing GFP in PBS + Km(approx. 1 cell in 1 droplet)
大腸菌濃度は 1x10⁶ 個 /ml に調整
Mineral oil; Span80 4.5%,
Triton X-100 0.4%
Droplet Generator;
sample/7.3kPa, sheath/9.5kPa
→ about 40μM

■ ハイドロゲルボール(大腸菌)



■ テトラヒメナの封入と培養(フッ素系オイル)※1



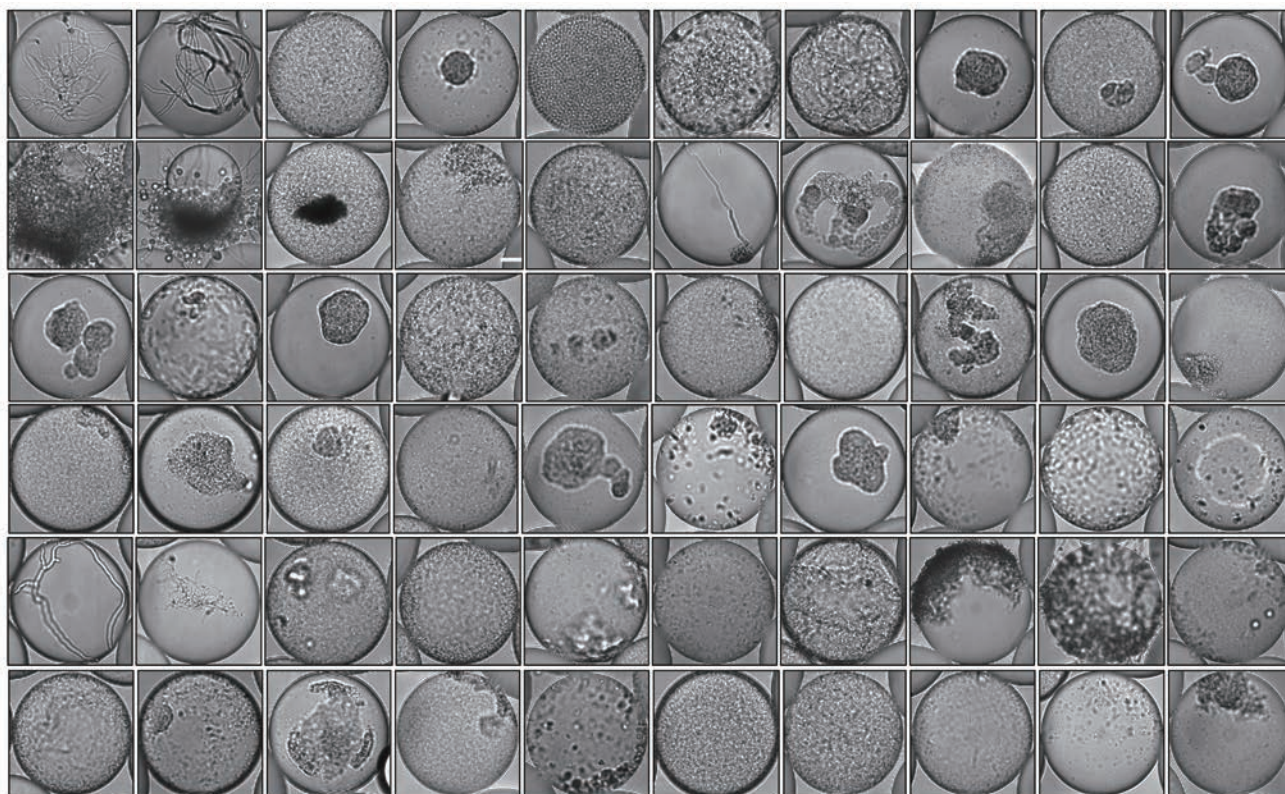
試薬
Tetrahymena in AB + penicillin
(approximately 1 cell in 1 droplet)
原生動物濃度は 1x10⁵/mL に調整
Pico-Surf(tm) 1 (2% (w/w) in Novec
(tm) 7500)
Droplet Generator; sample/7.0kPa,
sheath/11.0kPa → about 120μM

エマルジョンに微生物を封入することで単離・培養が可能であった。
ハイドロゲルボールとすることで外部から培地や物質を取り込むことも可能と思われる。

※1: サンプル提供: 筑波大学 中野先生

微生物叢からの分離

■ 土壌微生物のエマルジョン培養コレクション



2018年度戦略的イノベーション創造プログラム スマートバイオ産業・農業基盤技術の成果
長岡技術科学大学 小笠原 渉教授 本間様ご提供

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。 | 08

お問合せ先

シスメックス株式会社

日本・東アジア地域本部 R&I事業推進部

ソリューションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-991-2091 Fax 078-997-9976

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557