

研究報告書

「自然乳化を利用したマイクロ水滴内単一細胞イムノアッセイ」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2020 年 3 月

研究者: 福山 真央

1. 研究のねらい

本研究では、単一細胞分泌物の高スループット測定をめざし、マイクロメートルサイズの油中水滴(マイクロ水滴)内での、単一細胞分泌物のイムノアッセイ法の開発を目的とする。これまで、マイクロ水滴は単一細胞の分析場として注目を集めてきたが、細胞の分泌物を測定は困難だった。これは、イムノアッセイで必要となる、分析ターゲットと結合した標識分子と未結合の標識分子の分離(B/F分離)操作を、液滴内で行うことが困難なためである。本研究では自然乳化という油水界面現象をマイクロ水滴内包物の選択的濃縮法を B/F 分離に応用し、マイクロ水滴中の単一細胞イムノアッセイ法を確立することを目的とした。本イムノアッセイ法は、マイクロ水滴外部に界面活性剤を流すだけという、シンプルな操作でイムノアッセイ法の前処理が可能になる。そのため、イムノアッセイ用のシンプルなマイクロ流体デバイスをセルソーターなど既存の単一細胞分析装置に接続するだけで、これまで困難だった高スループットな単一細胞分泌物アッセイが可能になる。

2. 研究成果

(1) 概要

マイクロ水滴内イムノアッセイを実現するためには、自然乳化現象を理解・制御することが重要である。この自然乳化の現象は、19 世紀から知られている現象であるが、未だ不明な点が多くある。そのため、まず自然乳化のメカニズムの解明を目指した。具体的には、マイクロメートルサイズの空間にマイクロ水滴を閉じ込め、自然乳化中に発生するマイクロ水滴-ナノ水滴間の物質輸送を解析することで、Span 80 によって起こる自然乳化のメカニズムを解明し、マイクロ-ナノ水滴間の物質輸送の特性を明らかにした。

次に、細胞培地など高濃度のタンパク質を含むマイクロ水滴を操作するためのポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロ流体デバイスを開発した。細胞培地など高濃度のタンパク質を含む溶液でもマイクロ水滴を作製するために、新たな溶媒応答性の表面処理を開発した。その結果として、高濃度マイクロ水滴を多数同時に作成するデバイスを実現した。

そしてこの結果を踏まえ、界面活性剤種類を最適化し、自然乳化を利用したマイクロ水滴内でのイムノアッセイを確立した。本研究では数十万分子(zeptomolar程度)のタンパク質の計測が可能になった。

(2) 詳細

研究テーマ1. 自然乳化中における分子分配挙動の解析

本研究で着目する Span 80 を用いた自然乳化では、非イオン性界面活性剤である Span 80 を含む有機相に、水相を接触させると、100 nm 程度のサイズのナノ水滴が自発的に生成する。自然乳化時の水相-ナノ水滴間の水および溶質輸送を解析するために、マイクロ流体デバイス中のマイクロ水滴を用いることを着想した。マイクロ水滴は比表面積が高いため自然乳化による微量の物質輸送を観察するのに適している。また、マイクロ流路中の流体はレイノルズ数が低く安定な層流を形成するため、再現性の高い実験を行えると考えた。図 1a のように PDMS 製のマイクロ流体デバイス中に 100 – 200 μm サイズのマイクロ水滴をアレイ状に配置し、マイクロ水滴のサイズ変化および蛍光強度変化などを観察した。その結果、水相からミセルやナノ水滴への水の分配の駆動メカニズムおよび、マイクロ水滴-ナノ水滴間の溶質分配のカイネティクスが明らかになった (図 1b)。また、これらの研究結果をもとに、定倍率濃縮が可能になり、タンパク質定量や分子間相互作用観察を実証した。

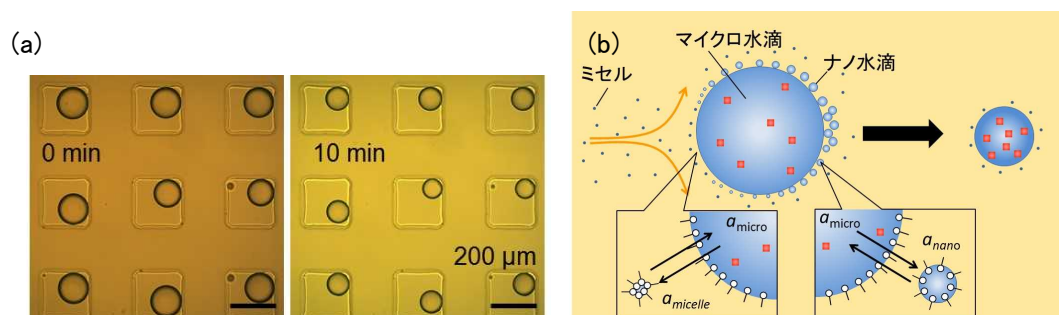


図 1 マイクロ水滴アレイを用いた自然乳化における分子輸送メカニズム解析。

- (a) マイクロ水滴アレイの顕微画像。Span 80 を含むヘキサデカンを連続相として流すと、自然乳化に伴いマイクロ水滴が縮小した。(b) 自然乳化中の水分配メカニズム。

研究テーマ2. 細胞操作用マイクロ流体デバイスの開発

本システムを 1 細胞解析に応用するにあたり、細胞培養のための培地を用いてマイクロ水滴アレイを調整する必要があった。しかし、培地は高濃度のタンパク質を含む水溶液であり、タンパク質が PDMS に吸着し PDMS デバイス壁面を親水化するため、マイクロ水滴アレイの調整が難しかった。そこで本研究ではポリエチレングリコール鎖を PDMS に修飾することで、溶媒応答性界面を持つ PDMS デバイスを初めて開発し、これを用いて培地中の細胞を閉じ込めたマイクロ水滴アレイの作製を実証した (図 2)。

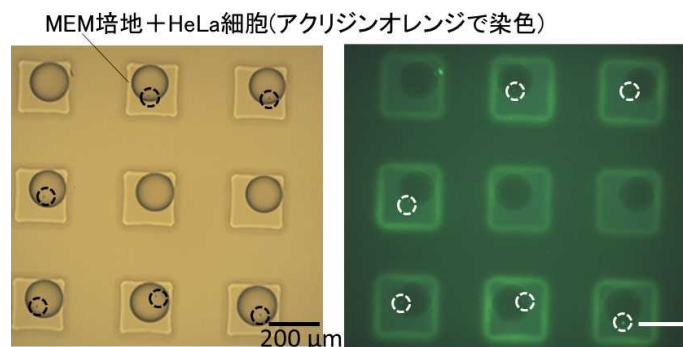


図 2 溶媒応答性界面を持つ PDMS デバイスで調整した 1 細胞入りマイクロ水滴アレイ

研究テーマ3. 1 細胞解析に向けたマイクロ水滴内イムノアッセイ法の確立

本研究以前では、抗体などのタンパク質を自然乳化で生成したナノ水滴に抽出することは難しかった。本研究では界面活性剤種類を検討し、有機相中へのアニオン性界面活性剤の添加により、タンパク質をナノ水滴への抽出しうる条件を見出した。この結果を踏まえ、蛍光色素を修飾した抗体と粒子を修飾した抗体のサンドイッチイムノアッセイ系を用いて、マイクロ水滴中のイムノアッセイを実証した。本手法では、およそ数十万分子の検出を実証した。

3. 今後の展開

本研究では、界面現象に基づく B/F 分離法を利用し、マイクロ水滴内でのイムノアッセイを可能にした。本プロジェクトではタンパク質の定量を実証したが、今後エクソソームなどの分子集合体や核酸などの検出・定量も可能になると考えている。

現在、世界中でマイクロ水滴を用いた 1 細胞解析法が盛んに報告されている。これらの技術ではマイクロ構造を用いたマイクロ水滴操作が必要であり、それによりスループットが決まっている。一方で、本手法マイクロ構造不要の化学操作である。現段階では蛍光検出を用いるため細胞のソーティングにマイクロ構造が必要であるものの、今後、水相/ミセル間の分配機構を適切に調節することで、試薬添加やナノ構造体の除外など、様々な操作を可能とし、マイクロ構造フリーの 1 細胞解析技術を実現したいと考えている。

4. 自己評価

本研究では、細胞の生存率が極めて低い界面活性剤条件ではあるが、マイクロ水滴内でのイムノアッセイを実証した。研究を推進する上で、細胞培養設備およびマイクロファブリケーション設備を整え、更にセルソーターを購入した。また、消耗品としては主に細胞培養用の器具やイムノアッセイ用試薬、界面活性剤を購入した。さらに、研究補助者を雇用し研究の加速を図った。その際も小さな発見を見逃さないように注意を払い、界面活性剤の前処理操作の検討より当初計画にはなかった自然乳化における水輸送メカニズム解明も成し遂げた。また、溶媒応答性 PDMS の調整技術は、タンパク質吸着抑制としての利用目的で問合せが多く、試料提供を行っている。研究者の当初の意図とは違った観点より技術が広がっている。また、本研究により可能となったマイクロ水滴内イムノアッセイは、再生医療分野の細胞の品質管理などに応用されていくと期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mao Fukuyama, Manabu Tokeshi, Mikhail A. Proskurnin, Akihito Hibara

“Dynamic wettability of polyethylene glycol-modified poly(dimethylsiloxane) surfaces in an aqueous/organic two-phase system”

Lab on a Chip, 2018, 18, pp. 356–361.

2. Mao Fukuyama, Akihide Hibara, Yumi Yoshida, Kohji Maeda
“Kinetic Switching of the Concentration/Separation Behavior of Microdroplets”
Analytical Chemistry, 2017, 89 (17) pp. 9279–9283.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 福山真央、火原彰秀
発明の名称: マイクロ水滴内イムノアッセイ
出 願 人: 東北大学
出 願 日: 2017/5/12
出 願 番 号: 2017-095672

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(招待講演)

1. 福山真央, 吉田裕美, 前田耕治, 火原彰秀
「ナノ水滴生成を利用したマイクロ水滴内包物の分析前処理操作」
日本分析化学会第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月.
2. 福山真央
「Sample pretreatments for droplet microfluidics by using nanodroplet formation」
日本化学会第 98 回春季年会, 2018 年 3 月
3. 学会発表(招待講演)
福山真央, 火原彰秀
「自然乳化を利用したマイクロ水滴分析操作の開発」
日本分析化学会第 68 年会, 2019 年 9 月

受賞

1. 平成 30 年度化学とマイクロ・ナノシステム学会若手優秀賞受賞
「界面化学に基づく選択的濃縮法の開発とその応用」
2019 年 5 月

プレスリリース

1. 「細胞一つ一つの個性を解明する分析技術を開発」
2017 年 5 月 社団法人日本分析化学会