

～シングルセルゲノミクスでの活用～

細胞分注における課題

ライフサイエンス分野では、空圧式や電磁バルブ式のディスペンサーが多く使われており、それらによる細胞の分注も行われています。

しかし、細胞が含まれる懸濁液の分注には制約があり、そのまま分注するだけでは1滴中に1つの細胞を入れて分注することは実現できません。

実現するための方法として、事前に細胞懸濁液の濃度を調整し、確率的に1滴中に1つの細胞が入るようにして分注する手法があります。これは限界希釈法と同じ考え方であり、確率的に狙った数の細胞を分注することが実現できますが、**安定的に細胞を取り分けることが難しい**という課題があります。

特に細胞をシングルセルとして分離する用途においては、上記のような確率的手法では細胞をウェルプレートに分離すると、分注後にすべてのウェルを顕微鏡などで観察して細胞の数を確認する必要があります。観察方法によっては、1つの細胞を見つけるのが困難であり、数日間の培養後に形成されるコロニー状態からシングルセルで分注できたかどうかを判断する必要があるなど生産性に問題があります。

上記のように細胞懸濁液をそのまま分注する手法での課題は、**分注される液滴の中に入っている細胞数が制御できない**点です。それに対して、これから紹介する「**インクジェット技術**」を応用した分離方法は、画像解析を活用することで1滴に1つの細胞を入れた状態で分注を実現することが可能です。

インクジェット技術について

インクジェット技術とは、 piezo（圧電）素子の変位により小さな液室の中に圧力波を発生させ、それにより超微量な液滴を高速でOn-Off吐出する技術です。

「インクジェット技術」と聞いて、最初にオフィスや家庭で使用しているカラープリンタをイメージされたのではないのでしょうか。確かに、インクジェットプリンタは、1984年にHP社がPC用途として量産を開始してから既に35年以上が経過し、今では幅広く普及しています。

そして現在、このインクジェット技術はカラープリンタの領域を超え、回路描画やライフサイエンス分野、さらに3Dプリンティングによる3次元構造物の造形にまで応用が進んでいます。各分野で使われているインクジェット技術はそれぞれ中身が大きく異なっていますが、共通したインクジェット技術の特徴として下記が挙げられます。

インクジェット技術の特徴

- ピコリットルの微小液滴を高速・大量に生成
- 液滴を1滴ずつ自在にOn-Off制御
- 対象物へ非接触で微小液滴を着滴

では、カラープリンタに使われているインクジェット技術と、各分野で使われているインクジェット技術とは、何が異なるのでしょうか。それは、液滴を形成するインクジェットヘッドと呼ばれる心臓部の構造や性能です。カラープリンタに使われているインクジェットヘッドは、カラーインクで安定して印刷することを目的に最適化されていますが、ライフサイエンス分野で扱う試薬などを安定して分注することを想定しておらず、また細胞懸濁液を扱う場合にはノズル詰まりが発生するなど、課題が多く存在します。

本書では、上記課題を解決したライフサイエンス用のインクジェットヘッドを用いて、細胞を1つずつ分注操作する技術と、その応用事例として細胞株開発を取り上げていきます。



Figure 1. インクジェット液滴飛翔状態

インクジェット法によるシングルセル分注

インクジェット技術は生成される液滴が「ピコリットオーダー」、かつ「ばらつきが少ない」特徴があります。

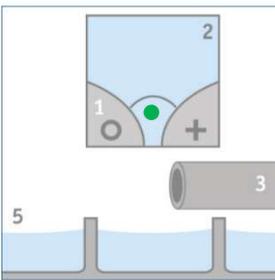
そのため、液を吐出するノズル先端部において、毎回特定の領域内にある液を吐出することが可能です。この特徴を活かして、まずはノズル先端部の細胞状態をカメラにより画像解析し、次に吐出される液の領域内に何個の細胞が入っているかを確認します。そして、細胞が1個のみ存在するときにはそのまま分注を行い、細胞が無い、あるいは2個以上入っている場合には液滴の飛行中に回収することで、結果として、細胞が1個のみ含まれる液滴をウェルプレートなどに分注することが可能になります。

この分注プロセスにより、細胞が1個のみ含まれる液滴を選択的にウェルに分注することが可能になります。また、この分注プロセスはすべて画像として記録され、各ウェルプレートに対して、どのような細胞が分注されたかを画像で確認が可能です。

シングルセルを必要とする細胞株開発やシングルセルゲノミクスの分野において、分注後、培養や解析を行う細胞が1つであることの証明は必須であり、本手法は取得された画像によりそれを実現することが可能です。最終的にはウェルプレートに分注された細胞を確認する必要がありますが、培養前後において簡易的に細胞数を確認できるため、実験効率を向上させることができます。

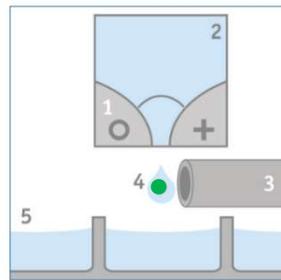
CASE 1. 液滴に細胞が1個のみ含まれる場合

STEP. 1



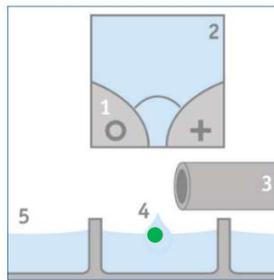
細胞懸濁液の充填後、カートリッジ先端領域の細胞数を確認、細胞のサイズと真円度を画像解析により計測

STEP. 2



細胞が指定されたサイズと真円度の範囲内に収まっているとき、対象のウェルに対して細胞懸濁液を分注

STEP. 3

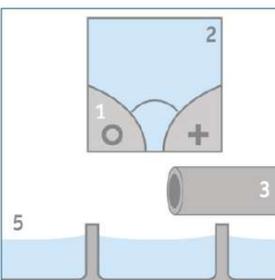


指定されたウェル内に細胞を1個含む液滴が着滴

1. カートリッジ (ノズル先端部)
2. 細胞懸濁液
3. 空圧式シャッター (液滴回収機構)
4. 分注された液滴
5. ウェルプレート

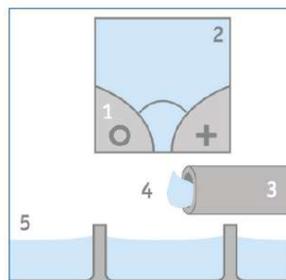
CASE 2. 液滴に細胞が含まれない場合

STEP. 1



細胞懸濁液の充填後、カートリッジ先端領域の細胞数を確認、細胞が領域内に含まれないことを確認

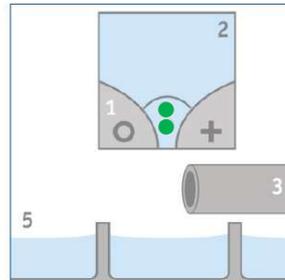
STEP. 2



飛行中の液滴を空圧式シャッターにより吸引

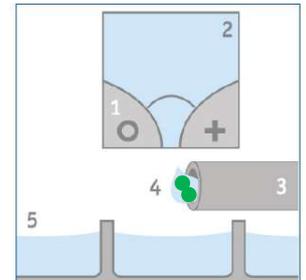
CASE 3. 液滴に細胞が2個以上含まれる場合

STEP. 1



細胞懸濁液の充填後、カートリッジ先端領域の細胞数を確認、細胞が2個以上含まれることを確認

STEP. 2



飛行中の液滴を空圧式シャッターにより吸引

シングルセルゲノミクス分野での活用

近年、シングルセル解析のための機器や環境が充実したこともあり、がん研究や免疫学などの幅広い分野において、シングルセル解析が急速に採用されています。

このシングルセルゲノミクス分野においても、シングルセルの分離は困難な課題となっています。現在採用されている分離手法では、解析対象のウェル内において1細胞のみが分離されたことを示すための十分なエビデンスを得ることができないケースが多く存在します。また、解析対象のDNAを保持するためには、溶解前に細胞の完全性を維持することが不可欠であり、細胞はRNAや発現量を維持するためにはできるだけ負荷をかけず分離する必要があります。

従来手法の課題

フローサイトメータなどによる分離手法では、事前に染色するプロセスをはじめ細胞分離の過程における細胞への負荷が大きく、また細胞と一緒に分注される液滴の体積が多いため、解析への影響などが懸念されます。負荷が少ないとされる限界希釈法においても、シングルセルの分離効率が悪いという課題があります。また、それぞれの手法において分離された細胞が1個であることを視覚的に確認することができないため、基本的には分注後のウェルプレートでのイメージングが必要になるなど分離プロセスにおける工数が多くなってしまいます。

分離実績のある細胞

下表にて、分離実績のある代表的な細胞を示します。

インクジェット分離によるメリット

インクジェット法と画像解析を応用した細胞分離手法では、分注に必要な最小限の圧力印加のみでシングルセルを分離することが可能です。シングルセルの分離成功率はおおよそ90%以上であり、より効率的な実験を実現することができます。

また蛍光マーカーに基づいて細胞分離することも可能であり、死細胞を除外したり、亜集団を標的にすることができます。

各ウェルへの分注時に取得された画像により、シングルセルが分注されたことを簡易的に確認でき、また分離された細胞の大きさ、真円度、蛍光強度など細胞の形態も記録できるため、必要に応じてシーケンスデータなどと結びつけて解析に活用することが可能です。

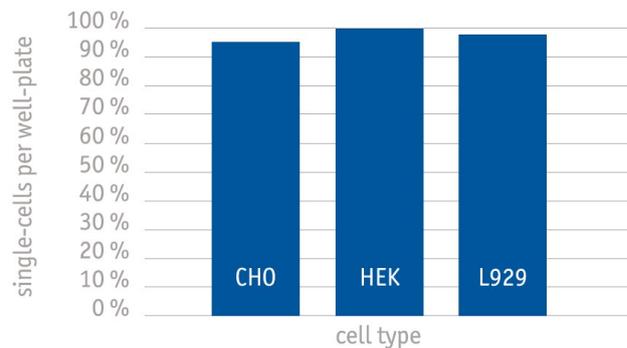


Figure 2. シングルセル分離の成功率

細胞株開発で使用されるCHOやHEK293を始め、複数細胞での実績があります。

ヒト癌細胞株	ヒト由来細胞株	ヒト由来初代細胞	動物細胞株
NCI-H460 (non-small cell lung)	B-cells	fibroblasts	CHO-K1
A549 (non-small cell lung)	T-cells	keratinocytes	RBL
HCT-116 (colon)	HEK 293		L929
MDA-MB-231 (breast)	iPS		SP2/0-Ag14
U-2 OS (human osteosarcoma)			NIH-3T3
HeLa (cervix adenocarcinoma)			
Ca Ski (cervix epidermoid carcinoma)			
SiHa (cervix squamous cell carcinoma)			
C-33 A (cervix carcinoma)			
Jurkat (Acute T-cell Leukemia)			
Kasumi-1 (human myeloblast)			
THP-1 (Acute Monocytic Leukemia)			
Raji (Burkitt's Lymphoma)			

Figure 3. 分注後の増殖が確認された細胞

Appendix : インクジェット式シングルセル分注機 “x.sight”

これまで紹介した分離技術を搭載したインクジェット式シングルセル分注機 “x.sight”には、蛍光機能の有無により2種類のラインナップがあります。

細胞分離に必要な機能を、1つの装置にコンパクトにまとめたオールインワン装置となっており、安全キャビネット内にそのまま設置することができます。

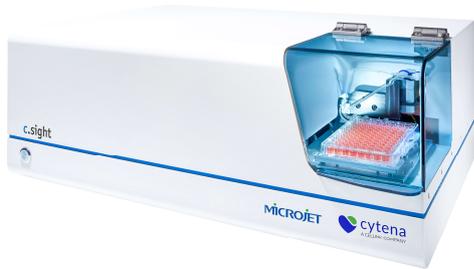


Figure 4. シングルセル分注機 “x.sight”シリーズ標準タイプ “c.sight”



Figure 5. シングルセル分注機 “x.sight”シリーズ蛍光機能付きタイプ “f.sight”

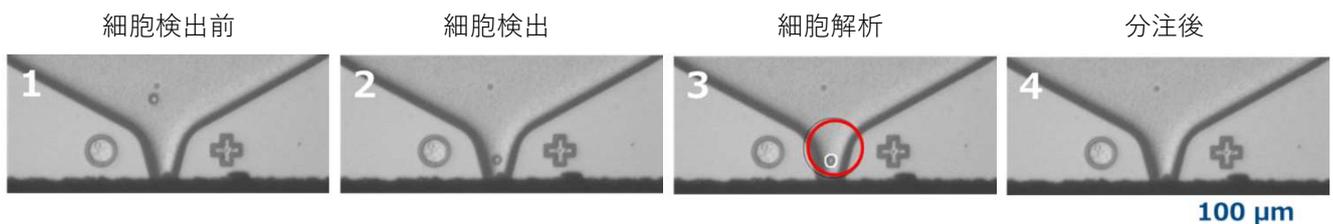


Figure 6. シングルセル分注時の記録画像

シングルセル解析のための付加機能

シングルセル解析と次世代シーケンス(NGS)ライブラリ調製において、効率的なシングルセル分離と使用するPCRプレート内への正確な分注は重要です。今回紹介するシングルセル分注機 “x.sight” (cytena社製)には、細胞を各ウェル中央に着滴させるための自動オフセット補正(AOC)機能が搭載されています。これによりウェル底面への正確な分注を実現できるため、1µL以下のバッファーでの細胞溶解も可能になります。

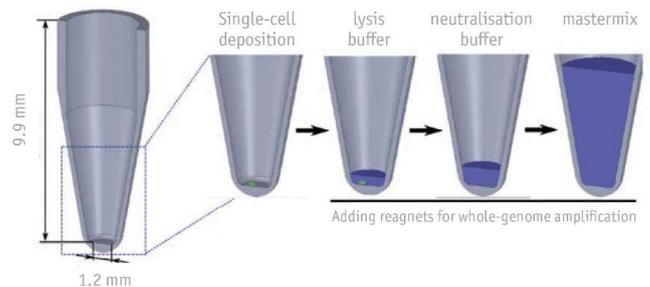


Figure 7. 自動オフセット機能による微量バッファー内への分注

装置特徴	<ol style="list-style-type: none"> 1. 96ウェルに3~7分で分注し、注入確率は90%程度 2. 標準・PCRタイプの96、384ウェルに対応 3. 滅菌処理ディスポカートリッジ採用により洗浄不要 4. 10分以内でセットアップや細胞液の交換が可能 5. インクジェット法により細胞への負荷を大幅に低減 	用途例	<ul style="list-style-type: none"> • 細胞株開発 • シングルセルゲノミクス
------	--	-----	--

※ 本製品はドイツcytena社とのコラボレーション製品です
 ※ 液種により安定吐出できない液があります
 ※ 分注時間は細胞種類や濃度により異なります

Company Profile

社名	株式会社マイクロジェット
URL	www.microjet.co.jp
設立	1997年9月
代表取締役	山口 修一
本社	長野県塩尻市大門五番町79-2
東京支社	東京都国分寺市南町3-11-17 尾崎ビル2階
事業内容	<ul style="list-style-type: none"> • インクジェットの産業応用の研究開発支援 • バイオ、エレクトロニクス、3Dプリンタ分野の研究開発用機器の開発 • インクジェット試験、評価、工法開発の受託 • 技術コンサルティング • 技術セミナーの開催 • 技術専門書籍の企画・販売
事業沿革	<p>ライフサイエンス分野</p> <p>2009年 自社製バイオ用ピエゾインクジェットヘッド GlassJet販売開始</p> <p>2010年 バイオ研究開発用インクジェット装置 BioPrinter販売開始</p> <p>2014年 世界初バイオチップ製造用インクジェット装置 NanoJet販売開始</p> <p>2016年 インクジェット式1細胞分離装置 SingleCellPrinter販売開始</p> <p>2017年 ディスポーザブルピエゾインクジェット PipeJet販売開始</p>
受賞歴	<p>2015年 「nanotech大賞2015 日刊工業新聞社賞」 受賞：nanotech展主催</p> <p>2016年 「はばたく中小企業300社」 受賞：経済産業省主催</p> <p>2017年 2017年度「蔵前ベンチャー賞」 受賞：一般社団法人蔵前工業会主催</p>