



## Microfluidic chip based flow cytometer

### On-chip Flow

世界初のフローセル交換型フローサイトメーター

### On-chip Sort

微量、無菌、ダメージフリーで細胞を分離!

株式会社 オンチップ・バイオテクノロジーズ

〒184-0012 東京都小金井市中町2-24-16  
農工大・多摩小金井ベンチャーポート 204号室  
TEL.042-385-0461 FAX.042-385-0462



東京都ベンチャー技術大賞  
優秀賞 受賞



## マイクロ流路チップ フローサイトメーター/セルソーター On-chip Flow / On-chip Sort

On-chip Biotechnologiesは、これまでの細胞分離では不可能なことに挑みました。ソーティング操作が細胞に与えるダメージを払拭し、バイアビリティを残したままクロスコンタミネーションの心配なしに細胞を単離する、という目標です。

また、細胞毎に最適な液体をシース液に選択し、植物細胞や海洋微生物、原生生物等も扱える解析装置として、フローサイトメーターの利用領域を拡大する、という目標です。

最小限の圧力で細胞を操作することに加え、マイクロ流路チップの改良や処理速度を向上させ、どこまでもコンパクトでありながら、使う人の安全性をとことん追求した、世界初のフローセル交換型製品が、On-chip Flow/ On-chip Sortです。

### —ダメージ無く細胞を分離

- 無菌、コンタミネーションフリーな細胞分離
- スフェロイドやオイル中のエマルジョンも分離解析可能
- サンプルの繰返しソーティングが可能
- 小型。簡便な操作性、バイオハザード対応



## マイクロ流路技術 ディスポーザブルチップ 無菌、コンタミネーションフリー

On-chip Flow用のチップ、On-chip Sort用のチップを揃えています(図1)。それぞれは滅菌処理済みのチップと、無処理のチップを選択することが可能です。チップはアクリル製の樹脂で、5.5cm×4.0cmの基板に幅80 $\mu$ m、深さ50~80 $\mu$ mの流路が加工形成されています。流路系の全てはこの交換型のマイクロチップ内にあり、サンプル間のコンタミや装置へのコンタミはありません。装置の小型化により安全キャビネット内に設置することが可能で、ソーティング時にエアロゾルも発生しないため安全です(図2)。

細胞解析・分離用チップ



細胞解析・分離用大容量チップ



図1. 使い捨てマイクロ流路チップ



図2. BSC内へ設置されたOn-chip Sort

## 光学系技術

マイクロ流路は、両側からのシース流でサンプル流の流れ幅を10 $\mu$ m以下に絞り込み、サンプル流路内を細胞一個ずつ流す構造となっています。

マイクロチップの上部からレーザーを照射して、前方散乱光(FS)はチップに対して垂直方向に、側方散乱光(SS)は流路の側面方向へチップ基板を透過する散乱光を端面で下方に全反射させ検出器により検出します(図3)。

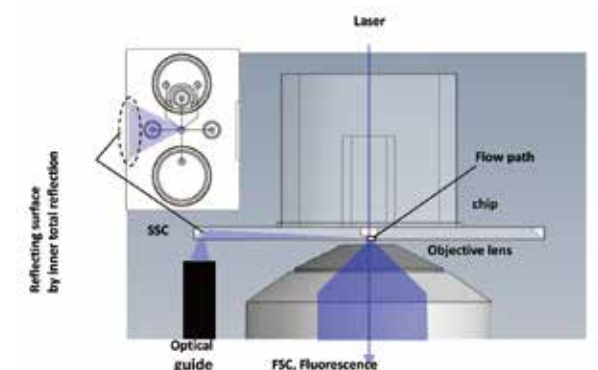


図3. 散乱光の検出



## 送液技術 流路制御とシース液・サンプル液の幅広い選択が可能

送液は空気加圧方式をとり、流路内へのサンプル液やシース液を非接触的に送液します(図4)。

本送液方法ではOn-chip Sortを用いたソーティング時には、目的細胞はサンプル回収リザーバーに集められます。また、On-chip Flowを用いた解析でも、測定後のサンプル液は廃液リザーバーに回収されるように設計されています。

また、マイクロ流路の流れを制御する分離方法の採用により、シース液やサンプルバッファーを多様に選択することが可能になりました。

シース液・サンプルバッファーに培養液やオイルを用いることも可能です。

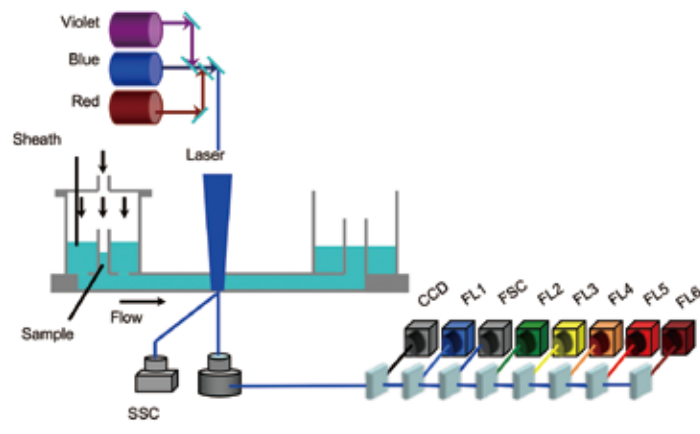


図4. マイクロ流路チップの送液方法

## ソーティング技術 ダメージフリーソーティングを実現

従来のセルソーターでは、細胞分離時に細胞は液面への衝突等により大きなダメージを受けます。On-chip Sortでは細胞はマイクロ流路を空気圧により移動します。目的の細胞を分取する時には、ソーティングリザーバーとコレクションリザーバーのバルブを高速開閉し、短時間のPush & Pullのシフトの流れを発生させ、このシフトの流れによって目的の細胞を分取用流路に流し込み回収します(図5)。

流速は空気圧によって調整することが出来ます。

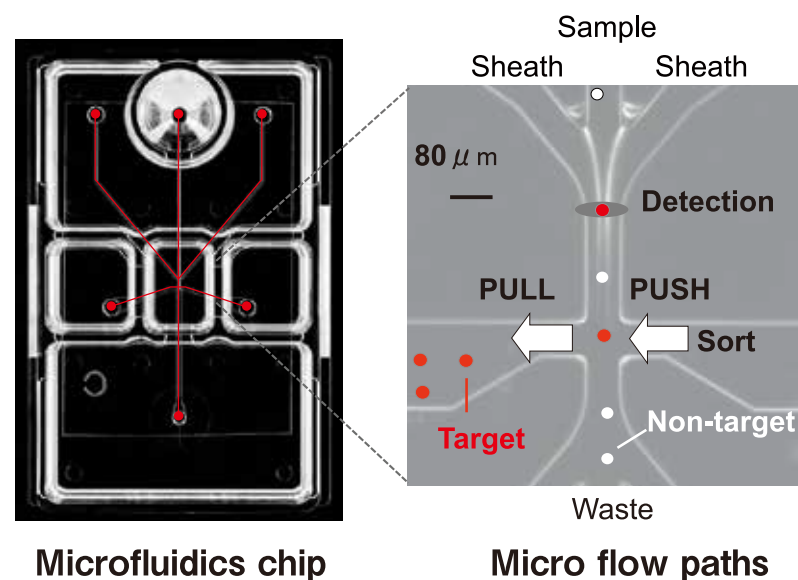


図5. ソーティング原理

## 簡単操作、メンテナンスフリー

ディスプレイマイクロ流路チップを使用するため、煩雑な装置の洗浄を必要としないメンテナンスフリーを実現しました。マイクロ流路チップをホルダーに装着した後にシース・サンプル液を充填して上蓋をすることで閉鎖系となります。使用後はチップを捨て、装置の電源をオフにするだけです(図6)。ドロップレット形成や電極によるソーティング方法を取らないので、設定も簡単です。



チップを用意 試料を充填 ホルダーにセット 装置に設置 ソーティング/アッセイ

図6. マイクロ流路チップを使用して、簡便に閉鎖系実験をおこなうことが可能

## On-chip FlowからOn-chip Sortへの機種拡張性

On-chip Flowは細胞分離用の各種モジュールを追加することでOn-chip Sortへのアップグレードが可能です(図7)。

免疫学や細胞生物学では、フローサイトメーターによる細胞の性状解析にとどまらず、目的細胞を分離・分取して更なる解析をおこなう必要性が増えています。On-chip FlowはOn-chip Sortへのアップグレードや、レーザー、検出器の追加を行うことで研究の流動性に合わせて、実験設備を整備していくことが可能です。

また、On-chip Flow / On-chip Sort は、導入後でも以下のアップグレードが可能です。

### 【レーザーの追加】

On-chip Flow/ On-chip Sortのレーザーは、最大3本になるまで追加搭載することが可能です。搭載可能レーザーは、Blue(488nm or 473nm)、Violet(405nm)、Green(561nm)、Red(637nm)から最大3種類です。また、588nm、785nm等をカスタマイズで搭載することも可能です。

### 【検出器の追加】

On-chip Flow/ On-chip Sortに、蛍光検出器は最大6本になるまで追加搭載することが可能です。

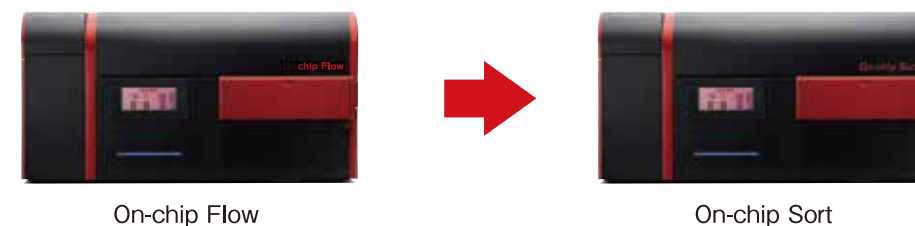
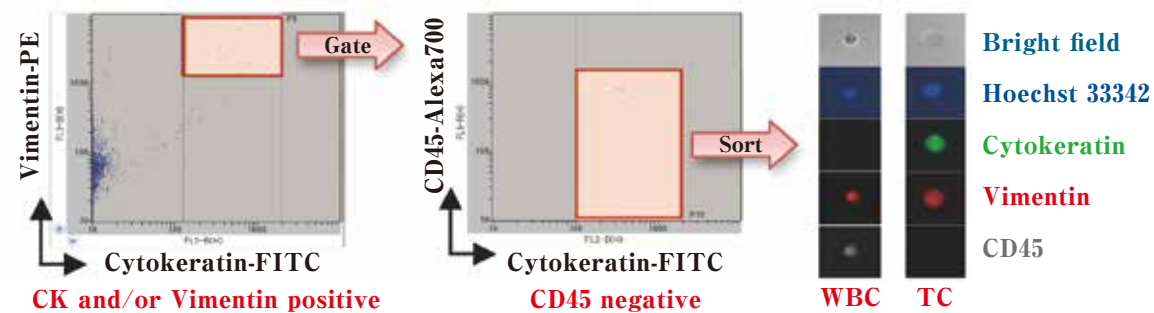


図7. 装置の拡張性

## 1. On-chip SortによるCirculating Tumor Cell (CTC)の解析

がんの転移・浸潤には上皮間葉移行(EMT#)が深く関わっている。そのため上皮系細胞のマーカーと間葉系マーカーの一つであるVimentinによるCTCの検出系を開発した。さらに、がん患者臨床サンプルから回収されたCTCを用いて遺伝子変異を検出することも可能となった。

# EMT(Epithelial-Mesenchymal Transformation上皮間葉転換)上皮細胞がその細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い、遊走、浸潤能を得ることで間葉系様の細胞へと変化する事。

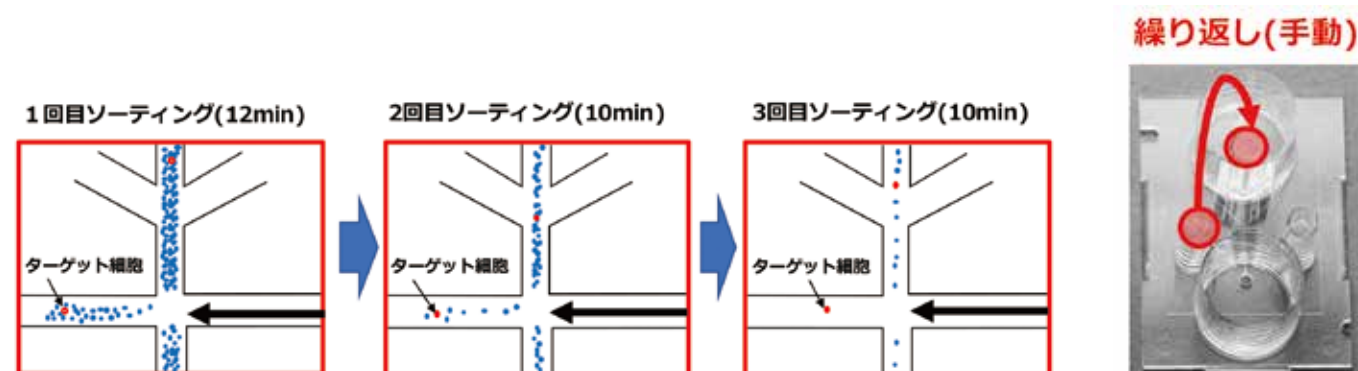


Collaboration with Dr. Watanabe, Shizuoka Cancer Center Research Institute.

## 2. 繰り返しソーティングによる希少細胞の回収

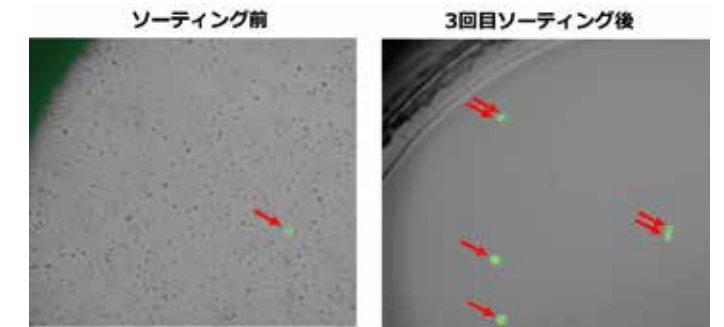
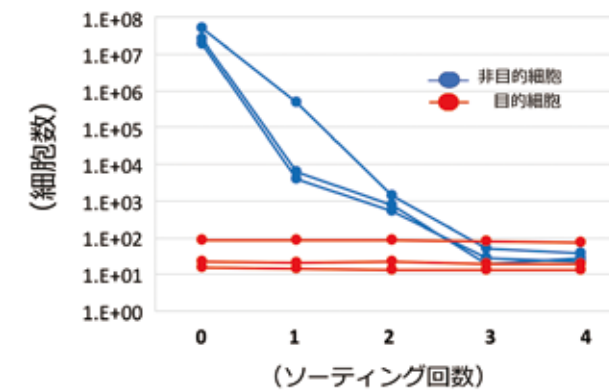
On-chip Sortのダメージフリーソーティング技術と、特徴的なマイクロチップ型流路を用いると、サンプルの繰り返しソーティングが可能となる。

繰り返しソーティングは、これまでのフローサイトメーターの概念を覆す方法であり、高濃度サンプルから少数ターゲット細胞を短時間で高確率に回収することを可能とする。1回目のソーティングで目的細胞を低純度に回収し濃縮する。回収した細胞を再度サンプルポートに入れてソーティングを繰り返すことで最終的に容易に目的細胞のみを回収することができる。



2D Chip-Z101は、 $1 \times 10^7$ 個中のわずか数十個の細胞の回収を可能とする。1回のソーティングに約10分必要とし、3回繰り返しソーティングは30分程度でおこなえる。

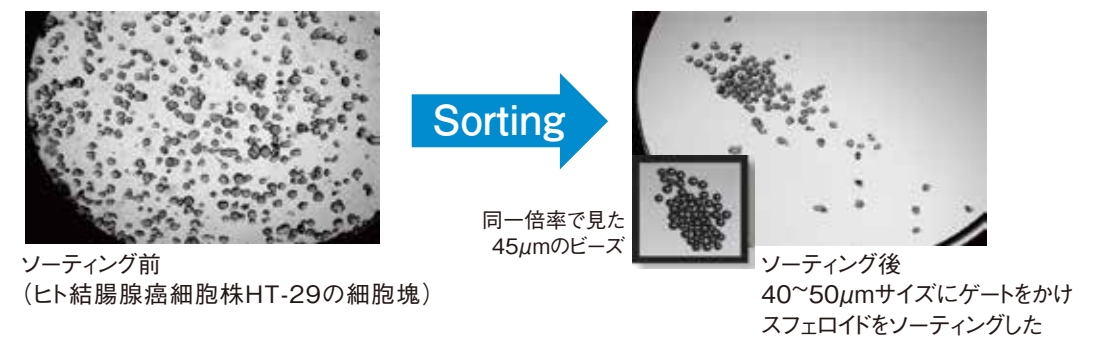
## 2D Chip-Z101繰り返しソーティングによるレアセル回収



溶血した血液細胞中に存在する極く僅かな細胞を特異的に蛍光染色し(左図)繰り返しソーティングを実施した。繰り返しソーティング3回後の顕微鏡観察でターゲット細胞のみが高純度で回収できていることがわかる。

## 3. On-chip Sortによるスフェロイド(細胞塊)のサイズ別ソーティング

がん治療における薬効評価にはスフェロイド(細胞塊)を用いて薬剤感受性を見ることが重要である。薬剤の標的培養細胞や臨床材料からスフェロイドの大きさを揃えることを目的に、On-chip Sortにより一定のサイズのスフェロイドをソーティングすることが出来る。



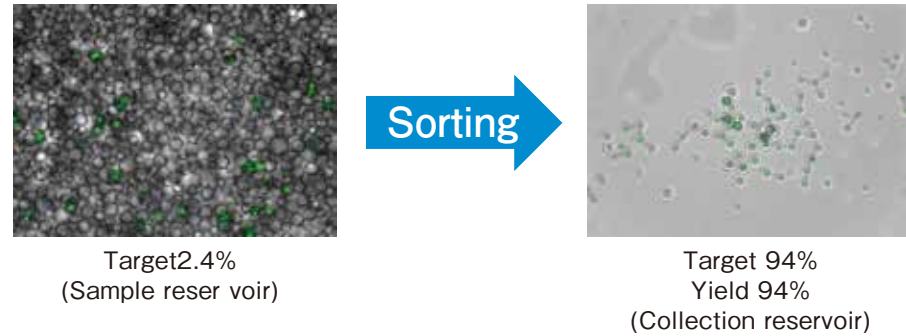
ソーティング前  
(ヒト結腸腺癌細胞株HT-29の細胞塊)

ソーティング後  
40~50μmサイズにゲートをかけスフェロイドをソーティングした



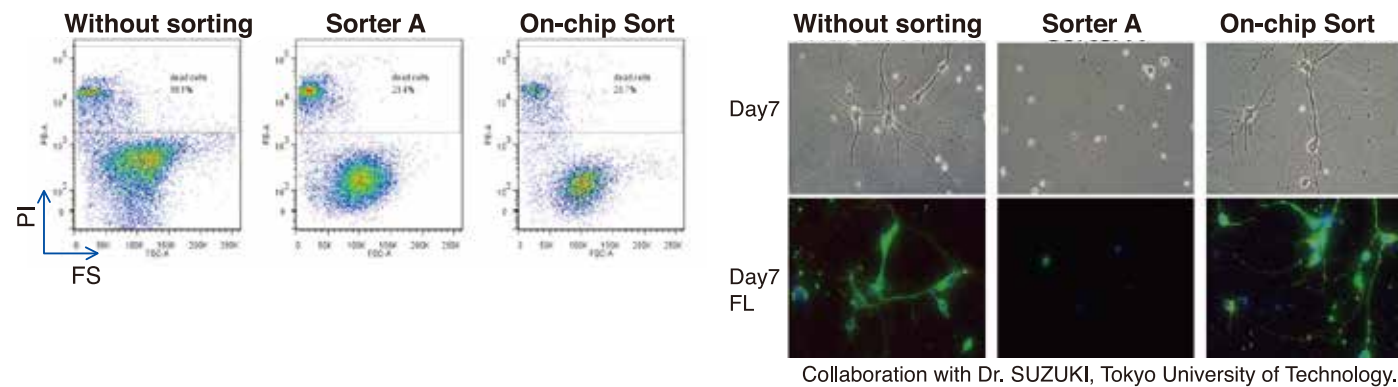
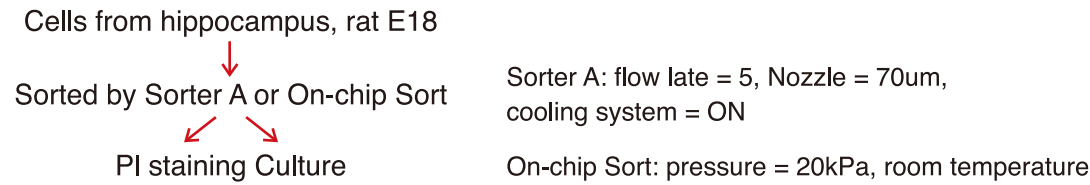
## 4. オイル中の液滴ソーティング

On-chip Sortはシース液にオイルを用いることが出来る為、オイル中の液滴(water in oil (w/o))をソーティングすることが可能となる。実験例は液滴に蛍光ビーズを入れて、蛍光ビーズの入った液滴のみをソーティングした。通常のFCM/セルソーターはシース液にオイルを用いることが出来ない為、液滴をソーティングする為にはwater in oil in water (w/o/w)のダブルエマルジョンを作製しなければ出来ない。



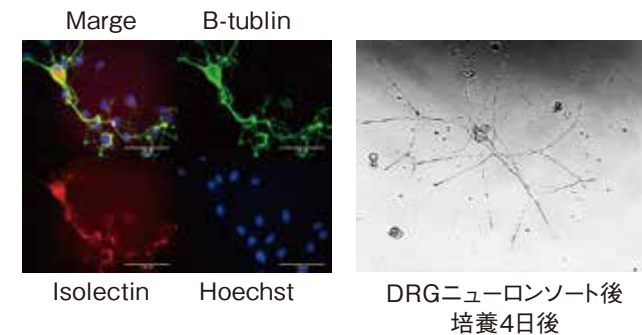
## 5. ラット胎児脳の海馬をOn-chip Sortでダメージフリーソーティング

海馬はストレスに弱い細胞で、通常のJet in Air方式のソーターとOn-chip Sortのそれぞれでソートし、得られた細胞を培養下で観察した。従来方式のソーターでソートした細胞はほぼ死滅したが、On-chip Sortで分離した細胞は神経軸索を伸長させる能力を見せた。



## 6. DRGニューロンのダメージフリーソーティング

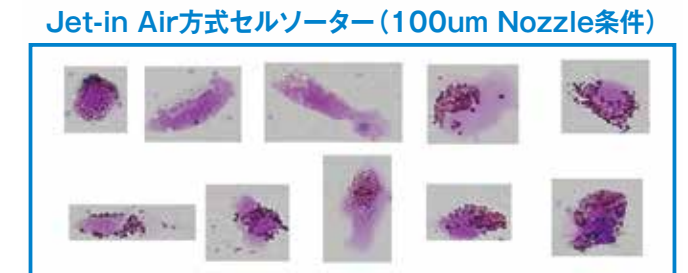
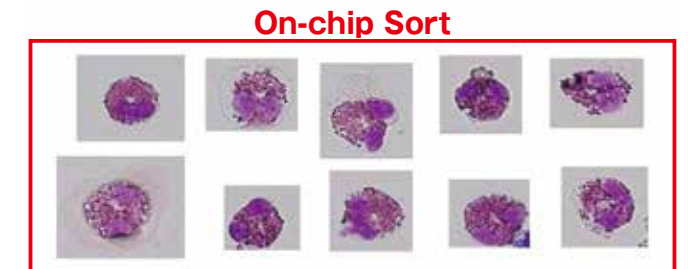
感覚ニューロン(求心性ニューロン)の細胞体(DRGニューロン)は脊髄後根神経節(DRGs)に存在している。DRGニューロンをヘテロな細胞集団から培養液(Neural Basal Media)をシース液として使用し、On-chip Sortを用いてソーティングした。第一段階として細胞の大きさに基づいてソーティングを行い5日間培養し、 $\beta$ -チューブリンIII( $\beta$ -tubulinIII)、シナプトフィジン(Synaptophysin)で染色しDRGニューロンであることを確認した(下図左)。第二段階として、ペプチドニューロンと称されるisolectin B4 (IB4) ポジティブのDRGニューロンのみソーティングを実施し4日間培養した結果、神経突起の伸長が確認されDRGニューロンがダメージ無くソートされた事が確認できた(下図右)。



Collaboration with Dr. Suzuki, Tohoku Institute of Technology

## 7. 血球細胞のダメージフリーソーティング

高速のJet-in-Air方式のセルソーターとOn-chip Sortで、末梢血細胞をソートした時の細胞形態に与える影響を比較し、ソーティングが細胞に与えるダメージについて検討した。On-chip Sortでソートした細胞は、好酸球特有の形態を保っている(下図)。

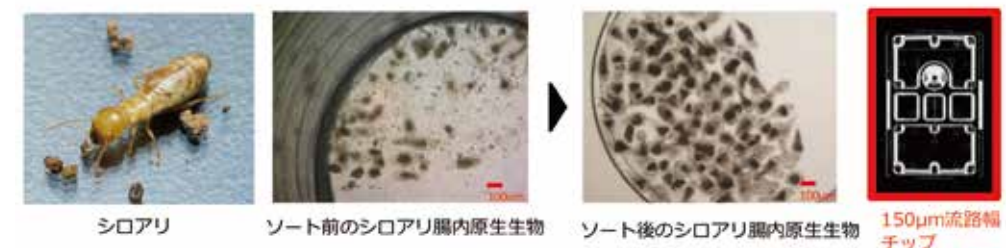


## 8. 原生動物のソーティング

植物の木質を分解し吸収する能力が優れていることが知られているシロアリの腸内に共生する原生動物の分離をおこなうには、通常のセルソーターでは原生動物のサイズが大きいことや、シース液の浸透圧によって破裂してしまうことから分取が困難である。

On-chip Sortは細胞の破裂が起きない最適な生理的塩類溶液をシース液として選択でき、細胞ダメージも少ない分離ができるため、原生動物や多種多様な動植物細胞の分離に利用することが可能である。

### シロアリ体内に生息する大型腸内原生動物ソーティング

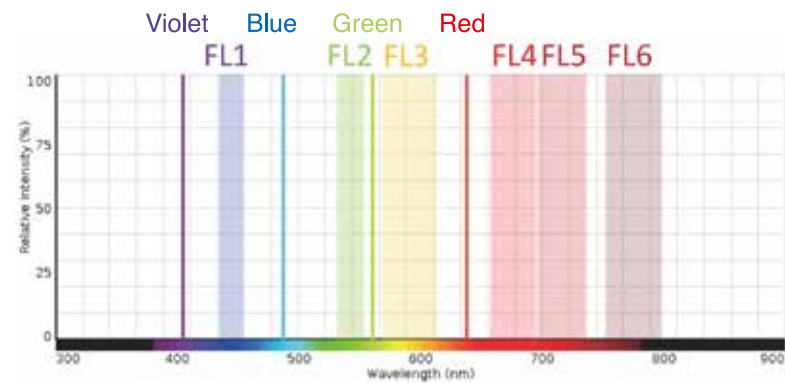


Collaboration with Dr. YUKI and Dr. Okuma, RIKEN BRC, Japan

## 多彩な蛍光色に対応 / 高感度・高精度

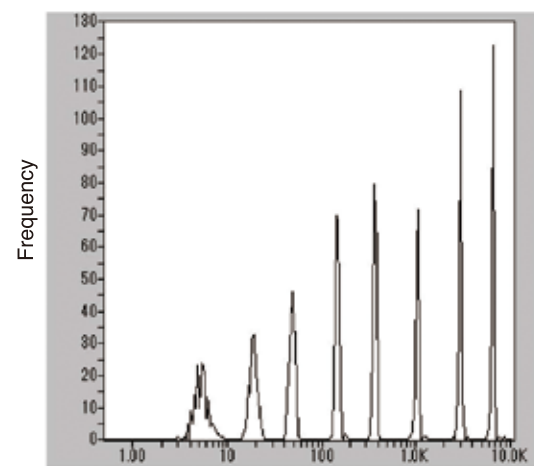
搭載レーザーは、Blue (488nm)、Violet (405nm)、Green (561nm)、Red (637nm) から最大3種類を搭載出来、588nm、785nmのレーザーをカスタマイズで搭載する事も可能です。

検出感度はFITC<200 MESFと高感度を実現しました。蛍光6色に対応することで、計測領域の拡大と計測精度の向上が図られ、近紫外領域のレーザーを搭載することで、サイドポピュレーション(SP)の解析も可能となりました。



	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6
<b>Violet</b>	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6
<b>Blue</b>		FL2	FL3	FL4	FL5	FL6
<b>Green</b>			FL3	FL4	FL5	FL6
<b>Red</b>				FL4	FL5	FL6

Sample : Rainbow calibration particles (8 peaks)



FITC Signal intensity  
蛍光感度: FITC<200 MESF

同一検出器で複数のレーザー由来の蛍光を検出できる技術を開発し、装置の小型化・低価格化に成功しました。

### 装置 (On-chip Flow)

製品番号	製品名	仕様概要	レーザー	検出器
362F2001	On-chip Flow HS	Laser 3, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 637nm & 405nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
362F2001G	On-chip Flow HSG	Laser 3, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 561nm & 405nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
362F2001GR	On-chip Flow HSGR	Laser 3, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 561nm & 637nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
262F2001	On-chip Flow MS6	Laser 2, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 405nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
252F2001	On-chip Flow MS5	Laser 2, FS, SS, FL(5 colors)	Laser 488nm & 637nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
252F2001G	On-chip Flow MS5G	Laser 2, FS, SS, FL(5 colors)	Laser 488nm & 561nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
152F2001	On-chip Flow LS5	Laser 1, FS, SS, FL(5 colors)	Laser 488nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
132F2001	On-chip Flow LS3	Laser 1, FS, SS, FL(3 colors)	Laser 488nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm,

### 装置 (On-chip Sort)

製品番号	製品名	仕様概要	レーザー	検出器
362S3001	On-chip Sort HS	Laser 3, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 637nm & 405nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
362S3001G	On-chip Sort HSG	Laser 3, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 561nm & 405nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
362S3001GR	On-chip Sort HSGR	Laser 3, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 561nm & 637nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
262S3001	On-chip Sort MS6	Laser 2, FS, SS, FL(6 colors)	Laser 488nm & 405nm	445/20nm, 543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
252S3001	On-chip Sort MS5	Laser 2, FS, SS, FL(5 colors)	Laser 488nm & 637nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
252S3001G	On-chip Sort MS5G	Laser 2, FS, SS, FL(5 colors)	Laser 488nm & 561nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
152S3001	On-chip Sort LS5	Laser 1, FS, SS, FL(5 colors)	Laser 488nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm, 716/40nm, 775/46nm
132S3001	On-chip Sort LS3	Laser 1, FS, SS, FL(3 colors)	Laser 488nm	543/22nm, 591.5/43nm, 676/37nm,

## 装置の主な仕様

	On-chip Flow	On-chip Sort
<b>光学系と検出感度</b>		
レーザー	最大3本(405nm、488nm、561nm、637nm、785nm[カスタマイズ応相談])	
測定パラメーター	前方散乱光(FSC)、側方散乱光(SSC)、6PMT(10パラメーターまで)	
サイズ検出感度	FSC < 0.5μm、SSC < 1.0 μm	
蛍光感度	< 200 MESF FITC	
データ分析能	4 decades, 18 bit	
パルス解析	Height, Area, Width	
検出波長	FL1(445/20 nm)、FL2(543/22 nm)、FL3(591.5/43 nm) FL4(676/37 nm)、FL5(716/40 nm)、FL6(775/46 nm)	
<b>流路系統</b>		
フローセルチップ	交換型マイクロ流路チップ	
チップ素材	樹脂	
流路サイズ	80 μm × 80 μm, 150 μm × 150 μm	
流速(m/s)	500 mm/sec~	
シースバッファ	樹脂素材が溶けなければどんな液体も利用可能。応相談	
サンプル・ボリューム	10 ~ 1000 μl	
シース・ボリューム	1 ~ 9 mL	
<b>解析とソーティング</b>		
ソーティング手法	—	マイクロ流路内Flow Shift方式
純度	—	> 95% (細胞濃度による)
収率	—	> 80% (条件による)
細胞ダメージ	なし (解析後サンプル回収可能)	なし (1個からソーティング可能)
コンタミネーションフリー	コンタミネーションなし チップ交換により全リザーバー、流路交換	
無菌・バイオハザード対応	容易	
送液圧力	0.3-3 PSI	
解析速度	4,000 events/sec	
分取速度	—	500 targets/sec
操作開始までの時間	1~2分	5分
シャットダウン	10秒(クリーニング不要)	
<b>安全性</b>		
エアロゾルの発生	なし	
<b>サイズと重量</b>		
サイズ(W×H×D、mm)	520 × 330 × 390	
重量(kg)	40 kg	45 kg
<b>制御PCと制御速度</b>		
PCとソフトウェア	ノートパソコン	
OS	Windows 10、64 bit	
データフォーマット	Own format and FCS3.0	
<b>電源</b>		
電源入力	AC100-240V, 50/60Hz	
消費電力	240 VA	

お問い合わせ先

株式会社 オンチップ・バイオテクノロジーズ

Phone: 042-385-0461 Fax: 042-385-0462

E-mail: info@on-chip.co.jp Home page: http://www.on-chip.co.jp