

全自動1細胞単離解析装置の開発

良元 伸男¹・徐 傑²・黒川 正也³・近藤 昭彦⁴・藤井 郁雄⁵・黒田 俊一^{1*}

¹名古屋大学大学院生命農学研究科, ²古河電気工業株式会社, ³スターライト工業株式会社,
⁴神戸大学大学院自然科学研究科, ⁵大阪府立大学大学院理学系研究科

(2010年9月16日受付 2011年1月11日受理)

Development of automated single-cell isolation and analysis system —Review—

Nobuo Yoshimoto¹, Xu Jie², Masaya Kurokawa³, Akihiko Kondo⁴, Ikuo Fujii⁵, and Shun'ichi Kuroda¹ (*Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601*¹; *Furukawa Electric Co., Ltd., 6 Yawata-kaigandori, Ichihara, Chiba 290-8555*²; *Starlite Co., Ltd., 2222 Kamitoyama, Ritto, Shiga 520-3004*³; *Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501*⁴; *Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8570*⁵) *Seibutsu-kogaku* **89**: 72–78, 2011.

Various cells have been utilized in not only research fields (biochemistry, molecular biology, stem cell research) but also industrial fields (tissue engineering, medicine, energy, foods). It is important to isolate and breed cells possessing most purposive characters. However, cell heterogeneity within an isogenic cell population is a widespread event. Stochastic gene and protein expression has been clearly demonstrated at the single cell level. We here propose a novel concept “single cell breeding” to overcome the potential problem and describe the development of “automated single-cell isolation and analysis system” to realize the concept.

[**Key words**: single cell analysis, single cell breeding technology, cell surface engineering, high-throughput screening]

はじめに

生物工学や細胞生物学を中心とする基礎研究から、医薬・エネルギー・食糧に関する応用研究に至る幅広い分野において、細菌・酵母・昆虫・植物・動物・ヒトなどに由来する細胞群は、タンパク質、生理活性ペプチド、抗生物質、ビタミンあるいはアルコールなどの生産源として長い間活用されている。これらの研究において解析結果の精度を高めたり、物質生産効率を上げたりするために、対象細胞の純度を均一にするモノクローン化（純化）は重要である¹⁻⁴。これまでの細胞の純化は、各コロニー（細胞塊）に含まれる細胞の性質が基本的に均一であるという前提の上で、各種細胞をコロニー単位で単離操作することがほとんどであった。特に最近では、各

種菌体や細胞は純化後、ライブラリー化されており、研究者は容易にこれらの細胞を購入し、ただちに使用している。しかし昨今、1細胞レベルの解析が進むにつれ、必ずしもコロニーが均一な細胞集団ではないことが明らかになってきた⁵⁻⁸。実際に筆者らの解析でも、各種幹細胞マーカーを指標として純化されたマウス由来 embryonic stem cell (ES細胞) の pluripotency (多能性) や、抗体産生用に純化されたハイブリドーマの抗体分泌能を分析したところ、実際の細胞群はヘテロな集団であると判明している (Fig. 1)。そこで今後は、細胞を用いる研究においては、目的細胞を1細胞単位で単離解析し育種する技術 (1細胞育種技術; single cell breeding technology) が要となる。

*連絡先 E-mail: skuroda@agr.nagoya-u.ac.jp

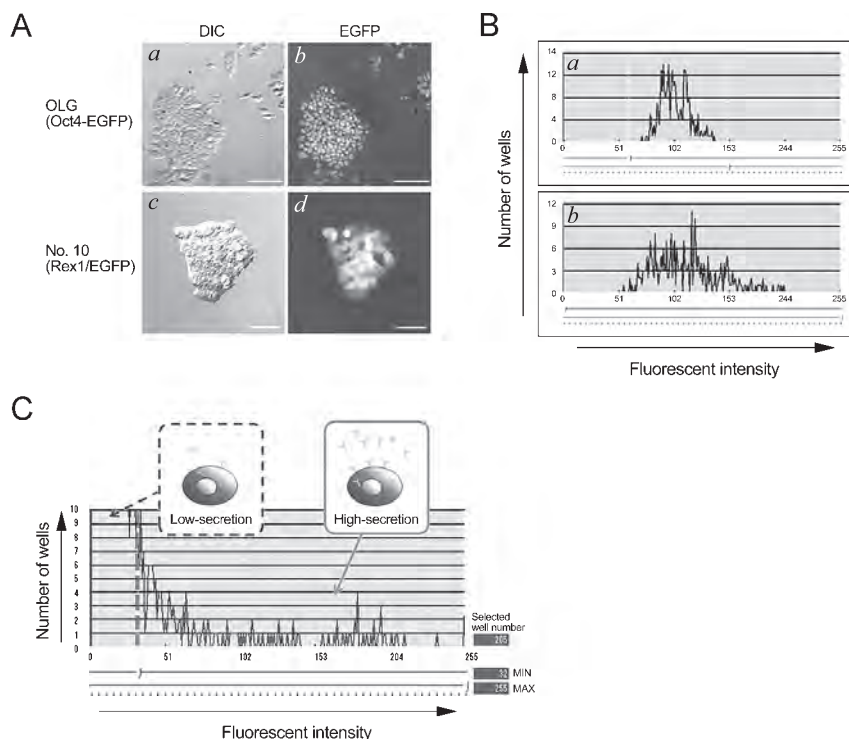


Fig. 1. Heterogeneity of mouse ES (embryonic stem) and hybridoma cells before single cell isolation. (A) Microscopic observation for mouse ES cells. OLG (ES cells harboring *Oct4-EGFP* gene) and No. 10 (ES cells harboring *Rex1/EGFP* gene) were observed under the confocal laser-scanning microscopy. While OLG cells showed homogenous expression of Oct4-EGFP (panel *b*), No. 10 cells showed heterogeneous expression of Rex1/EGFP (panel *d*). Bar = 100 nm. (B) Expression profiles of ES markers of OLG and No. 10 cells. The histograms of EGFP expression of both cells were obtained by the As One cell picking system. Horizontal axis, fluorescent intensity associated with the expression levels of ES markers; vertical axis, number of wells showing respective fluorescence. While the Oct4-EGFP expression in OLG cells was convergent (panel *a*), the Rex1/EGFP expression in No. 10 cells was dispersive (panel *b*). (C) Antibody secretion profile of hybridoma cells. The amounts of antibody secretion from each hybridoma cell were determined by the cell surface FIA (fluorescence-linked immunosorbent assay) as described in Fig. 5 and the As One cell picking system. The amounts of antibody secreted from each hybridoma cell were found to be heterogeneous. Horizontal axis, fluorescent intensity associated with the secretion levels of antibodies; vertical axis, number of wells showing respective fluorescence. MIN, minimum threshold of fluorescence intensity for positive wells; MAX, maximum threshold of fluorescence intensity for positive wells.

従来の1細胞解析と単離技術

以前より、細胞懸濁液から目的細胞を単離する技術として、手動による限界希釈法が用いられてきた。まず、理論的に1細胞になるように希釈系列をマルチウェルプレートに作製し、正確に1ウェルに1細胞だけ入っているかどうか顕微鏡などを用いて観察する。しかし、本法は広大なプール底に沈んでいる小石の個数を正確に1個だけかを勘定するような作業であり、大変な時間と根気が必要である。現在では、目的細胞を効率よく1細胞単離するツールとして fluorescence-activated cell sorter (FACS) が用いられており、それまで手作業に頼っていた1細胞レベルの研究を著しく効率化し、各研究分野へ多大な貢献をしてきた。

FACSは、細胞群を分析する解析系および各細胞を電荷により分離する分取系（ソーター）から構成される

(Fig. 2). 浮遊細胞あるいはトリプシン処理などにより単細胞化した接着細胞をFACSのマイクロ流路にシース液と共に通すと、ラミナフローの原理により細胞懸濁液の流れが細く絞り込まれて細胞が1列に並んで流れる。解析系では、1列に流れる細胞に対してレーザー光を照射し、発現する蛍光タンパク質や、細胞を標識した蛍光物質を励起する。同時に、細胞サイズを前方散乱光の強度として、顆粒状構造体の概要を側方散乱光の強度として数値化し、蛍光情報と併せて目的細胞を特定できる。分取系では、マイクロ流路から出てきた細胞懸濁液をピエゾ振動子によりエンベロープ（液滴）化し、同時に荷電する。帯電した目的細胞を含む液滴は、解析系からの情報に基づき偏向板を通過する際に逆極に引き寄せられサンプル回収容器に滴下される。最新のFACSでは、1秒間に70,000細胞以上の解析が可能で、高密度な細胞懸濁液では不向きとされるソート時でも1秒間に30,000

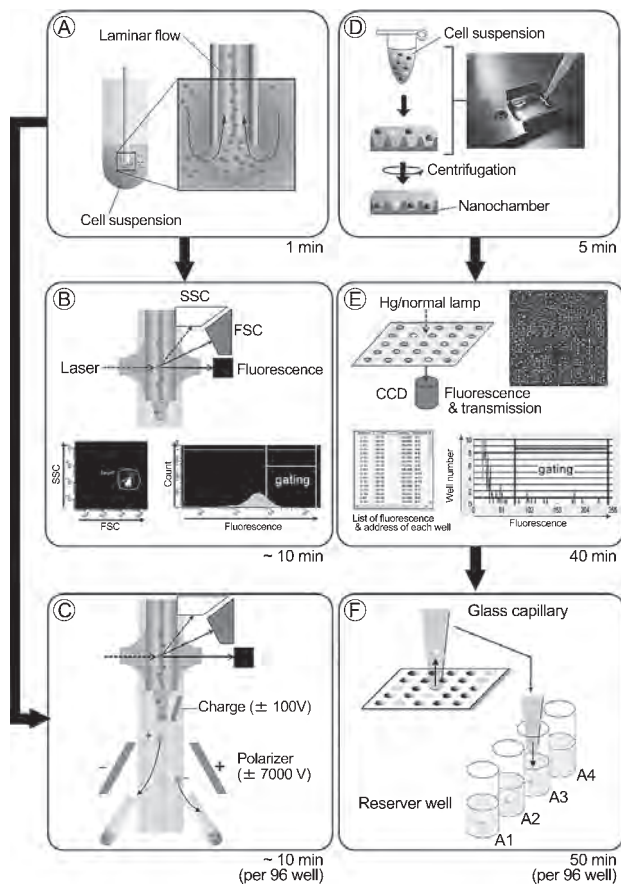


Fig. 2. Workflows of FACS and automated single-cell isolation and analysis system. In FACS system, fluorescence-labeled cells are kept in the sample tube. The cells are injected into the flow channel by laminar flow (panel A). Each cell is enveloped by an oscillator, and exposed to excitation laser. The fluorescent intensity, forward scatter light (FSC), and side scatter light (SSC) of each cell are measured by the respective detectors. Threshold of the fluorescent intensity is determined by pre-run, which utilizes positive control cells. These cells are discarded after the measurement. The FSC-SSC dot plot and representative histogram for fluorescence are shown (panel B). Again, new fluorescence-labeled cells are injected into the flow channel as described in panel A. Based on the pre-determined threshold, each cell is enveloped by an oscillator and concomitantly charged. If cells show stronger fluorescence than the threshold, the cells are attracted toward opposite polarity side by a polarizer, and then sorted to collection tubes (panel C). In automated single-cell isolation and analysis system, fluorescence-labeled cells are introduced into the nanochamber slide (see also Fig. 3) covered with an aluminum frame. Each cell is sedimented to the bottom of each nanochamber well by brief centrifugation (panel D). Both fluorescence and transmission image of each cell on the nanochamber slide are obtained by the excitation light source, the filter unit, and the CCD camera (see also Fig. 3) to generate the cell list of both fluorescent intensity and address of each cell and the histogram. Based on the fluorescent intensity of each cell, the cells of interest can be selected freely on the PC-based program (panel E). Each selected cell is automatically picked up with a glass capillary equipped on the recovery unit (micromanipulator) (see also Fig. 3) and moved into each well of the reserver plate (panel F). Time required for each step is indicated at the right-bottom of each panel.

細胞からの1細胞単離を実現している。

しかし、最新のFACSでも困難な1細胞単離がある。具体的には、実際のサンプルの一部を用いて解析し、蛍光輝度分布から目的細胞の蛍光値を予測してゲーティングする必要があるが、目的細胞の存在比が0.1%を下回ると全体のヒストグラムにおける目的細胞の位置が予測できなくなる。また、 10^6 細胞/ml以上の濃度がないと分析困難であり、解析およびソートにはFACS内部のラインを満たすために0.5 ml以上のサンプル容量が要求される。つまり、仮にサンプルの総細胞数が 10^6 細胞以上と潤沢にあったとしても、目的細胞が100細胞(0.01%)以下だとFACSにとっては存在比不足であり、総細胞数が 10^5 細胞以下だと、目的細胞が1000細胞(1%)以上あったとしても細胞濃度の不足になる。また、FACSは目的細胞回収時に、細胞を約30 m/sの高流速や数千Vに達する高電荷に曝すため、脆弱な細胞の単離には適していない。そこで筆者らは、これまで1細胞解析のツールとして最有力とされてきたFACSにも、不向きな解析対象があることに着目し、きわめてマイルドな環境で、貴重なサンプルに含まれる低存在比の目的細胞を単離できる新たな1細胞単離解析技術が必要と考えた。

全自動1細胞単離解析装置の開発

2003年、筆者らは上記FACSの限界を克服するために、FACSとはまったく異なるコンセプトの全自動1細胞単離解析装置に関する基礎技術の開発に着手した。具体的には、微弱な蛍光でもS/N比良く分析できるナノチャンバーの開発(スターライト工業担当)、CCDカメラによる形態・蛍光観察技術と連動した多数の微粒子から標的粒子を1個ずつマイルドに単離するキャピラリー吸引システムの開発(古河電工担当)である(Fig. 2, Fig. 3)。その結果、2007年に初号機を完成させ、2008年にアズワン社から“*As One cell picking system*”(Fig. 3)とし

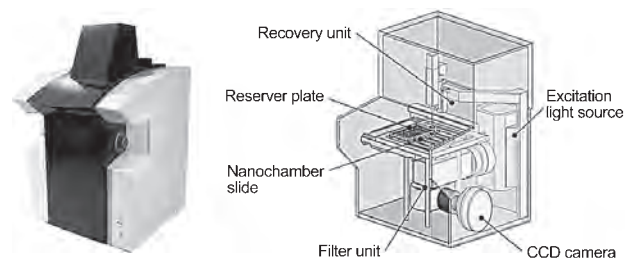


Fig. 3. Automated single-cell isolation and analysis system. Body appearance (left panel) and internal structure (right panel). The system consists of microarray (nanochamber slide), fluorescent microscopy (excitation light source, excitation/emission filter unit, CCD camera), and micromanipulator (recovery unit, reserver plate).

て販売を開始した。本装置で使用するナノチャンバーは (Fig. 4), シンクロトロンを併用する LIGA (Lithographic Galvanoformung Abformung) 射出成形技術により⁹⁾, プラスチックスライド上の 1.45 cm × 2.33 cm の領域に直径 10~30 μm の丸型ウェルが整然と微細加工され, 最大 40 万ウェルが 1 スライド上に成形されている。材質には蛍光のきわめて少ないプラスチック (ポリスチレン, ポリメチルメタアクリレート, ポリジメチルシロキサン) を用いており, 各種表面処理 (官能基導入, 親水化処理など) も比較的容易にできる。キャピラリー吸引システムは, ナノチャンバーの各ウェルに培養液のまま 1 細胞ずつ導入した各細胞の蛍光と透過像を CCD カメラで測定し, PC により解析した蛍光強度順位に基づき, 自動的に目的細胞を同定して 1 細胞ずつマイルドに単離することができる (Fig. 2)。目的細胞は, 微弱なポンプにより吸引するため, 高電荷や高流速に曝されないことから, 細胞への物理的ストレスはきわめて少ない。全自動 1 細胞単離解析装置を用いると培養液中の細胞群から目的細胞を高感度に検出し, 高速かつダメージレスに 1 細胞単離できる。FACS とは異なり, 少量サンプル (3000 細胞でも可能) をすべて解析して単離操作に供することができる

でき, 全細胞の蛍光を解析してから目的細胞の選別を行うことから, 理論上 0.01% 以下の存在比でも確実に目的細胞を単離できる。さらに, 本装置の細胞接触箇所はすべてディスプレイのガラスキャピラリーとナノチャンバーであるので, FACS では回避の難しいウイルスや細菌の二次感染および異種細胞間のコンタミネーションに対する危険性はきわめて少ない。今までの経験から, 酵母細胞は直径 10 μm の丸型ウェルに収まり, 血球系細胞は直径 10~20 μm の丸型ウェル, その他の動物細胞は直径 30 μm の丸型ウェルに収まることが分かっている。もし, 細胞がトリプシン処理などによる 1 細胞化が困難な場合には, 直径 100~200 μm の丸型ウェルを有するナノチャンバーを用いて数細胞から成る塊のまま取り扱う。また, 培養基への接着性がきわめて高い細胞の場合には, プラスチック表面の親水化処理程度を調節して細胞接着を回避し, それでも困難な場合にはナノチャンバー内に 1 細胞単位で播種した後, 数回細胞分裂させ, トリプシン処理してから 1 細胞単離解析に供する。今後, 1 細胞単離解析対象となるさまざまな細胞に対しては, ナノチャンバーの素材と表面処理, キャピラリー内径, ナノチャンバーの丸型ウェルの直径を最適化することにより適用可能になると考えている。

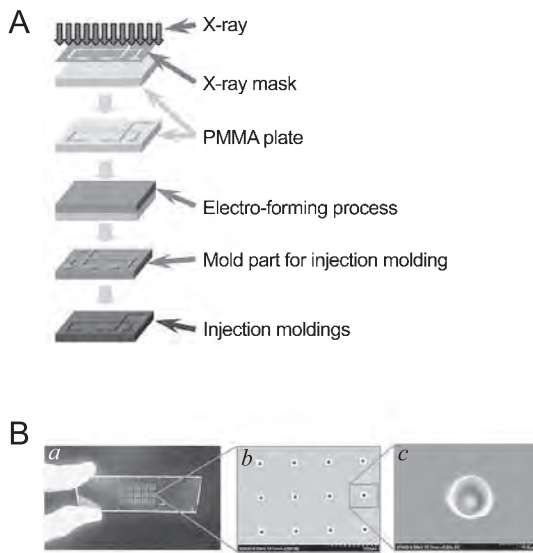


Fig. 4. X-ray LIGA process and nanochamber slide. (A) Outline of X-ray LIGA (lithographic galvanofomung abformung) process. Microfabrication on polymethylmethacrylate (PMMA) plate is generated by an X-ray mask and an X-ray lithography technology combined with synchrotron radiation. With the patterned PMMA plate as a master plate, a nickel mold part is made by electro-forming process, resulting in effective production of the Ni-made mold part possessing replicated micro-patterns. Then, the mold part is inserted in a mold base and injected to produce a polystyrene slide. (B) Nanochamber slide. The 30×10^3 wells with a diameter of 30 μm (panel c, bar = 30 μm) are systematically arranged on a polystyrene slide (panels a and b, bar = 200 μm).

全自動 1 細胞単離解析装置の実例

近年, 再生医療, 抗体医薬を含むバイオ医薬品, 超早期癌診断, 癌予後診断に対する社会的な関心が著しく高まってきている。これらの研究開発には, 幹細胞群 (iPS 細胞, ES 細胞, 造血幹細胞, 組織幹細胞など), 抗体産生細胞群 (B 細胞, ハイブリドーマ), バイオ医薬品産生細胞群 (CHO 細胞, 酵母など), 癌判定基準としての末梢循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells, CTC) や癌幹細胞などを 1 細胞レベルで単離解析する必要がでてきており, 現在 FACS が用いられようとしている。しかし, これらの細胞の 1 細胞単離を行うにあたって FACS では困難なケースがある。ここでは, 全自動 1 細胞単離解析装置を用いる利点について述べる。

幹細胞の 1 細胞単離

今回筆者らは, 樹立されたマウス由来 ES 細胞に多能性マーカー (Oct4 および Rex1) と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) との融合遺伝子を導入し, 多能性のレポーターアッセイを可能にして, 本装置で多能性遺伝子発現についての解析を行った。その結果, 本来均一であるべき ES 細胞において, 多能性マーカーの発現量が大幅にバラついていた (Fig. 1)。そこで, 本装置により Rex1-EGFP 発現 ES 細胞 (約 50,000 細胞) から蛍光輝度の高

い順に24株を単離したところ、生存率100%で親細胞群より高い蛍光輝度を有するバラツキの少ない細胞群を得ることに成功した。一方、理化学研究所・発生・再生科学総合研究センターの笹井らは、ヒトES細胞をFACSで分離した場合、トリプシン処理やメカニカルストレスにより99%以上の細胞にアポトーシスが生じること、Rho kinase (ROCK) 阻害剤で処理すると約30%の生存率でソーティング可能なことを報告している¹⁰⁾。この脆弱性は幹細胞研究分野にブレイクスルーをもたらしたinduced pluripotent stem cells (iPS細胞)の樹立においても問題となっている。さらに、本来ES細胞は初期化されていて比較的均質な幹細胞であるのに対し、iPS細胞は一度分化した細胞を初期化して再分化させるため、遺伝的背景が均一ではないと考えられる。実際、マウスiPS細胞から分化させて得た心筋組織は、心筋梗塞マウス半数に治療効果を示したが、半数のマウスに腫瘍を形成したとの報告がある¹¹⁾。この結果は、ヒトiPS細胞の医療現場での実用化には、細胞作製時においてた

だちに1細胞単離を行い、個々のiPS細胞について遺伝子発現の揺らぎを解析し、遺伝的に安定なiPS細胞を迅速に得る方法の確立が急務であることを示している。

ハイブリドーマの1細胞単離

現在急成長している抗体医薬を支える細胞は主にハイブリドーマである。現在、ハイブリドーマ樹立および抗体産生能の高いハイブリドーマ選別において、前述した限界希釈法により1細胞化を行い、個々について培養し、培養上清に分泌された抗体量をELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法により測定して選抜しており、多大な時間(約2ヶ月)を必要としている。本目的においてFACSは、ハイブリドーマ特異的表面抗原(CD19, CD28, CD38, CD138など)によるハイブリドーマ樹立に使用されるが、抗体産生能の高いハイブリドーマ選別には分泌阻害剤(たとえばGolgiPlug; タンパク質輸送阻害剤)を作用させて細胞内に留まった抗体分子を免疫蛍光法により検出する必要があり、抗体産生能の高い

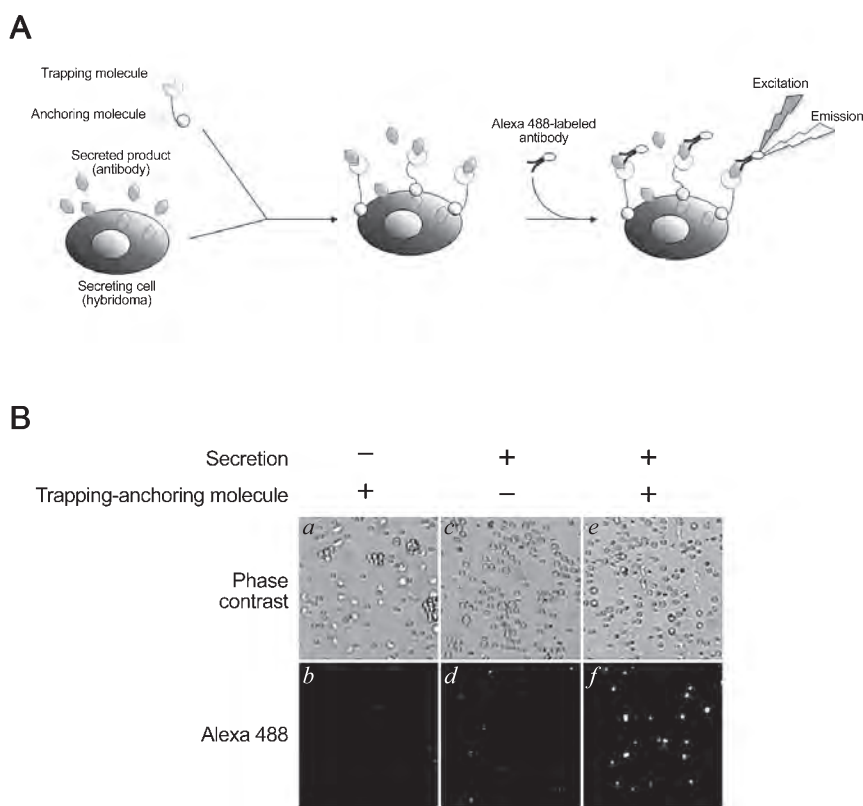


Fig. 5. Cell surface FIA for measurement of antibodies secreted from hybridoma at one cell level. (A) Outline of cell surface FIA. After seeding of hybridoma cells on a nanochamber slide, the cells are treated with a trapping molecule (e.g., anti-mouse IgG antibody) fused with anchoring molecule (e.g., phospholipids) (left scheme), incubated for a short time (5–10 min) to allow the antibody secretion (middle scheme), and treated with an Alexa 488 (fluorescence)-labeled anti-antibody molecules (e.g., antigen, anti-mouse IgG antibody) (right scheme). (B) Analysis of hybridoma cells by cell surface FIA. After treatment with a trapping-anchoring molecule (anti-mouse IgG antibody-conjugated phospholipid), the hybridoma cells were treated with an Alexa 488-labeled anti-mouse IgG antibody and visualized under the fluorescence microscopy. The cells exhibited fluorescence from each cell surface in a dose-dependent manner of antibody secretion.

ハイブリドーマを生きのまま選別することはできない。今回筆者らは、特定の抗体を分泌発現するハイブリドーマをナノチャンバー上に展開し、抗体捕捉用分子（抗マウスIgG抗体、抗原など）と細胞膜アンカリング分子の融合分子（トラップ分子）を添加して短時間抗体分泌を促し、蛍光標識抗マウスIgG抗体を作用させて、ハイブリドーマ表層において分泌抗体に対するFIA（fluorescence-linked immunosorbent assay）を成立させた（Fig. 5）。その結果、個々のハイブリドーマの抗体分泌量に応じて細胞表層の蛍光輝度を相関させ、樹立されたはずのハイブリドーマでも抗体産性能に大幅なバラつきが生じていることを見いだした（Fig. 1）。また、全自動1細胞単離解析装置を用いることにより、短時間で約50,000細胞からの抗体分泌能の高いハイブリドーマの1細胞単離を達成することができた。なお、本細胞表層提示技術をFACS用サンプルにも応用することも検討したが、ハイブリドーマの蛍光染色をナノチャンバー内のように1細胞単位で行うことができないため、細胞表層の蛍光色素が他細胞へ移り込み、FACSには適用不可であることが判明した。以上から、本装置および本細胞表層提示技術は、ハイブリドーマのみならず種々のバイオ医薬品などの高分泌細胞の1細胞単離を高速化できると期待される。

出芽酵母の1細胞単離

これまでの実験例は直径10～25 μm の培養細胞であり、ナノチャンバーの内径は30 μm のものを使用していた。ここでは、直径5 μm の出芽酵母を内径10 μm のナノチャンバーを用いて選抜した例を紹介する。今回筆者らは、出芽酵母表層に上皮成長因子受容体（EGFR）全長を機能を保ったまま発現させ、同時にランダムペプチドライブラリー（helix-loop-helix構造の1側面の5アミノ酸残基を可変化した320万通りのライブラリー）を細胞壁に固定化されるように発現させた。その後、細胞膜透過処理を行い、蛍光標識した抗リン酸化EGFR抗体で標識してナノチャンバー上に移し、本装置で約360万の酵母クローンから蛍光強度の高い順に計12クローンを1細胞単離した。得られた酵母クローンを1細胞PCRに供し、ライブラリー部分の配列の重複を除外して9クローンとした。次に、大腸菌を用いてライブラリー部分を大量発現させて精製を行い、EGFRを高発現するヒト扁平上皮癌由来細胞A431の培養液に添加したところ、7クローン由来のライブラリータンパク質がEGF様活性を示した。この結果は、本装置が培養細胞のみならず、酵母のような微生物にも適用可能であることを示すとともに、創薬において*de novo*薬剤スクリーニングという新しい手法が可能であると示している。

全自動1細胞単離解析装置が拓く希少細胞解析の世界

これまでは、全自動1細胞単離解析装置が「1細胞育種」や「*de novo*薬剤スクリーニング」に有効であることを示してきたが、貴重かつ目的細胞の存在比がきわめて低い「希少細胞解析」に適していることを述べる。近年、新たな癌の超早期診断法として原発巣から遊離したCTC（末梢循環腫瘍細胞）の末梢血中の濃度が注目されている¹²⁻¹⁴。現在は患者血液を7.5 ml採取し、EpCAM抗体を用いた磁性ビーズを用いてCellSearchにより3000～5000細胞まで濃縮し、サイトケラチン抗体で染色して目視により解析している。血球系細胞約 10^6 個のうちCTCが1～5細胞であると、その患者の癌の悪性度は高いと判定され^{14,15}、後の治療法決定の指針とされる。あるいは癌治療後の患者に適用すれば、予後が良好か不良かの判断基準となる。このように、末梢血に含まれるCTCの検出は今後の癌判定として非常に高精度のパラメータになると期待されており、米国FDAにより乳癌、大腸癌、前立腺癌の診断において認可された検査方法でもある。しかし、きわめて存在比が低いために単離同定が困難であり、FACSによる分取も前述の理由により困難である。筆者らは、本装置が末梢血中のきわめて低いCTC存在比（ 10^6 細胞に1～5細胞、すなわち0.0001～0.0005%の存在比）でも、CellSearchによる濃縮後の微量細胞数（3000～5000細胞）でも対応可能であることから、今後の癌診断法研究において多大な貢献ができると期待している。

結 語

本稿で述べたように、全自動1細胞単離解析装置は“*As One cell picking system*”として実用化され、再生医療およびバイオ医薬品製造において、物質生産を支える細胞の育種を1細胞レベルにまで高めること（1細胞育種）に成功し、従来にはない均一な細胞を迅速に得ることを可能にした。また、莫大な予算と時間を要する薬剤スクリーニングにおいても、本装置は創薬領域に新たな方法を提案することができた。さらに本装置は、CTCのような希少細胞の解析を可能にすることから、新たな癌検査および診断技術を生み出す基盤技術になると期待される。しかしながら、本装置の適用可能な研究分野は、上記の例のみに留まらないのは明らかである。現在、本装置は、細胞培養装置および多重蛍光検出装置の搭載を進めており、次年度中には次世代機が完成する予定である。今後、本装置は、FACSと共に、それぞれの長所短所を補完しあいながら（Table 1）、さまざまな分野での1細胞単離解析技術を支えると考えられる。

Table 1. Comparison of FACS and automated single-cell isolation and analysis system.

Properties	FACS	Automated single-cell isolation and analysis system
Cell sample:		
Minimum content of positive cells for sorting	> 0.1%	~ 0.01%
Optimal cell density	10 ⁶ ~ 10 ⁷ cells / 1 ml	~ 250,000 cells / 1 ml
Maximum cell number for sorting	∞	250,000 cells
Minimum cell number for sorting	10 ⁶ cells	10 ³ cells
Suspension solution	Buffer (usually Sheath soln)	Culture medium
Cell cluster	Not acceptable	Acceptable
Machine:		
Single cell isolation mechanism	1) Laminar flow formation 2) Enveloping by oscillator 3) Sort by charge	1) Nanochamber array installation 2) Pick up by glass capillary 3) Sort by micromanipulator
Processibility for analysis	~ 70,000 cells / s	~ 250,000 cells / 20 min
Processibility for sorting	~ 30,000 cells / s	96 cells / 30 min
Disposability of apparatus for cell handling	Difficult (path flow)	Easy (capillary, nanochamber)
Gating methods for positive cells	1) Determination of threshold of fluorescence intensity by pre-run 2) Cell group showing over-threshold fluorescence are judged as positive cells	1) Generation of cell list of fluorescence intensity and address (not necessary for pre-run) 2) Each cell showing fluorescence intensity of interest is judged as a positive cell
Multicolor detection	> 8 colors	~ 3 colors
Observation of cell morphology	Not acceptable	Acceptable

本研究は、近畿経済産業局（平成15年度および平成17年度中小企業地域新生コンソーシアム研究開発事業）およびアズワン株式会社、長瀬科学技術振興財団（平成22年度研究助成金）による支援を受けて実施致しました。また、本研究遂行におきまして大阪大学産業科学研究所 谷澤克行教授、立松健司助教、山崎智子研究員、池田優子氏、神戸大学大学院自然科学研究科 石井純特命助教、大阪府立大学大学院理学研究科 円谷健准教授、植田淳子研究員、兒島孝明助教（現名古屋大学大学院生命農学研究科）、古河電気工業株式会社 杉山聡氏、木村健一氏、アズワン株式会社 松下政宏氏、上向健司氏、理化学研究所 上田泰己チームリーダー、二階堂愛研究員、宇野健一郎研究員、名古屋大学農学部 木田晶子氏の協力を賜りましたことに感謝いたします。

文 献

- Kudo, T., Saeki, H., and Tachibana, T.: *J. Immunol. Methods*, **145**, 119–125 (1991).
- Lee, D. G., Nishimura-Masuda, I., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., and Uozumi, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **44**, 177–181 (1998).
- Tamehiro, N., Hosaka, T., Xu, J., Hu, H., Otake, N., and Ochi, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6412–6417 (2003).
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., and Melton, D. A.: *Nat. Biotechnol.*, **26**, 795–797 (2008).
- McAdams, H. H. and Arkin, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 814–819 (1997).
- Eddinger, T. J. and Meer, D. P.: *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **117**, 29–38 (1997).
- Lidstrom, M. E. and Meldrum, D. R.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 158–164 (2003).
- Jensen, K. B. and Watt, F. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11958–11963 (2006).
- Kurokawa, M.: *Advanced Micro & Nanosystems, LIGA and Its Applications*, (Saile, V., Wallrabe, U., Tabata, O., and Korvink, J. G.), vol. 7, p.323–335, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany (2009).
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., and Sasai, Y.: *Nat. Biotechnol.*, **25**, 681–686 (2007).
- Miki, K., Saito, A., Uenaka, H., Miyagawa, S., Shimizu, T., Okano, T., Yamanaka, S., and Sawa, Y.: *Circulation*, **120**, S721 (2009).
- Ring, A., Smith, I. E., and Dowsett, M.: *Lancet Oncol.*, **5**, 79–88 (2004).
- Pantel, K. and Brakenhoff, R. H.: *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 448–456 (2004).
- Smerage, J. B. and Hayes, D. F.: *Br. J. Cancer*, **94**, 8–12 (2006).
- Ross, A. A., Cooper, B. W., Lazarus, H. M., Mackay, W., Moss, T. J., Ciobanu, N., Tallman, M. S., Kennedy, M. J., Davidson, N. E., Sweet, D., Winter, C., Akard, L., Jansen, J., Copelan, E., Meagher, R. C., Herzig, R. H., Klumpp, T. R., Kahn, D. G., and Warner, N. E.: *Blood*, **82**, 2605–2610 (1993).