平成26年度 ものづくり中小企業・小規模事業者等 連携事業創造促進事業

(戦略的基盤技術高度化支援事業)

「レーザー光と高速可動ステージの精密制御による

高効率細胞融合・回収自動化装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成27年3月

委託者 中国経済産業局

委託先 公益財団法人ちゅうごく産業創造センター

目 次

第	1	章	研究開発の概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		· 1
	1	. 研	究開発の背景・研究目的及び目標・・・・・・・・・・・・・・		1
		1.1	研究の背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		• 1
		1.2	研究の目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	• • •	• 1
		1.3	研究概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		• 2
		1.4	研究内容及び目標・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		• 2
	2	. 研	究体制・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		7
		2. 1	研究組織・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		. 7
		2.2	管理体制・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		. 7
		2.3	管理員及び研究員・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		• 6
		2.4	研究開発推進会議及び事業化検討会委員・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		10
	3	. 成	果概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		11
	4	当	該研究開発の連絡窓口・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		12
如		2 章	本論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		1.0
牙		•	· 本調・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		13
	•	・ 同 1.1	 		
		1. 1	位置決めと融合性能の評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		
	2		物率な細胞診断及び回収のための高速なレーザー光位置決め技術の		18
	_	· 同ス 2.1	の年な細胞診断及び回収のための高速なレーリー元位直次の投制のF 高速な診断及び位置制御ソフトウェアの製作・・・・・・・・・・		18
		2. 1	全反射レーザーの光学系の位置決め及び回収装置の設計と製作・・・		19
		2. 3	回収性能の評価(細胞融合装置)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		20
			回収性能の計画(細胞融合表直)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		22
	J	. тшлі 3.1	工程を連続して自動化する装置及び関連ソフトウェアの開発	,	42
		J. 1	(全自動細胞回収装置)・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		• 22
		3. 2			
		3. 3	自動化工程の性能評価		_
			(全自動細胞回収装置、卓上型細胞融合・回収装置)・・・・・・・		27
第	; 3	章	全体総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		28
	1	. 研学	究開発の成果(平成 24~26 年度)・・・・・・・・・・・・・・・		28
		1.1	高効率な細胞融合のための高精度な位置決めレーザー顕微鏡の開発・		28
		1.2	高効率な細胞診断及び回収のための高速なレーザー光位置決め技術の	開発	28
		1.3	細胞の融合、診断、及び回収自動化システムの開発と製作・・・・・		28
	2	. 今後	後の課題・事業化展開・・・・・・・・・・・・・・・・・・		30
		2. 1	今後の課題・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		30
		2. 2	事業化展開・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		. 30

第1章 研究開発の概要

1. 研究開発の背景・研究目的及び目標

1.1 研究の背景

本申請研究開発は、21世紀の予防・先進医療(再生医療、遺伝子治療)を実現する医療・バイオ機器の開発に関するものである。新型万能(iPS)細胞は我が国をあげた取り組みとして進められている。患者自身の細胞から分化誘導した iPS 細胞から目的細胞を獲得し、オーダーメイド創薬及び拒絶反応のない臓器を作製する夢の技術が現実化しつつある。一方、iPS 細胞の活用のためには、効率的な遺伝子導入による安定的な作製、未分化細胞の混雑なく、非侵襲的かつ簡便な分離・回収が要求される。

ヒト人工染色体 (HAC) 技術は安定かつ効率的な遺伝子導入法であり、iPS 細胞の作製のほか、①巨大遺伝子群の導入、②宿主染色体上の遺伝子を破壊しない、③導入遺伝子の過剰発現や発現消失が起きず、発現が変化しない、④導入遺伝子の発現を自由制御できる等の極めて優れた特徴を有する。HAC ベクターの構造を損なわずに受容細胞 (iPS 細胞等)に移入する方法として、微小核細胞融合法 (MMCT) が開発された。HAC が導入された微小核細胞 (マイクロセル: MC) を受容細胞と融合させて導入するが、従来法では、HAC ベクターが移入した細胞を得る確率は最大でも 0.001%と非常に低率である。

細胞融合法には、高濃度ポリエチレングリコール (PEG) 融合剤の使用、直交流電場を利用した電気融合法等が既存技術であるが、融合効率が極めて低く、試薬、電場、せん断圧等による細胞へのダメージは少なくなく、使用できる細胞種にも限界がある。

PEG 等の融合剤と受容細胞のアンカリングセグメントをもつ素材を細胞サイズのスポットが定序的に配列した細胞マイクロアレイ (μ Ay)に固相化して、基板上に予め播種した MC 上に受容細胞を接着させると高効率で細胞融合可能な技術を見出した。また、 μ Ay は接着細胞を個別に判別することが可能となり、分化万能細胞の精密な診断が可能となる。 さらに、細胞接着面を熱等の外部刺激によって変化する機能性高分子とすることにより、目的細胞スポットのみに外部刺激を与え、非侵襲的にはく離・回収が可能となる。

本研究開発では、高効率遺伝子導入法として研究されてきたパルスレーザー光照射を融合剤固定化 μ Ay 基板上で、細胞にダメージを与えない $\pm 1\,\mu$ m精度の 3 次元位置決めによって非侵襲的かつ従前にない高効率融合装置の開発を目指す。さらに、目的細胞の分離技術の 1 つフローティングセルソーターと異なり、安価、省スペース、少数の細胞でも選択的かつ非侵襲的な分取を可能とする。熱等刺激応答性樹脂を固定化した μ Ay 基板と高精度位置決め CW レーザー照射装置を用いた細胞回収装置を開発する。

1.2 研究の目的

細胞にダメージを与えずに高効率に細胞融合、細胞回収が行える技術・装置は、再生医療や医療・バイオの研究開発に不可欠なものであるが、現在、細胞融合の効率は低く、細胞融合、回収を効率よく行える技術、装置はない。このため平成 22 年度地域イノベーション創出研究開発事業(経済産業省)での研究成果を踏まえ、先端医療・バイオの研究開発の川下ユーザーが希求する高効率、非侵襲的な細胞の融合、回収法の開発に取り組む。具体的には ϕ 10~50 μ mサイズのスポットが 100 μ m間隔で形成されているガラス基板(μ Ay)

 $CW(\underline{C}$ ontinuous \underline{W} ave) レーザー光でヒト人工染色体(HAC)ベクターを搭載した微小核細胞(MC)を基板上に集積する。受容細胞を播いた後、パルスレーザー光照射で瞬間的な膜穿孔により非侵襲的に高効率な融合を行う。融合した後、目的細胞1つ1つに高速移動させながら CW レーザー光を照射し、選択的かつ非侵襲的に回収する等の機能を備えたシステムを既存光学顕微鏡ベースに μ Ay とレーザーシステムの併用によって集積して小型化・軽量化装置を製作する。さらに、融合・回収等工程を連続自動化し、川下ユーザーの煩雑操作の軽減と操作時間の短縮、及び高価な試薬の使用低減を目指す。また、装置をユーザー仕様に融合・回収、あるいは融合・回収等機能にカスタマイズ化できる構成にし、市場競争力のある実用化装置としての製造・販売を目的とする。

1.3 研究概要

 μ Ay (例:4,900 スポット/基板 10×10 mm) の細胞サイズのスポット上に HAC ベクター搭載 微小核細胞を CW レーザー光でスポットに集積させ、その後、受容細胞を播種して互いの接触効率を高める。さらに、各スポット上の受容細胞の膜を標的に、基板上 $1\sim2\,\mu$ m の範囲 に融合用パルスレーザーを照射して従来法の約 10 万倍に融合効率を高める。融合後、細胞診断で陽性の細胞スポットに 1 つ 1 つに μ Ay を乗せたステージを高速移動させながら、基板上の上限臨界共溶温度を示す機能性ポリマーに CW レーザーを照射・加熱し、細胞の足場を瞬間的に溶解することにより、ピンポイントでかつ非侵襲的に回収を実現する高精度位置決め技術等を開発して、卓上型細胞融合・回収自動化システムとしての実用化を目指す。

1.4 研究内容及び目標

〈目標値〉本研究開発期間で得られる最終目標は次のとおりとする。

開発テーマ	目標値
① 高効率な	①-1 駆動部及び光学系制御ソフトウェアの設計と製作
細胞融合のた	汎用光学顕微鏡に精密な移動ステージを設置し、レーザーの光軸を制御
めの高精度な	して、細胞の特定位置にレーザーを集光できる光学系を開発する。融合条
位置決めレー	件時に使用する MC 濃度(1×10⁵~1×10⁶個/mL)下で、融合基板面への MC
ザー顕微鏡の	の集積を、レーザー照射しない時の 10 倍以上とする。
開発	①-2 位置決めと融合性能の評価
	CW あるいはパルスレーザー光を照射して、配列する細胞マイクロアレ
	イのスポット 1,000 個分を移動後、開始スポットと終点スポットのズレが
	±1μm以内にする。
	血球系細胞(U937)を受容細胞とした場合の MC との融合効率を、これま
	での基礎試験によって得られた融合効率 0.1%から 10~100 倍の 1~10%に
	高める。現在、ヒト iPS 細胞と MC では殆ど融合しないが、本技術で融合
	効率を 0.001%以上に高める。

開発テーマ	目標値			
② 高効率な	②-1 高速な診断及び位置制御ソフトウェアの製作			
細胞診断及び	ガルバノスキャナ光学系を用いて、100μm のスポット間移動時間を現			
回収のための	在最少の約 100ms とする。約 5,000 個のスポット上の細胞の診断時間を 1			
高速なレーザ	時間以下とする。			
一光位置決め	②-2 全反射レーザーの光学系の位置決め及び回収装置の設計と製作			
技術の開発	マイクロアレイ基板下面からレーザー光照射による加熱技術を開発し			
	て、細胞はく離率を 90%以上とする。			
	②-3 回収性能の評価			
	細胞マイクロアレイ上で、融合陽性と判別した細胞数に対して、レーザ			
	一照射で 70%以上を回収する。			
	また、回収した細胞が正常に増殖できること等をもって非ダメージ細胞			
	として評価する。			
③ 細胞の融	③-1 工程を連続して自動化する装置及び関連ソフトウェアの開発			
合、診断、及	細胞の融合、診断、回収の各工程を連続して、自動的に行うことができ			
び回収自動化	る装置及びシーケンス制御するプログラム(温度、試薬等を流す速度、バ			
システムの開	ブル開閉タイミング、洗浄時間等)を開発する。処理開始と終了時の基本			
発と製作	的な作業以外は処理の進行状況を確認するだけのシステムとする。			
	③-2 卓上型システムの製作			
	各工程の装置を小型化及び簡素化すると共に、川下ユーザーの要望に応			
	じて、細胞の融合、診断、回収が個別でも、セットでも入手できる卓上型			
	で、安価なシステムを製作する。			
	③-3 自動化工程の性能評価			
	全工程を連続して、自動化することによって、個別作業で行うより一連			
	の作業時間を 1/2 に短縮する。			

- ① 高効率な細胞融合のための高精度な位置決めレーザー顕微鏡の開発
- ①-1. 駆動部及び光学系制御ソフトウェアの設計と製作

(実施担当機関:エステック(株))

市販のマイクロステップスライダーと鏡の向きの制御でレーザーの光軸を調整できるガルバノスキャナを組み合わせて、高速かつ高精度な位置決めを行う。広範囲(数 $100\,\mu\,\mathrm{m}$) の駆動は機械駆動のスライダーで、狭い範囲($5\,\mu\,\mathrm{m}\,\mathrm{以}$ 下)の駆動は高精度に調整できるガルバノスキャナで行う。また、レーザー光の焦点を Z 軸方向に高精度に移動させ、3 次元的に自動焦点合わせを行う装置とソフトウェアを開発する。

- ①-2. 位置決めと融合性能の評価 (実施担当機関:近畿大学、鳥取大学)
- a. μ Ay と同じ厚みのガラス基板上に、 $1\sim2\,\mu$ m 厚の光分解性素材のスピンコート膜あるいはバーコート膜を形成する。CW 又はパルスレーザー光を照射して垂直 Z 軸方向の位置決め精度を電子顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡等で評価する。
- b. 直径 1μ m のポリスチレン微粒子分散液を μ Ay の基板上に置き、欠陥なく基板上に微粒子が配列して吸着するよう、レーザー光出力及び位置決めを最適化した後、 μ Ay スポッ

トサイズ径 $(20\sim50\,\mu\text{ m})$ にレーザー光を照射して、MC の集積と受容細胞 (iPS 細胞等) との融合実験を行う。

- ② 高効率な細胞診断及び回収のための高速なレーザー光位置決め技術の開発
- ②-1. 高速な診断及び位置制御ソフトウェアの製作(実施担当機関:エステック(株)) 操作性の向上と長時間の診断による細胞へのダメージを軽減するため、融合又は非融合 細胞を数100ms以下で判別する。融合した細胞からの微弱なGFP蛍光強度の検出を目標に、 CW レーザー光照射強度の蛍光検出の光学系とシステムを開発する。CW レーザー光をスポット基板の下面から照射して、ガラスと水との屈折率の異なる界面で全反射するレーザー入 射角を調整する。融合した細胞と診断されたスポットにレーザー光を全反射させてエバネッセント光を放出する光学系とソフトウェアを開発する。位置決め精度の向上によって蛍光の検出感度が増大し、融合細胞の判別の精度が向上するため、回収率が高まる。
- ②-2. 全反射レーザーの光学系の位置決め及び回収装置の設計と製作 (実施担当機関:エステック(株))
- ①-1. で開発する技術を転用して、診断と回収の時間を短縮して細胞へのダメージを軽減するため、上記②-1. のレーザー光を診断時及び回収時に必要なパワー等に最適化し、連続的に高速で入射できる光学系とソフトウェアを開発する。位置決め精度の向上によって、細胞に強いレーザー光照射が避けられるため、ダメージのない細胞の回収率が高まることとなる。
- ②-3. 回収性能の評価 (実施担当機関:近畿大学、鳥取大学)

回収した細胞の培養を行い、この細胞について蛍光顕微鏡観察等を行い、融合することで目的遺伝子が受容細胞に導入されたかどうかを評価する。また、非侵入的なはく離細胞とトリプシンはく離細胞との増殖速度との比較、及び特定の抗体等を用いて細胞の機能を調べる等で細胞へのダメージを評価する。

- ③ 細胞の融合、診断、及び回収自動化システムの開発と製作
- ③-1. 工程を連続して自動化する装置及び関連ソフトウェアの開発 (実施担当機関:エステック(株))

全自動細胞回収装置は作業領域のクリーンベンチ化、 CO_2 インキュベーター搭載、ロボットハンドリングにより、作業中起こりうるコンタミネーションの発生を防止した構造で製作する。搭載した2連式のシリンジポンプにより、培地の入れ替えを自動で行いながら細胞の回収も行える。構造を一新したレーザー導入部では、搭載する全てのレーザー光がガルバノメータスキャナを通る構造で全レーザーの光軸制御が可能になる。また、異なるレーザーを同時に照射することも可能となる。

平成25年度には、装置制作し、平成26年度は、制御ソフトウェアの機能を充実する。

③-2. 卓上型システムの製作(実施担当機関:エステック(株))

平成 26 年度は、3-1. の各工程装置を小型化及びモジュール化すると共に、川下ユーザーの要望に応じて、細胞の融合、診断、及び回収が、各々個別でも、組み合わせでも

可能なシステムとする。研究開発の現場に手軽に導入できる省スペースで低コストの装置 を製作する。

③-3. 自動化工程の性能評価 (実施担当機関:近畿大学、鳥取大学)

平成 25 年度は、製作した全自動細胞回収装置について、iPS 細胞等を用いて、各工程での作業を行い操作の容易性、作業時間の短縮、使用試薬の節減等を評価し、また同様に連続した工程での装置の性能も評価した結果、自動化連続工程としての装置設計と試作を完成し、融合・診断・回収についての性能評価を実施した。

平成 26 年度は、完成した装置を使用して各工程での作業時間及び使用試薬を実測して 短縮及び節減等をさらに精密に評価する。

④ プロジェクトの管理・運営(実施担当機関:公益財団法人ちゅうごく産業創造センター) 本研究開発の円滑な運営と推進を図るために、各年度3回の研究開発推進会議及び事業 化検討会(プロジェクト推進会議)を開催するとともに、研究実施機関との研究開発等に係る打合せを適宜実施することにより、研究開発の進捗フォローと同時に設備の状況をチェックし、プロジェクトの推進管理を行う。

また、研究開発成果について、報告書作成の検討及びとりまとめを行う。

④-1. 研究開発推進会議及び事業化検討会の開催

プロジェクト参加機関全体による研究開発推進会議及び事業化検討会を定期的に開催して、研究開発全体の進捗状況の把握、課題の抽出・検討、研究成果の評価及び事業化計画の策定・検討等を行うことにより、研究開発の円滑・推進を図る。

④-2. 研究開発進捗管理

研究実施機関との連携・調整及び研究開発等に係る打合せを適宜実施して、事業の進捗 状況把握、研究開発課題への迅速対応等によりプロジェクトの推進管理を行う。

また、適宜経理処理業務の指導・支援を行い、委託費の適正な経理処理に努めるとともに、 研究開発で取得した機械装置等について、管理台帳等により適正な管理を行う。

4-3. 成果報告書のとりまとめ

各年度の研究開発成果について、プロジェクト構成員とともに報告書の作成検討及びと りまとめを行う。

研究実施場所

[事業管理機関]

公益財団法人ちゅうごく産業創造センター (最寄り駅:広島電鉄 中電前) 〒730-0041 広島県広島市中区小町4番33号 中電ビル2号館

「再委託先〕

エステック株式会社 (最寄り駅: JR 山陰本線 揖屋駅)

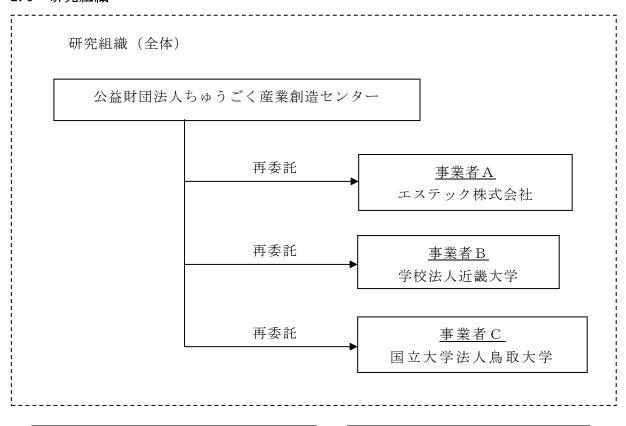
〒699-0101 島根県松江市東出雲町揖屋 2797-3

学校法人近畿大学 工学部 (最寄り駅: JR山陽本線 西高屋駅) 〒739-2116 広島県東広島市高屋うめの辺1

国立大学法人鳥取大学 大学院医学系研究科 (最寄り駅: JR 山陰本線 米子駅) 〒683-8503 鳥取県米子市西町 86

2. 研究体制

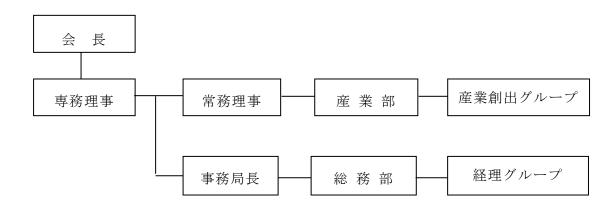
2.1 研究組織



総括研究代表者 (PL) エステック株式会社 代表取締役 永島 正嗣 副総括研究代表者(SL) 学校法人 近畿大学 教授 白石浩平

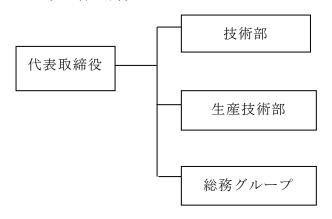
2.2 管理体制 (平成 2 6 年度)

【事業管理機関】公益財団法人ちゅうごく産業創造センター

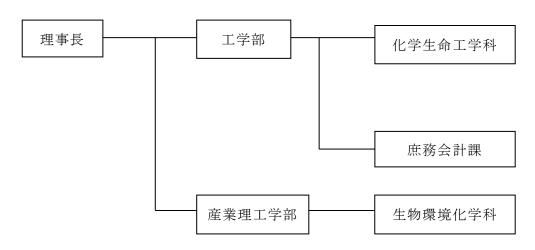


【再委託先】

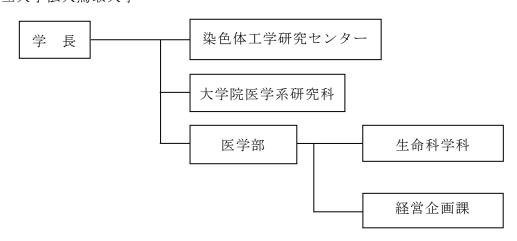
1) エステック株式会社



2) 学校法人近畿大学



3) 国立大学法人鳥取大学



2.3 管理員及び研究員(平成26年度)

【事業管理機関】公益財団法人ちゅうごく産業創造センター

管理員

氏 名		所属・役職	実施内容(番号)
奥本	芳治	常務理事	④ −1、 ④ −2
松原	健之	産業部 産業創出部長	4 - 1 , 4 - 2 , 4 - 3
中谷	郁夫	産業部 部長	\[\(\text{\(\)}}} \end{\(\text{\(\)}}} \end{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\(\text{\(\text{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\(\text{\(\text{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\} \text{\} \text{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\} \text{\) \end{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\(\text{\(\text{\) \end{\(\text{\) \end{\(\text{\} \text{\) \end{\(\text{\} \text{\) \end{\(\text{\} \end{\(\text{\) \end{\(\text{\ \end{\(\text{\) \end{\(\text{\ \end{\(\text{\) \end{\(\text{\ \end{\(\texi{\) \end{\(\text{\ \end{\(\text{\ \end{\) \end{\(\text{\ \end{\ \end{\(\text{\ \end{\(\) \end{\ \eni}} \ \end{\ \end{\ \end{\ \end{\
新谷	聖	産業部 部長	(4) - 1 , (4) - 2 , (4) - 3

【再委託先】※研究員のみ

1) エステック株式会社

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
永島 正嗣	代表取締役	(1-1, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2)
崔源煥	技術部 主任	(1-1, (2-1, (2-2, (3-1, (3-2)))))
山本 由美子	技術部	(1-1, (2-1, (3-1, 3-1), 3-2))
竹下 英樹	技術部	③-1、③-2

2) 学校法人近畿大学

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
白石 浩平	工学部 化学生命工学科 教授	①-2、②-3、③-3
山田 康枝	工学部 化学生命工学科 教授	①-2、②-3、③-3
河済 博文	産業理工学部生物環境化学科 教授	①-2、②-3、③-3

3) 国立大学法人鳥取大学

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
押村 光雄	染色体工学研究センター 特任教授	①-2、②-3、③-3
加藤 基伸	医学部生命科学科 助教	①-2、②-3、③-3
香月 康宏	大学院医学系研究科 助教	①-2、②-3、③-3

2.4 研究開発推進会議及び事業化検討会委員 (平成26年度)

氏 名	所属・役職	備考
永島 正嗣	エステック株式会社 代表取締役	P L
崔源煥	エステック株式会社 技術部 主任	
白石 浩平	学校法人近畿大学 工学部 化学生命工学科 教授	SL
山田 康枝	学校法人近畿大学 工学部 化学生命工学科 教授	
河済 博文	学校法人近畿大学 産業理工学部 生物環境化学科 教授	
押村 光雄	国立大学法人鳥取大学 染色体工学研究センター 特任教授	
加藤 基伸	国立大学法人鳥取大学医学部 生命科学科 助教	
香月 康宏	国立大学法人鳥取大学大学院 医学系研究科 助教	
定村 佳房	和光純薬工業株式会社・ライフサイエンス研究所 所長	アドバイザー
岡本 圭司	トーヨーエイテック株式会社 表面処理事業部企画開発課 課長	アドバイザー
藤川 武司	広島和光株式会社・営業本部営業推進室 室長	アドバイザー

3. 成果概要

開発テーマごとの目標値および成果は次のとおり。

開発テーマ	目標	結果	評価
① 高効率な	①-1 駆動部及び光学系制御ソフ		
細胞融合のた	トウェアの設計と製作		
めの高精度な	1)細胞の特定位置にレーザーを集光	1)開発完了	1)達成
位置決めレー	できる光学系の開発		
ザー顕微鏡の	2)融合基板面への MC の集積を、レー	2)約 10 倍	2)達成
開発	ザー照射しない時の 10 倍以上		
	①-2 位置決めと融合性能の評価		
	1)配列する細胞マイクロアレイのス	1) ±1μm以内	1)達成
	ポット 1,000 個分を移動後、開始		
	スポットと終点スポットのズレが		
	±1μm以内		
	2)血球系細胞(U937)を受容細胞とし	2)融合効率:	2)
	た場合の MC との融合効率を、0.1%	(U937) 1.2%	(U937)達成
	から 10~100 倍の 1~10%	(iPS)未実施	(iPS)研究を継続
	ヒト iPS 細胞と MC の融合効率を		
	0.001%以上		
② 高効率な	②-1 高速な診断及び位置制御ソ		
細胞診断及び	フトウェアの製作		
回収のための	1)100μmのスポット間移動時間を約	1) 100ms	1)達成
高速なレーザ	100ms		
一光位置決め	2)約5,000個のスポット上の細胞の	2) 20 分以下	2)達成
技術の開発	診断時間を1時間以下		
	②-2 全反射レーザーの光学系の		
	位置決め及び回収装置の設計と製作		
	1) 細胞はく離率を 90%以上	1)はく離率: 78%	1)ほぼ達成
	②-3 回収性能の評価		
	1) レーザー照射による回収率を 70%	1) —	1)未達成
	以上		回収率向上を
	2)非ダメージ細胞として評価		検討
	(回収した細胞が正常に増殖できる	2)評価完了	2)達成
	こと等)		

開発テーマ	目標	結果	評価
③ 細胞の融合、診断、及び回収自動化システムの開発と製作	③-1 工程を連続して自動化する 装置及び関連ソフトウェアの開発 1)全自動細胞回収装置の開発 (処理開始と終了時の基本的な作業 以外は処理の進行状況を確認する だけのシステム)	1)開発完了	1)達成
	③-2 卓上型システムの製作 1)卓上型細胞融合・回収装置の製作	1)開発完了	1)達成 コスト低減を検 討予定
	③-3 自動化工程の性能評価 1)個別作業で行うより作業時間を 1/2 に短縮	1)作業時間 65~ 70%短縮	1)達成

4. 当該研究開発の連絡窓口

当該研究開発に関する連絡窓口は、下記のとおりである。

【郵便番号】 〒730-0041

【住所】 広島市中区小町 4 番 33 号 中電ビル 2 号館 【組織名称】 公益財団法人 ちゅうごく産業創造センター

【担当者氏名】 産業部 部長 新谷 聖

電 話: 082-241-9914 FAX: 082-240-2189

E-mail: zdshinta@pnet.gr.energia.co.jp

第2章 本 論

1. 高効率な細胞融合のための高精度な位置決めレーザー顕微鏡の開発

1.1 駆動部及び光学系制御ソフトウェアの設計と製作

細胞融合装置は駆動部(顕微鏡電動部、XY ステージ、ミラー切り替え部)及び光学系(各種レーザーの配置及び光軸調整用ミラー、レンズ構成)のハードウェアで構成した装置を製作した。



図 1.1-1 細胞融合装置の構成

マイクロアレイ(以下 μ Ay)上の細胞をターゲットに正確にレーザーを照射するために XY ステージの移動は $1~\mu$ m 単位で移動を実現し $\pm~1~\mu$ m の位置決め精度を達成した。ガルバノメータスキャナを用いた光軸制御により、レーザー照射位置は 100 倍対物レンズ場合 $20~\mu$ m 範囲内で $0.5~\mu$ m 以内の精度達成し、目標とした $\pm~1~\mu$ m の精度を達成した。

 μ Ay 基板上のスポットの正確な位置情報を得るため、CCD カメラで撮影したスポット像の画像処理で行い、複数スポットのラベリング処理により XY 平面上のスポットの位置決め行った後、スポット像のコントラスト測定により Z 方向の位置決め(焦点合わせ)を行うことで、各スポットに対する 3 次元の位置決めを自動で行う。比較的時間がかかる Z 方向の

位置決めは、上記両位置決め機能を組み合わせ、全スポットの中から代表 9 点の Z 方向の 焦点位置を測定し、他のスポットの位置を計算で割り出す方法で位置決めにかかる時間を 押さえた。

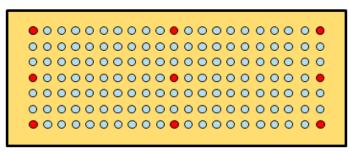
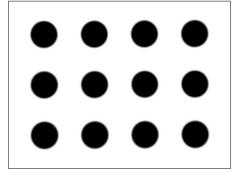
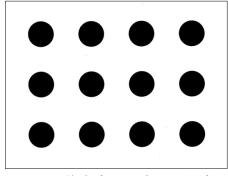


図 1.1-2 焦点測定位置(赤いスポット)

 μ Ay の全スポットを連続して撮影した結果、スポットの位置ズレや焦点のズレがない映像が得られており、自動化したソフトによる XYZ 方向の位置決めが± 1 μ m 以下の精度で達成できたことを確認した。



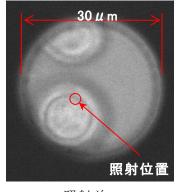
焦点合わせ無しの場合



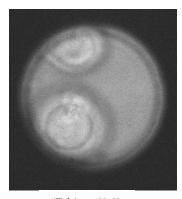
焦点合わせ有りの場合

図 1.1-3 焦点合わせ無し・有りの比較

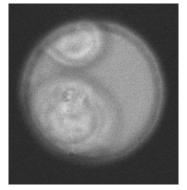
U937 細胞を用いた 349nm レーザーの照射実験では、細胞膜を狙い強いレーザー光を照射し、照射された部位の細胞膜の破壊に成功した。レーザーパワーを調整することで細胞を壊すことなく細胞融合を誘導できることが確認できた。



照射前



照射5秒後



照射 20 秒後

図 1.1-4 U937 細胞に 349nm パルスレーザー照射実験 (レーザー照射条件: 2.5A, 1000Hz, 1パルス照射)

1.2 位置決めと融合性能の評価

- (1) HAC と受容細胞の融合を効率化するため、周囲を Cr あるいは Au 等の金属とする細胞 サイズのガラススポットを μ m オーダーで定序的に配列した μ Ay のスポットに細融合 を促進するポリエチレングリコール(PEG)、細胞膜表面のタンパク質との固定化用素材 N-アクリル酸スクシイミジル(NAS)、及び細胞膜類似の化学構造をもち細胞接着時のダ メージを軽減する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)を所定比率 で表面開始共重合した。さらに、メタクリル酸ブチル(BMA)と MPC の共重合体をエチル アルコール溶液でスポット周囲の金属部をディップコーティングし、HAC 及び受容細胞 を集積する細胞非接着層を形成した。融合効率を保持したまま、基板の作製コストを低 減するため、融合用の素材を更に最適化し、PEG の分子量の検討及び MPC 鎖を除き、上 記の方法で固定化して融合検討し、MPC あるいは NAS セグメントの両者がなくても、融 合活性を示す新たな知見を得た。融合系には必ずしも MPC あるいは NAS セグメントは必 須ではなく、MPC は細胞融合における細胞ー細胞間接触調整剤としての機能、及び PEG 鎖長は 1100 付近が最適で、さらに NAS セグメントの導入によって融合効率が増大する ことを見出した。受容細胞として血球系 U937 細胞を使用し、融合効率を増大させるヒ ト型細胞表面との特異的に結合する抗原タンパク質を修飾した HAC を調製した。さらに、 多くの受容細胞、例えば、マウス幹細胞等への細胞種の適用を拡大するため、変更した 表面処理剤を用いて、上記の抗原タンパク質を含まない HAC の調製とそれによる細胞融 合さらにマウス人工染色体(MAC)によるマウス幹細胞(m-ckit)への MAC の融合実験を実 施した。その結果、抗原タンパク質を含まない HAC でも抗原タンパク質とほぼ同じ融合 効率を示し、さらに、表面処理μAy 基板を用いてMACのm-ckit へ移入を認めた。
- (2) μ Ay 上に HAC 続いて受容細胞 U937 を播種後、 XY ステージを走査しながら、スポット径と同じサイズの $50\,\mu$ m に整形したパルスレーザーをレーザーパワー、照射時間、繰返し時間等を変化させて膜上にパルスレーザー (349nm)を 1 パルス (4ns) の照射によってレーザー照射による細胞融合の促進実験を行い。未照射の場合では μ Ay 上で必要な融合期間を 3 日から 1 日に短縮する効率化を認めた。パルスレーザー照射条件の最適化を行い出力 1.5A, 5pulses,周波数 500Hz で目標の細胞融合効率 1%以上を達成した(図 1.2-1)。
- (3) ヒト人工染色体 (HAC) ベクターを含む微小核細胞 (MC) の細胞径約 1μ m (1000nm) を近赤外 CW レーザー光 (1064nm、1450nm) 照射 μ Ay スポットに MC さらには受容細胞 U937 (細胞径約 10μ m) を移動及び集積することが可能となった。 μ Ay 基板への位置決めと集積光の選択並びに光学系調整等の最適化を実施して、1450nm の CW レーザー光を用いて μ Ay スポット上の HAC 及び U937 細胞を $300\text{ms} \sim 500\text{ms}$ の高速かつ細胞にダメージを与えることなく集積を可能とした。また、レーザー光トラッピング(捕捉)による基板上の細胞移動等を非接触かつ PC 上のマウス操作で行うことを可能とした。

(4) その他

a. HAC と U937 細胞の従来融合法 (PEG 法) で高効率化に必要であった麻疹ウイルス提示 HAC を用いることなく、 μ Ay 上スポットに PEG 及び NAS の共重合体の固定化のみで、両者の融合を可能とした。

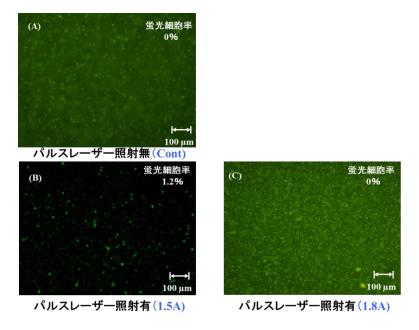


図 1.2-1 g-μ Ay 上 U937 細胞と MC のパルスレーザー融合後、選択 培養蛍光顕微鏡像: (A) 未照射, (B) 1.5A パルスレーザー照射, (C) 1.8A パルスレーザー照射

- b. μ Ay を用いた HAC と U937 細胞の高効率融合には μ Ay のガラススポット上への固定化素材として細胞膜表面のタンパク質と反応する NAS セグメントは必須であり、融合効率を高めるために、 μ Ay 上で非接着層を形成してスポット上に HAC 及び U937 細胞を集積することが好ましいことを認めた。
- c. レーザー照射光学系の単純化を実施して、レーザー照射光路を1つにすることを達成し、光軸調整等の自動化も進めてメインテナンスの軽減を実施した。

d. c. の光学系の達成によって、CW レーザーで集積しながら(図 1.2-2)、融合用のパルスレーザーを同時に照射できる光学系となり、融合効率の増大が見込まれる。

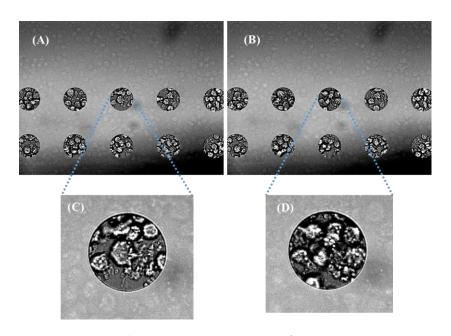


図1.2-2 g-μAy上U937 細胞とMC播種後の顕微鏡像: (A)未照射, (B) (A)の拡大像, (C)1450nmCW レーザー400ms 照射, (D) (C)の拡大像: U937 細胞 1.0×10⁶cel1s/well, HAC 3.0×10⁶/well

以上のことから、細胞融合用機能性ポリマー素材をスポットに固定化し、スポットの周囲を非接着素材でコーティングした μ Ay が HAC と受容細胞との融合素材として有用で、融合用機能性素材の必要なポリマー構造を確定した。また、はく離・回収用の CW レーザー光として細胞への省ダメージや細胞操作性等の諸条件を満たす最適な波長が 1450nm であることを認めた。さらに、 μ Ay 基板を用いる細胞融合用のパルスレーザーの照射条件を見出し、CW レーザー光の集積と併用して、さらに条件を検討することによって、これまで以上の融合効率を達成できる見込みである。

2. 高効率な細胞診断及び回収のための高速なレーザー光位置決め技術の開発

2.1 高速な診断及び位置制御ソフトウェアの製作

細胞の診断にはスポット毎に蛍光及び発光の光量を測定して行う。更に、光量の設定範囲に該当する面積(画素数)を判断基準にし細胞の診断を行う。スポット1個毎にステージを移動しながら診断を行うと膨大な時間がかかるため、高速診断のための方法を検討した。



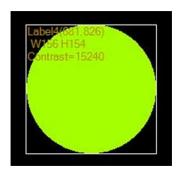
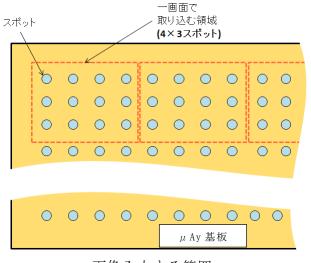
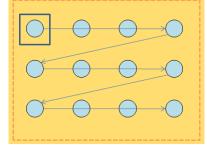


図 2.1-1 診断用設定画面と診断対象のスポット範囲

高速診断方法として、20 倍レンズで 1 回の画像入力で 4×3 個のスポットを処理することで、XY ステージの移動と画像入力の回数を大幅に減らし、作業時間の短縮を図った。

 μ Ay 基板には $152\times51=7752$ 個のスポットがあり、全スポットの診断に必要な時間は、 1 スポット毎に移動一画像入力一診断をする場合、約 77.5 分かかったのに対し、1 回の画像入力で 4×3 個のスポットを一気に処理する場合、約 6.5 分で作業を完了、約 1/10 に短縮することができた。





画像入力する範囲

スポット処理順

図 2.1-2 画像入力範囲及びスポットの処理順

診断用対物レンズと回収作業用対物レンズの違いによるレーザー照射位置の水平垂直 方向の位置ズレを XY ステージの移動時に補正を行うよう制御することで、別途調整時間を 設けることなく回収作業ができるよう制御ソフトに機能を設けた。

2.2 全反射レーザーの光学系の位置決め及び回収装置の設計と製作

本装置では、細胞融合に成功した細胞のみを回収する方法として、μ Ay のスポットに塗布されている樹脂を温めることで樹脂の上に乗っている細胞の足場をなくし、当該細胞をはく離する方法で回収を行う。

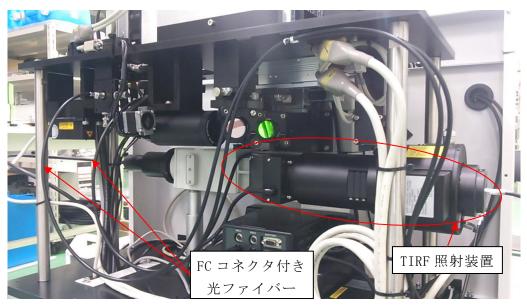


図 2.2-1 TIRF 照射装置

樹脂を温めるために 1450nmCW レーザーを用いる。樹脂を温める際にレーザーによる細胞への影響を最小限にするため、レーザーを直接照射する方法以外に図 2.2-1 の様に全反射照射 (TIRF) 装置を用いるための光学系を設けた。レーザー光が対物レンズで全反射する現象を用いて μ Ay 基板上の樹脂のみを温めるのが狙いである。

細胞の回収に用いる 1064nm、1450nm レーザーの照射位置を、デジタルサーモテープの加温による色の変化を用いて正確に調整した。そして、レーザーにより局所部の加温が可能であることも確認した。

光軸を制御し、両レーザーの全反射機構に導入する機能と導入されたレーザーの入射角度を自由に調整する機能を制御ソフトに組み込んだ。

レーザー用パワーメータを用いてレーザー光の通過と設定値通り入射角が調整できる ことを確認した。

2.3 回収性能の評価

細胞は例えば万能性を獲得のハイスループット診断さらには特定した標的細胞を選択的に獲得・純化する必要がある。開発の細胞融合装置には、融合機能のみならず診断及び非侵襲的な回収システムを搭載する。この際、融合操作と同様に μ Ay を用い、 μ Ay スポットに下限臨界共溶温度(LCST)型あるいは上限臨界共溶温度(UCST)型ポリマーを選択的に固定化し、細胞にダメージのない波長域の CW レーザーを高精度に位置決めしてスポット毎に局所的に加熱して細胞足場を変化させる。UCST 型ポリマー固定化スポット上の標的細胞のみに位置決め CW レーザー照射によって高効率に細胞を分取できる簡便なツールとなる。

また、パルスレーザーを使用して LCST 型ポリマーをスポット固定化し、不用細胞を選択的に除去後に、基板全体を冷却して細胞回収をするツールとなる。

 μ Ay への UCST 型ポリマーの固定化及びスポットへの細胞集積を促進するスポット周囲の非接着領域の形成を確認した。表面開始原子移動ラジカル重合 (ATRP)法によって、LCST 型ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) [P (Ni PAAm)] の表面密度、鎖長を細胞の接着及びはく離に最適化した。また、表面開始可逆的付加開裂連鎖移動 (SI-RAFT) 重合法によって μ Ay ガラススポット上にアクリルアミド (AAm) 及びアクリロニトリル (AN) の共重合体の組成、表面密度、グラフト鎖長を最適化してガラス表面の固定化後、加温による培地中での非侵襲的なはく離の性能を従来のはく離率 20~40%程度から約 80%に増大させた(図 2.3-1)。

UCST型P(AAm-co-AN)はRAFT重合法によって、加温による細胞はく離性能を与える表面性状に制御可能であった。

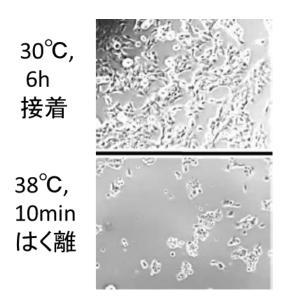


図 2.3-1 SI-RAFT 重合法により UCST 型 P(AAm-co-AN)を固定化した glass 調製した P(AAm-co-AN)-g-glass 上での hiMSC の接着及び温度刺激はく離

LCST 型 P(Ni PAAm) を SI-ATRP 法で、UCST 型 P(AAm-co-AN) を SI-RAFT 重合法によって、 μ Ay 上のガラススポット上に固定化した。次に、 μ Ay のスポット周囲を非接着性とするため、リン脂質類似ポリマー (PMPC) に溶媒キャストコーティング性能を与える構造に最適化したのち、コーティングして、細胞回収用の基板を調製した。所定量の hi MSC を播種後、 hi MSC がガラススポットに集積固定化された(図 2.3-2)。

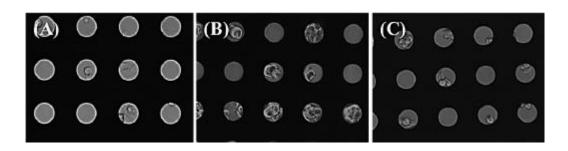


図 2.3-2 hiMSC 接着 μ Ay の位相差顕微鏡像(スポット直径:50 μ m): スポット(A)未処理、(B) P (Ni PAAm) 固定化、(C) P (AAm-co-AN) 固定化、ガラススポット周囲には PMPC コーティング

1450nmCW レーザー照射によって(C)では照射による細胞の形態変化を確認した。基板の1450nmの熱吸収効率を高めるため、吸収剤の細胞接着ガラスの裏面にコーティングして細胞はく離の性能向上をさせる。

3. 細胞の融合、診断、及び回収自動化システムの開発と製作

3.1 工程を連続して自動化する装置及び関連ソフトウェアの開発 (全自動細胞回収装置)

細胞の融合及び回収作業は、XY ステージ上で比較的長い時間の作業が必要である。クリーン環境が整ってない状態で行われる場合、作業中にコンタミネーションが発生する危険性も増大する。

全自動細胞回収装置では、作業領域をクリーンベンチ化、 CO_2 インキュベーター内蔵、ロボットによるハンドリング構造で制作し、作業中に起こりうるコンタミネーションの発生を防止した装置として製作した。

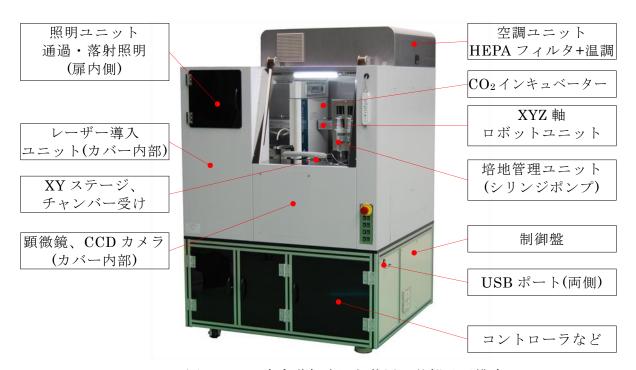


図 3.1-1 全自動細胞回収装置の外観及び構成

装置内での作業は大きく以下の2つの作業に大別し、

- ① 顕微鏡の XY ステージの上に μ Ay チャンバーを載せ、チャンバー内の細胞を対象に レーザー照射する細胞集積・融合・はく離作業
- ② μ Ay チャンバー自体をロボットハンドリングにより、 CO_2 インキュベーター内へ収納、一定時間の培養後 CO_2 インキュベーターからの取出し、XY ステージにセットし、培地管理ユニットで培地交換するなどの管理作業

で構成される。

①の作業に関して平成 25 年度装置製作時に製作した制御方法に加え光軸の変更による動作を追加製作した。②の作業に関するソフトは各部位の基本動作制御部を作業の流れに合わせた組み合わせを行った。そして、①と②の作業をスケジュリング処理して、全体を統括する管理ソフトを作成した。

(1) レーザー照射による細胞集積・融合・はく離作業

本装置では、細胞の集積・融合・はく離作業用のレーザーとして 1064nm、349nm、1450nm レーザーを搭載している。それぞれのレーザーを μ Ay 上の細胞まで正確に届けるためには、レーザーヘッドから照射されたレーザー光をミラーで反射させ、最終的に対物レンズを通して細胞に照射する必要がある。レーザー光は対物レンズに入射される直前に、レーザー用フィルターキューブで最終反射される。ここではレーザー光のみを反射し、可視光は通過する必要があり、レーザーそれぞれの波長に合わせたミラーが使われている。

照射するレーザーの種類に合わせ、光軸中のミラーの切り替えとレーザー用フィルターキューブの切り替えを自動で同時に行える制御ソフトを製作した。この制御動作は、電動シリンダによるミラーの出し入れ、電動キューブタレットの回転といった物理的動作を頻繁に行うので、全体の処理時間の増大、機械的摩耗等による故障の問題が懸念された。

レーザーの照射制御について、CW レーザーの照射エネルギのより細かな制御のために簡易パルス制御機能を製作した。IO 信号による ON/OFF 制御を利用し、レーザー出力の繰り返し数 (Hz)、照射時間 (ms)、無照射時間 (ms)、そして全体の実行回数の設定が可能であり、照射中に少し間を入れるような動作も可能である。

(2) 管理作業

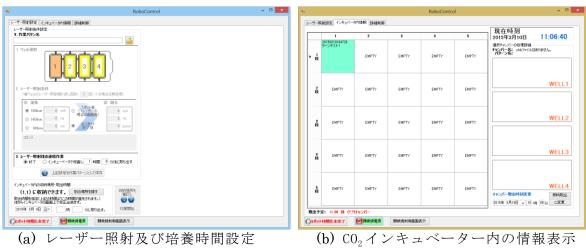
 μ Ay チャンバーの準備から融合作業、細胞培養、細胞診断、回収までたくさんの作業で行われる。一部の人手が必要な作業以外、時間のかかる作業はほとんど自動化されている。作業の開始から終了までを自動で行うためにはセットされた μ Ay チャンバー毎にスケジュリング管理をする必要が有る。更に、 μ Ay チャンバーは 4 個のウェルで構成されており、それぞれのレーザー照射条件と記録しておきながら、 CO_2 インキュベーター内で培養中でも閲覧できると便利である。

管理用ソフトではウェル毎のレーザー照射条件をパターンファイル (.ptn) に記録して管理する。 μ Ay チャンバーをパターンのファイルで記録された内容でレーザー処理してから、 CO_2 インキュベーター内に収納培養する。パターンのファイルの内容を含め、培養に関わる情報を記録して、チャンバー処理記録ファイル (.chb) を生成する。そして、 CO_2 インキュベーター内の棚の状況をファイルに記録 (.INC) したファイルを生成し、棚番号と培養中の μ Ay チャンバーファイルをリンクさせる。

ファイルを作成して管理することでパソコンの再起動などのトラブルがあっても作業を続けることができる。

管理ソフト上では CO_2 インキュベーター内の棚を DataGrid で表示し、選択される位置のチャンバー情報をウェル毎に表示する。培養中のチャンバーは予約された時間なったら自動で取り出すことも、マウス選択で即時取り出すことも可能である。

細胞の回収作業に必要な培地管理ユニットはフタルのシリンジを正確に同期し、一定速度で培地の入れ替えや、注入・回収作業を行う。



(b) CO₂インキュベーター内の情報表示

図 3.1-2 制御ソフトの管理画面

3.2 卓上型システムの製作(卓上型細胞融合・回収装置)

「細胞融合装置」と「全自動細胞回収装置」の製作で確立した各種機能及び機器の最適 化を行い、研究開発の現場に手軽に導入できる省スペースで低コストな装置の開発を目的 として「卓上型細胞融合・回収装置」を製作した。

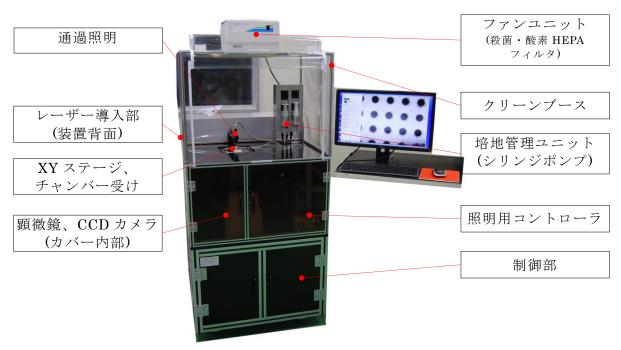


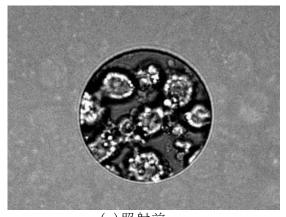
図 3.2-1 卓上型細胞融合・回収装置の外観及び構成

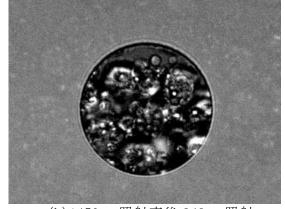
本装置の構成は、平成 25 年度製作の「全自動細胞回収装置」の構成から装置内の温調 機能、CO₂インキュベーター、ハンドリングロボットを省略した構成となる。そして、以前 の装置で実験的に行われていた多様な機能の内、必要な機能を絞って最適化して構成した。 今まで製作した装置との比較を表 3.2-1 に示す。

	表 3.2	-1 開発装置の比較表		
区分	細胞融合装置 XCF	全自動細胞回収装置 XCFA	卓上型細胞融合・回収装置 XCFE	
	Ti-E	Ti-S + 電動コントロール	Ti-S	
顕微鏡	全ユニット電動制御	レボルバー、フィルターキュ ーブ、照明の電動切り替え	手動	
XY ステージ	1μ m/step	0.1	μ m/step	
対物レンズ上下	顕微鏡で制御 0.025 μ m/step	XY ステージコントローラより対物レンズツマミ制御 0.1 μ m/step		
観察・画像入力		冷却 CCD カメラ (1360×1024)		
導入レーザー	349nm, 1064nm, 1450nm	349nm, 1064nm, 1450nm	349nm, 1450nm	
光路	物理的光路切り替え		一本化	
光軸制御	ガルバノメータスキャナによる			
光軸制御対象	349nm l	349nm レーザーのみ		
培地交換	手作業	培地管	理ユニット	
細胞回収	手作業	レーザー照射	+培地管理ユニット	
環境管理	無し	装置全体クリーンルーム化	クリーンブース (作業部のみ)	
その他の機能	TIRF 照射機構 (エバネッセント光による 樹脂表面のみ加熱) 超高感度 CCD カメラ	ハンドリングロボット CO ₂ インキュベーター内蔵		
1 > 6 /	(融合細胞の発光観察)	(細胞培養)		
大きさ(WDH)	$750 \times 800 \times 1390$	$1000 \times 1100 \times 1667$	$700 \times 750 \times 1600$	

細胞融合用レーザーの照射は、照射するスポットの均一な照射を実現するため、光軸上に UV ホログラフィックディフューザーを設置し、一旦拡散させたレーザー光をピンホールで周りの光をカット、中央の平滑化されたレーザー光のみをレンズで絞り μ Ay のスポットに ϕ 60~80 μ m サイズにしぼり照射する。 UV ホログラフィックディフューザーによる細胞融合効果は「全自動細胞回収装置」で実験的に行ったテストでその効果を確認している。

実験により、細胞の集積に $1450\,\mathrm{nm}$ レーザーの効果が確認され、細胞集積とはく離に $1450\,\mathrm{nm}$ レーザーで可能で有ることがわかった。その上、融合用 $349\,\mathrm{nm}$ レーザーとの同時照 射を可能にするためレーザー導入部の構造と制御の改善を行った。ダイクロイックミラーを用いレーザー光の同軸化を行い、混合したレーザーをガルバノメータスキャナに入射することに成功し、 μ Ay のスポットの同じ位置に両レーザー光を同時に照射することも可能になった。





(a) 照射前

(b)1450nm 照射直後 349nm 照射

図 3.2-2 集積直後融合レーザーを照射した様子

図 3.2-2 で示したような、1450nm レーザーを 400ms 照射し、周りの細胞を近く寄せて、直後に融合用の 349nm レーザーを数パルス照射する作業ができた。光路上の機器を切り替える動作が無く 2 種類のレーザーを順次に照射して次のスポットに移動する動作が可能となり、比較的早じ時間で作業が完了できる。

本装置は、安価な装置を目指して開発をしているが、作業領域は簡易クリーンブースによりクリーン環境を確保した。

培地管理ユニットのその環境の中で動作し、細胞回収時のコンタミネーションの危険性を除いた。シリンジの交換作業はシリンジホルダにシリンジを押し付けるだけでセットができ、作業後は正面に引き抜くだけで外れるので簡単に脱着できる。

3.3 自動化工程の性能評価

製作した全自動細胞回収装置について、各工程での作業の人為的操作と比較して、容易性、作業時間の短縮、使用試薬の節減等を評価した。また同様に連続した工程での装置の作業時間を評価した結果、人為よりも大幅な操作工程の簡略化を可能とする。自動化連続工程としての装置設計と試作を完成し、融合・診断・回収についての操作性能を評価する。

平成 26 年度に完成した本格的なコンパクトな自動化装置による平成 25 年度製作の自動 化装置を用いて実操作時間の概計測して、従来法と比較した。

その結果、自動化によって、細胞融合では、35%以下、細胞診断・回収では 45%以下の操作時間の短縮を見込む。精密かつ高速移動するメカニカルステージは高価で位置決め等の所用時間の短縮が難しいが本システムは位置決めを、μ Ay 数 10 スポットを1 区画として、区画内では PC 制御のミラー駆動による高速化・高精度化をガルバノメータスキャナとメカニカル移動と組み合わせたソフトウェアによって課題解決している。

細胞播種や培地交換さらには多数のチャンバーを同時に操作する自動化の要素技術の完成しており、顧客要求に応じてカスタマイズした装置を作製可能とした。また、STC㈱社の保有技術の1つである既製品の遠心分離機のロボティクス利用に活用や本装置でも取り入れている注射器等の汎用消耗品の人的操作を代替した培地送液等の技術開発も完了しており、操作時間の短縮のみならず顧客の使用カスタマイズ化時間も大幅に短縮することが可能となる。

第3章 全体総括

1. 研究開発成果 (平成 24~26 年度)

1.1 高効率な細胞融合のための高精度な位置決めレーザー顕微鏡の開発

駆動部(顕微鏡電動部、XY ステージ、ミラー切り替え部)及び光学系(各種レーザーの配置及び光軸調整用ミラー、レンズ構成)のハードウェアで構成した「細胞融合装置」を製作した。融合用レーザーとして 349nm パルスレーザー、細胞集積用レーザーとして 1064nmCWレーザー、細胞回収のための加熱用レーザーとして 1450nmCW レーザーを搭載した。

XY ステージの移動と対物レンズの焦点合わせを自動で行い、 $1 \mu m$ 以下の精度で 3 次元の位置決めを可能にした。

高精度な位置決めを行いながらスポット間移動を 100ms で可能なハード及びソフトをの開発から、当初目標の樹立化細胞株 (U937) を受容細胞細胞とする融合効率 1.2%を達成している。なお、費用とメンテナンス軽減の観点から、新たに製作した光学系によって、HAC 一受容細胞間の接触効率を増大させる CW レーザー光による集積と融合用パルスレーザーの同時照射が可能となった。マウス血球系幹細胞 (m-ckit) へのマウス人工染色体 (MAC) 微小核細胞の基板のみによる移入効率が 6.7%であり、上記の CW/パルスレーザー照射系により、iPS 細胞等への HAC 微小核細胞の高効率融合 (移入) 次年度以降の補完研究で達成を見込む。

1.2 高効率な細胞診断及び回収のための高速なレーザー光位置決め技術の開発

XYZ の 3D 軸のいずれにも高精度かつ 100ms 以下での高精度位置決めを達成し、同時に細胞からの蛍光観察とスポット位置の特定と記録を 7分以下で行う光学系、移動装置のソフト並びにハードを完成させた。 さらに細胞にダメージが少なくレーザー出力の調整が容易な 1450nmCW レーザーを光源と特定している。基板上への加温によって細胞接着の足場が変化する上限臨界共溶温度 (UCST) 系ポリマーの固定化素材及び手法もアクリルアミド/アクリロニトリル共重合体の μ Ay 表面のガラススポット上への表面開始可逆的付加開裂重合法によって、30℃培養→37℃加温で接着性多能性細胞(ヒト間葉系幹細胞)はく離率 78%を達成した。CW レーザー加温では、基板ガラスを十分に加温できなかったため、ガラス面への 1450nm 光の吸収剤を基板裏面に塗布したはく離条件を検討しており、次年度以降の補完研究で目的細胞のみの CW レーザースポット照射による回収を見込む。

1.3 細胞の融合、診断、及び回収自動化システムの開発と製作

細胞の融合、診断及び回収作業は、XY ステージ上で比較的長い時間の作業が必要であり作業中のコンタミネーションの発生を防止するため、装置内部をクリーンルーム化した「全自動細胞回収装置」を製作した。「細胞融合装置」と「全自動細胞回収装置」の製作で確立した各種機能及び機器の最適化を行い研究開発の現場に手軽に導入できる省スペースで低コストな装置として「卓上型細胞融合・回収装置」を製作した。

上記 1.1 及び 1.2 節で達成された技術開発によって、 μ Ay 基板上診断・回収の所用時間は 1 時間(回収の場合は細胞数によって、照射時間が増減するため、スポット数 7,752 個全てへの照射時)以内の短時間処理を達成している。診断方法も観察スポット面からの蛍

光を細分割したピクセル単位に、強度の閾値決めたピクセル数で評価する技術開発による 高速かつ精密な診断を達成している。細胞の播種、回収、さらには、細胞培養のチャンバ ーとインキュベーターへの移動も全てロボットで操作できる環境、設備、消耗品のほぼ全 てを汎用市販品で操作しうる装置構成として、自動化要素技術のほぼ 100%レーザーの仕 様(診断、診断・回収、診断・回収・融合等)に容易に変更できることから、今後はユー ザー要求にカスタマイズ化した商品提供できるメリットを示して、販売体制を構築する、 販売しながら開発を進めて装置のさらなる改善を見込む。

2. 今後の課題・事業化展開

2.1 今後の課題

装置販売における最大課題となる装置及び μ Ay の製作・作製費用について、とくにパルスレーザーの条件最適化をさらに進めて、レーザー仕様(出力、周波数、繰返照射回数)及び顕微鏡仕様(レンズ、駆動系、光検出系)を限定する必要がある。また、 μ Ay 基板作製費用を低減する必要がある。また、ユーザーの高い信頼性を得るため、細胞の基板上への集積効率を \sim 100%に高めることが課題となる。

本装置の販売形態としてユーザー仕様にカスタマイズ化できる利点があるため、上記課題の全てを一度に達成する必要はないが、それぞれの課題をユーザー開拓しながら、解決していく必要がある。パルスレーザー光源及び顕微鏡については安価品の供給先に一定の目途(中国製等)があり、信頼性テスト始める必要がある。基板の表面処理については表面開始重合法に依らない溶媒スピンコーティングによる素材も研究期間内で既に開発されている。コーティング法では、金/ガラス素材よりも安価なダイヤモンドライクカーボン(DLC)による μ Ay の使用も可能である。さらに、本開発期間で開発してレーザートラッピング(捕捉)や他法を併用したアレイ上への細胞配列の精密化を達成して、低価格、高ハンドリング性、細胞操作への多応用機能の長所を全面に事業化に繋げられると考えられる。

2.2 事業化展開

事業展開については、今後、補完研究を通じて装置条件の最適化から、使用する装置の限定化を図り、また、「細胞集積効率」、「細胞回収効率」、「細胞融合の未樹立化細胞への応用条件の検討」などの課題をユーザー提供ののち、ユーザーと共に克服する体制を構築すると共に、本最終開発品をデモ機として展示会への出展、ユーザー貸出、利用要求の高い企業・機関(一部調査済)への個別広報をエステック株式会社において実施して、早期の事業化を目指した検討を進める予定である。