

平成27年度
革新的ものづくり産業創出連携促進事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「次世代に向けた単一細胞分離回収用マイクロデバイスおよび装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成28年11月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 深江化成株式会社
東京大学先端科学技術研究センター

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 研究目的及び目標

1-2 研究体制

(研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

1-3 成果概要

1-4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

1. 細胞の分離と集積率を向上させるための膜の開発

1-1. 細胞ダメージの低減させる膜架橋度の確立

1-2. 高精度の細胞吸引用微細流路と細胞吸引孔の開発

2. 安定した流路およびウェル形成のための微細成形基板の開発

2-1. 液流を制御するためのトップの開発

2-2. 均一なウェル形成のためのベースの開発

3. 膜-膜間、膜-基板間の接合技術の確立

4. 単一細胞を自動分画回収するための装置開発

5. システムおよび装置の開発と量産体制の確立

最終章 全体総括

第1章 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

これまで「ある集団の細胞は全て同様の動態を示す」と考えられてきたが近年、細胞は個々に動態が異なっており、ストレスやダメージを与えるとその動態も変化してしまうことがわかってきた*1)。

分析技術の向上により、細胞一個の動態を研究する「単一細胞の解析研究」は、血液学、再生医療、がん研究等様々な分野で生体機能の理解の為に非常に重要な研究課題として位置づけられており、その解析手法の確立は急務となっている。世界の単一細胞解析市場は500億円(2015年)にも上り、日本においても大手製薬企業を始め、東京大学や理化学研究所、株式会社日立製作所等多くの機関が参入している。

そしてこの研究において最も重要視されていることは、正確な解析結果を得る為に、利用する単一細胞をできる限りストレスやダメージを与えない状態(以下無傷細胞と記載)で回収することである。

*1) MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 74:1287-1294 (2007)

1-1-2 研究目的及び目標

○高度化技術 バイオ

○高度化目標 生物としてのヒトや疾病の分子レベルでの理解に資する解析技術の高度化

細胞を単一状態へ分離し回収するための様々な従来技術では無傷細胞が得られない上、回収率も低く、ユーザーのニーズに答えられていないのが現状である。本事業では、新たな技術によって無傷細胞を得、回収の効率やデバイス・装置の価格まで従来のものと比べて優位となる、新装置を開発することを目標とした。

この目標を達成するために、本事業で開発する新規デバイスには東京大学先端科学技術研究センター池内講師らのグループが開発した幹細胞培養デバイスPASCLの原理を開発のシーズ、射出成形による微細加工技術をもつ深江化成株式会社の双方の技術を融合させることとした。

また、できるだけ安価な製品を作成することで、予算が潤沢にある研究者だけでなく、単一細胞の研究をしている、あるいはこれからしていきたいと考えている多くのユーザー層にも利用できるようにしていくことで、単一細胞研究の裾野を広げることも目的である。

1-2 研究体制

1) 研究組織

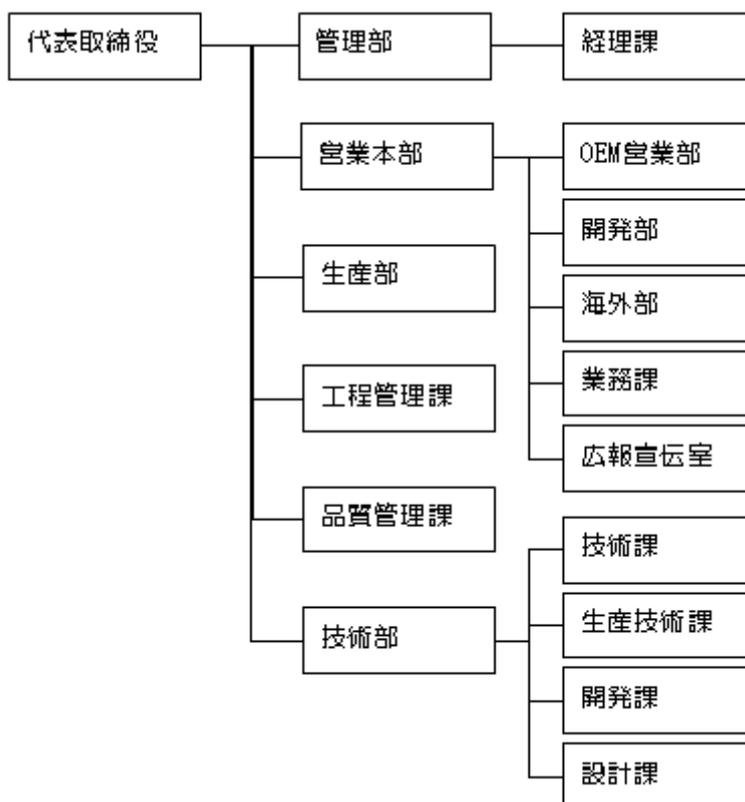
総括研究代表者 (PL) 氏名：本 真 所属組織：深江化成株式会社 所属役職：営業本部 開発部 部長	副総括研究代表者 (SL) 氏名：池内 真志 所属組織：東京大学先端科学技術研究センター 所属役職：講師
--	--

2) 管理体制

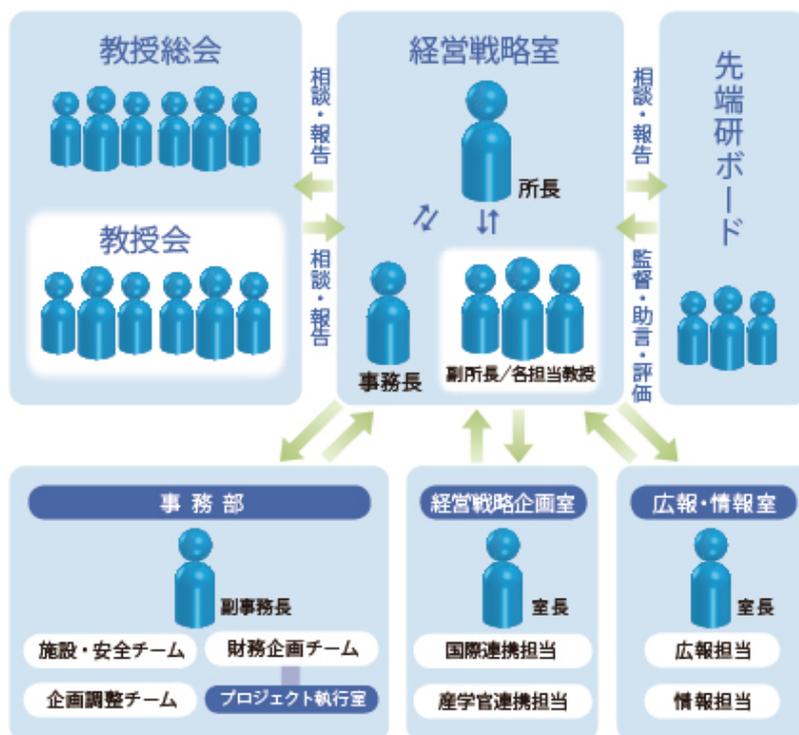
事業管理機関および研究機関

① 深江化成株式会社

開発、販売ならびに経理処理の管理に関わることを記載している



②東京大学先端科学技術研究センター



http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/about/organization/index_ja.htmlより抜粋

3) 研究者氏名

深江化成株式会社

氏名	所属・役職
本 真	営業本部 開発部 部長
秋吉 由佳里	営業本部 開発部

東京大学先端科学技術研究センター

氏名	所属・役職
池内 真志	東京大学先端科学技術研究センター 講師
青山 千裕	東京大学先端科学技術研究センター 博士研究員

4) アドバイザー

キコーテック株式会社

氏名	所属・役職
長船 剛尚	代表取締役社長

1-3 成果概要

平成 26 年度～27 年度の 2 か年に跨る本研究の目標であった「単一細胞をいかに無傷状態で回収するか」については、途中で計画変更を実施したが達成率 80%のところまで来たと考えている。

検証において難航した課題は、(1)5um の孔に細胞を吸引トラップする技術、(2)接合の技術の二点であった。(1)のレーザー加工による微小な孔の作成は、膜厚によってはすり鉢状にしかあけることができない、加工したカスによって孔が再度埋まり易いなどいくつか欠点があったうえ、浮遊状態の細胞を孔へ誘導することが極めて困難であることがわかった。また、(2)については、成形品と膜を接合するために、成形品側の微妙な反りを埋めるだけのクッション性が求められたが、クッション性が高くなるほど接着が困難となる結果となった。

そこで細胞の分離回収方法を見直し、より簡単に、単一細胞を安定に回収できる方法を再検討した改良型開発品(以下：s-PASCL)を考案し開発を進めた。計画変更の際、仕様の変更を行ったが、s-PASCL に求められる「単一細胞をいかに無傷状態で回収するか」については、当初の目標を変更せず開発を進めることができた。

[s-PASCL 概要]

384 トランスファープレートとメンブレン層を接合したものを単一細胞の分離デバイスとし、384 個の孔で同時に細胞を分離トラップする。また、このトラップした細胞は遠心分離機を使用して 384 ウェルプレートや 384PCR プレートへ移行することで、単一細胞の回収を行う。

分離から回収までの作業は、現段階で 30 分、回収率は 10%程度である。作業時間は当初の目標時間を達成した。また回収にて移行させるプレートは、細胞実験で用いられる代表的な物であり、その後ユーザーが行いたい実験に迅速に取り掛かることができる。今後は分離時に撒く細胞の個数の調節等で、この割合を増やしていく予定である。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

所属 深江化成株式会社

氏名 秋吉 由佳里

電話 078-991-4477

FAX 078-991-4491

Email akiyoshi@watson.co.jp

第2章 本論

1. 細胞の分離と集積率を向上させるための膜の開発

1-1. 細胞のダメージを低減させる膜架橋度の確立

マイクロデバイスでは細胞を微細孔に吸引固定する時に、孔のエッジの部分で細胞膜表面に応力が集中するため、その影響により細胞膜の破壊による細胞死や、ストレスに起因する発現状態の変化が懸念される。そこで、膜の柔軟性を高め、エッジ部分で細胞膜の局所に応力が集中しないように、材料特性を検討した。

s-PASCL では、5 μ m 以下の微細な孔が無数に空いている膜で、かつ、細胞を吸引時に変形させたりダメージを与えず、孔にトラップされ、遠心により簡単に剥がれるという条件を満たす素材の探索を行い、検証した。

1-2. 高精度の細胞吸引用微細流路と細胞吸引孔の開発

細胞を微細孔に吸引固定する際に、孔のエッジの部分で細胞膜表面に応力が集中するため、その影響により細胞膜の破壊による細胞死や、ストレスに起因する発現状態の変化が懸念される。そこで、膜の柔軟性を高め、エッジ部分で細胞膜の局所に応力が集中しないように、材料特性を検討した。

細胞のクッション剤として PDMS 膜は非常に使用しやすい素材だったが、作成に時間が掛かってしまうことがわかった。より簡便な多孔質膜各種を使用して検証を行った。

2-1. 液流を制御するためのトップの開発

マイクロデバイスの開発では、単一細胞をトラップする膜上の ϕ 5 μ m の孔まで細胞懸濁液を効率よく誘導するための構造を持つ成形品を作成した。トップの裏面にて細胞懸濁液を流す構造とした。流路幅は 0.5mm である。流路の長さを一定にすることで懸濁液が一定にマイクロデバイスに流れる構造となったが、細胞をトラップする孔まで細胞を誘導することができなかった。そこで、s-PASCL では、一様に一度に細胞懸濁液を流し入れる簡便な形に変更し、トップによる流路の制御は不要とした。

2-2. 均一なウェル形成のためのベースの開発

マイクロデバイスでは、各単一細胞を独立させるために、ウェル作成用負圧流路を負圧にすることによって深さ 500 μ m のウェルを 2.5mm ピッチ でならべ、これをガイドとして

ウェルを作成した。ウェル用の膜のガイドとなる構造を作成した。超える細胞にも同デバイスが利用できる。この溝をガイドとしてすべてのウェルを均一に作成することができることを検討した。

s-PASCL ではこの形状を変更し、一度の処理で 192 個の細胞の回収から、384 個の回収を行うことができるように改良した。特に吸引時に重要な因子となる孔径は 384 個の回収用デバイスを用いることにより安定に作成可能となった。

3. 膜-膜間、膜-基板間の接合技術の確立

本事業では、PDMS 膜を 2 層にする技術から、PDMS 膜と多孔質膜の 2 層構造に変更し接合を試みた。樹脂と膜の素材の相性によっては接合できる可能性が見えた。

一方でマイクロデバイスの接合では、トップの流路を完全にシールできなかった。流路の淵がフラットではないことが原因と考えられる。

s-PASCL では、多孔質膜をラバーの柔らかい素材で押すことで、成形品側の面に圧着させて接合を試みた。これにより、回収時移行させるプレートとの嵌合がより正確になり、回収できる確率が向上すると考えられたためである。

接着の技術は非常に難しく、平成 26 年度、27 年度ともに、メインの検証項目とした。接着したとみなす状態（引っ張らなければ取れないレベルならよいのか等）はどこを基準にするか、圧着させるための素材選定はどうするかなど、決定する条件項目が非常に多くこれらを掛け合わせて、条件の最適化に尽力した。

4. 単一細胞を自動分画回収するための装置とシステムの開発

平成 26 年度は、第一期試作機となる単一細胞分離回収用装置に回収時に使用するマイクロタイタープレートの開発を実施した。単一細胞の回収用に特化した形状のものを選択し、さらにコーティング処理などで細胞が底面に滑り落ちやすい製品を開発した。

平成 27 年度に上記装置を使用して検証を重ね、分画した単一細胞を培養するユーザーにとっては、安全キャビネット内という限られたスペースで細胞を回収することが望まれるというユーザーニーズも含めて、さらに安価で汎用性の高い、コンパクトなものを作成すべく仕様を変更した。特筆すべき点はすべてをオートメーションにするのではなく、半自動にすることで、誰でも簡単に使用できるものにしたことである。

5. システムおよび装置の開発と量産体制の確立

装置については、量産化に向け開発の構想を検討し、大型の全自動装置から、半自動の簡易装置へと仕様を変更した。新規の仕様による手法の確立をするために、実験を行った。

また平成 26 年度に作成した 96 ウェルプレート各種も、実際の使用方法に即した実験を行い、単一細胞用として販売する製品として問題ないか検討した。

最終章 全体総括

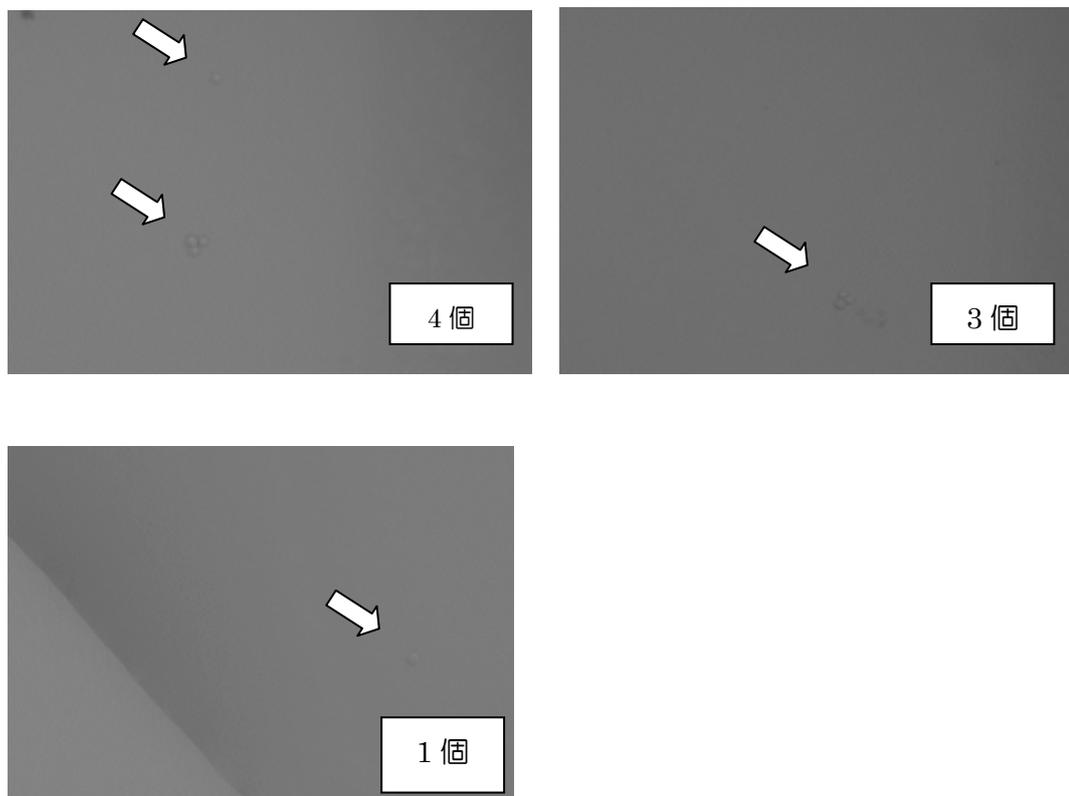
事業途中で計画変更したものの、最終的に細胞を単一化に近い状態で回収できるデバイスおよびプロトコルを開発することができた。

細胞の播種数や種類、吸引装置など実験を重ねながら、今後はスポットでユーザー評価を頂き、マイナーチェンジをしていきたいと考える。

○顕鏡結果

3 つのウェルを例に示す。少ない個数までは回収できていることがわかる。

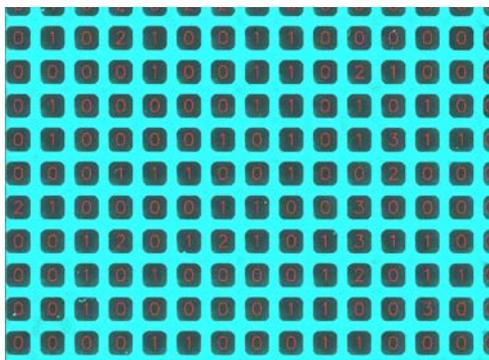
また、1 個の細胞のみ回収もできていることがわかる。



○ソフトウェアの開発

ウェル内に細胞がいくつ入っているかを自動でカウントするソフトウェアを東京大

学の池内講師らのグループが作成した。デモ画像を以下に示す。0-3 個の数量が一目瞭然と判定できる。



平成 28 年度から 29 年度にかけて、メンブレンと成形品を接合させた製品を完成させ、順次販路開拓を行っていく予定である。