

平成23年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「金型成形プラスチックマイクロ流路型チップの加工精度
向上による実用的なバイオアッセイシステムの開発」

研究開発成果等報告書

平成24年 11月

委託者 関東経済産業局
委託先 株式会社つくば研究支援センター

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-2 研究体制	3
1-3 成果概要	5
1-4 当該研究開発の窓口	6
第2章 本論	7
1 金型技術の開発	7
1-1 マイクロ流路型チップ金型構造の開発	7
1-1-1 マイクロ流路解析	8
1-2 細胞接着性制御機能を有したマイクロ流路型チップの開発.....	9
1-3 金型加工用マイクロ流路の開発.....	11
2 装置の開発.....	12
2-1 送液及び光検出方法、自動装置の開発	12
3 バイオアッセイの最適化.....	14
3-1 細胞アッセイの最適化の検討.....	14
3-2 遺伝子レベルでのバイオアッセイの検証	16
3-3 タンパク質レベルでのバイオアッセイ	17
4 システムの事業化	18
4-1 専用検査試薬のキット化	18
最終章 全体総括	19

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

研究開発の背景

生細胞の各種刺激に対する生理活性を評価する従来の方法である生物学的応答評価（バイオアッセイ）法は、煩雑な操作性、低い再現性、長い検査時間などの問題のために汎用性が低い。(株)生体分子計測研究所にて開発実績があるマイクロ流路方式を採用した自動化システムを開発することでこれらの問題解決が可能になり、汎用性の高い実用的なバイオアッセイ技術を確立・普及することが期待できる。

しかし、マイクロ流路内で堰き止める細胞の最小サイズは約10 μ mで、金型成形プラスチックマイクロ流路型チップを作製する際の加工限界でもある。本加工限界を解消することが本開発における主課題である。

研究目的

金型成形品の高精度化技術であるマイクロ流路解析技術を活用して、マイクロ流路の加工限界である10 μ m以下のギャップの加工再現性を向上させた高精度マイクロ流路を開発し、汎用性の高いバイオアッセイシステムを開発・実用化することを目的とした。

本目的を実現するため、Ⅰ. 金型技術の開発、Ⅱ. 装置の開発、Ⅲ. バイオアッセイの最適化、及びⅣ. システムの事業化の各テーマについてそれぞれ以下に示す項目を抽出し開発を進めた。

Ⅰ. 金型技術の開発	
1. マイクロ流路型チップ金型構造の開発	担当 (株)生体分子計測研究所
1-1. マイクロ流路解析	担当 (株)生体分子計測研究所
2. 細胞接着性制御機能を有したマイクロ流路チップの開発	担当 (独)産業技術総合研究所 A* 担当 (株)生体分子計測研究所
3. 金型加工用マイクロ流路の開発	担当 (株)生体分子計測研究所
* (独)産業技術総合研究所 A : (独)産業技術総合研究所 健康工学研究部門 ストレスシグナル研究グループ	
Ⅱ. 装置の開発	
1. 送液及び光検出方法、自動化装置の開発	担当 (株)生体分子計測研究所

Ⅲ. バイオアッセイの最適化	
1. バイオアッセイの最適化の検討	担当 (株)アレナビオ 担当 (株)生体分子計測研究所 担当 (国)筑波大学
2. 遺伝子レベルでのバイオアッセイの検証	担当 (独)産業技術総合研究所 B * *
3. タンパク質レベルでのバイオアッセイの検証	担当 (株)アレナビオ 担当 (国)筑波大学

* * (独)産業技術総合研究所 B : (独)産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 シグナル分子研究グループ

Ⅳ. システムの事業化	
1. 専用検査試薬のキット化	担当 (株)生体分子計測研究所 担当 (株)アレナビオ 担当 (国)筑波大学

目標

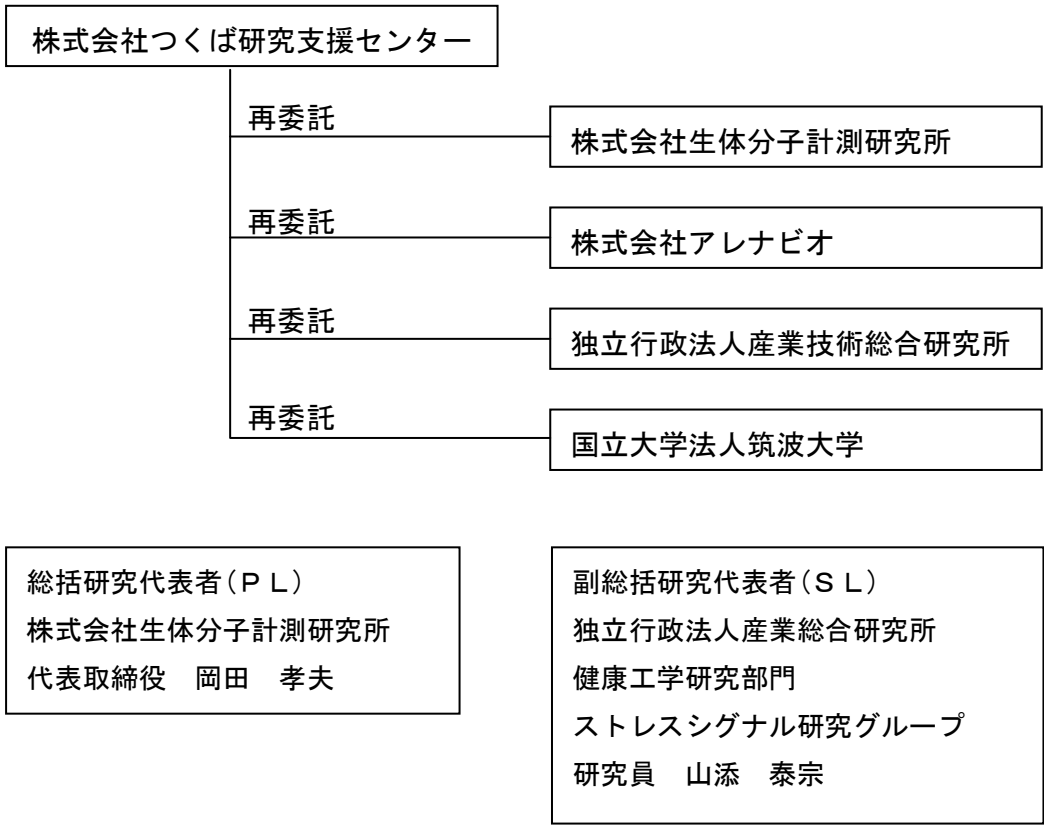
最終年度平成23年度の目標は次のとおりである。

- ・最終目標である加工再現性のよい10 μ mギャップ構造設計を目標とする。ギャップ加工精度は「マイクロ流路解析技術」により評価する。更に、再現性のよいバイオアッセイを検討するため、昨年度1次仕様を決定したマイクロ流路チップをベースに使用する。
- ・細胞接着性制御機能の検証及び検討、細胞アッセイの実施による流路構造の検証及び検討を行う。
- ・バイオアッセイシステムについては、昨年度開発した1次試作機の撮像機能を開発する。次に本試作機を用いた細胞アッセイ試験を通じ、流路チップデザイン、装置仕様及びプロトコルの最適化を行う。更に、以上の結果を反映した分注・排出自動化装置を開発し1次試作機に追加する。
- ・バイオアッセイの最適化においては、マイクロ流路チップを用いた各種細胞検体のスケールダウンプロトコル試験を行う。同時に、DNAチップ法を用いた各処理能力や感度・精度に関する遺伝子レベルの検証と、タンパク質レベルの詳細検討を行う。
- ・10 μ mギャップ構造の金型マイクロ流路型チップを用い、試作バイオアッセイシステム（検定自動化装置）により、実際に細胞バイオアッセイを実施することで統合検証を行う。その結果を基に、金型マイクロ流路型チップの他、検定自動化装置及びバイオアッセイプロトコルの最適化を行うことで実用化を目指す。
- ・検定自動化装置については、画像方式による光検出系の開発、統合検証による最適化に伴う装置本体の改良及び制御系の一体化など必要に応じた修正を行う。
- ・バイオアッセイの最適化においては、上記統合検証における金型マイクロ流路型チップと細胞を用いた繰り返しバイオアッセイ試験により、開発プロトコルの信頼性・再現性及び検出感度の評価・改善を行う。
- ・システムの事業化においては、細胞生存性試験を行うためのマイクロ流路型チップと細胞のキット化の検討を行う。

1-2 研究体制

研究組織・管理体制

以下の図に示すように、株式会社つくば研究支援センターを事業管理機関とし、株式会社生体分子計測研究所、株式会社アレナビオ、独立行政法人産業技術総合研究所、国立大学法人筑波大学の共同体制により開発を行った。



研究者氏名

株式会社 生体分子計測研究所

岡田 孝夫	代表取締役
エル オリ アデルファテ	先端計測解析センター 研究員
杉山 幸宏	先端計測解析センター 次長
佐々木 美穂	先端計測解析センター 研究員
山本 憲司	先端計測解析センター 課長
石黒 正純	生体分子計測事業部 主任研究員

株式会社 アレナビオ

藤井 壮一郎 代表取締役

独立行政法人 産業技術総合研究所

山添 泰宗	健康工学研究部門 ストレスシグナル研究グループ 研究員
木山 亮一	バイオメディカル研究部門 シグナル分子研究グループ 主任研究員

国立大学法人 筑波大学

磯田 博子	大学院 北アフリカ研究センター 教授
韓 峻奎	大学院 北アフリカ研究センター 准教授

1-3 成果概要

マイクロ流路チップの開発

- 加工再現性のよい 10 μ mギャップ構造の金型マイクロ流路チップを設計・作製した。
- 「マイクロ流路解析技術」により 10 μ mギャップ加工精度を評価し、試薬微粒子発生に伴うギャップ詰りと、吸引圧力上昇の問題を発見した。
- 架橋アルブミンフィルムでコーティングしたマイクロ流路チップを用いて抗癌剤の細胞アッセイを行うことができた。
- サイズの異なる細胞を用いたアッセイにおいて、接着細胞ではギャップのすり抜けは確認できなかった。

装置の開発

- ピペット操作自動化のための自動分注・排出機構を開発し、1次試作機と組合せた

検定自動化装置を開発した。

- 1次試作機の蛍光測定機能と併用可能な吸収測定機能を開発し、両分光測定機能を統合した。
- 装置統合制御機能とユーザインタフェース機能を開発し、ユーザビリティの向上した検定自動化装置の開発に成功した。

バイオアッセイの最適化

- 従来法の細胞アッセイで使用されるプレートとマイクロ流路チップによる両アッセイを比較し、結果に差がないことを確認した。
- アッセイ時に発生する微粒子による 10 μ mギャップの詰りを解消するプロトコルを開発した。
- 遺伝子レベルでマイクロ流路チップを用いたバイオアッセイを検証するために、評価用標準 DNA チップシステムの構築を行い、ホルモンなどの刺激により変動する遺伝子を指標としてマイクロ流路チップを用いた細胞のバイオアッセイシステムの評価を行った。結果は、マイクロ流路チップは従来の細胞培養シャーレとの差は認められなかった。
- タンパク質レベルの検証では従来法プレートとマイクロ流路チップによる二次元電気泳動試験を行い、両者の結果に差が認められないことが確認された。

1-4 当該研究開発の窓口

株式会社 つくば研究支援センター 研究支援部 次長 高田 青史

〒305-0047 茨城県つくば市千現2-1-6

Tel : 029-858-6061、Fax : 029-858-6014

E-mail: takata@tsukuba-tci.co.jp

第2章 本論

1 金型技術の開発

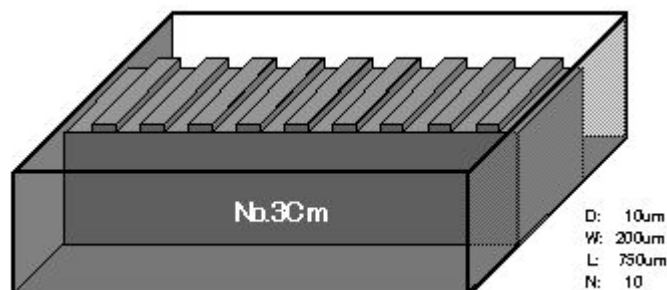
1-1 マイクロ流路チップ金型構造の開発

プラスチック部品の貼り合わせ変形が抑制される $10\mu\text{m}$ ギャップ構造設計を試作検討した。昨年度 $20\mu\text{m}$ デザイン No. 1C で見出した、ギャップがつぶれないアスペクト比(ギャップ幅:ギャップ深さ) $10:1$ によるギャップ深さ $10\mu\text{m}$ の流路チップ No. 3C を試作しギャップ評価を行った。評価は、レーザ計測、後述のマイクロ流路解析技術、および細胞活性評価試験により実施した。

その結果、流路チップデザインを No. 1C から No. 3C に変更することで、以下3つの課題が生じた。

- (1) 溶液がギャップを通過するのに要する圧力が、No. 3C は No. 1C の8倍になり溶液が流れ難くなる。
- (2) 従来法の細胞活性試験で使用されるMTT試薬の反応により生成される微粒子が、狭くなったギャップに詰まるようになった。
- (3) No. 3C の小流路幅を $100\mu\text{m}$ としたことにより精密な金型加工精度を要することになり金型製造コストが大幅に高額になる。

(1) については「2-1. 装置の開発」における分注・排出機構により解決した。(2) については「3-1. バイオアッセイの最適化」におけるプロトコルの最適化により解決した。ここで、課題(3)は金型加工精度を従来精度に戻すことにより解決した。下図がそのデザイン No. 3Cm である。



ギャップ深さ $10\mu\text{m}$ 、小流路幅 $200\mu\text{m}$ 、そして小流路の長さを $750\mu\text{m}$ に短くすることでギャップを溶液が通過させるのに要する吸引圧力差を低く抑えられる。ハーゲン・ポアズイユ式に基づく計算により No. 3Cm の吸引圧力差は No. 1C よりさらに大きい10倍程になる。下表はギャップ構造デザインの経緯である。

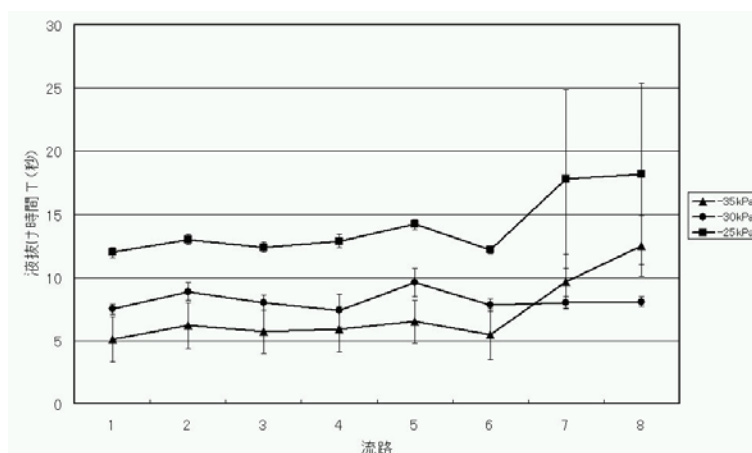
	深さ D(μm)	小流路幅 W(μm)	ギャップ長さ L(μm)	小流路の数 N
No. 1C	20	200	1,000	10
No. 3C	10	100	1,000	20
No. 3Cm	10	200	750	10

1-1-1 マイクロ流路解析技術

試作マイクロ流路の 10 μ m ギャップ精度を「マイクロ流路解析技術」により評価検討した。マイクロ流路解析技術は流路に吸引により蛍光試薬を流し、蛍光試薬が流れきる時間の長短でギャップ加工精度を評価する解析法である。

蛍光試薬（溶液）が流路を流れ切る時間、液抜け時間（T）はギャップ深さ（h）に反比例する（ $T \propto 1/h$ ）ので、ギャップ深さの精度を時間の精度として評価することができる。更に液抜け時間は、流れのボトルネックとなるギャップ表面の加工精度や貼り合わせ精度にも依存する。液抜け時間 T の比較により、各流路の液体の流れに関するギャップの「加工精度」を評価することができる。

マイクロ流路解析技術により、マイクロ流路チップデザイン No. 3C と No. 3Cm の液抜け時間測定を実施した。マイクロ流路チップ No. 3C の各吸引圧力 -35kPa, -30kPa, -25kPa における 8 つの各流路液抜け時間を各 4 回ずつ測定し平均を取った（下図）。各吸引圧力は大気圧との圧力差であり差が大きいほど吸引力が大きく、流路の液抜け時間は短くなっている。吸引圧力 -30kPa における液抜け時間は 8 秒程度を中心に全流路でほぼ安定していた。流路のギャップ精度は安定していると考えられる。吸引圧力 -25kPa



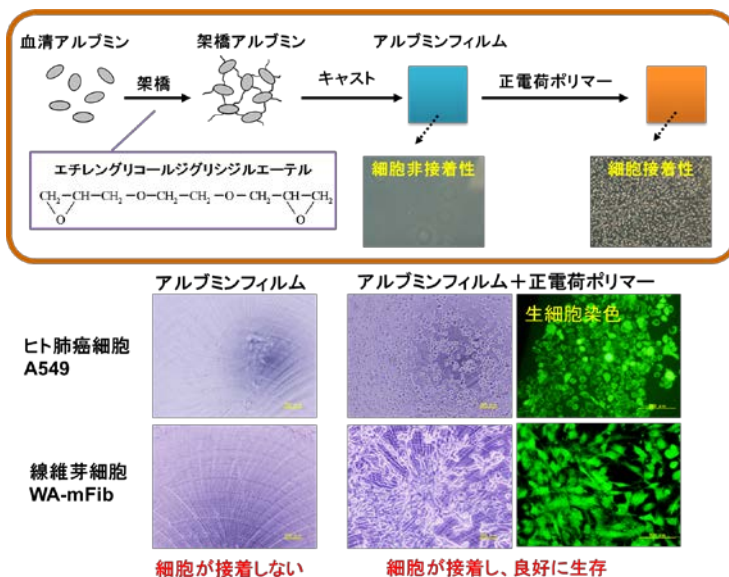
および -35kPa における流路 1～6 の測定結果も同様な傾向を示していた。ここで、-35kPa と -25kPa では流路 7 と 8 で液抜け時間が長くなっている。原因は流路 7 と 8 のギャップ部分に蛍光試薬の可溶化しきれなかった微粒子の詰まったためである。一度ギャップに詰まった微粒子の排除は困難であった。この結果は重要である。本マイクロ流路チップを使用する限り、細胞アッセイに使用する全ての試薬はフィルターを通すなどして微粒子発生の可能性のあるものを除く必要があることを示唆している。また、試薬反応により微粒子（微結晶）が生じる場合がある。アッセイに使用する試薬またはプロトコルの変更が必要である。

マイクロ流路チップ No. 3Cm でも同様に、蛍光試薬による吸引測定を試みた。しかし、No. 3Cm は No. 1C の 10 倍程度の吸引圧力差を要する。実際に、吸引しても溶液（蛍光試薬）がほとんど流れず測定に至らなかった。そこで、流路の排出口側にピペットチップを差込み密閉することで、内部の吸引圧力を高める“密閉吸引方式”を検討した。マイクロ流路チップ No. 3Cm を用いた検討の結果、本方法によりギャップを介した溶液吸引が確認できた。

1-2 細胞接着性制御機能を有したマイクロ流路型チップの開発

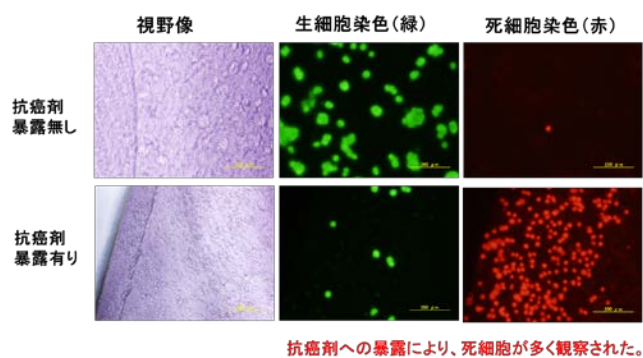
①マイクロ流路チップへのアルブミンフィルムのコーティング、及び、流路内での細胞培養

架橋処理を施したアルブミン溶液をキャストすることで作製した水に不溶性のアルブミンフィルムは細胞が接着しない性質を有している。一方、このフィルムを正電荷ポリマーに暴露することで細胞接着性に変換することができる。この細胞接着性を制御できるフィルムをマイクロ流路チップ表面にコーティングし、流路内の細胞接着性の制御を可能とした。アルブミンフィルム上には繊維芽細胞や肺癌細胞が全く接着せず、正電荷ポリマーに暴露したフィルム上には良好に接着した。また、接着した細胞の良好な生存も確認できた。



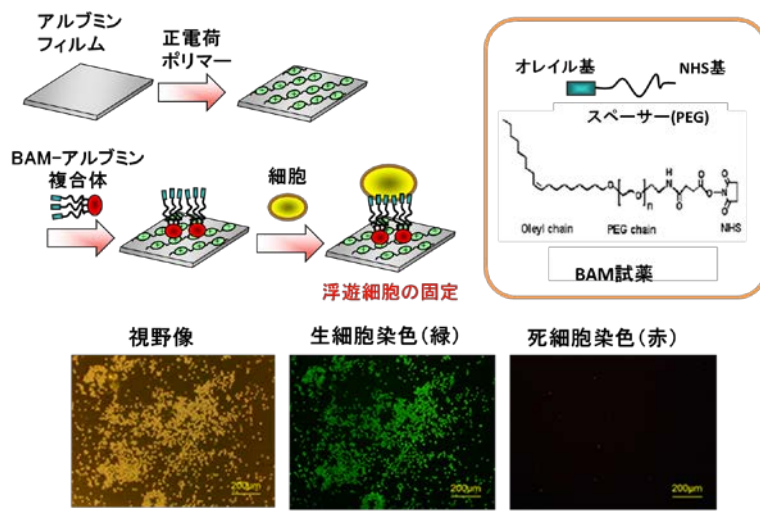
②マイクロ流路内における抗癌剤の細胞アッセイ試験

マイクロ流路チップ内に肺癌細胞を接着させた後、肺癌治療に最も良く用いられている抗癌剤であるシスプラチンに暴露した。生細胞、及び、死細胞染色色素で染色した結果、抗癌剤に暴露しない場合には細胞が良好に生存していたが、暴露した場合には多くの細胞が死滅していることが分かった。このように、マイクロ流路チップ内において、抗癌剤の細胞アッセイ試験を行えることを実証した。



③アルブミンフィルムと細胞膜修飾試薬を用いた浮遊細胞の固定化

アルブミンフィルムを正電荷ポリマーに暴露後、細胞膜修飾試薬 BAM とアルブミン複合体を吸着させ、その上に浮遊細胞を播種することで、Jurkat や 32D 細胞等の浮遊細胞を良好に基板の上に固定化することに成功した。また、フィルム上に固定化した浮遊細胞の良好な増殖と生存を確認することができ、アルブミンフィルムと BAM-アルブミン複合体を利用することで、浮遊細胞の固定化、及び、固定化状態での培養を実現できた。



良好な生存状態を保ちながら浮遊細胞を固定化することができた。

1-3 金型加工用マイクロ流路の開発

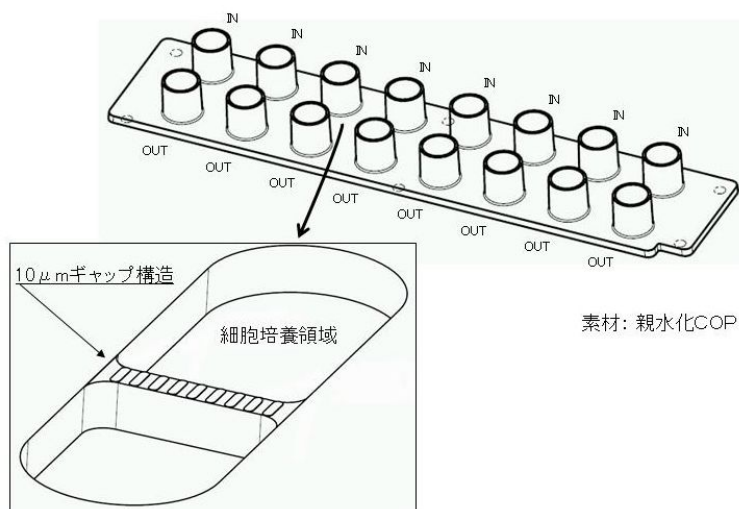
金型加工用マイクロ流路の最適化仕様の検討と、評価検討を行った。No. 3Cm デザインのマイクロ流路チップを用い、サイズの異なる3種類の細胞を使用することにより、細胞のギャップすり抜け評価を行った。

細胞 PC12、Caco-2、および RBL-2H3 (RBL-2H3 は PC12 や Caco-2 よりも小さい) の3種類を、さまざまな濃度でマイクロ流路チップ No. 3Cm 流路の細胞培養層側に播種して培養した。最後に MTT 染色により、流路の細胞培養層とギャップを挟んだ排出層を観察し細胞の有無を評価した。

各細胞の流路中播種濃度は 1, 250、2, 500、5, 000、および 10, 000 cells であった。分注の際、流路の排出層側に先に各細胞用培地を $40\mu\text{L}$ ずつ分注した。後から各細胞分散液を分注口側から $60\mu\text{L}$ ずつ分注した。MTT 処理後の流路分注層、ギャップ部分、排出層における生細胞を観察した。

観察の結果、PC12 細胞、Caco-2 細胞共に、ギャップ部分にも排出層にも入り込みは確認できなかった。ただし、サイズの一番小さな RBL-2H3 細胞だけが、少数ギャップ部分への入り込みが確認された。しかし、排出層への入り込みは確認できなかった。

開発されたマイクロ流路チップ No. 3Cm は、細胞培養層側でのみ接着細胞を培養できることが確認できた。接着細胞では、ギャップを介する排出層側への細胞の入り込みを抑制できることが確認できた。下図は全ての開発検討項目を反映した金型成形マイクロ流路チップである。



2 装置の開発

2-1 送液及び光検出方法、自動装置の開発

昨年度開発した1次試作機は、マイクロ流路チップ用のホルダ、インキュベータ、およびカメラ撮像方式の蛍光測定系から構成される細胞アッセイ基本システムである。

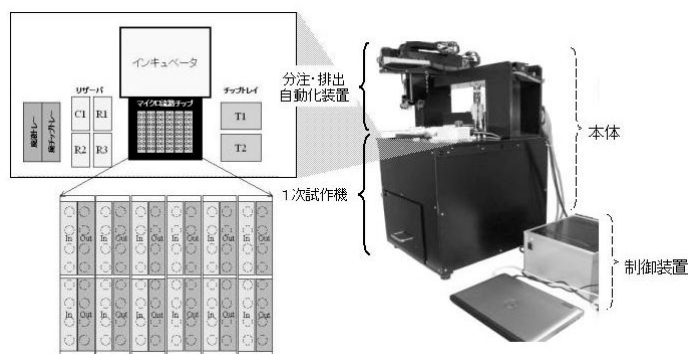
今年度は、蛍光/吸収測定併用可能な撮像方式の分光測定系、溶液の自動分注・排出を実行するピペトロボット（分注・排出自動化装置）、そしてユーザビリティ向上のためのインターフェース（ハード及びソフト）の開発を行い、全てを集約した最適化された検定自動化装置を製作した。

撮像式吸収測定機能の開発

1次試作機の蛍光測定系と併用可能な吸収測定系と解析・統合プログラムを開発した。光学系の基本構成は蛍光測定系と同じにすることができた。蛍光測定時はサンプル自体が光源になるが吸収測定時は背景が光源になる。サンプルが影になるので背景（光源）が明るすぎるとコントラストが出ない。光源が微弱になるため高感度カメラに変更した。

分注・排出自動化装置の開発による検定自動化装置の開発

各流路への細胞の播種、培地や試薬などの分注・排出などを行うピペトロボット（分注・排出自動化装置）を開発し、1次試作機と組合せた検定自動化装置を試作した（右図）。さらに、インキュベータや分光測定機の制御機能も追加した。



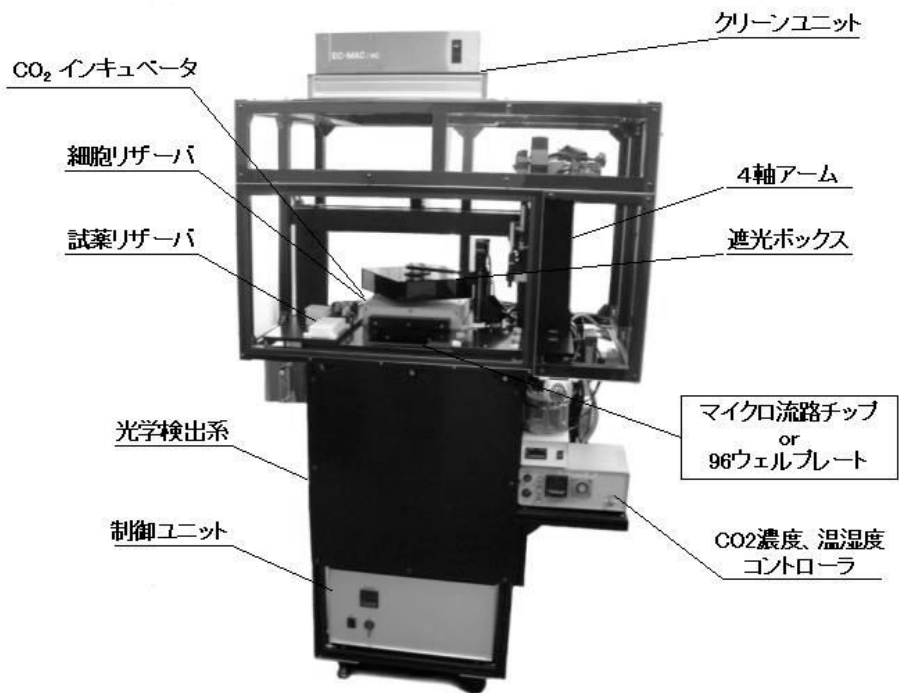
検定自動化装置の最適化によるユーザビリティの向上

検定自動化装置の使用にあたり、ユーザの負担を極力軽減させるインターフェース（ハードとソフト）を開発することでユーザビリティを向上させた。ユーザがプロトコルデータを作成して入力するだけで装置はアッセイをスケジュールして実行する。実験終了後の結果はレポートとして出力される。入力用プロトコルデータ作成フォーム（仕様）とその解析プログラムを開発した。例えば、右図はプロトコル作成画面の実験フロー入力画面の例である。また、付随する装置制御系も製作した。



最適化検定自動化装置の開発

本開発全てを集約した検定自動化装置を製作した（次図）。



3 バイオアッセイの最適化

3-1 細胞アッセイの最適化の検討

3-1-A マイクロ流路型チップと従来型プレートによる細胞アッセイの比較

本検証では「マイクロ流路型チップ」と同素材 96 ウェル プレートもしくは「マイクロ流路型チップ」により培養した細胞を用いたアッセイ結果と、従来型「96 ウェルプレート」により培養した細胞を用いたアッセイ結果の比較を行った。本実験では一型アレルギーの細胞モデルを用い、抗アレルギーアッセイを行った。その結果、「マイクロ流路型チップ」と同素材 96 ウェル プレート (Sapoin-96 well) と従来型「96 ウェルプレート」(Lab-96 well) ではほぼ同じ傾向の結果が得られた。

細胞アッセイにおける最適化の検討を行うため、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の細胞形態における影響を調べた。本実験では、抗アレルギーアッセイで用いられるラット好塩基性白血病細胞である RBL-2H3 を使用した。RBL-2H3 細胞は刺激を受けると滑らかだった細胞表面が荒れた状態になる。

本実験では、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の RBL-2H3 細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した結果、細胞形態において異なる点は見られなかった。

以上の結果から、「マイクロ流路型チップ」の素材は、バイオアッセイ用「マイクロ流路型チップ」として問題ないと考えられる。

更に、「マイクロ流路型チップ」の遺伝子発現に及ぼす影響を調べるため、従来型「96 ウェルプレート」で培養した RBL-2H3 細胞から抽出した Total RNA と「マイクロ流路型チップ」の Total RNA を用いて遺伝子発現への影響を調べた。本実験では、mRNA の発現をリアルタイム PCR を用いて遺伝子発現における比較を行った。アレルギー発症と関係があるサイトカイン遺伝子である IL-4、IL-6、IL-13、Fcer1、TNF の mRNA 発現における比較を行った。

まず、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の Total RNA の濃度と純度の比較を行った結果、陰性対象の Total RNA 濃度以外は大きな差は確認できなかった。平均的な Total RNA の抽出量として HeLa 細胞 (1.0×10^6 cells) の場合、4~12 μ g 程度であることから、「マイクロ流路型チップ」の Total RNA 抽出量は問題無いと考えられる。さらに、Total RNA の純度においては「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」で大きな差は確認できなかった。以上のことから、「マイクロ流路型チップ」の Total RNA 抽出は「96 ウェルプレート」と同様な方法で可能であることが確認できた。

「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の Total RNA を用いた逆転写反応後の cDNA の濃度や純度を比較した結果、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の cDNA の濃度や純度において大きな差は見られなかった。

上記の cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った結果、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の遺伝子発現において陰性対象を 1 にした遺伝子 (IL-4、IL-6、IL-13、Fcer1、TNF) の発現が、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」においてほぼ同じ傾向を示した。特に、IL-4 においては、「マイクロ流路型チップ」のほうが感度が高いことを見出した。IL-4 はアトピー、花粉症などの一型アレルギーにおいて、Th2 細胞のサイトカインとして抗アレルギー作用やアレルギー発症に関与する IgE の産生を促進するサイトカインの一つであることが報告されている。

以上に結果から、遺伝子レベルでの「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の比較ではほぼ同じ結果が得られたことから、「マイクロ流路型チップ」のバイオアッセイ用としての利用が可能であることを確認した。

3-1-B マイクロ流路チップに適したプロトコルの検討

本開発の細胞アッセイ法のモデルである細胞生存性試験において、MTT法はポピュラーなプロトコルである。しかし、10 μ mギャップ構造の検討においてMTTの反応により生成されるホルマザンが微粒子となってギャップに詰まる問題が明らかになった。その他にもMTT法には以下のような課題がある。

1. 流路チップの分注容量は従来型プレートのウェル容量に比較して少ない。しかし、MTT法の反応では培地とMTTとSDSの3種類の溶液反応が必要なため、総溶液量は多くなる。
2. MTT法は結果を得るのに時間を要する。(2日以上)
3. 反応に要する試薬の数が多。(MTTの他にSDSが必要)
4. MTT法の感度

そこで、MTT以外の最適なプロトコルを検討することにした。

微粒子化は、MTTが粉末試薬であることが主な原因である。そこで、MTTと同様な効果がある液体試薬のMTSとWSTとの比較で検討することとした。検討には、白血病細胞のHL60、神経細胞のPC12、子宮頸癌由来細胞のHeLa、および肺癌細胞のA549の4種類の細胞を使用した。

試験開始前に、HL60細胞はRPMI培地に10%FBSと1%ストレプトマイシン・ペニシリンを添加したもので増殖させ、継体培養を5回行った。PC12細胞はDMEM培地に10%HSと5%FBSと1%ストレプトマイシン・ペニシリンを添加したもので増殖させ、継体培養を4回行った。HeLa細胞はDMEM培地に10%FBSと1%ストレプトマイシン・ペニシリンを添加したもので増殖させ、継体培養を3回行った。A549細胞はDMEM培地に10%FBSと1%ストレプトマイシン・ペニシリンを添加したもので増殖させ、継体培養を6回行った。ここで、各細胞の96ウェルプレートへの播種濃度は、100、1,000、5,000、および10,000 cells/wellとした。

MTS(A)、WST(B)、およびMTT(C)それぞれは、各細胞培養開始後24時間、48時間、および72時間後に添加した。MTSとWSTについては各時間後からそれぞれ490nmの吸収、450nmのODを1時間間隔で測定した。MTTについては各時間後から4時間および24時間経過後に10%SDS添加によるフォルマザン可溶化開始時点から570nmの吸収を1時間間隔で測定した。

MTS、WST、およびMTTそれぞれを用いたプロトコル比較のため、HL60細胞、PC12細胞、HeLa細胞、およびA549細胞を用いた生存性試験を行った。

HL60細胞、PC12細胞、HeLa細胞、およびA549細胞のいずれもMTS、WST、およびMTTの違いにかかわらず濃度、培養時間、反応時間に依存した同様な傾向を示していた。感度についてはWST使用時が比較的高かった。MTS、WSTはMTTと異なり液体試薬のため微粒子は生じない。また、MTT法におけるSDSのようなフォルマザンの可溶化過程も不要なので、試験期間が短縮できる。マイクロ流路チップを用いる本バイオアッセイシステムの細胞生存性試験では、MTTの代わりにWSTもしくはMTSが適当である。

3-2 遺伝子レベルでのバイオアッセイの検証

開発されたマイクロ流路型チップによる細胞検体の処理能力を評価するために、ホルモンなどの刺激により変動する遺伝子を指標として変動の感度と精度を測定し、変動係数や危険率を算出して評価を行った。

平成23年度は、マイクロ流路型チップの改良点を評価するために以下の実験を行った。

1. 標準とするシャーレとマイクロ流路型チップの素材(COP基板)で作成したシャーレ(COPシャーレ)それぞれでエストロゲン存在/非存在下で培養した細胞の増殖率を比較するためのプロトコルを作成した。また、DNAチップ法による遺伝子発現プロファイルにより評価を行うために、変動係数によって再現性を評価するためのプロトコルを作成した。
2. 上記のプロトコルに従って、細胞増殖実験によりCOPシャーレを評価した。
3. 上記のプロトコルに従って、DNAチップ法によりCOPシャーレを評価した。
4. マイクロ流路型チップを用いてエストロゲンの応答性について細胞増殖実験により検証を行った。
5. 1項の結果をさらに遺伝子レベルで評価するために、リアルタイムRT-PCR法を用いてエストロゲンによる細胞の遺伝子発現変動を解析した。

・実験結果のまとめ

細胞増殖実験を行った結果、標準シャーレとCOPシャーレそれぞれで培養した細胞の数はほぼ同じになった。また、上記のシャーレを用いてエストロゲンに対する細胞の応答を検証するために細胞増殖実験を行った。その結果、標準シャーレとCOPシャーレの間で、細胞増殖率に違いは見られなかった。

さらに、DNAチップアッセイにより検証を行った結果、2回の実験の間は高い相関が見られた。また、我々が過去に行った実験結果(標準データ)との間も高い相関が見られた。

さらに、リアルタイムRT-PCR法により遺伝子レベルで解析したところ、今回マイクロ流路型チップによる遺伝子発現変動の結果は以前の結果とほぼ同じ変動を示した。

・全体の結論

マイクロ流路型チップによるバイオアッセイシステムはエストロゲンを用いた細胞増殖と遺伝子発現変動により検証した結果、問題はないと考えられる。また、遺伝子レベルでも評価を行った結果、問題はないと考えられる。

3-3 タンパク質レベルでのバイオアッセイの検証

本検証では「マイクロ流路型チップ」と同素材 96 ウェル プレートもしくは「マイクロ流路型チップ」により培養した細胞から抽出したタンパク質と、従来型「96 ウェルプレート」から抽出したタンパク質の発現比較を行うため、細胞の全タンパク質のマップ化が可能な二次元電気泳動手法 (2-Dimensional electrophoresis) を用いた。

まず、「マイクロ流路型チップ」と同素材 96 ウェルプレートでの二次元電気泳動を行った。その結果、銀染色 (Silver stain) を行うために十分なタンパク質の抽出ができた。二次元電気泳動後に銀染色を行った結果、スポットの比較が可能な全タンパク質のマップが得られた。

更に、「マイクロ流路型チップ」により培養した細胞から抽出したタンパク質と、従来型「96 ウェルプレート」により培養した細胞から抽出したタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。タンパク質濃度は、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」における差は見られなかった。1x10⁶ cells における HeLa 細胞のタンパク質濃度は 100~200 μg 程度であり、「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」のタンパク質濃度と大きく異なることは無かった。

CBB で染色したゲルも「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」の大きな差は認められなかった。

以上の結果からタンパク質レベルにおいても「マイクロ流路型チップ」と「96 ウェルプレート」において大きな差は無かったことから「マイクロ流路型チップ」がアッセイ用のチップとして問題ないことを見出した。

4 システムの事業化

4-1 専用検査試薬のキット化

本研究開発後の事業化に向けて、マイクロ流路チップ用細胞アッセイキットの仕様を検討した。

開発した環状ポリオレフィン（COP）性のマイクロ流路チップによる細胞アッセイ試験では、従来法のマイクロプレートやシャーレと同様な結果が得られることが明らかになった。つまり従来法で実施されていたプロトコルがほぼ適用できることになる。一方、マイクロ流路には $10\mu\text{m}$ の狭いギャップがあるため、目詰まりの原因となる微粒子が発生し難いプロトコルに修正する必要があるがあった。細胞生存性試験の代表的方法であるMTT法では微粒子が目詰まりを生じた。そこで、目詰まりを生じない、液体試薬WSTまたはMTSを用いるマイクロ流路チップに適したプロトコルを開発した。また、マイクロ流路チップでは使用する試薬量が従来法と比較して少なくて済む。例えば、96ウェルプレートの場合と比較すると試薬量は1/2程度でよい。

本開発のバイオアッセイシステムの検定自動化装置ではプロトコルデータに基づきアッセイが実施される。即ち、本開発向けの細胞アッセイキットは、試薬、マイクロ流路、および専用プロトコルデータから構成される。

【細胞アッセイキットの仕様】

- * 試薬
- * マイクロ流路チップ
- * プロトコルデータ

ところで、本検定自動化装置はプレート、インキュベータ、および蛍光/吸収測定を用いる試験であれば、細胞アッセイ以外の試験にも適用できる。細胞アッセイ以外の試験系への適用可能性の検討として、以下のよく知られるケミカル試験を行った。

1) フォーリン・チオカルト試験

食品中などサンプル中の総ポリフェノールを定量する方法である。96ウェルマイクロプレートを用いた比色定量を行った。サンプル量を従来法の1/2, 1/4, 1/8, および1/16とした比較を行った。没食子酸(Gallic acid)をスタンダードとしたサンプルの検量線から、サンプル量1/4までは検定可能であることが確認できた。

2) DPPH試験

サンプル中の抗酸化能を測定するための方法である。96ウェルマイクロプレートを用いた比色定量を行い検定可能な直線性が得られることを確認できた。

いずれも問題なく試験可能でありキット化可能である。

最終章 全体総括

従来の生細胞の各種刺激に対する生理活性を評価する生物学的応答評価（バイオアッセイ）法には、煩雑な操作性、低い再現性、長い検査時間などの課題があった。そこで本開発は、これらの課題を改善するため、培養、反応及び検出までをシステム化した簡便なバイオアッセイシステムの実現を目指した。我々は、従来法の問題点であるヒューマンエラーによる再現性の低下や操作の煩雑性に注目し、その解決方法として金型成型加工技術の向上による高精度化されたマイクロ流路型チップと、それを用いるシステムの開発を目指した。以下は、各実施項目における研究開発成果である。

本開発の研究開発成果

1. 金型技術の開発

ギャップ部分に柱を設けることにより、上下プラスチック部品の貼り合せによる変形を抑制する流路ギャップ構造を設計し試作した。最終的に 10 μ m ギャップの形成に成功した。ギャップ加工精度の評価には、液体の流速均一性を評価できるマイクロ流路解析技術を用いた。10 μ m ギャップデザインでは、用いる試薬微粒子がアッセイ中に発生しギャップに詰まる問題と、溶液のギャップ通過時に大きな吸引圧力を要する問題が明らかとなった。それぞれの問題は、プロトコルの最適化と、装置開発により解決した。

マイクロ流路チップの素材を環状ポリオレフィン（CPO）に決定した。架橋アルブミンフィルムを利用することで、CPO 基板上への細胞の接着挙動を制御することができた。また、架橋アルブミンフィルムの細胞接着性を変換するための条件を最適化することができた。アルブミンフィルムと細胞膜修飾試薬を用いることで浮遊系、及び、接着系細胞の両方を基板上に固定化することができた。更に、架橋アルブミンフィルムでコーティングしたマイクロ流路チップを用いて抗癌剤の細胞アッセイを行うことができた。

マイクロ流路チップはピペットロボットによる分注・排出を考慮し、上部に分注・排出口を設け、下部から光検出できる構造とした。

サイズの異なる細胞を用い、接着細胞が適当な分注・排出プロセスによりギャップをすり抜けられないことが確認できた。浮遊細胞については今後の目標である。

2. 装置の開発

ピペット操作の自動化のための自動分注・排出機構を開発し、昨年度開発した 1 次試作機を組み合わせた検定自動化装置（試作機）を開発した。また、従来の蛍光測定機能と併用可能な吸収測定機能を開発し、両分光測定機能を統合した。更に最終目標とするユーザビリティ向上に必要な装置統合制御機能とユーザインタフェース機能を開発し、最適化された検定自動化装置の開発に成功した。

3. バイオアッセイの最適化

従来法の細胞アッセイを基に、マイクロ流路チップおよびシステム用のプロトコルの開発と検証を行った。各種細胞のバイオアッセイのスケールダウンを含む最適条件（プロトコル）を見出した。従来法のプレートとマイクロ流路チップによる両アッセイを比較し、結果に差が無いことも確認できた。更に、上記 10 μ m ギャップ構造の評価で見出された使用試薬に起因する微粒子発生の問題を回避するためのプロトコルを開発した。

遺伝子レベルでマイクロ流路チップを用いたバイオアッセイを検証するために、評価

プロトコルの作成、細胞培養アッセイ系の構築、評価用標準 DNA チップシステムの構築を行い、ホルモンなどの刺激により変動する遺伝子を指標として変動の感度と精度を測定し、変動係数や危険率を算出してマイクロ流路チップを用いた細胞のバイオアッセイシステムの評価を行った。その結果、マイクロ流路チップによるアッセイと従来の細胞培養シャーレによるアッセイとの差は認められなかった。

タンパク質レベルでの検証では各種細胞を用い、既存の各種タンパク質マーカーにおける発現をリアルタイム PCR 手法を用いて測定評価した。さらに、二次元電気泳動手法を用いた測定評価によってもマイクロ流路チップによるアッセイと従来法プレートによるアッセイとの差は認められなかった。

4. システムの事業化

本研究開発後の事業化に向けた、マイクロ流路チップ用細胞アッセイキットの仕様を検討した。細胞アッセイキットは、試薬、マイクロ流路チップ、および検定自動化装置用のプロトコルデータから構成される。また、細胞以外のアッセイでもキット化は可能であることが確認できた。

研究開発後の課題と事業化展開

事業前倒しにより、本開発の目標とした①マイクロ流路チップ、②バイオアッセイシステム、および③プロトコルを早期に開発することができた。④キット化の基本仕様も決定した。

現時点の状況と課題は、次の通りである。①マイクロ流路チップは、本開発の外注先であった住友ベークライト社から仕入れできる状態にある。②バイオアッセイシステムは、検定自動化装置（試作機）を基に最適化（製品化）仕様を決定し、実証機（最適化検定自動化装置）が完成した。外注製作可能な状態である。ただ、ユーザニーズに応えるためには、④バイオアッセイキット開発と併せた継続検討によるブラッシュアップが必要である。③プロトコルは、本システムで使用できる専用プロトコルが開発済みである。従来法プロトコルもほぼ流用可能である。ただし、継続的検討とブラッシュアップが必要である。④専用キットは、細胞アッセイ等の基本仕様が決定されている。ただし、ユーザニーズに応えるためには、継続検討によるブラッシュアップと検証が必要である。また、販売用キットの生産体制を確立する必要がある。

（株）生体分子計測研究所は、既に筑波大学発ベンチャーである（株）アレナビオ社との業務提携による細胞アッセイ受託サービスを展開中であり、本開発の基となった細胞アッセイの数々も実施している。

そこで、本高度化支援事業終了後 1 年目は、筑波大学との連携の下で本受託サービスへの本開発システムによる細胞アッセイ手法の導入を徐々に検討して行く。併せて、最適化検定自動化装置、プロトコル、および専用キット仕様のブラッシュアップを目的に、主に筑波大学と継続して検討して行く。専用キットの生産と販売の準備も開始する。

2 年目以後は、1 年目の受託サービスに加え、検定自動化装置と専用キットの販売も開始する予定である。流路チップについては単独でも販売する。並行して、多様なバイオアッセイの需要に応えるために、バイオアッセイキットの検討は継続して行く。