

平成 23～25 年度 戦略的基盤技術高度化支援事業
『高いユーザビリティを低コストで達成する
革新的な多機能型細胞アッセイ装置の開発』

研究開発成果等報告書

平成 26 年 3 月

委 託 者：北海道経済産業局

事業管理機関：株式会社北海道二十一世紀総合研究所

研究実施機関：コスモ・バイオ株式会社

北斗電工株式会社

有限会社エフ・ティ・システム

独立行政法人産業技術総合研究所

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 研究開発体制	3
1-3 成果概要	4
1-4 当該研究開発の連絡窓口	4
第2章 本論	5
2-1 微小電流検出に適したアナログ基板の開発	5
2-2 プローブ位置制御技術の開発	6
2-2-1 プローブ位置制御ソフトウェアの開発	6
2-2-2 プローブ位置制御技術の評価	7
2-3 制御・解析のための組み込みソフトウェア技術の開発.....	7
2-3-1 破骨細胞により形成された骨吸収窩（ピット）を評価可能な制御・解析ソフトウェアの開発	7
2-3-2 心筋細胞、脂肪細胞、破骨細胞のための解析ソフトウェアの改良	8
2-4 センサプローブの開発	10
2-4-1 センサプローブの評価・改良	10
2-4-2 センサプローブ作製法の検討	12
2-5 キャピラリーデバイスの開発	12
2-5-1 キャピラリーデバイス装置を制御可能なソフトウェアの開発	13
2-5-2 キャピラリーデバイスによる細胞アッセイの評価	14
2-6 多機能型細胞アッセイ装置実験機の開発	14
2-6-1 多機能型細胞アッセイ装置実験機の改良	14
2-6-2 測定環境維持装置の開発	14
2-6-3 実証試験に向けた簡便に操作可能な制御プログラムの開発	15
2-6-4 心筋細胞の測定のための実証試験	16
2-6-5 脂肪細胞の形状および破骨細胞による骨吸収窩の測定のための実証試験 ..	18
2-7 市場リサーチ	19
第3章 全体総括	21

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

電流検出するセンサプローブを固体表面に接近させると、表面からの距離に応じて電気抵抗が変化する。この現象を利用して電池表面などの凹凸を調べる目的にこの電気化学測定技術が広く利用されている。

本研究では、電気化学を利用した表面解析技術を細胞分析に応用した新規な細胞アッセイ装置を開発することにより、その装置販売から受託細胞アッセイまでの事業化を目指すものである。

下図に現在の細胞解析技術と本研究で開発する新技術を比較する。ヒトの体はおよそ 60 兆個の高度に分化した多種類の細胞で構成されており、医薬品や機能的食品などの開発には、細胞を用いた解析が不可欠である。しかしながら細胞を組織から回収する際には目的以外の細胞が必ず混入するため、解析毎に分離精製が必要である。また、細胞種ごとに評価項目が異なることから、複数の測定装置を必要とし初期投資が大きな負担となっている。これに対し、本研究で開発する装置は、微細なセンサプローブによって不均一な細胞群から目的の一細胞のみを非接触で解析するため、精製プロセスを必要としない。また、従来解析法が解析毎に必要な細胞の固定、溶解などが不要で細胞消費量の低減と同一細胞の連続測定も可能な特徴を有する。また、電圧等の測定条件を選択することにより、一台の装置で多様な解析も達成できる。さらに本装置では、一細胞選択的に微量薬剤を添加するキャピラリーデバイスを具備することにより、薬剤量の削減による大幅なランニングコストの低減を実現する。

以上、薬企業・食品企業・大学研究室等の川下ニーズに応える高性能で低価格な細胞アッセイ装置を開発するために本研究では以下の目標を設定した。

目標 1. 微小電流検出に適したアナログ基板の開発

多機能型細胞アッセイ装置において、心筋細胞

現状の問題点	本事業での開発課題	開発担当
微小電流 (pA レベル) 測定は不可能	pA レベルの電流計測が可能なアナログ基板を評価・改良する。	北斗電工

等の拍動を解析する場合、拍動に伴う細胞形状の変化は $1\mu\text{m}$ 以下であり、 10pA 以下の電流変化を検出する必要がある。しかし、これまでのシステム (北斗電工 (株)) では、最小レンジが 10nA であり、細胞の呼吸量形状変化を測定することは困難である。アナログ基板を搭載した微小電流測定装置の評価、改良を進めることで、操作性および電流検出感度の向上を図る。

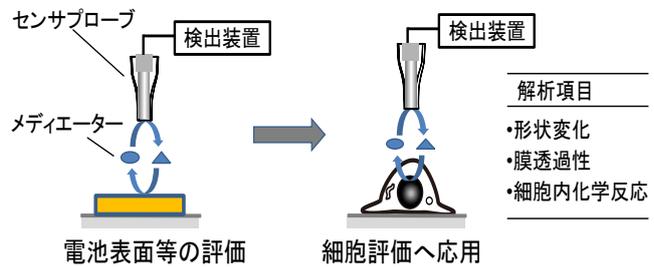


図 電気化学的細胞解析技術の開発

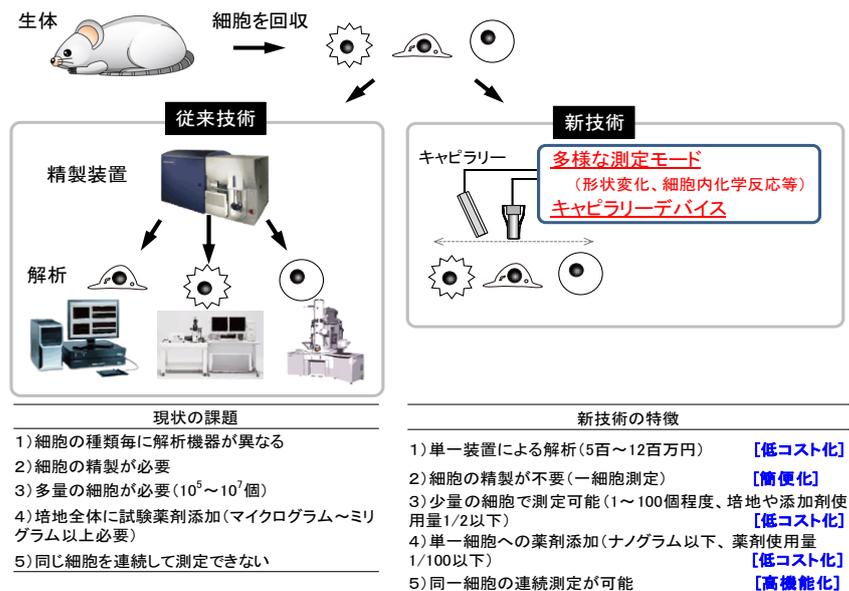


図 従来技術と新技術の比較

目標 2. プローブ位置制御技術の開発

これまでのシステムでは、測定速度に重点を置くと測定精度や

現状の問題点	本事業での開発課題	開発担当
測定精度・範囲・速度のいずれかに劣る	様々な位置制御技術を開発・改良することで、多様な測定条件に合致したシステムを構築する。	北斗電工 エフ・ティ・システム コスモ・バイオ

測定可能範囲に制限が生じ、反対に測定可能範囲に重点を置くと測定が長時間に及ぶなど、全ての条件を満たすプローブ位置制御技術が存在しなかった。(独)産業技術総合研究所によるプログラム開発指導のもと、(有)エフ・ティ・システムがアッセイ装置に適合したソフトウェアを構築し、コスモ・バイオ(株)がこれらのプローブ位置制御技術を評価することで、PIEZO 駆動ステージおよびステッピングモータ移動速度、測定解像度などのパラメータの最適化を試みる。

目標 3. 制御・解析のための組み込みソフトウェア技術の開発

(有)エフ・ティ・システムおよびコスモ・バイオ(株)が、目標 3 で

現状の問題	本事業での開発課題	開発担当
細胞種毎に制御・解析ソフトウェアの開発が必要	多様な細胞種の解析へ対応可能なソフトウェアを構築する。	エフ・ティ・システム コスモ・バイオ

開発した位置制御技術と組み合わせて、破骨細胞のピット測定が可能なソフトウェアを開発する。また心筋細胞の拍動解析ソフトウェア、脂肪細胞やピット形状の解析が可能なソフトウェアに改良を行う。

目標 4. センサプローブの開発

これまでの研究ではガラスで被覆されたセンサプローブを利用

現状の問題	本事業での開発課題	開発担当
高価かつガラスで被覆されているため取り扱いに熟練を要する	プラスチックにより被覆された、低コストで操作性に優れたセンサプローブを開発する。	北斗電工 産業技術総合研究所

していたため、壊れやすく操作性に課題があった。そこで、プラスチックにより絶縁されたセンサプローブの開発・評価・改良を(独)産業技術総合研究所が行い、北斗電工(株)がプローブ作製の低コスト化および安定化に関して検討する。

目標 5. キャピラリーデバイスの開発

細胞アッセイにおいて、ランニングコストを下げるためには、細胞・薬剤使用量を低減する必要がある。単一細胞を対象とすることにより細胞の使用量は減少するが、薬剤使用量は培地への添加をする限り従来とほとんど変わらない。そこで、標的細胞に選択的かつ局所的に薬剤を添加可能なキャピラリーデバイスを開発する。

現状の問題点	本事業での開発課題	開発担当
薬剤応答の測定では、培地全体に添加するため、薬剤使用量が多い	測定対象の細胞に選択的に微量の薬剤を添加可能なキャピラリーデバイスを開発する。	北斗電工 コスモ・バイオ 産業技術総合研究所

●従来
培地全体に薬剤を添加

●新技術
細胞を選択して薬剤を添加

低コスト化

電流検出
キャピラリー制御

目標 6. 多機能型細胞アッセイ装置の開発

目標 3 で開発した解析ソフトウェア、目標 5

で開発した薬剤噴霧を可能とするキャピラリーデバイスとその制御システムを随時統合する。さらに長時間測定の際の細胞へのストレスを抑制することを目的とした環境維持装置にガス混合装置を設置することで培養環境の安定化を図り、チャンバーなど各ユニットの改良と評価を行う。これらの新たに導入した機器やシステ

ムを統合させ、薬剤添加に伴う心筋細胞の拍動および酸素消費量の変化、破骨細胞により形成されたピット形状の測定・解析を行い、アプリケーションデータの収集と測定条件の検討、多機能型細胞アッセイ装置の評価を行う。

1-2 研究開発体制

- 総括研究代表者 平 敏夫
所属組織名：コスモ・バイオ株式会社 プライマリーセル事業部
所属役職：研究開発グループ長
- 副総括研究代表者 青柳 重夫
所属組織名：北斗電工株式会社
所属役職：技術開発部・担当部長
- 事業管理機関 株式会社北海道二十一世紀総合研究所
- 研究実施機関および研究者氏名

研究実施機関 (機関名)	代表者 役職氏名	連絡先
コスモ・バイオ株式会社 プライマリーセル事業部	執行役員 事業部長 牧 与志幸	平 敏夫(研究開発グループ長 兼 セルアッセイグループ長) 清水 恭子(製造グループ長) 酒井 雅人(マーケティンググループ 兼 研究開発グループ社員) 尾田 千佳子(製造グループ社員) 金濱 吉範(製造グループ 兼 研究開発グループ社員) 山口 昭博(セルアッセイグループ社員) 山口 さより(セルアッセイグループ社員) 大高 志乃(研究開発グループ 兼 製造グループ社員) 渋谷 真広(研究開発グループ 派遣社員) 奥村 翔(研究開発グループ 派遣社員)
北斗電工株式会社	代表取締役社長 幸松 弘彦	青柳 重夫(技術開発部 担当部長) 福泉 敦尚(技術開発部 副部長) 小林 幸太(技術開発部 課長代理) 斯波 裕之(技術開発部 主任) 内海 陽介(技術開発部 主任) 志澤 桃子(技術開発部 研究員)
有限会社エフ・ティ・システム	代表取締役 向井 英一	田中 出(システム開発部 部長) 向井 洋平(システム開発部開発1課 主任) 吉田 大介(システム開発部開発1課)
独立行政法人 産業技術総合研究所	理事長 中鉢 良治	小松 康雄(生物プロセス研究部門 生体分子工学研究グループ 研究グループ長) 平野 悠(生物プロセス研究部門 研究員)

■ 研究協力者

機関名又は氏名	所在地又は住所	代表者等
東北大学 原子分子材料科学高等 研究機構	〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11	教授 末永 智一
名古屋市立大学 大学院薬学研究科	〒467-8603 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通3-1	教授 松永 民秀
旭化成株式会社 研究開発センター	〒416-8501 静岡県富士市鮫島2-1	主幹研究員 戸潤 一孔
コスモ・バイオ株式会社	〒135-0016 東京都江東区東陽2丁目2-20 東 陽駅前ビル	開発部長 内田 哲夫

ビーエム機器株式会社	〒113-0033 東京都文京区湯島 2 丁目 29-3 湯島太田ビル	代表取締役社長 高木 勇次
株式会社 フロンティア研究所	北海道石狩市新港西 1 丁目 777-12	取締役 加藤 美穂子

1-3 成果概要

以下のように、研究計画立案時に設定した実施計画は、おおむね達成することができた。

①微小電流検出に適したアナログ基板の開発

1 nA 電流レンジでの電流検出精度は 1.0% 以内であり、10 pA レベルの微小電流を測定できることを確認した。さらに、従来機より容積で 28.6%の小型化も行った。

②プローブ位置制御技術の開発

PIEZO ステージとステッピングモータを連動させ、10 nm 以下の精度でプローブ位置制御を可能にした。また、Constant current モードや Hopping モード、Constant height モードの 3 モード使い分けを可能とすることができた。

③制御・解析のための組み込みソフトウェア技術の開発

Constant height、Hopping、Constant current の 3 モードから研究に適したものをユーザーが選び、脂肪細胞の体積変化および、破骨細胞により形成されたコピットの容積、心筋の拍動、細胞の酸素消費を評価可能な制御・解析ソフトウェアを開発した。さらに、より直感的に測定が行えるようにするため 3D 解析ソフトウェアも開発した。

④センサプローブの開発 ((独)産業技術総合研究所、北斗電工㈱)

従来型のガラス電極と同等の性能を持つプラスチックにより絶縁されたセンサプローブの製造方法を確立した。

⑤キャピラリーデバイスの開発

標的細胞に選択的かつ局所的に薬剤を添加可能なキャピラリーデバイスを開発した。また、実際に噴霧した薬剤に応答する心筋(ラット、モルモット、ヒト iPS)の測定を行った。

⑥多機能型細胞アッセイ装置の開発

①～⑤で開発した装置に、連続培養・測定を可能にする培養環境維持装置を設置し、連続的に培養と測定が行えるようにした。試作した装置でラット脂肪細胞、ラット間葉系幹細胞、ラット心筋、モルモット心筋、ヒト iPS 由来心筋、ラット破骨細胞、ヒト破骨細胞などの培養を行い、薬剤への応答や分化の測定などを行った。

⑦市場リサーチ

各アドバイザーおよびプライマリーセルの細胞顧客などを訪問し、⑥などで得られたデータにたいする現場研究者の意見を集めた。また、研究者から頂いたニーズを集約し、現在も改良を継続している。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

総括研究代表

フリガナ)：タイラトシオ

氏名：平 敏夫

所属組織名：コスモ・バイオ株式会社 プライマリーセル事業部

所属役職：研究開発グループ長

Tel：011-667-5911 Fax：011-667-5912

E-mail：toshio-taira@cosmobio.co.jp

第2章 本論

2-1 微小電流検出に適したアナログ基板の開発

概要

多機能型細胞アッセイ装置では、単一細胞（ $10\mu\text{m}$ 程度）近傍に配置したセンサプローブ（ $10\sim 20\mu\text{m}$ ）に一定電位を印加し、電気化学反応に伴う電流値を測定する。この時、プローブで測定される電流値は細胞とプローブの距離に依存し、細胞形状の変化はプローブと細胞間距離の変化量を解析することにより定量化できる。

(1) アナログ基板の設計・製作

平成 23 年～24 年度に設計・製作した 10 pA レベルの微小電流を測定できるアナログ基板において、 1 nA 電流レンジでの電流検出精度は 1.0% 以内であり、 10 pA レベルの微小電流を測定できることを確認した。 10 pA 以下の微小電流の検出を可能とするために、新たに設計・製作した IV-変換器のブロック図及び写真を下図に示す。 $\pm 10\text{ pA}$ 入力時のノイズの評価を行った結果、目標の 10 pA 以下の微小電流の検出が可能であった。

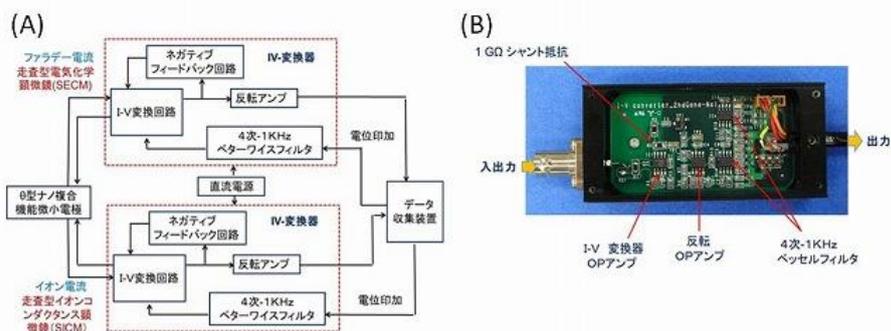


図 1 IV-変換器ブロック図及びアナログ基

(2) CPU 基板の組み込みソフトウェアの設計・製作

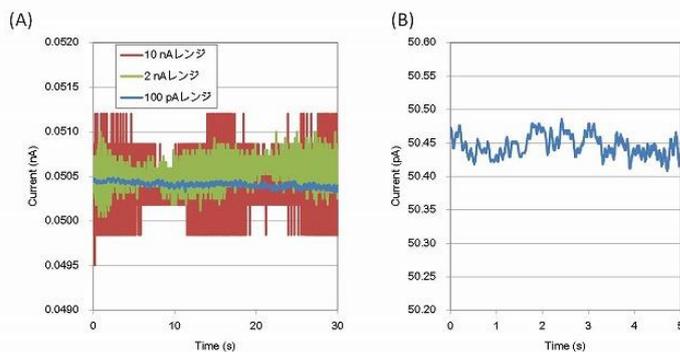
多機能型細胞アッセイ装置で用いている微小電流検出装置の CPU 基板へ、

①通信コマンドにより外部入力の ON/OFF する機能、②印加した状態での測定開始、終了が可能。また外部入力 ON(EXT 1)に合わせて測定開始する方法およびサンプル時間幅を設定する機能。③設定範囲制限値を変えることによってデータ取得を最短 10ms へ変更し、 10ms 毎に転送速度を決定可能とする機能を持たせるためのソフトウェアを組み込んだ。

(3) 微小電流検出装置の小型化

平成 25 年度には微小電流検出装置の小型化を図り、従来機より容積で 28.6% の小型化を達成した。開発した小型化微小電流検出装置の電流検出感度を、 $1\text{G}\Omega$ の抵抗を利用し、電流測定レンジを 10 nA 、 2 nA 、 100 pA と変えて評価した結果(下図(A))、レンジを変えても観察される電流の絶対値は変わらないことが確認できた。また、 100 pA レンジを利用した場合、5 秒間に観察される電流値は $50.40\sim 50.48\text{ pA}$ であったことから(下図(B))、 10ms の時間分解能で 1 pA レベルの電流値変化を安定して測定可能であることがわかった。

図小型化 HV-405 を利用した電流測定 (A) 100 nA 、 10 nA 、 100 pA レンジの比較、(B) 100 pA レンジを利用した場合の電流応答



2-2 プローブ位置制御技術の開発

2-2-1 プローブ位置制御ソフトウェアの開発

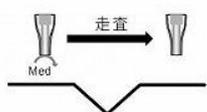
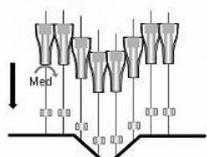
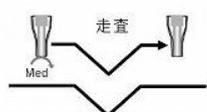
概要

センサプローブ位置を XY 軸方向に 100 ~1000 μm 、Z 軸方向に 100 μm 程度の範囲で、10 nm 以下の精度で制御するために PIEZO ステージとステッピングモータを連動させるプローブ位置制御ソフトウェアの開発を行った。

(1) センサプローブの走査を利用した基板表面の形状評価

センサプローブを垂直方向に走査測定する場合、主に右表に示すような Constant height、Hopping、Constant current の三つの測定方法が利用できる。

時間短縮に重点を置く場合などにはもっとも単純な Constant height モードを利用し、骨吸収窩（ピット）のように深さが 100 μm 以上に及ぶこともある対象物では Hopping モード、対象物の凹凸が激しく、電極が接触してしまう危険が低い場合には時間と精度を両立しやすい Constant current モードなどの用に目的やサンプルコンディションにより選択できるようにした。

測定方法	特徴	欠点
Constant height 	<ul style="list-style-type: none"> 一定の高さで走査 短時間で測定可能 	<ul style="list-style-type: none"> 電極から遠い位置の形状を測定できない 凸形状では接触する恐れがある
Hopping 	<ul style="list-style-type: none"> 測定点毎にアプローチカーブを測定 対象と接触しないため細胞形状を測定可能 高精度 	<ul style="list-style-type: none"> 測定に時間がかかる
Constant current 	<ul style="list-style-type: none"> 電流値が一定になるように高さを変えながら走査 短時間で測定可能 高精度 	<ul style="list-style-type: none"> 対象と接触する恐れがある

表凹凸評価のための三つの測定方法

(2) Constant current モードのための位置制御技術の開発

Constant current モードを利用した 1 line 測定のプログラムでは、基板表面と水平方向にステッピングモータ駆動ステージを利用して一定速度でセンサプローブを走査し、電流応答を測定する。この時、時間分解能を 100 ミリ秒以下に設定した電流応答、および PID 制御を利用してセンサプローブの垂直方向位置を計算し、連続的に PIEZO 駆動ステージを制御する。電流測定のパラメータ、P、I、D の各値、走査速度を最適化することで、基板表面の凹凸に対応したセンサプローブの位置制御が可能となった。（右図）

(3) Hopping モードの測定時間短縮化の検討

Hopping モードは測定点ごとにプローブを Z 方向に走査して電流変化を読み取り、対象物の凹凸をイメージングする測定方式である。プローブと対象物の距離が遠い時にはステップ距離を大きくし、対象物近傍ではステップ距離を小さくしてゆっくりと接近させる 2 段階アプローチを採用した。またステップ距離を切り替える距離は 11~12 μm とした。

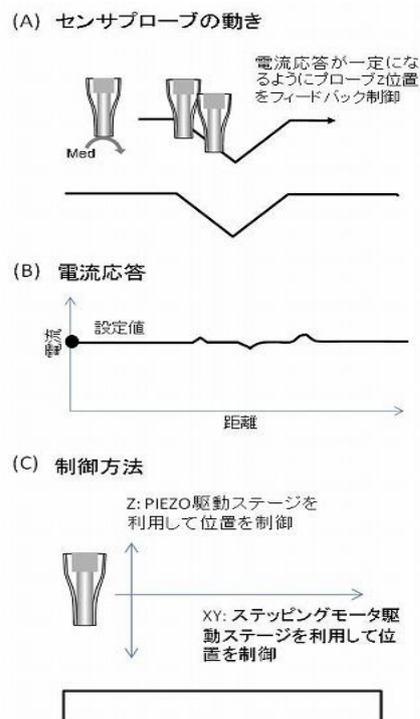


図 (A) 測定時のセンサプローブの動き、(B) 電流応答、(C) センサプローブ位置の制御方法

2-2-2 プローブ位置制御技術の評価

(1) Constant current モードを利用した表面形状イメージングシステムの開発と評価

今年度開発した Constant current モードを利用して表面形状イメージングシステムを試作した(右図)。Constant current モードを利用した表面形状のイメージングでは、センサプローブの基板と水平方向の位置制御にはステッピングモータ駆動ステージ、垂直方向の位置制御には PIEZO 駆動ステージを利用した(右図(A))。センサプローブの位置制御に利用する距離制御パラメータを設定可能にすることで、電流値が一定ではないイメージが得られた場合、対象に合わせて変更できるようにした(右図(B))。

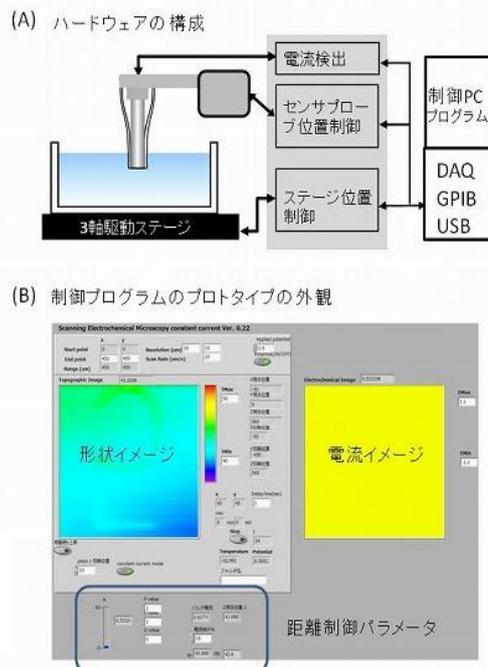


図 Constant current モードを利用した表面形状イメージングシステム
(A) ハードウェアの構成 (B) 制御プログラムの外観

(2) ガラス表面の形状測定による Constant current モードの評価

Constant current モードイメージングをテストするために、500 μm 間隔の格子、大文字アルファベット、及び数字の溝が形成されているガラス基板をイメージングした結果、光学顕微鏡写真の溝と一致した。Constant current モードは凹凸変化の急峻でない形状の測定に適した測定方式と言える。

(3) 象牙切片上のピット形状測定による Hopping モードの評価

象牙切片上に形成されたピットを用いて、測定時間の短縮化を検討した Hopping モードの測定精度を評価した。1000 \times 1000 μm の範囲を測定し、測定開始点を 500 μm 移動させてさらに測定することを繰り返すと、それぞれのイメージング像中のピット形状とその位置が重なり合うことを確認した結果、数 10 μm のピット形状を広範囲測定でも位置再現性高く測定可能であった(右図)。

対象の凹凸の大きさや状態、測定可能な時間等を考慮し、条件に合わせて Constant current モードや Hopping モード、Constant height モードの使い分けが必要になると考えている。

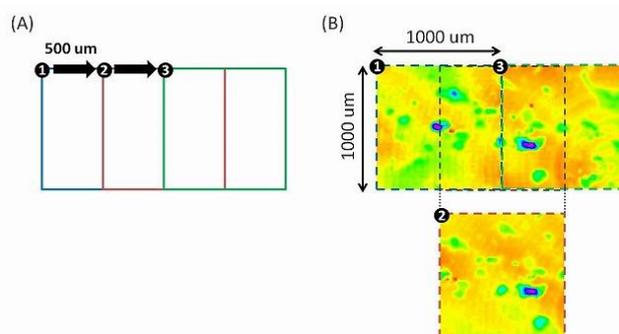


図 Hopping モードによるピット形状の連続測定
(A) 500 μm ずつ X 軸方向に移動させて測定 (B) 測定結果

2-3 制御・解析のための組み込みソフトウェア技術の開発

2-3-1 破骨細胞により形成された骨吸収窩(ピット)を評価可能な制御・解析ソフトウェアの開発

(1) 広範囲測定に対応した制御プログラムの開発

骨吸収窩測定では広範囲測定を可能にするため、PIEZO 駆動ステージとステッピングモータを組み合わせ、制御するプログラムを開発した。

Z 軸方向の移動には従来通り PIEZO 駆動ステージを使用し、XY 軸の移動にはステッピングモータを使用することで広範囲かつ結合処理を必要としない方式を開発した(右図(B))。またステッピングモータの制御単位を $1 \mu\text{m}$ から $0.02 \mu\text{m}$ に変更したことで、より精度の高い位置制御が可能となった。

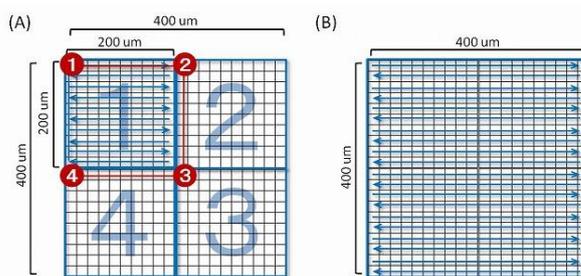


図 広範囲測定方式の改良
(A)PIEZO 駆動ステージ組み合わせ型 (平成 24 年型)
(B)ステッピングモータ単独型 (最終型)

(2) 骨吸収窩(ピット)の形状測定に適した測定方式の開発

測定する複数箇所の指定するプログラムとして、ランダム指定モードと固定指定モードの 2 つを開発した。ランダム指定モードは測定箇所数や測定範囲を任意の値に指定可能で、象牙上の測定箇所を自動的に決定する(下図(A))。固定指定モードは測定位置や測定箇所数があらかじめ決定している仕様であり、測定範囲のみ変更が可能である(下図(B))。

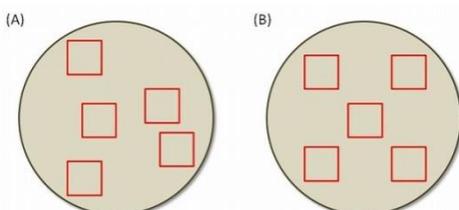


図 象牙切片上の測定箇所の指定
(A)ランダム箇所指定モードの例
(B)固定箇所指定モード

2-3-2 心筋細胞、脂肪細胞、破骨細胞のための解析ソフトウェアの改良

(1) 心筋細胞の拍動を解析するためのソフトウェアの改良

平成 24 年度に開発した拍動解析ソフトウェアを基盤として、多様なデータへの対応や多彩な解析データの出力のための改良を実施した(下図(A))。さらに解析のために平均化計算された拍動波形データは、従来の単一出力から複数出力とすることで拍動と拍動の間隔時間を明確に表現可能となった(下図(B))。

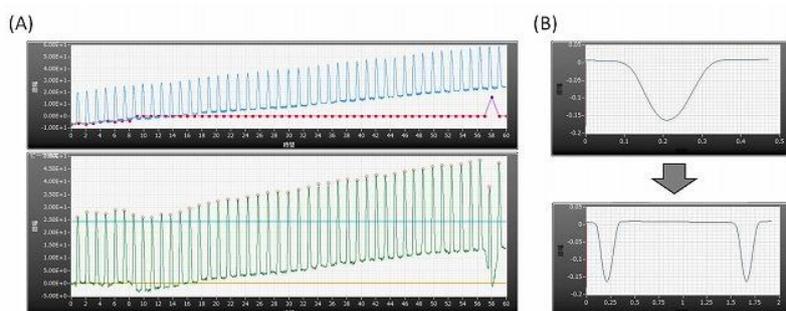


図 拍動解析ソフトウェアの改良
(A)バックグラウンドの手動補正
(B)平均波形の複数化表示

数値入力には数値の変更とキーボードの矢印キー押下のいずれの方法にも対応させた(下図)。

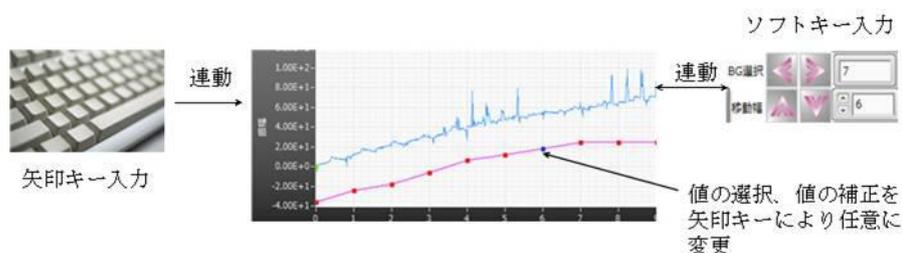


図 キーボード入力による補正

その他にも、長時間測定されたデータの部分抽出機能や、拍動波形の平均化データ取得間隔の指定など、様々な機能を搭載し、多様なデータ出力が可能なソフトウェアとした。

(2) 脂肪細胞および破骨細胞の解析のためのソフトウェアの改良

3D 解析ソフトウェアにて、脂肪制帽の体積変化や破骨細胞によって形成されたピットの容積の計算を可能にした。また、バックグラウンド傾斜を補正し、その影響を除去する機能を開発した。

傾斜を補正するデータ配列について、行（横軸）と列（縦軸）のいずれの方向にも指定可能とし、また配列の指定を、行列番号の値入力あるいは専用画面上のマウスクリックによる位置指定のいずれの方法でも設定可能とした（右図）。

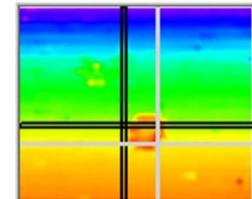


図 マウスクリックによる補正位置指定

さらにバックグラウンドの形状を除去し、細胞やピットの形状のみを抽出して体積や容積を正しく計算可能とした（下図上段）。データ表示は、使用者による数値入力で色の示す最大・最小値を任意に指定可能としたことで、形状変化を視覚的に明瞭に表現可能となった（下図下段）。さらにピットのような凹型の形状にも対応し、凹状くぼみの容積計算も実施できるように改良が加えられた

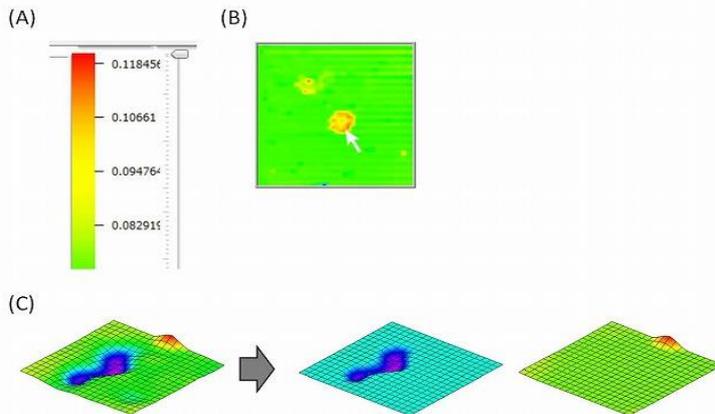


図 体積・容積計算時のバックグラウンド形状の除去

(A) 色・数値指定による除去 (B) 専用画面クリック指定による除去 (C) 凸形状を除去して容積計算あるいは凹形状を除去して体積計算

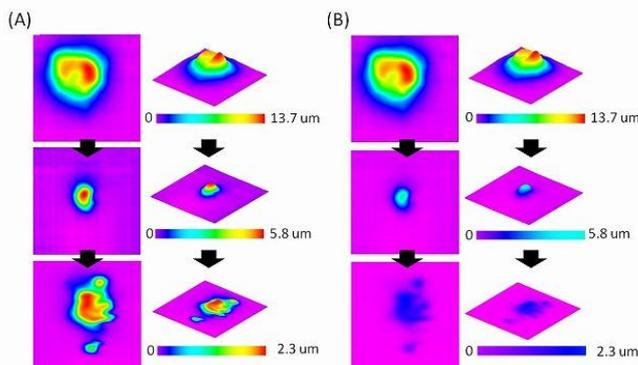


図 高さ表示色の任意指定

(A) 従来版：最大と最小の色は固定 (B) 改良版：最大と最小の色を指定可能

(3) その他の解析のためのソフトウェアの改良

広範囲測定が可能となったことで、測定されたイメージング像のうち一部を抜粋して解析する必要性が出てきた。その際、平成 23 年版では 1 点ごとに座標番号を割り振る必要があり、全データを表示するまでであった（下図(A)）が、マウスの座標位置読み取りプログラムを応用することで、マウスドラッグによる範囲指定機能を構築した（下図(B)）ことで画像表示時間が大幅に短縮されるとともに抽出範囲指定も視覚的に容易に行えるようになった。

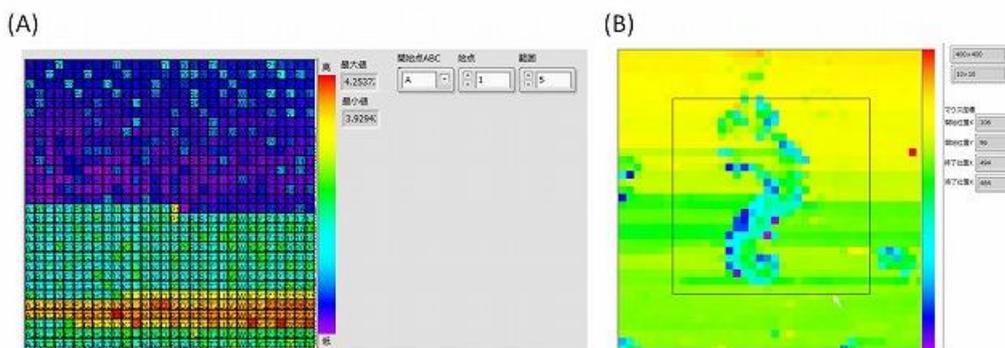


図 データの部分抽出ソフトウェア
 (A) 平成 23 年版：座標の指定 (B) 改良版：マウスドラッグによる指定

また、先に述べたように、Constant height、Hopping、Constant current の 3 つの方法が選択可能であるが、Constant height のみは電流値を測定し、計算により距離データを求める仕組みとなっているため、バックグラウンド電流値を補正するソフトウェアを開発した (下図)。

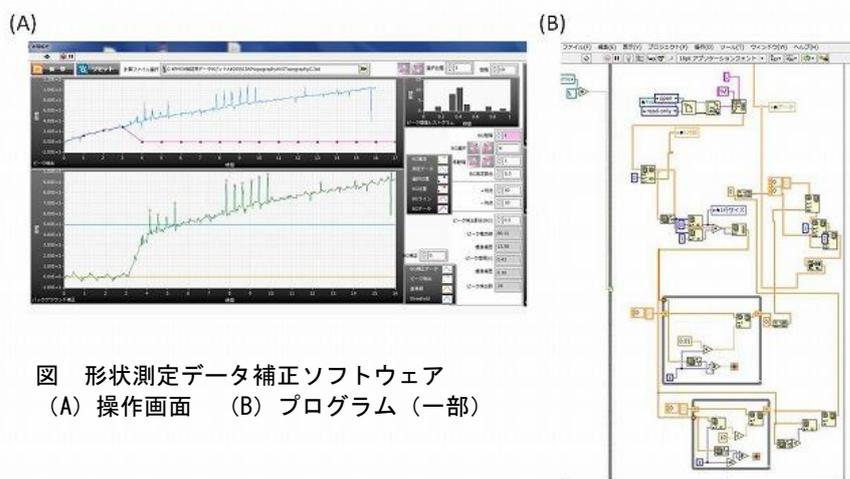


図 形状測定データ補正ソフトウェア
 (A) 操作画面 (B) プログラム (一部)

2-4 センサプローブの開発

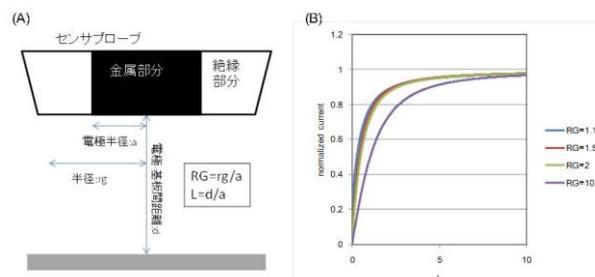
概要

従来の走査型電気化学顕微鏡を利用した測定では、ニードル型のガラスで被覆されたセンサプローブを利用していたため、壊れやすく操作性に課題があった。そこで、ガラス以外の絶縁材料を検討することで、操作性に優れたセンサプローブを開発した。

2-4-1 センサプローブの評価・改良

センサプローブの電流応答は、電極半径 (a) とセンサプローブ全体の半径 (rg) の比 ($RG=rg/a$) に依存する (下図)。溶存する電気化学活性種をセンサプローブの先端で還元しながら絶縁基板に近接させる場合、プローブ先端-基板間距離を変えた時の理想的な電流応答は、計算結果とほぼ一致することが報告されている (下図 (B))。

図 (A) センサプローブの概略図 (B) 溶液中の酸化体を還元しながらセンサプローブを絶縁基板に近づけた時に計算から予想される電流応答



(1) 耐熱性樹脂を利用したセンサプローブ作製法

センサプローブの電極材料には直径 10 μm の Pt 細線を選択し、左下図に沿った以下の手順でマイクロ電極を作製した。(右下図)

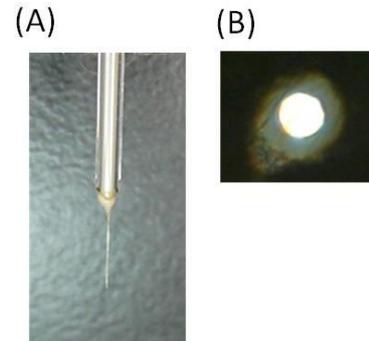
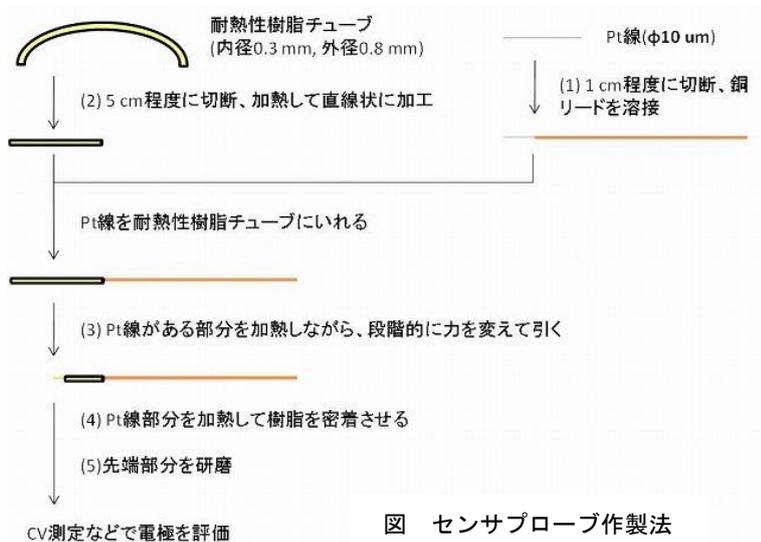
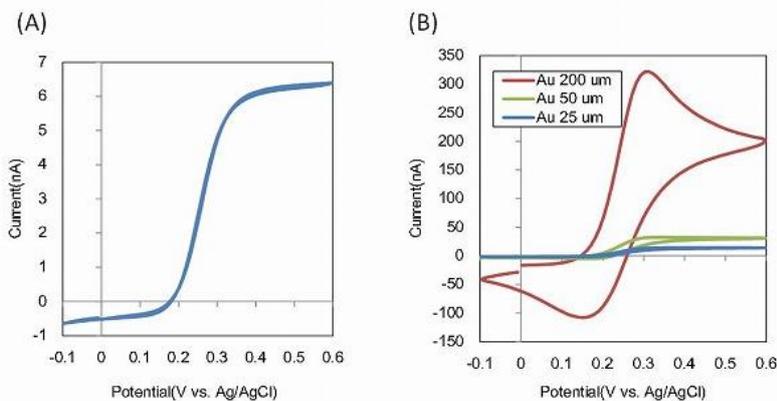


図 プラスチック電極

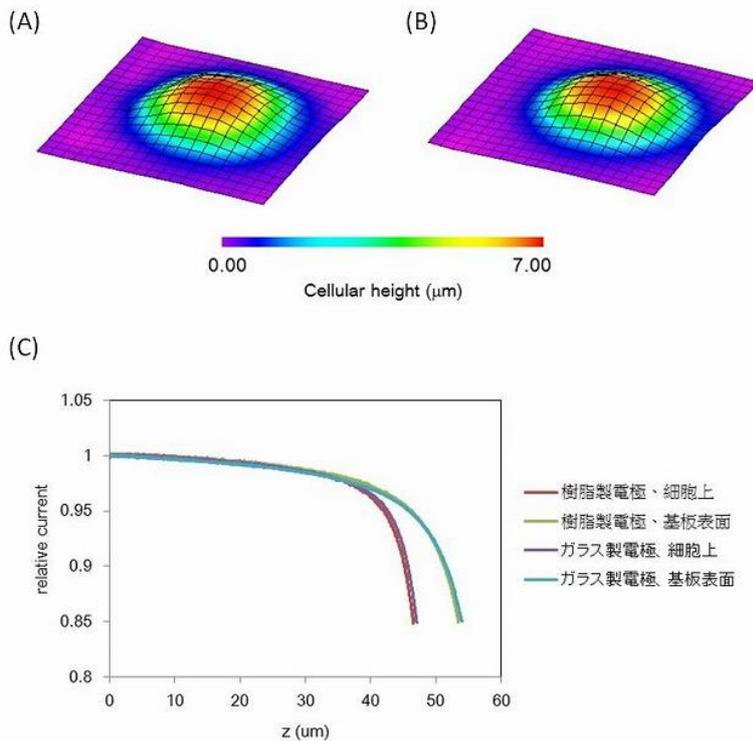
下図(A)に作製したセンサプローブ(Pt, $\phi = 10 \mu\text{m}$)のサイクリックボルタモグラム(CV)を示す。定常電流応答が電極半径に比例し、計算から予想される値ともほぼ一致したことから、ガラス製と同様の応答を示すことが確認できた。同様の方法で Au を電極材料として作製したセンサプローブの CV を下図(B)に示す。それぞれの電極の CV が予想される電流応答とほぼ一致したことから、開発した作製方法を利用することで、電極サイズ、金属によらずセンサプローブを作製可能であることが確認できた。



図センサプローブのサイクリックボルタモグラム(A)Pt($\phi = 10 \mu\text{m}$)センサプローブ、(B)Au($\phi = 25, 50, 200 \mu\text{m}$)センサプローブ

(2) 一細胞形状測定におけるガラス製センサプローブとの比較

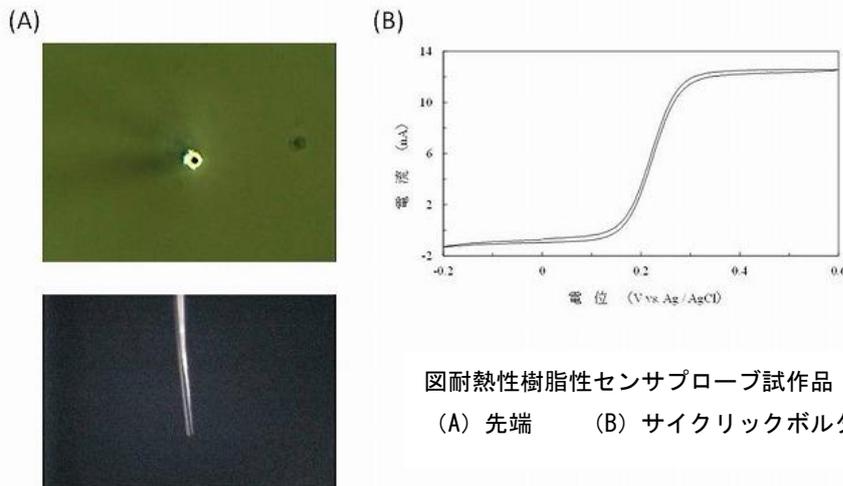
下図は、従来のガラスで絶縁被覆したセンサプローブと、本事業で開発した樹脂で絶縁被覆したセンサプローブを利用して、生細胞(HepG2)の評価を行った結果を示す。新たに開発したプラスチックプローブが形状イメージ測定に利用可能であることを示している。



図一細胞 (HepG2) の形状イメージ
 (A) 開発したプラスチックプローブで測定した形状イメージ
 (B) ガラス製センサプローブを利用して測定した形状イメージ
 (C) ガラス製およびプラスチック製センサプローブのアプローチカーブの比較

2-4-2 センサプローブ作製法の検討

作製したプラスチックプローブ先端の写真を下図(A)に、CVの結果を下図(B)に示す。限界電流 13.8 nA から求めたPt直径は11 μmで、使用したPt線の直径10 μmとほぼ一致した。



図耐熱性樹脂性センサプローブ試作品
 (A) 先端 (B) サイクリックボルタモグラム

2-5 キャピラリーデバイスの開発

概要

細胞アッセイにおいて、ランニングコストを下げるためには、細胞・薬剤使用量を低減する必要がある。単一細胞を対象とすることにより細胞の使用量は減少するが、薬剤使用量は培地への添加をする限り従来とほとんど変わらない。そこで、センサプローブを利用して添加液量を制御するキャピラリーデバイスを開発し、心筋細胞などの細胞アッセイへ応用した。

2-5-1 キャピラリーデバイス装置を制御可能なソフトウェアの開発

(1) キャピラリーの位置制御ソフトウェアの開発

キャピラリーデバイスによる薬剤添加では、添加量制御においてガラスキャピラリー先端位置と添加をモニタリングするセンサプローブの位置の関係が重要である。またキャピラリー先端からの添加溶液の漏出により、細胞へ意図しない影響を与えることを最小限に抑えるため、添加時にのみキャピラリーを細胞へ接近させ、添加後には速やかに細胞から隔離する必要がある。

キャピラリー先端を目標とする添加位置に配置するには、一度キャピラリーとプローブの先端を合わせ、そこからキャピラリーを遠ざける手順が組まれている（下図）。微小範囲移動の距離単位は初期値を 10 μm としているが、必要に応じて任意に変更可能である。またプローブの移動と同様に、数値入力による XYZ 方向移動も可能である。

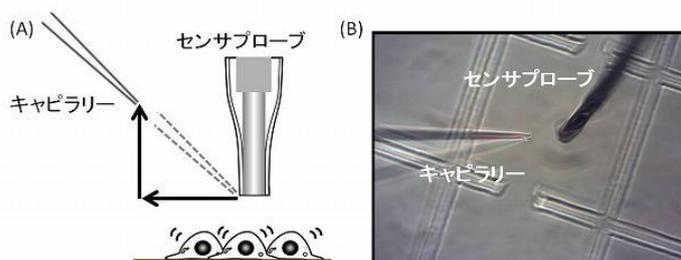


図 センサプローブとキャピラリーの位置制御

プローブとキャピラリーの XYZ 位置制御を連動させることが可能で、添加位置の確定後にプローブを移動させた場合でも、キャピラリー位置制御プログラムがプローブの移動を識別し追従して移動することができ、薬剤添加実験を行う際の標的細胞への位置合わせを容易に行うことができるシステムとなった。

さらにキャピラリーデバイスの薬剤添加量制御システムとも連動させた仕様とした。そのため薬剤添加開始の直前までキャピラリーを細胞から隔離し、開始と同時に設定した薬剤添加位置に自動で移動させることが可能となった。

(2) キャピラリーデバイスによる薬剤添加制御ソフトウェアの開発

キャピラリーデバイスは、pL レベルで溶液の吐出を制御可能なマイクロインジェクタと、インジェクタのハンドル回転角を微小に制御可能なステップモータを組み合わせた構成となっている（下図）。



図 キャピラリーデバイスの構成

$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を含む溶液中でセンサプローブに 0.5 V (vs. Ag/AgCl) の電位を印加すると、 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の酸化に伴う電流が観察される。この状態で $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を含まない溶液をキャピラリーから添加した場合、キャピラリー下流に配置したセンサプローブの電流値は添加量に比例して減少する。この電流値の減少割合をモニタリングすることで、細胞周辺の添加薬剤濃度を制御することを可能とした。さらに、電流値の減少割合の変化を読み取り、添加量を調節するフィードバック制御システムとして ON/OFF 制御モードおよび PID 制御モードを装備した。また、キャピラリー位置制御技術と連動させた添加位置への移動システム、溶液添加とは関係のないバックグラウンド電流値の減少に対応した過剰吸引防止機能、薬剤溶液の添加時間制御システムについても開発し、ソフトウェアに盛り込んだ。

2-5-2 キャピラリーデバイスによる細胞アッセイの評価

キャピラリーデバイスによって添加された薬剤溶液の拡散の様子をモニタリングするため、モデルとして食紅溶液をガラスキャピラリーに充填し、キャピラリーとセンサプローブをセットした後に定量添加モード (40 nL/sec.) による添加を行った (下図)。添加された溶液は約 600 μm 四方に拡散し、添加を終了すると約 30 sec. で周辺へと拡散して視野内から消失する様が観察された。これにより薬剤暴露する時間を任意に制御できることを確認した。

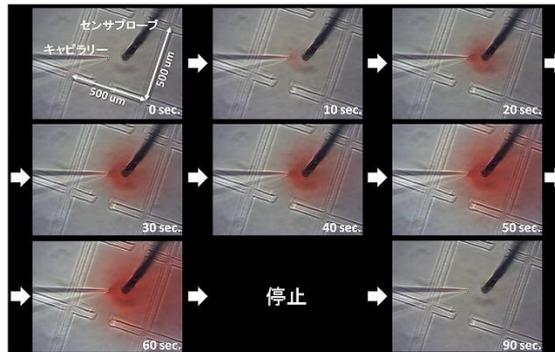


図 キャピラリーデバイスによる食紅溶液の添加

2-6 多機能型細胞アッセイ装置実験機の開発

2-6-1 多機能型細胞アッセイ装置実験機の改良

平成 23 年度事業で製作し、平成 24 年度事業で改造した多機能細胞アッセイ装置実験機に対して、薬剤の局所添加のためのキャピラリーデバイス周辺ユニットの設置、長時間測定のための環境維持装置の改造、微小電流測定装置の小型化等の改良を行った。主な改良点および新規導入したユニット類の概要及び多機能型細胞アッセイ装置実験機のブロック図を下図に示す。

- ①キャピラリー位置の自動制御のためのステッピングモータステージを設置。
- ②①のステッピングモータステージのコントローラを増設。
- ③環境維持装置チャンバーの改良。
- ④5% CO₂ 環境を構築するための CO₂ ガスボンベ、エアポンプ、ガス混合装置の設置。
- ⑤取り扱いデータ量の増大に対応するため、測定・解析用 PC 周辺機器を追加。
- ⑥安定な多機能細胞アッセイを行うために、制御機器類用の除振台を設置。
- ⑦温度制御機能など不要な機能を削除し、微小電流測定装置の小型化を図る。

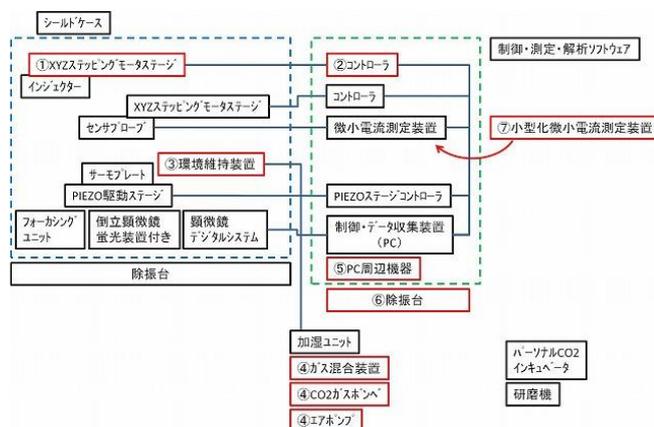


図 改良多機能型細胞アッセイ装置実験機のブロック図

2-6-2 測定環境維持装置の開発

本事業で開発中の多機能型細胞アッセイ装置は、細胞を非侵襲で測定するため、同一細胞を連続して測定・

解析可能な点が特徴である。数日間連続して培養、計測が行えるように測定時の細胞の培養環境を維持できる CO₂ インキュベータ様機能と、無菌環境を提供できるクリーンベンチ様機能の両方を備えた新規の環境維持装置の開発を行った。

培養チャンバーは PIEZO 駆動ステージへの負荷を軽減するため台座上に設置し（右上図）。チャンバーの一部は PIEZO 駆動ステージと連動して動き、チャンバーの固定部とはシリコン膜で連結させ内部の気密性を保持している。培養チャンバーは滅菌の必要があるため、70%エタノールに耐久性があり、透明度の高いポリ塩化ビニル製とした（右下図）。

チャンバー内を 5%CO₂ 環境に維持が必要である。平成 24 年度では構成の簡略化のため、5% CO₂ ボンベを設置し、チャンバーと直結させた。しかしながらチャンバー内部の CO₂ 濃度を測定すると、3%程度までしか上昇しないことが明らかとなった。よって平成 25 年度は CO₂ ガス供給源として一般的な 100% CO₂ ボンベを採用し、空気と混合して 5%に調整するためのガス混合装置と空気を供給するエアポンプを導入し、さらに培養チャンバー導入前に加湿を行い、培養に適した環境を維持可能とした。

培養装置の汚染を防ぐため、環境維持装置のチャンバー内部の無菌環境を構築するための空気清浄装置にて処理したエアーをチャンバーに導く機構を設計した。これらを設置した装置の全体図および構成ユニットを下図に示す。

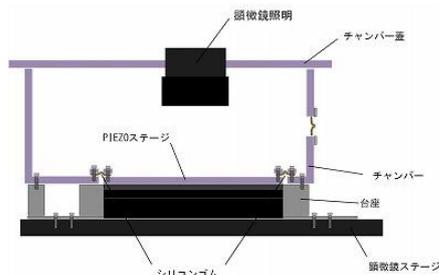


図 環境維持装置チャンバーの機構

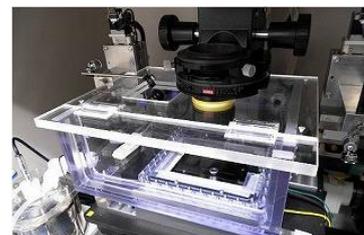
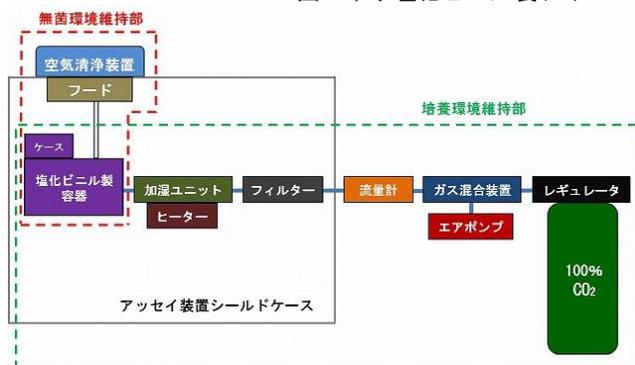


図 ポリ塩化ビニル製チャンバー

図 環境維持装置全体図

センサプローブの取り付けや細胞の出し入れなど、塩化ビニル製容器の開放時にはクリーンベンチ様機能を果たす（赤色破線部）。測定時には塩化ビニル製容器を閉鎖し、CO₂ インキュベータ様機能を果たす（緑色破線部）。



2-6-3 実証試験に向けた簡便に操作可能な制御プログラムの開発

多機能型細胞アッセイ装置は数多くの機器類を統合して制御している。装置が機能を発揮するためには、その全ての機器類と制御・測定用 PC との連携が正常に行われる必要がある。そこで測定・制御ソフトウェアを立ち上げた際に、装置の核をなす4つのユニット、①PIEZO 駆動ステージ、②プローブ制御用ステッピングモータ、③キャピラリーデバイス用ステッピングモータ、④微小電流計測装置 HV-405 との疎通確認する機能を開発した（下図）。

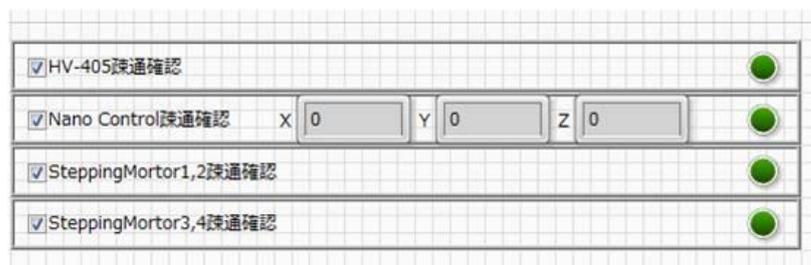


図 各制御機器との通信確認

単一細胞を対象に経時的变化を測定するなど、本アッセイ装置を用いた測定では同一設定の動作を同じ順序で繰り返し行うことが多い。各プロセス（センサプローブの対象物への接近や拍動の測定、電流の安定待機な

ど)は数10秒~数分のものが大半であるが、これまでに開発されたソフトウェアは1ソフトウェアにつき1機能を持つ構造となっており、1プロセスを終えるごとに次のソフトウェアを立ち上げて実行する必要があるため、測定中は常にソフトウェアの操作が必要であった。今年度は繰り返し実行される測定プロセスについて、使用者があらかじめ設定しておいた順序で次々にソフトウェアを実行し、測定開始から終了までを自動で実施するユーザー指定組立型ソフトウェアを開発した。

2-6-4 心筋細胞の測定のための実証試験

概要

心筋細胞は活動電位持続時間 (QT 時間) の延長など、薬剤化合物の心臓への副作用のスクリーニング等に使用される初代培養細胞である。これらの測定の場合、従来は心筋細胞の拍動の変化をパッチクランプやアレイ電極基板を用いて電氣的に記録する、拍動時のカルシウムチャンネルの動きに対し、蛍光カルシウム指示物質を用いてモニタリングする、拍動の大きさを光学顕微鏡下で観察するなどの手法が用いられてきたが、電氣的なデータと実際の心筋細胞の動きに相関がない場合が見受けられることや動画解析の時間分解能の制限など、心筋細胞の「動き」を捉えるには不十分であった。多機能型細胞アッセイ装置は従来の手法にはない細胞の「動き」をモニタリングすることで心筋細胞を評価可能な装置である。平成25年度は各種薬剤を心筋細胞に添加し、多機能型細胞アッセイ装置がその動きの変化を捉えることが可能であることを確認した。

1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ を含む無血清培地中でラット心筋細胞を培養し、拍動と酸素消費の測定を行った(右図)。

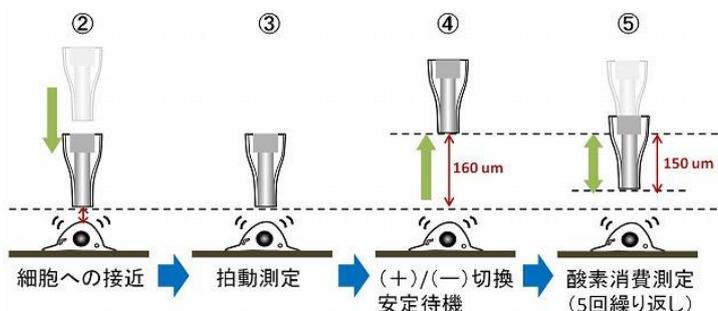


図 拍動および酸素消費測定

① +0.5 V (vs. Ag/AgCl) 印加

② 心筋細胞へのセンサプローブのアプローチ

③ 細胞頂点から約 90 μm 離れた位置でプローブを固定し、60 秒間電流値を測定

④ プローブを 160 μm 上方へ離し、-0.5 V (vs. Ag/AgCl) 印加、安定待機

⑤ 細胞へ向かって 150 μm 接近させ、その間の電流値を測定

⑥ 再び上方へ戻し、⑤を繰り返す

(1) ラット心筋細胞への薬剤添加

図はラット心筋細胞に対し、終濃度が 50 μM となるように ATP 溶液を添加した際の拍動回数の変化を示したものである。マイクロピペットにより ATP 溶液を添加すると単位時間当たりの拍動回数が増加することがわかる(右図)。しかしながらキャピラリーデバイスによる局所添加(inject)では添加後も拍動回数が変わらず、また添加中も波形の変化がほとんどないことがわかった。

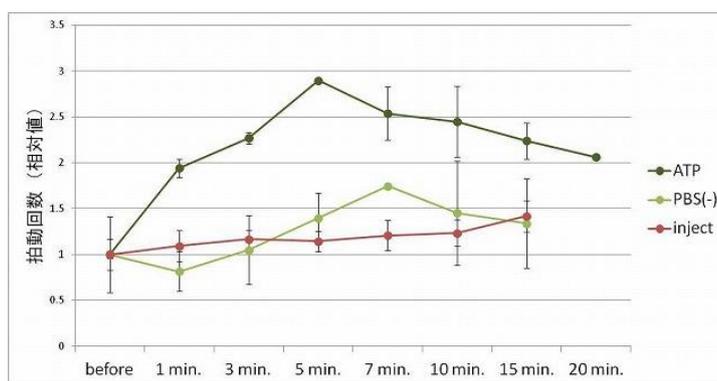


図 ラット心筋細胞への ATP 溶液の添加

心筋細胞はシャーレ中でほぼすべての細胞が同調して拍動リズムを刻んでいるため、一部の細胞に

のみ薬剤を添加しても同調リズムを変化させるには至らない可能性がある。そこで細胞を任意の形・大きさにパターンニングして播種可能な器材を利用し、測定標的細胞とその周辺の細胞を「島」として他の「島」と隔離して薬剤添加を行ったところ、下図のように添加中に波形変化を生じさせることが可能となった。

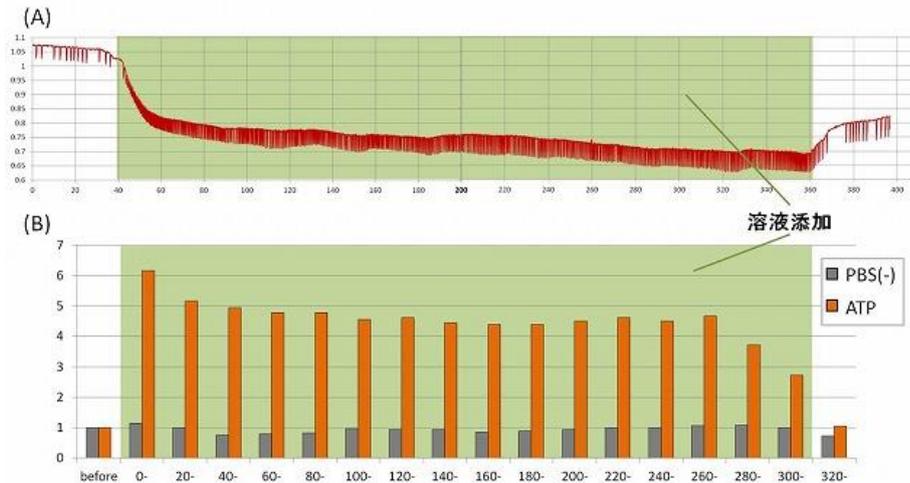


図 細胞パターンング器材とキャピラリーデバイスの組み合わせによるラット心筋細胞へのATP溶液の添加
 (A) 拍動波形 (B) 単位時間当たりの相対拍動回数

このようにキャピラリーデバイスを用いた局所的薬剤添加により、ラット心筋細胞の拍動変化を生じさせることが可能であると明らかになった。しかしながら拍動変化が生じているにもかかわらず、薬剤添加後の酸素消費測定では変化を観察できなかった。この要因として、薬剤添加を終了させると拍動が添加前の状態に戻ることがあること、薬剤添加の制御は+電圧印加であるのに対して酸素消費測定は-電圧印加であり、薬剤添加と酸素消費測定の両立が難しいことなどが挙げられる。したがって実験の目的に応じて、酸素消費測定が重要である場合にはマイクロピペットによる添加を、薬剤添加による素早い拍動変化を捉えるためにはキャピラリーデバイスによる添加を採用するなどの使い分けを行うことが望ましい。

(2) モルモット心筋細胞への薬剤添加

QT 時間延長をはじめとする心筋細胞の拍動変化にはイオンチャネルが関与している。ここではイオンチャネルがヒトと相同性が高いとされるモルモット心筋細胞を新規に開発し、マイクロピペットによる薬剤添加実験を行った。

ラット心筋細胞ではピペットにより培地全体に Astemizole 添加を行うと、キャピラリーデバイスによる添加とは異なり拍動が完全に停止し、波形変化を観察することができなかった。しかしモルモット心筋の場合は、弛緩時間が延長した波形変化を捉えることができた (下図)。よって多機能型細胞アッセイ装置は、動物種の違いによる薬剤応答性の違いについて評価可能であることが示された。

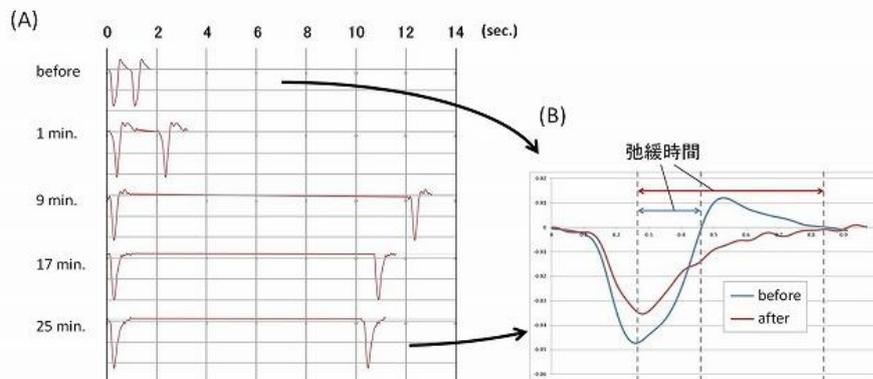


図 Astemizole 添加後のモルモット心筋細胞の拍動波形変化
 (A) 平均波形全体 (B) 添加前と添加後の波形比較

(3) ヒト iPS 心筋細胞への薬剤添加

iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells: 人工多能性幹細胞) とは、体細胞に数種の遺伝子導入を行うことで分化万能性と増殖能を獲得させた細胞であり、再生医療や創薬研究などへの応用が期待されている。ヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導した細胞 (CDI 社) を用いて、ラット心筋細胞やモルモット心筋細胞と同様に薬剤添加実験を行い、拍動の変化を多機能型アッセイ装置で測定した。

iPS 心筋細胞をパターンニング器材に播種し、にアドレナリンβ受容体刺激剤である Isoproterenol を、キャピラリーデバイスを用いて添加した際の拍動変化を示す (下図)。添加中、単位時間当たりの拍動回数が増加している様子が捉えられている。また拍動波形の形状から、iPS 心筋細胞はモルモットやラットとは異なり、単一方向 (Z 方向) だけでなく横方向 (X 方向や Y 方向) の動きも合わさった複雑な動きをしていることが捉えられた。このように多機能型細胞アッセイ装置を用いて iPS 心筋細胞の動きを評価可能であることを確認した。

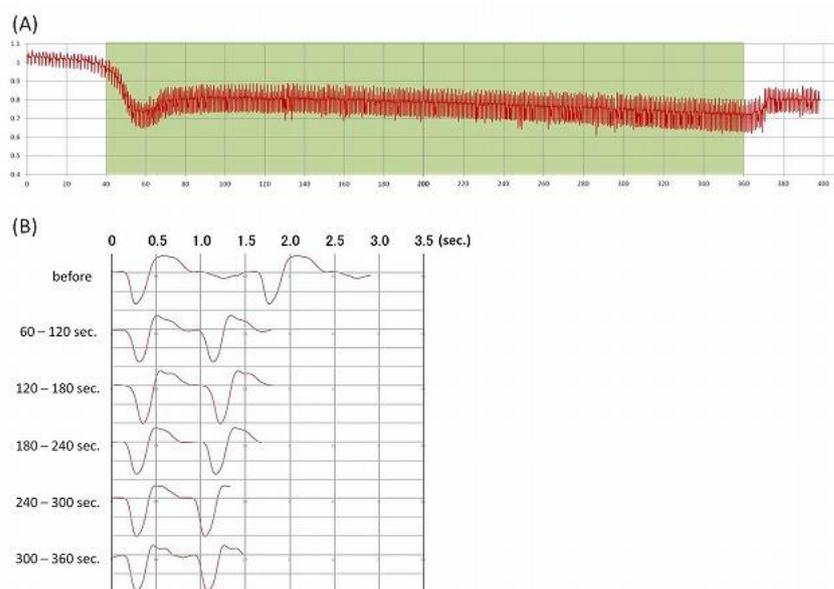


図 Isoproterenol 溶液添加中のヒト iPS 心筋細胞の拍動波形変化
(A) 拍動波形の変化 (B) 平均化した波形

2-6-5 脂肪細胞の形状および破骨細胞による骨吸収窩の測定のための実証試験

破骨細胞は骨のリモデリング (再構築) において骨吸収を担っている細胞であり、象牙質切片上で培養することで骨吸収窩 (ピット) を形成する (右図)。形成されたピットの大きさにより破骨細胞の骨吸収能を評価するが、走査型電子顕微鏡やヘマトキシリン染色など、従来の方法ではピットの面積を測定することに限定されていた。

多機能型細胞アッセイ装置は、2-2 項で述べたセンサプローブ位置制御技術、2-3 項で述べた制御・解析ソフトウェアを用いて、対象物の形状を測定し、その体積・容積を計算することが可能である。そこで象牙切片上で破骨細胞を培養し、形成されたピットの形状を測定・解析し、容積の計算を行った。

破骨細胞によるピットはその形状が急峻かつ深さが 100 μm 前後に及ぶこともあり、3つの測定モードのうち、Constant current モードでは測定中の接触リスクが高く、Constant height モードでは深部の形状を捉えきれない場合がある。したがって今年度では、測定時間の短縮化を検討した Hopping モードを主流とし、ピッ

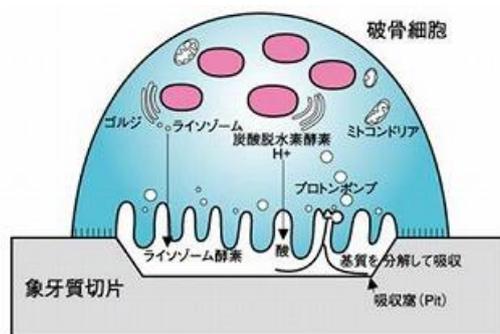


図 破骨細胞による骨吸収と吸収窩の形成

トの形状測定最適化と評価方法の検討を行った。

Hoppingモードでのセンサプローブの接近と戻る距離についてはサンプル間のピット形成の差異を読み取るレベルまで点数を減らした測定を検討した。

ヒトまたはラット破骨細胞を象牙切片上に播種し、数週間の培養後に細胞を剥離した後、ヘマトキシリンによる象牙表面のピットの染色を行った(右図(A))。次に同じ象牙サンプルをシャーレ底面に固定し、1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ を含むPBS(-)中でプローブに0.5 V (vs. Ag/AgCl)を印加して、 $4000 \times 4000 \mu m$ の範囲を測定した(右図(B))。また図では一部のピットを抜粋し、その容積を計算した(右下図)。ヘマトキシリン染色ではヒト、ラットのいずれも同程度にピットが形成されているように見受けられるが、多機能型細胞アッセイ装置を用いた測定ではヒトの場合にはピットが捉えられているのに対し、ラットの場合はほとんど見受けられなかった。この結果と実体顕微鏡による目視観察には相関があり、多機能型細胞アッセイ装置によるピット形成の評価は、ヘマトキシリン染色法よりも深さや体積が測定できる点で正確性に優れた手法と言える。また測定溶液にサンプルを入れるだけで即座に測定が開始できることから、電子顕微鏡観察よりも簡便性に優れている。したがって、多機能型細胞アッセイ装置は破骨細胞によるピット形状の測定とその評価に適していると考えられる。

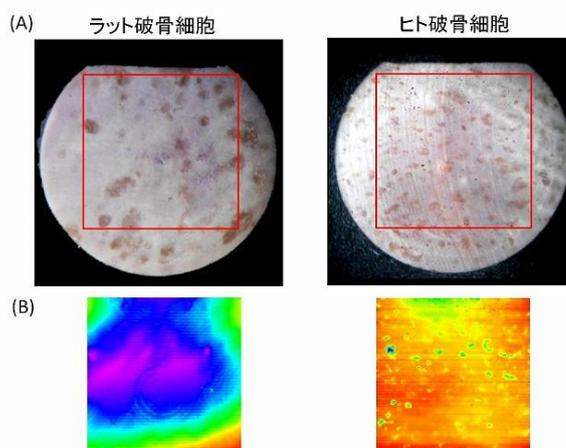


図 ラットおよびヒト破骨細胞により形成されたピットの形状
(A) ヘマトキシリン染色 (B) 多機能型細胞アッセイ装置による結果

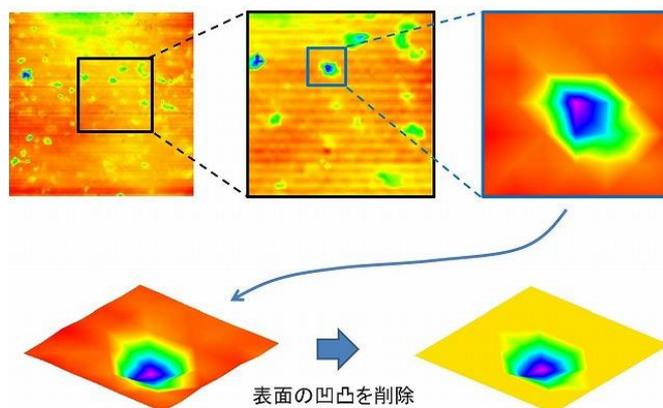


図 ヒト破骨細胞により形成されたピットの容積計算

2-7 市場リサーチ

本事業にて開発中の多機能型細胞アッセイ装置の市場ターゲットは、初代培養細胞および株化細胞を用いた研究を行うアカデミア・企業・医療機関などの研究室である。細胞アッセイ装置に求める性能や機能は研究室・研究者により様々であり、同じ細胞のユーザーであっても目的や分野によりアッセイ系の評価は異なる。したがってできる限り多くの幅広い分野の細胞研究者からニーズ情報を入手することが重要である。

前年度に加え平成25年度は、心筋細胞関連6か所、脂肪細胞関連4か所、破骨細胞関連2か所、幹細胞(ES/iPS)関連2か所、その他細胞アッセイ全般5か所においてヒアリングを実施し、それぞれの研究テーマの視点から本アッセイ装置の長所・短所の確認や新規アッセイ系についての意見交換、既存のアッセイ装置と比較した評価を行い、さらには今後検証すべき課題についての提示も頂いた。

研究分野	結果
心筋細胞	<ul style="list-style-type: none"> キャプラリーデバイスは高評価だが、培地に添加した場合とのデータ比較を求められた。 拍動だけでなく、心筋肥大や血栓成長などのリクエストを受けた。 複数電極など、スループットを上げる必要性を感じた

	<ul style="list-style-type: none"> データの集計方法などで指摘を受けた 酸素消費データの再現性を上げる必要性を感じた 等
脂肪細胞	<ul style="list-style-type: none"> 連続アッセイできることは好評であった。 具体的な体積の変化を数値化できる点が好評であった シングルセルでの測定が魅力的 褐色脂肪で酸素消費測定できることが望まれる。 幹細胞からの分化実験で高分化を持続する培地成分での電極の汚染対策の必要性を感じた。 等
破骨細胞	<ul style="list-style-type: none"> ピットの体積を測定できることは大変好評であった。 ヒトの単核球から分化した骨吸収アッセイ系に興味をもたれた。 細胞培養を維持しながら測定が望まれる 人工骨上でのアッセイが望まれる 等
幹細胞	<ul style="list-style-type: none"> 間葉系幹細胞での分化測定に興味をもたれた iPS でのアプリケーション例を増やす必要性を感じた 等
その他	<ul style="list-style-type: none"> 既存の測定機器との相関データをとるようアドバイスを受けた。 細胞アッセイ市場（特に幹細胞研究）は成長が見込まれる 今までにない細胞測定原理であることが評価された さらなるコストダウンの必要性を感じた 等

一方で、本アッセイ装置は細胞研究分野においては全く新規のシステムを有するものであるため、ヒアリング時に提示したアプリケーションデータ例によっては、本アッセイ装置の目標認識に相違が生じたことは、今後のユーザー訪問やデータ構築の際に改善すべき点である。

今年度での多機能型細胞アッセイ装置の改良・開発にて装置の熟成度はさらに増し、より高精度で多様なアプリケーションに対応可能となった。2-6 項における多機能型細胞アッセイ装置実験機の開発では市場リサーチの結果を随時フィードバックし、ニーズに応じた新規アプリケーションの検討やデータの収集を行ってきた。

本事業終了後はユーザーからサンプルを受領し、多機能型細胞アッセイ装置で測定・評価した試験結果を提示することでより細かな要望に応え、さらに実用レベルに向けて邁進していきたい。

第3章 全体総括

医薬品や機能性食品などの研究開発には細胞を用いた各種解析が不可欠である。また日々進展する再生医療技術の向上と臨床化においては、研究開発のみならず医療に用いる細胞の品質管理が必ずや必要になると予想される。本事業は、高度で多彩な機能を備え持った細胞アッセイ装置を開発、事業化し、川下ユーザーに多機能かつ低コストの細胞解析装置を提供することを目指すものである。

これを実現するためには、

- ① 微細なセンサプローブによって、不均一な細胞群から目的の一細胞のみを非接触で解析するとし、複雑な精製プロセスを必要としない。
- ② 細胞の固定、溶解などが不要で細胞消費量の低減と同一細胞の連続測定も可能とする。
- ③ 測定条件を選択することにより、一台の装置で多様な解析も達成できる。
- ④ 一細胞選択的に微量薬剤を添加するキャピラリーデバイスを具備する。

等がその必要条件であると考え、これらを実現するために我々は、

1. 微小電流検出に適したアナログ基板の開発
2. プローブ位置制御技術の開発
3. 制御・解析のための組み込みソフトウェア技術の開発
4. センサプローブの開発
5. キャピラリーデバイスの開発
6. 多機能型細胞アッセイ装置の開発

の6項目のサブテーマを設定し、研究開発に努めてきた。さらに随時市場調査を行うことで、ユーザーの意見や要望を開発・改良に取り入れ、ニーズに合致した装置の構築を目指してきた。

その結果、平成23年度および平成24年度に引き続き今年度中もこれらのサブテーマは概ね計画通りに開発が実施された。特に

サブテーマ1：応答速度を維持したまま高感度に測定可能なアナログ基板を開発した点

サブテーマ2：操作性の高いプローブ固定治具を開発した点や、PIEZO 駆動ステージにステッピングモータを併用することにより広範囲での位置制御が可能となった点

サブテーマ3：汎用性が高く多彩な解析に対応可能なソフトウェアを開発した点

サブテーマ6：連続測定に対応した環境維持装置を設計・開発した点や、測定を自動で行う組立型ソフトウェアを開発した点

などは、当初の計画目標を超えた成果を得ている。

またサブテーマ4においては、昨年度に開発し、本アッセイ装置に導入し検討した耐熱性樹脂製センサプローブの安定した作製法の改良を行うことで、いち早く本事業で構築された技術を市場に還元できるよう努めている。

今後は、事業化に向けた改良と検討に注力していく。具体的なプロセスとしては、初めに無償の受託アッセイを行うことで、多方面にわたるデータの詳細な検証作業を進めるとともにユーザーニーズの検証を行っていきたいと考えている。その過程で、装置の測定データ構築と市場への周知、ユーザーへのデータ提示と意見徴収に基づく測定・解析技術の改良と個々のニーズに対応した解析ソフトウェア改良など、アプリケーションのバリエーション拡大を目指す。その後、装置の特徴と優位性のユーザー理解を得た上で、装置本体とアプリケーションソフトウェア販売の事業化を目指していきたいと考えている。