

平成23 年度戦略的基盤技術高度化支援事業  
「バイオハザード対応・無菌・ダメージレス・マイクロ流路チップ・  
セルソーターの開発」

研究開発成果等報告書

平成25年 1月

委託者 関東経済産業局

委託先 株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

## 目次

### 第1章 研究開発の概要 ……3ページ

- 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標
- 1-2 研究体制
- 1-3 成果概要
- 1-4 当該研究開発の連絡窓口

### 第2章 本論 ……10ページ

- 2-1 従来方式の課題
- 2-2 他社のマイクロ流路チップ型セルソーターの例
- 2-3 本開発の目的
- 2-4 本開発のベースとなる技術
- 2-5 研究開発の目標と成果
- 2-6 研究開発の内容
  - ①電子部品・デバイスの実施技術によるワイヤレス制御セルソーターの開発
  - ②組み込みソフトウェア技術による操作性の向上
  - ③プラスチック射出成形技術によるマイクロ流路チップの原価削減
  - ④製品評価用の対策と改良
  - ⑤本装置のユーザー評価と優位性を示すアプリケーション開発
  - ⑥医療・輸出対応等の事業化の準備と改良

### 第3章 事業化計画と全体総括 ……33ページ

- 3-1 研究成果のまとめ
- 3-2 特許・成果発表等
- 3-3 事業化計画の概要
- 3-4 製品化スケジュール
- 3-5 事業化の体制
- 3-6 本開発品のアピールポイント
- 3-7 セルソーターの市場規模と動向
- 3-8 本開発品が必須となる用途
- 3-9 本開発品の適応ユーザー層の推定
- 3-10 プレマーケティングによる本開発品のニーズ調査

# 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) 研究の目的

最近のライフサイエンスの研究(特に創薬研究)では、動物愛護と開発効率の観点から動物実験からセルベーススクリーニングへとパラダイムシフトが進行している。つまり細胞レベルの研究の重要性がますます重要になっており、細胞を分離するセルソーター技術がライフサイエンスの進歩のキーツールとなっている。セルソーターは細胞を1個単位で流す流路にレーザーを照射し、個々の細胞から発する散乱光や複数の波長の蛍光を多チャンネルで検出し、そのアナログ信号を高速にデジタル信号に変換し、散乱光信号による細胞の大きさ情報と蛍光信号による細胞膜の表面タンパク情報によって分離目的の細胞か否かを判断し、目的細胞のみを分離回収する装置である。

従来のセルソーターは理化学機器として普及しているが、①細胞ダメージの問題、②巨大な装置サイズ、③熟練の操作者が必要、④検体間のコンタミの発生、⑤バイオハザード対策の困難さ、等の要因から医療機器にはなっていない。再生医療で用いる細胞処理は、無菌が保障されるプロセスで行わなければならないので、今後の再生医療の進歩には、セルソーターのバイオハザード強化やダメージフリーを中心とした改良が重要であると考えられる。本研究では、使い捨てマイクロ流路チップ内での細胞分離を行う方式により、上記の医療やバイオテクノロジー分野でのニーズに最適な、医療用途に展開可能な小型、簡単操作、バイオハザード対応のセルソーターを開発する。

### 2) 研究の概要

本研究では、以下の特徴を有するセルソーターを開発する。

- ①交換型のマイクロ流路チップ内で、空気圧制御によるPUSH-PULLパルス流により細胞をダメージフリーで分離する。
- ②小型装置であり、通常的安全キャビネット内に設置可能である。
- ③操作が簡単
- ④装置本体と制御PC間をワイアレス化(安全キャビネット内装置の遠隔制御)
- ⑤チップ原価低減のための開発(接着工程の無いの樹脂チップの製造技術)

具体的には、測定細胞の多数の蛍光信号を高速で信号化处理するための多チャンネル高速AD変換ボードの開発、装置本体と制御PC間のワイアレス化することで安全キャビネット内に設置した装置の遠隔制御を可能とする。

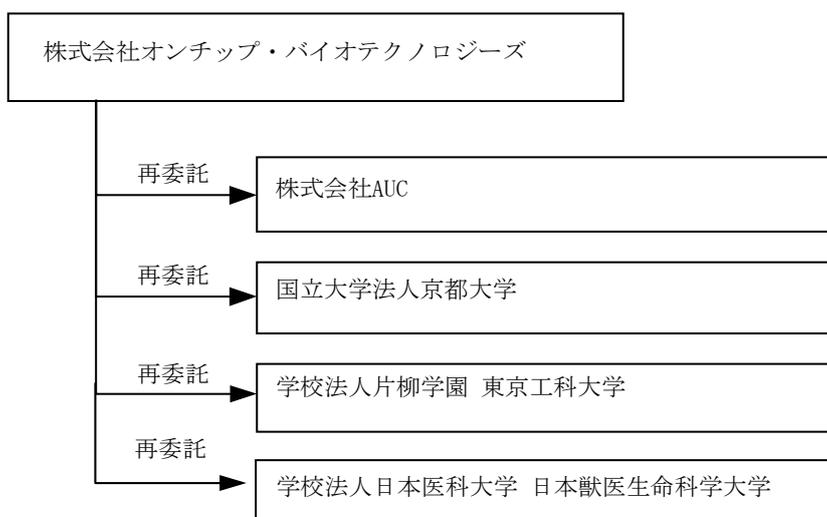
本開発のセルソーターに用いるマイクロ流路チップは、サンプル液や廃液などの複数のリザーバーを有している。このリザーバーは人手による接着工程で取り付けているためコストアップになっている。コストダウンを実現するため、一体成型による部品点数の削減、製造工程の短縮を実現する。また、再生医療用途を考えてチップの滅菌化も確立する。本開発のセルソーターは、非習熟操作者でも操作可能であることが必要であるため、条件設定を簡便化し、制御ソフトの操作性を向上させる。

さらに、本開発のセルソーターの速やかな事業化に向けて、ユーザー評価や本開発装置の優位性（バイオハザード対応・無菌・ダメージフリーでの細胞分離）を具体的に示すアプリケーション（測定・分離事例）の開発を行う。

## 1-2 研究体制 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)

### (1) 研究組織及び管理体制

#### 1) 研究組織(全体)



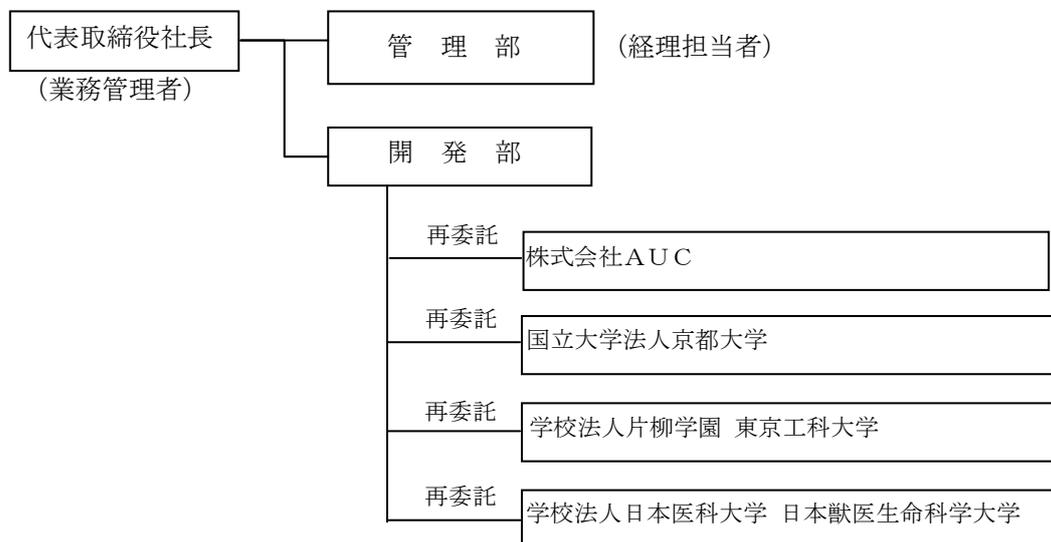
総括研究代表者（PL）  
株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ  
取締役開発部長 武田 一男

副総括研究代表者（SL）  
株式会社AUC  
開発設計部長 渡瀬 進一郎

## 2) 管理体制

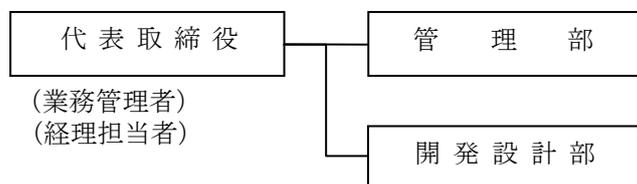
### ① 事業管理機関

[株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ]



### ② 再委託先

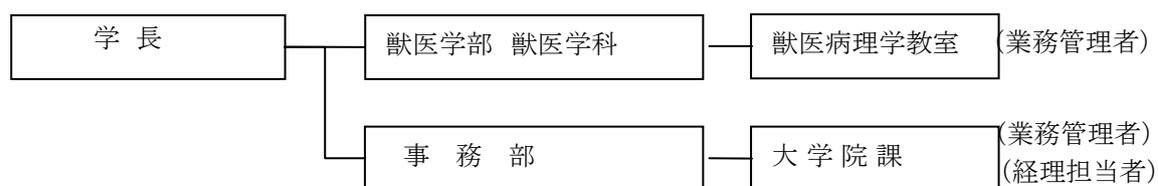
[株式会社AUC]



[国立大学法人京都大学]



[学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学]



(2) 管理員及び研究員

【事業管理機関】株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

①管理員

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
小林 雅之	代表取締役社長	⑦
幸山 エリコ	管理部 部員	⑦

②研究員

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
武田 一男	取締役 開発部長	①②③④⑤⑥
山下 南海子	開発部 主任研究員	②④⑤
藤村 祐	開発部 研究員	①②③④⑤⑥
西尾 香織	開発部 研究員	②④⑤
川瀬 芳恵	開発部 研究員	②④⑤

【再委託先】

(研究員)

株式会社AUC

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
渡瀬 進一郎	開発設計部長	①②④⑥
榛葉 健	開発設計部	①④
井口 兼太郎	開発設計部	①②④
木暮 智文	開発設計部	①②④

国立大学法人京都大学

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
菅井 学	医学部附属病院探索医療センター 探索医療開発部 講師	⑤
中野 圭子	同上 技術補佐員	⑤
林 達成	同上 技術補佐員	⑤
眞野 浩人	同上 技術補佐員	⑤

学校法人片柳学園 東京工科大学

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
鈴木 郁朗	応用生物学部 応用生物学科 大学院 バイオニクス専攻 助教	⑤

学校法人日本医科大学 日本獣医生命科学大学

氏名	所属・役職	実施内容 (番号)
道下 正貴	獣医学部獣医学科獣医病理学教室講師	⑤

### (3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

(事業管理機関)

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

(経理担当者) 管理部 部員 幸山 エリコ

(業務管理者) 代表取締役社長 小林 雅之

(再委託先)

株式会社AUC

(経理担当者) 代表取締役 内田 慎一

(業務管理者) 代表取締役 内田 慎一

国立大学法人京都大学

(経理担当者) 事務部 経理・調達課産学経理掛 江川 裕一朗

(業務管理者) 事務部 経理・調達課産学経理掛長 福島 慎吉

(業務管理者) 医学部附属病院探索医療開発部 菅井 学

学校法人片柳学園 東京工科大学

(経理担当者) 研究協力課 塚本 勝

(業務管理者) 応用生物学部 学部長 齋木 博

学校法人日本獣医生命科学大学

(経理担当者) 事務部 大学院課 寺田 稔寿

(業務管理者) 獣医学部 獣医学科 獣医病理学教室 講師 道下 正貴

(業務管理者) 事務部 大学院課 課長 清水 和宏

## 1-3 成果概要

### ①-1 小型装置のままでの細胞識別能力の向上するための多チャンネル蛍光検出系の小密度実装技術の確立

他社の従来型装置に対して、装置が小型という強みがあるが、原理検証機では蛍光色検出数が4色と少ないため細胞識別能力が劣っている。特に幹細胞や末梢血中を流れるがん細胞の検出には蛍光検出数の追加が求められており、小型装置のままでは蛍光検出数を増加する技術開発が必要である。

小型装置で蛍光検出数を増加する為に、一個の検出器で複数の信号検出を可能とした。この方法により、多チャンネル検出装置の小型化を実現した。

### ①-2 分離精度向上のための高速演算処理ボードの開発

細胞の検出から分取までの間に、目的細胞であるか否かの細胞識別を行う必要がある。8種類の信号を高分解能で取得し、検出から分離までに間に合うように演算処理速度を速める必要がある。このために、18ビット以上の高分解能でサンプリング時間 $0.5\mu$ 秒で10チャンネルの信号をAD変換し、FPGAにより細胞識別のための演算処理を $50\mu$ 秒以下で処理するボードを開発し、検出から分離までの時間以内での処理を達成した。この結果、細胞分離のハード的な性能は1000個/秒以上となる。しかし、マイクロ流路内のパルス流のレスポンスが律速するために5個/秒が実際の限度となっている。

### ①-3 バイオハザード対応強化 (ワイアレスによるリモート制御)

装置本体と制御PCとの間には接続ケーブルが存在するため、装置本体を安全キャビネットに設置しても、不完全なバイオハザード対策であり、ワイアレス化を求める顧客が多い。そこで、信号処理をすべて、装置本体内で行うための多チャンネル高速AD変換ボードの開発をし、ワイアレス化を実現した。

## ② 組み込みソフトウェア技術による操作性の向上

従来のセルソーターは調整が必要なパラメーターが多く、その調整に右表の通り多大な時間を要し、熟練者でなければ操作できない。本開発の試作機はこれに比べれば簡便であるが、一定の熟練を要している。

サンプルバッファの違いにより細胞の流速が変化し、これに応じた装置調整が必要である。この調整をソフトウェアの改良により、自動又は半自動化する予定であったが、まだ実現できていない。この内容は今後実施する予定である。

### ③ 射出成型技術によるマイクロ流路チップの原価削減

現状の弊社の射出成型チップは、多数の成型品を人が接着している。そのためチップの製造コストが高くなっている。一体成形により人手が必要な工程を少なくして、チップ原価低減を行った。

### ④製品評価用の対策と改良

試作装置の評価の過程で、チップにピペットでサンプルを入れた時に、ピペットの先でリザーバーの底がぬけるトラブルが発生した。この対策として、リザーバーの底に対応する場所には床を設置し補強するようにチップホルダー構造を改良した。

### ⑤ 本装置のユーザー評価と優位性を示すアプリケーション開発

京都大、東京工科大、日本獣医生命科学大学において使用して頂き、幹細胞の識別に必要なサイドポピュレーションの検出のアプリケーションを確立した。また、アプリケーション開発と並行して、アプリケーションに必要なバッファー類などの試薬類のキット化を行った。また、その試薬類が神経細胞に対して細胞毒性がないことを確認した。

### ⑥ 薬事法及び輸出対応のための準備と改良

欧米への輸出のためのEMC試験を実施し、基準をクリアするレベルであることを確認した。また、再生医療用で求められる無菌処理に対応するために、チップの滅菌方法の検討と無菌性試験を行い、滅菌チップの製品化を行った。

## 1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ

代表取締役社長 小林雅之

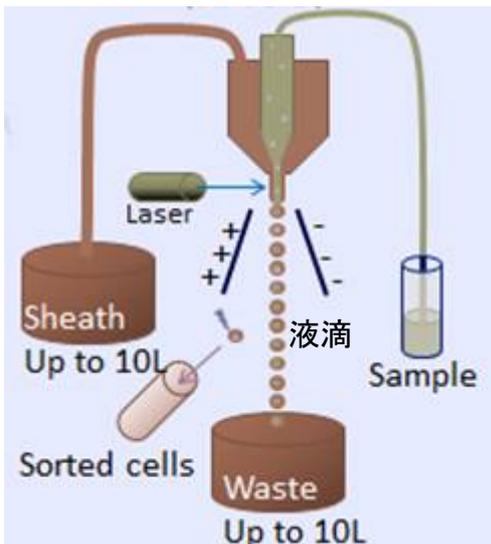
T e l : 042-385-0461 F a x : 042-385-0462

e-mail : m-kobayashi@on-chip.co.jp

## 第2章 本論

### 2-1 従来方式の課題

セルソーターは細胞を流した状態でレーザーを照射し、個々の細胞から発する散乱光や複数の波長の蛍光を検出し、目的の細胞のみをリアルタイムに判断して分取する装置である。従来のセルソーターは、Jet in Air方式であって以下のようにバイオハザードとサンプルキャリーオーバーとダメージフリー・ソーティングの3点について課題がある。これらの課題は、使い捨てマイクロ流路内ソーティングによって解決するという戦略で開発を行った。



従来型セルソーター(Jet in Air方式)

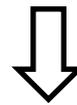
ノズルから液滴を発生させて、液滴単位で高電場で分離する方法。



従来型セルソーター内の  
液滴形成に伴い発生するエアロゾル  
(バイオハザード上の課題)

#### 従来型セルソーターの課題

- 1) 液滴形成に伴うエアロゾルの発生  
(感染細胞の装置内汚染と大気中汚染の危険性有)
- 2) サンプルキャリーオーバー有  
(固定送液系の為、検体間クロスコンタミネーション有)
- 3) ダメージレスソーティング  
(サンプルへの圧力が大きい:大気圧の3倍以上)  
(培養液中でのソートが不可能)



使い捨てマイクロ流路内ソーティングで  
解決可能

## 2-2 他社のマイクロ流路チップ型セルソーター製品の例

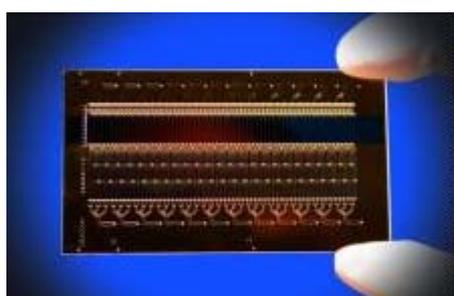
マイクロ流路チップ内で蛍光信号に基づいて個々の細胞を識別して分離するセルソーターは、製品として実用化されて現在販売されているものは、下記のサイトノーム社のものである。この製品はマイクロ流路チップに多数のチューブが接続している。このため、チップ自体を交換しても検体間クロスコンタミネーションの可能性が残る。この製品は、メディカルグレードのソーティングが可能であることをうたっているが、このためにはチップ以外の流路系全体もサンプル毎に交換しなければならない。



Cytonome ST 社(米国)

<http://www.cytonomest.com/>

装置本体



マイクロ流路チップ



マイクロ流路チップ

チップに多数のチューブが接続  
(流路系全体が使い捨てではない)

使い捨てチップではない → **Not Biosafety !**

## 2-3 本開発の目的

医療ニーズに最適な下記の特長を有するバイオハザード強化のための安全キャビネット設置状態でのワイアレス制御が可能な小型セルソーターの製品開発を目的としている。

### 1) バイオセーフティー&無菌ソーティング

- ・感染性検体で求められるバイオセーフティー

- ・再生医療で求められる無菌処理

以上のニーズを

滅菌チップ流路内のソーティングと

安全キャビネット内に設置装置で満足し、

さらにワイアレス操作で使い勝手を向上させる。



使い捨てソーティングチップ  
(滅菌処理済)

### 2) 検体間クロスコンタミネーションフリー

使い捨てチップ交換により流路全交換となるチップにより実現する。



安全キャビネット内設置

### 3) ダメージフリー・ソーティング

電場などの細胞にダメージを与える外力を利用せず培養液中でのソーティングを可能とする。



ワイアレス操作

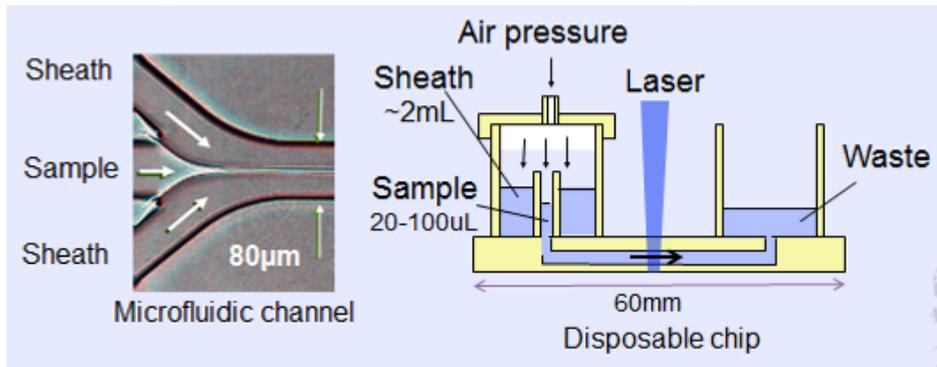
## 2-4 本開発のベースとなる技術

関連する保有特許

特許の名称 (内容)	出願番号 (出願日)	内容	出願人	発明者
① フローサイトメーターおよびそのフローセル	特願2008-172161 出願日2008年7月1日  日本特許No 4358888 米国特許No 8248604	空気圧による使い捨てマイクロ流路チップの流速制御	オンチップ・バイオテクノロジー	武田一男
② 使い捨てチップ型フローセルとそれを用いたフローサイトメーター	特願2009-26794 出願日2009年2月9日 国際出願番号 PCT/JP2010/051694	使い捨てチップに適する側方散乱検出技術	オンチップ・バイオテクノロジー	武田一男
③ 使い捨てチップ型フローセルとそれを用いたセルソーター	特願2010-7295 出願日2010年1月15日 国際出願番号 PCT/JP2011/050270	PUSH-PULLパルス流による細胞分離	オンチップ・バイオテクノロジー	武田一男

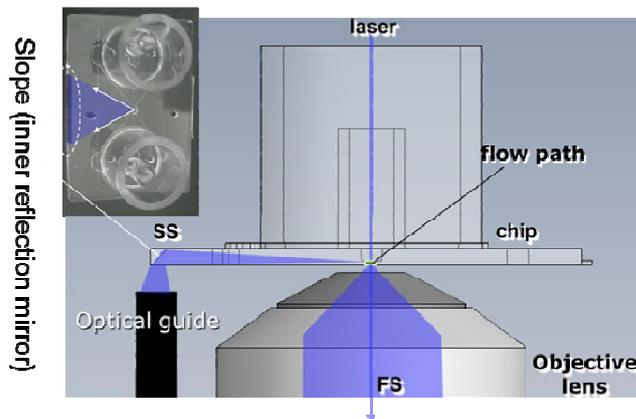
### ①空気圧制御による使い捨てマイクロ流路チップ技術 (上記リストNo1)

リザーバー構造を有するマイクロ流路チップで、空気圧により流速制御を行う。



### ②チップ基板内全反射を利用した側方散乱検出技術 (上記リストNo2)

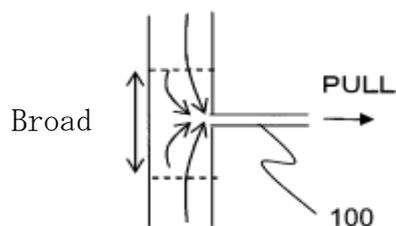
平板基板に形成されたマイクロ流路では、平板方向への信号光の検出に通常のレンズ光学系を適用することは不可能である。透明基板自体を導光板として基板端の斜面での全反射を利用して流路内から発生した光を外部に効率よく反射させて検出する。



### ③. Push/Pullパルス流によるマイクロ流路内ソーティング技術（上記リストNo3）

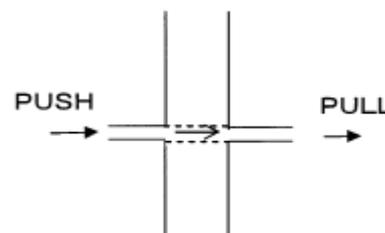
マイクロ流路では外力による部分的な流れの変化が全体の流れに影響する（下図の左図）。この現象がマイクロ流路内ソーティングの基本的障害となっている。この課題を、Push/Pullパルス流によって解決した。この方式は培養液中でのソーティングが可能であり、細胞に与えるダメージが無い。

マイクロ流路ソーティングの基本的課題

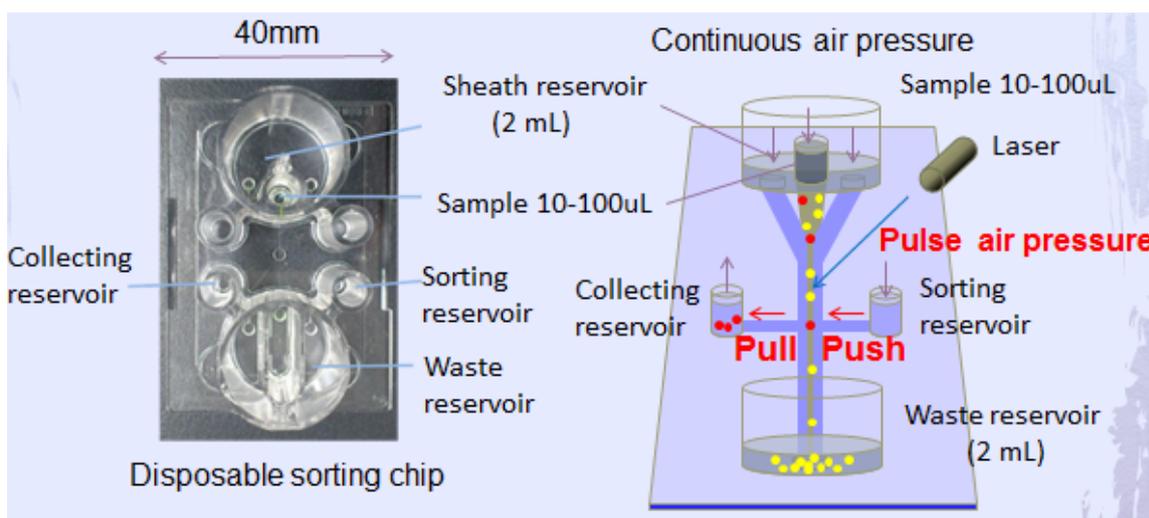


マイクロ流路中ではソーティング流が流路全体の流れに影響する。

PUSH-PULL方式による課題解決



PUSH-PULL方式により、ソーティング流が流路全体に及ばなくする。



## 2-5 研究開発の目標と成果

開発目標	成果
<p><b>①電子部品・デバイスの実装技術によるワイアレス制御セルソーター開発</b></p> <p>①-1 小型装置のままでの細胞識別能力向上 目標:蛍光6色検出 (実施:オンチップ社、(株)AUC)</p> <p>①-2 分離精度向上の為の高速演算処理ボード開発 目標:500event/sec (実施:オンチップ社、(株)AUC)</p> <p>①-3 バイオハザード対応強化(ワイアレスによるリモート制御) (実施:オンチップ社、(株)AUC)</p>	<p>・安全キャビネット設置サイズで3レーザー、蛍光6色検出 (達成度:100%)</p> <p>・検出300event/secでの分取達成 (達成度:80%)</p> <p>・ワイアレス制御を実現 (達成度:100%)</p>
<p><b>②組み込みソフトウェア技術による操作性向上</b> 目標:処理時間41分/100uL (実施:オンチップ社、(株)AUC)</p>	<p>・処理時間 50分 (達成度:80%)</p>
<p><b>③プラスチック射出成型技術によるマイクロ流路チップ原価削減</b> 目標:コスト50%減 (実施:オンチップ社)</p>	<p>・試作チップは1月に完成予定 (達成度:50%)</p>
<p><b>④製品評価用の対策と改良</b> 目標:試作装置の操作性・完成度の向上 (実施:オンチップ社、(株)AUC)</p>	<p>・チップの底抜けトラブル防止対策のチップホルダ改良を実施 (達成度:100%)</p>
<p><b>⑤本装置のユーザー評価と優位性を示すアプリケーション開発</b> 目標:アプリケーションを複数開発する。 (実施:オンチップ社、東京工科大、日本獣医生命大、京都大)</p>	<p>・神経細胞やSP細胞(幹細胞)解析 (達成度:100%)</p>
<p><b>⑥医療・輸出対応等の事業化の準備と改良</b> 目標:EMC試験クリア (実施:オンチップ社、(株)AUC)</p>	<p>・装置のEMC試験クラスAクリア ・滅菌チップの準備 (達成度:90%)</p>

## 2-6 研究開発の内容

### ①電子部品・デバイスの実装技術によるワイアレス制御セルソーターの開発

#### ①-1 小型装置のままで細胞識別能力の向上(多チャンネル蛍光検出系の小密度実装技術)

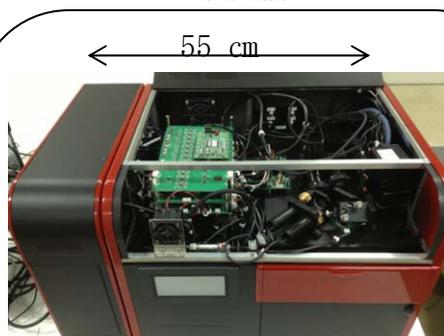
(実施：(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、(株)AUC)

細胞の識別能力を向上させるために、搭載レーザ本数を多い装置が求められる。レーザ本数を増加させると光学系を大きくしなければならない。そこで、小型装置のままでレーザ本数増加に対応させる為に、一個の検出器で複数の信号検出を可能とする方法をとる。この方式を実現するために、光学系と多チャンネルAD変換ボードの開発を行った。現状の小型装置で蛍光検出数を4色から6色以上に増加することを目標とした。

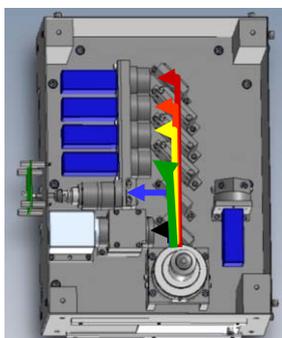
#### 【光学系の改良】

装置サイズを変えずに、蛍光4色から6色検出への増加とレーザ2本からレーザ3本へ増加

改良前

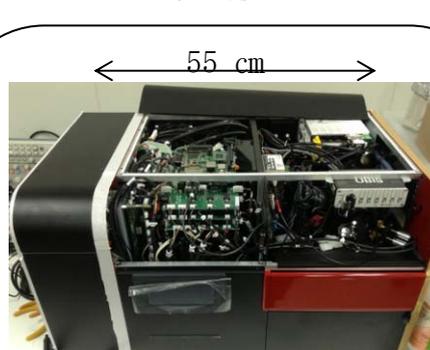


レーザ2本  
蛍光4色検出

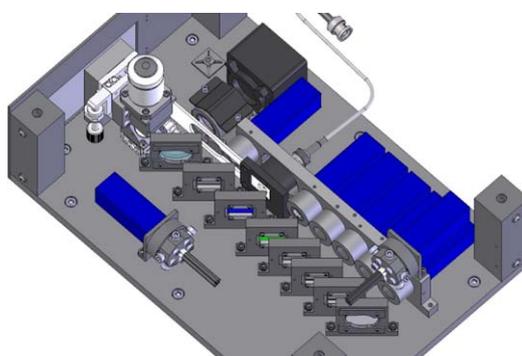


検出光学系

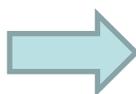
改良後



レーザ3本  
蛍光6色検出

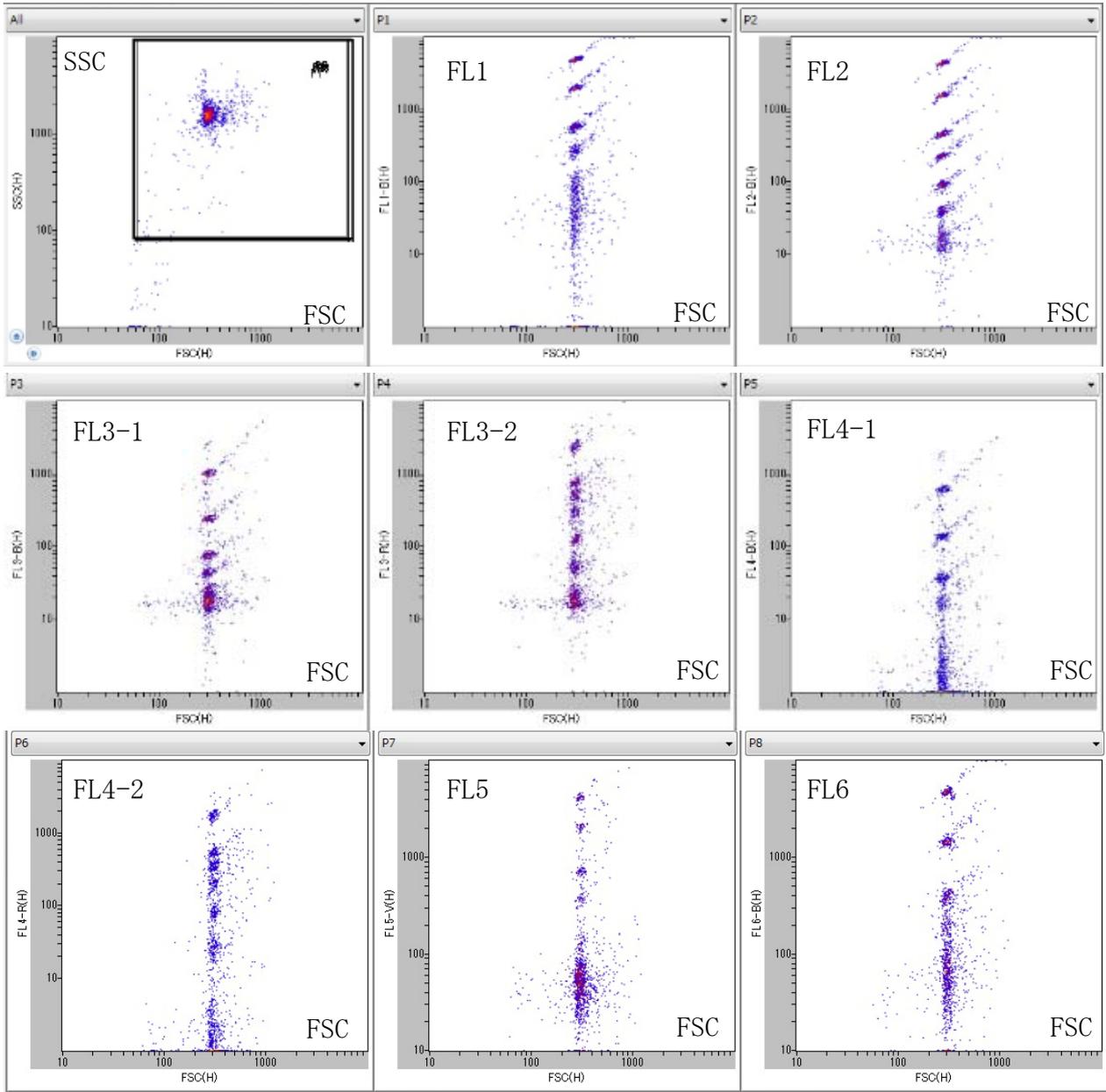


検出光学系



【改良後の計測信号】（最大10種類の信号計測）

検出信号数：最大10種類（内訳：蛍光信号8種＋散乱光信号2種）

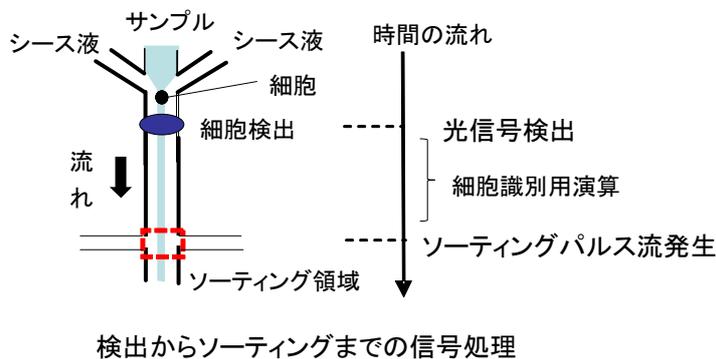


<p><b>【目標】</b> 小型サイズのまま 蛍光検出数を 6色化する。</p>	<p><b>【達成度】</b> 100%</p>	<p><b>【成果】</b> 装置サイズ現状維持で、以下の光学系を増加した。 蛍光検出器を4個から6個、レーザー本数を2本から3本に増加させ、 蛍光色数8個、散乱光信号2個の計10個の計測を可能とした。</p>
---	------------------------------	---

## ①-2 分離精度向上のための高速演算処理ボードの開発

(実施:株オンチップ・バイオテクノロジーズ、株AUC)

セルソーターは細胞の検出から分取までの短時間に、目的細胞であるか否かの細胞識別を行う必要がある。本開発装置では、細胞の流速が約1m/sであり、検出からソーティングまでの距離が約400マイクロメートルであるから、その時間間隔は、約400マイクロ秒である。この時間内に、計10種類（散乱光2種、蛍光信号8種）の信号を取得し、検出から分離まで細胞識別のための演算処理を行い、目的細胞と判断したらソーティングパルス流を発生する。本開発では、上記の信号処理に必要な多チャンネル対応高速演算処理ボードを開発し、これにより、本開発セルソーターの処理速度を500イベント/秒以上を目標とした。



上記を達成する為に、下記の仕様の10チャンネル対応のAD変換を含む高速演算処理ボードを開発した。

### 開発仕様

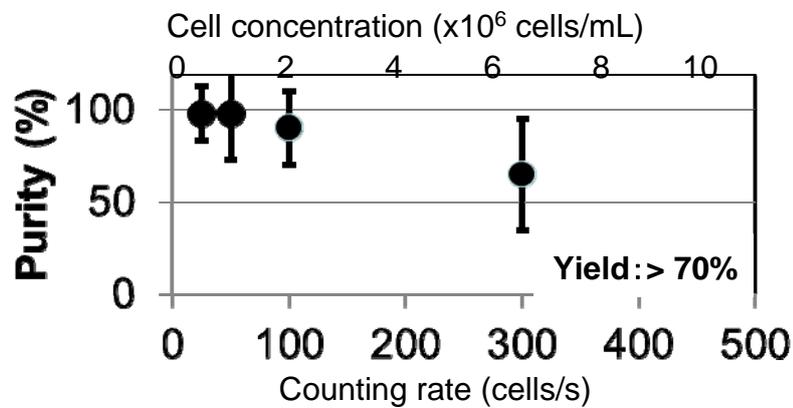
#### 機能1；

- レーザー照射系からの散乱および蛍光データ（10ch）を同時にAD変換しメモリへ保存
- 測定信号  
FS\_L、FS\_M、FS\_H、SS、FL1、FL2、FL3、FL4、FL5、FL6
- AD変換分解能  
18Bit、同時サンプリング 0-4Vを±4VとしてAD変換する。
- サンプリング間隔  
最大 0.5 μs（最大波形幅 4096 μs）
- 信号10ch全ての波形に関し、下記データを取得する。
  - (1) PEAK：指定閾値を超えたタイミングで、指定期間、各波形の最大値を計測する。
  - (2) AREA：指定閾値を超えたタイミングで、指定期間、各波形の積算面積を計測する。
  - (3) WIDTH：指定閾値を超えたタイミングで、指定期間、各波形の幅を計測する。
  - (4) PROFILE：一定時間のすべてのサンプリングデータを計測



試作した高速AD変換ボード

10ch入力、AD分解18ビット、サンプリング0.5マイクロ秒



上記ボードにより実現したソーティング性能: 検出300イベント/秒において細胞分取を達成

<p><b>【目標】</b> 処理速度を500イベント/秒以上とする。</p>	<p><b>【達成度】</b> 80%</p>	<p>ハード処理性能は、検出300イベント/秒において、ターゲット細胞1%程度を60%以上の効率での分取を可能とした。</p>
---	-----------------------------	---

【今後の対策】 現在の改良ソーティングチップは2月以降に完成するが、そのチップはソーティングパルス流路を拡大しており、時間応答性が2倍程度よくなる見通しでこれによって目標を達成する見込みである。

①-3 バイオハザード対応強化(ワイアレスによるリモート制御)

(実施: (株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、(株)AUC)

装置本体と制御PC間に接続ケーブルをワイアレス化した。

内容は非公開とします。

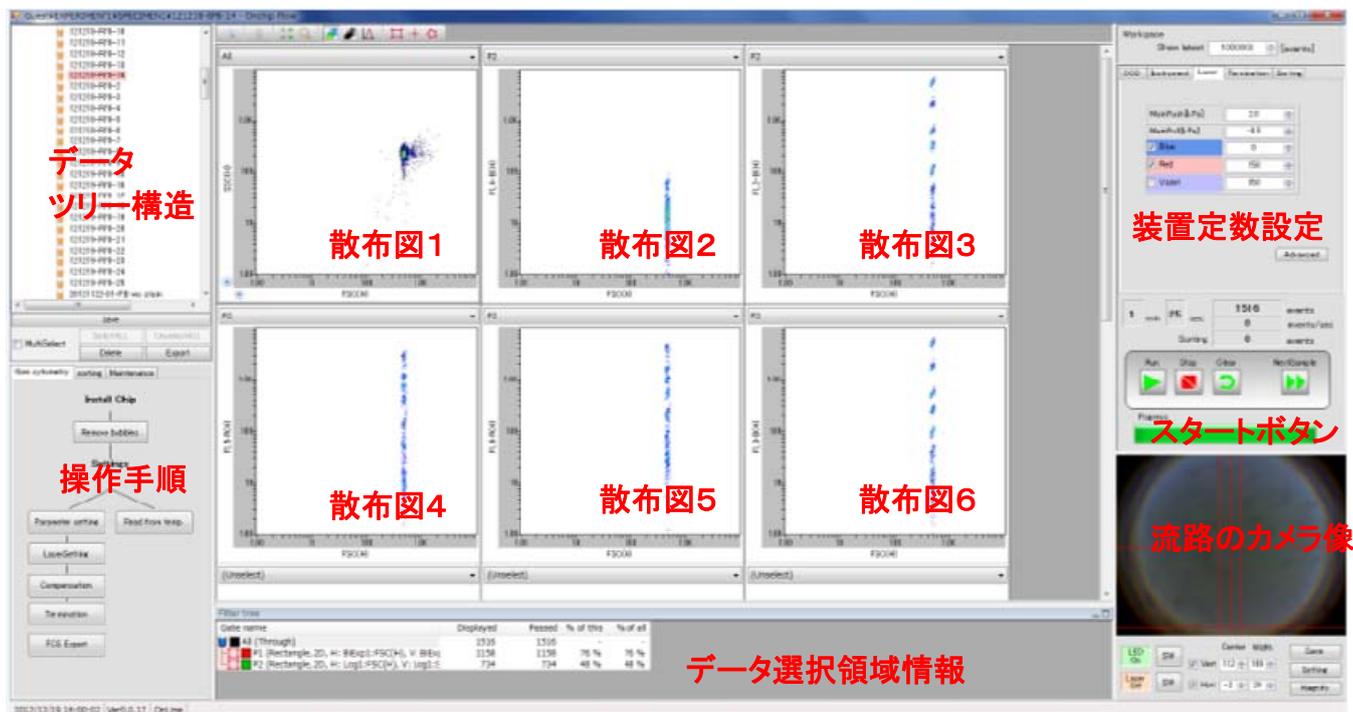
<b>【目標】</b> 小型サイズを維持したまま装置本体と制御PC間をワイヤレス化する。	<b>【達成度】</b> 100%	<b>【成果】</b> ワイアレス制御を可能とした。これによって、安全キャビネット内に設置した状態でPCとの邪魔な接続ケーブルが無くなった。
--	----------------------	--

## ②組み込みソフトウェア技術による操作性の向上

(実施:株オンチップ・バイオテクノロジーズ、株AUC)

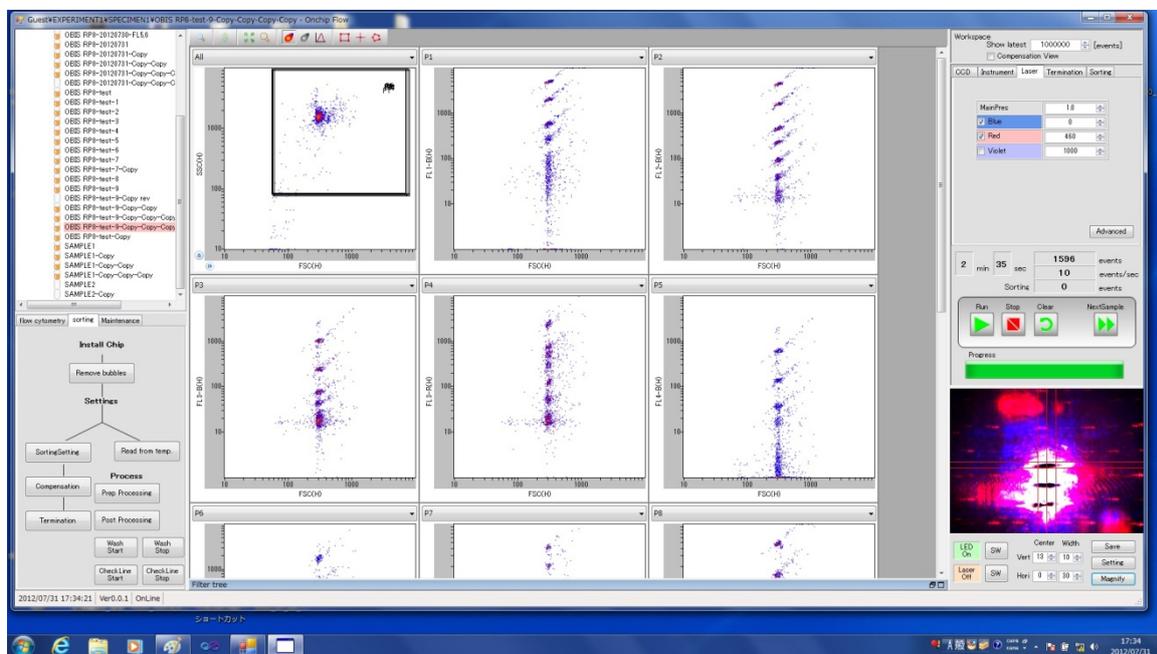
従来のセルソーターは調整が必要なパラメーターが多いため、その調整に数時間を要し、装置の起動から後処理を含めた1回の細胞分離実験に多大な時間を要する。操作が複雑であるために、数日の訓練を受けた専任のオペレーターが必要である。

本開発のセルソーターでは、調整するパラメーター数を少なくする。さらに細胞ダメージを無くすために各種の培養液中でのソーティングの実現を目標としている。ユーザが希望するバッファーに合わせたパラメータ設定を簡易化するためのソフトウェアの改良を行った。これにより、細胞に最適な環境でのソーティングと簡単操作性を実現した。



制御ソフト画面構成

最大6個の散布図と流路内観察カメラ像をソーティング中に表示する。  
 カメラ像により、流路とレーザーの位置調整を行い、気泡の発生の検知を可能とした。



<p><b>【目標】</b>装置の調整をソフトウェア等の改良により非熟練者でも操作可能とし、装置立ち上げからソーティング終了まで41分以内とする。</p>	<p><b>【達成度】</b> 80%</p>	<p><b>【成果】</b>処理時間50分を達成した。</p>
---	-----------------------------	---------------------------------

**【今後の対策】** 画像認識による自動プロセスによって、40分以下を目指す予定である。

### ③プラスチック射出成型技術によるマイクロ流路チップの原価削減

(実施:株オンチップ・バイオテクノロジーズ)

現状のセルソーティングに用いるマイクロ流路チップは、複数のプラスチックの射出成形品を接着しているためチップの製造コストが高くなっている。このため、一体成形により部品点数と人手が必要な工程を削減し、チップの原価低減を行う。一括射出成型化により、チップの原価を現状の50%以下とすることを目標とした。原価は未確定であるが、1000円の予定である。

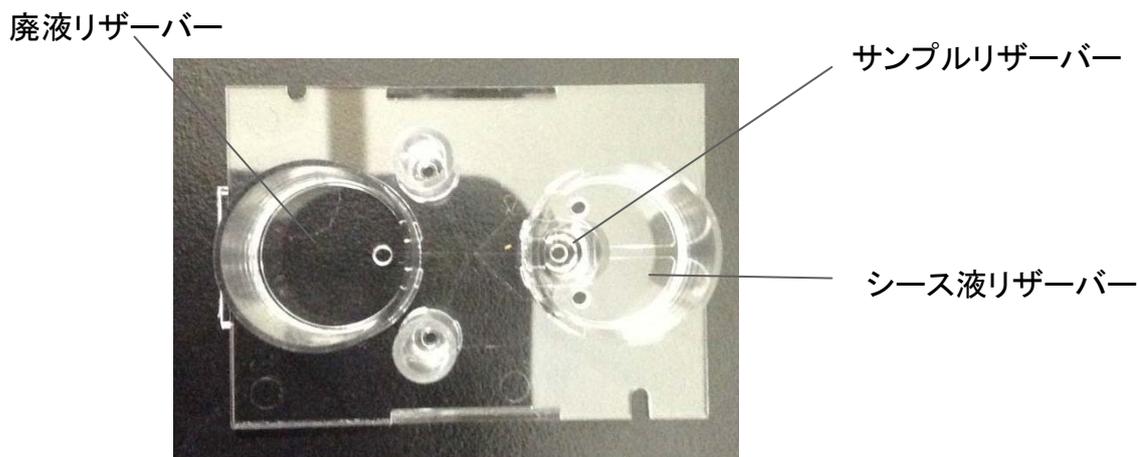
これまでの接着工程を含む製造方法

複数の射出成形部品を接着してチップを形成するが、接着工程は一個単位の手作業であるためチップのコストが高くなる。



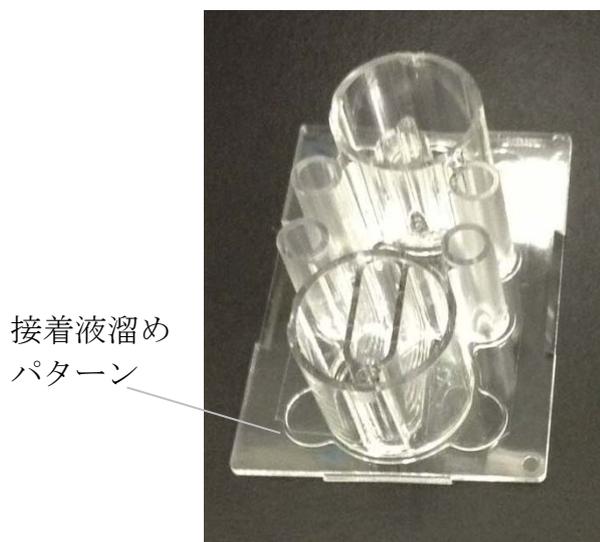
接着工程を含まない製造方法

チップ原価低減のために、リザーバー構造を接着せずに一体構造で射出成形するチップ試作を行った。下図は試作した一体化射出成形により製造したチップの写真である。



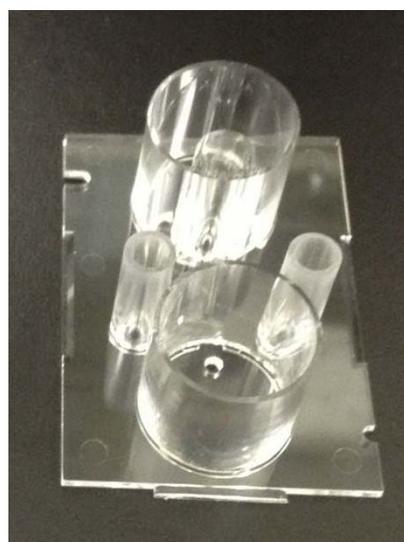
試作チップ

## 一体化射出成形チップと接着チップとの比較



接着液溜め  
パターン

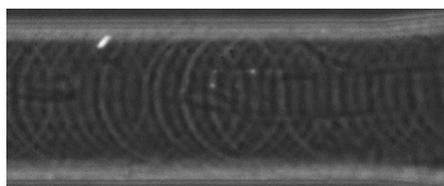
リザーバーを接着したチップ



リザーバー構造の一体化射出成形チップ  
(接着液溜めパターンは存在しない)

## 一体化射出成形チップのラフネス評価

流路中にレーザーを照射するので流路内のラフネスを顕微鏡の明視野像により評価した。改善前は研磨痕が観察され、レーザー照射可能なラフネスレベルではなかったが、射出成形の金型の再研磨により研磨痕が観察されなくなった。



ラフネス改良前（研磨痕が観察される）



ラフネス改良後（研磨痕が観察されない）

<p><b>【目標】</b>一体成型等によりチップの原価を現状比50%以下とする。</p>	<p><b>【達成度】</b> 90%</p>	<p><b>【成果】</b> ラミネートシール部分以外が完成した。</p>
---	-----------------------------	---

**【今後の対策】** ラミネート部分は3月までに完成の見通しである。

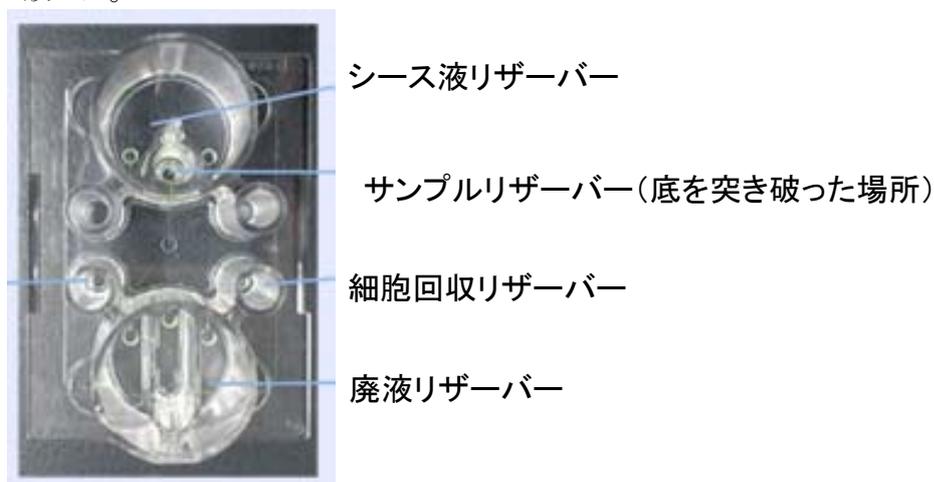
#### ④製品評価用の対策と改良

(実施: (株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、(株)AUC)

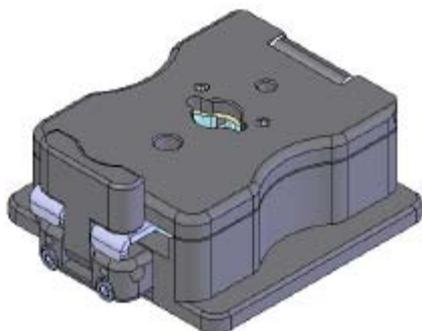
ユーザー評価のフィードバックに応じた所要の改善を実施し、装置の改良を行った。  
また、装置の製造原価低減の観点からの設計変更を検討した。

#### ユーザー使用によるトラブル対策のための改良点

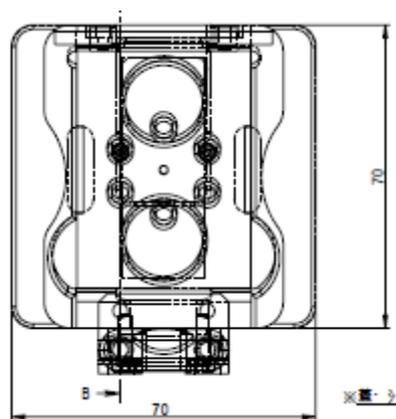
トラブル内容: サンプルをチップに投入するときに、誤ってリザーバーの底面をピペットで突き破った。



対策のための改良: チップホルダーのサンプルリザーバーの底に対応する部分に底抜け防止板を設置した。



チップホルダー



リザーバー底抜け防止のために底に床を設ける改良を施した。

<p>【目標】ユーザー評価のフィードバックに応じた改善を実施する。</p>	<p>【達成度】100%</p>	<p>【成果】 チップ底抜け防止用チップホルダ改良 原価低減実施(購入品見直しによりコスト20%減)</p>
---------------------------------------	------------------	--

## ⑤本装置のユーザー評価と優位性を示すアプリケーション開発

従来のセルソーターのユーザーである京都大学、東京工科大学、日本獣医生命科学大学において、本開発装置を用いた実証使用を行い、性能や使い勝手の比較評価により改良点を抽出し、上記研究テーマ②及び④にフィードバックする。また、本開発装置が有するバイオハザード対応・無菌・ダメージフリーでの細胞分離という特長を生かし、幹細胞、前駆細胞、ES細胞、癌細胞、神経細胞等の各種細胞を用いた細胞のダメージの比較評価を実施し、本装置の優位性を明らかにするアプリケーション（解析・分離事例）を構築する。

### ⑤-1 神経細胞のダメージレスソーティング

（実施：(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、東京工科大学）

従来型ソーター(Jet in Air方式) でソートした細胞は、培養開始から7日目ではほぼ死滅した。ところが開発ソーターではソートしていない細胞と変わらず樹状突起を伸ばし神経細胞としての形態を持たせることに成功した。

#### 試料と手順

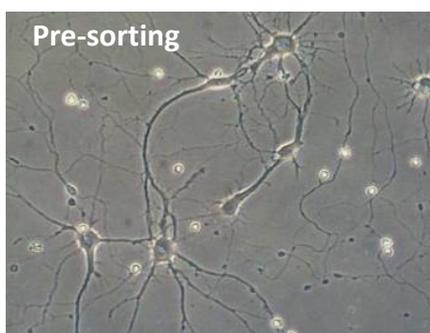
Cells from hippocampus,  
mouse E18



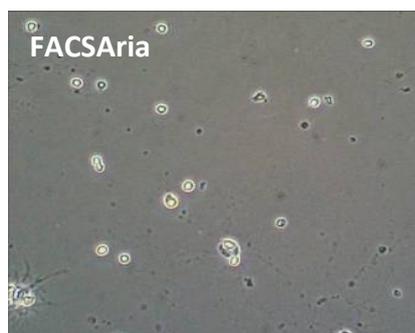
Sorted by FACS Aria  
or On-chip



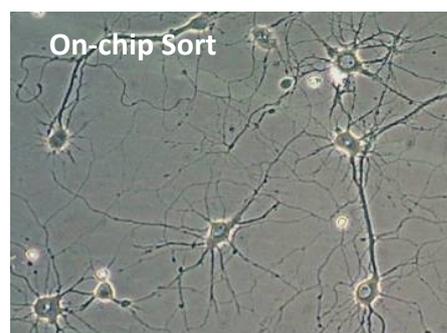
Culture (7日後観察)



コントロール



ダメージ有



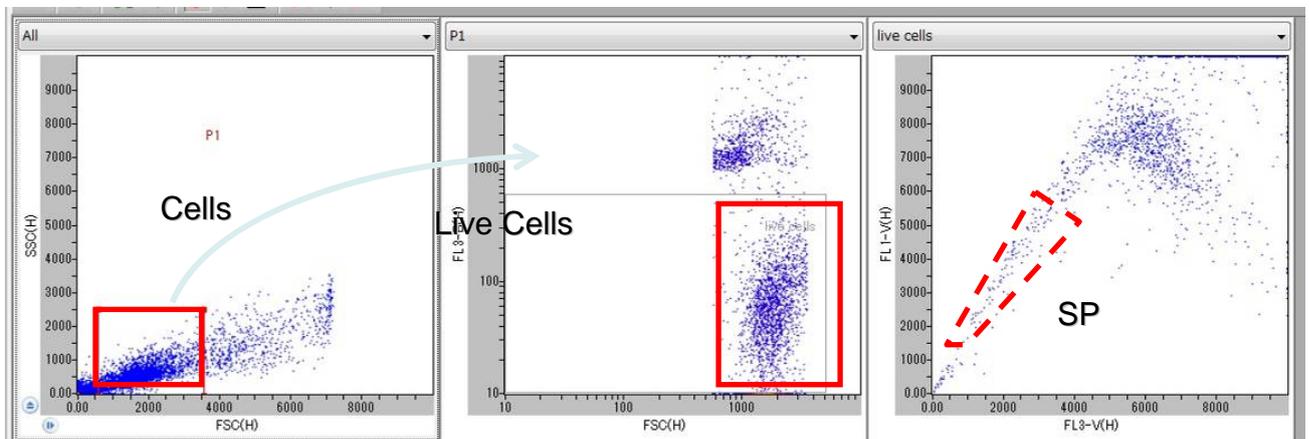
ダメージ無

## ⑤-2 Side population (SP)の検出

(実施: 株オンチップ・バイオテクノロジーズ、日本獣医生命科学大学)

多くの幹細胞が短波長励起の蛍光色素に対する高い排出能を持つことが報告されており、Side Population (SP) 細胞と呼ばれる。On-chip Sortでは新たに405nmレーザーを搭載して、使い捨てチップで検出を可能とした。これにより、無菌的に幹細胞の分取がダメージフリーで可能となる。このことは再生医療の協力的な研究ツールとなると予想される。

サンプル: セルライン MCF-7



SSC  
↑  
FSC  
→

PI  
↑  
FSC  
→

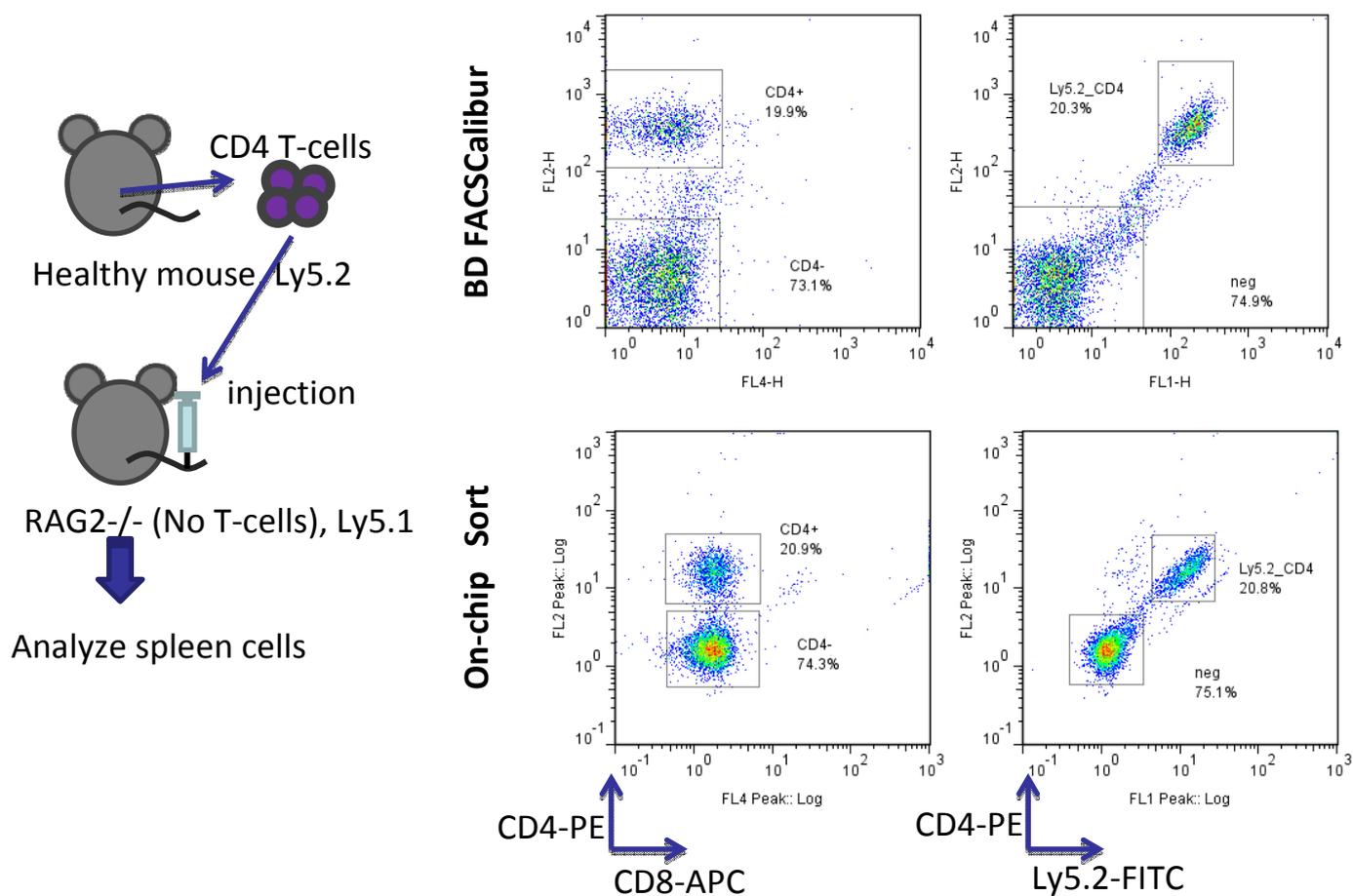
Blue  
↑  
Red  
→

日本獣医生命科学大学 道下先生

⑤-3 マウスの血球解析による従来装置との性能比較

(実施: (株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、国立大学法人京都大学)

装置が小型であるため、無菌飼育のマウス舎に入れることが可能であり、簡単なマウスの血液検査が出来るとマウスの品質管理に有益である。そこで、マウスの血球解析 (CD4, CD8) をおこない、従来装置と比較を行った。



京都大学 菅井先生

<p>【目標】本開発装置の特長を生かしたアプリケーションを複数構築する。</p>	<p>【達成度】 100%</p>	<p>【成果】神経細胞やSP細胞(幹細胞)解析など3件を確立。</p>
--	-----------------------	-------------------------------------

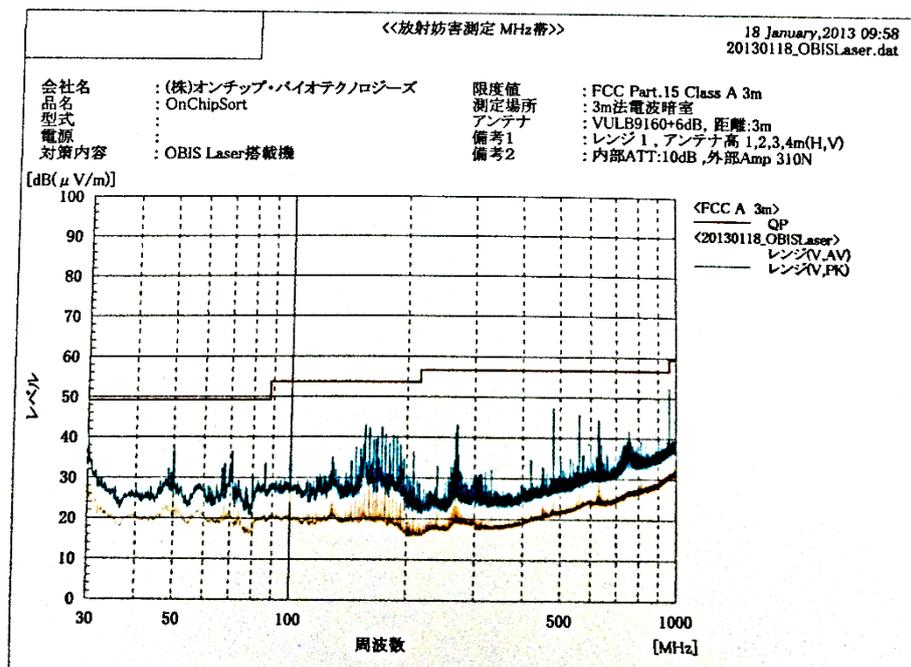
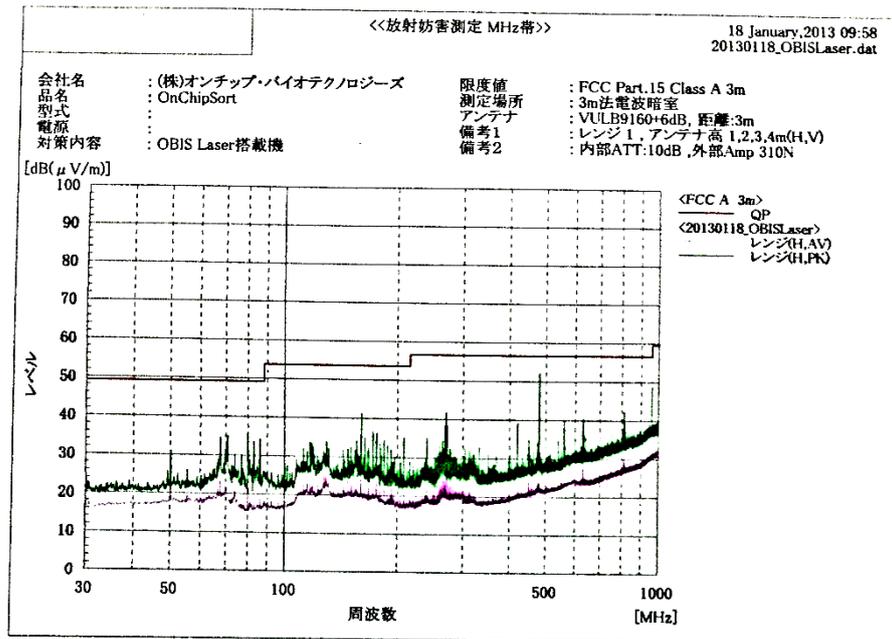
⑥医療・輸出対応等の事業化の準備と改良

(実施:株オンチップ・バイオテクノロジーズ、株AUC)

欧米への輸出のためのEMC試験と、医療展開の際に求められるチップの滅菌処理と菌性試験を行った。また、本開発装置の各種アプリケーションに共通に利用可能な試薬類のキット化をおこなった。

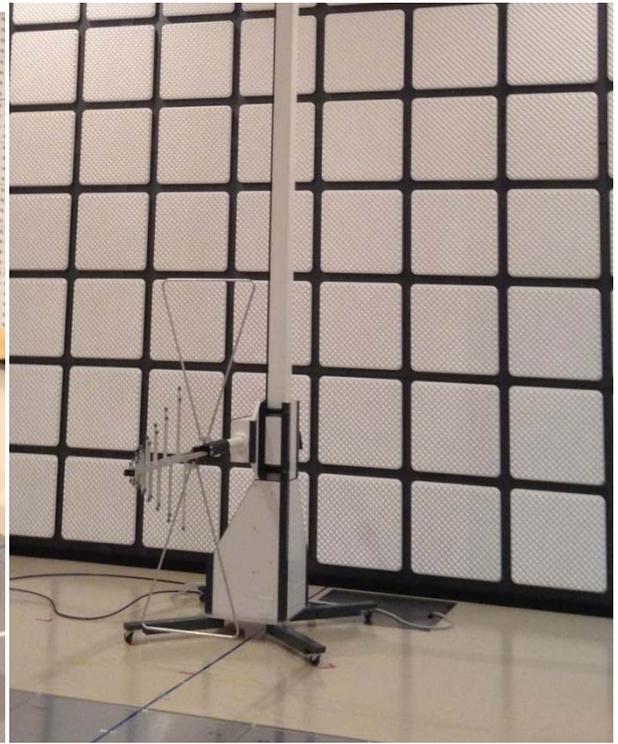
⑥-1 EMC試験

装置のEMC試験を実施し、合格レベルであることを確認した。





EMC試験用準備中の試作機



EMC試験室の電磁波受信機

## ⑥-2 滅菌チップの開発

ソーティングチップの滅菌方法の検討:

### 1) エチレンオキサイドガス(EOG)滅菌法

滅菌処理後にEOGガスが残留し、その残留ガスが細胞毒性を有するため不採用。

### 2) ガンマ線照射滅菌法:

透明樹脂チップが青色に着色し、さらに樹脂自体の自家蛍光が増大し蛍光検出のノイズとなったため不採用。

### 3) 過酸化水素低温プラズマ滅菌

処理後に残留するガスは、酸素と水分のみであるため細胞毒性がなく、さらに樹脂の自家蛍光を増大することもないためにこの方法をチップ滅菌法として採用することにした。

## 滅菌チップの無菌性試験

上記の過酸化水素低温プラズマ滅菌法で処理したチップの無菌性試験をおこなった。

具体的には、チップに滅菌処理したMueller Hinton Broth培養液を入れたのち回収し、回収した培養液を寒天培地で10日間培養しコロニー法で細菌の有無をしらべ、無菌性を確認した。

(結果)

(1) BBL™ Mueller Hinton Broth



コロニー無



(1) BBL™ Mueller Hinton Broth



コロニー無

### ⑥-3 試薬類の準備

製品化の準備を完了した試薬類は以下の通りである。



#### 1) 細胞無毒性の流路の親水性コーティング剤

製品名：Through Path Plus 40X

#### 2) シース液

Through Path Plus 40Xを独自の無血清細胞保存液で40倍希釈したもの。  
細胞を数日間冷蔵保存可能である。

製品名：On-chip Sheath

#### 3) サンプルバッファー

On-chip Sort専用のサンプル用バッファーであり、独自の無血清細胞保存液と  
Through Path Plus とPVPを含む。

製品名：On-chip Sample Buffer

#### 4) ユーザが希望する細胞培養液を利用するためのサンプルバッファー調整用液

PVPを含み、細胞培養液で2倍に希釈して使用する。

製品名：Sample Buffer 2X

<b>【目標】</b> 欧米への輸出のために電磁波安全性試験を実施する。 チップの滅菌方法を確立する。 試薬類のキット化を行う。	<b>【達成度】</b> 90%	<b>【成果】</b> 装置のEMC試験クラスAクリア (CEマーク認証は2月以降の予定) 滅菌チップの準備の完了
--	---------------------	---

**【今後の対策】** 2月以降にCEマーク取得のための追加の安全試験を実施する予定である。

## 第3章 事業化計画と全体総括

### 3-1 研究成果のまとめ

本開発による成果である完成した装置仕様を下表にまとめた。

#### On-Chip Sort Wi-Fi (本開発品) の主な仕様

光学系と検出感度	
レーザー	半導体レーザー488nm(30mW), 637nm(100mW), 405nm(50mW)
測定パラメーター	前方散乱光, 側方散乱光, 蛍光6色(最大 10パラメーター・3レーザー)
サイズ検出感度	FSC < 0.5 μm, SSC < 0.5 μm
蛍光感度	< 200 MESF FITC,
データ分解能	4 decades, 18bit
パルス解析	Height, Area, Width
検出波長	452/45 nm (Alexa405, Dye cycle Violet), 543/22 nm (FITC, Alexa488), 585/40 nm (PE) 607/24 nm (PI), 676/37 nm (APC, Alexa647), > 710 nm (APC-Cy7, Alexa700)

解析とソーティング機能	
分取方式	マイクロ流路チップ内パルス流 Push & Pull方式
流路サイズ	80 μm × 80 μm
光軸調整	不要
サンプル・ボリュウム	10 - 100 μL (細胞培養液使用可能)
シース・ボリュウム	1 - 3mL (細胞培養液使用可能)
細胞濃度	< 10 <sup>6</sup> /mL (サンプル全量測定可能)
目的細胞比率	< 数% (ターゲット濃度による)
純度	98% (細胞濃度による)
収率	70%以上
細胞ダメージ	ダメージ無
コンタミネーション・フリー	測定チップ交換のため
その他	再生医療用無菌ソーティング、バイオハザード対応サンプル非拡散ソーティング
解析速度(アナライザーモード時)	5,000 events/sec
解析速度(ソーティングモード時) 分離速度(targets/sec)	1,000 events/sec < 5 targets/sec
操作時間	1時間以内

### 3-2 特許・成果発表など

非公開とします。

### 3-3 事業化の計画の概要

<b>実用化目標 製品等</b>	マクロ流路チップ・セルソーター“On-chip Sort Wi-Fi”
<b>現在の技術開発 動向とその影響</b>	流路が全交換型のセルソーターは他にない。 通常サイズの安全キャビネットに設置できるセルソーターは他にない。 装置本体と操作PCをワイヤレス制御できる装置は他にない。
	<b>競合技術等 に対する検討</b>
<b>現在の市場動向 及びその対応</b>	上記の通り、本開発品と同様のコンセプトの競合技術を見い出すことができない。従来型セルソーターとは細胞分離機構が異なり、最適な用途も異なるため、事業展開が容易である。  iPS細胞や細胞を用いた医療・診断への注目によりセルソーターの市場は拡大している。 このため数年前までは本市場は米国のBD社とBC社の2社による寡占市場であったが、Life technologies社、SONY、BIORAD社など大手の企業が近年市場に参入した。いずれのセルソーターも従来のJet in Air方式であるため、細胞ダメージが大きいという欠点があり、神経細胞などを生きたまま分取は不可能である。 本開発品の無菌的かつダメージフリーソーティングという特徴は、今再生医療用などの市場に参入しやすいと考えられる。
<b>事業化計画 について</b>	(株)オンチップ・バイオテクノロジーズが2013年8月に国内販売を開始する。既に同社は、国内にてセルアナライザー(細胞を解析するだけで分離機能のないもの)を製品化し販売実績があるので、販売体制は構築済みである。欧米での販売体制の構築が課題である。
<b>今後の研究 開発方針</b>	2013年8月に国内販売を開始する。既に購入に向けて準備をしている顧客が3件ある。さらなる拡販のために、引き続き参画機関にて、本装置の特長を活かすアプリケーションの開発を実施していく。
<b>PMの所見</b>	本開発の仕様策定のために実施したプレマーケティング活動により、本装置は現存するセルソーターを駆逐できるものではないものの、相当程度の市場ニーズが確認できている。

### 3-4 製品化スケジュール

製品化には①最終製品化に向けての開発、②各種のドキュメンテーション③本装置の優位性を示すアプリケーションの蓄積が必要である。いずれも本開発の参画機関で引き続き実施していく。

下記のスケジュールの通り、国内では2013年10月より、米国では2013年12月より販売を開始する計画である

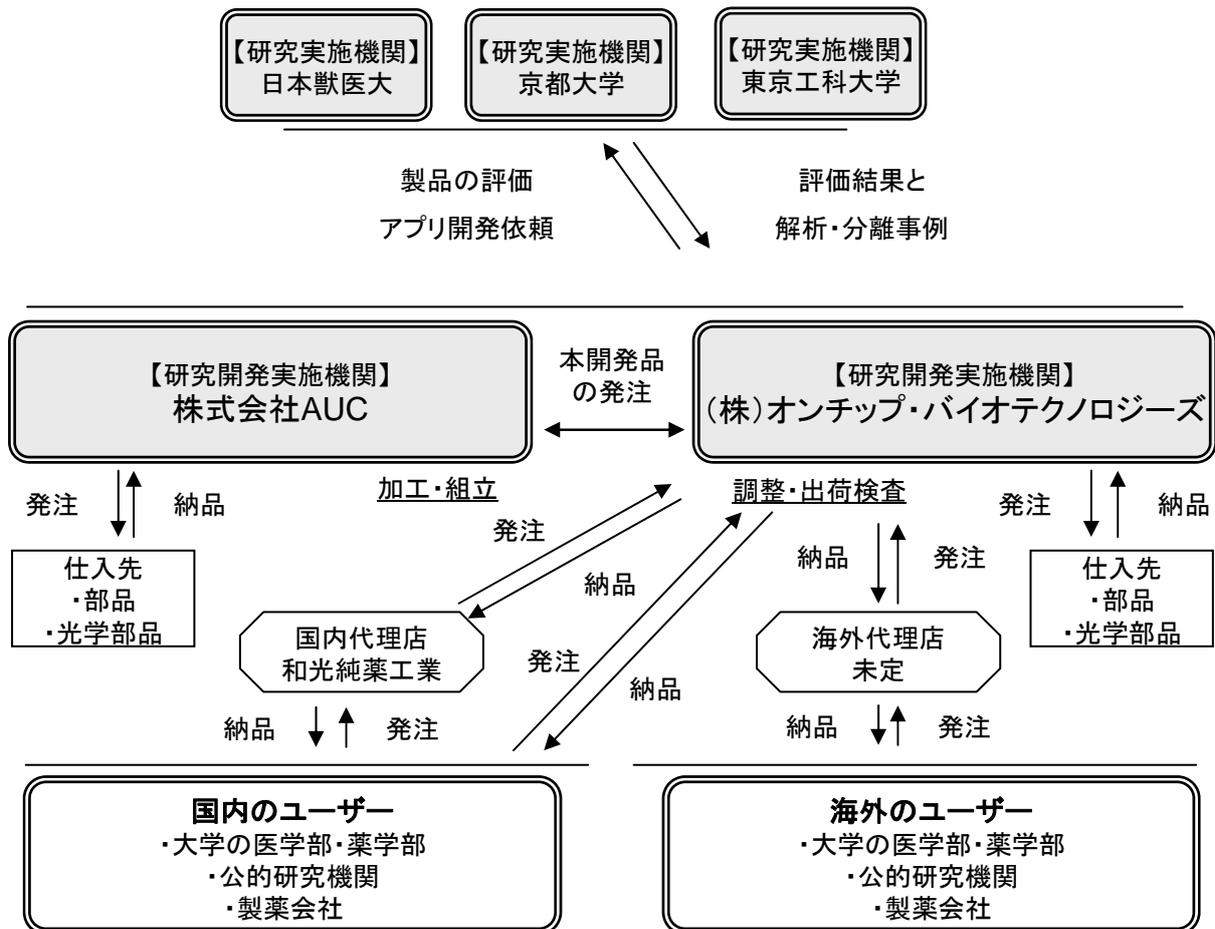
実施内容	実施者	～2013年 3月	～2013年 6月	～2013年 9月	～2013年 12月	～2014年 3月
<b>【1】製品化の準備</b>						
<b>【1-1】ワイアレス型On-Chip Sort</b> <b>【1-2】各種ドキュメントの作成</b> (①製品出荷検査マニュアル、②ユーザーマニュアル、③メンテナンスマニュアル)	オンチップ社、AUC	バクだしと改良	作成		国内での販売開始	
<b>【2】輸出対応</b>						
<b>【2-1】輸出に必要な安全性試験・認証の取得</b> <b>【2-2】英文ドキュメント整備</b>	オンチップ社、AUC		CEマーク&UL認証	作成	米国での販売開始	
<b>【3】アプリケーションの充実</b>						
従来のセルソーターでは不可能なアプリケーションを充実させる。	(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、京都大学、日本獣医生命科学大学、東京工科大学				ダメージレス細胞分離の優位性を示す	
					安全を考慮すべきサンプルの分離の事例蓄積	
					微量サンプルからの分離の事例蓄積	

### 3-5 事業化の体制

下図の通り、加工組立は株式会社AUCが行い、調整、出荷検査を株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズが行う。

国内販売は直販と代理店販売とで実施する。

海外販売における販売パートナーの選定が課題である。



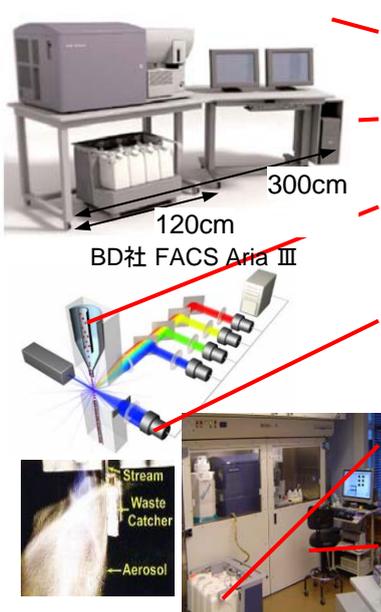
### 3-6 本開発品のアピールポイント

本開発のセルソーターは従来の装置と分離方法が異なるため大量細胞／高速分離に未対応であるが、ダメージフリー他、下記のような長所がある。従来のセルソーターの置き換え需要を狙うのではなく、以下の2点を軸に事業展開する計画である。

- ①既存のセルソーターのユーザーにはダメージレス、バイオハザード対応の装置として2台目需要
- ②ダメージフリーで取得した細胞で、これまでに出来なかった細胞研究を行う新規ユーザーの獲得

【従来のセルソーター】

価格 5,000万円から8,000万円



【本開発装置 On-chip Sort Wi-Fi】

価格 2500万円から3000万円(予定)

装置が大型 5000万円以上	装置が小型 2500万円	
熟練オペレーター (操作が複雑)	簡単操作	
フローセルは 使い回し (検体間コンタミが発生)	交換型フローセル (マイクロ流路チップ) で検体間コンタミなし	
サンプルがエアロゾル により飛散 (危険)	エアロゾルの発生なし (サンプルはチップ内 封じ込め)	
多量シース液と 大量の廃液20L	少量シース液と 少量の廃液	
バイオハザード対策に 大面積と 大規模工事が必要	安全キャビネット内 の設置で簡単なバ イオハザード対策	

細胞のダメージ大

高圧、超音波、電荷、回収リザーバーへの時速数十Kmでの衝突により細胞がダメージを受ける

細胞のダメージなし

流れを制御しているだけで、回収リザーバーへの衝突衝撃もないため、細胞のダメージなし(検証済み)

従来装置

本開発品

長所

大量細胞を高速分離できる。

小型・低価格、  
ダメージレスで細胞分離  
専任オペレーター不要

短所

大型・高額、専任の  
熟練オペレーターが必要  
細胞にダメージ

大量細胞／高速分離に未対応

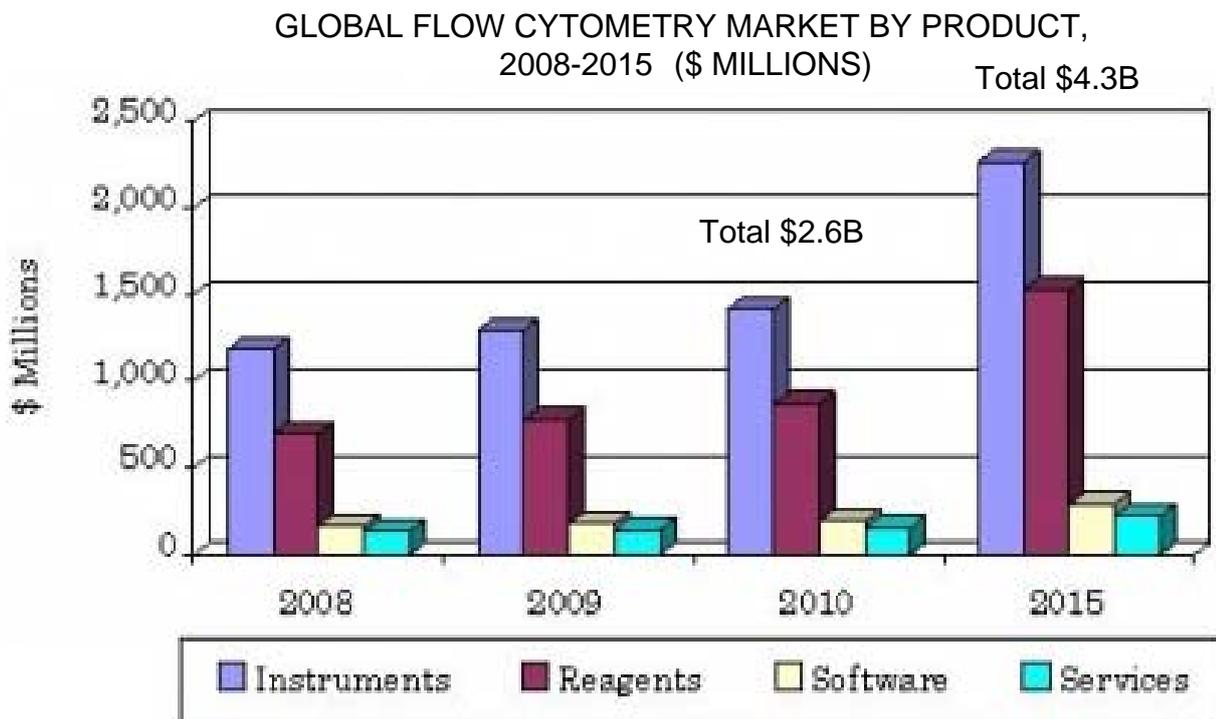
### 3-7セルソーターの市場規模と動向

#### 1) 既存市場の規模

下図の通り、セルソーターだけでなく細胞分離機能がないセルアナライザーも含めたフローサイトメーターの市場規模は2010年で\$2.6Billionである。セルソーターとセルアナライザーの市場規模の比率は1:1なので、セルソーターだけでは\$1.3Billionと推定される。

国内のセルソーターの市場規模は装置販売で45億円、試薬、ソフトウェア、サービスも含めて83億円と推定される。

細胞研究と細胞を用いた医療への脚光とその研究開発の競争激化により市場は拡大している。



#### 市場シェア

Becton Dickinson	56%
Beckman Coulter	33%
Others	11%

細胞研究への脚光と競争の激化により市場は拡大中

- 上記はセルソーターだけでなくセルアナライザー(分離機能なし)を含む
- セルソーター:セルアナライザーの市場規模の比率は約1:1
- 国内の市場規模は世界の8-10%
- 国内のセルソーターの2010年の市場は装置販売で45億円、試薬、ソフトウェア、サービスを含めて83億円

## 2) 競合他社の動向

下記に示す通り細胞研究への脚光と市場の拡大により拡大を続ける本市場にSONYやBio Rad社が市場参入を果たしている。いずれのセルソーターも、細胞分離の機構がJet in Air方式の従来型であり、前述の比較表で記載した従来装置の課題を解決したものではない。

2010年2月 SONYが、iCyt Mission Technology社(米国)を買収。iCyt社が開発した大型の安全キャビネットに収納できるセルソーターによって当業界への市場参入。



2012年3月 Beckman Coulter社が自動前処理機能を搭載したフローサイトメーターを開発したBlue Ocean Biomedical社を買収。



2012年10月 Bio Rad社がベンチトップ型のセルソーターの開発会社 Propel Labs社を買収し、2013年より市場参入を発表



2012年11月 SONYが、自社開発のセルソーターの発売開始を発表

細胞研究への脚光と市場の拡大により大手による市場参入が盛んな状況である  
何れの製品も、Jet in Air方式の従来型であり、細胞ダメージの点では大きい装置である。

### 3-8 本開発品が必須となる用途

本開発品は小型、低価格、簡単操作という優位性と持ち、且つ下記のような従来のセルソーターでは適用が困難であった用途において必須の装置となる。

#### ①遺伝子解析のための1細胞/微量細胞分離

定量PCRや microarrayの技術の発達により1細胞、少数の細胞での遺伝子発現量の解析が可能となってきた。この解析用途に用いる細胞は、僅かな細胞へのストレスが結果に大きく影響を与えるため、ダメージなく分離・回収しなければならない。従来セルソーターではこの目的に不向きであるが、本開発品は最適である。

#### ②癌細胞、白血病細胞、造血幹細胞及びiPS、ES細胞研究

これらの細胞の研究は、がんの治療、再生医療、骨髄移植などのために激しい研究競争が世界で行われている。ここで用いる細胞は、僅かなストレスによりviability が落ちたり分化能を失ってしまう。また、患者から採取した組織や細胞を使うこともあり、バイオハザード対応も重要である。現状では細胞分離によりストレスやダメージがかかった細胞にて研究を行うほかない。本開発品でのダメージレスでの細胞分離は、本研究領域に最適である。

#### ④発生学分野・胎仔、Zebra Fish, Drosophila (ショウジョウバエ), C. elegans (線虫)

これら小動物及び胎仔は、個体あたりの細胞数が少ないため、例えば、100匹のハエを解剖して必要なサンプル量を確保して、解析が行われている。本開発品は10  $\mu$  lの微量なサンプル量で解析・分離が可能である。実験の効率が格段に向上することとなる。

#### ⑤Neuronal cell (神経細胞)

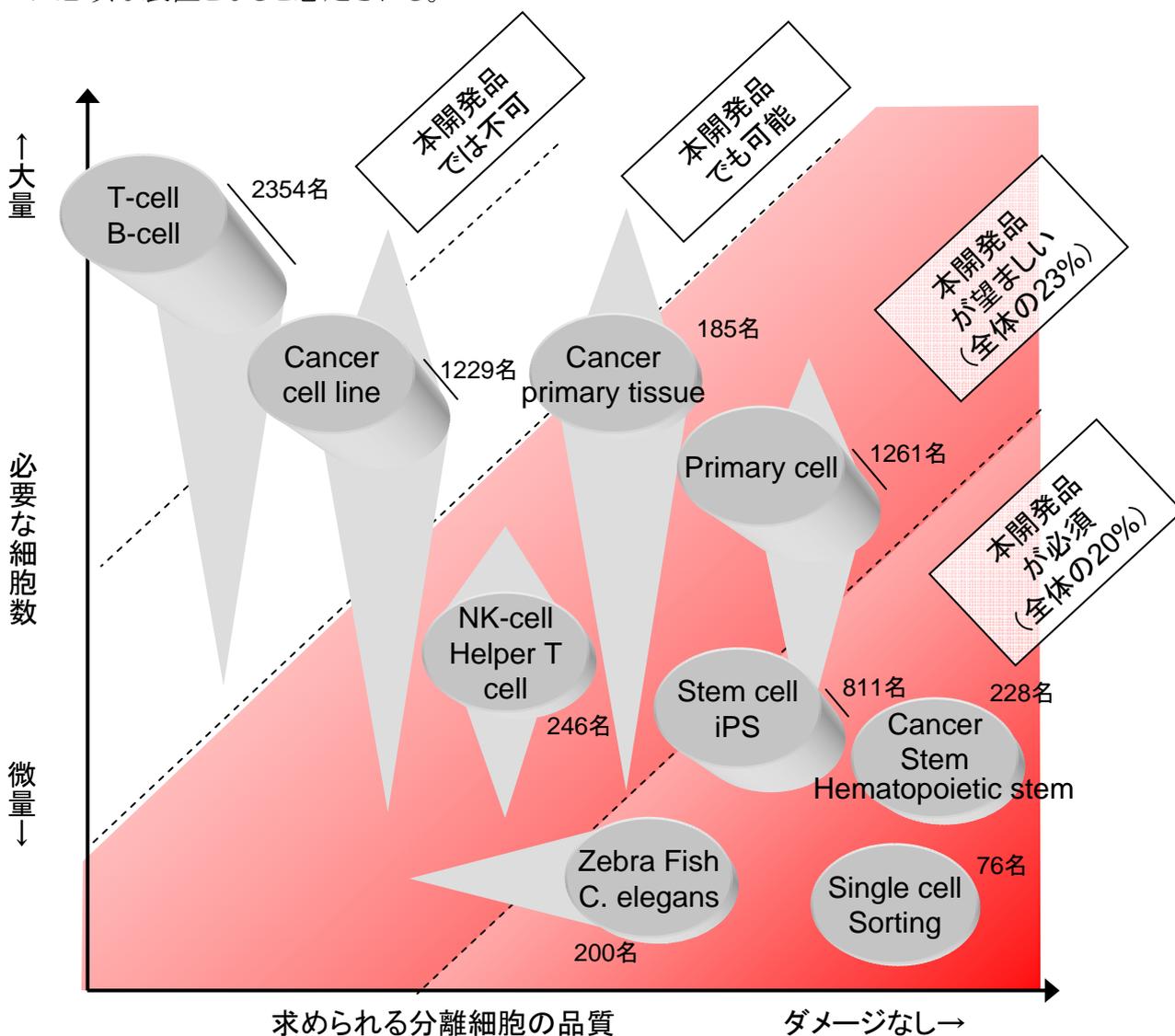
神経細胞はストレスに弱い細胞の代表格であり、この分野では未だにソーターを使うユーザーが限られている。本開発品によって、今まで不可能であった神経細胞が持つ本来の機能を維持したまま、これを分離・回収できることとなる。よって神経学分野、神経疾患の研究での必須のツールとなる。機能を維持した神経細胞を用いた研究により当該研究分野のブレークスルーが期待される。

### 3-9本開発品の適応ユーザー層の推定

科学技術振興機構が運営する研究者データベースJ-globalにて、研究テーマを検索し、下表を作成した。赤色の部分ほど、本開発装置の利用が適した分野となる。表にしめした人数はその分野に登録されている研究者の数である。

例えば、T-cell、B-cellの研究においてはそれらの細胞の分離に際してダメージがあっても問題はなく、求められる細胞数は多い。一方、Single cell Sorting、Cancer Stem、Stem cell、iPS等の研究においては微量なサンプルからダメージなく目的細胞を分離することが求められ、本開発装置に使用が最適である。

これらの人数の比率からして、微量・ダメージレス分離の本開発セルソーターは既存ユーザーの20～43%に必須な装置となると想定される。



• 微量・ダメージレス分離の本開発セルソーターは既存ユーザーの20～43%に必須な装置となる

• さらに低価格化による新規ユーザー層の囲い込みも可能である

### 3-10 プレマーケティングによる本開発品のニーズ調査

プレマーケティングとして本開発品のニーズ調査を行った。対象は下記の9機関と次ページの3機関である。いずれも当社とコンタクトがあった方々である(ランダム抽出によるコンタクトではない)。

全12機関のうち、3件については、2013年において本装置を購入したいとのことであった。

下記の○でしめした5件については、先方の研究ニーズを満たしており、△でしめした3件は、先方のニーズを満たすには改良などが必要であるが、これは1年内に対応可能なものである。

×で示したものは必要な細胞量が多いため、本装置ではそのニーズを満たすことができないものであった。

#### 東京農業大学の先生

水素を産生する細菌を共培養中から分離し、ゲノム解析を行いたい。

○ 可能

#### 熊本大学 医学部の先生

ウィルス感染細胞を生きたまま分離したい

○ 可能

#### 岡山大学の先生

癌細胞で発現するテロメラーゼを用いて血液中に循環する癌細胞を分離し、フェノタイプを同定した。

○ 可能

#### 富山大学の先生

細胞毒性の低い染色法を用いてX/Y染色体の違いで精子をダメージなく分離し、産業動物(牛)の産み分けに活用したい。

△ チップの大容量化が必要

#### 大阪医療センターの先生

iPS細胞の細胞周期の毎に96wellプレートに各well10<sup>4</sup>個を分離したい。

× 分離速度が不足し対応できない

#### 東京農工大学の先生

昆虫から取得した各種の細胞を分離し、新規培養細胞を樹立したい。

○ 可能

#### 北海道大学の先生

マウスの床下部視交叉上核のニューロンを分離し、単離培養し時計遺伝子の発現リズムを解明したい。

○ 可能

#### 国立がん研究センターの先生

##### 静岡がんセンターの先生

凝集細胞があっても分離したい。

△ 流路幅の拡大が必要

#### 株式会社リプロセルの연구원

数を制御した細胞の塊をダメージなく分離したい。

△ 流路幅の拡大が必要

【記号の説明】 ○ 現時点で可能  
△ 1年以内に対応可能  
× 対応できない