

平成 26 年度採択
中小企業経営支援等対策費補助金
戦略的基盤技術高度化支援事業

「迅速簡易に免疫能を検査する免疫蛍光分析装置の研究開発」

研究開発成果等報告書

平成 29 年 3 月

担当局 関東経済産業局
補助事業者 株式会社キャンパスクリエイト

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	3
1-1-1 研究開発の背景	3
1-1-2 研究開発の目的	4
1-1-3 従来技術との比較	5
1-1-4 研究の目標	7
1-2 研究体制	8
1-2-1 研究開発組織	8
1-2-2 研究開発の内容および担当	8
1-3 成果概要	9
1-3-1 検査デバイス	9
1-3-2 測定装置	9
1-4 当該研究開発の連絡窓口	9
第2章 本論	
2-1 研究開発の課題と目標の詳細	10
2-2 研究開発の成果	10
第3章 全体総括	
3-1 検査デバイス	21
3-2 測定装置	21
3-3 研究開発後の課題	21
3-4 事業化展開	22

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究開発の目的及び目標

本研究開発は迅速簡易に免疫能を検査する装置の開発を目的としているため、はじめに免疫能を検査する必要性および手法を中心に研究開発の背景を説明し、次に研究開発の目的について説明する。

1-1-1 研究開発の背景

ヒトを始めとする動物の生命は、神経系・内分泌系・免疫系の相互作用により維持されているが、特に免疫系のバランスの乱れ、機能低下、機能過剰といった要因により、がん、感染症、自己免疫疾患、アレルギーといった疾患の発症に繋がることが知られている。

わが国においては、がんが死因の第1位であるという状況が長年にわたって続いており(図1)、がんに対する最も有効な対処法は早期発見および早期治療であることから、免疫検査装置としても簡便かつ迅速に結果が得られることが求められている。また、リウマチ等の自己免疫疾患、国民の1/3に発症する花粉症やアトピー等のアレルギー性疾患なども免疫系が直接関わる疾患として重要であり、免疫検査装置の必要性は拡大している。

一方、世界に目を向けてみると、エイズ、結核、マラリアの世界三大感染症によって1日当たり平均で約1万人もの死者を出しており(図2)、これらの疾患はいずれも免疫検査により診断および治療経過の確認が可能である。こういった疾患が深刻な地域では、医療環境が十分に整備されていないことも多いため、免疫検査装置としては簡便かつ安全に扱うことができ、さらには低コストで利用できることが求められている。

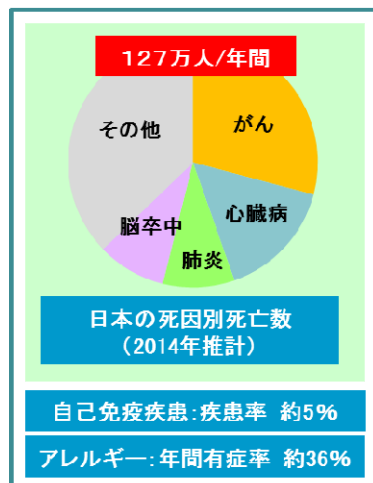


図1 日本における各種疾患の状況

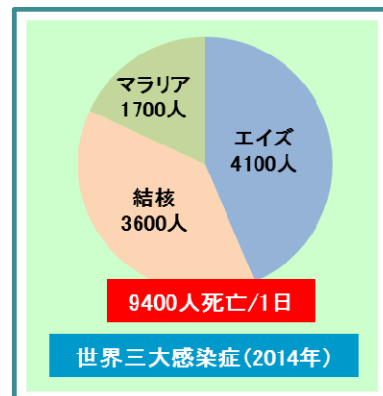


図2 世界三大感染症死亡数

免疫検査の現状

免疫検査は、大型で高額(数千万円)なフローサイトメーター(図3)を使用し、装置の操作と測定計測結果の解析に関する専門知識・技術を有した熟練技術者が行うのが一般的になりつつある。検査の手順は、採血した血液をチューブに入れて約45分間遠心分離した後、手作業で白血球層をピペットで採取する。採取した白血球を蛍光標識後に洗浄、フローサイトメーターに注

入し測定計測する。熟練技術者が検体の前処理、装置の操作、測定計測結果の解析まで行うため、手間と時間、費用を要している。そのため、現状では外注検査が主体となり検査結果が出るまでに3日～5日かかっている。また、担当する技術者の前処理技術や測定計測結果の解析技術の違いによる検査結果のバラツキも改善点として挙げられている。

医療現場からはこうした状況を改善し、緊急を要する疾患やリスクを伴う投薬などに対して、迅速・簡易に患者の待ち時間内（1時間以内）に免疫能を検査し、その日のうちに適切な診断や薬剤の処方等ができる安価なシステムの開発が求められている。



図3 フローサイトメーター

1-1-2 研究開発の目的

前記の通り、現在医療現場で求められている迅速簡易に結果が得られ、安全に扱うことができ、さらに低コストで利用可能な免疫検査装置を開発することが本研究開発の目的である。

免疫系の中心的な役割を担っているのが白血球（とくにリンパ球、単球、好中球）であり、これらの機能を詳細に調べることにより、免疫能の検査を行う。図4に示すように、各血球の比重は少しずつ異なっていることから、第一段階として精密な比重分離を行い、さらに次段階で免疫蛍光を利用した詳細な解析を行うことにより、必要な免疫情報を取得する。

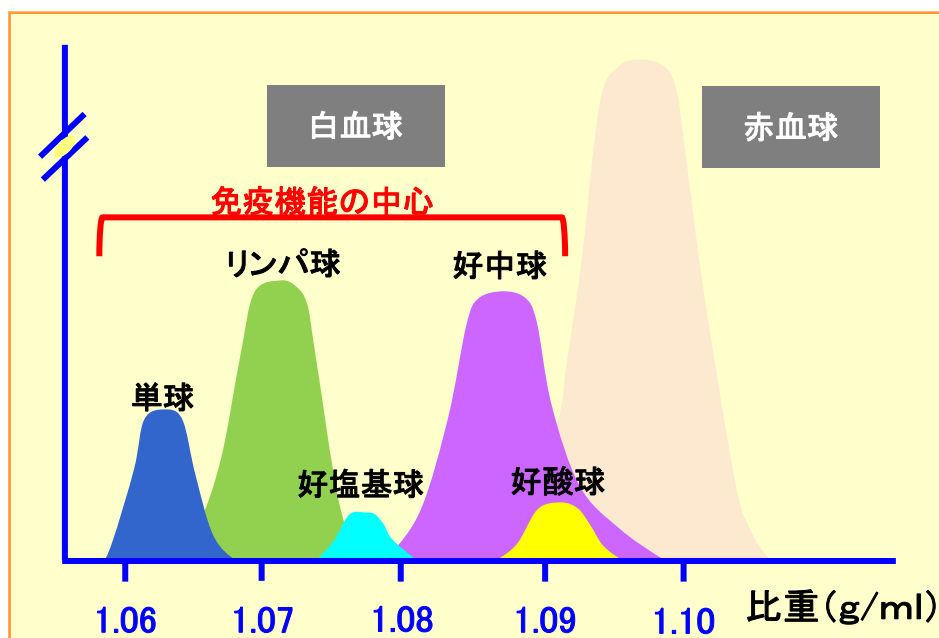


図4 ヒト血液中の血球の比重分布

1-1-3 従来技術との比較

免疫検査にフローサイトメーターが使用されることが一般的になってきていることは既に述べたとおりであるから、この装置を用いた検査方法と比較しながら本製品開発の特徴を説明する。

遠心分離法

免疫系で中心的な役割を果たす白血球を調べるため、まずこれらを血液中から分離回収する必要があるが、これには遠心分離法を用いることが一般的である。

一般的な遠心分離法では図5に示すように、遠心分離チューブに比重液を入れ、その上に分離したい試料を重層して回転させることにより、比重液より重い成分は比重液より下に沈殿し、軽い成分は比重液の上層に残るため、成分が分離される。例えば血液試料の場合、比重液として1.11程度のもを使用すれば、白血球と赤血球を分離することができる。

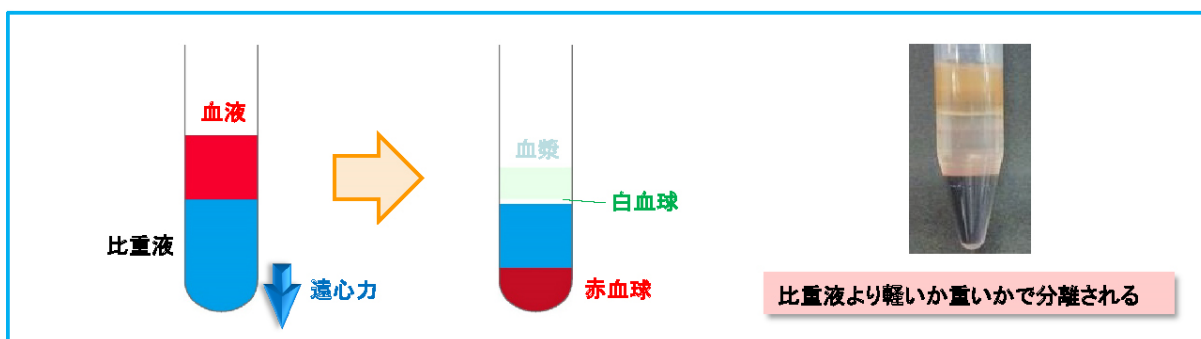


図5 一般的な遠心分離法による血液の分離

一方、本研究開発では、2つの比重液槽をマイクロ流路で連結した構造を利用する（図6）。両比重液槽は形状が異なっており、回転によって加わる遠心力が異なるため、両液槽から排出される液量が時間経過とともに変化する。したがって、2種類の異なる比重液をあらかじめ注入して回転させるのみの操作で、容易に密度が連続的に変化する状態（連続密度勾配）を生成することができる。

この連続密度勾配中で試料を分離した場合、試料中の各成分はそれぞれ自らの比重に一致する位置へ移動、分離されるため、1種類の比重液よりも重いか軽いかで分離される一般的な遠心分離法と比較して、より精密な分離が行われることになる。

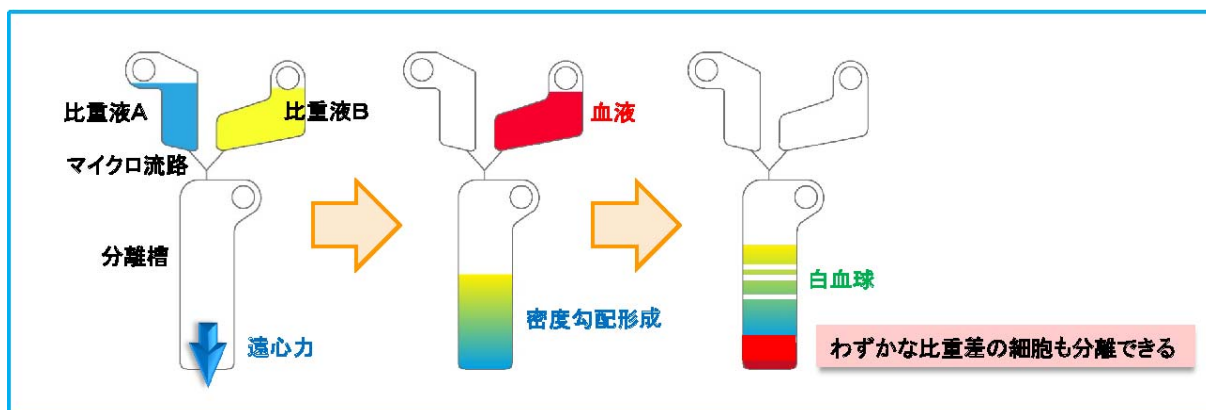


図6 本研究開発の遠心分離法による血液の分離

蛍光検出法

免疫細胞をさらに詳細に調べる手法としては、一般的に免疫蛍光分析を用いる。図7に示すように、細胞の表面にはその種類や状態に応じてさまざまな抗原が存在している。例えば白血球であれば、図8のような各種抗原が存在している。したがって、各抗原に選択的に結合する抗体を用意し、あらかじめこの抗体に蛍光物質を結合させておけば、蛍光物質にレーザー励起光を照射することにより、細胞の種類を蛍光で判別できることになる。

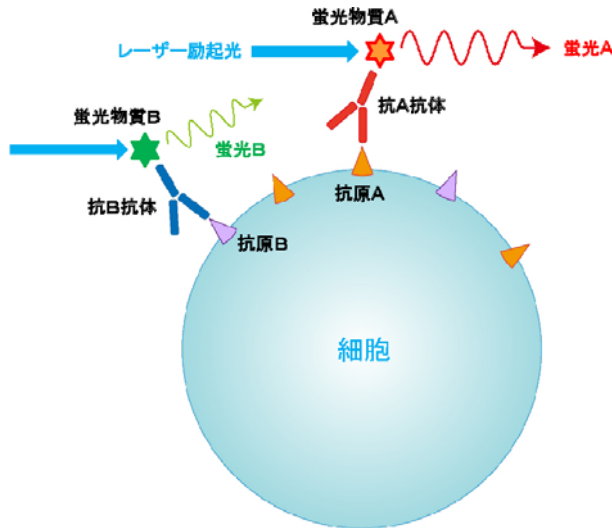


図7 細胞の蛍光検出

白血球	免疫系細胞	抗原
リンパ球	ヘルパーT細胞	CD3 CD4
	キラーT細胞	CD3 CD8
	B細胞	CD19
	NK細胞	CD56
単球	マクロファージ	CD11b
	樹状細胞	CD11c

図8 免疫系細胞に特徴的な抗原

フローサイトメーターでは、あらかじめ遠心分離法によりある程度必要な細胞集団を分離回収したうえで、これに蛍光を結合させた抗体を混合して前処理を行う。これをマイクロ流路に導入し、非常に細い層流に絞り込むことにより、細胞が1つずつ流れる状態を生成する。流路にレーザー光を照射して、個々の細胞ごとに蛍光および散乱光の情報が得られるので、この情報を解析することで、細胞の形態や種類に関する情報を得ることができる。

前処理の手間を要すること、および解析結果が経験や主観の差の影響を受けやすいことが問題である。

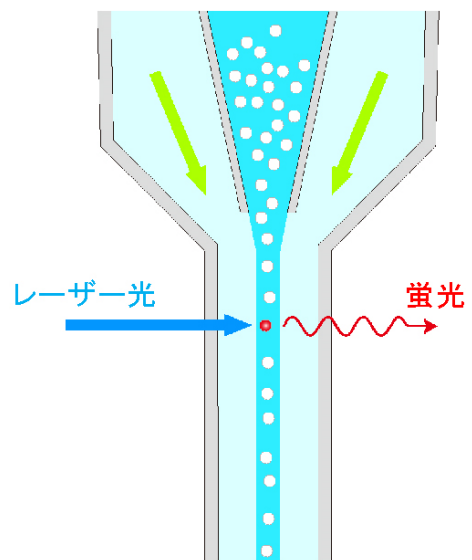


図9 フローサイトメーターの原理

一方、本研究開発の方法では、比重による分離が高精度に実行されるため、蛍光を検出したい対象細胞もある程度絞られている。したがって、遠心分離後は細胞を取り出すことなく、そのままレーザー励起光を照射して、蛍光細胞を検出することが可能である。蛍光はカメラ撮影からの画像解析にて取得し、ハードウェアをより簡素化する。

このように、比重液と血液をセットすれば、後はほぼ自動で蛍光検出までが可能となるため、誰が使用しても簡便、迅速かつ安定した検査結果を得ることができる。

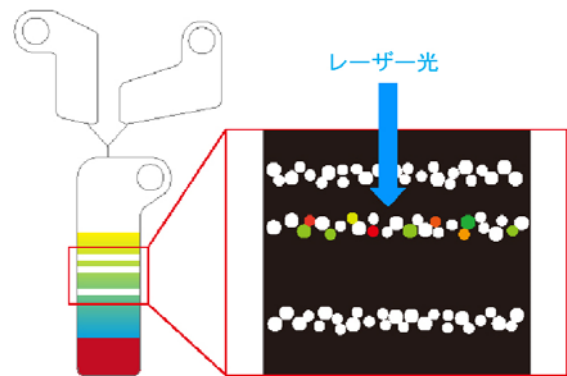


図 10 本研究開発の蛍光検出イメージ

安全性とコスト

安全性については、フローサイトメーターではガラス等で形成されている流路部分のディスポーザブル化が難しいため、検査ごとに洗浄の手間が必要となる。洗浄時に使用者が感染するリスクがあるため、安全性が高いとはいえない。一方、本研究開発の手法では、分離媒体をディスクあるいはチップ化することが可能であり、ディスポーザブルなものにできる。したがって、血液を導入後は分離媒体の廃棄まで完全閉鎖系で完了することができるため、感染のリスクがなく、高い安全性を実現できる。

また、コストについても分離に必要な部分のみを消耗品にできるため、非常に安価に抑えることができる。

1-1-4 研究の目標

前述の背景および技術の特徴を鑑みて、以下の目標を設定した。

【主たる技術区分】 測定計測

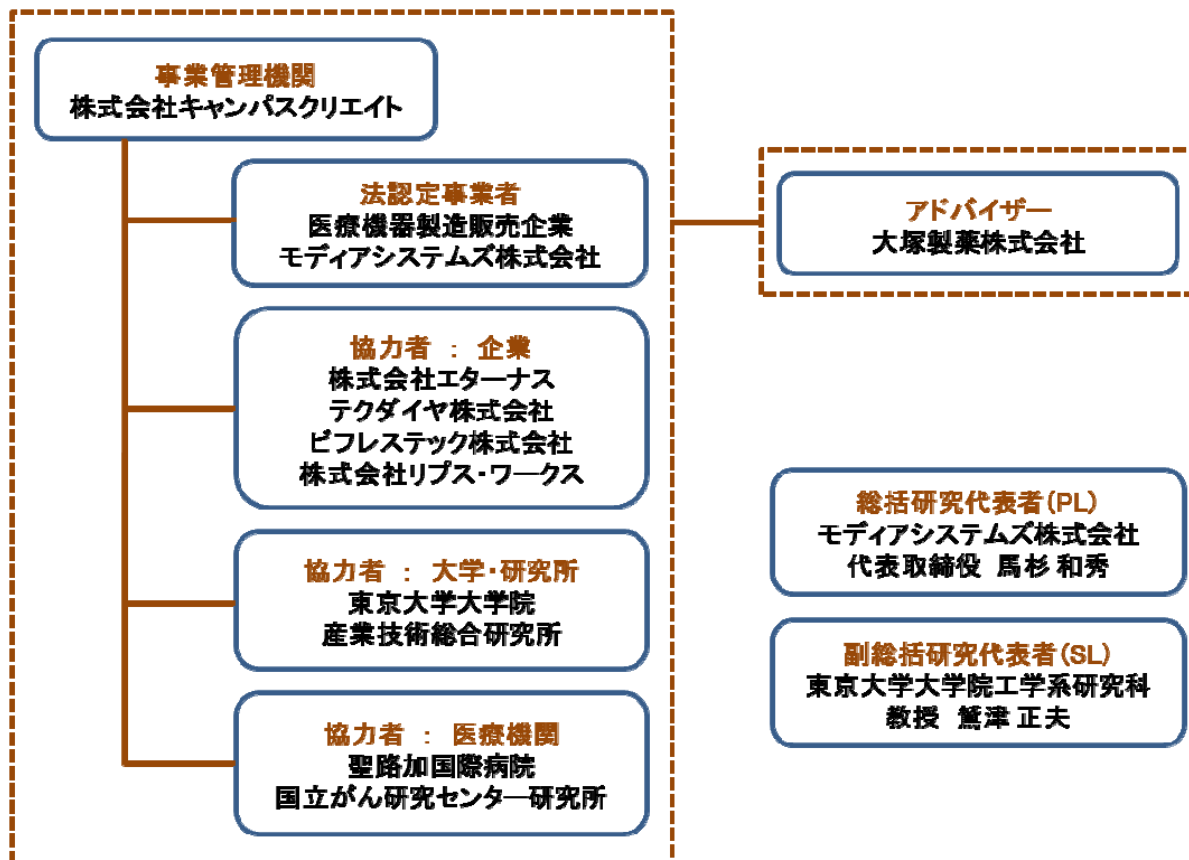
【研究開発計画名】 迅速簡易に免疫能を検査する免疫蛍光分析装置の研究開発

【研究概要】

世界の年間総死亡数は 5,400 万人で感染症に起因する死亡は約 1/4 (1,350 万人) を占めている。日本では死因の 1 位~4 位 (悪性新生物、心疾患、脳血管疾患、肺炎) の多くで感染症 (合併症) が予後を悪化させている。感染症の発症は免疫能の低下が原因になる。本研究開発では、通常の血液検査や生化学検査と同様に、遠心分離技術を高度化する技術により、医療現場で行える迅速簡易な小型免疫能検査装置を開発し、採血後、1 時間以内に結果を出し、患者の免疫能の把握と感染症への対処に関して科学的に判断できるシステムを開発する。

1-2 研究体制

1-2-1 研究開発組織



1-2-2 研究開発の内容および担当

研究開発分類	サブテーマ	担当
検査デバイス	【1-1】 検査用ディスクの切削加工製作と評価	(製作)①③④⑤
	【1-2】 試作金型の製作と評価	(評価)⑥⑧⑨
	【1-3】 量産確認用金型の製作と評価	
検査装置	【2-1】 試作装置の製作と評価	(製作)①②
	【2-2】 自動化試作装置の製作と評価	(評価)⑥⑦⑧⑨
	【2-3】 量産確認用装置の製作と評価	

※担当 ①モディアシステムズ②エターナス③テクダイヤ④ピフレストック⑤リプス・ワークス
⑥東京大学大学院⑦産業技術総合研究所⑧聖路加国際病院⑨がんセンター研究所

1-3 成果概要

1-3-1 検査デバイス

検査デバイスについては、初年度は市販のコンパクトディスク（CD）基板（ポリカーボネート製）を購入し、これに機械加工およびレーザー加工を行い分離用の形状を形成した。この両面に同じCD基板をカバー材として貼り合わせ、分離ディスクを製作した。

2年度目は実際に血液を用いた分離評価を行い、液槽の形状およびマイクロ流路の幅、深さの最適化を試みた。最終的にマイクロ流路の幅、深さともに $100\mu\text{m}$ とすることで、密度勾配の形成および血液の分離が可能であることを確認した。また、密度勾配を生成しないシンプルな形状の分離パターンをもつ分離ディスクの試作金型を製作し、分離ディスク300枚を製作してばらつき等を評価した。最終目標である細胞の蛍光検出についても、低価格3Dプリンターの駆動系を利用して、分離槽の任意の位置を拡大撮影する機構を試作し、画像で蛍光細胞を認識できることを確認した。

最終年度は、限られた予算で効率的に検討を行うべく、検査デバイスをディスク型からチップ型へと変更した。これにより試作に要する時間とコストを大幅に削減するだけでなく、樹脂の歪み等を抑制して、蛍光撮影に必要な形状精度が得られるようになった。実際にヒト血液を用いた免疫系細胞（ヘルパーT細胞）の蛍光カウントを実施し、高価なフローサイトメーターによる結果に近似する数値が得られた。なお、PDMS製のチップも試作し、機械的に分離後の細胞回収を行うことで、細胞の品質評価も行った。

1-3-2 測定装置

測定装置については、初年度は期間が短いこともあり、市販のモータードライブ基板およびサーボアンプを利用して、本研究開発の目的に必要な回転速度、位置制御等の検討が可能なハイスペック型の試作機を製作した。

2年度目は、ハイスペック型試作機による検討結果をもとに仕様を決定し、モーター制御およびストロボ制御を行う基板を開発し、コストおよびサイズを抑えた試作機を開発した。タイプI型試作機は、遠心分離と画像による確認に機能を絞った携帯型の装置であり、タイプII型試作機は、これに蛍光撮影機能も加えた装置である。

3年度目は、実際に血液を用いた蛍光カウントが可能なレベルにタイプII型試作機を改良し、フローサイトメーターに近似する数値を得ることができた。また、PDMS製チップの任意の位置に針を穿刺して直接かつオートマティックに細胞バンドを回収する試作機も開発した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社キャンパスクリエイト

技術移転部 オープンイノベーション推進室

プロデューサー 須藤 慎

182-8585 東京都調布市調布ケ丘1-5-1 電気通信大学産学官連携センター

TEL: 042-490-5728 FAX: 042-490-5727

E-mail: sudoh@campuscreate.com

第2章 本論

2-1 研究開発の課題と目標の詳細

第1章で述べた通り、本研究開発は迅速簡易に免疫能を検査する装置の開発を目的としている。具体的には1-2-2に記載のサブテーマごとに役割分担を行い、開発を進めた。本節では、サブテーマごとに課題と目標の詳細を説明する。

【1-1】検査用ディスクの切削加工製作と評価

完全閉鎖系かつディスポーザブルな検査用ディスクを開発する必要があるが、初年度は期間が限られているため、市販されているコンパクトディスク（CD）基板に切削加工およびレーザー加工を行い、ディスクを試作する。微細な加工精度が必要なマイクロ流路部をレーザーで加工し、閉鎖された分離空間を形成するために無加工のCD基板を両面に液漏れがないように貼り合わせることが課題である。

【1-2】試作金型の製作と評価

1-1で試作した検査用ディスクを用いて遠心分離の基本的な性能が確認できれば、より詳細な検討を行うために試作金型を製作し、数百枚単位で検査用ディスクを試作する。また、本研究開発の目的である免疫蛍光分析に対応した検査用ディスクも試作し、蛍光検出に必要な光学系などのハードウェアの検討を促進する。分離後の細胞を回収して既存のフローサイトメーターなどの結果と比較評価するため、レーザー穿孔により細胞を回収できる構造を有する検査用ディスクの開発にも取り組む。これらは主に2年度目を実施するものとする。

【1-3】量産確認用金型の製作と評価

1-2までの評価により、免疫蛍光分析が可能な検査用ディスクの材質及び形状を確定させ、量産確認用金型を試作する。実際にヒト血液検体を用いて詳細な評価を行い、免疫蛍光分析装置としての完成を目指す。この検討は最終年度に実施するものとする。

【2-1】試作装置の製作と評価

1-1にて試作するCD型の検査用ディスクを回転させ、遠心分離を実施する試作装置を製作する。初年度は期間が限られているため、市販のモーター制御基板を使用し、テスト用のソフトウェアで回転、停止といった基本操作を行えるようにする。また、回転に同期させたストロボ照明を開発し、回転中の様子をカメラで撮影してリアルタイムに遠心分離の状態を確認できるようにする。

【2-2】自動化試作装置の製作と評価

モーター制御およびストロボ制御を行う基板を独自に設計開発し、装置に組み込む。レーザー穿孔ユニットの試作を行い、並行して開発する3次元位置制御を行う駆動系に組み込むことで、1-2にて試作する穿孔対応検査用ディスクの任意の位置にレーザー穿孔できるようにする。また、同じく3次元位置制御系に蛍光励起光源とカメラを組み込み、検査用ディスクの任意の位置の蛍光を検出できるようにする。なお、レーザー穿孔時には分離槽が鉛直下方に停止しなければ分離した細胞バンドが崩れてしまうため、回転の位置制御も必要である。これらの検討は、主に2年度目を実施するものとする。

【2-3】量産確認用装置の製作と評価

2-2までの試作検討により免疫蛍光分析に必要なハードウェアの構成および仕様が確定し、1-3にて製作する量産確認用のディスク試作金型が確定すれば、試作装置についても量産確認を行うための設計および試作を行う。実際のヒト血液を用いて詳細な評価を行い、免疫蛍光分析装置としての製品化に目途をつける。

2-2 研究開発の成果

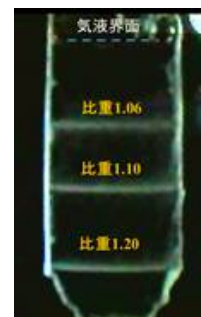
2-1に記載した各テーマの課題と目標に対し、開発を行った内容と成果を説明する。

【1-1】検査用ディスクの切削加工製作と評価

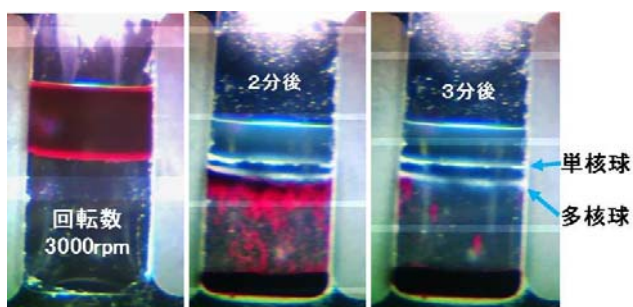
下写真左のようなコンパクトディスク（CD）用の基板を購入し、切削加工およびレーザー加工により、下写真右のような各液槽および流路形状を試作した。



この加工基板の両面に、テープマウンターを使用して無加工のCD基板を貼り合わせ、閉鎖された分離槽およびマイクロ流路をもつ試作ディスクを製作した。実際に2種類の比重液を用いて連続密度勾配を生成し、比重ビーズを分離したところ、右写真のように各比重のビーズのバンドが綺麗に形成され、連続密度勾配の中で複数の比重の分離が可能であることが確認できた。



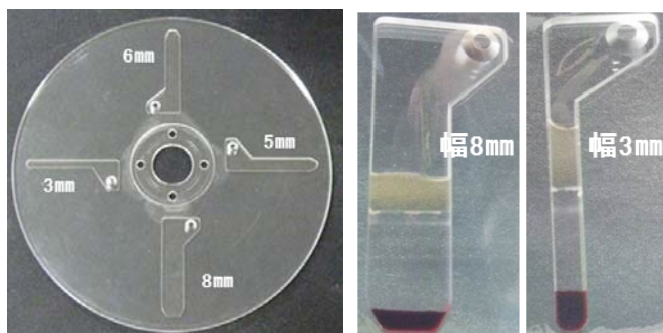
また、ヒト健常者の血液を用いて同様の分離実験を行った（下写真）。試作装置には回転に同期させたストロボ照明を搭載しているため、遠心分離の時間経過とともに、赤血球および白血球の単核球と多核球のバンドが分離されていく様子が確認できた。なお、ヒト血液用には、連続密度勾配を生成せずとも単核球と顆粒球を分離できる性質をもった比重液が市販されているため、ここでの検証にはそのような比重液を利用した。



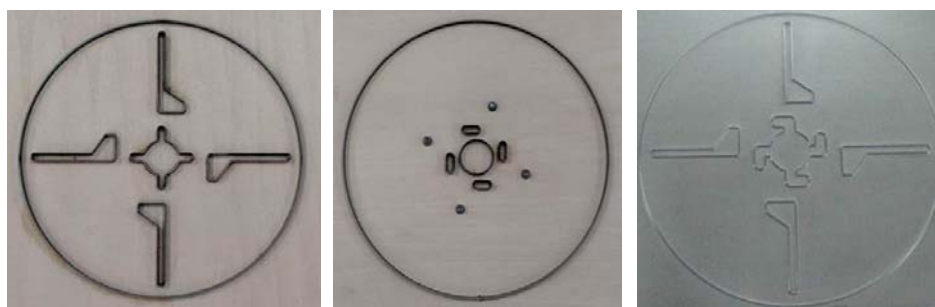
ヒト血液の分離状態のリアルタイムモニタリング

【1-2】試作金型の製作と評価

1-1で試作した検査用ディスクにて実際に血液の分離が可能であることが確認できたため、より最適な条件で分離ができるパターンを検討を行った。まず分離槽の幅について、下写真左のように3～8mmで異なる4種類の幅のパターンを試作し、血液を分離して比較を行った（右写真）。白血球のバンドについては幅が細い方が明瞭になる傾向が確認されたため、血液の単純分離用としては試作金型をこの形状で製作することにした。

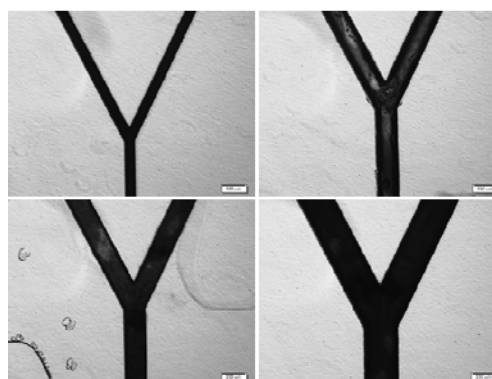


試作金型の製作に関して検討した結果、コスト、製作時間、修正の簡易さ等を考慮して、プレス打ち抜き金型を選択した。樹脂打ち抜き金型（両刃：厚さ0.7mm、高さ4mm）3種類、両面接着フィルム打ち抜き金型（エッチング刃）1種類を製作した。これらの写真を以下に示す。



検査用ディスク試作金型

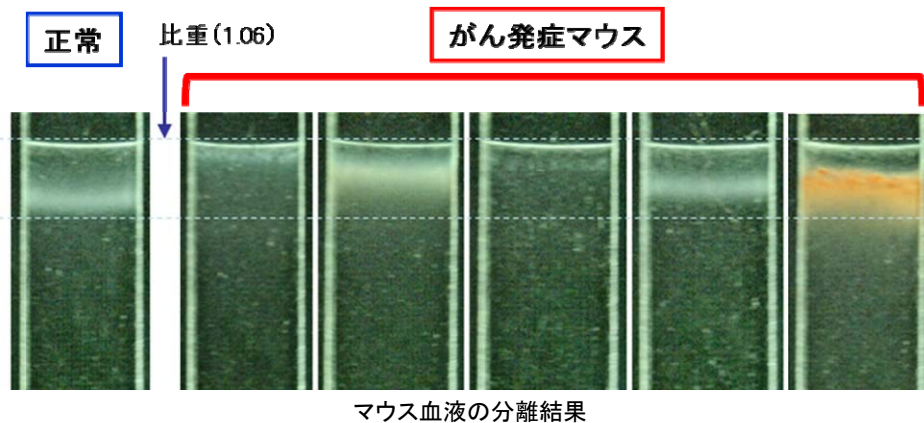
また、単純な分離ではなく連続密度勾配による分離を行うディスクについては、精度の高い密度勾配を生成するためにはマイクロ流路部の精度が重要であると想定し、ピコ秒レーザーを用いた高精度加工により、数種類のパターンを試作検討した。実際に血液分離確認を行い、流路幅、流路深さともに100 μ mのものが最も良好であった。



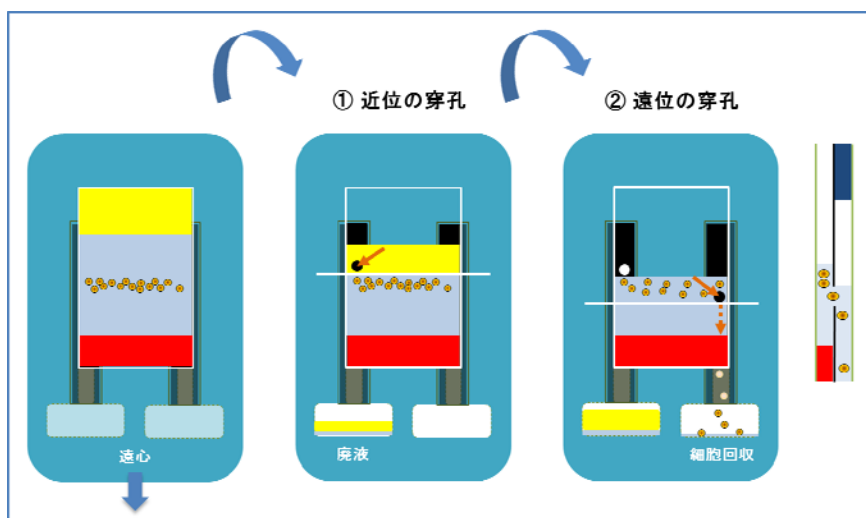
ピコ秒レーザー加工装置(左)と試作したマイクロ流路形状(右)

試作したディスクを用いて、まず正常マウスとがん発症マウスの血液を分離比較し、ヒト臨床評価に繋げられるようなデータが得られるかを調べた。蛍光検出についてはディスク製作および装置開発の技術的難易度が高いため、まず連続密度勾配を用いない単純分離にて、これらのマウスの結果に差が見られるかを確認した（下写真）。

各分離画像の最上位に見られる白色のラインは、比重マーカーとして導入した比重 1.06 の樹脂ビーズのバンドである。これが一致するように画像を並べて比較すると、がん発症マウスでは白血球のバンドが消失していたり、正常のものに比べて低比重側にシフトしている傾向が見られた。



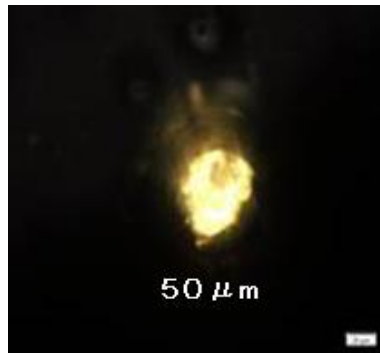
また、細胞回収用のディスクの検討も行った。回収の原理の構想は下図の通りである。分離槽の端部をフィルムで形成することにより、任意の位置にレーザー穿孔できるようにする。透明部分から細胞の分離状態を確認し、回収したい細胞バンドの位置を決定したら、まず排液溝側の上方でできるだけバンドに近い位置に穿孔する。この状態から回転させると細胞バンドよりも上方の液体は全て排液される。ここで回転を停止し、細胞バンドの下部の高さに合わせて回収溝側に穿孔を行い回転させると、細胞回収槽へと目的の細胞バンドが回収されるという原理である。



実際に穿孔用レーザー（下左写真）を試作し、数種類のフィルムへの穿孔テストを行ったところ、細胞を排出するには十分な穴を開けられるフィルムが存在することがわかった（下中央写真）。そこで、このフィルムを用いて穿孔対応検査用ディスクの試作を行った（下写真右）。ディスク形状にするためにはフィルムに粘着剤を塗布する必要があるが、レーザー照射時に粘着剤が熔融して残存することがわかった。これにより穴が塞がれてしまい、細胞が綺麗に排出されないという課題が生じた。



穿孔用レーザー



フィルムへの穿孔

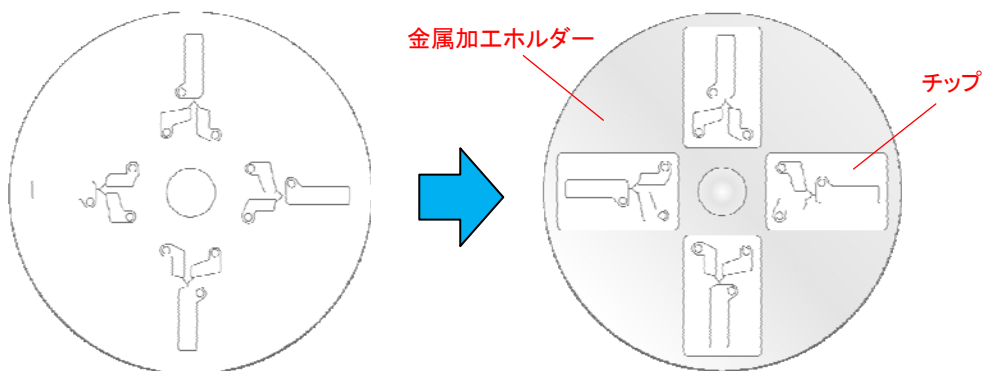


穿孔対応ディスク

【1-3】量産確認用金型の製作と評価

検査用ディスクの残る課題は、本研究開発の最終目標である免疫蛍光分析が可能なディスクの製作および細胞回収評価用ディスクの製作となった。前者は単に細胞の蛍光が画像で捉えられればよいというわけではなく、細胞を正確にカウントするため、存在する細胞が全て画像内に映らなければならず、高い形状精度が求められる。後者は遠心回転にも耐えられる強度でフィルムを接合し、かつレーザー穿孔も綺麗に実施できることが求められる。

いずれにせよ、最終年度は初年度の1/2という予算の中で、複数の大型ディスクの金型を繰り返し試作あるいは修正することは不可能であると考えられた。そこで、まず始めに下図のように、検査用デバイスをディスク型からチップ型へと変更することにした。分離に必要な形状部分のみをチップとして消耗品にすることにより、試作に必要なコストを大幅に低下させることが可能になった。また、チップをセットするホルダーは精密金属加工により製作することにより、チップの位置精度が大幅に向上するとともに、チップ自体もディスクよりは小型で歪みが生じにくい利点も得られた。これにより、細胞をカウントできるレベルに撮影するという高い機械精度が求められる機能の開発難易度も大きく低下した。



検査用デバイスのディスク型からチップ型への変更

液槽およびマイクロ流路は、市販の亚克力材で 0.2mm、0.3mm、1.0mm のものを入手し、レーザー加工により形成した。これを、自家蛍光の少ない PMMA 材料をチップサイズに切断加工したもので挟んでチップを試作した。まず蛍光粒子を分離槽に入れて撮影したところ、下写真左のように厚さ 0.3mm 以下の分離槽であれば、粒子を全て撮影できることが確認できた。そこで、試作金型もこの厚さで設計製作し、樹脂成型チップを試作した（下写真右）。

試作金型により成形したチップでも、粒子の撮影結果は良好であり、蛍光撮影に十分な形状精度が確保できていることが確認された。そこで、実際の血液検体を用いて蛍光細胞のカウントを行ったが、その結果については 2-3 にて説明する。



蛍光粒子の撮影



樹脂成形チップ

また、チップ型にすることで使用材料が大幅に減少することから、やや高価な材料を使用することが可能になったため、微細加工によく使用される PDMS 材を利用したチップ試作も行った。PDMS 材は弾性体であるため、レーザー穿孔を行わずとも、細胞バンドの横位置から針を機械的に穿刺して直接

回収することができる。したがって、技術的な難易度が高いレーザー穿孔方式よりも早期に細胞回収評価を実施できると考えられた。実際に、PDMS 注型用のアルミ金型を試作し（写真左）、ガラス基板と表面処理により接合して細胞回収用のチップを作製した（写真右）。細胞回収を行った結果については、2-3 にて説明する。



PDMS注型用試作金型



PDMS製チップ

なお、2-2 にて説明したレーザー穿孔対応の細胞回収用デバイスについても、チップ化対応を行った（右写真）。比重液を入れてテストを行ったところ、遠心分離の回転に対してフィルム接合部分の強度が不足しており、チップ内部で液漏れが発生した。この課題は期間内に解消できなかったため、細胞回収評価は実施していない。



【2-1】試作装置の製作と評価

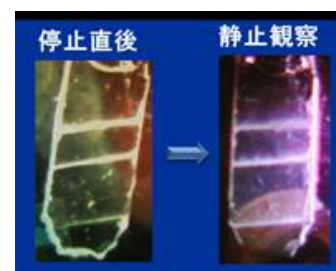
1-1 にて試作する CD 型の検査用ディスクを用いて実際に遠心分離を行うため、ハイスペック型の試作機 1~3 号機およびコンパクト型試作機を製作した。

ハイスpek型1号機は右写真のような構成であり、市販のロータリーエンコーダ付のモーターおよび制御基板を3セット使用した。1セットは遠心分離用のモーター制御、残り2セットはXY方向へのディスク位置移動に使用した。また、カメラとして毎秒100フレームの高速撮影が可能であり、外部制御にて任意のタイミングで画像取り込みが可能な機種を搭載した。回転角をセンサーで検出し、回転とストロボ照明および画像取り込みを同期させることにより、遠心分離の様子をリアルタイムかつ詳細に確認できるようにした。



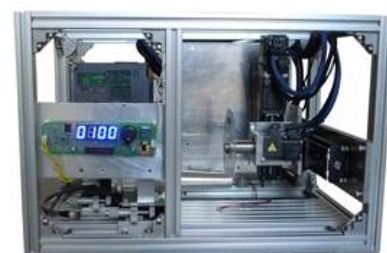
ハイスpek型試作機1号機

本試作装置を用いて遠心回転からの停止条件を詳細に検討したところ、分離槽が鉛直上方にある位置から、円周外側への遠心力が重力に勝る条件である180rpmの回転速度を保ちながら半回転以内に鉛直下方に停止させれば、分離したバンドが乱れることなく停止できることがわかった。遠心分離後の細胞の回収を行う上で、これは非常に重要な知見となった。



回転停止時のバンドの様子

ハイスpek型2号機は、右写真のように、穿孔用のレーザーが完成次第、それを搭載してディスクへの穿孔検討ができるように、XY駆動系にレーザーを搭載することを前提に製作したものである。また、レーザーの照射条件を検討するため、パルス出力の電圧と回数を設定できる基板を試作し、表示部とともに搭載した。



ハイスpek型試作機2号機

ハイスpek型3号機は、右写真のように、1号機よりも外形をコンパクト化したものである。1号機での検証により、回転停止後でも十分な細胞バンドの確認ができることがわかったため、カメラとしては毎秒30フレーム程度の安価なものを採用し、ディスク位置移動も縦方向のみに限定することで、コンパクト化および低コスト化を実現した。



ハイスpek型試作機3号機

【2-2】自動化試作装置の製作と評価

2-1の試作評価により、原理的には十分に目的とする血液の分離が可能であることが確認できたため、市販のモータードライブ基板およびサーボアンプを使用するのではなく、独自にモーター制御基板を開発した。モーター制御だけではなく、ストロボ同期照明用の回路、蛍光励起用レーザーの点灯回路など、本研究開発に必要であると想定される機能を1枚の基

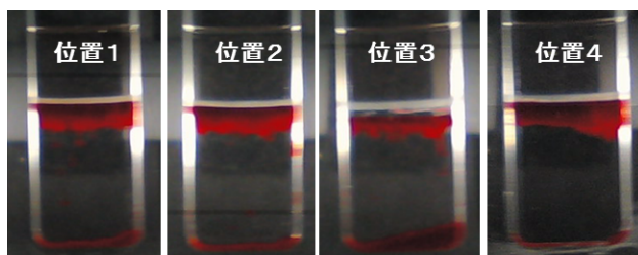
板にまとめた。

これにより、装置全体の大幅なサイズダウンが可能となり、右写真のように片手でも携帯できるケース内に、遠心分離と撮影機能を収めることが可能になった（これをタイプⅠ型試作機と呼ぶ）。

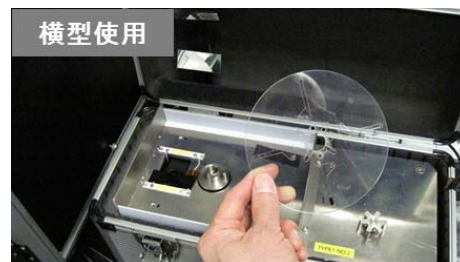


タイプⅠ型試作機

遠心分離の様子を確認だけであればよい用途であれば、1-2にて説明した通り、検査用ディスクは4検体まで同時に分離できる構造となっているため、本機を水平にして使用すれば効率的に分離を完了できる。一方、分離後の細胞を回収したい場合は、分離槽を鉛直下方に停止させる制御機能は基板に実装されているため、本機を垂直に立てて使用すればよい。ストロボ照明は任意の位置に同期できるため、ソフトウェアからの指示により4検体をサイクリックに撮影する機能も開発した（下写真左）。

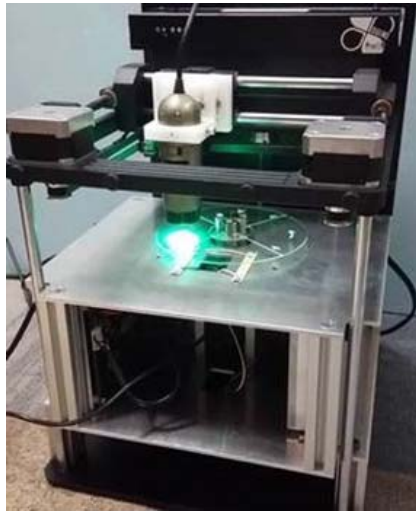


4検体同時分離撮影

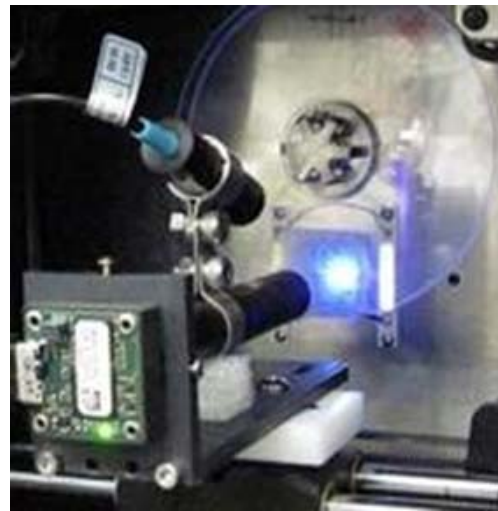


また、本研究開発の最終目標である細胞の蛍光解析に対応するため、励起光源および必要なフィルタを内蔵したカメラを内蔵する装置の開発も行った。

細胞をカウントできる拡大率の視野で撮影を行う場合、1視野で分離槽幅全体を撮影することはできないため、カメラおよび光源からなる撮像系を、分離槽の任意の場所を撮影できるように移動させる必要がある。2-1では市販のモーター制御系とリニアガイド等を使用して駆動系を製作したが、2年度目はコストダウンも目標としていたため、低価格3Dプリンターの駆動系を転用することで、大幅なコストダウンとコンパクト化を図った。蛍光撮影用の光学系もコンパクトにするため、当初は光源一体型の顕微鏡を利用して装置を開発した（次ページ左写真）が、細胞をカウントするレベルの解像度が得られなかった。そこで、カメラとレンズを必要な感度と倍率のものに変更し、蛍光励起用のレーザーを一体化させた装置を開発した（次ページ右写真）。これらの蛍光撮影に対応したモデルを、タイプⅡ型試作機と呼んでいる。

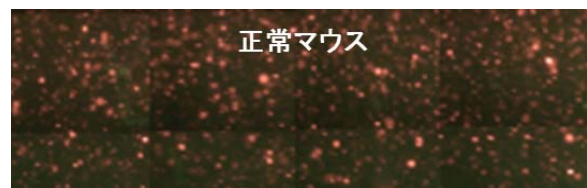


マイクروسコープ組み込み型
タイプⅡ試作機



レーザースキャン対応型
タイプⅡ試作機

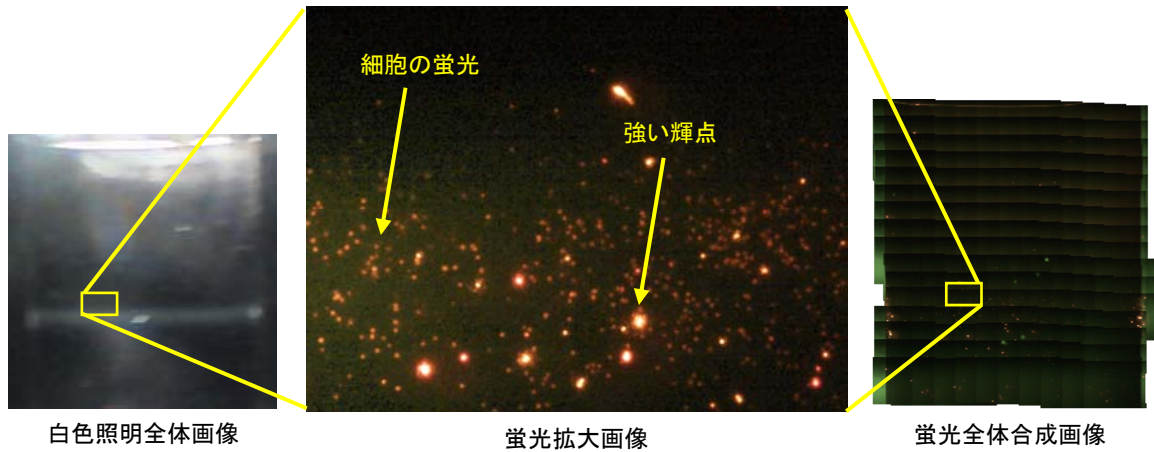
レーザースキャン対応型タイプⅡ試作機にて、がん発症マウスと正常マウスの血液の撮影を行ったものが下写真である。免疫系細胞のうち、T細胞に存在するCD4抗原およびCD8光源に結合する蛍光抗体を使用しているが、がん発症マウスでは発光している細胞が明らかに減少している様子が確認できた。ただし、この段階では定量性については確認ができていない。



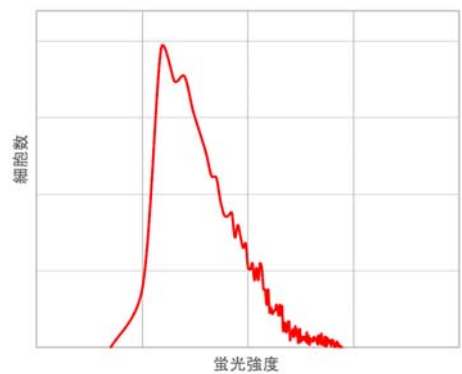
【2-3】量産確認用装置の製作と評価

1-3で説明した通り、限られた予算と期間で検査用デバイスの検討を効率的に行うため、ディスク型からチップ型へ変更することにした。したがって、蛍光撮影用として2-2にて開発したタイプⅡ試作機についても、ディスクホルダーからチップホルダーに変更した。また、励起光源用および撮影用の光学フィルタについても、使用する蛍光抗体の性質に合わせて随時変更を行った。

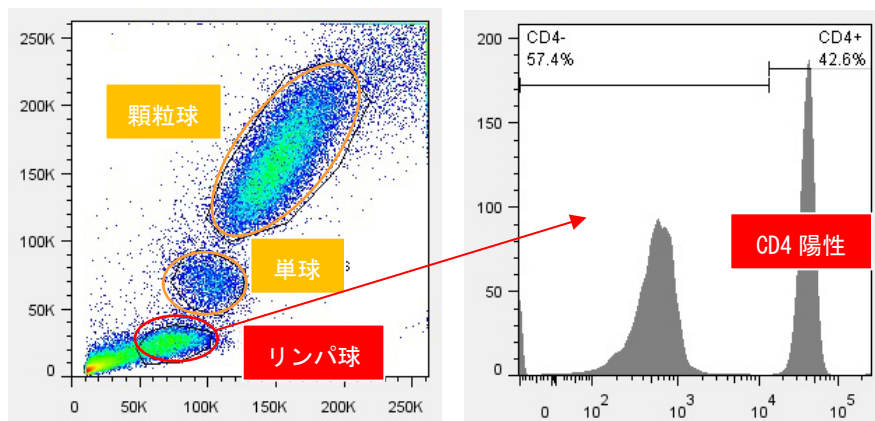
実際にヒト健常者の血液を用いて、ヘルパーT細胞に特異的なCD4抗原に結合する蛍光抗体で検出を行った例が下写真である。白色照明により白血球のバンド全体の位置を確認し（下写真左）、その一部にレーザー照射を行い拡大画像（下写真中央）を撮影すると、多数の細胞と見られる蛍光輝点が観察された。非常に強力な輝点も存在するが、これを顕微鏡で確認すると細胞ではないことがわかるため、細胞のカウント処理では除外する。2-2で説明したように、このような拡大画像1枚では細胞バンド全体のカウントができないため、3Dプリンターを転用した駆動系に撮像系を取り付け、細胞バンド全体をスキャン撮影し、合成画像を得る（下写真右）。



一定範囲内の輝度を有する細胞の蛍光と思われる輝点を、開発したソフトウェアにて検出し、蛍光強度と細胞数のグラフを作成すると、右図のようになった。血液検体量 $10 \mu\text{L}$ に対し、蛍光細胞のカウント数は 3105 個となった。白血球バンドを回収し、顕微鏡にて白血球全体のカウントを行い、蛍光の強い細胞数の比率（CD4 陽性率）を求めると、8.8%となった。

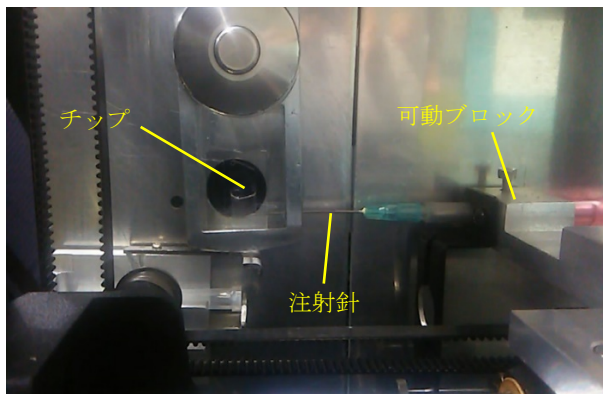


免疫蛍光分析に一般的に用いられているフローサイトメーターでも同じ検体を測定し、CD4 陽性率を求めると 9.4%となり（下図）、本研究開発の試作装置で得られた値に近くなった。この結果から、本研究開発の試作装置で免疫検査を行うことが可能であることが示された。

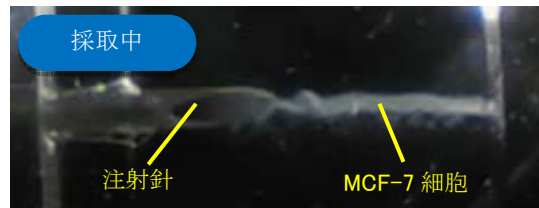


フローサイトメーターによる解析

また、PDMS材を使用した分離チップからの細胞回収を行うため、3Dプリンターを転用した駆動系に、穿刺回収用の注射針とシリンジを取り付けた装置を試作した（次ページ写真左）。次ページ写真右は実際に培養細胞である MCF-7 細胞のバンドを回収している様子であるが、ほぼ完全に細胞を回収できていることがわかる。

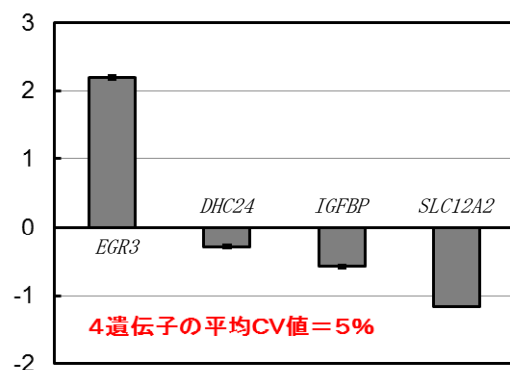


細胞の自動回収機構



MCF-7 細胞の回収

エストロゲン刺激あり/なしの条件でそれぞれ培養した MCF-7 細胞を試作機で分離回収し、RT-PCR法によりコントロール遺伝子の遺伝子発現量の比を求めたところ、各遺伝子の平均CV値は5%となり、本研究開発の手法により分離回収される細胞の品質は問題のないレベルであることが示された。



第3章 全体総括

3-1 検査デバイス

検査デバイスの技術的な概要は1-3-1で述べた通りであり、詳細は第2章で説明しているため、ここでは割愛する。本研究開発の開始当初は、市販されているコンパクトディスク（CD）の基板が安価に入手でき、加工試作の容易さ、市販のCDドライブを用いた回転評価の容易さという点で非常に有利であった。しかし、基本検討が順調に進行し、試作金型を製作して評価する段階になると、CDサイズでは金型製作費および材料費が高く、大面積であるがゆえに蛍光撮影に必要なミクロン単位での加工形状および位置決め精度も得にくいという問題点の方が大きいことが明白となった。

そこで、最終年度はディスク型からチップ型に変更することで、開発費および開発期間を削減し、本研究開発の目標である細胞の蛍光画像分析による免疫検査が可能であることを実証できた。チップ型に変更したことで、ディスク型では難しい機械的な細胞回収も可能となり、回収後の細胞の品質評価も予定通り完了できた。

検査デバイスをチップ化することは当初計画には含まれていなかったが、このような対応をすることで、予定されていた一連の評価および目標性能を達成することができた。

3-2 測定装置

測定装置についても技術的な詳細はここでは割愛する。本研究開発を遂行する上で最も重要であったことは、遠心分離の回転中に細胞の検出や回収のための処理を行わなければならないのか、回転を停止させてからでも処理が可能であるのかという点であった。初年度の開発では市販のモ

ジュールや基板を利用して試作装置を製作したが、これにより、回転を一定の条件で停止させれば分離後の状態も安定していることが確認できたため、その後の技術的な仕様を決定することが容易になった。

2年度目の第一の課題は、自作の制御基板により低コスト化およびコンパクト化を図ることであったが、初年度の検討で必要なスペックは明らかになっていたため、予定通り完了することができた。また、最も大きな課題として、蛍光検出に必要な3次元駆動系をいかに低コストかつ短期間に開発するかということが重要であったが、低価格3Dプリンターの駆動系を自作のソフトウェアで制御できることが確認できたことにより、実現の目途が立った。

最終年度は検査用デバイスがチップ型に変更されるという事情があったものの、チップを固定するホルダーを高精度な金属加工で製作できるようになったため、蛍光撮影に必要な形状精度を確保するという課題については、むしろ容易になった。また、細胞回収機構の開発についても、レーザー穿孔対応チップに限定せず、PDMS製チップが試作されたことで、レーザー穿孔方式ほどの高精度な位置制御は必要なくなり、前年度に開発した3Dプリンターの駆動系を応用して短期間で実現することができた。

最終的には、フローサイトメーターよりも大幅なコストダウンとコンパクト化を実現した装置により、フローサイトメーターに近い検査結果を得るという目標を達成することができた。

3-3 研究開発後の課題

本研究開発の最終製品は医療機器であるため、製品自体の研究開発と同程度以上に臨床評価も重要である。本事業の性質上、臨床評価を行う病院等の機関の予算は限られるため、臨床評価については十分に実施できておらず、今後の大きな課題となる。免疫蛍光分析評価としては、ヒト健常者の血液で、T細胞の検出をモデルケースとして実施したが、今後は各種疾患患者の血液で、T細胞以外の免疫細胞を蛍光標識して検出する評価が必要である。また、フローサイトメーターでは、同時に複数の抗体すなわち複数の蛍光色の分析を行うことも一般的であるが、本研究開発の画像をベースとした手法でどこまで多色解析が可能であるかは大きな課題になると考えられる。いずれにせよ、幅広いレンジで高感度に解析ができるフローサイトメーターの置換を目指すのではなく、免疫検査のターゲットを定め、それに最適化する形でコストダウン等を進め、フローサイトメーターとの差別化を図っていく必要がある。

3-4 事業化展開

前記の通り、医療機器として必要な臨床評価を少なくとも1年程度かけて行い、装置の最適化設計と試作が必要になると思われるので、そこから製造販売のための認証を得ることなどを想定すれば、製品化は早くとも平成30年の後半になる。ただし、臨床評価を進めるためには十分な予算も必要であるから、その資金源を確保することと、それだけの資金を投入して回収できるだけの市場性が本製品にあるかについてのマーケティング調査も十分に行わなければならない。

本製品は基本的には分離チップを中心とした消耗品ビジネスの形となると想定されるが、既存の方法と比較してコスト競争力のあるものとするためには数万個単位で分離チップを量産しなければ難しく、設備投資にも相当な費用が必要となるため、やはりマーケティングが重要となる。

一方、本研究開発の中で開発された、遠心分離後の細胞を簡便かつオートマチックに回収できる機能については、医療機器に限らず生命科学用途に広く応用できるものである。実際に、

本研究開発の成果発表として平成28年12月に日本分子生物学会年会への出展を行ったところ、免疫分析そのものよりも、細胞の回収についての関心の方が高かったという結果が得られている。今後は医療機器としての製品化を目指す検討を継続しながら、こちらの用途で早期の製品化を図ることも想定して研究開発を行っていく予定である。