平成27年度採択 戦略的基盤技術高度化•連携支援事業 戦略的基盤技術高度化支援事業

「再生医療の産業化に向けた未分化・造腫瘍性細胞の検出技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成30年5月

担当局 四国経済産業局 補助事業者 公益財団法人かがわ産業支援財団

目 次

第1章 研究開発の概要

- 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標
 - (1)研究開発の背景
 - (2) 研究目的及び目標
- 1-2 研究体制 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)
 - (1) 研究組織・管理体制・協力者
 - (2) 管理員及び研究員
 - (3) 他からの指導者・協力者
- 1-3 成果概要
- 1-4 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

- 2-1 本事業の全体概要説明
- 2-2 実施項目[1] 高品質レクチンチップの設計・検証
 - (1) レクチンチップ製造工程フローの改善
 - (2) テーリング現象の発生抑制への取り組み
 - (3) 試作チップの S/N 比評価試験
 - (4) レクザム製 レクチンチップの性能評価
 - (5) 次世代規格チップ(Ver.2 規格チップ)の策定
 - (6) レクチンチップ測定システムの評価・検証

- 2-3 実施項目【2】 レクチンチップのばらつき低減
 - (1) スポット工程における液滴吐出不良発生の原因と対策
 - (2) スポット飛散原因の解析、および要因除去による品質向上検討
 - (3) ばらつき改善効果の検証
- 2-4 実施項目【3】 レクチンチップの長期保存技術の開発
 - (1)環境試験機を用いた保存耐久試験の実施
- 2-5 実施項目【4】 未分化性判定システムの開発
 - (1) チップ上の試料反応促進システムの設計・検証
 - (2) レクチンチップ測定システムの開発
 - (3) レクチンチップ測定システムの評価・検証

第3章 全体総括

- (1) 研究開発の成果
- (2) 創出可能な製品の種類
- (3) 今後の事業化展開

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)研究開発の背景

人工多能性幹細胞(iPS/ES細胞等)を用いた細胞加工製品の実用化は、失われた身体機能を回復させる「再生医療」を実現していく上で欠くことのできない存在である。しかしながら現状では、細胞加工製品には依然として癌化につながる未分化細胞の残留リスクが存在することから、実用化にはこの残留リスクに関する数値的な評価・管理手法の確立が大きな課題となっている。

このような背景の下、我々は被験細胞試料中の造腫瘍性細胞の混入を「従来の遺伝子 増幅法よりも信頼性高く、簡便・高速に検出したい」という川下企業のニーズに応える ことを志向した新技術の研究開発を実施した。本新技術は細胞内の遺伝子ではなく、幹 細胞表層の糖鎖構造変化を直接検出する方法を採用する(図 1)。

本開発事業では、上記目的のために被験細胞表層の糖鎖を高効率に補足する「レクチン」と呼ばれるタンパク質を固定化した<u>「チップの製造技術」</u>及び、このチップを高感度に蛍光検出する<u>「検出システムの開発」</u>を実施する。

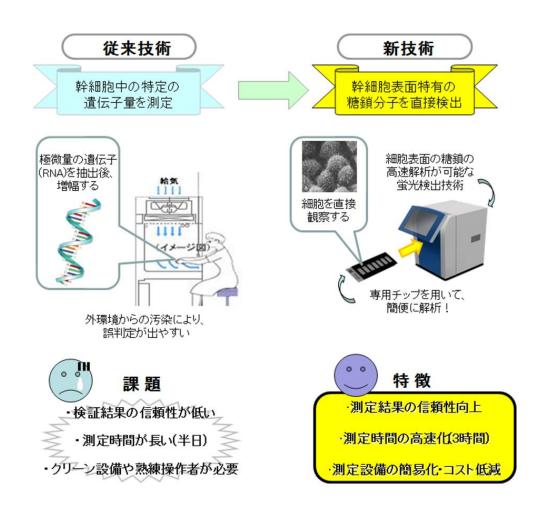


図 1 従来技術と新技術の比較

(2) 研究目的及び目標

再生医療の産業化に向けた未分化・造腫瘍性細胞検出技術の開発は、上記に掲げた川下製造業者等の共通の課題及びニーズに応えるものである。本事業では細胞加工製品中に残留する未分化細胞をレクチン固定化チップの利用によって信頼性高く、簡便・迅速に測定する技術を開発する。研究開発の高度化目標は以下のとおり(図2)。

実施項目	高度化目標	
1.高品質レクチンチップの 設計・検証	100種以上の細胞種を用いた判定能力検証	
2.レクチンチップの	スポット輝度ばらつきが少ないチップの開発	
ばらつき低減技術の開発	(目標:CV値=10%以下)	
3.レクチンチップの	1年間保存を可能とする乾式チップ保存法の	
長期保存技術の開発	開発(1年後の残存活性70%以上)	
4.未分化性判定システム	検体処理能力の高速化	
の開発	(3時間で96検体の処理能力)	

図2 研究開発の高度化目標

1-2 研究体制

(1)研究組織・管理体制・協力者

本共同体の研究実施機関である株式会社レクザムは、糖鎖研究やレクチンチップの開発において世界をリードし続けてきた「産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター」の協力の元、下記アドバイザーらの助言も得ながら、糖鎖構造から細胞の残存未分化能検出チップの開発を推進した(図3)。

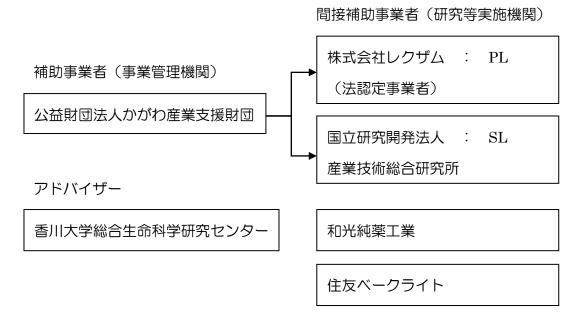


図3 研究開発の実施体制

(2) 管理員及び研究員

【管理員】

公益財団法人 かがわ産業支援財団

	J		
	氏	名	所属•役職
今雪	良智		技術振興部・参与兼部長
	 - 1+1		(平成29年4月~平成30年3月)
森	敏樹		技術振興部・参与兼部長
,, <u></u>			(平成27年9月~平成29年3月)
佐藤	恵子		技術振興部産学官連携推進課・専門員

【研究員】

株式会社レクザム

111 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1			
氏 名	所属・役職		
岩本 昌克	生産本部 第1開発部 フェロー		
髙嶋 俊治	生産本部 第1開発部 部長		
内山 昇	生産本部 第1開発部 第4開発グループ		
	マネージャー		
玉井 一規	生産本部 第1開発部 第4開発グループ		
	リーダー		
曽我部 綾子	生産本部 第1開発部 第4開発グループ		

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

氏 名	所属•役職
平林 淳	創薬基盤研究部門・首席研究員
舘野 浩章	創薬基盤研究部門・主任研究員
齊藤 佐代子(補助員)	創薬基盤研究部門・テクニカルスタッフ

(3) 他からの指導者・協力者

国立大学法人 香川大学

氏 名	所属•役職
中北 慎一	総合生命科学研究センター 糖鎖機能解析研究部門 准教授

1-3 成果概要

本研究開発に於ける「当初目標に対する達成状況」は下図の通り(図4)。

実施項目	目標	達成状況		
1.高品質レクチンチップの		計151種の細胞株を用いた大規模評価試験を		
設計・検証		実施し、判定機能に関する最終検証を完了		
2.レクチンチップの	スポット輝度ばらつきが少ないチップの開発	量産パイロット品のスポット輝度ばらつきは、		
ばらつき低減技術の開発	(目標:CV値=10%以下)	CV値=6%を達成		
3.レクチンチップの	1年間保存を可能とする乾式チップ保存法の	量産パイロット品の活性検査を行い、1年間		
長期保存技術の開発	開発(1年後の残存活性70%以上)	保管品でも85%以上の活性保持を確認		
4.未分化性判定システム	検体処理能力の高速化	並列反応促進機構を開発することで、同時		
の開発	(3時間で96検体の処理能力)	検体処理能力を最大210検体/3h まで強化		

図4 研究成果の概要

1-4 当該研究開発の連絡窓口

株式会社レクザム 生産本部 第1開発部 第4開発グループ 内山 昇

TEL: 087-879-3131(代表)

FAX: 087-879-8877

E-mail: <u>uchiyama-noboru@rexxam.co.jp</u>

第2章 本論

2-1 本事業の全体概要説明

本事業では全体の研究開発を4つの各実施項目に分割し、2つの間接補助事業者(レクザムと産総研)がそれぞれに下図のように担当を分担し、数値目標を設定した上で研究開発を実施した(図5)。

レクザムは主に細胞上の特殊な分子を分析するための専用チップ(レクチンチップ)及びそのチップを解析する蛍光検出システムの開発を担当した。

産総研は主に保有する幹細胞(iPS/ES 細胞)を用いた、レクチンチップや蛍光検出システム全体の評価・検証試験を担当した。

実施計画と実績の一覧

計画 -

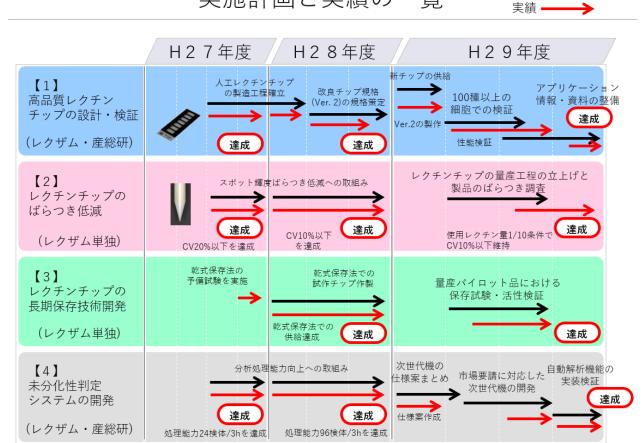


図 5:本事業の実施計画と実績一覧

2-2 実施項目[1] 高品質レクチンチップの設計・検証

(1) レクチンチップ製造工程フローの改善

【株式会社レクザム担当分】

レクザムでは最初に、レクチンチップのコストダウン・生産性向上を目的とした 「チップ製造工程の改善」に取り組んだ。

本事業で開発するレクチンチップは側端面から入射光を入射させて基板内部で光を 全反射させながら基板表面にエバネッセント光発生領域を生成させる事を特徴として いる。このため基板の表面を汚染しないよう、チップ製作の全工程にわたって清浄な 空間内での作業を行うことが重要となる。

レクチンチップの製造工程の改善に当たっては、温湿度コントロール下のクリーン 空間と共に、製造工程のほぼ全般にわたって改善を行った。3 年間の改善活動の結果 として、最終的に確定した製造工程フロー図は下記の通りである(図 6)。

①ラバー・シール貼付け工程 ②レクチン試薬調製工程 保湿箱のチップをマイクロスコープを使って 全スポットの異常有無を目視確認する非破壊検査 ③レクチンスポット工程 歩留まり 改善 4検鏡検査工程 (全数検査) 新規追加 ⑤固定化反応工程 (一晚) 温湿度コントロール環境下 6洗浄工程 で実施するよう変更 ⑦表面保護コート工程 レクチン活性確認の目的で、完成チップのうち1~2枚に 対して検査用蛍光タンパクを反応させる破壊検査 ⑪レクチン ⑧乾燥工程 機能検査工程 (抜き取り検査 (9)チッツ プクリーニング工程 高速化 今回確立 ⑩不活性ガス置換封入包装工程

レクチンチップ製造工程の流れと改善項目

図 6: レクチンチップ製造工程の全体フロー図

前ページの図6の工程フローにおいては、赤枠で囲んだ「③レクチンスポット工程における歩留まり改善」、「④検鏡検査工程の新規追加」、「⑤固定化反応工程・⑥洗浄工程の温湿度コントロール」、「⑪不活性ガス置換封入包装工程の置換率向上及び高速化」、「⑪レクチン機能検査工程の確立」の5点が特に重要な改良ポイントとなった。

(2) テーリング現象の発生抑制への取り組み

本実施項目の中で最も苦戦した開発課題の 1 つが、レクチンチップの洗浄工程でレクチンスポットが尾を引く「テーリング現象」の抑制手法の開発であった。この現象は下図7に示すように「スポットが彗星の尾を引くように流れてしまう」現象であり、この現象がスライド中で 1 箇所でも発生してしまうと隣のレクチンスポットに重なって NG 品と判定されるため、歩留まりの悪化要因として非常に大きな問題となってきたが、本現象の発生をコントロールができずに、レクチンチップの製品化を目指す上で最大の障害となっていた。

検討の結果、本現象は洗浄工程中の空気の湿度が高い状況で発生することが判明した。高湿度環境ではレクチン液滴が周囲から水蒸気を吸収して大きく成長するため、洗浄工程でレクチン溶液が流れ、尾を引いたような模様を残すことが分かった。そこで湿度を低く保った湿度コントロール環境中でレクチン微小液滴の吸湿による成長を抑制ながらインキュベーション反応を行い、その上でチップの洗浄操作を行った所、この「テーリング現象」の発生を有意に低減できることが判明した(図 7)。

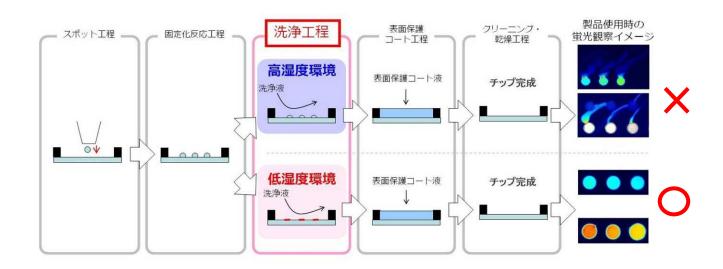


図7:テーリング現象の発生機序

レクチンチップの製造は微小なレクチン液滴が乾燥しないよう、高湿度環境下で行う必要がある。環境雰囲気の湿度が低下すると、レクチンの微小液滴がすぐに乾燥・ 塩析してレクチン活性が失われてしまう為である。

このため、「高湿度環境で発生しやすい」テーリング現象を抑制するには、レクチン液滴がなんとか乾燥しないギリギリまで湿度を下げつつ、この湿度環境を長時間安定的にコントロールした状態下でレクチンチップの「洗浄工程」までを一気通貫に実施する必要がある。これを達成すべく、本事業では下図8に示す専用チャンバーを開発した。



図8:洗浄工程における温湿度制御効果の把握

このチャンバーの採用によって「テーリング現象」の大幅抑制に成功したが、上記 対策を行ってもなお一部の特定のレクチンにはテーリング現象が発生し、これが中々 根絶できない課題として残されていた。そこでこの課題への最終対策として、レクチ ンを溶解するスポット液の組成変更検討を実施した。

吸湿性がより低いバッファー組成を求めて組成検討を繰り返し、スポッターの液滴 吐出確実性とテーリング抑制を両立できるよう、スポット液の組成を少しずつ変えて 試作を続けた。最終的にはバッファー組成条件の最適化によってようやく、量産化の 見通しを得ることができた(次頁 図 9)。

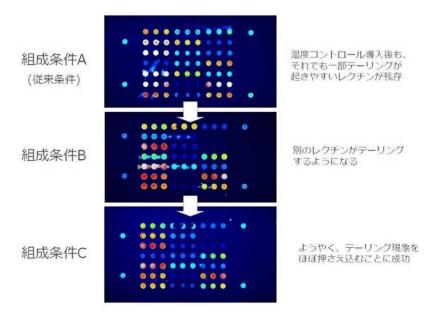


図9:レクチンスポットバッファーの組成検討結果

本事業では「洗浄工程の改善」、「スポットバッファーの組成変更」とそれに合わせた「スポット吐出圧力設定の最適化」、「全数検査の確立」といった改善を積み重ねることで、レクチンチップの大幅な品質向上が達成された結果、チップ自体の歩留まりを30%から70%に引き上げることに成功した(図10)。

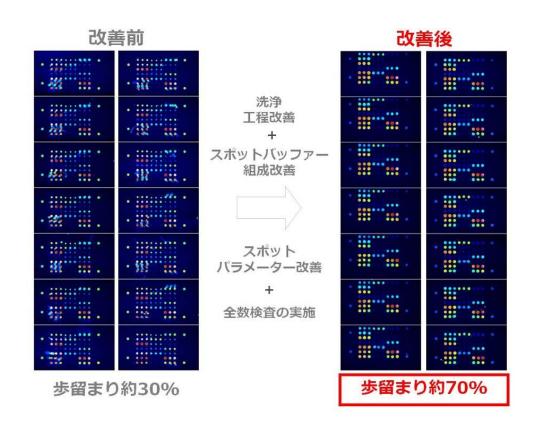


図10:各種改善を組み合わせた前後の総合的な比較結果

(3) 試作チップの S/N 比評価試験

平成28年度の開発を通じて各種工程を改善し、品質を高めた試作レクチンチップ (Ver.1)を試作システムで測定した場合、実際に蛍光強度信号がどの程度の S/N 比で 得られるかについて検証を行った。モデルレクチンとして「rBC2LCN」というレクチンチップ(Ver.1)に採用された 21 種のレクチンの中でも特に蛍光強度が弱いレクチンのみをスポットした、非常に条件の厳しいモデルチップを試作した上で、このチップでモデル糖タンパク質プローブと反応時に得られる S/N 比を観察した(図 11)。

	事業2年度目
	(H29年1月)
取得蛍光画像	
輝度値平均	2,239
バックグラウンド値平均	180
スポットの平均S/N比	12.4

図 11: スポットの平均 S/N 比 評価試験結果

検証の結果、最も蛍光強度が得られにくいレクチンで観察する最も厳しい条件においても当初数値目標値である「S/N 比=10 以上」を達成できていることを確認できた。

(4) レクザム製レクチンチップの性能評価

【産業技術総合研究所担当分】

産総研では、レクザムにて試作されたレクチンチップ(Ver.1)の品質をチェック・検証する目的で、まずは従来の産総研製レクチンチップとの性能比較試験を実施した(図12)。

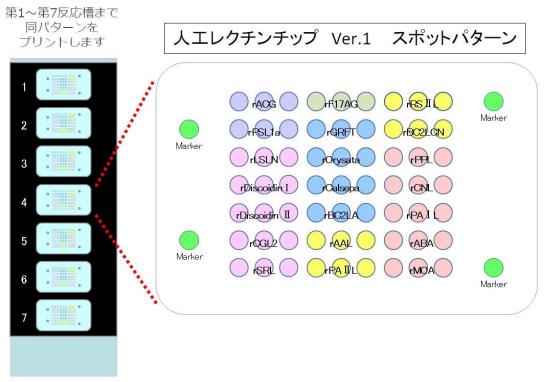


図 12: レクチンチップ(Ver.1)のスポットパターン

ユーザーが実際に使用する条件と条件を揃えることを目的として、レクチンチップ はレクザムにおいて乾式包装処理後に、産総研(つくば)まで冷蔵輸送したものを比較評 価試験に供した。

この比較試験の結果、レクザム製レクチンチップが従来の産総研製レクチンチップ との高い同等性を示すことが確認された。また、今回の長距離輸送による悪影響も特 に見られず、輸送後も問題なく評価試験に使用できることが確認された(次頁 図 13)。

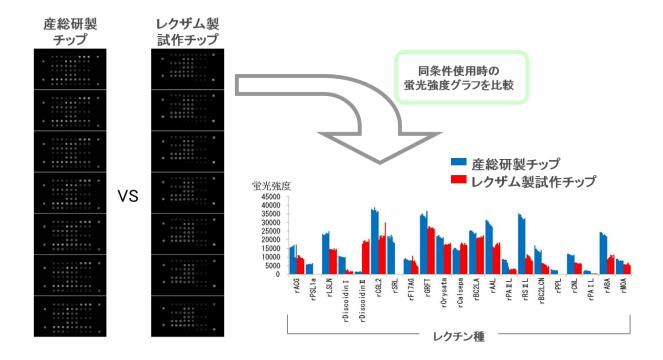


図 13: レクチンチップ輸送試験の結果

この成果を踏まえ、次に各種細胞由来試料を用いたレクチンチップの性能比較試験に移行した。細胞試料を用いた各種比較試験の結果、乾式保存処理されたレクザム製レクチンチップが、従来の産総研製レクチンチップとほぼ同等の能力を持つことを検証し、目標達成を確認した(図 14~15)。



図 14: レクチンチップの評価手順

アレイ品質比較

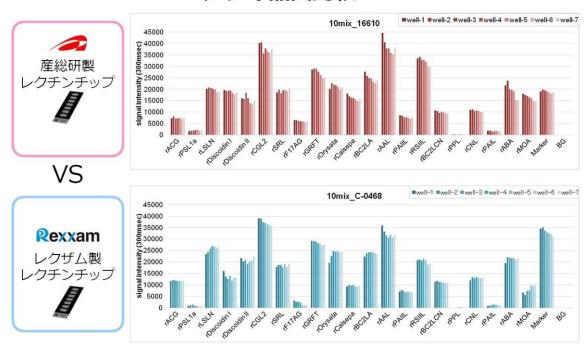


図 15: 規定の糖タンパク質プローブを用いたレクチンチップ品質比較結果

(5) 次世代規格チップ(Ver.2 規格チップ)の策定

本事業の 2 年度目には、レクチンチップ上の反応槽数を 7 well から 14 well へと 倍増させる代わりに、固定化するレクチン数を 21 種から 7 種に減らした次世代型 チップ規格(Ver.2)の策定を実施した。

本規格の策定はチップに使用するレクチンを、より有用なレクチンだけに絞り込む ことで、検体処理可能数の倍増と検体解析コストの半減が可能になるというコンセプ トからスタートしている。

産総研の保有する 150 種類のレクチンの中から一次選抜を行った結果を第 1 案としてレクザム側に提示した。その後、これをたたき台としてレクチンコストや生産性の問題を考慮した第 2 案を提示した。最終的に試作と若干のレクチンの入れ替えを行った第 3 案で最終案となった(図 16)。

Ver.2 規格チップの策定は「ユーザーの検査コストの低減と量産性向上」に結びつく成果であった。

🥏 改良チップ規格(Ver. 2)の規格策定

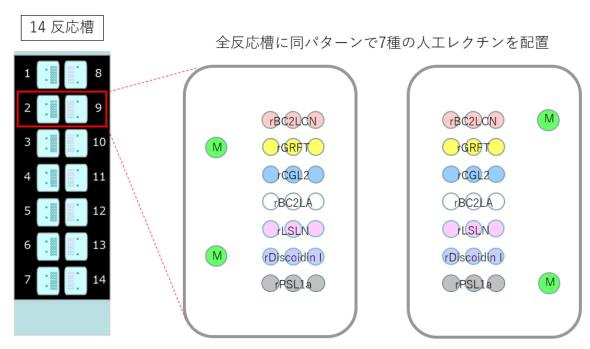


図 16: 策定した次期レクチンチップ規格(Ver.2)のレクチン配置

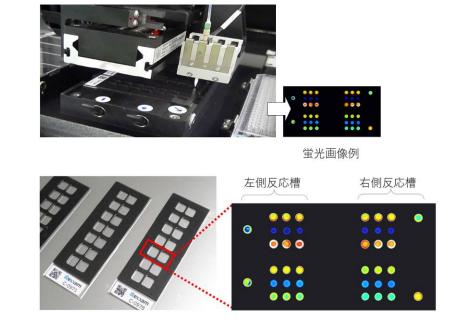


図 17: 試作されたレクチンチップ規格(Ver.2)のチップ

(6) レクチンチップ測定システムの評価・検証

本事業の最終年度には、本事業の成果である「レクザム製レクチンチップ」及び「レクチンチップ検出システム」を一体的に評価する目的で、産総研において最終評価を実施した(図 18)。

本最終評価においては、レクザムで製造したレクチンチップ規格(Ver.2)量産パイロット品を産総研に製品出荷時と同条件で送付した上で、実際のユーザーが使用する条件と同条件で評価試験を実施して頂いた。

産総研での評価試験においては、分化細胞(32 種類)、未分化細胞(119 種類)の合計 151 種類を使用して頂き、当初計画時の目標であった「100 種類以上での細胞での評価」を大きく上回ることができた。



数値目標であった「100種類以上の細胞を用いたチップ能力検証」を達成

図 18: 産総研での最終評価の概要

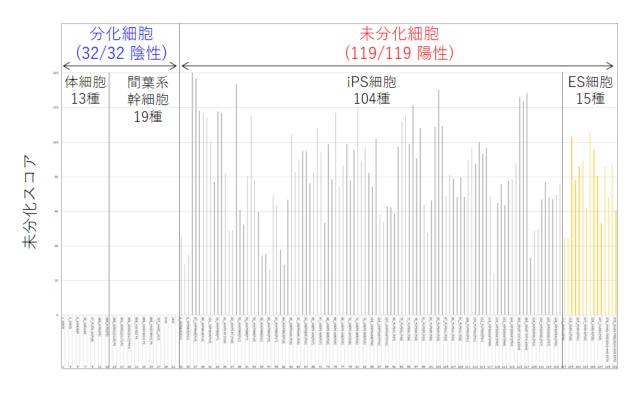
計 151 種類の細胞を用いて実施した最終検証の結果を下図(図 19)にまとめた。本システムにおいて自動的に算出される未分化スコアを縦軸、151 種類の細胞腫を横軸に取ったグラフであり、未分化スコアが高いほど「細胞が未分化である」ことを示している。

今回の産総研による検証試験によって、本システム一式が十分な細胞の未分化能の 判定能力を持つことを証明することが出来た。

本成果はレクチンチップの細胞未分化能の判定性能を担保するための重要なデータであり、チップ能力の信頼性確保に結びつく成果である。



産総研でのレクザム製レクチンチップ+スキャンシステムの評価試験結果



→計151種の細胞株を用いた大規模な評価試験を実施。 システム全体の判定機能に関する最終検証を完了した

図 19: レクチンチップ規格(Ver.2)を用いた未分化判定能力検証結果(まとめ)

2-3 実施項目【2】 レクチンチップのばらつき低減技術の開発

(1) スポット工程における液滴吐出不良発生の原因と対策 【株式会社レクザム担当分】

レクチンチップ製造工程においては、ノズル先端への水滴付着現象が問題となってきた。レクチン液滴を吐出するセラミック製微小ノズルの先端は親水的であり、そこから親水的なタンパク質試料を吐出しているために、タンパク質の汚れ等の付着により先端の濡れ性が高まり、レクチン溶液や洗浄液の大きな液滴が付着しやすくなる傾向がある(図 20)。

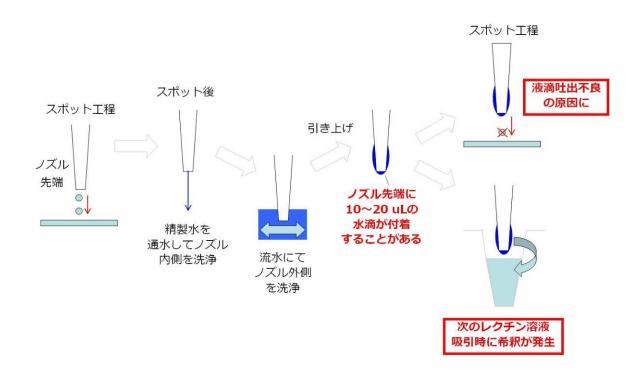


図 20: 従来問題となってきたノズル先端への水滴付着現象とその影響

前述した理由から、従来から如何にしてノズル先端への水滴付着を防止するかという 点が技術課題となっていた。最終的にこの課題に対しては、洗浄工程及びサンプル吸引 工程において毎回ノズルを水中で洗浄後に「ノズル先端をバキューム管の中に突っ込ん で吸引乾燥する」ことでノズル先端に付着した水滴を毎回除去するというアプローチを 採用し、この問題を解決した(次頁 図 21)。

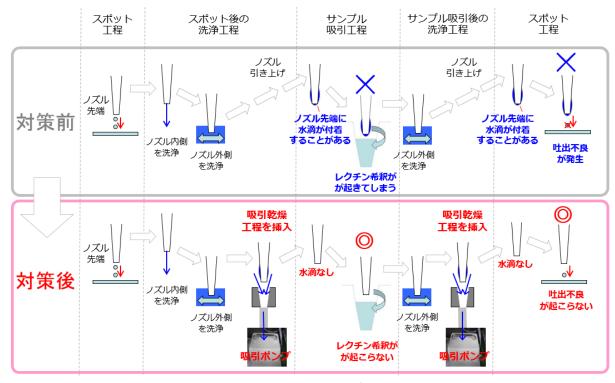


図 21: ノズル先端用吸引ポンプの導入とその効果

ノズル先端乾燥機構を開発するに当たり、ノズル位置検知センサとこれに連動する吸引ポンプ機構、スポッター制御機構のソフトウェア改良対応等を実施した。またノズル先端乾燥機構の開発後は実際の動作試験を繰り返し、動作確認や吸引圧の適正化を実施した(図 22)。

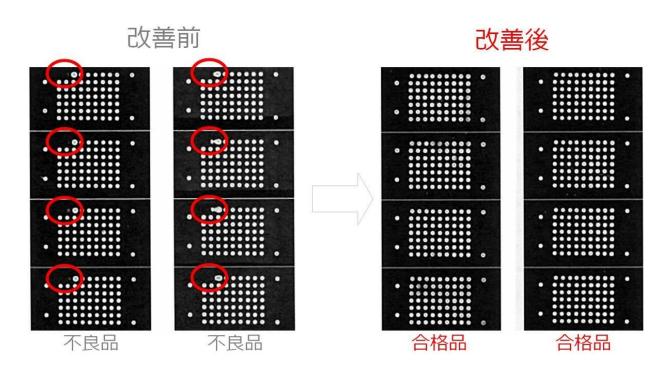


図 22: ノズル先端乾燥機構の導入前後比較

レクチンチップの製造工程においては 1 箇所のスポット吐出不良箇所が発生するだけで、そのチップ全体が NG 品となってしまう。このため極めて低頻度でも吐出不良が発生すると大変な損失が発生する。

このような背景から「吸引ポンプの導入による吐出不良現象の押さえ込み」は非常 に重要な成果であり、レクチンチップの歩留まり改善に大きく結びついた。

(2) スポット飛散原因の解析、および要因除去による品質向上検討

従来のレクザム製レクチンチップに独特の問題として、下図23に示すようにスポット周囲へ液滴が飛び散る例が散見されていたが、その原因が分からない状況であった。この液滴飛び散り現象が起きると、隣り合うスポットにおいてレクチン液滴同士が混合してしまうことから大きな問題となっていた。

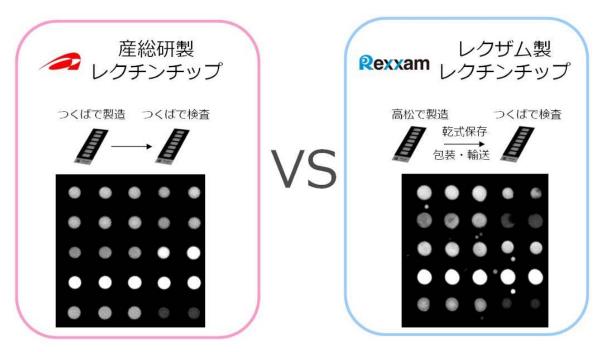


図 23:産総研でのチップ品質比較評価結果

このスポット時の液滴飛び散り現象は「起きる時」と「起きない時」があり、発生原因が分からないために現象をコントロールする手立てがないという状況が続いていた。そこで今回の事業では、この飛び散り現象がどのようにして発生しているのかを突き止めるため 1 秒間に 4000 コマの撮影ができる「高速度顕微カメラ」を導入し、実際にノズルから高速に吐出されているレクチン微小液滴の運動状況の観察を試みた(次頁 図 36)。

観察の結果、コンディションが良い時と悪い時ではノズル先端からの「液滴吐出状況」は全く異なっていた。吐出コンディションが良いノズルでは大きな主滴を 1 滴吐出した後に、小さなサテライト(衛星状の水滴)が 1 滴、後を追うように発生し、双方とも真下に落ちる(液滴は 30 ミリの距離を僅か 1000 分の 3 秒間で落下する)様子が明らかになった。

一方、吐出コンディションが不適切なノズルでは、最初に小型でいびつな主滴が落ちた後に小さい多数のサテライト液滴が一斉にスプレー状に巻き散らされる様子が観察された。このように高速度顕微カメラの導入によって初めて、レクチンスポットにおける飛び散り現象を視覚化し、その発生機序を解明できた(図 24~25)。

上記成果はノズル先端からの液滴吐出状況の直接観察を可能とし、1 万分の 1 秒単位で調整する必要があるノズル吐出圧設定の最適化に結びついた。

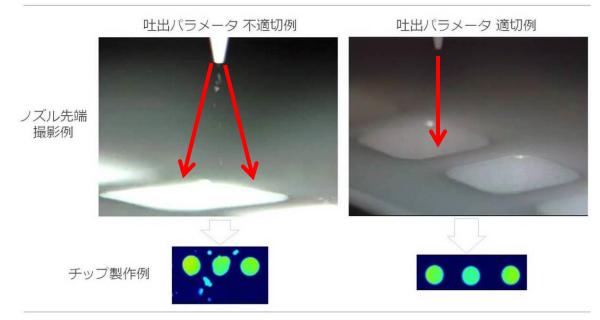


図 24: 顕微高速度カメラによるサテライト発生状況の観察結果

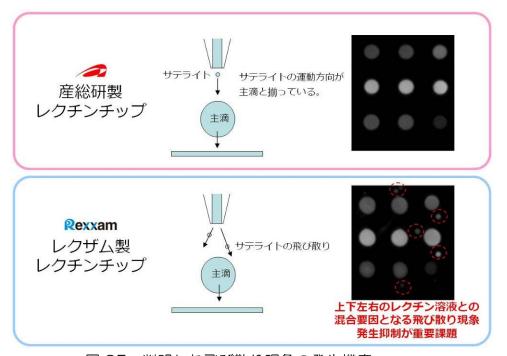


図 25: 判明した飛び散り現象の発生機序

液滴吐出状況の高速度カメラ観察によって、レクチンスポットにおける飛び散り現象の発生状況が明らかになった。そこで次に、この相違がノズル先端のどのような状態変化で生じているのかという原因の調査を行う必要が生じた。

従来はセラミックノズル先端部の細孔の直径は 75 m と非常に小さいために、従来レクザムが保有するマイクロスコープでは、細孔はぼんやりとした黒い点にしか見えず、穴の内部の状態変化の観察までは非常に難しい状況であった(図 26)。

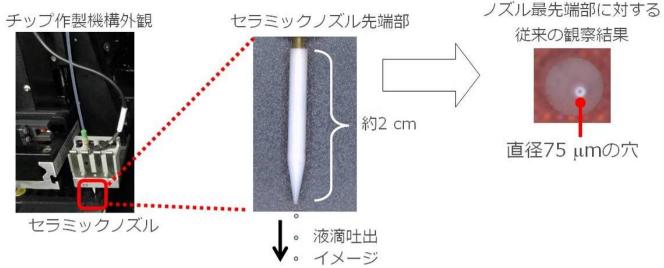


図 26: 従来のノズル先端状況の観察・管理の限界

そこで今回導入した顕微鏡を活用し、コンディションの良いノズルと悪いノズルの 先端の拡大観察を実施したところ、ノズル内部構造の相違が明瞭に判別できた。

この後、更に観察例を増やして観察した結果、ノズル先端の細孔内部に結晶状粒子の汚れが付着・蓄積することで、スポット飛散問題の主要因となっていることを突き止めた(次頁図 27)。

この成果によって、ノズルの吐出不良時に先端細孔内部が綺麗である場合は「それ以上ノズル先端の洗浄は行わずに他の要因を探索する」よう直ぐに業務を切り替える事が可能となった。またどんなにノズルの洗浄を行ってもノズル先端の細孔内部に結晶状粒子が除去できない場合は、ノズルの寿命と見做してノズルを交換するといった判断も可能となり、スポット不調時の対策やスポット品質のコントロール業務において、格段の効率化がもたらされた。

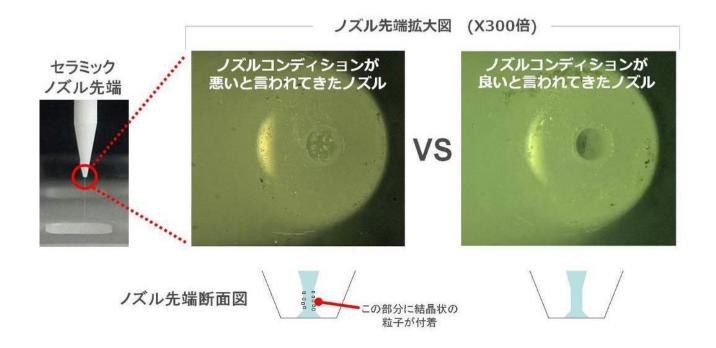


図 27: ノズル先端の拡大観察結果

(3) ばらつき改善効果の検証

各種のばらつき低減技術を検討後の効果確認テストの結果、チップ上のスポット輝度ばらつきは前年度に比べて大きく改善しており、年度末の数値目標である使用レクチン量 1/10 条件で CV=10%以下を達成できたことを確認した(図 28)。

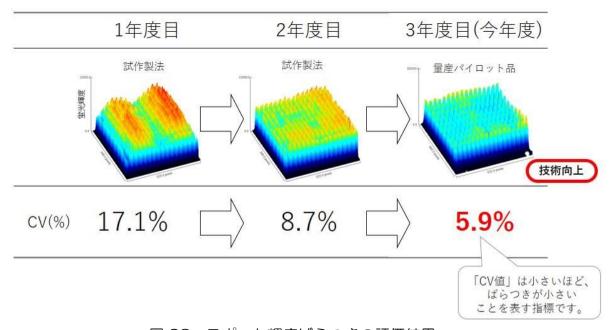


図 28:スポット輝度ばらつきの評価結果

2-4 実施項目【3】 レクチンチップの長期保存技術の開発

(1)環境試験機を用いた保存耐久試験の実施

【株式会社レクザム担当分】

乾式包装の条件確立後、温度を一定に保つことができる環境試験機で乾式レクチンチップの保存耐久試験を実施した。試作品を 2 台の異なる温度条件の環境試験機に入れ、 室温放置品との比較試験を実施した(図 29)。



図 29: レクチンチップの保存耐久試験の様子

まず予備的な試験として試作したレクチンチップ(Ver.1)を用い、3 ヶ月間のレクチンチップ保存耐久試験を行った。この予備試験の結果、室温保存条件では活性が低下するレクチンが存在することが判明した。またその一方で冷蔵保存したチップは全レクチンにおいて活性を保持していたことから、チップの保管時に「冷蔵」することの重要性が明らかになった(次頁図 30)。

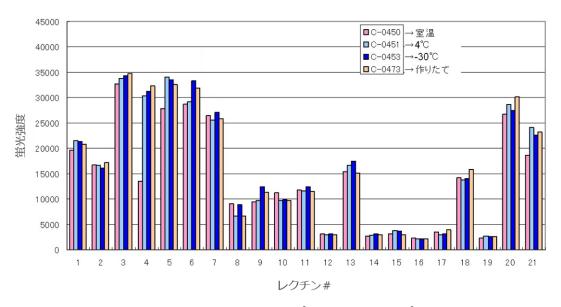


図 30: 3ヶ月間のレクチンチップ保存耐久試験(プレテスト)の結果

予備試験において乾式レクチンチップが良好な成績を見せたことから、最終年度は 1 年間の評価期間を設定し、実際の Ver.2 チップを使用した「レクチンチップ保存耐久試験」を実施した。この試験の結果、Ver.2 チップに採用されたレクチンは最大のレクチンでも 1 年後に-14%しか活性低下は観察されなかった(図 31)。

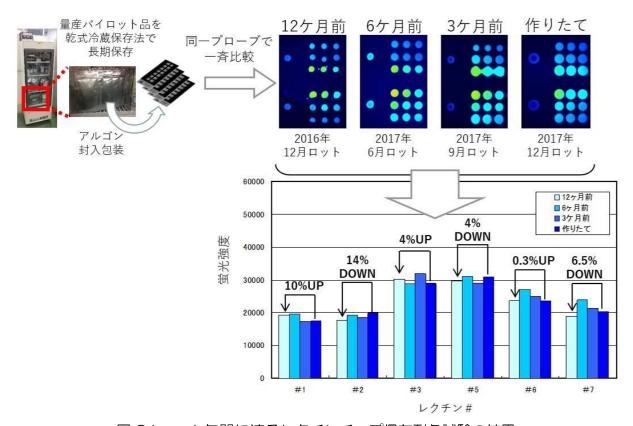


図31: 1年間に渡るレクチンチップ保存耐久試験の結果

以上の結果から、当初計画したレクチンチップの保存期間の設定(1 年間)の妥当性が確認でき、当初計画目標として掲げた「乾式保存で1年後の活性 70%以上保持」を達成し、乾式保存法チップの試作品製作を完了した。

2-5 実施項目【4】 未分化性判定システムの開発

(1) チップ上の試料反応促進システムの設計・検証 【株式会社レクザム担当分】

本実施項目ではまずレクチンチップの結合反応の高速化を果たすべく、初年度目標として「検体処理能力24検体/3 時間の達成」を掲げて開発を進め、まずは初年度に「ほぼ当初目標に近い処理能力」を備える試作品を完成させることができた(図32)。

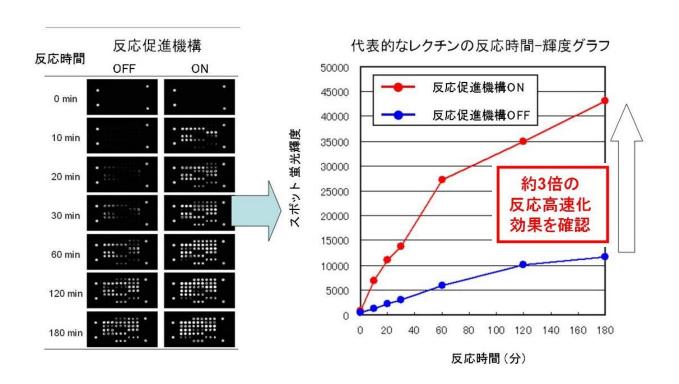


図32:レクザム独自の反応促進システムを用いた結合反応高速化例

カートリッジの検体処理能力を向上させた本試作品は、レクザム独自の微小振動を用いた反応促進機構を利用しており、レクチン-糖鎖間の結合反応の平衡化に要する時間の大幅な短縮を実現した。

開発した反応促進システムに対しては、実際にカートリッジを 10 個まで搭載する負荷 動作試験を実施し、振動動作によるカートリッジの脱落や重量増に伴う反応促進能力低下 が生じないこと等の検証を行った(図 34)。



図34:改良した反応促進システムの検証時の様子

(2) レクチンチップ測定システムの開発

事業 3 年度目は完成した蛍光検出システムについて、完成後に産総研側から頂いた 意見を反映するべく、新たに検出システム側のソフトへの機能追加を実施した。特に 重要な機能追加としてはスポット検出時のチップ位置ずれ/回転への耐性向上(図 35) や、バックグラウンド蛍光値の取得方法改善(図 36)、全露光時間を串刺し一斉解析機能の追加(図 37)等が挙げられる。

上記の改善成果は最終ユーザーの使用時のデータの信頼性向上、及び利便性の大幅 な向上に結びつく成果である。

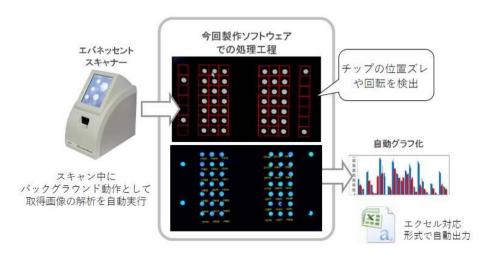
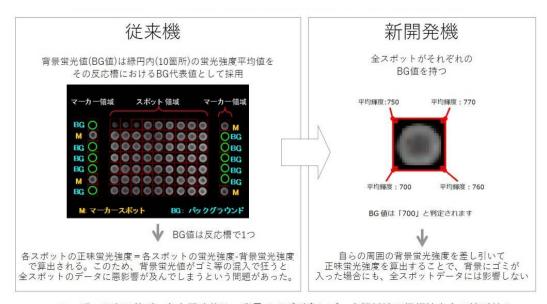


図 35: ソフトウェア機能追加(1)



→ユーザーの声に基づいた上記改善は、背景ノイズが多いデータ解析時の信頼性向上に結び付く

図 36: ソフトウェア機能追加(2)

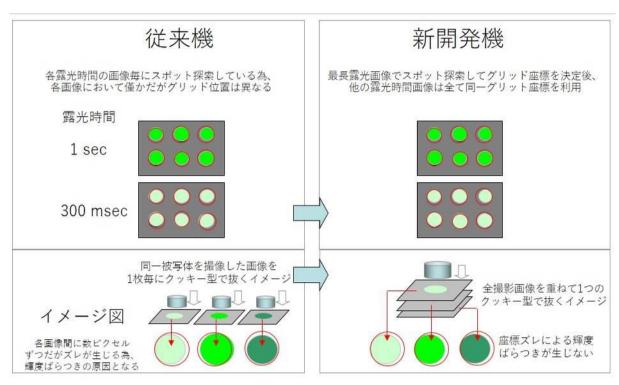


図 37: ソフトウェア機能追加(3)

(3) レクチンチップ測定システムの評価・検証

【産業技術総合研究所 担当分】

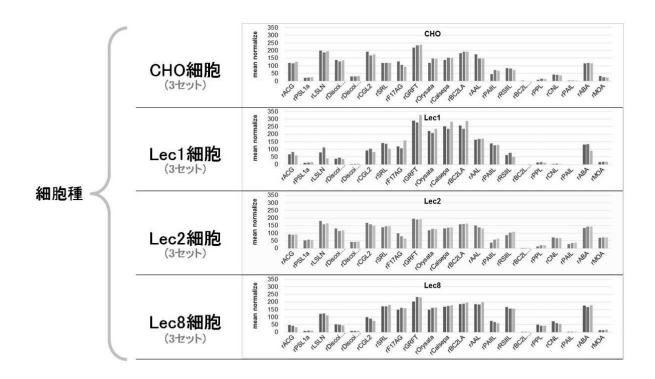
産総研においては、レクザム製の最新ソフトウェアを搭載した「スキャナーシステムー式」とレクザム製の「試作レクチンチップ」を用い、システム全体としての一連の細胞分化能判別能力の評価試験を実施した。また従来の大型スキャンシステムとの比較試験を行った(図 38)。



図38: 産総研におけるシステム評価試験の様子

産総研が行った評価試験の一例としては、ユーザー使用条件で実際の細胞試料を用いて、レクチンチップの結果の再現性が問題ないレベルであることを検証できた(次頁図39)。

また細胞試料を用いたレクチンチップの比較解析の結果、レクザム製のチップ/検出システムでも細胞表層の糖鎖構造変化を反映したレクチンチップのプロファイルを得られる事が検証できた(次頁図40)。



レクチン結合パターンの高い再現性を確認

図39:細胞試料を用いたレクチンチップの再現性検証結果



図 40:細胞試料を用いたレクチンチップの解析比較結果

また産総研において、レクザム製のチップ/検出システムを用いた幹細胞の分化能識別能の検証を実施した結果、良好な分離能力を確認できた(図 41)。

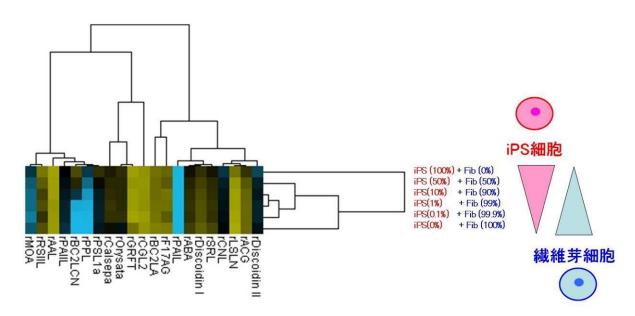


図 41:産総研で実施したレクザム製レクチンチップの分化能識別能力試験結果

産総研による各種評価試験によってレクザム製レクチンチップと検出システムに対する性能の妥当性検証を完了することができ、レクザム製のチップ及び蛍光検出システム全体の持つ性能について、評価を得た。上記の成果はシステムに対する信頼性検証データとして大いに役立つ成果である。

第3章 全体総括

(1) 研究開発の成果

3年間の研究開発を通した成果のまとめを下図に示す(図 42)。

	当初目標値	事業終了時の達成状況	判定	目標達成により得られた効果
実施項目【1】 高品質レクチン チップの設計・検証 100種以上の細胞種を用いて チップ能力を検証		<u>151種</u> の細胞種を用いて チップ能力を検証	達成	レクチンチップの 未分化能判定能力の担保
実施項目【2】		使用レクチン量従来比 1/10条件で輝度ばらつき CV= <u>6%</u> を達成	達成	レクチンチップの 信頼性の担保
実施項目【3】 レクチンチップの 長期保存技術開発	乾式保存で1年後の 活性70%以上保持を達成	乾式保存で1年後の 活性 <mark>85%</mark> 保持を達成	達成	
実施項目【4】 未分化性判定 システムの開発	検体処理能力 96検体/3h	検体処理能力 最大 <mark>210検体</mark> /3hを達成	達成	判定システムとしての 使い勝手の大幅向上
	自動解析機構の 実装完了	自動解析機構の 実装を完了	達成	

図 42:3年間の研究開発成果まとめ

実施項目 1 においては、レクザム・産総研が共同開発したレクチンチップの最終型(量産パイロット品)を用いた大規模検証試験を実施し、レクチンチップが高い未分化判定性能を持つことを実証した。

実施項目 2 においては、レクチンチップの輝度バラツキを実用上問題ないレベルまで低減するための各種技術を開発・検証することで、レクチンチップの信頼性確保を実現した。

実施項目3においては、レクチンチップを輸送に適した「乾式保存」包装した状態で、 ユーザー先で1年間の保存に耐えるための各種技術を開発し、1年保存後もレクチン活性 の低下幅が実用上問題ない範囲に収まることを確認した。

実施項目 4 においては、レクチンチップを自動的にスキャンし、未分化スコアまでを自動出力する蛍光検出システムの開発を行った上で、産総研におけるシステム性能検証を完了した。

上記の諸成果は、本研究開発事業終了後の「レクチンチップ分析システム」の迅速な製品 化に結び付く。

(2) 創出可能な製品の種類

今回の研究開発成果に基づき、細胞分化能検出・評価キットとしての「高品質レクチンチップ」と「高感度蛍光解析システム」の製品化が可能となった。

本システムを用いることで、ユーザーは 3 時間以内に 96 検体の被験細胞試料に対して「細胞の未分化スコア」を迅速かつ簡便に取得でき、「細胞の未分化能」の有無を判定できる。

今回開発されたシステムは「幹細胞の効率的な確保技術」、「様々な状態が混在する細胞集団からの優良な幹細胞の選別技術」、「品質を維持・管理しながら培養する技術」など、幅広い産業分野の発展に寄与するものと期待される。

(3) 今後の事業化展開

今回の研究開発成果を盛り込んだ「レクチンチップ」と「高感度蛍光解析システム」については、平成30年度前半にも販売開始予定であり、現在準備を急ピッチで進めている。

製品化後は従来の機器販売ルートを通じた販売を行いながら、川下企業と共同でのニーズ開拓や営業活動を継続して行きたい。

また川下企業からの要望・フィードバック情報に対応する形での小規模な改良も 随時実施していく予定である。 補足資料:専門用語等の解説

未分化細胞:

未分化細胞は適切に誘導を行うことで様々な細胞を得ることができる多能性を有

する細胞であり、薬効評価や再生医療への応用など、生命科学や医療分野への貢献

が大きく期待されている。中でも iPS 細胞(人工多能性幹細胞)は、皮膚等の組織

から作製可能で倫理的な障壁が低く、有用な細胞源として期待されている。一方

で、ヒト幹細胞の産業利用を行うためには「品質の確保されたヒト幹細胞の安定的

な大量供給」を可能とするための様々な基盤技術の確立が必要であるため、世界中

で研究が行われている。

造腫瘍性(tumorigenicity):

移植細胞が増殖することにより腫瘍を形成する能力をいう。ヒト iPS 細胞やヒト

ES 細胞は元来、奇形腫形成という造腫瘍性を有しているため、製品段階での残留

が医療用途利用上の問題となる。

レクチン:

糖鎖と結合する能力を有するタンパク質の総称。様々な動植物からの抽出品が市

販されている。

糖鎖:

生体内に存在する糖の部分を鎖に見立てたもの。癌の感染症をはじめとする様々

な病気にも関与しており、病態の解明や新薬の開発を目的とした研究が進められて

いる。

CV 値:(coefficient of variation 変動係数)

標準偏差を平均値で割ったもの。単位のない数で、相対的なばらつきを表す。

38