

平成31年度

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

「細胞集団分離機能及び蛍光と形態判断に基づき自動で高精度に細胞単離ができる機能を兼備した安価な革新的装置の開発」

研究開発成果等報告書

令和2年5月

担当局 関東経済産業局

補助事業者 公益財団法人千葉県産業振興センター

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
1-2 研究体制 (研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者)	3
1-3 成果概要	5
1-4 当該研究開発の連絡窓口	6

第2章 本論

2-① 連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合の課題への対応	7
2-② 蛍光シグナル及び形態的判断により細胞の吸引・保持・吐出を自動制御するソフトウェア の開発の課題への対応	13
2-③ 連続密度勾配遠心機能の分離精度、安定性および回収効率の向上の課題への対応	16

第3章 全体総括

3-1 複数年の研究開発成果	18
3-2 研究開発後の課題	20
3-3 事業化展開	20

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

1-1-1 研究開発の背景・目的

次世代シーケンス技術の出現により細胞の様々な情報が解析できるようになった結果、従来の概念とは異なり、1細胞から増殖した細胞集団は、同一細胞でも形質は経時に細胞間で大きくバラつくことが分かってきた。例えば、同じがん細胞種でありながら、ある濃度の抗がん剤が効く細胞と効かない細胞が存在する。その抗がん剤が効くか効かないかの原因を探求するため、1細胞単位でゲノム情報の網羅的解析をする必要性が生じてきた。その他にも、抗体医薬開発、再生医療分野、糖尿病、アレルギー、アルツハイマーなどの病気の解明にも、1細胞解析技術が必要不可欠になってきた。それに伴い全世界規模で1細胞解析研究が急激に発展しており、細胞単離装置としては手動操作型で処理能力の低い1000万円以下のローエンド製品と、自動操作型で処理能力の高い高額なハイエンド製品が市場に出回っているが、大半は数千万円する非常に高価な装置である為、研究資金を潤沢に持っているユーザーしか購入できないのが現状である。

本研究開発ではこれらの問題点を鑑み、連続密度勾配により細胞群をわずかな比重差でも分離できる遠心分離装置と、微量の液体を吸引・吐出可能な小型ピペット装置を統合し、蛍光及び形態判断に基づき、高精度に目的細胞を単離できる安価な自動装置（図1）の開発を行った。

1-1-2 研究概要

本研究開発では、現在ネッパジーン（株）が販売している微量の液体を吸引・吐出可能な小型ピペットの技術及び平成26年度戦略的基盤技術高度化支援事業採択プロジェクト（以下、平成26年度サポイン事業）、研究開発テーマ名「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」で株式会社ターナスが開発した連続密度勾配により細胞群をわずかな比重差でも分離できる遠心分離技術を基盤技術としている。

当技術を基に研究開発を行うにあたっては、①「2つの装置を統合することにより、遠心による細胞集団の分離からピッキングによる1細胞の単離までを一貫して行う」、②「蛍光シグナル及び形態的判断によって細胞を判別し、対象となる細胞のみを自動的に単離する」、③「遠心分離によって対象となる細胞を含んだ細胞集団を安定的に分離し、単離効率を向上させる」ことをテーマとして、試作・研究開発を行った。

【本開発技術組み合わせ】

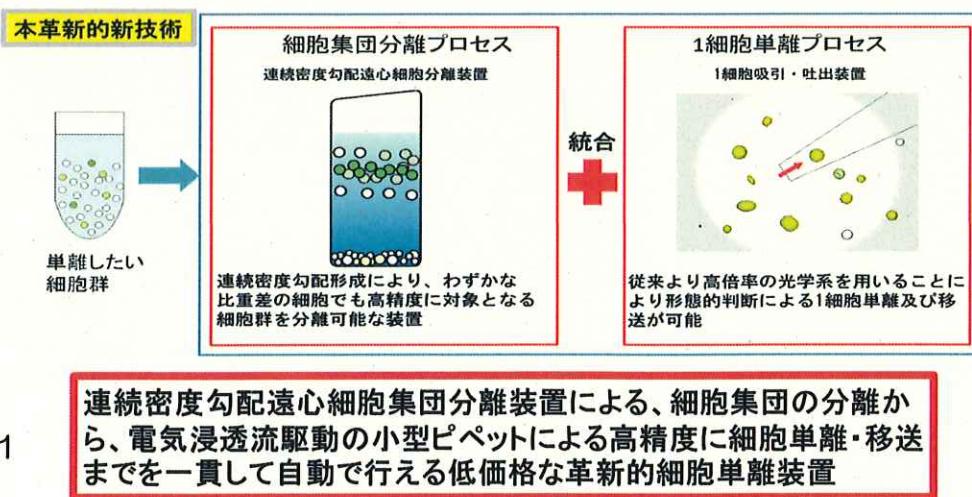


図1

1-1-3 目標

本研究開発は3つのサブテーマから構成されており、以下の各サブテーマでの目標を設定した。

1-1-3-① 連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合の課題への対応

1-1-3-①-1 低価格かつ高分解能な自動ピッキング装置駆動部の開発

連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合装置プロトタイプを開発する。

技術目標としては、(1)駆動分解能 $10\text{ }\mu\text{m}$ 、(2)細胞検索範囲 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ 、(3)吐出駆動範囲 $126\text{mm} \times 85\text{mm}$ 以上、(4)集団分離から細胞単離までの分離プロセスを1ステップで行うことのできる仕様とする。

1-1-3-①-2 広域探索と高解像度を両立させる光学系および駆動系の設計試作

高倍率と低倍率のレンズを組み合わせ、効率よく目的とする細胞を見つけ出す機構を開発する。

技術目標としては、(5)広域探索用の低倍率レンズが10倍(H29年度5倍変更)、(6)細胞形態確認用の高倍率レンズが20倍の倍率とし、(7)選択的単離率90%以上を目指す。

1-1-3-② 蛍光シグナル及び形態的判断により細胞の吸引・保持・吐出を自動制御するソフトウェアの開発の課題への対応

1-1-3-②-1 1細胞吸引・吐出自動制御ソフトウェアの開発

連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合装置プロトタイプに対応したソフトウェアを開発する。

技術目標としては、小型ピペット先端からの自然吐出を抑制し、①高精度で正確な細胞単離を行うことを目指す。

1-1-3-②-2 細胞の蛍光強度および形態による判断が可能な画像処理ソフトウェアの開発

1細胞吸引・吐出装置試作機及び細胞を用いて、広範囲探索用低倍率レンズで、主に蛍光情報を基に目的細胞の候補の位置を取得し、併せて細胞形態観察用高倍率レンズにより形態的判断を行うことで、目的細胞のより正確かつ選択的な単離を実現するためのデータを収集する。さらに、これらの画像情報を解析し、目的細胞であるかどうかの判定を行うアルゴリズムを開発する。

技術目標としては、②選択的細胞単離率90%以上を目指す。

1-1-3-③ 連続密度勾配遠心機能の分離精度、安定性および回収効率の向上の課題への対応

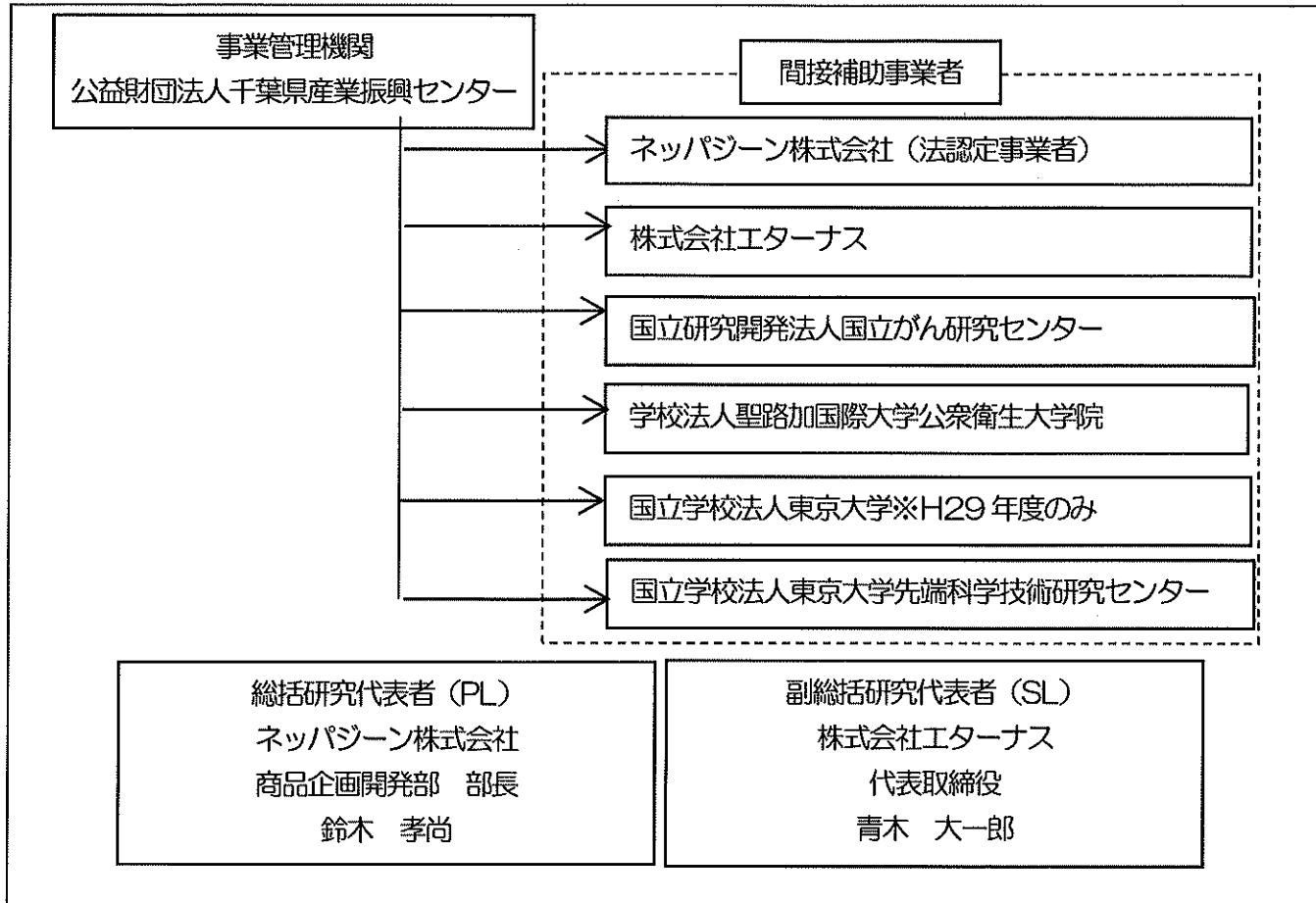
1-1-3-③-1 遠心分離チップの分離精度、安定性および回収効率の向上

遠心分離チップの再設計および半量産試作を行う。

技術目標としては、①連続密度勾配CV値：8%以内の達成、②比重マーカー精度：0.004以内、③目的細胞の存在比率の上昇率：10倍以上を達成を目指す。

1-2 研究体制

1-2-1 【研究組織・管理体制（全体）】



1-2-2 研究者氏名

ネッパジーン株式会社

氏名	所属・役職	実施内容（サブテーマ）
鈴木 孝尚	商品企画開発部 部長	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
栗原 欣也	商品企画開発部 係長	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
渥美 優介	商品企画開発部 研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
中本 和希	商品企画開発部	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】

株式会社エターナス

氏名	所属・役職	実施内容（サブテーマ）
青木 大一郎	代表取締役	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
鈴木 渉	研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
八色 伸一	研究員	【①-1、2】【②-1】
青木 清乃	研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】

国立研究開発法人国立がん研究センター

氏名	所属・役職	実施内容（サブテーマ）
大木 理恵子	研究所 基礎腫瘍学ユニット・独立ユニット長	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】

学校法人聖路加国際大学公衆衛生大学院

氏名	所属・役職	実施内容（サブテーマ）
平家 勇司	生体医科学分野 教授	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
山平 真也	共同研究ラボラトリー 研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】

国立大学法人東京大学

氏名	所属・役職	実施内容（サブテーマ）
長棟 輝行	工学系研究科 教授	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】

国立大学法人東京大学先端科学技術研究センター

氏名	所属・役職	実施内容（サブテーマ）
山口 哲志	先端科学技術研究センター 准教授	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
大橋 友紀	先端科学技術研究センター 研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
細金 剛	先端科学技術研究センター 研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
小阪 高広	先端科学技術研究センター 研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】
山岡 未知	先端科学技術研究センター 研究員	【①-1、2】【②-1、2】【③-1】

1-2-3 協力者

アドバイザー

所属	協力内容
大塚製薬株式会社	本事業の性能およびその検証方法についての客観的助言
学校法人中村産業学園 九州産業大学	本事業の方向性、製品仕様、性能、安全性評価の客観的助言

1-3 成果概要

1-3-① 連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合の課題への対応

1-3-①-1 低価格かつ高分解能な自動ピッキング装置駆動部の開発

連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合装置プロトタイプを開発し、下記の通り当初の技術目標を達成した。

- ・吸引動作を安定させるために $2\mu\text{m}$ の駆動分解能を達成した。
- ・微動ステージの採用により $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ の細胞検索動作を達成した。
- ・マイクロウェルプレート($126\text{mm} \times 85\text{mm}$)の全ウェルに吐出が可能であることを確認して、目標を達成した。
- ・移送機構とリモート制御ピペットの開発により、遠心分離から細胞のピッキングまでの一連の処理ができるようにして、目標を達成した。
- ・量産化の形態として筐体の設計を行った。
- ・光学系の構造を変更し、倍率切替動作の高速化と細胞画質の大幅な向上を達成した。

1-3-①-2 広域探索と高解像度を両立させる光学系および駆動系の設計試作

高倍率と低倍率のレンズを組み合わせ、効率よく目的とする細胞を見つけ出す機構を開発し、下記の通り当初の技術目標を達成した。

- ・広域検索用の低倍率(5倍)レンズ及び細胞形態確認用の高倍率(20倍)レンズの配置の工夫により、高画質での細胞観察を実現した。

1-3-② 蛍光シグナル及び形態的判断により細胞の吸引・保持・吐出を自動制御するソフトウェアの開発の課題への対応

1-3-②-1 1細胞吸引・吐出自動制御ソフトウェアの開発

連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合装置プロトタイプに対応したソフトウェアを開発し、当初の技術目標を達成した。

- ・吸引・吐出に使用する小型ピペット装置に水を充填した際に電圧をかけていなくてもピペット先端から水が自然吐出され基準電圧が安定しなかった。その自動制御が困難になる問題を解決するために自然吐出を抑制するサイフォン機構の開発と改良を行った。
- ・自然吐出抑制効果により、細胞を移動させずに $2\mu\text{m}$ の精度でターゲット位置に細胞が来るようにキャピラーを接近可能となり、位置精度と自然吐出抑制により吸引以降の電圧操作の安定化を実現した。

1-3-②-2 細胞の蛍光強度および形態による判断が可能な画像処理ソフトウェアの開発

1細胞吸引・吐出装置及び細胞を用いて広範囲探索用低倍率レンズで、主に蛍光情報を基に目的細胞の候補

の位置を取得し、併せて細胞形態観察用高倍率レンズにより形態的判断を行うことで、目的細胞のより正確かつ選択的な単離を実現するためのデータを収集し、さらに、これらの画像情報を解析し、目的細胞であるかどうかの判定を行うアルゴリズムを開発し、下記の通り当初の技術目標を達成した。

- ・低倍率レンズと高倍率レンズの配置の変更により、低倍率の蛍光画像と高倍率の実画像の位置情報の精度が向上した。
- ・細胞の蛍光強度による候補細胞の絞り込みと、形態解析による確認を行う基本的なアルゴリズムを開発した。
- ・蒸発を大幅に抑制する容器を開発し、動作の安定化および動作中のピンボケの防止に成功した。
- ・PEG 脂質を用いた細胞の配列化とピッキング条件の検討を行った。
- ・照明光源の選定を行い、波長および強度の最適化を実現した。
- ・最適な細胞密度を実験的に決定し、選択的単離率90%以上という目標値を達成した。

1-3-③ 連続密度勾配遠心機能の分離精度、安定性および回収効率の向上の課題への対応

1-3-③-1 遠心分離チップの分離精度、安定性および回収効率の向上

遠心分離チップの再設計および半量産試作を行い、下記の通り当初の技術目標を達成した。

- ・遠心分離チップの再設計および半量産試作を行い、遠心分離の条件検討を行い、連続密度勾配CV値 8%以内を達成した。
- ・比重マーカーの精製・評価検討を行い、精度 0.04 以内を達成した。
- ・遠心分離チップ内の処理を検討し、細胞の吸着による回収率の低下を防止することに成功した。
- ・比重のみで比率を高めることが困難なアプリケーションについては抗体ビーズを用いた遠心分離によるネガティブセレックションまたはポジティブセレックションを行うことにより、目的細胞の存在比率を大幅に向上できることを確認した。
- ・上記により、目的細胞の存在比率 10 倍以上を達成した。
- ・遠心分離確認用装置を開発し、遠心分離条件の最適化を検討できるようにした。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

ネッパジーン株式会社

商品企画開発部 部長

鈴木 孝尚

TEL : 047-306-7222 FAX : 047-306-7333

e-mail : suzuki@nepagene.jp

第2章 本論

前章で述べた研究課題に対して3年間に渡り研究を推進した結果、具体的に以下の成果をえることが出来、当初の目標を達成した。

2-① 連続密度勾配遠心細胞集団分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合の課題への対応

2-①-1 低価格かつ高分解能な自動ピッキング装置駆動部の開発

<平成29年度>

XY 駆動分解能 $10\mu\text{m}$ および細胞検索範囲 $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ という技術目標を達成するため、自動ピッキング装置単体としての駆動部（図2）の開発を行い、試作機が完成し以下の技術目標の達成した。

試作1号機



図2 自動ピッキング装置単体としての駆動部

(1) 駆動分解能： $10\mu\text{m}$ の達成

血球計算盤を用いて駆動分解能を評価した結果（図3）、技術目標である駆動分解能： $10\mu\text{m}$ を達成した。

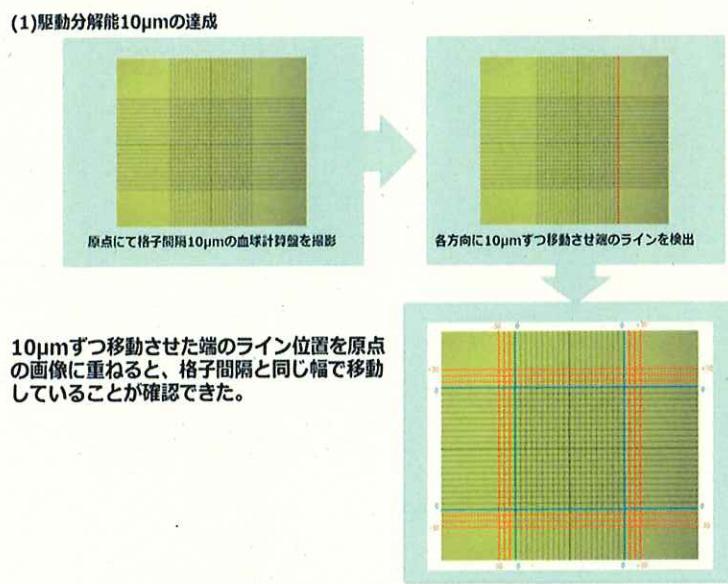


図3 血球計算盤を用いて駆動分解能を評価した結果

(2) 他細胞検索範囲：10mm×10mm の達成

血球計算盤を用いて細胞検索範囲を評価した結果（図4）、他細胞検索範囲：10mm×10mmを達成した。同時に、高い駆動分解能が必要ではない細胞検索範囲外には安価な駆動系を採用できる設計で、低コスト化の目途も立てることができた。

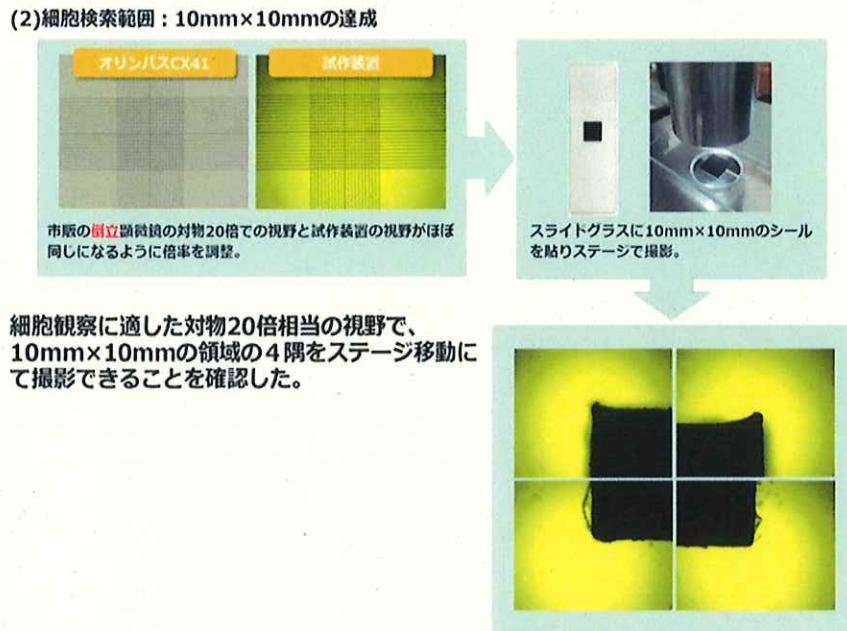


図4 血球計算盤を用いて駆動分解能を評価した結果2

<平成30年度>

遠心分離装置と1細胞吸引・吐出装置間で細胞集団の移送を行うために必要な移送装置を開発することにより、遠心分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合装置プロトタイプ（図6）を試作した。当初は直動のみで移送を行う予定であったが、遠心分離装置内部に移送しやすいことから、直動軸に加えて回転軸も追加して対応した。その統合装置を用いて、以下の技術的目標(1)～(4)の達成した。

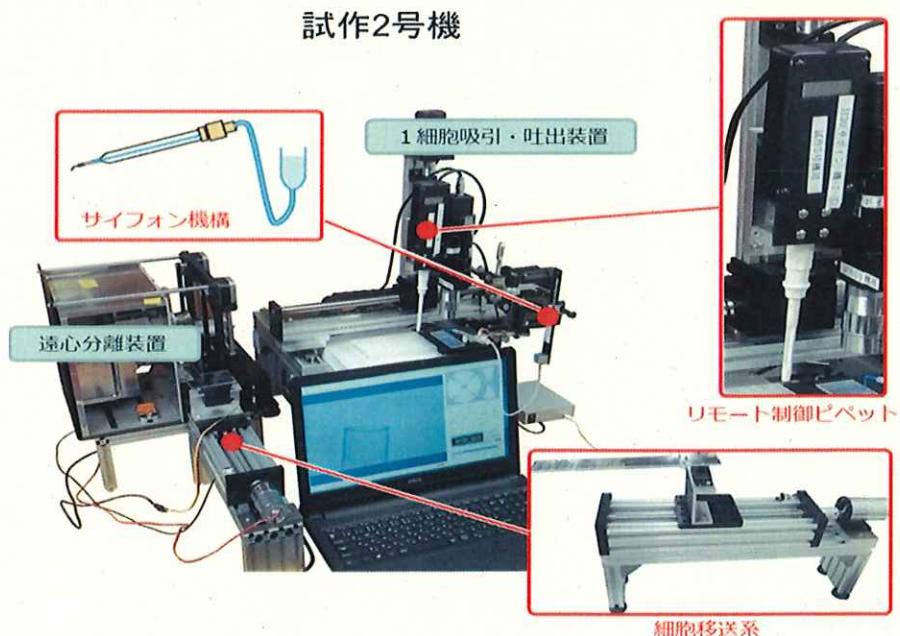


図6 遠心分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合装置プロトタイプ

(1) 駆動分解能：10 μm

昨年度に統合前の装置にて達成した目標値であるが、電気浸透流ポンプの安定性を検討する中で、細胞と吸引器具（ガラスキャピラリー）との位置精度が非常に重要であることがわかり、さらに高精度化を図ることにした。統合装置プロトタイプを用いて、前後左右にステージを2 μmずつ移動させ、10 μmの粒子の変位量を画像で確認したところ、粒子サイズの1/5 (=2 μm) 程度の精度でステージが移動（図7）できていることが示された。

駆動分解能：10μm → 吸引精度のため2μmに向上

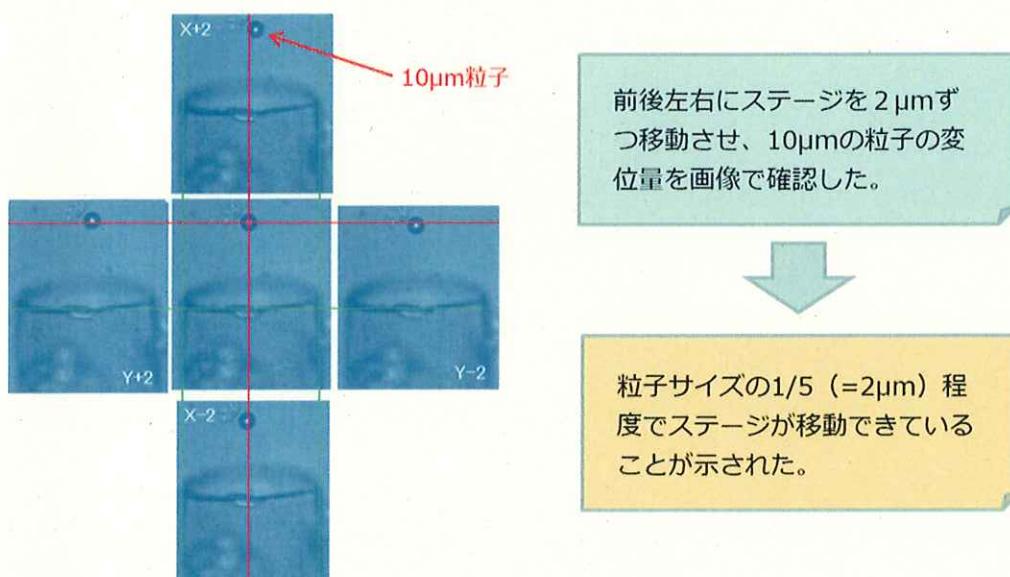


図7 粒子サイズ1/5 (=2 μm) 程度の精度でステージが移動

(2) 細胞検索範囲：10mm×10mm

微動ステージにより10mm×10mmの範囲を検索する動作は昨年度に達成しており、今年度開発の統合装置においても方式は同一であることから、技術目標を達成した。

(3) 吐出駆動範囲：126mm×85mm以上

統合装置にてマイクロウェルプレート（126mm×85mm）の全ウェルに吐出が可能であることを確認できたため、技術目標を達成した。

(4) 単離プロセス：1ステップ

移送機構とリモート制御ピペットの開発により、遠心分離から細胞のピッキングまでの一連の処理ができるようになり、技術目標を達成した。

【その他の成果】

- ・遠心で濃縮・回収した細胞群を試作容器に出し、1細胞吸引に適した濃度に希釈するリモート制御ピペットを開発した。リモート制御ピペットは既存の電動ピペットの各操作ボタンに配線を行い、PCソフトウェアからの指示に応じてボタン操作をON/OFFする制御基板を開発することで、想定内の期間とコストで目的を達成した。

- ・1 細胞吸引・吐出動作を安定化させるために電気浸透流ポンプの特性を詳細に調査したところ、電気浸透流ポンプの原理および構造に起因する現象として、電圧を印加しない状態でも重力の作用により、ポンプに水を充填した後はしばらく自然に吐出が起きてしまう問題への対処が重要であることがわかった。この状態で電気浸透流ポンプの先に接続されたガラスキャピラリーを目的細胞に接近させると、自然吐出により細胞を移動させてしまうため、安定した吸引ができない状況になる。この現象を抑制するために自然吐出を抑制する改良を行った。

<平成31年度>

令和元年度は、昨年度までの成果を活かし統合装置の量産化設計と量産プロトタイプ装置(図8)を試作する。その量産プロトタイプ装置を用いて、以下の技術目標の達成した。

(7) 単離効率：選択的単離 90%以上

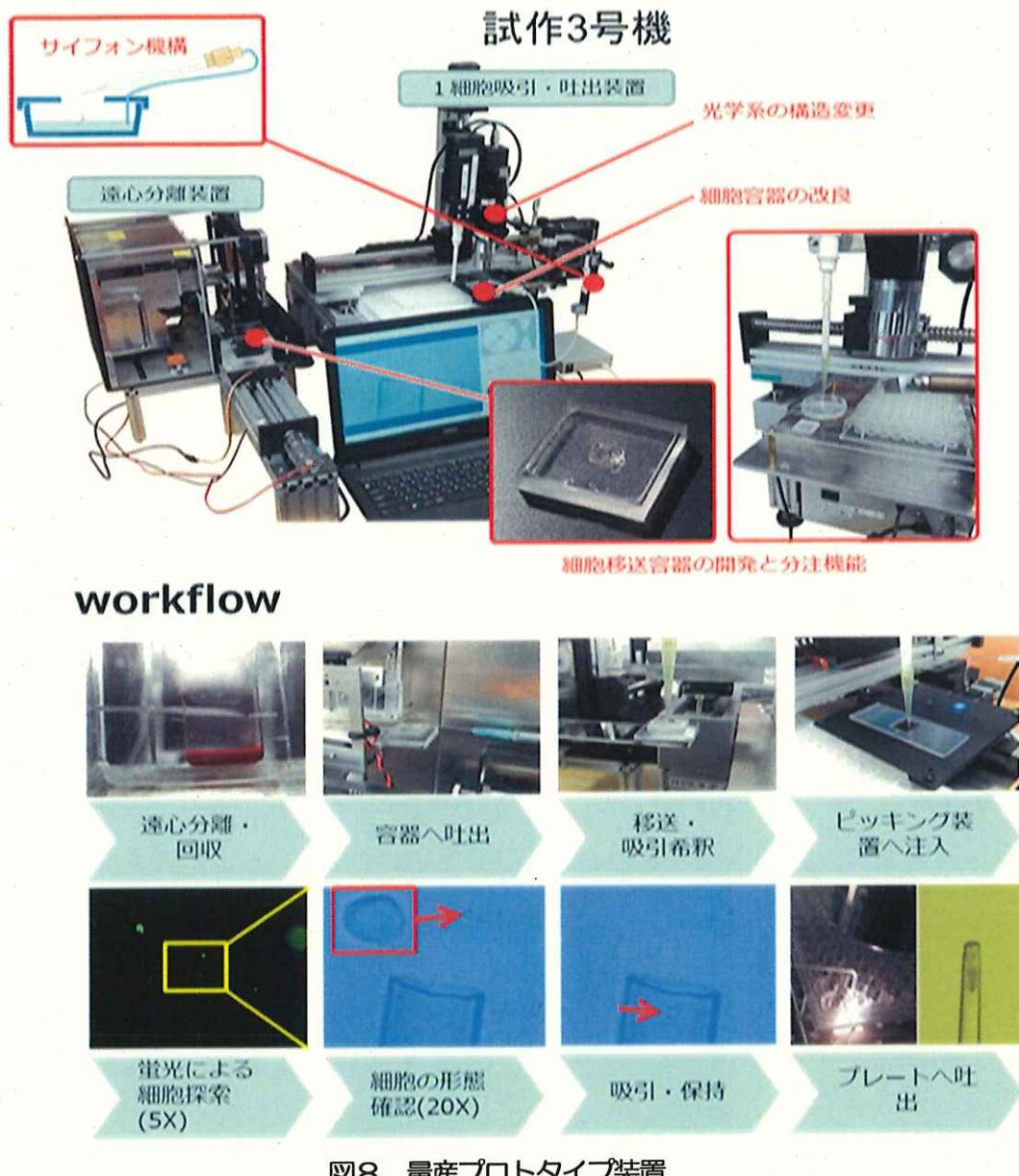


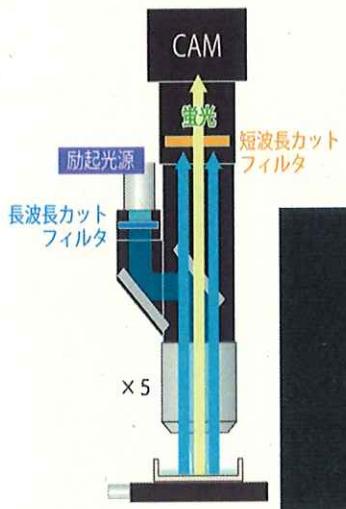
図8 量産プロトタイプ装置

【その他の成果】

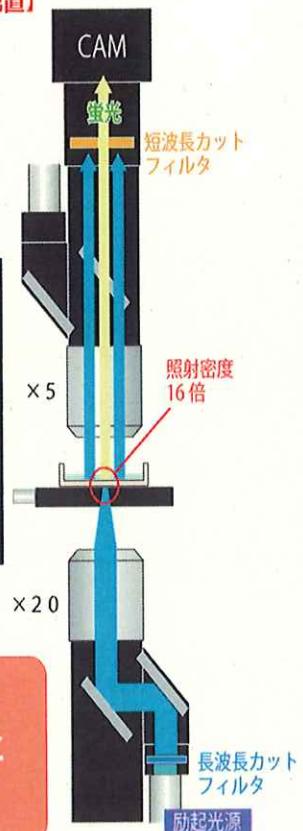
- ・光学系の構造の変更による全体的な改善を行い、同じ励起光源を低倍率($\times 5$)から高倍率($\times 20$)側へ配置の工夫(図9)をすることで、単純計算で照射密度は16倍になり、蛍光感度は大きく上昇することがわかり、蛍光観察性能が更に向上了り、白色光源が低倍率側に配置されることで、低倍率の明視野像の明るさのムラが改善、白色光源が低倍率光学系に追従するためピッキングと吐出の両プロセスで利用でき、プレート吐出確認用の白色パネル光源が不要になり、低コスト化を実現した。

蛍光用照明の配置変更

【従来の配置】



【改良配置】



同じ励起光源を低倍率（×5）から高倍率（×20）側へ配置変更することで、単純計算で照射密度は16倍になり、蛍光感度は大きく上昇することがわかり、蛍光観察性能が更に向上した。

図9 同じ励起光源を低倍率（×5）から高倍率（×20）側へ配置の工夫

2-①-2 広域探索と高解像度を両立させる光学系および駆動系の設計試作

＜平成29年度＞

技術目標(5)(6)についてはまず光学系を組み込み、細胞撮影できることを確認した。

【その他の成果】

- ・ミクロメーター、ビーズおよび細胞の撮影を実施して、10倍率レンズが広範囲探索用に実装しても問題ないことを確認した。なお、吸引時の画像としては5倍の方がより適していることが判明した。
- ・20倍率レンズを用いて、ミクロメーター、ビーズ及び細胞の画像判定が可能になる条件を確定させるための基礎データを収集した。

＜平成30年度＞

目的細胞の広域探索は低倍率光学系による広い視野で実施し、実際にそれが目的細胞であるかどうかを高倍率光学系で細胞形態を確認することにより、高精度に目的細胞を回収するということが本製品の目指す特長となっている。昨年度は低倍率、高倍率の光学系を横に並べて配置し、これらの位置を交互に切り替えることで倍率の変更を行っていたが、倍率切替に時間がかかることによる時間処理能力の低下、倍率切替時の振動による細胞位置精度の

低下、細胞液槽からの蒸発に伴う液面変動による高倍率画像のピンボケといった課題が生じた。

これらの課題を解決するには、個別に対策を行うのではなく、高倍率光学系を下方に配置した倒立型の構成（図10）にするのが最も効率的であると判断し、下図のように設計変更を実施した。これにより、まず倍率切替のための移動時間がなくなり、時間処理能力が大幅に向上した。また、倍率切替時の振動もなくなったことから、細胞移動による精度の低下も生じなくなった。さらに、被写界深度の小さい高倍率光学系は細胞液槽の底側から常にピントが合った状態で撮影できるようになり、蒸発に伴うピンボケが発生しなくなった。

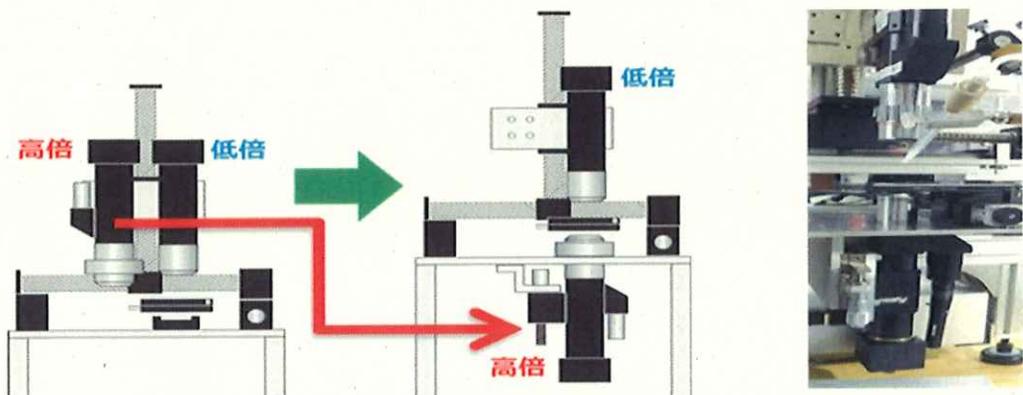


図10 高倍率光学系を下方に配置した倒立型の構成

・高倍率レンズと低倍率レンズの配置の工夫により、細胞の輪郭が明瞭になり、細胞内部の濃淡の様子も画像として捉えることが可能になった。

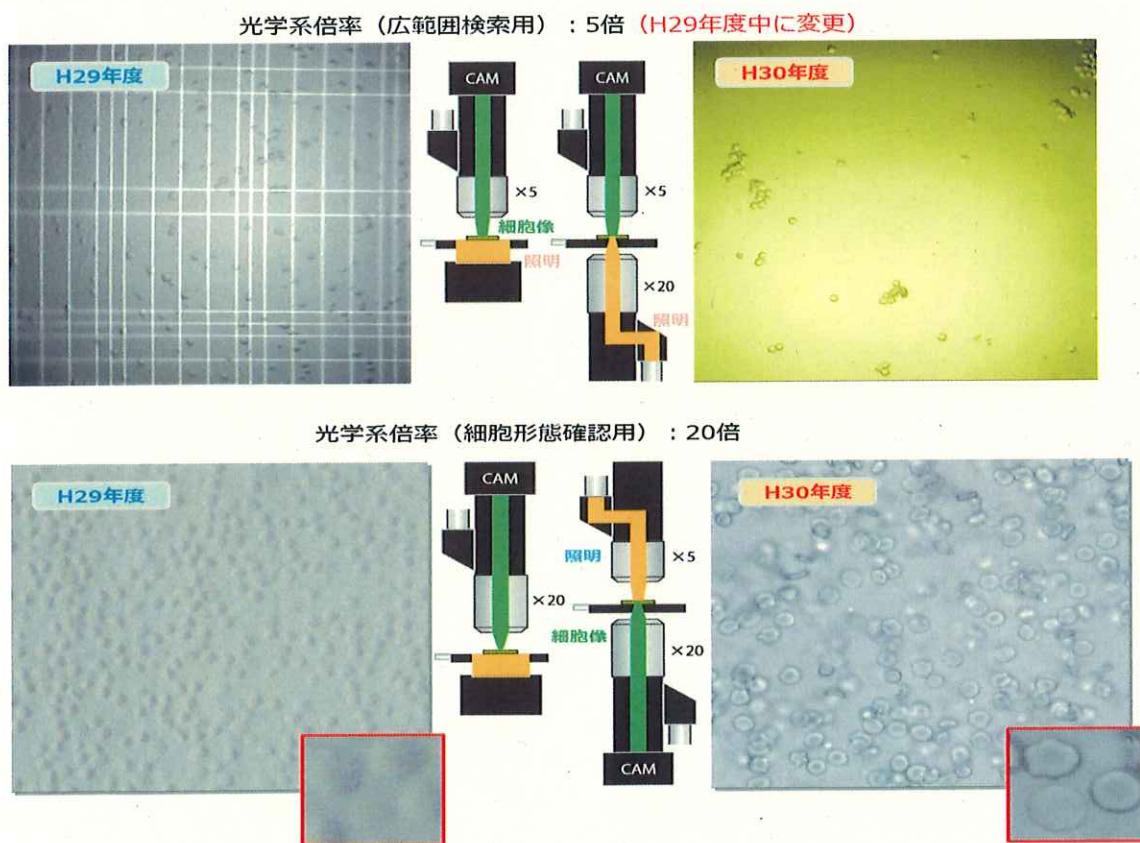


図11 高倍率レンズと低倍率レンズの配置の工夫により、細胞の輪郭が明瞭

2-② 蛍光シグナル及び形態的判断により細胞の吸引・保持・吐出を自動制御するソフトウェアの開発の課題への対応

2-②-1 1細胞吸引・吐出自動制御ソフトウェアの開発

<平成29年度>

PC制御可能な電気浸透流ポンプ駆動基板と電圧ロギングソフトの開発に成功した。次年度以降に実施する自動化のために必要なデータを、ビーズや細胞を用いて細胞の大きさと電圧との相関性を評価した結果、正確な単離条件のログの取得ができる、技術目標を達成できる目途を付けた。

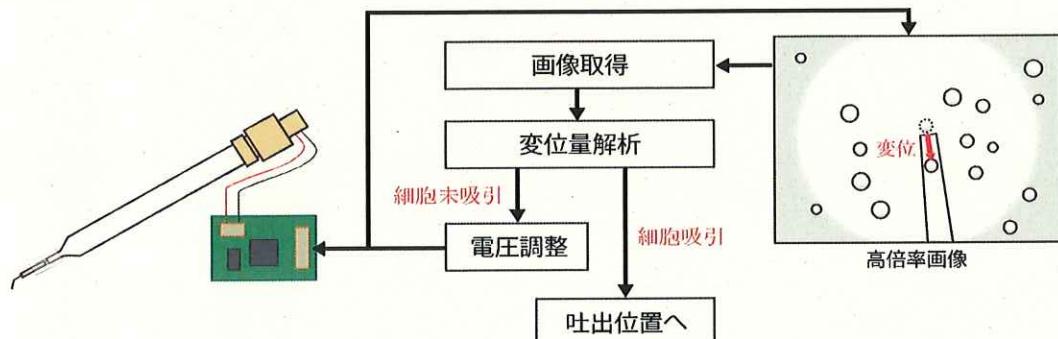


図1-2 PC制御可能な電気浸透流ポンプ駆動基板と電圧ロギングソフト

<平成30年度>

遠心分離装置と1細胞吸引・吐出装置の統合のため、今年度開発した細胞移送装置とリモート制御ピペットを必要なタイミングで制御する機能を開発し、ソフトウェアに組み込んだ。また、1細胞を正確に吸引するために、あらかじめターゲット位置を設定し、吸引したい細胞を画像で指定すると、その細胞がターゲット位置に来るようステージを移動させ、吸引以降の電圧を出力する機能を追加した。それにより、以下の技術的目標の達成した。

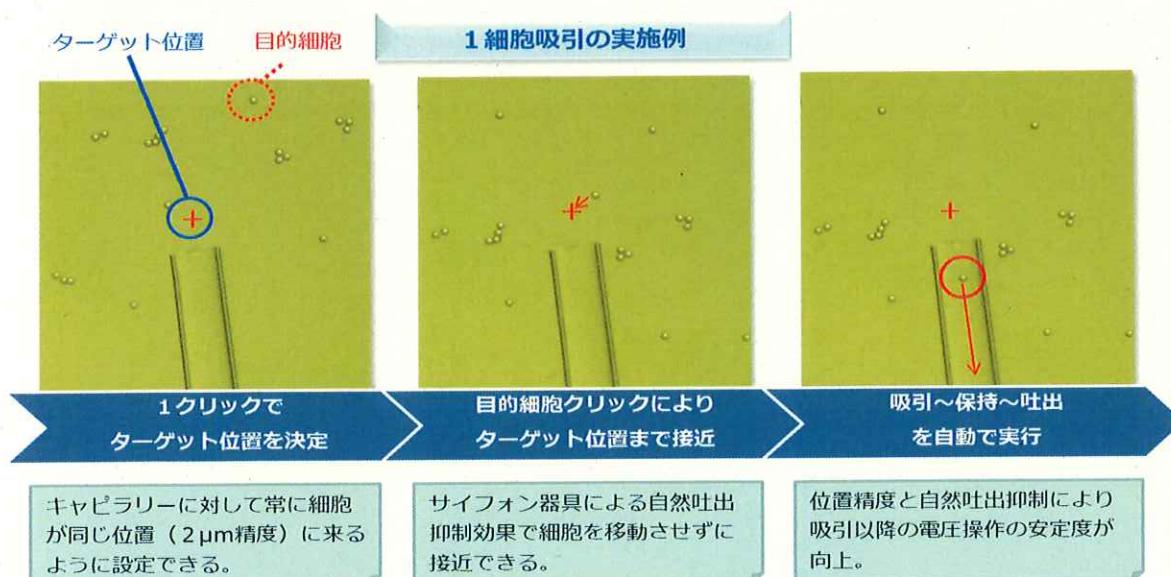


図1-3 正確に細胞単離する1細胞吸の実施例

下記の技術的目標については、上記の通り一連の処理が可能になったこと、及び、正確な位置制御が可能になったことにより達成した。

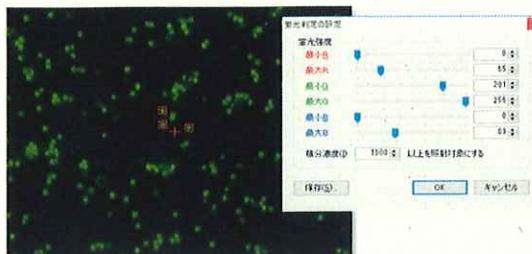
(1) 単離精度：正確な細胞単離

2-②-2 細胞の蛍光強度および形態による判断が可能な画像処理ソフトウェアの開発

＜平成30年度＞

今年度は蛍光画像に対して色味と輝度の範囲を設定し、この条件を満たす細胞候補を、キャピラリーに近いものから指定個数分だけ検索する機能を開発し、細胞の蛍光強度及び形態判断に使用するデータを収集した。

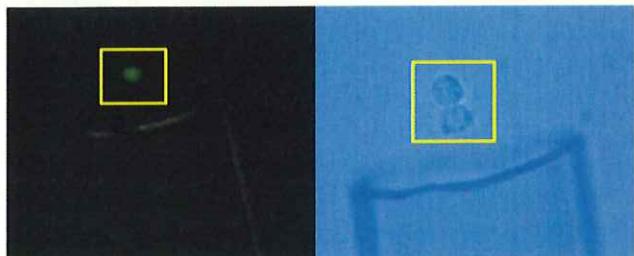
蛍光画像による目的細胞候補の絞り込み



蛍光量の条件を設定し、それを満たすものでターゲット位置から近い細胞候補を絞り込むアルゴリズムを開発した。

表面が蛍光染色されている場合への対応やサイズ判定などが今後必要となる。

細胞形態および個数による吸引可否の判定



蛍光画像では細胞1個のみが映っているが、明視野像で観察すると複数個存在する場合がある。

このような細胞を誤って吸引しないように画像で判定する必要がある。

図14 蛍光画像の範囲設定と細胞形態および個数による吸引可否の判定

次年度の目標を達成するために形態的判断についても血球細胞をまず対象として、画像解析方法を検討した。細胞検出アルゴリズムとしては、テンプレートマッチング法、輪郭外周検出法、輪郭内周検出法の3つを検討し、血球細胞の検出においては、輪郭内周検出法であれば細胞が隣接していても、個々の細胞の種類まで検出できることがわかった。

(2) 単離率：選択的単離90%以上 ※次年度達成技術目標

細胞画像からの形態判断

血球画像からの細胞の検出および細胞の種類の判定が可能であるかを検討した。

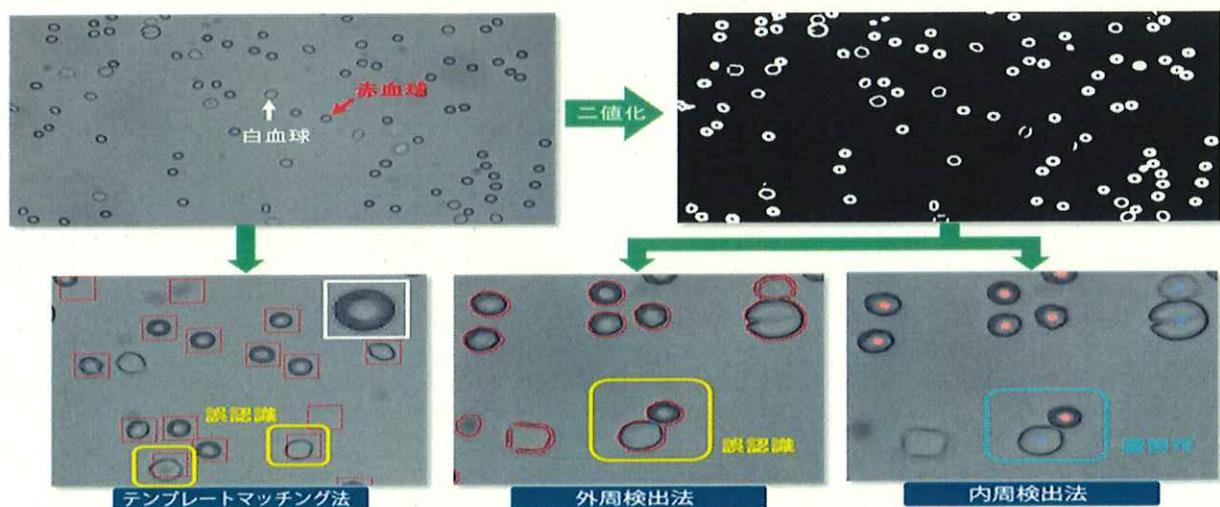


図15 画像解析方法を検討

<平成31年度>

蒸発抑制機能を有する細胞容器を開発した。具体的にはスライドグラスにシリコン枠を貼り付けた初期型では、蒸発抑制及び量産性に課題があったため、市販容器を改良することにより、蒸発を大幅に抑制した。また、部材数が減り、作製が容易になったため、ユーザーに安価で供給が可能となった。

追加課題： 蒸発抑制機能を有する細胞容器の開発

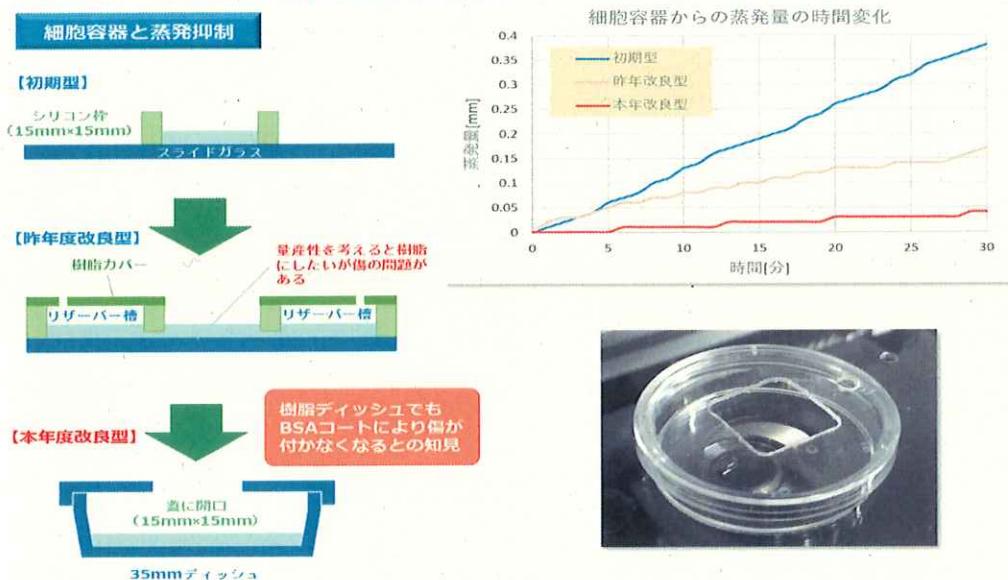


図16 蒸発抑制機能を有する細胞容器

照明器具の更なる改良として、蛍光励起光源を変更することにより、蛍光視野と明視野を低倍率で明瞭に観察でき、自動検出が出来るようになったため、より多くのパラメータを活用して細胞の検出が可能となった。

	蛍光視野	明視野	
光源	454nm		505nm
光路	高倍レンズ側	低倍レンズ側	
励起フィルター	光源側鏡筒内 + 微動ステージ側カセット	微動ステージ側カセット (高倍レンズからの反射を抑制)	
カメラ	低倍レンズ側	低倍レンズ側	高倍レンズ側
観察			
細胞検出(外周)			

蛍光視野と明視野を低倍率で明瞭に観察でき、自動検出も可能になった。

図17 照明器具の更なる改良（蛍光励起光源を変更）

細胞移送容器から細胞集団を回収・希釈し、吸引用の細胞容器に移送するソフトウェア機能の開発も完了し、一連の動作ができるようになり、以下の技術的目標の達成した。

(2) 単離率：選択的単離 90%以上

2-③ 連続密度勾配遠心機能の分離精度、安定性および回収効率の向上の課題への対応

2-③-1 遠心分離チップの分離精度、安定性および回収効率の向上

<平成29年度>

遠心分離チップの試作を行い、着色した比重液を用いて連続密度勾配のCV値を評価した。同時に密度勾配の評価の確認に必要な比重マーカーの作製も行い、技術目標値(2)比重マーカー精度：0.004以内を達成した。その結果、最も青色濃度が高い液面から色濃度が80%、50%、20%に変化する位置を比較すると、とくに色濃度が薄い高比重側ではらつきが大きくなる傾向（図18）が明らかになった。

(2)比重マーカー精度：0.004以内

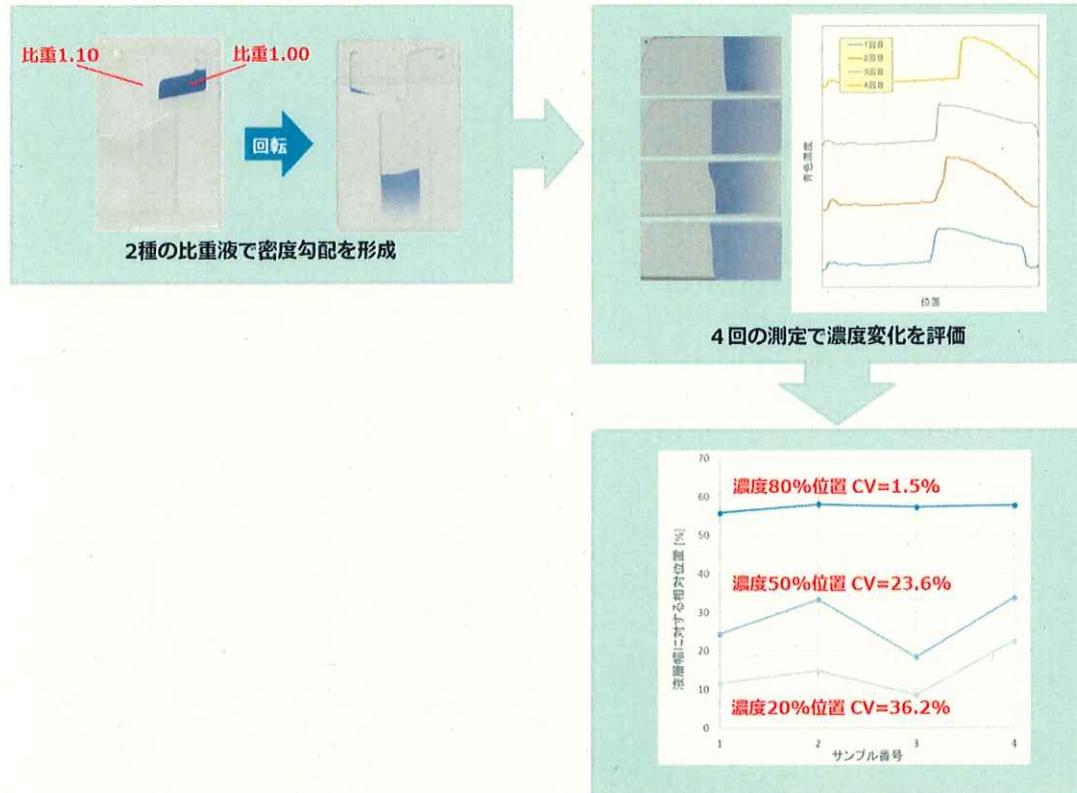


図18 色濃度が薄い高比重側ではらつきが大きくなる傾向例

親水化処理および比重選別を行ったマーカーは密度勾配中で再現性よく直線状に分布しており、比重のばらつきが想定通りに抑えられていることを確認した。上記の比重についてはほぼ目標を達成しているが、他の用途にも適用するため、異なる比重の粒子の選別を行った他、抗体を用いて比重を変化させる方法も検討した。

<平成30年度>

遠心分離チップの再設計および半量産試作を行い、下記の技術目標を達成した。

(1)連続密度勾配CV値：8%以内

特定の細胞に結合する抗体と、抗体に結合する高比重ビーズとを用いて「細胞-抗体-高比重ビーズ」という結合体を形成することにより、効率的に目的細胞を遠心分離法で集める方法を試みた。結果として、この方法により遠心分離後のチップ内の特定位置を回収することにより、比重差がなくても目的細胞を効率的に回収できることを実証（図19）した。

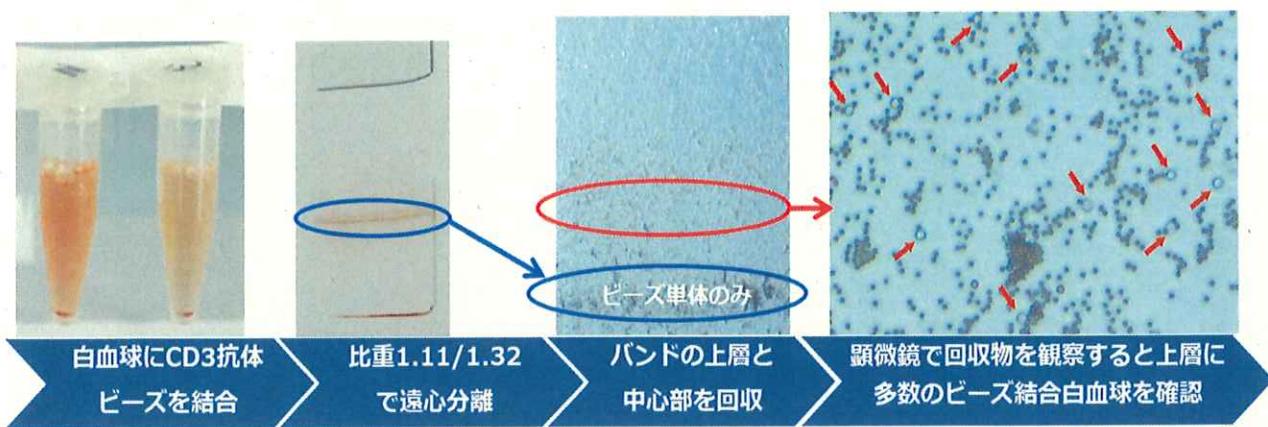


図19 比重差がなくても目的細胞を効率的に回収できることを実証例

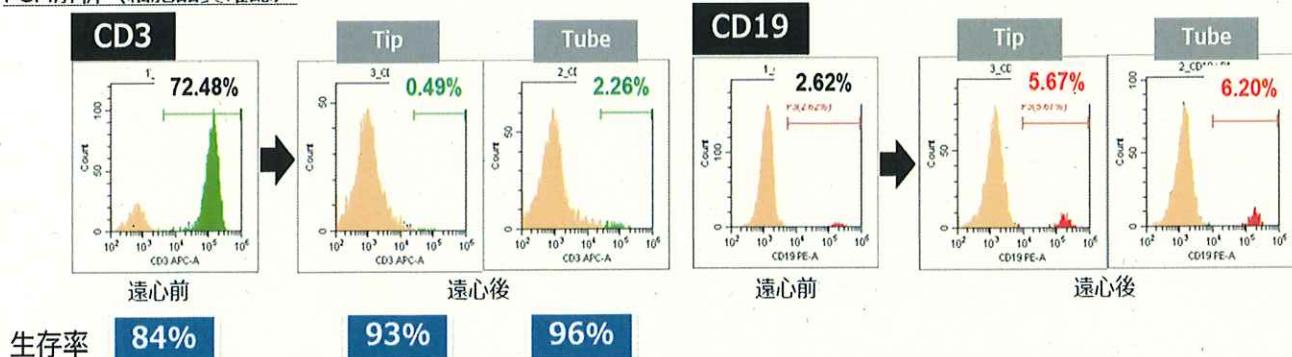
<平成31年度>

原理確認できたビーズ結合細胞の遠心分離を、遠心分離チップと市販の遠心分離チューブを用いてさまざまな細胞で行い、4種の細胞の分離アプリケーションへの応用が期待できることを確認した。また、追加検討で、遠心分離後のチップ内の細胞集団の分布確認用装置の製作をして、遠心したチップの全体像と目的の細胞集団を区別して同一視野で観察することができた。さらに注射針が細胞を回収する様子も観察することができた。

全血からのT細胞のネガティブセレクション

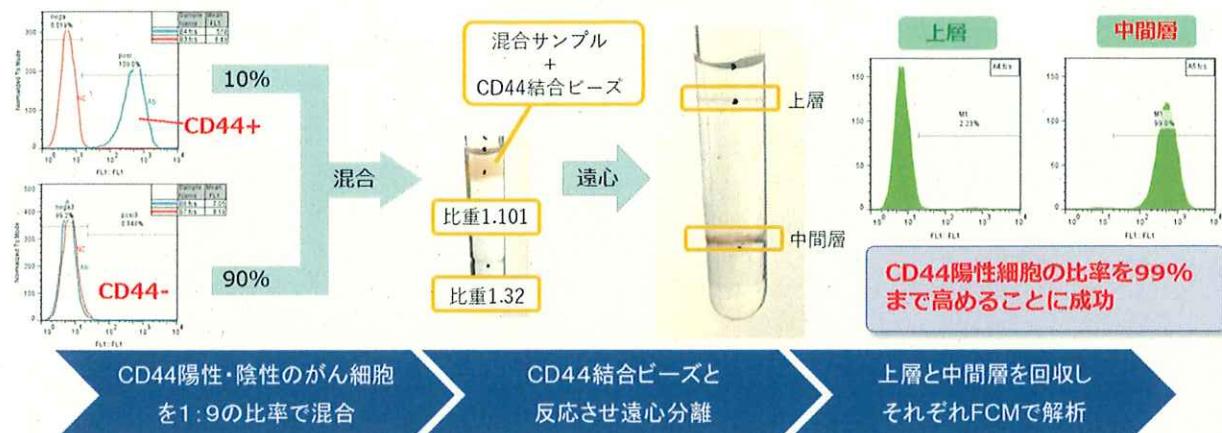


FCM解析（細胞品質確認）



CD3のネガティブセレクションによってCD3+細胞（T細胞）はほぼ全て除去され、CD19+細胞（B細胞）の比率が約2倍に增加了。またチップとチューブで回収率に差はなかった。以上により、遠心分離チップを用いたネガティブセレクション方法が確立された。

がん細胞集団からのCD44（がん幹細胞マーカー）陽性がん細胞のポジティブセレクション



ヒト血液から血液循環腫瘍細胞（CTC）を模した子宮頸がん細胞のセレクション

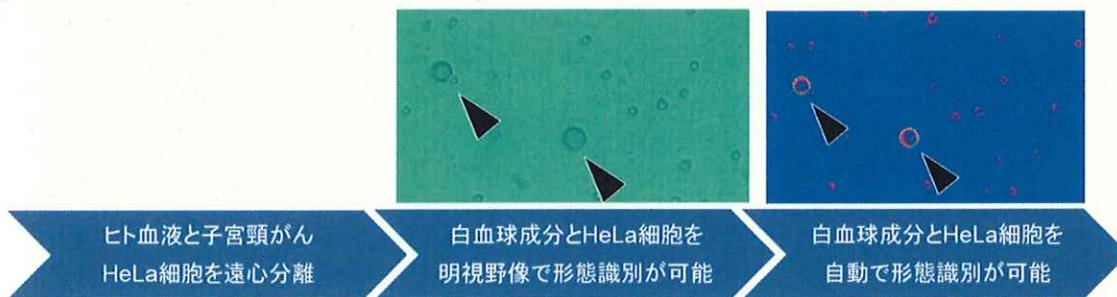


図20 4種の細胞の分離アプリケーションへの応用例

細胞培養等による回収後の細胞の品質評価を行い、下記の技術目的を達成した。

(3)目的細胞の存在比率の上昇率：10倍以上

第3章 全体総括

3-1 複数年の研究開発成果

本研究開発では、次世代シーケンス技術の出現により細胞の様々な情報が解析できるようになった事で、1細胞単位でゲノム情報の網羅的解析をする必要性が生じてきたため、目的となる細胞を自動で選択的に単離できる安価な装置の開発を行った。

駆動部においては、安価な3Dプリンタを流用した粗動ステージと細かく稼働する微動ステージを組み合わせることによって、目的細胞を発見するための検出範囲(10mm×10mm)、検出された細胞を追跡、ピッキングするための駆動分解能(10μm)、ピッキングした細胞を吐出位置まで移動させる駆動範囲(126mm×85mm)を達成した。また、遠心分離後の細胞集団を適切な濃度に希釈する機構を追加することによって、遠心分離から細胞単離までのプロセスを1ステップで行うことが可能となり、装置の統合化も進んだ。光学系においては、当初広範囲検索用の低倍率レンズ(10倍)と細胞形態確認用の高倍率レンズ(20倍)を上方に隣接させて配置する形式だったが、その後の検討により、低倍率レンズの倍率を10倍から5倍に変更し、高倍率レンズと低倍率レンズの配置の工夫により倍率変更時の時間処理能力低下、振動による細胞位置精度の低下、細胞液相からの蒸

発に伴う液面変動による高倍率画像のピンボケといった問題を解決した。また、レンズ鏡筒から同軸照明光を入射することで、細胞の輪郭が明瞭になり、細胞内部の濃淡の様子も画像として捉えることが可能になった。さらに、低倍率光学系と高倍率光学系を上下で対向させ、それぞれの撮影に用いる照明を対向する光学系から同軸入射させるように配置変更することで、倍率切替の高速化と画質の改善を実現した。

細胞吸引・吐出については、電気浸透流ポンプに電圧を印加することにより吸引・吐出を行うが、電圧制御を行なうソフトウェアの開発後、自動化を行うにあたってポンプからの自然吐出が問題となった。この対策としてサイフォン機構を利用した自然吐出抑制を実施することにより、これを改善した。改善後に1細胞を正確に吸引するためには予めターゲット位置を指定し、吸引したい細胞を画像で指定するとその細胞がターゲット位置に来るようステージを移動させ、電圧を出力する機能を追加した。

目的細胞の判別については、蛍光強度及び形態についての判断を行う画像処理ソフトウェアを開発した。当ソフトウェアにおいては細胞検出アルゴリズムを用いて、隣接している細胞でも個々の判断が可能となった。また、前述の光学系の改善によって、細胞を明瞭に観察できるようになり、判断に使用できるパラメータが増加した。更に、蒸発抑制機能を有する細胞容器を開発することで、ピントのズレに影響する蒸発を大幅に抑制した。

上記2つのソフトウェアを統合し、細胞移送、希釈用ピペットの制御機能を追加することで、遠心分離から細胞単離までを一貫して行うことのできる装置の制御ソフトウェアを開発した。

ピッキング前の細胞集団分離については、当初は比重マーカーを使用して、連続密度勾配遠心によって分離することを想定していたが、目的細胞が他の細胞の比重と重なっているために比重分離のみで比率を高めることが困難な場合の対処法として、抗体ビーズを結合させることにより、遠心を行った際に目的細胞を特定の比重に集めることに成功した。また、遠心分離に使用するチップの改良を行い、改良したチップを用いて4種の細胞アブリケーションでの遠心分離を行い、遠心後のチップ内の細胞集団の分布を観察できる装置を用いて、細胞が特定の位置に集まっていることを確認した。

この研究開発成果から派生したピッキング機能のみの製品を2019年11月にロンドンで開催されたシングルセル関係の学会（SynGen Series UK）で参考展示をした。多くの研究者が興味を持ち、うち10人の研究者がデモや発売する時期や価格などについて高い興味を示した。



本技術開発は、世界中の1細胞解析研究に多大な影響を与える日本発の国際競争力を持つ新規成長事業である。本技術が波及することにより、1細胞研究のレベルが底上げされるとともに、疾患研究が進展し、がん、糖尿病、アレルギー、アルツハイマーなどの病気の解明や、効率的な抗体医薬、診断医薬研究開発の推進が期待される。また、今後発展が見込まれる細胞バンク及び細胞培養受託施設が本技術を採用することにより、細胞製造の生産性の効率が改善され、今後再生医療により高品質な細胞が用いることができるようになり、さらに市場が拡大することが見込まれる。これにより、本技術が医薬開発や再生医療業界に及ぼす経済効果は計り知れなく、我が国の国際競争力が高められることにも繋がっていくことになるものと期待される。

3-2 研究開発後の課題

本事業の研究開発の成果をもとに、ピッキング装置、遠心分離装置、統合装置としての再設計・改良を行い、最終仕様が決定したら、製造コスト削減の検討をして、製造バリデーションを早急に行い、安定した量産化体制を構築して、2021年度販売を目標に順次製品化に向けての準備を行っていく予定である。同時に、早急に本開発で確立した要素技術を応用特許として出願する計画である。

3-3 事業化展開

本技術の有用性を実証して、短期間で周知徹底を図り、短期間で高シェアを実現する。更に顧客ニーズを把握

して、アプリケーション開発、プロトコルの最適化、適正な価格戦略を行い、更なる商品力の向上を目指す。

事業化体制

