

平成29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

「クライオ電子顕微鏡を用いたタンパク質単粒子解析法のための定膜厚試料
自動作製装置の開発」

研究開発成果等報告書

令和2年3月

担当局 経済産業省中部経済産業局
補助事業者 公益財団法人名古屋産業科学研究所

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
- 1-2 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

補助事業の具体的内容

- 【1.インクジェットの精密吐出量制御技術および吐出位置精密制御技術の研究】
- 【2.吐出液滴の広がりと薄膜化の促進技術の研究】
- 【3.吐出液滴の膜厚制御技術の研究】
- 【4.光学的手法による膜厚のその場計測技術の研究】
- 【5. 各機構の連動と自動化への対応】

最終章 全体総括

- 1. 研究開発成果
- 2. 研究開発後の課題・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

日本の医薬品の市場規模は 9 兆円、世界で第 2 位の大きさを誇る一方で、年間 1.3 兆円を超える輸入超過の状況にある。日本で開発された医薬品が世界に出回らず、さらに抗がん剤や糖尿病用薬などの開発は欧米の製薬会社が先んじており、輸入せざるを得ないためである。

一方で、安倍政権の成長戦略では医薬品を含む健康・医療産業を次世代の成長産業として位置付けており、日本の経済成長を牽引する産業への成長が期待されている。

医薬品業界における長年の恒常的な輸入超過の現状を打開し、世界に対する競争力を高めるためには創薬力の再生は必要不可欠である。そのため、本研究開発の川下である創薬分野からは創薬の要である研究開発を促進する、より効果的かつ効率的な装置や技術の開発が求められている。

表 1 日本の医薬品の輸出入額 (億円)

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
医薬品輸出額	3,677	3,721	3,744	3,799	3,844	3,787	3,590
医薬品輸入額	9,060	9,912	10,784	11,424	13,286	15,226	17,250
輸出超過額	△ 5,383	△ 6,191	△ 7,040	△ 7,625	△ 9,442	△ 11,439	△ 13,660

JPMA News Letter No.154(2013/03)「医薬品の輸入超過の実態」より引用

今日の創薬の探索研究では、疾病の原因となるタンパク質に結合して効果を示す化合物を探すために、数百万種に及ぶ化合物について実験を行う。その後、薬効が期待できそうな結果を示した化合物について、構造の一部を改変して異なる特性を持つ複数の化合物を新規に合成し、再び薬効を調べる (図 1)。この膨大な労力と時間がかかるプロセスが創薬の非効率性の大きな要因の一つである。

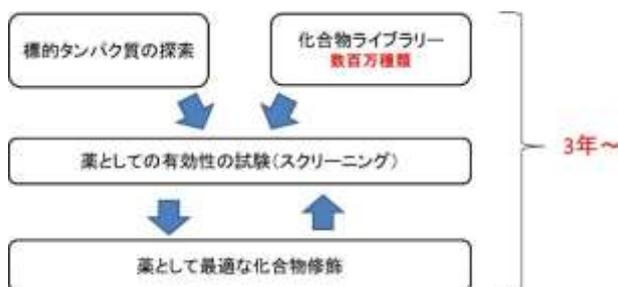


図 1 創薬における一般的な研究の流れ

各研究機関で貯蔵されている化合物 (化合物ライブラリー) と疾病の原因タンパク質 (標的タンパク質) を作用させて効果を見るスクリーニングを行う。効果が高かった化合物については化学修飾と評価を繰り返し、より効果の高い化合物を作っていく。一般的にこの工程で 3 年以上の期間を要する。

この非効率性を解決するために最も有効な手段として、標的タンパク質分子の構造解析技術が強く求められている。目的のタンパク質分子の構造を基に、医薬品となる化合物の候補を数千種類以下に絞り込むことができるためである。この手法は「SBDD (Structure-Based Drug Design、構造に基づく医薬品設計)」と呼ばれている。現在では SBDD を促進するために、正確で迅速なタンパク質の構造解析を可能にする技術の開発が求められている。



図2 タンパク質構造解析に

基づいた創薬の流れ

疾病の原因として特定されたタンパク質の構造を解析し、“くぼみ”にはまる化合物を設計する。化合物と結合したタンパク質は機能を失い、疾病の症状が抑制される。数百万種類の化合物を対象にしていた以前の手法に比べ、数千種類への絞り込みが可能である。

従来の構造解析手法

タンパク質の構造解析手法として、今日までX線結晶構造解析と核磁気共鳴(NMR)が主流であった。

X線結晶構造解析は化合物の結晶にX線を照射し、得られた像から分子の構造を割り出す手法である。非常に詳細な構造解析が可能であるが、観察対象の結晶化を必要とする点が課題である。創薬の標的となるタンパク質の多くは細胞膜に埋め込まれて存在する膜タンパク質であり、これらは結晶化が非常に難しいため、X線結晶構造解析は創薬における活用が困難である。

同様にタンパク質の構造解析を行うことができるNMRは、解析に要する観察試料が比較的少量であり、一般的に精製が難しい創薬研究のターゲットタンパク質を解析するには時間や費用が大きいことが課題である。さらに、解析対象が低分子タンパク質に限られていることなど、NMRでの構造解析には制約が多い。

新たな構造解析手法:クライオ電子顕微鏡法

X線結晶構造解析やNMRでの解析が困難であるタンパク質の構造解析手法として、クライオ(極低温)電子顕微鏡法が近年注目を集めている。

クライオ電子顕微鏡法は、極低温で分子を瞬間凍結させ、氷の薄膜に包埋された状態の分子を電子顕微鏡で観察する。結晶化を必要としないため、創薬の標的となる膜タンパク質も観察できる。さらに生体内でのありのままの構造を観察できる点や、解析に必要なタンパク質試料が少ない点、巨大な複合体として存在するタンパク質を観察することができる点など、多くの利点がある。他の構造解析手法では不可能であった種類のタンパク質の構造解析を実現する可能性が高く、創薬において有望な手法として期待されている。かつてはX線結晶構造解析をはじめとする他の解析手法に比べ、分解能は大きく劣っていたが、上記の利点から、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析法は世界規模で研究が行われてきた。電子顕微鏡の性能向上や優れた直接電子線検出カメラ(DDC)の開発、解析ソフトウェアの開発により、クライオ電子顕微鏡の解像度は劇的に進歩し、現在では他の構造解析に匹敵するレベルの分解能が報告されるようになった。

このようなハード面の技術的進歩により、クライオ電子顕微鏡を用いて解明された分子構造の報告数は加

速度的に増加しており、データベースへの登録数は NMR 法を超える勢いになってきている。2015 年には科学誌として最も有名な Nature 誌が“Method of the year 2015”にクライオ電子顕微鏡法を選ぶほど、世界中が注目している解析手法である。

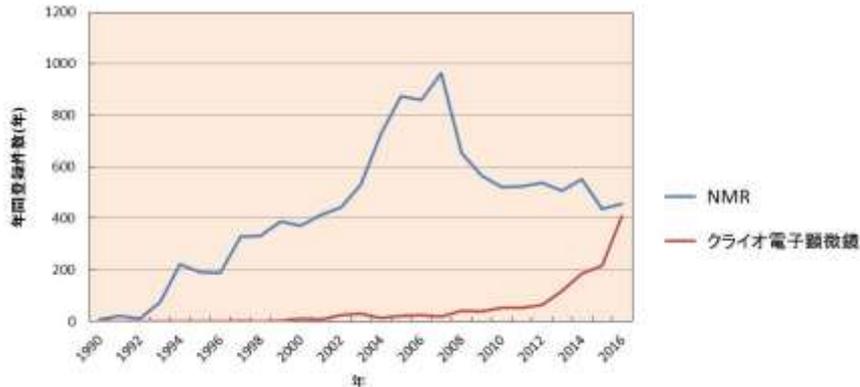


図3 NMR とクライオ電子顕微鏡による1年ごとの構造解析の件数

クライオ電子顕微鏡は2012年を境に構造解析の件数が急増し、年間あたりの解析実績数は2016年にはNMRに並んだ。

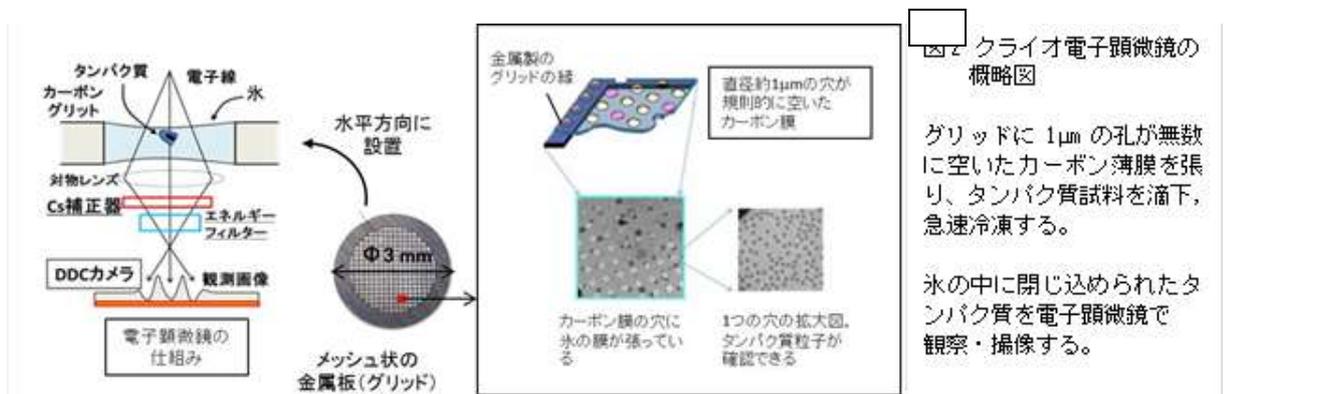
※RCSB PDB 統計データ(<http://www.rcsb.org/pdb/>)をもとに作成

しかし、上記で示したクライオ電子顕微鏡の進歩に係る DDC や解析ソフトウェアは、ほとんどが欧米のメーカーや研究機関によるものである。今後の創薬の研究開発を担うと期待されているクライオ電子顕微鏡において海外に大きく後れをとっている状況は、医薬品における輸入超過の状況を一層悪化させるおそれがある。世界に対抗できる創薬のためにはクライオ電子顕微鏡による解析技術の向上は必須の課題である。

【従来技術の課題】

クライオ電子顕微鏡法の概略を図4に示す。グリッドと呼ばれる直径3 mm ほどの金属製のメッシュ上に試料を滴下し、瞬間凍結させた試料を電子顕微鏡で観察する。透過型電子顕微鏡のクライオ試料は電子線が透過するごく薄い氷薄膜になっている必要がある。

図4



従来技術による試料作製の手順

従来技術での試料作製は下記のステップで手動、あるいは半自動で行われている。

- (1) 約 $1\mu\text{m}$ の大きさの穴が規則的に空いたカーボン薄膜を貼ったグリッド(直径 3 mm の 100μ 金属メッシュ: 商品名 quantifoil)へ試料を滴下する
- (2) ろ紙で試料の過剰分を吸取り、体積を約 1/1000 にすることで穴の部分に薄い水溶液の膜を創る
- (3) 液化エタンを充填した容器に落として急速凍結し、タンパク質試料が分散した非晶質氷の薄膜をグリッド上に作る。

解析に適した観察試料が作製できるどうかは、作業者の経験による。適した試料ができるまでさまざまな条件で作製し次々と観察を試す、ということが常態化している。

このように観察試料の歩留りが悪いためになかなか構造解析のデータ取得まで至っていない。

クライオ電子顕微鏡の実用化を実現するには試料作製装置の改良は早急に解決すべき課題である。

本研究開発では、試料作製の歩留りを改善する技術を新規に開発し、創薬分野におけるクライオ電子顕微鏡法の実用化へつなげることを目的としている。

従来の手動での試料作製の各ステップにおける課題は下記 図5である。



図 3 従来技術における試料作製の手順

課題1: 試料の膜厚が制御できない

穴の部分に薄い水溶液の膜をつくる工程において、ろ紙の吸取りによって体積を約 1000 分の 1 にすることに対応している。このろ紙での吸取りが定量的ではなく、求められる薄さの氷薄膜が得られるかどうかは作成者の経験と勘に依存するという現状となっている。

そのため、吸取りすぎによって試料が残っていないケースや、吸取りが不十分で厚みが過剰になっているケースが多々発生しており、構造解析に活用できるデータが得られないことが多い。

課題2: 試料のロスが多い

ろ紙による吸取りによって、滴下した試料の 99%以上が廃棄されている。創薬のターゲットとなるタンパク質は精製が難しいとされている種類が多く、精製に時間がかかるうえ、少量しか回収できないことが多い。そのため廃棄する試料の削減が求められている。

課題3: 試料の完成度を確認できない

凍結後の観察試料が電子顕微鏡での観察に適した膜厚になっているかどうかは、実際に電子顕微鏡で観察するまでわからない。そのため、解析に適した膜厚の観察試料ができるまで、試料作製と電子顕微鏡での観察を何度も繰り返す必要がある。電子顕微鏡で観察するには、電子顕微鏡への試料ホルダーの設置や電子顕微鏡の起動などいくつもの工程を経る必要があり、観察までに時間を要するためスループットが悪い。

【研究開発動向】

試料作製に関しては歩留りの悪さから他社でも改善が試みられてきた。FEI 社は「VitRobot」と呼ばれる製品を「自動試料作製装置」として開発・販売している。しかし、ろ紙での吸取りの時間や回数を制御したり、液化エタンへの投下を自動で行ったりする程度に留まっている。

Leica 社から販売されている試料作製装置は試料作製の環境を制御することで試料作製の再現性を実現することを特長としている。しかしこちらも試料の膜厚を制御できる技術ではなく、ろ紙による吸取り工程は残っており、吸取りすぎや吸取り不十分が多発している。

表 2 各社の試料作製装置の機能比較

	本研究開発	FEI 社 「VitRobot」	Leica 社「EM GP」
試料ロス	○	×	×
膜厚の定量性	○	×	×
膜厚の測定機能	○	×	×
瞬間凍結機能	○	○	○
歩留り改善	○	×	×

弊社(テラベース(株))ではクライオ電子顕微鏡の受託観察を行っており、依頼された分析試料を用いてクライオ電子顕微鏡の試料作製を行っている。手動及び上記市販装置での試料作製において独自のノウハウを発展させ、安定した品質のクライオ電子顕微鏡用試料の作製により各研究機関へ貢献してきた。

本研究開発は、これまでの弊社の試料作製のノウハウを活用し、クライオ電子顕微鏡での観察に最適なクライオ電子顕微鏡用試料を完全自動で作製できる装置を開発することである。本研究開発では、以下のスペックを備えた技術開発を目指し、試料作製における各工程において以下の目標を達成する。

- (1) 個々のタンパク質試料の種類や濃度の特性に応じた、最適な試料水溶液の膜厚試料を作る
- (2) 個人の経験・能力によらない利便性をもつ
- (3) 必要なタンパク質試料の滴下量を最小限に留める
- (4) 自動化され、操作が簡便である
- (5) 高スループットである

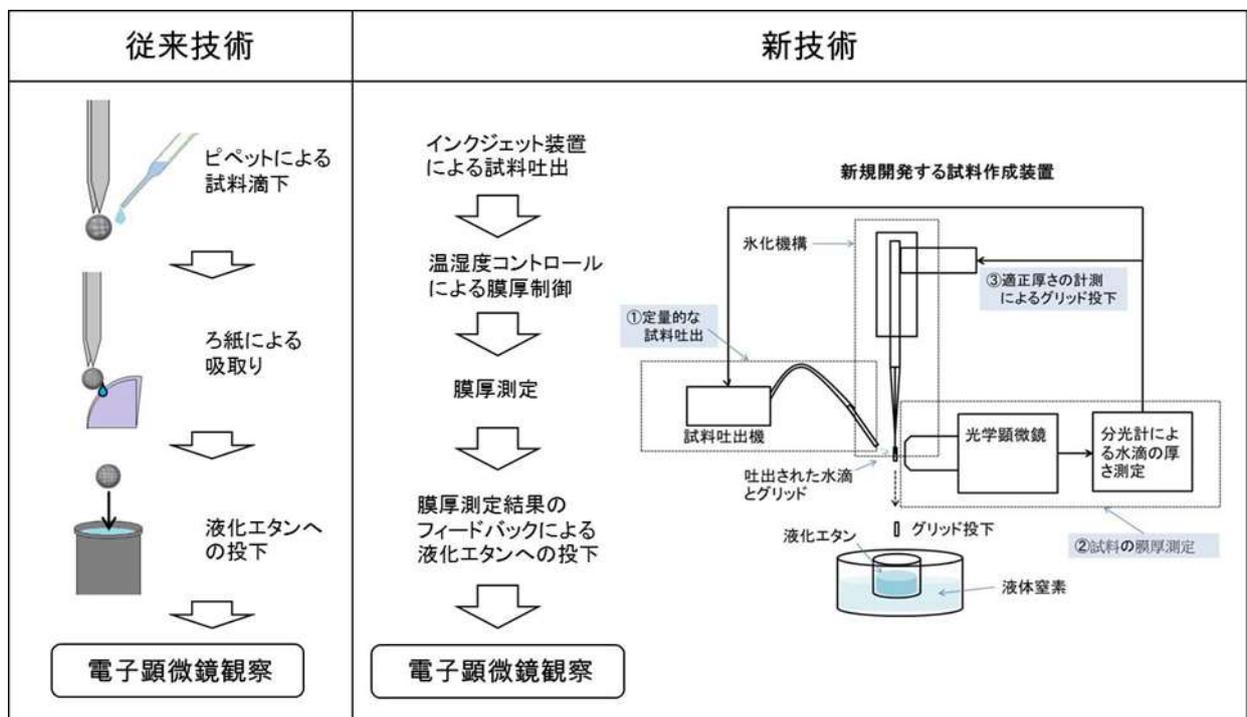
研究開発の概要

下記の方法で、課題を解決する。

- ①インクジェット技術により吐出量を μL 単位で制御する。
- ②本装置内でのグリッドの親水化処理を実現する。
- ③装置内の温湿度を精密にコントロールすることで、膜厚の制御を可能にする。
- ④光学的手法により膜厚を計測し適した膜厚になった時点で液化エタンに投下する
- ⑤ろ紙による吸取りの工程を省くことにより、試料のロス削減を可能にする。

新技術による仕組みを備えた試料作製装置と従来技術の試料作製の手順の比較を図6に示す

図6 従来技術および新技術における試料作製の手順



(2) 研究目標

本研究開発では、クライオ試料作製における各プロセスにおいて表3の目標を達成し、試料作製歩留り改善のニーズに対応し、クライオ電子顕微鏡法における分析技術の効率性向上を目指す。

表3 観察試料作製プロセスにおける高度化目標

	従来技術	新技術の目標値
膜厚の再現性	試行錯誤による出来高のため再現性なし	±10%の精度で再現可能 (計測・制御により実現)
試料作製の歩留り ^注	～10%	70～80%
精製したタンパク質の利用率	1%以下	70%以上
自動化の度合	凍結機能のみが自動化 ほとんどが人手に依存	全自動

本研究開発における技術的目標値

① インクジェットの精密吐出量制御技術および吐出位置精密制御技術の研究	
現状はインクジェットの試料滴下においては数十μLで1回の吐出を行っており、詳細なコントロールができていない状況である。これを、下記の①-1～①-3により吐出量、吐出位置の制御を可能にする。	
①-1	1ショット当たりの吐出量の決定 インクジェット機構によりpL単位での吐出制御を実現する。
①-2	グリッドステージの駆動機構の開発 直径3mmのグリッド面を1μm単位で移動制御し、任意の場所で液滴を吐出できる機構を実現する。
①-3	インクジェット・ヘッド部へのタンパク質試料の装填機能の開発 インクジェット・ヘッド部からタンパク質溶液を吐出に必要なだけヘッド部に装填できる機構を検討する。
② 吐出液滴の広がりや薄膜化の促進技術の研究	
クライオ電子顕微鏡による構造解析において、観察試料の膜厚の薄さが求められるが、現状では膜厚の薄さは不十分である。下記の②-1～②-2を達成することで、①のインクジェットの試料滴下技術と合わせた際に十分な薄さを実現できる親水化処理を実現する。	
②-1	グリッドの親水化処理条件の決定 基板に対する接触角30度以下を実現する(角度は表面積と滴下量と膜厚等からの計算による推定値)
②-2	吐出液滴の広がりや薄膜化の促進技術の開発 ②-1で最適化されたグリッドに吐出した試料が十分に広がり薄膜化を実現するための技術を開発
③ 吐出液滴の膜厚制御技術の研究	
インクジェット技術を用いた新技術では、少量の試料で済む一方、蒸発による試料水分の消失が起きやすく、現状では0.5～1秒弱で試料が乾燥して無くなる。そこで、装置内の温度・湿度などの環境条件を制御して、蒸発防止を行うことで膜厚の減少スピードを遅くする方法を開発する。	
③-1	温湿度制御チャンバーの設計/製作および基礎データ取得 タンパク質溶液の温度は4℃～10℃の範囲で吐出できるように検討を行う。チャンバー内湿度は70～100%の範囲で制御可能であることを目標とする。
③-2	試料作成装置へのチャンバーの組み込み 上記チャンバーを試料作成装置に組み込む。その際、チャンバーの配置が、吐出される液滴の飛

	路や、光学系による膜厚測定に支障のないように機構設計する。
④ 光学的手法による膜厚のその場計測技術の研究	
その場計測での膜厚測定を可能にする。	
④-1	市販膜厚測定器を用いた膜厚と吐出量の関係性の評価
	膜厚と吐出量に関しての相関性を見出す。市販の膜厚測定装置を用いてインクジェット機で吐出した一定量の水滴と膜厚の関係を求める。
④-2	単一波長の LED を用いた膜厚計の試作
	単一波長の LED を用いた膜厚計を試作し、水滴の固定の膜厚(例えば 200nm)に関して、市販の膜厚計と同等の計測値が得られるか実験する。
④-3	膜厚測定の評価およびライブラリとソフトの作成
	上記により確立されたアルゴリズムによりソフトウェアを開発し、膜厚値の計算を実現する
⑤ 各機構の連動と自動化への対応	
1 試料のセットから凍結完了まで 5 分以内のスループットを達成する。	
⑤-1	各機構の制御システムの構築
	先述の高度化目標で示した目標(歩留り 70 %~80%、タンパク質利用率 70%以上)を実現可能であることを確認する。
⑤-2	自動試料作製装置としての組立て
	円滑に正確に作動することを確認する。

(3) 研究開発の取り組みの評価

【1.インクジェットの精密吐出量制御技術および吐出位置精密制御技術の研究】

1-1.1 ショット当たりの吐出量の決定 80%達成

(株)SIJ テクノロジが担当し、吐出量の確認を行い完了した。

吐出ノズル径、印加電圧、などの適切な判断・設定が必要なので更にデータを取得する。

1-2.グリッドの移動駆動機構の開発 達成

クライオ試料作成装置の製作が完了し達成した。装置としての更なる改良を継続して行う。

1-3.インクジェット・ヘッド部へのタンパク質試料の装填機能の開発 達成

(株)SIJ テクノロジが、吐出先端部からの吸引方式を開発成功し達成した。

【2.吐出液滴の広がりや薄膜化の促進技術の研究】

2-1.グリッドの親水化処理条件の決定 達成

試料グリッドのプラズマ処理条件の検証を行い、条件を決定し、達成した。

プラズマ処理装置のエアリーク条件が重要なことが解り実施した。

2-2.吐出液滴の広がりや薄膜化の促進技術の開発 80%達成

試料グリッド上に水膜を生成しタンパク質溶液を inkjet で吐出した結果、溶液が広がる事を確認した。この方式でクライオ試料を作成、電子顕微鏡で観察した。タンパク質の分散、氷の厚さなどで目的とする成果が得られた。今後さらなる追求を実施する。

【3.吐出液滴の膜厚制御技術の研究】

3-1. 温湿度コントロールチャンバーの設計/製作および基礎データ取得 達成

クライオ試料作成装置の製作が完了し達成した。実験結果に基づき改造を行っていく。

3-2. 試料作成装置へのチャンバーの組み込み 達成

クライオ試料作成装置の製作において、温湿度を制御したチャンバーを設け達成した。
実験結果に基づき改造を行っていく。

【4. 光学的手法による膜厚のその場計測技術の研究】

4-1. 市販膜厚測定器を用いた膜厚と吐出量の関係性の評価 達成

F40 の決定に当たり、販売会社フィルメトリクス社 山下氏の装置説明、膜厚測定実施、
のデモを受け、試料グリッド上の水膜の測定を行った。検討の結果、対物レンズとして 10 倍、20 倍の2本の
購入を決定した。

本装置を用いてし試料グリッド上のタンパク質溶液の厚さを評価する事ができた。

試料グリッド上の水膜の厚さ評価が可能になり、グリッドの表面、裏面の膜厚測定を行った。

時間経過による水膜厚さの変化を捉えることが出来た。

4-2. 単一波長の LED を用いた膜厚計の試作 70%達成

RGB-LED レーザーによる、簡易型膜厚測定器を製作したが、光軸合せが困難な状況あり
まだ完成には至っていない。

4-3. 膜厚測定の評価およびライブラリとソフトの作成 60%達成

新たな試料の膜厚計測システムが開発できた。

ソフトは完成したが、実証テストは準備の段階である。

市販の膜厚測定器 H40 のデータと比較し、簡易膜厚計の評価を進めている。

【5. 各機構の連動と自動化への対応

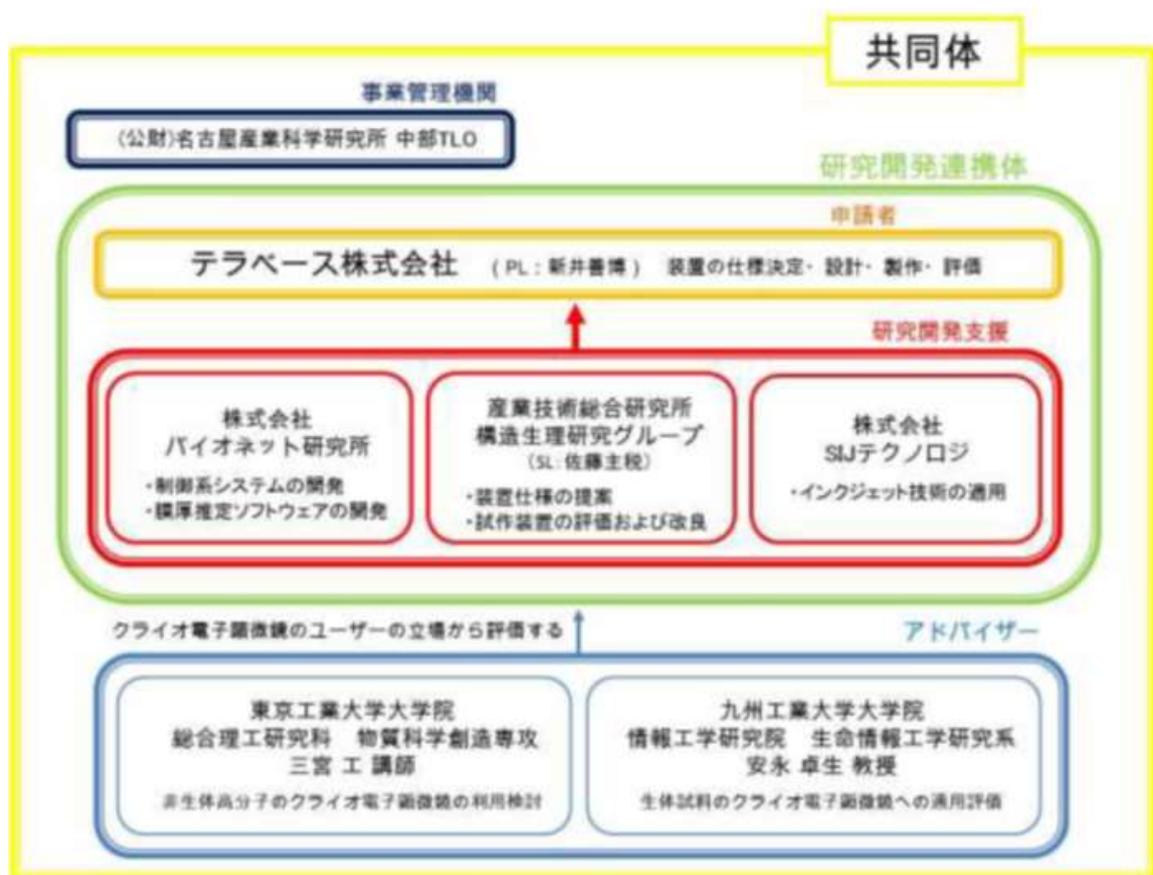
5-1. 各機構の制御システムの構築 達成

ステージ、温度制御系について制御系ソフトウェアを開発し、動作の確認まで完了した。
装置の改造に従い、ソフトの変更を実施した。

5-2. 自動試料作製装置としての組立て 30%達成

基本機能はほぼ決まったので、装置としてまとめるための検討を進めている。

1-2 研究体制



1-3 成果概要

(1) 装置の開発

・ Inkjet: SIJ 吐出ノズルの開発

試料グリッドの XYZ 位置微調整

ピンセット保持着脱方法の改善

処理室の温湿度の制御達成

(2) クライオ試料作成作業工程

試料グリッド(カーボン薄膜)の親水化処理の改善

ノズルへの試料装填技術完成

水溶液の広がり・膜厚測定評価

クライオ試料作成評価

1-4 当該研究開発の連絡窓口

テラベース株式会社 代表取締役 新井善博

arai@terabase.co.jp

0564-64-6271

第2章 本論

補助事業の具体的内容

【1.インクジェットの精密吐出量制御技術および吐出位置精密制御技術の研究】

1-1. 1ショット当たりの吐出量の決定

インクジェット技術でピコリットル単位の吐出制御を実現するために、SIJ方式およびピエゾ方式の2種類のインクジェットヘッドでタンパク質溶液を吐出できるか確認し、その吐出量を測定した。

溶液としては2種類のタンパク質(ヘモグロビンとアルブミン)溶液を用いた。

SIJ方式: 試料溶液をグリッドの狙った位置に点状塗布できることを確認した。吐出液滴の直径がノズル径と同程度と仮定すれば吐出量は約0.5pLとなり、吐出目標を十分に達成している。

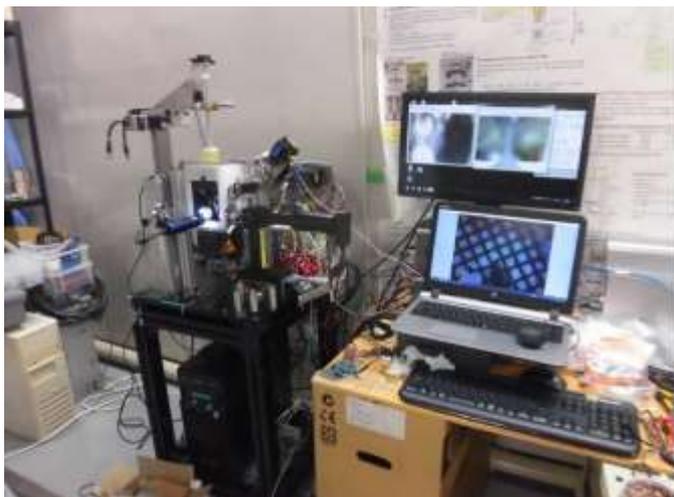
ピエゾ方式: 後述の方法で微量溶液を充填し、ノズル内径とほぼ同じ直径の液滴の吐出を観察した。その体積は約1.5pLであり、目標をクリアした。

1-2.グリッドの移動駆動機構の開発

直径3mmのグリッド面を1 μ m単位で位置制御し液滴を吐出する機構を実現するために、装置の設計、組み立て、ソフトウェア開発、ならびに動作検証を行った。ピエゾ方式とSIJ方式の両方で、グリッド上のカーボン膜に2種類のタンパク質溶液をピコリットルオーダーで自動吐出できることを確認した。

試料グリッドをピンセットで掴み、上下Z軸の移動機構(スライダ)で保持したシャフトに取付ける。このシャフトはXYZ方向の位置調整ができる。 * 試料作成の構造説明 装置全体写真、図7 参照

シャフトで保持した試料グリッド/ピンセットは、ペルチェ冷却と、加湿器が付いたアルミの箱内(100w×100d×150h、 \sim 0 $^{\circ}$ C、湿度 90%以上)で上下し、タンパク質試料の吐出と光学的膜厚測定を行った後、液化エタンに突入、急速冷凍クライオ試料とする方向で装置を製作完成した。アルミ箱内の温湿度(\sim 0 $^{\circ}$ C、湿度 90%以上)達成、XYZ駆動の微少移動・制御完成、光学式膜厚保計の動作確認などについては問題なく達成した。



装置全体写真



試料作成室

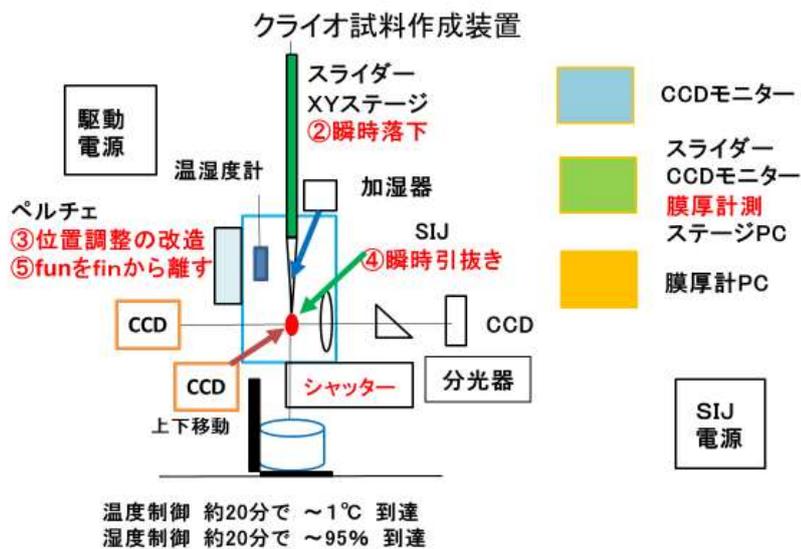


図7 構成図

6

1-3.インクジェット・ヘッド部へのタンパク質試料の装填機能の開発

試料作成に必要な最低吐出量(20 μL 以下)だけをタンパク質溶液をヘッド部に装填する機構を検討した。

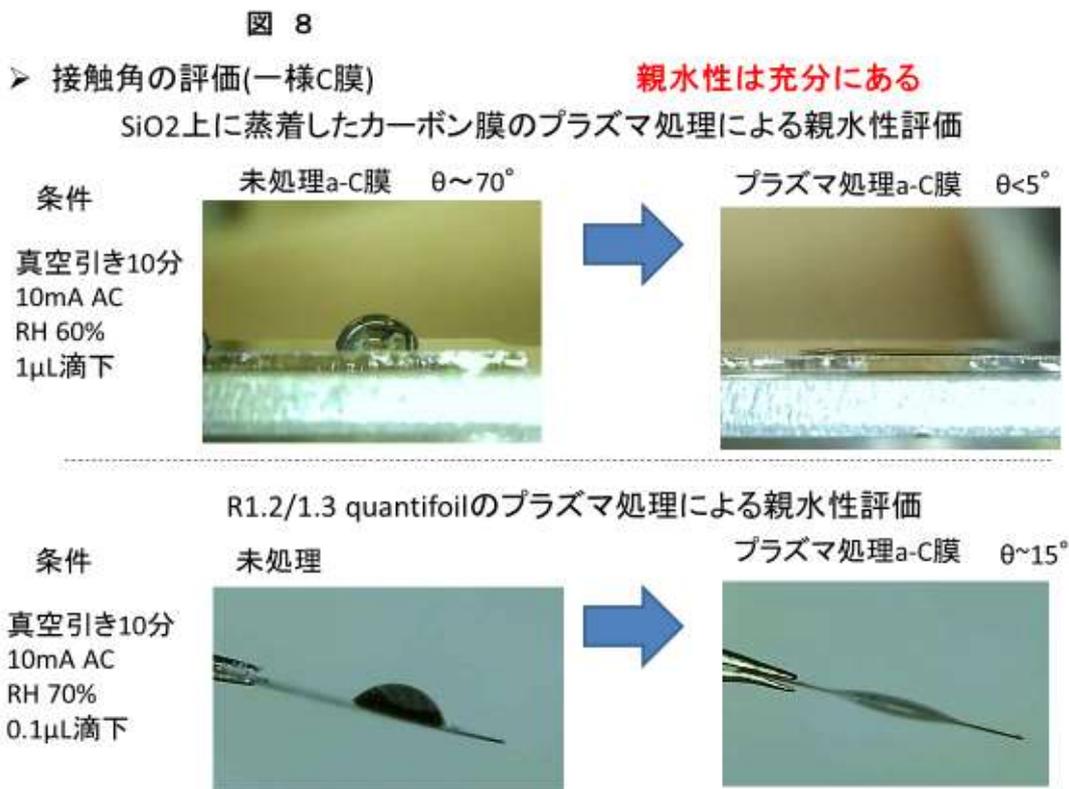
SIJ方式のヘッドは10 μL の装填が可能であり問題はない。一方で、ピエゾ方式のヘッドでは通常、試料溶液量が最低100 μL 必要である。この量を減少させる目的で、ピエゾヘッドのノズル吐出口から溶液を吸引させることを試みた。まず吐出口に1 μL の水滴を付着させ、溶液注入口に負圧を印可した。すると、水がヘッド内部に吸い込まれた。つぎにピエゾヘッドを駆動させると、通常のインクジェット時と同様の液滴の吐出が確認された。この方法は、タンパク質溶液にも適用可能であることを確認した。

【2.吐出液滴の広がりと薄膜化の促進技術の研究】

2-1.グリッドの親水化処理条件の決定

グリッドを親水化するために使われるプラズマ照射装置では、プラズマ加工室の上下に正負の電極があり、プラズマの流れもほぼ上下方向である。したがって、通常のグリッドを下電極面の上に置いた場合、カーボン膜の穴側面の親水性はグリッド上面より小さいと考えられる。そこで、穴側面にまでプラズマ照射することを目的とした。

①グリッドを浮かせて裏面からもプラズマを回り込ませる、②プラズマ電極面に対してグリッドを立てる方式でプラズマ処理後、水の滴下による接触角測定により親水性を評価した。結果は①、②により処理したグリッドは、従来のグリッドにくらべカーボン膜の穴側面の中の親水性が高くクライオ試料作製に適していることがわかった。

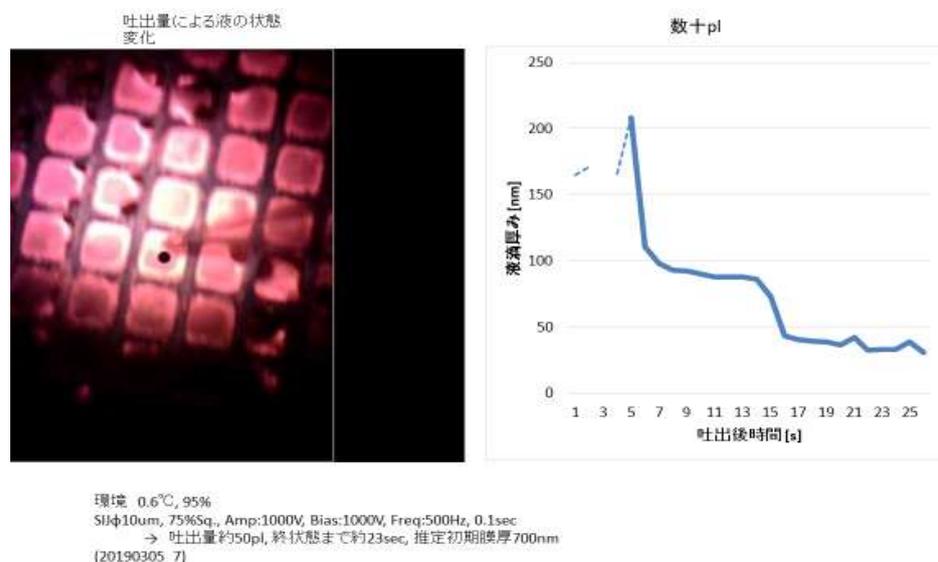


2-2.吐出液滴の広がりと薄膜化の促進技術の開発

試料グリッド上に水膜を生成しタンパク質溶液をインクジェットで吐出した結果、溶液が広がる事を確認した。

この方式でクライオ試料を作成、電子顕微鏡で観察した。タンパク質の分散、氷の厚さなどで目的とする成果が得られた。

図9 膜厚の変化



【3.吐出液滴の膜厚制御技術の研究】

3-1. 温湿度コントロールチャンバーの設計/製作および基礎データ取得

クライオ試料作成装置の温湿度制御チャンバーは、ペルチェ素子と市販のペットボトルに付加して使用する加湿器を改造したものを取付けている。チャンバー内温度(ピンセット温度を含む)は10分で3℃以下に冷却され、湿度は～95%が確認出来た。湿度については、水膜の蒸発状況を観察した結果、100%が望ましいと考えられる。

3-2. 試料作成装置へのチャンバーの組み込み

「上記チャンバーを試料作成装置に組み込む。その際、チャンバーの配置が、吐出される液滴の飛路や、光学系による膜厚測定に支障のないように機構設計する。」

1-2, 3-1で述べたように、クライオ試料作成装置として温湿度を制御したチャンバーを設け装置として完成した。クライオ試料作成装置のチャンバーは、温湿度制御が容易に可能なようにアルミの引抜き角材(100×100×3t)を使用した。温度制御にはペルチェ素子を装備し、～15分で0℃以下に到達した。加湿器は市販のペットボトル用を採用しているが～95%以上に到達し不都合はない。

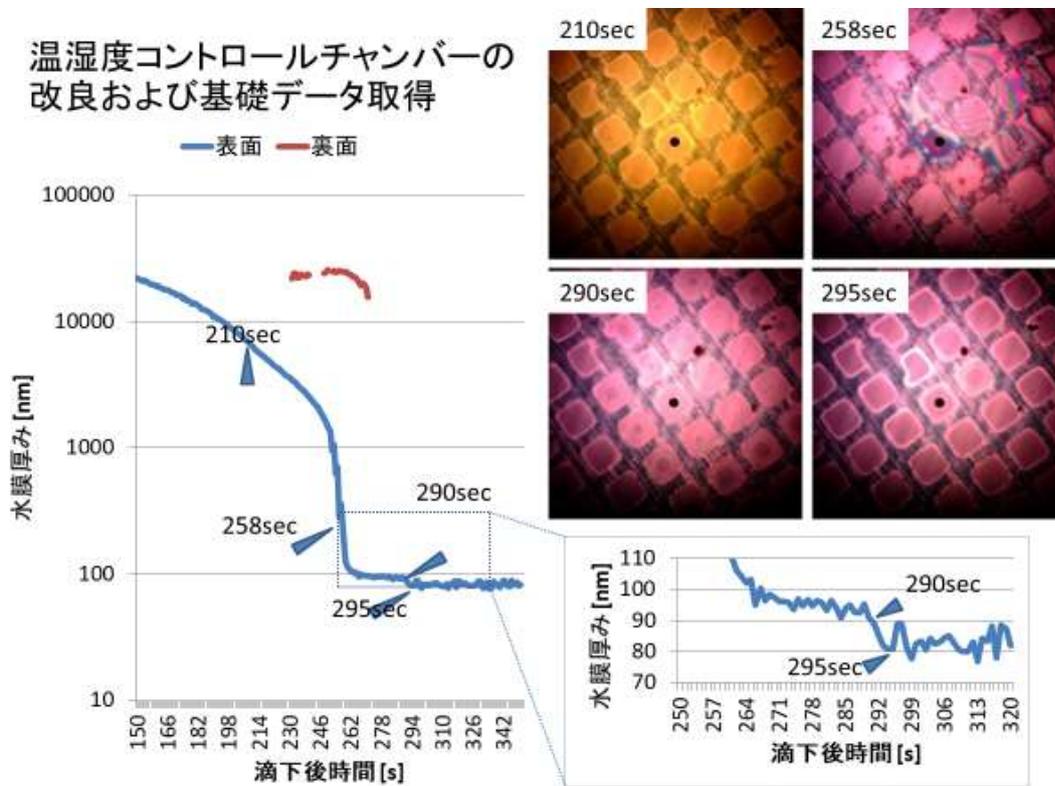
【4. 光学的手法による膜厚のその場計測技術の研究】

4-1. 市販膜厚測定器を用いた膜厚と吐出量の関係性の評価

クライオ試料作成装置に膜厚計(H40)を取付けて、チャンバー内でグリッドに溶液をインクジェット吐出後にリアルタイムで、試料グリッド上の水膜測定を行った。非接触であり比較的長いワークディスタンスでの測定が可能であることを確認できた。グリッド表面の水膜は乾燥により水膜は直線的に減少し極薄い水膜が確認された。

試料グリッド上の水膜の厚さ評価が可能になり、グリッドの表面、裏面の膜厚測定を行った。時間経過による水膜厚さの変化を捉えることが出来た。また、試料グリッド上のタンパク質溶液の厚さを評価する事ができた。

図 10 水膜変化のグラフ



予め試料グリッドを濡らしておき、水膜の時間変化を調べた。以下のグラフで表面：青、裏面：橙
表面では、水膜は直線的に変化した後極薄い水膜状態が約 30 秒保持されることが解った。

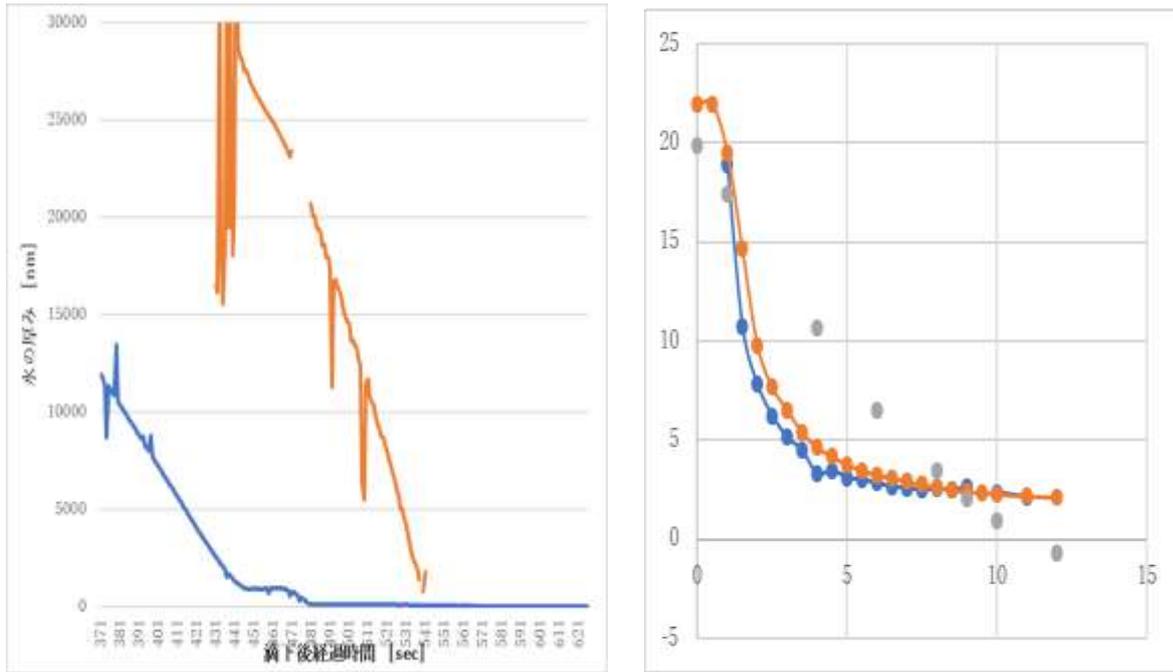


図11 グリッド上の水膜厚さ(青:表面、橙:裏面)

4-2. 単一波長の LED を用いた膜厚計の試作

RGBの LED-laser を薄膜に照射し、その入射・反射の比を測定することで膜厚を計測する簡易型膜厚測定器を製作し光軸合せを実施した。構造を図 11 に示す。

反射光を求める式はいかとなる。 3次元グラフを図 12 に示す

$$R_i = r^2 + r'^2 + 2rr' \cdot \cos(2\pi / \lambda * 2 * n * d)$$

R_i : 反射光強度 λ : 波長、 n : 水の屈折率、
 d : 薄膜の膜厚、 r, r' : 薄膜の上下界面での反射係数

RGB-Laserを薄膜に照射し、照射波と反射波の比を求め、以下のRGB3次元グラフより膜厚が求められる。

図12 簡易膜厚計器構成図 3波長(RGB)を照射し反射強度より厚さを求める

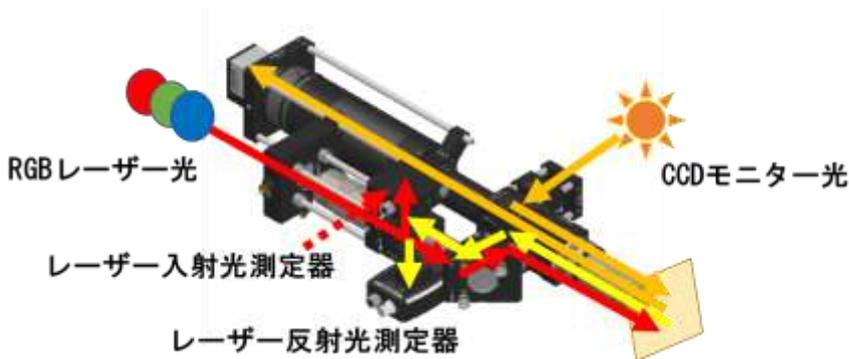
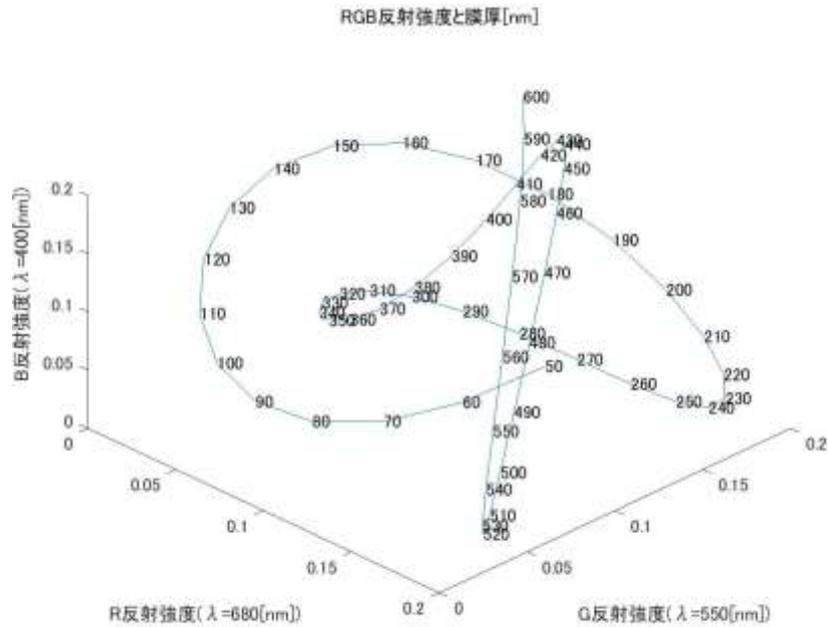


図13 RGB強度と膜厚保の関係



4-3. 膜厚測定の評価およびライブラリとソフトの作成

新たな試料の膜厚計測システムが開発できた。

ソフトは完成したが、実証テストは準備の段階である。

市販の膜厚測定器 H40 のデータと比較し、簡易膜厚計の評価を進めている。

簡易膜厚計 表示

サポイン膜厚測定装置ソフトウェア

校正
標準膜厚測定
測定開始
終了

レーザー出力設定

R: 1 mA 1.00W

G: 1 mA 1.00W

B: 1 mA 1.00W

測定間隔設定

測定間隔: 1.0 秒 (カメラ時間 + 測定時間)

レーザー照射時間: 0.1 秒 (測定時間 = レーザー照射時間 × 積算回数)

積算回数: 1 回

校正値

ミラー反射率 R: 98.0 % G: 95.2 % B: 92.0 %

バックグラウンド		全反射		補正係数
入射側	反射側	入射側	反射側	
R	255	255	255	0.123
G	255	255	255	0.123
B	255	255	255	0.123

測定値

	入射側	反射側	反射率
R	255	255	10.2 %
G	255	255	8.3 %
B	255	255	2.2 %

信頼性	膜厚
85 %	100nm

結果コード: 正常終了

測定ログ

時刻	経過	R入射	R反射	R反射率	G入射	G反射	G反射率	B入射	B反射	B反射率	膜厚[nm]	信頼性%	結果コード
00:00:00	00:00:00	255	255	99.9	255	255	99.9	255	255	99.9	100	85	正常

【5. 各機構の連動と自動化への対応】

5-1. 各機構の制御システムの構築

装置として必要な、試料グリッド保持/上下Z、XY位置調整、インクジェット吐出器のXYZ位置調整、試料処理チャンバー環境保持機能として、ペルチェ冷却、加湿器、温湿度測定器、これらとインクジェット吐出器駆動電源を総合的にまとめ操作するソフトを開発し、装置制御を完成した。

5-2. 自動試料作製装置としての組立て

グリッド位置の微調整用ステージ制御、温度制御系について制御系ソフトウェアを開発し動作の確認完了した。

最終章 全体総括

1. 研究開発成果

1-1 装置開発成果

インクジェット SIJ 吐出ノズルの改良を行い、適合するノズルを完成した。

試料グリッドの XYZ 位置微調整機能を有したクライオ医療作成装置を完成した。

ピンセット保持着脱方法を改善し、操作性を改善した。

処理室の温湿度の制御を達成した。

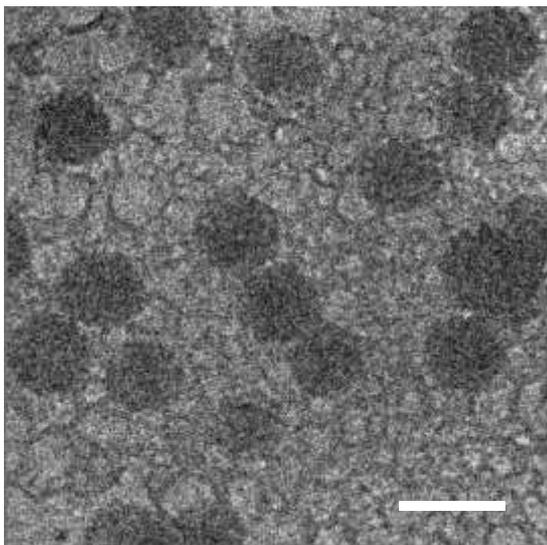
1-2 クライオ試料作成成果

試料グリッド(カーボン薄膜)の親水化処理を改善、十分な成果が得られた。

インクジェット吐出後の水溶液の広がり・膜厚を測定し評価した。

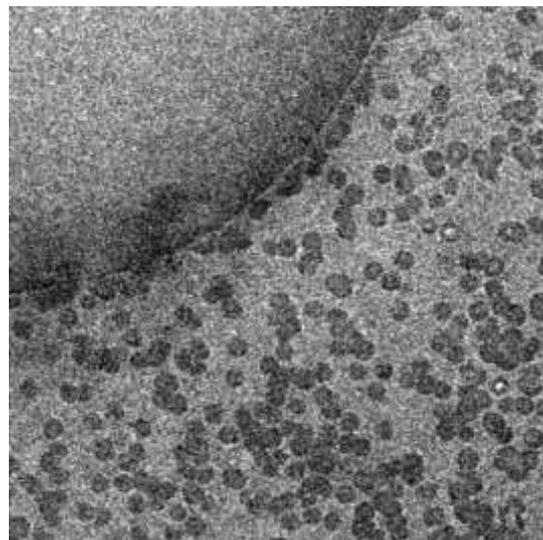
クライオ試料作成し透過型電子顕微鏡で観察を行った。

1-3 クライオ試料観察

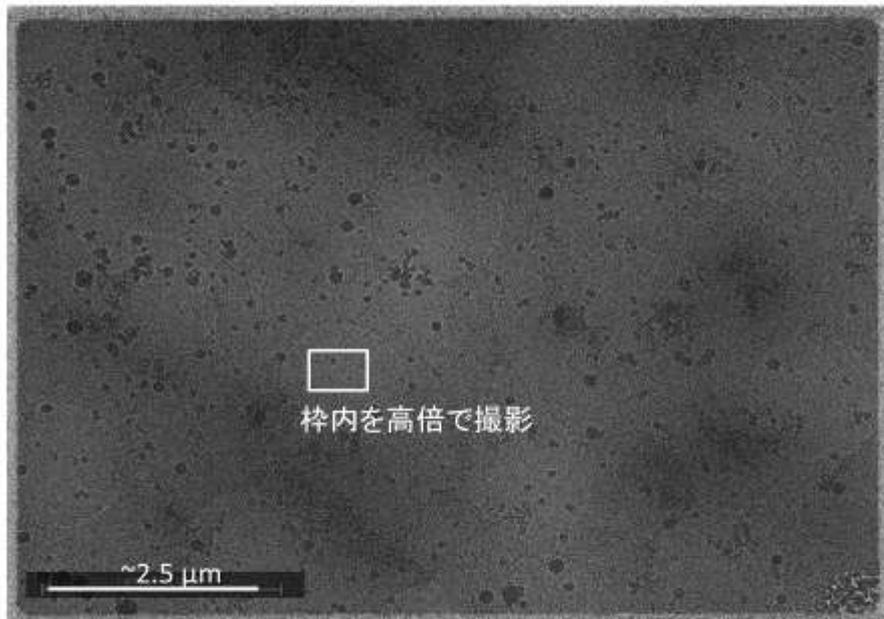


試料: Virus (RDV)

100nm

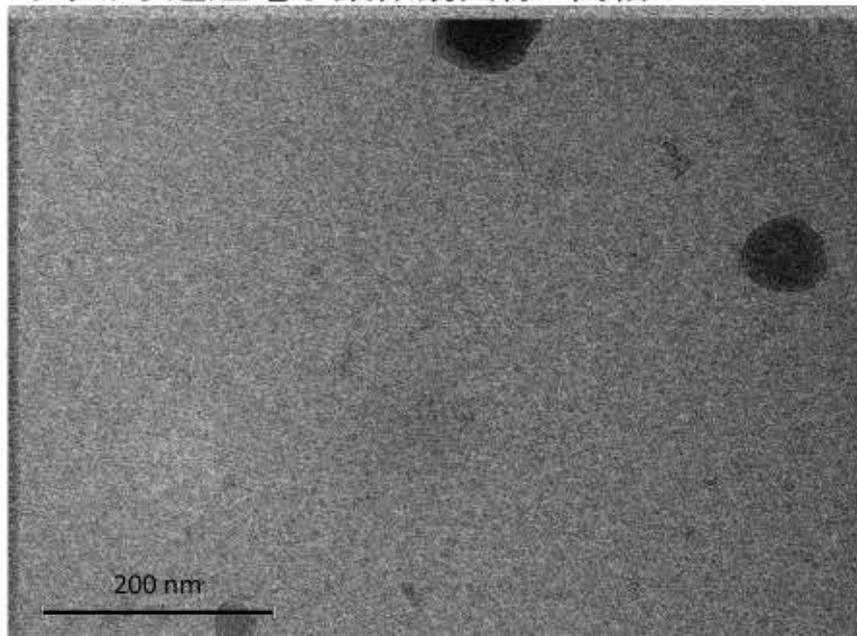


クライオ透過電子顕微鏡画像



サンプル 4mg/ml アルブミン 視野全体に非晶質の氷が確認できる。

クライオ透過電子顕微鏡画像 高倍



倍率4万倍 得られた氷の厚さ 220 nm

2. 研究開発後の課題・事業化展開

(1) 想定している具体的なユーザー、マーケット及び市場規模等に対する効果

販売対象顧客はクライオ電子顕微鏡の既存ユーザー又は新規ユーザーである全世界のバイオ研究機関・大学、国内創薬メーカー、海外バイオシミラー、海外メガファーマ、バイオベンチャー、食品・バイオ企業である。現状のFEI製とLeica製の試料作成装置は両社ともほぼ同じ性能で、作製される膜厚に関する保証は全くない。これに対し我々の新製品は、膜厚の量の制御と計測機能を兼ね備えているため、性能的には格段に向上している。使い勝手の良い装置を販売出来れば確実に市場を席巻できると思われる。

(3) 事業化に至るまでの遂行方法や今後のスケジュール

1. 商品機の完成度向上、コストダウン
2. デモ機の貸出 産総研、岡崎生理研、九州工業大学等
3. 研究開発の継続が必要
4. 令和3年 デモ機納入、国内販売
5. 令和4年～ 海外販売開始
6. その他クライオ電子顕微鏡開発販売強者との提携

(4) 成果(試作品)の無償譲渡や無償貸与

産業技術総合研究所は、本研究で完成させる試作機及び、その次の商品試作機等を用いた、タンパク質単粒子解析の実績を発表し、世界へこの装置の優位性を示すことで、その販路を世界的に広めることに協力する。