プログラム名：豊かで安全な社会と
新しいバイオものづくりを実現する人工細胞リアクタ
PM 名：野地博行
プロジェクト名：基盤技術開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書（成果）

平成２９年度

研究開発課題名：

人工細胞デバイスおよび計測システム開発ならびにゲノム起動法の開発

研究開発機関名：

東京大学

研究開発責任者
田端　和仁

Ⅰ　当該年度における計画と成果

１．当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

「はかる」、「つくる」、「ふえる」プロジェクトを社会実装する際に必須となる普及型の人工細胞デバイスおよび当該人工細胞デバイスを用いて計測を行う普及型の計測システムとを一体的に開発し、実用化を目指す。開発にあたっては、人工細胞デバイスを安価かつ簡便に作成するとともに、計測システムを小型かつ簡単に操作可能とすることにより、人工細胞デバイス計測システムを社会に広く普及可能な計測システムとする。また、人工ゲノム DNA を起動し、機能させるための技術として、人工細胞デバイスを利用した人工ゲノム起動法の開発に取り組む。今年度は以下を目標として開発を進める。

1.　普及型人工細胞リアクタの開発

1-1.　安価で作成が容易な普及型人工細胞リアクタの開発

UV 硬化樹脂を用いた人工細胞リアクタを使用して、デジタルアッセイ（デジタル ELISA、ウイルス検出、遺伝子増幅等）が現行デバイスと同等に計測できるか検証する。また安価な材料、加工法による人工細胞リアクタ開発を開始し、材料、加工法の候補を絞り込む。

1-2.　人工細胞リアクタの最適化と量産化

24mm×36mm, φ5μm, d=3μm のデバイスに関しては、最大作成枚数（100 枚）をコンスタントに製造、供給する体制を確立し、参加グループへの人工細胞デバイスを継続供給する。課題 1A 向け大型デバイス月産 20 枚体制を確立する。

1-3.　臨床用全自動デジタル ELISA 装置専用のデバイス開発

射出成形デバイスを開発し全自動装置内での計測可能性を検証する。

1-4.　人工細胞リアクタ精密計測法の開発

他課題と共同で、人工細胞デバイスを用いた計測を行う。

2.　普及型人工細胞リアクタ計測システムの開発

2-1-1. ベンチトップサイズの計測装置の開発

内蔵光学系の小型化（高さ 20cm、幅 20cm 程度）を行う。

2-1-2. 小型検出システムの開発

パームトップタイプの検出装置としてスマートフォンをベースにした、撮影から解析まで全てスマートフォン上で行えるよう、アプリとして開発する。

2-2.　機能分子スクリーニングシステム開発

自動で現行の手動回収システムと同等レベルの液滴を回収できるシステムの構築を行う。

3.　人工ゲノム起動法の開発

3-1.　人工細胞リアクタを用いたゲノム起動法の開発―融合細胞の作成と内部状態評価

融合細胞内の内部状態計測法を立ち上げ、タンパク質合成、ATP 濃度、膜電位、タンパク質濃度の計測系を 1 種類以上計測する。

3-2.　ゲノム起動の確認

マイコプラズマゲノム抽出法とゲノムへの外来遺伝子導入（ゲノムインテグレーション法）を確立する。マーカー遺伝子をゲノム上に導入したマイコプラズマ株（M. mycoides）を確

立する。

２．当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

1. 普及型人工細胞リアクタの開発

1-1. 安価で作成が容易な人工細胞リアクタの開発

UV 硬化樹脂の試作品ならびに安価な材料、加工法候補の人工細胞デバイスへの適応性評価を実施した。（項目 1-3 と重複）

1-2. 人工細胞リアクタの最適化

使用頻度の高い人工細胞リアクタ（24 mm×36 mm, φ5 μm, d=3 μm）に関して重点的に供給できるよう、プロセス条件の検討を行い、日産 100 枚体制の確立に成功した。これらデバイスを野地プログラムに参画する研究開発機関に供給を行った。さらに、課題 1A 向けの大型デバイスの加工法を確立し、毎月 20 枚程度の供給を実施した。

1-3. 臨床用全自動デジタル ELISA 装置専用のデバイス開発

臨床用全自動デジタル ELISA 装置用デバイスの量産化に向けた射出成形デバイスの開発を実施した。

1-4. 人工細胞リアクタ精密計測法の開発

β-グルコシダーゼ、インフルエンザウイルスのデジタル計測法の開発を他課題と共同でもしくは本課題で開始した。

2. 普及型人工細胞デバイス計測システムの開発

2-1-1. ベンチトップサイズの計測装置の開発

普及型計測装置に向けプロトタイプ機を評価し、光学設計などを再実施し、小型光学系を作製した。

2-1-2. 小型検出システムの開発

パームトップタイプの検出装置では、スマートフォンをベースとした検出装置の開発として小型光学系構築と取得した画像データから定量解析するためのソフトウエア開発に取り組んだ

2-2. 機能分子スクリーニングシステム開発

機能分子スクリーニングシステムにおいて、パートナー企業と共同で人工細胞デバイスから 1 分子 DNA を回収できる試作機の開発を行った。

3. 人工ゲノム起動法の開発

3-1. 人工細胞リアクタを用いたゲノム起動法の開発

融合細胞の作成効率の 300%向上に成功したため、その内部状態を評価する方法としてβガラクトシダーゼをコードするプラスミドを導入しその発現を見ることで評価を行った。本課題は、マイコプラズマゲノム交換法の開発に注力するため本年度で終了となった。

3-2. ゲノム起動の確認

クレイグベンター研究所で成功しているマイコプラズマゲノム交換法の導入を実施した。

2-2 成果

1. 普及型人工細胞リアクタの開発

1-1. 安価で作成が容易な人工細胞デバイスの開発

開発品 UV 硬化樹脂でデジタルアッセイを検証したところ、酵素 1 分子の活性を検出するようなデジタルアッセイは可能であったが、PUREsystem（登録商標）のような複雑なコンポーネントを持つものは、機能しなかった。これは、UV 硬化樹脂が現行品に比べ、非特異的吸着が多いと言うことが知られており、原因である可能性が高い。そこで、非特異吸着が少ない UV 硬化樹脂の開発に着手した。現在、改良品の合成を行っており、翌年度以降に評価する予定である。一方、単純なコンポーネントでのデジタルアッセイは可能であるため、課題 1C への供給を行った。また、安価な材料、加工法で人工細胞リアクタへの適応性を評価し、量産性、加工性なども考慮し候補を項目 1-3 と同一の材料、加工法に選定した。一方、課題は項目 1-3 と同一であり、デバイスの仕様を見直し解決を図る。

1-2. 人工細胞デバイスの最適化と量産化

使用頻度の高い人工細胞リアクタ（24 mm×36 mm, φ5 μm, d=3 μm）に関して重点的に供給できるよう、プロセス条件の検討と行い、日産 100 枚体制の確立に成功した。これらデバイスは、課題 1A、1C、2A、2E、2F、3A に供給を行った。また課題 4A においてもインフルエンザ診断薬開発に利用した。さらに、課題 1A 向けのデバイス形状が大型化しており（100 mm×140 mm, φ5 μm, d=3 μm）、従来の加工法では対応できないことが分かってきた。そこで大型デバイス用の加工法を確立し、毎月 20 枚程度の供給を実施している。

1-3. 臨床用全自動デジタル ELISA 装置専用のデバイス開発

課題 1A からの要請により φ5μm, d=3μm のマイクロチャンバーを 40 万個アレイ化した射出成形デバイス作成に成功した。本デバイスを用いて顕微鏡を用いたデジタルアッセイも可能であったが、対物レンズがしっかりしていない簡易検出装置ではピントが合わず観察できなかった。これは、成形したデバイス底面の厚みが 2 mm 程度と厚く、プラスチックの複屈折によって焦点がデバイス表面に結ばれず、観察を困難にしていることが考えられた。このような簡易検出装置は将来的に安価なデジタルアッセイ装置として発展することが見込まれるため、これらの検出器でも計測可能なデバイスの検討を開始した。

1-4. 人工細胞デバイス精密計測法の開発

課題 2A、2F とともに、人工細胞デバイスを利用した β-グルコシダーゼの耐熱化酵素スクリーニングに向けた計測法の開発を開始し、問題点（ヒーティング性能、無細胞発現と酵素機能条件の相違）を見いだした。また、人工細胞デバイスの用例開拓の一環として、インフルエンザウイルスの高感度計測法の開発に課題 4A として取り組み、インフルエンザウイルスを従来検査法（イムノクロマト法）よりも高感度で検出可能であることが分かった。

2. 普及型人工細胞リアクタ計測法の開発

2-1-1. 普及型人工デバイス計測システムの開発

本項目では、試作機を作成し、デジタル計測が出来る事が確認されたため、光学設計などを見直し、50 cm 四方程度のベンチトップサイズに小型化した計測装置開発（光学系のみでは～20 cm×20 cm）に成功した。

2-1-2. 普及型人工デバイス計測システムの開発

パームトップタイプの検出装置では、スマートフォンのカメラを利用した検出装置の開発に成功した。本装置を利用して、インフルエンザウイルスのデジタル検出に成功した。これらの画像を処理して結果を出力するためのソフトウエアの開発もおこない、スマートフォンでインフルエンザウイルスの定量計測が可能となった。

2-2.　機能分子スクリーニングシステムの開発

課題 2A におけるスクリーニングを自動化し、高速化することを目的に自動化装置に向けた開発を行った。試作機を作成し、評価した。本試作機を用いて人工細胞デバイスから液滴を回収しその中に含まれる 1 分子 DNA の増幅に成功した。また、回収操作も自動で行うことができ、1 つの液滴回収にかかる時間を半分以下に短縮できた。さらなるユーザビリティの向上と完全自動回収化に向けて試作機の改修の検討を開始した。

3.　人工ゲノム起動法の開発

3-1.　融合細胞の作成と内部状態評価

本項目では、人工細胞デバイスを使った融合細胞の内部状態評価のため、βガラクトシダーゼをコードしたプラスミドをあらかじめデバイス内に閉じ込め、融合細胞を作成することで、プラスミドからの酵素発現をモニターして評価する系の開発を行った。課題 2E から、βガラクトシダーゼに対する蛍光基質を供給してもらい、その発現を蛍光強度で定量したところ、1 融合細胞あたり平均で 25 分子のβガラクトシダーゼを発現していることがわかった。

3-2.　ゲノム起動の確認

本項目では、作成したゲノムが起動可能なものであるかを確認するための方法の開発として、マイコプラズマゲノム交換法の立ち上げを行った。まずマーカー遺伝子（テトラサイクリン耐性遺伝子、LacZ 遺伝子）をマイコプラズマ用プロモーター下に連結したコンストラクトを作製した。それを用いてクレイグベンター研究所で行われているマイコプラズマゲノム交換法を我々の研究室にも導入できたことを確認したが、その効率が非常に低く、1 度の実験において 1 個か 2 個しかコロニーを得ることができなかった。そこで、その効率を向上させるため手技や試薬の検討を開始した。

2-3 新たな課題など

特になし。

３．アウトリーチ活動報告

東京農業大学にて講演「小さな容器に細胞を作り込む」を行い、本研究開発を紹介した（2018 年 6 月 28 日）。