



ムーンショット目標 1

2050年までに、人が身体、脳、空間、時間の制約から
解放された社会を実現

実施状況報告書

2022年度版

細胞内サイバネティック・アバターの遠隔制御によって

見守られる社会の実現



山西 陽子

九州大学 大学院工学研究院



研究開発プロジェクト概要

身体が持つ免疫能力を拡張する細胞内サイバネティック・アバター（細胞内 CA）を開発します。医師・専門家が複数体の細胞内 CA を遠隔操作することによって、体内をパトロールして、疾患の原因となる細胞の悪性状態を検査して、必要に応じて除去し、体をいつも良い状態に保つことができるようになります。2050 年までに細胞内 CA に見守られて、安全・安心な日常生活と健康寿命の延伸を実現します。

https://www.jst.go.jp/moonshot/program/goal1/17_yamanishi.html

課題推進者一覧

課題推進者	所属	役職
山西 陽子	九州大学 大学院工学研究院	教授
横森 真麻	名古屋大学 未来材料・システム研究所附属未来エレクトロニクス集積研究センター	特任助教
閼闓 孝介	理化学研究所 開拓研究本部	専任研究員
菅野 茂夫	産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門	主任研究員
庄司 観	長岡技術科学大学 技学研究院	准教授
田川 美穂	名古屋大学 未来材料・システム研究所附属未来エレクトロニクス集積研究センター	准教授
木村 笑	九州大学 大学院工学研究院	助教
坪内 知美	自然科学研究機構 基礎生物学研究所	准教授
佐久間 臣耶	九州大学 大学院工学研究院	准教授
白崎 善隆	東京大学 大学院薬学系研究科	特任助教
鎌谷 高志	東京医科歯科大学 M&D データ科学センター	講師
鳥取 直友	九州大学 大学院工学研究院	助教
高橋 暁子	公益財団法人がん研究会 がん研究所 細胞老化研究部	部長
四元 聡志	東京薬科大学 生命科学部	助教
早川 健	中央大学 理工学部	准教授

1. 当該年度における研究開発プロジェクトの実施概要

(1) 研究開発プロジェクトの概要

本研究開発プロジェクトの初年度となる当該年度は、「細胞内 CA に見守られた」新たな生活様式の社会受容性の向上を図るために必要となる体制・基盤の整備に重点を置くとともに、細胞内 CA による新たな遠隔制御技術を創出するための基盤的な研究開発体制を整備し、それぞれの課題においてコアとなる要素技術の検討を開始した。

次年度以降において、「CA 搭載細胞の作製」から「細胞内 CA の遠隔制御性の評価」の流れを円滑に推進し、技術開発を飛躍的に加速させるためには、特に、PM を含む本研究開発プロジェクトの参画者全体で、研究開発項目間・研究開発課題間の連携体制を計画・整備・把握する必要がある。そのため、研究開発項目ごとに選出した代表者と、PM、PM 補佐をメンバーとする、「PM 支援体制チーム」を組織し、PJ 全体プロジェクトミーティング、研究開発項目間ミーティングを 1 回以上オーガナイズした。

各研究開発項目の実施内容の概要は以下のとおりである。

研究開発項目 1: 細胞内 CA の E³LSI 課題の調査・検証

研究開発項目 1 は、細胞内 CA の利用に対する社会受容性の向上を目指すために、E³LSI 課題検討部会の設置のための基礎調査に着手した。E³LSI 課題検討部会内に、細胞内 CA の倫理・法制度検討委員会および産業化検討委員会を設置するための基礎調査や人選のための情報収集を行った。

研究開発項目 2: 細胞内 CA の設計

研究開発項目 2 は、検査・除去・マーカー用細胞内 CA の設計のために、設計した細胞内 CA の機能を簡易的に評価できる実験環境を整え、細胞内 CA のプロトタイプを 1 種類以上設計することを目指した。

研究開発項目 3: 細胞内 CA の搭載

研究開発項目 3 は、研究開発項目 2 にて設計される細胞内 CA を、免疫細胞・がん細胞・老化細胞へ効率よく選択的に搭載するための技術開発を担当する。当該年度は各研究開発課題にて、搭載検討用の株化細胞を用いた培養条件下でのモデル分子搭載評価を開始した。

研究開発項目 4: 培養環境における細胞内 CA の遠隔制御評価

研究開発項目 4 は、CA 搭載細胞の詳細な動態計測・解析による細胞内 CA の遠隔制御性を評価する技術開発を担当し、当該年度は各研究開発課題にて、次の内容を実施した。細胞内 CA および搭載対象の細胞の物理特性の不均一性評価に基づいて、均質な細胞集団の分級、1～数細胞の動態計測に必要な基盤技術の設計および、計測データの解析の環境整備に着手した。

研究開発項目 5: 生体内における細胞内 CA の遠隔制御評価

研究開発項目 5 は、検査用・除去用・マーカー用の細胞内 CA を搭載した細胞の遠隔制御性を生体内で評価することを担当し、当該年度は各研究開発課題にて以降の内容を実施

した。細胞内 CA の搭載対象となる細胞を 1 種類以上選定し、適切な抽出方法の検討、細胞内 CA の遠隔制御性の評価のための実験系構築を開始した。

研究開発項目6:生体内模擬環境を利用した細胞内 CA の遠隔制御評価

研究開発項目 6 は、実験動物を用いない CA 搭載細胞の相互作用・遠隔制御性の評価プラットフォームの開発を担当し、当該年度は各研究開発課題にて以降の内容を実施する。3 次元評価プラットフォームの開発に必要な 3 次元生体模擬デバイスの部材選定・加工条件の検討を開始し、流体制御システム、細胞内 CA および CA 搭載細胞の投入システムの設計・試作に着手した。

2. 当該年度の研究開発プロジェクトの実施内容

(1) 研究開発項目1:細胞内 CA の E³LSI 課題の調査・検証

研究開発課題 1 : 細胞内 CA の E³LSI 課題の調査・検証

当該年度実施内容 :

研究開発実施内容 1-1-(a) E³LSI 管理体制および知財管理体制を整え、ガイドラインを作成

細胞内 CA の利用に対する社会受容性の向上を目指すために、E³LSI 検討部会設置の検討を 2023 年 2 月より開始した。E³LSI 検討部会内に、細胞内 CA の倫理・法制度検討委員会を設置することで、E³LSI の管理体制及び知財管理体制を整え、細胞内 CA の利用に対するガイドラインを作成するために、当該分野の研究・開発状況の基礎調査およびガイドライン作成に必要となる人材の検討およびアドバイザーとなる外部有識者の人選を開始し、2 月に対面にて概要を説明した。

研究開発実施内容 1-1-(b) ガイドラインの運用

細胞内 CA の利用に対するガイドライン作成の取り組みは、目標 1 での CA 技術と共通する部分が多いことが想定された。そこで、プロジェクト早期から目標 1 におけるプロジェクト間連携にて E³LSI に取り組むとともに、E³LSI を専門とする、法学者、社会学者、生命・医療倫理学者等の有識者にアドバイスを仰ぎ、課題発見と適切な解決方法を検討した。初年度である当該年度は、ガイドラインの作成に必要となる項目の洗い出しなどの議論を行うために、目標 1 におけるプロジェクト間連携などを視野に入れたガイドラインの策定と運用のための委員会の立ち上げを目指して、人選・働きかけを行いガイドライン策定・運用の準備を開始した。

研究開発実施内容 1-1-(c) 細胞内 CA の製造、設計部分のコンソーシアムの立ち上げ
E³LSI 検討部会内に、細胞内 CA の産業化検討委員会を設置するための基礎調査や人選に着手し 2023 年 1 月以降コンタクトを開始した (表 1)。細胞内 CA の製造・設計に関するコンソーシアムの立ち上げを主導し、細胞内 CA 利用の社会実装へ向けて、流通や保存などの実行的な経済的課題の洗い出しを行うための準備を開始した。

研究開発実施内容 1-1-(d) コンソーシアムの運用

細胞内 CA の製造、設計部分のコンソーシアムの効果的な運用のために、経験豊富な外部有識者を産業化検討委員会のアドバイザーとなるよう働きかけを開始した。

課題推進者：山西陽子（九州大学）

(2) 研究開発項目2:細胞内 CA の設計

研究開発課題1：シグナル変換機能を有する細胞内 CA の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 2-1-(a)情報読み取りが可能な人工的な核酸・ポリペプチドの設計

該当年度は、細胞内の情報を検出するための変換後シグナルとなる人工的な核酸候補を選定し、設計に着手した。

候補(1)(2)ともに核酸末端に蛍光分子 Cy5 を修飾する。蛍光を消光する効果をもつ金ナノ粒子の近傍に配置することでシグナルバックグラウンドを減少させ、感度向上効果を得る。これにより、マイクロプレートリーダーや蛍光顕微鏡を用いた検出を可能とする。候補(2)は DNA タグ配列を含む。DNA タグ配列は一般的な高感度核酸定量方法である qPCR を用いて検出するためのプライマー用共通配列を有する。

選定したシグナル核酸のデザイン評価として、候補(1)を金ナノ粒子に担持し、蛍光分子の消光効果について検討した。シグナル核酸担持金ナノ粒子とシグナル核酸単体について、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度測定した。その結果、シグナル核酸担持金ナノ粒子のサンプルにおいて蛍光分子の消光が確認された。

研究開発計画 2-1-(b)入力に伴い核酸・ポリペプチドを放出するナノ - マイクロ構造体の作製

研究開発計画 2-1-(a)で選定した人工核酸シグナル等を入力分子に応じて放出するシステムとして、核酸切断酵素を利用した放出システムを選定し、設計に着手した。近年、様々な分子をトリガーとして本酵素を活性化させる研究が進んでおり、本システムは汎用性が広いと考えられる。また、シグナル変換効率の評価を行うための実験系として、マイクロプレートリーダー、qPCR、光学顕微鏡を選定した。

課題推進者：横森真麻（名古屋大学）

研究開発課題2：化合物ベースの細胞内 CA の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 2-2-(a)化合物-人工受容体ペアのスクリーニング

化合物-人工受容体ペアのスクリーニングを行うプラットフォームとして、ヒト培養細胞を用いた実験系の構築を開始した。具体的にはヒト培養細胞のうち標的とする免疫系の細胞株を中心に、遺伝子導入の実績やカスパーゼ依存的にアポトーシスが誘導されるか

どうかを基準に検討し、スクリーニングに用いる細胞として選定した。さらに導入する人工受容体としては、化合物により 2 量体化が誘導されるユニットとカスパーゼを融合させた蛋白質を発現させることを計画した。そのために入手可能な市販のプラスミドを中心に選定を行い、レンチウイルスにより遺伝子導入することが可能なプラスミドを最初の人工受容体として設定した。

課題推進者： 閻 閻 孝介（理化学研究所）

研究開発課題 3： 遺伝子ベースの細胞内 CA の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 2-3-(a) if-then-else 機能をもつ遺伝子スイッチの設計・評価

If-then-else という条件分岐を起こす遺伝子ベースの仕組みの開発の準備段階として、設計のための遺伝子群を先行文献およびゲノムデータのサーベイによりリスト化した。検査用の細胞内 CA を搭載した細胞（CA 搭載検査細胞）、除去用の細胞内 CA を搭載した細胞（CA 搭載除去細胞）の宿主として有望な、ヒト白血病由来の細胞株の培養系を構築した。具体的には、安全キャビネット、CO₂ インキュベーター、ディープフリーザーを調達し、セットアップを完了した。また、GoldenGate クローニングや Gibson assembly 反応のプロトコールを、ヒトウイルスベクターを構築するために最適化した。以上の研究開発を通して、設計した遺伝子スイッチの評価を in house でスムーズに実行する研究環境を整えた。

課題推進者： 菅野 茂夫（産業技術総合研究所）

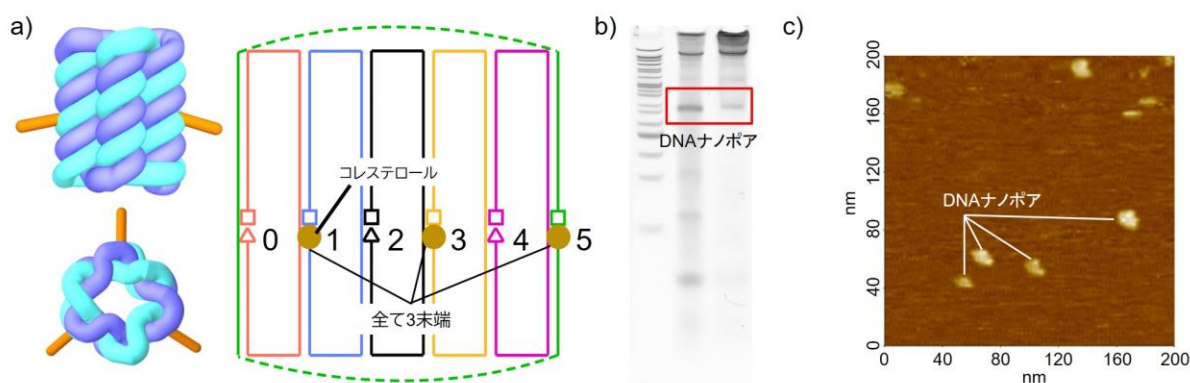
研究開発課題 4： 細胞膜チャネル様の細胞内 CA の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 2-4-(a) 細胞膜修飾ナノポア構造体の開発および人工細胞膜システムを用いた機能評価

(1) 合成 DNA ナノポアの作製

細胞死を誘導する合成ナノポアの開発を目指し、初年度は 2 nm の内径を有する合成 DNA ナノポアを作製した。6 本の二本鎖 DNA (dsDNA) がバレルを形成するように円周上に配

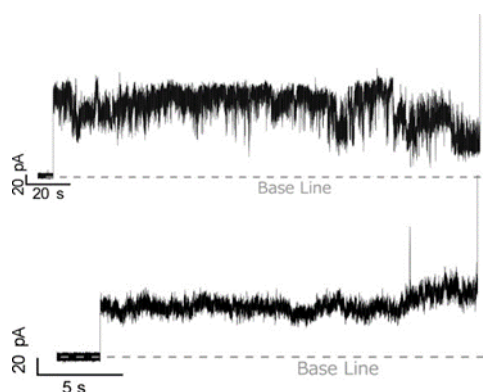


2-4 図 1 a) 合成 DNA ナノポアのデザイン b) 作製した合成 DNA ナノポアの泳動結果 c) DNA ナノポアの AFM 画像

列した構造体をデザインし、自律的に細胞膜に挿入されるように、コレステロールを3つ修飾した(図 1a)。アニーリングにより DNA ナノポア構造体をアセンブリし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により構造体の形成を確認した。その結果、DNA ナノポア構造体の形成を示すバンドを確認することができた(図 1b)。さらに、令和5年度に購入予定である原子間力顕微鏡(AFM)の機種選定を行うために、上記合成 DNA ナノポアの AFM 観察実験を実施した。その結果、任意の DNA 構造体が構築されていることが確認された(図 1c)。以上の結果より、直径 2 nm の合成ナノポア的设计および作製を達成した。今後は、内径がさらに大きい DNA ナノポア構造体を設計し、ナノポアの内径に対する細胞死誘導率の評価を実施する。

(2) 平面人工細胞膜を用いたイオン電流計測システムの構築

人工細胞膜を用いた合成ナノポアの評価系を確立するために、HL-60 細胞の主成分である 1,2-di-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)、1,2-di-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)、スフィンゴミエリン(SM)、コレステロール(chol)を用いた平面脂質二分子膜の形成実験を実施した。平面脂質二分子膜は、我々の研究グループで考案したマイクロ電極を用いた膜形成手法を用いて実施し、静電膜容量を計測することで、脂質二分子膜の形成を確認した。その結果、従来研究と同様に静電膜容量の上昇を確認することができ、HL-60 と同様の膜組成による脂質二分子膜の形成が示唆された。さらに、上記の DNA ナノポアを電解質溶液に加え、DNA ナノポアのイオン電流計測を行った。その結果、DNA ナノポアの膜挿入によるイオン電流の上昇を確認することができた(図 2)。今後は、本システムを用いて、DNA ナノポアのイオン電流計測を実施し、統計解析により DNA ナノポアのサイズや膜挿入時間・頻度を解析する。



2-4 図 2 合成 DNA ナノポアのイオン電流計測結果

(3) 巨大リポソームの構築

遠心沈降法を用いて上記の平面脂質二分子膜と同様の脂質組成を有する巨大リポソーム形成実験を実施した。その結果、上記の脂質組成においても巨大リポソームの形成が確認され、細胞内 CA 搭載細胞の膜組成を模倣した巨大リポソームを形成することに成功した。今後は、作製した DNA ナノポア構造体を本巨大リポソームに再構築し、蛍光分子の流出実験により DNA ナノポアの膜挿入性能を評価する

課題推進者：庄司観（長岡技術科学大学）

研究開発課題 5：細胞内小器官様の細胞内 CA の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 2-5-(a) タンパク質を封入・放出するナノ粒子の三次元構造体（細胞内小器官様の細胞内 CA）の作製

CRISPR-Cas9 封入のための、充填率の低い（結晶内空孔が大きい、格子定数が大きい）結晶の作製に取り組んだ。結晶内の空隙の評価として、X 線小角散乱 (SAXS) 測定により得られる DNA で連結されていないナノ粒子同士の最短表面間距離を指標とした。この結晶に GFP 修飾 RNP (Cas9; ~7.5 nm/gRNA; 5.5 nm (Mout, R. et al., Bioconjug. Chem. 2017, 28, 880-884)) を加えて室温下で 0.5~1 時間インキュベーションした。捕捉されなかった分子を洗浄除去後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて結晶への分子の結合状態を 3 次的に観察した。結晶断面の観察結果および蛍光強度のラインプロファイルより、結晶の表面だけでなく内部部分からも RNP 由来の蛍光強度が得られている、つまり、結晶内に RNP が封入されていることを確認した。

研究開発計画 2-5-(b) 人工核酸を封入・放出するナノ粒子の三次元構造体（細胞内小器官様の細胞内 CA）の作製

今後、様々な鎖長の人工核酸を扱うことを考え、本年度は鎖長の異なる DNA を DNA ナノ粒子結晶に封入することに取り組んだ。具体的には、DNA 修飾ナノ粒子を結合する DNA の鎖長を 3 種類準備し (System-I: 25 塩基, System-II: 16 塩基, System-III: 18 塩基)、それぞれ結晶化した。塩基配列が互いに相補的な二元系の結晶化の場合は、2 本のリンカー DNA で架橋する System-I, II、及び 1 本のリンカー DNA で架橋する System-III 共に結晶構造は最密充填構造よりも充填率の低い体心立方構造になることを X 線小角散乱により確認した。

課題推進者：田川美穂（名古屋大学）

(3) 研究開発項目 3：細胞内 CA の搭載

研究開発課題 1：物理刺激を利用した細胞内 CA の搭載技術と生体内導入技術の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 3-1-(a) 狙った細胞の CA 搭載細胞の作製 (in-situ インジェクション)

当該年度は、将来の免疫細胞に対する機能化（細胞内 CA の送達）を視野に入れ、血球系の浮遊細胞株への細胞内 CA 送達の基盤技術構築を開始した。ハイスピードカメラを用いた観察・評価より、エレクトロメカニカルポレーションの成立条件であるマイクロバブルの連続的な生成を生じる印加電界および電極周囲溶液の条件を検討し実験系を構築した。これより見出した条件下で、ヒト由来の血球系浮遊細胞株である Jurkat ならびに HL-60 細胞に対するプラスミド DNA の導入を行った。導入実験において 2×10^6 個の細胞に対して 15 ug のプラスミド DNA を使用し、これと同条件で実施したリポフェクション法との比較を行った。遺伝子導入操作 1 日後に蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察したと

ころ、リポフェクション法では、Jurkat 細胞に EGFP 陽性細胞を認めたが、HL-60 には一切認められなかった。一方、エレクトロメカニカルポレーションによる遺伝子導入では、低頻度 (< 1%) ではあったが、Jurkat と HL-60 細胞の両者に EGFP 陽性細胞を認めた。エレクトロメカニカルポレーションによる遺伝子導入は微小な電極の先端部に局在した領域で生じるため、観察された導入効率は過小評価されたものである。このことを考慮すると、エレクトロメカニカルポレーションを用いた方法は、従来法で導入が困難な浮遊細胞に対しても効率的に遺伝子導入を実現する方法であることが示唆された。

研究開発計 3-1-(c) 購入した組織への細胞内 CA または CA 搭載細胞導入

当該年度は、次年度以降に取り扱う動物検体での実験の条件を絞り込むために、組織を対象として、高速なマイクロジェットによる穿孔現象を、3-1-(a)で導入するハイスピードカメラを用いて観察・評価することで穿孔条件を絞り込み、基本的なシステム構築を行った。蛍光ビーズ(直径 2 μm)を用いた予備実験の結果、鶏ささみ肉への約 600 μm の穿孔深さを達成した。

課題推進者：山西陽子（九州大学）

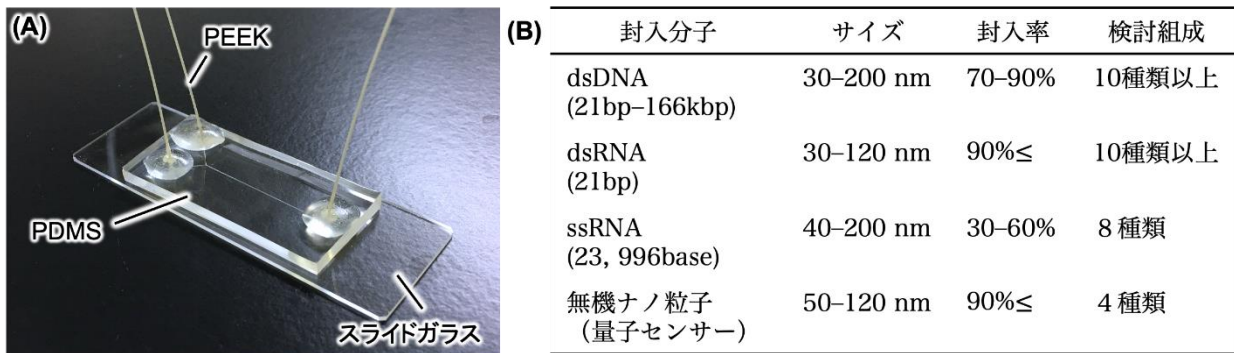
研究開発課題 2：細胞の嗜好性を利用した細胞内 CA の高効率搭載技術の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 3-2-(a) 細胞内 CA を封入/修飾したナノ粒子の作製

当該年度は、研究開発項目 2 において設計・合成される様々な大きさの細胞内 CA を封入するために、大きさの異なる複数のモデル分子・構造体を用いて、脂質ナノ粒子の作製条件の検討を開始した。分子量 2000 以下の細胞死誘導分子、数百 kbp の長鎖核酸、200 nm 以下の無機ナノ粒子をモデルに、DODMA、D-Lin-MC3-DMA といった代表的な人工合成脂質分子、DSPC や DOPE といった天然リン脂質を溶解させたアルコール溶液をモデル分子とともに、ポリジメチルシロキサン (PDMS) とガラスから成るマイクロ流体デバイスへ導入し、モデル分子の封入率、サイズ制御性を評価した。

粒子作製に使用したマイクロ流体デバイスを図 1 (A)に示す。流路構造にはこれまでに構築済みの流路構造を使用し、人工合成脂質分子 (2 種類)、天然リン脂質分子 (4-5 種類)、コレステロールをエタノールへ溶解させた脂質溶液と、封入分子を分散させた緩衝液をシリンジポンプを用いて別々の流入口から導入した。導入時の総流量及び、流量比 (緩衝液の流量/脂質溶液の流量) をそれぞれ 100-500 μL/min、流量比 2-5 の範囲で変化させ、粒子を作製した。作製した粒子の粒径は、研究開発項目 4-1 との連携のもと NTA を用いて測定した。モデル分子の封入率等の一覧を図 1 (B)に示す。本検討を通して、短鎖の核酸から情報量の多い長鎖核酸、さらに生体分子以外の無機センサー粒子の脂質ナノ粒子への封入が可能な粒子作製条件を見出した。



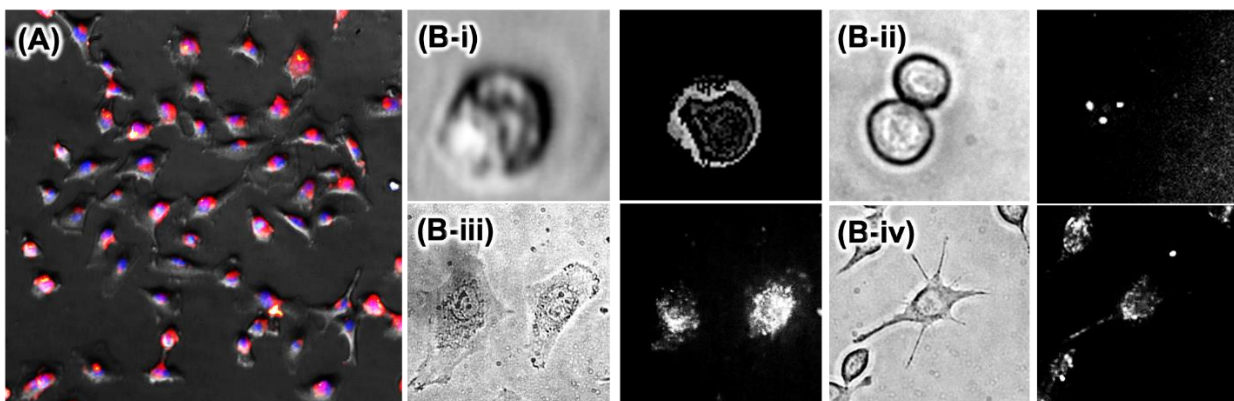
3-2 図1. 細胞内 CA を封入/修飾したナノ粒子の作製のための条件検討

(A) 粒子の作製に使用したマイクロ流体デバイス、(B) 細胞内 CA のモデルとして使用した封入分子と作製したナノ粒子の平均サイズ、モデル分子の封入率、検討した脂質分子の混合比の種類の一覧

研究開発計画 3-2-(b) 細胞内 CA 封入/修飾ナノ粒子を用いた標的細胞への分子輸送 (生体外)

細胞内 CA 搭載検討用のモデル細胞として Jurkat 細胞、HL-60 細胞、MDA-MB-231 細胞、THP-1 細胞の培養を開始した。さらに、研究開発計画 3-2-(a) で作製したナノ粒子のうち、モデル分子の 30%以上の封入が確認できたナノ粒子を、培養した上記細胞および RAW264.7 細胞、HeLa 細胞、ヒト好中球へ暴露し、取り込みを顕微鏡観察等によって評価した。

研究開発計画 3-2-(a) で作製したナノ粒子に脂溶性蛍光分子を標識し、粒子の細胞内輸送の可視化評価のモデル細胞へ、総脂質濃度が 200 μM 以下となるように Opti-MEM で希釈したナノ粒子懸濁液を暴露し、2 時間後の細胞内分布を顕微鏡観察によって評価した (図 2)。種々のモデル細胞によって粒子輸送を可視化した結果、図 2 (A) に示す様に、接着性のがん細胞およびマクロファージ様細胞に対するナノ粒子輸送はエンドサイトーシスを介して比較的容易に送達でき、一方で、浮遊性の血球細胞へのナノ粒子輸送は、好中球においては接着性がん細胞と同等の輸送効率であったが、単球様細胞 (HL-60)、T 細胞様細胞 (Jurkat 細胞) への輸送効率は低く、作製粒子の表面修飾等の粒子デザインの検討が必要であることが示唆された。



3-2 図 2. モデル細胞を用いた作製ナノ粒子の細胞内輸送評価

モデルがん細胞の粒子取り込みの可視化(青:細胞核、赤:ナノ粒子)、(B) 粒子の取り込みが顕微鏡観察によって確認できた細胞の明視野画像と粒子の細胞内分布画像の例、(i)ヒト好中球、(ii) Jurkat 細胞、(iii) HeLa 細胞、(iv) マクロファージ様細胞

課題推進者：木村笑（九州大学）

研究開発課題 3：細胞融合法を利用した細胞内 CA の高機能化技術の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 3-3-(a) 細胞融合によるナノ-マイクロ構造体の送達

(1) ヒト血球系の株化細胞と融合するキャリア細胞候補の選定の開始

マウス ES 細胞、マウス 神経系由来細胞について融合効率、生存率の観点から評価を行った。ES 細胞はマウス初期胚由来の細胞で、高いゲノム編集効率の実績がある。ゲノム編集を用いて蛍光蛋白(mClover)が付与された ES 細胞と、別の蛍光蛋白(mCherry)が付与されたヒト B リンパ細胞（セルライン）について、一般的に用いられる Poly-Ethylene Glycol(PEG)による融合効率は全体の 0.3%かそれ以下であることを見積もった。そこで融合した細胞について抗体ビーズを用いて単離を試み全体の細胞集団の中の融合細胞の割合を 22%まで持ち上げることができた。また、電気を用いた融合法について検討するために異なる電気条件で膜の強度を評価し、B リンパ細胞, ES 細胞、神経系細胞については同程度の電気条件で膜が破壊されるため、融合対象として適していると判断した。

(2) 染色体除去に応用する技術デザインを行い、必要となるマテリアルの構築を開始これまでに Cre-loxP を用いた染色体維持に必須な領域の除去、Cas9 を用いた染色体破壊などが実施されている。融合細胞からの染色体除去については実施例がないため、まずはリピート配列が多くマウス細胞における染色体除去に実績のある Y 染色体の除去について検討している。

課題推進者：坪内知美（自然科学研究機構基礎生物学研究所）

(4) 研究開発項目 4: 培養環境における細胞内 CA の遠隔制御評価

研究開発課題 1：CA 搭載細胞の高速・高精度分取技術の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 4-1-(a) オンチップ CA 搭載細胞の高速分級・分取技術の開発

サイズごとの粒子濃度等の細胞内 CA の均一性を評価した。また、顕微鏡観察環境における、免疫細胞等の細胞内 CA 搭載の対象となる細胞のサイズ等の均一性を評価した。高速分級・分取のためのマイクロ流体チップを設計した。

研究開発計画 4-1-(b) CA 搭載細胞の高精度回収技術の開発

課題推進者の従来研究に基づき、細胞回収のためのピペットの設計を行った。

課題推進者：佐久間臣耶（九州大学）

研究開発課題 2：CA 搭載細胞の動態計測・分取プラットフォームの開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 4-2-(a) CA 搭載細胞の動態計測プラットフォームの開発

研究開発項目 2、3 の連携によって創製される検査用および除去用の CA 搭載細胞の遠隔操作を十分な統計数で評価するために、課題推進者・白崎が有する 1 細胞分泌実時間イメージングの技術の深化・適応を行なっている。これにより、CA 搭載細胞・標的細胞の形態変化・走化性・増殖活性・表面抗原発現・細胞分泌・細胞傷害活性および細胞死などの細胞動態の時系列情報を 1 細胞粒度で計測・評価することが可能な動態計測プラットフォームの構築を目指している。特に当該年度は、まず、1 μm 以下の空間分解能と分単位の時間分解能で、CA 搭載細胞が発する微弱な蛍光シグナルを高感度に顕微鏡観察することを達成するための高感度・高精細カメラの選別を行った。候補としては、①浜松ホトニクス社 ORCA-Quest qCMOS カメラ: C15550-20UP、ORCA-Lightning ②デジタル CMOS カメラ: C14120-20P、③ORCA-Fusion BT デジタル CMOS カメラ: C15440-20UP および④Oxford (Andor) 社 Sona 4.2B-11 を、これまで白崎が使用していた⑤浜松ホトニクス社 ORCA-Flash4.0 V2 デジタル CMOS カメラ: C13440-20CU を基準に比較した。なお、マシンビジョン用などの CMOS カメラと比べ、scientific CMOS カメラはノイズが低く、ダイナミックレンジが広く (16bits)、また、CMOS カメラで特有のピクセル毎の基底シグナルのばらつきが補正されていることから、定量性に優れている。

Scientific CMOS カメラのシステム適応性の比較

カメラ	感度 (QE _{max})	有効素子サイズ (mm)	ピクセルサイズ	アスペクト比	読み出しノイズ	採用
①	90%	18.8×10.6	4.6 mm	16:9	0.27e rms	
②	60%	25.3×14.3	5.5 mm	16:9	2.0e rms	
③	95%	15 × 15	6.5 mm	1:1	0.7e rms	○
④	95%	22.5×22.5	11 mm	1:1	1.6e	
⑤ (基準)	70%	13.3×13.3	6.5 mm	1:1	>1.4e rms	

上記の表において、解像度（ピクセルサイズ）、広視野性（有効素子サイズ）、感度（QE_{max} の高さ、および読み出しノイズの低さ）においては、①のカメラが最も優れていたが、アスペクト比が 16:9 であった。動態計測プラットフォームに用いるニコン社 Ti2-E

は、視野数 25 (17.7×17.7 mm) であるため、①、②のカメラの広視野性が損なわれていた。よって、本システムでは、③のカメラを採用し、導入を行なった。

一方、細胞内 CA を搭載したモデル免疫細胞および、モデル標的細胞のがん細胞・老化細胞の生理的機能を正しく発現させるための培養環境、計測環境および観察チップの設計・製作・評価を行うため、光導波路型 LCI-S ユニットおよびチップの開発を行なった。特に本年度は、固形がん由来の細胞や老化繊維芽細胞を想定し、LCI-S チップの抗体固定センサー表面に細胞接着を促進するコラーゲンゲルをコーティングする条件の割り出しを行なった。

研究開発計画 4-2-(b) CA 搭載細胞の動態計測・分取プラットフォームの開発

設計した細胞内 CA が正しく動作していること、および、CA 搭載細胞の動態や連携・協調が制御されていることを評価するために、課題推進者・白崎が有する、時間分解細胞状態選択法を深化・適応することで、CA 搭載細胞の動態や複数の細胞内 CA の連携・協調に基づいて細胞内情報を把握するための高精度細胞分取プラットフォームを構築する。特に当該年度では、研究開発課題 4-1 と共同で、ピコリットルピペットの設計を行なった。また、研究開発課題 4-3 と共同で、細胞形態の画像解析とスループットが両立する対物レンズの倍率を選定するため、様々な倍率および撮像速度でデータ取得を行なった。結果、10 倍の対物レンズを選択した。マニピュレーションシステムの構成要件の検討とシステムの設計を行なった。

課題推進者：白崎善隆（東京大学）

研究開発課題 3：CA 搭載細胞の遠隔制御性のモデル化技術の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 4-3-(a) CA 搭載細胞の制御系評価システムの開発

機密情報を扱う上で第一に検討すべきセキュリティ面の安全性について、東京医科歯科大学の病院・大学の情報関係者が集まる情報慣例定例会で検討した。その結果、クラウドサービスの安全性に関して相談し GCP(Google Cloud Platform)、AWS(Amazon Web Services)、Microsoft Azure、さくらインターネットで利用できるデータサーバーは使用者が左右できるセキュリティ対策を十分行えば、安全面において大きな差はないと判断した。使用者が左右できるセキュリティ対策としては情報慣例定例会で相談し複数の方法を講じた。まずアクセスする端末にはパスワードを要求し、OS は最新のもの、最新のセキュリティソフトを入れることを使用可能な条件とした。使用者ごとの秘密鍵・公開鍵を準備し、秘密鍵使用時にもパスワードを要求することとした。秘密鍵のコピーは禁止とし、課題推進者一人につき、基本的には 1 つまでとした。秘密鍵のパスワードは東京医科歯科大学におけるパスワードポリシーのパスワードの要件を設定した。さくらのクラウドにはセキュリティソフトを導入し、サーバーに入れるファイルの機密性を分類し、例えばデータが入ったフォルダは、指定したユーザしかアクセスできないように設定した。今後も課題推進者と相談しながら使いやすく、安全に環境をアップデートしていく。

・必要な課題推進者からアクセスできるような環境構築

ストレージサーバーに機密データのアップロードを行う課題推進者が、セキュリティを十分に担保し、サーバーにアクセス可能な PC のセットアップを行う課題であり、環境構成は終了した。具体的には、セキュリティ要件に加えて、同 PC にはログインパスワードのパスワード要件の設定、指定ソフト以外のソフトのダウンロード時は相談することとした。FTP ソフトのインストールなど、サーバーアクセスに疎い課題推進者が速やかにデータアップロード可能となるような環境を構築し、データアップロードおよびデータ解析のみに使用する PC のセットアップが完了した。今後もデータにアクセスする課題推進者と相談しながら使いやすく、安全に環境をアップデートしていく。

研究開発計画 4-3-(b) 安全な細胞内 CA・CA 搭載細胞の制御系設計の探索技術の開発
IPA, KeyMolnet, Metacore, iPathwayGuide に関して調査した。iPathwayGuide は数ヶ月程度の試用契約がなく年間契約しかできず、使用回数に制限もある（年 50 分析）。細胞内 CA 導入の機能推定の探索は試行錯誤になり複数回の使用が推定されたため、iPathwayGuide は使用しない方針とした。その他の 3 種の有償パスイソフトを 3 か月使用し、検証した。

KeyMolnet : 日本発のソフトでありかつパスイ解析ソフトとしては古くから解析し実績がある。しかし、ライセンスキーが PC 縛りとなること、Window OS でしか動作しないこと、GUI の使いづらさなどから利便性が低かった。

Metacore : web ブラウザ上で行うため、どの端末からでも使用可能で GUI も見やすい。また他のパスイソフトにはない手法として複数のデータセットの比較解析が可能である。しかし scRNA-seq データなどを用いた既知の老化関連パスイが結果として提示されないこと、データの入力・出力時にエラーが多いことなどからやや利便性が低いと考えられた。

IPA : パスイ解析ソフトとして歴史が長く、データの蓄積量も多い。アクセス端末の上限はあるが、充分量である。また既知の老化関連パスイも正確に結果として出力され、信頼できかつ本研究に適切なパスイ解析ソフトと判断した。

・研究開発項目 2 と連携し、設計する細胞内 CA に関連する Gene Set の選定 : 各設計細胞 CA に対し 1 種以上

細胞内 CA の機能を推定するためには、その推定する機能に関連した Gene Set を見つけエンリッチされているかを確認する必要がある。本研究課題では計画されるショートストーリーに沿った遺伝子群に関連する Gene Set の選定を試み、今後さまざまなショートストーリーが挙げられる際にも同様のパイプラインで行うことができるように、Gene Set 選定の流れを決定した。まず、複数の課題推進者と共にショートストーリーに適切な細胞の選定を行った。次に、細胞内 CA の機能に関連した論文を蓄積し、適切と思われる遺伝子のスクリーニングを導入予定の細胞や機能を専門とする課題推進者とともに行った。次に発現変動を起こすと考えられる遺伝子セットを抽出した。その中で既知の疾患関連遺伝子を調べ、その遺伝子群が GSEA やパスイ解析で強く関連していることを確認し適切な Gene Set と判断した。

課題推進者：鎌谷高志（東京医科歯科大学）

(5) 研究開発項目5：生体内における細胞内 CA の遠隔制御評価

研究開発課題 1：CA 搭載細胞の抽出による生体情報取得技術の開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 5-1-(a) 目的細胞の分離システムの構築

体内の状態を体外で情報として取得、あるいは、検体から抽出した細胞を基に CA 搭載細胞を作製するためには、様々な物理指標を有する多種多様な細胞が混在する微量検体中から、体内循環した CA 搭載細胞および、細胞内 CA の搭載対象である細胞を選択的に分離する必要がある。本研究開発計画では、課題推進者・鳥取が有する、規則的な支柱配列を有するマイクロ流体デバイスを用いた細胞の分離技術を深化・適応し、検体から目的の細胞のみを分離する技術を開発する。ここでは、例えば、T 細胞や単球などの細胞が分離の対象となるが、これらの細胞をその他、多種多様な細胞が混在する検体中から選択的に分離するためには、分離対象の細胞の物理指標（細胞のサイズや形状）に合わせたマイクロ流体デバイスの設計が必須となる。そこで、当該年度は、微量のヒト・マウス検体を取り扱う前段階として、課題推進者の有するマイクロ流体分離システムを基に、ヒト血球系の株化細胞（Jurkat や HL-60 細胞）を用いて、物理指標に基づく分離システムの設計および基礎評価を行った。具体的には、選定した細胞を含む微量サンプルをマイクロ流路で処理するために、チューブや外部ポンプを用いることなく送液可能とするマイクロ流体デバイスの設計・評価を開始した。

具体的には、ポリジメチルシロキサン（PDMS）による脱気駆動流を用い、外部ポンプを利用することなく支柱配列流路へとサンプルを送液し、細胞をサイズに基づいて分離可能とするマイクロ流体デバイスを設計・試作した。作製デバイスの分離性能の評価実験では、モデル細胞（Jurkat や HL-60 細胞）を懸濁した溶液をマイクロ流路へと導入し、支柱配列流路内での細胞の流れの様子を察すると、導入された細胞は支柱配列流路の傾きに沿って斜向した後、標的細胞用の出口から順次回収される様子が確認された。

研究開発計画 5-1-(b) 検体からの目的細胞の分離・評価

上記 5-1-(a)の基礎評価結果にもとづき、次年度以降に、末梢血検体から目的細胞の分離・評価を行う準備として、実験倫理審査の準備を進めた。

末梢血を利用するために観察研究の倫理審査の手続きを開始した。具体的には、九州大学を主とする他機関共同研究として観察研究倫理審査申請書を提出し、その後の倫理審査委員会によるヒアリングまで完了した。

課題推進者：鳥取直友（九州大学）

研究開発課題 2：腫瘍・老化細胞を用いた細胞内 CA の遠隔制御性の体内評価

当該年度実施内容：

研究開発計画 5-2-(a) 細胞内 CA による標的細胞の認識目的の新たなマーカーの導入・修飾
マウス線維芽細胞株 (MEF) やヒト正常線維芽細胞株 (TIG-3, IMR-90) を用いて、継代培養による細胞老化 (replicative senescence)、放射線照射による細胞老化 (X-ray induced senescence) や抗がん剤による細胞老化 (DNA damage induced senescence) を誘導し、CDK 阻害因子 (p16、p21) や SASP (senescence-associated secretory phenotype) 因子の発現誘導と Lamin B1 の発現低下を RT-qPCR で確認を行った。細胞老化マーカーである SA- β -gal (senescence-associated beta galactosidase) 活性と増殖マーカーの BrdU 取り込み解析を用いて細胞老化の誘導を検証した。そして、ヒトとマウスの正常細胞と老化細胞を用いて、検査 CA に認識されるためのマーカー (老化細胞表面抗原) のスクリーニングを行うための実験系構築を行った。複数のがん細胞株を用いた実験系を構築し、今後研究開発項目 2 から 4 で開発される新たなマーカー用の細胞内 CA 導入の検討を開始した。

課題推進者：高橋暁子 (公益財団法人がん研究会)

研究開発課題 3：免疫細胞を用いた細胞内 CA の遠隔制御性の体内評価

当該年度実施内容：

研究開発計画 5-3-(a) CA 搭載細胞の作製に適した細胞の選定

マウス臓器からセルソーターや磁気ビーズ法を用いて造血前駆細胞や免疫細胞の単離精製法を確立した。また、各課題推進者が細胞内 CA の搭載方法などの検討を行いやすくするために、株化した造血前駆細胞や免疫細胞を購入して課題推進者間で共有できるようにした。

研究開発計画 5-3-(b) 細胞内 CA を搭載した免疫細胞の機能評価に適したモデルがん細胞の選定

細胞内 CA を搭載した免疫細胞の機能評価するために、標的となるような抗原を発現しているヒトがん細胞を購入して、また、マウスがん細胞に遺伝子導入を行い、標的となるような抗原を強制発現させた細胞を作製して維持培養法を課題推進者間で共有できるようにした。

課題推進者：四元聡志 (東京薬科大学)

(6) 研究開発項目 6：生体内模擬環境を利用した細胞内 CA の遠隔制御評価

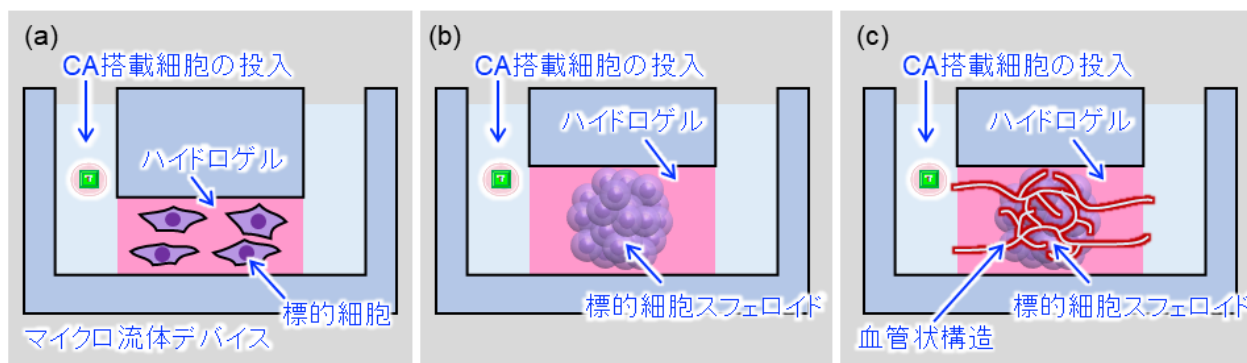
研究開発課題 1：細胞内 CA の遠隔制御性評価のための 3 次元生体模擬モデルの開発

当該年度実施内容：

6-1-(a) 3 次元生体模擬モデルの材料選定

3 次元細胞培養に適したゲル材料の調査、及びその加工性や材料特性を考慮した選定を行った。細胞培養に適しているコラーゲン、ゼラチン等のゲル材料を候補として最新の生体適合性材料の研究を調査し、適切な材料の選定及びバルクでの合成を開始した。まず、3 次元生体模擬モデルにおいて、3 タイプの試作品の要求仕様をまとめた (図 1)。

ゲルで標的細胞を包埋した簡易的なタイプ（図1 (a)）、標的細胞のスフェロイドを包埋したタイプ（図1 (b)）、標的細胞のスフェロイド内に血管新生を行い、生体の血管構造を模擬したタイプ（図1 (c)）の3タイプの作製を目指して材料、作製方法の検討を開始した。また、材料候補については、コラーゲン、GelMA、PEG-DA等、各材料の特徴、合成方法をまとめ、材料の調査を開始した（表1）。



6-1 図1 3次元生体模擬モデルのプロトタイプの様相

6-1 表1 3次元生体模擬モデルの材料候補の一部

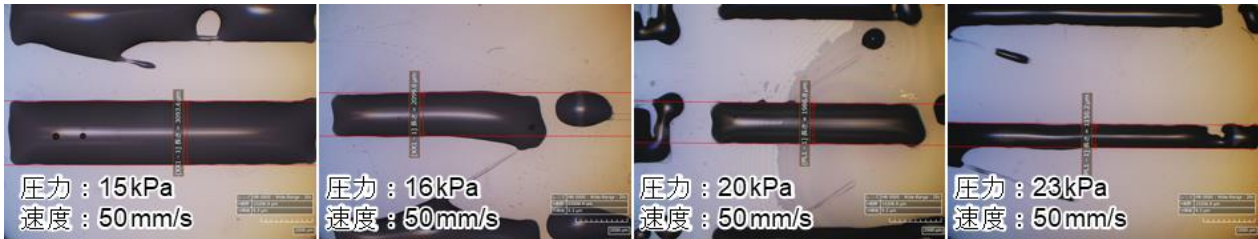
No.	材料名	生分解性	天然/人工	加工方法	弾性率
1	コラーゲン	あり	天然	温度（室温） 化学架橋 光架橋	0.1-1.0 kPa
2	ゼラチン	あり	天然	温度（室温）	
3	フィブリン	あり	天然	温度	0.01-1.5 kPa
4	GelMA	あり	人工	光架橋	0.1-100 kPa
5	PEG-DA	なし	人工	光架橋	0.01-10 kPa
6	ヒアルロン酸	あり	天然	物理架橋 化学架橋 酵素反応	0.01-2.5 kPa

6-1-(b) 3次元生体模擬モデルの加工技術の開発

6-1-(b)で選定した材料候補を用いて、ゲル材料の3次元加工技術の検討を開始する。特に、フォトリソグラフィ、ソフトモールドニング等の微細加工での加工に加えて、多様なゲル材料を複数同時造形可能なバイオ3Dプリンターを導入し、種々の材料に対する加工条件の検討を開始する。

まず、バイオ3Dプリンタとして多種材料の造形が可能、かつ加熱、冷却、光架橋など様々な加工が可能なCELLINK BioXを導入し、立ち上げを行った。導入したバイオ3Dプリンタを用いて、まずはコラーゲンゲルのラインパターンでの造形を行い、基礎評価を

開始した (図 2)。



6-1 図2 バイオ 3D プリンタによるコラーゲンゲルのラインパターンの描画

課題推進者：早川健（中央大学）

研究開発課題 2：細胞内 CA の遠隔制御性評価のための 3 次元評価プラットフォームの開発

当該年度実施内容：

研究開発計画 6-2-(a)流体制御システムの開発

流体制御口を有する 3 次元生体模擬モデル専用のインキュベータ開発のために、流体制御システムへの基本要件事項を調査した。

拍動機能を有するポンプシステムの設計および試作を行った。

研究開発計画 6-2-(a)細胞内 CA・細胞内 CA の投入システムの開発

3 次元生体模擬モデル内への細胞内 CA・CA 搭載細胞の投入のために、投入システムへの基本要件事項を調査した。

課題推進者：佐久間臣耶（九州大学）

3. 当該年度のプロジェクトマネジメント実施内容

(1) 研究開発プロジェクトのガバナンス

進捗状況の把握：当該年度は、以下の PM 補佐、各研究開発項目代表から構成される PM 支援体制チームを立ち上げた。

- ・ PM 補佐：佐久間臣耶（九州大学）
- ・ 研究開発項目 1 代表：山西陽子（九州大学）
- ・ 研究開発項目 2 代表：菅野茂夫（産業技術総合研究所）
- ・ 研究開発項目 3 代表：木村笑（九州大学）
- ・ 研究開発項目 4 代表：白崎善隆（東京大学）
- ・ 研究開発項目 5 代表：鎌谷高志（東京医科歯科大学）
- ・ 研究開発項目 6 代表：佐久間臣耶（九州大学）

本 PM 支援体制チーム及び PM は、当該年度進捗管理のために、以下のミーティングを行った。

- ・全体プロジェクトミーティング 1回（令和4年 12月19日）
- ・研究開発項目間ミーティング 2回
（項目4-6：令和4年12月23日，項目2-3：令和4年12月27日）

PMは上記に加えて、以下を主導した。

- ・PM支援体制チームを参加者とする運営会議1回（2022）。
- ・倫理的・法制度的・社会的・経済的課題（E³LSI課題）に関するE³LSI課題検討部会の設置の検討、準備の着手（研究開発項目1に関連）。

研究開発プロジェクトの展開：本研究開発プロジェクト開始の初年度であり、研究開発課題の実施期間が非常に短い。そのため、各研究開発課題推進者が、上記のPM支援体制チームがオーガナイズする1回の全体のプロジェクトミーティングおよび研究開発項目間ミーティングを通して、本研究開発プロジェクトの方向性、各研究開発課題の位置付け、本開発プロジェクトで実施を予定しているステージゲート等の運営体制について課題推進者に周知した上で、次年度の課題推進に取り組める体制を構築した。PMは項目の境界を超えるシームレスな運用体制となるよう、E³LSI課題の共有、研究開発倫理教育、データの取り扱いに関するルールの周知徹底、および、データマネジメントプランについて運用体制の基盤構築・整備の主導を行った。

（2）研究成果の展開

研究開発プロジェクトにおける知財戦略や知財出願について：立ち上げの準備を行う+E³LSI課題検討部会において、研究開発された知的財産の早期確認を行い、各研究機関の知財管理部署と連携し、特許マップを見据えた特許出願戦略を取れる体制構築の検討を行った。

技術動向調査、市場調査等について：PM主導のもと、次年度から開催する、関連分野の研究者・企業等を広く集めた有識者会議の検討を開始した。幅広い意見・情報を取り入れ、最新の技術動向、市場の状況について調査する技術動向、および市場調査を積極的に推進するため、専門のPM補佐を新たに雇用する。

事業化戦略、グローバル展開戦略等の立案に向けた体制、計画等：まず、細胞内CA産業化基盤を日本に構築することを目指し、情報集積システムの早期構築、アルゴリズムの秘匿・権利化を進めるために、当該年度はE³LSI課題検討部会内に、細胞内CAの産業化検討委員会を設置する準備を行った。設置する産業化検討委員会は、次年度に飛躍的な進捗が見込まれる、各研究開発項目および課題に対して、それぞれの担当者と連携し、特許マップ作成、パテントプール構想の検討を行い、細胞内CAの製造、設計部分のコンソーシアムの立ち上げを主導することについて計画を進めた。

E³LSI管理体制および知財管理体制を整え、細胞内CA利用のガイドラインの作成に向けて活動し、事業化、グローバル展開を推進することを目指すため、早期から実験倫理マップの作成、実験項目レビュー、特許マップ作成、パテントプール構想等の本プロジェクト

導入の検討を行った。

技術移転先、将来的な顧客開拓に向けた対応について：当該年度は、PM および、新たに雇用する専門の PM 補佐が主体となって、次年度の講演会・シンポジウム・展示会への出展の計画を目的とした情報収集を行った。PM は、本研究開発プロジェクト始動とともに、着手可能な SNS を通じた情報発信の情報収集を行った。

(3) 広報、アウトリーチ

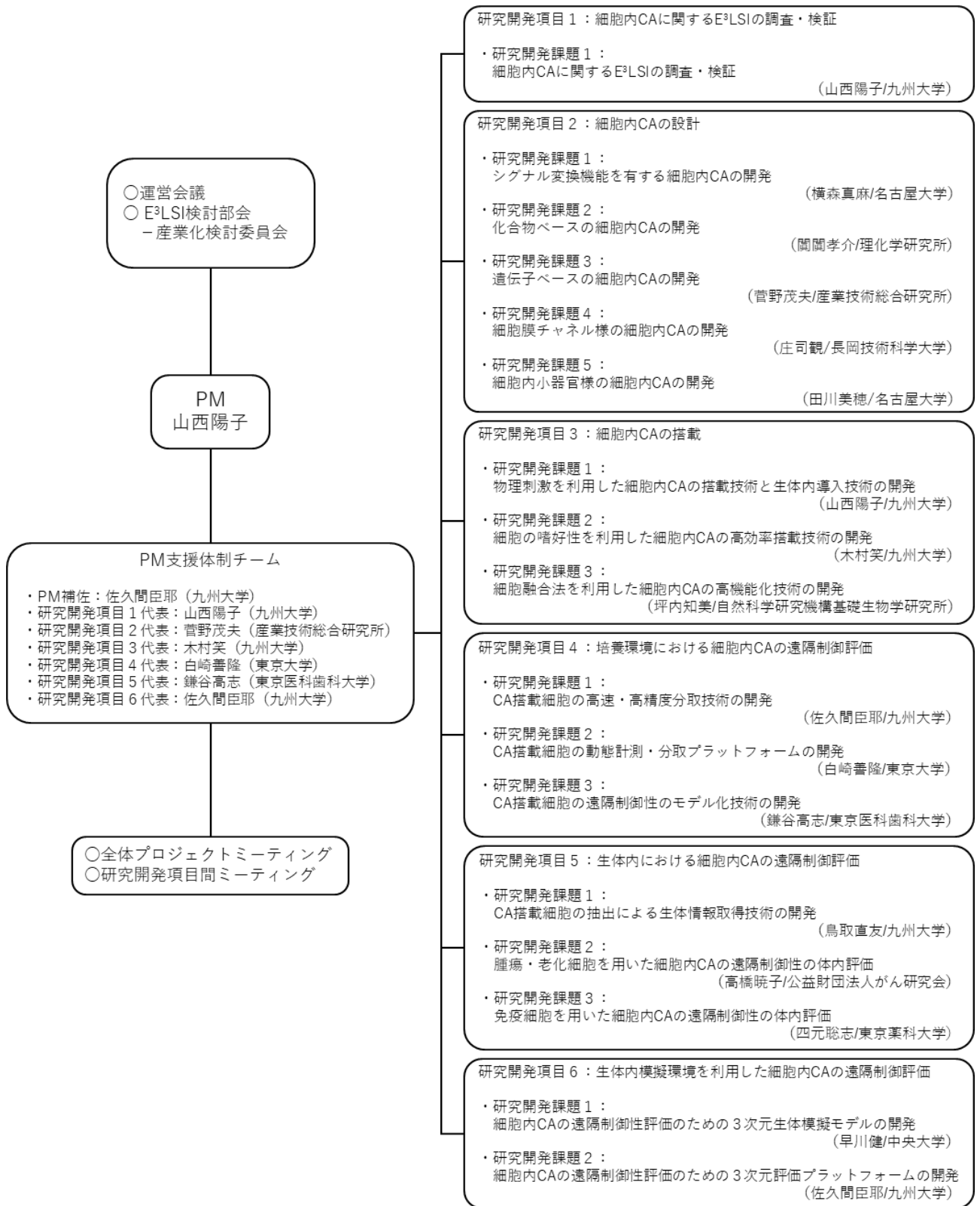
シンポジウム等の開催による国民との対話について：当該年度は、PM 主導のもと、次年度に開催する関連分野の研究者・企業等の有識者を広く集めたシンポジウムの開催を計画し、対外的な情報発信を行うことで調整を行った。

ホームページ、リーフレット等による積極的な広報、アウトリーチ活動について：PM および、新たに雇用する専門の PM 補佐が主体となって R 5 年度のホームページ運用のための準備を行った。

(4) データマネジメントに関する取り組み

当該年度は、PM 主導のもと、データの取り扱いに関するルールの周知徹底、および、データマネジメントプランを適切な運用に対する体制の整備を行い、PM 補佐より令和 4 年 12 月 19 日に開催された全体プロジェクトミーティングで周知を行い、明確なルールの運用を徹底した。本研究開発プロジェクト参画者全員に対して、データの取り扱いに関してルールを明確化し、データの取り扱いに関する合意書を作成した。

4. 当該年度の研究開発プロジェクト推進体制図



知財運用会議 構成機関と実施内容

- ・該当なし

運営会議 実施内容

全体プロジェクトミーティング 1回（令和4年 12月19日）

- ・研究開発項目間ミーティング 2回

（項目4－6：令和4年12月23日，項目2－3：令和4年12月27日）

- ・ショートストーリー会議（令和5年2月24日）

5. 当該年度の成果データ集計

【様式410】研究開発プロジェクト成果情報一覧の「集計」シートの値を記載してください。
プロジェクト内(PM 及び課題推進者間)で同一の成果を重複して計数することがないようにお願いします。

知的財産権件数				
	特許		その他産業財産権	
	国内	国際(PCT 含む)	国内	国際
未登録件数	0	0	0	0
登録件数	0	0	0	0
合計(出願件数)	0	0	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	6	1	7
口頭発表	0	0	0
ポスター発表	0	0	0
合計	6	1	7

原著論文数(※proceedings を含む)			
	国内	国際	総数
件数	0	0	0
(うち、査読有)	0	0	0

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	0	0	0
書籍	0	0	0
その他	0	0	0
合計	0	0	0

受賞件数		
国内	国際	総数
0	0	0

プレスリリース件数
0

報道件数
0

ワークショップ等、アウトリーチ件数
1