

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：83205

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22510128

研究課題名（和文） 高効率ハイスループット抗原特異的抗体産生細胞スクリーニングチップの研究開発

研究課題名（英文） Development of a high throughput screening chip for antigen-specific antibody-secreting cells

研究代表者 小幡 勤 (OBATA TSUTOMU)

富山県工業技術センター 中央研究所 副主幹研究員

研究者番号：30416143

研究成果の概要（和文）：抗原特異的に抗体を産生するリンパ球をスクリーニングするチップを開発した。チップ上にマイクロ磁性スポットとマイクロウェルを形成することで、従来シリコン基板を利用して作製した同様のチップと比較して4倍以上の細胞利用率とスクリーニング性能を実現した。

研究成果の概要（英文）：We developed a high throughput screening chip for antigen-specific antibody-secreting cells. By forming the micro-wells and micro-magnetic spots on the chip, we realized high screening performance and cell utilization compared with the chip using a silicon substrate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,800,000	540,000	2,340,000
23年度	800,000	240,000	1,040,000
24年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：MEMS、バイオ、免疫、抗体

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザなどのウイルス感染症は、ワクチン接種による免疫の獲得によってある程度は予防可能である。この方法によると、流行が予想されるウイルスの形をあらかじめ想定した後、約6ヶ月程度の期間を経て初めて目的のワクチンを手に入れるというプロセスとなる。しかし、ワクチンの製造期間が非常に長いことや想定していたウイルスがその間に変性したりすると効果が低いなどのデメリットも有する。特に新型インフルエンザなどは、これまでにヒトが感染を経験していない未知のウイルスとなるのでワクチンによる対策では、ヒト-ヒト間で起こる

爆発的な流行（パンデミック）に対応することはできない。

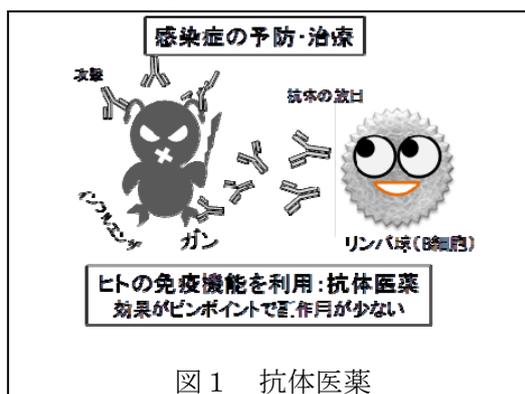
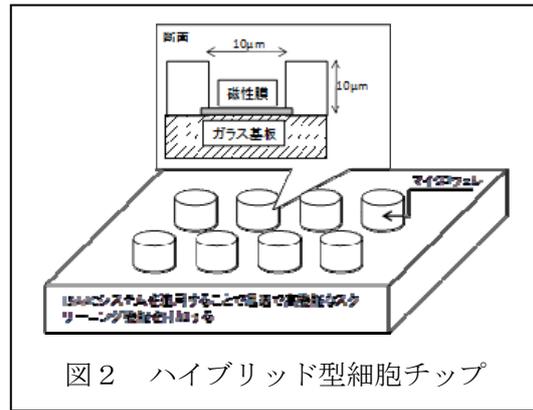


図1 抗体医薬

抗体医薬の特徴(図1)は、ヒトが体内に持っている免疫機能を利用していることにある。免疫機能は主に血液中のリンパ球がそれを担っており、その中でBリンパ細胞と呼ばれる白血球が体外から侵入した異物(抗原という)を攻撃する抗体を作る役割を持っている。現在の抗体医薬は、抗原に対して1種類の抗体を作るモノクローナル抗体が主となっている。この抗体は特定のウイルスや癌細胞など特異的に反応を起こすことから、これを元に開発された医薬品は毒性もなく、副作用のリスクも非常に低い。そのため現在開発中の医薬品の実に25%が抗体医薬品と言われ、その市場は非常に大きいことが見込まれている。以上の医療的な背景から製薬各社は、このモノクローナル抗体をベースにした抗体医薬品の開発に注力しているが、抗体取得の特許やノウハウなどの技術的な問題をはじめ、現在主流の抗体獲得技術では目的のモノクローナル抗体を選別するまで約6ヶ月の期間を要し、また得られる抗体の品質も必ずしも高い物では無かった。特にヒト抗体については、ヨーロッパや米国でほとんどが特許化されており、新しい抗体取得技術を開発しなければ高いロイヤリティがコストとして重くのしかかる結果となる。研究代表者らは、これまでに半導体基板であるシリコンを、MEMS技術を使って微細加工を行い、Bリンパ球を1つ単位で取り扱える細胞チップを開発してきた。抗体を産生する細胞は、抗原で刺激することによって起こる細胞内のCa⁺イオンの上昇をモニターすることで選別していたが必ずしも良い結果が得られなかった。そこでBリンパ球が産生する抗体と抗原の結合を直接観察可能でかつ短期間(6ヶ月→1週間に短縮)で高品質な抗体を産生する細胞のスクリーニングする技術:ISAAC(ImmunoSpot Array Assay on a Chip)法を開発し、関連特許を取得、さらにその成果は、米国科学雑誌「Nature Medicine」Vol.15 No.9 2009に掲載され、国内外に注目されている。

シリコンで作製されるISAAC用細胞チップは、ヒトの末梢血から得られたBリンパ球をその表面にばらまき、チップ上に作製されている直径10μmのマイクロウェルに一つ一つ収納される構造になっている。しかしマイクロウェルへの細胞の収容は重力沈降に任せているので、その収容率は40~50%程度となっており、少ない細胞を効率良くスクリーニングできるシステムとはなっていない。これは、ウェルに収容されずにチップ表面に浮遊している細胞が多いこと、それらを取り除く際の洗浄工程で一端ウェルに入った細胞も流れ出てしまうことが一因となっている。

2. 研究の目的



ヒトの免疫機能を利用した抗体医薬を開発するためには、特定のウイルスを特異的に攻撃する抗体を作り出す免疫細胞を選別する医療用チップデバイスが必要である。

1. 免疫細胞を個々に扱うことができ、目的の抗体を産生する細胞を1細胞単位で見つけ、回収することが可能
2. チップは細胞をアクティブにトラップする機能を有し、少ない細胞を高効率で利用可能
3. 世界的にも注目されている独自の免疫細胞スクリーニング技術を組み合わせ、短期間で高品質な抗体を獲得できる細胞チップを開発する。

3. 研究の方法

以上を解決するためには、細胞を何らかの力で強制的にウェルに収容し、一時的に固定する機能を持つ細胞チップが必要となる。そこで、研究代表者はターゲットとなるBリンパ球が表面を磁気修飾することでゾート可能なことを利用し、細胞チップに磁気によって細胞を配列させることを考えた(図2)。このチップは基板上に形成されたマイクロウェルの底に磁性膜を作製し、その磁気によって細胞をトラップする。またこのチップの材料をシリコンではなく安価で透明なガラスをベースとし、さらに生産性の悪いドライプロセスではなく、めっきによって磁性膜を形成する。磁性めっき膜の磁気あるいは外部磁界がめっき膜部で収束して形成された磁界に磁気修飾された細胞が、引き寄せられ固定する。細胞への磁気修飾は、従来から利用されている磁気ビーズを利用する。このようにして作製されたアクティブ機能を持つ細胞チップとすでに開発済みのISAAC法を組み合わせることで、細胞のスクリーニングの効率が劇的に向上することが期待できる。本研究では、マイクロウェル底に形成する磁性膜の作製方法、ウェルの形成方法及びそれらを再現性よく実現するプロセス開発が必要である。これらを研究期間内にほぼ完成させ、従来のシリコンチップを利用した抗体作製プロトコルからの移行を検討していく必要もある。

本研究は独自に開発した細胞スクリーニング技術と細胞一つ一つをアクティブにマイクロウェルに収容し、短時間に解析、回収可能な機能を持つハイブリッド型細胞チップを開発するというユニークなテーマである。本研究によって開発された細胞チップが、抗体医薬開発へ応用されれば、新興感染症や癌などに対してスピーディーでかつ効果的な医薬品を開発することが可能で、世界の医療技術が画期的な進歩を遂げることが期待される。

細胞を磁気誘導するためのマイクロ磁性膜はめっき技術によって作製をおこなう。開発するチップは不透明なデバイスでもかまわないが、一部透明性を確保すると医療研究者が直接マニュアルで観察、細胞の採取が可能な機能など付加価値をつけることができる。これは、エッチング技術と合わせ耐エッチング技術などを考慮して実現していく要素技術となる。これらをベースとして、細胞をより効率良くトラップするためのウェル構造を形成する技術として、フォトリソグラフィやインプリント技術がある。10 μm 以上の厚膜フォトレジストを10 μm 以下の解像度で加工することは懸案事項の一つとなっている。また、フォトリソグラフィではなく、インプリントなどで開発されている技術を置き換えとして検討すれば、形状のよいウェルの形成が可能になると予想され、自家蛍光が少ない材料や、塗膜技術などと合わせて調査していく必要がある。ここまでの技術で、ハイブリッド型細胞チップのほとんどが完成するが、さらに独自の特許技術であるISAAC法を適用することで、抗体産生細胞スクリーニング用細胞チップとして圧倒的な性能を誇ることができる。

4. 研究成果

目的とするスクリーニングチップは、半導体微細加工技術を利用するシリコンチップとは異なり、比較的汎用的な設備及び技術を用いて開発することにした。これまで、シリコンの深掘り加工技術を応用して作製して

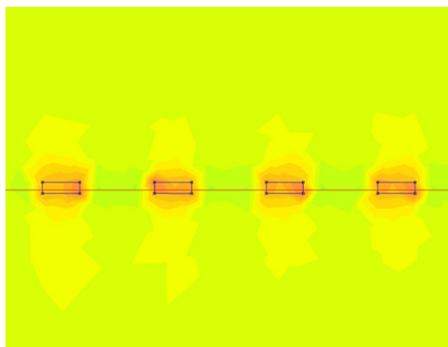


図3 スポット周りの磁束分布

いたマイクロウェルは、フォトリソグラフィによる樹脂による形成を目指した。また、シリコンには無かった機能である細胞を吸引する機構については、チップ上にマイクロ磁気スポットを形成し、磁力によって磁気修飾された細胞を引き寄せることにした。図3は有限要素法により簡易シミュレーションした結果である。このように基板上にマイクロ磁気スポットを形成し、チップ下部より磁束を供給すると、磁気スポット上10~20 μm の磁束密度の向上が見られる。これを利用することによって磁気修飾された細胞を正確にマイクロウェル内に引き寄せることが可能である。

(1) 磁性膜の形成と自家蛍光対策

磁性膜は蒸着、塗布、めっきなどにより形成可能である。本研究では量産性に優れ、膜形成時にすでに磁性を有する電気めっきによる磁性膜の形成をおこなった。約10 μm の磁性膜を形成し、その直上にマイクロウェルを形成することとした。ガラス基板上に100nm厚のクロム薄膜を形成し、直径10 μm の丸穴をフォトリソグラフィでパターンニング、穴から露出したクロム薄膜上にニッケル薄膜をめっきで析出させた。この工程において、丸穴表面におけるフォトレジストの極薄の残渣によりめっきの密着性にばらつきが生じた。対策としては酸素プラズマによるレジストのアッシングをおこない、これを改善した。めっき厚は細胞の吸引をおこない、2 μm 以上あれば有効であることを確認した。

磁性膜上に形成されるマイクロウェルは、厚膜レジストである東京応化工業(株)PMERN-CA3000PMを利用して作製した。一般的にフォトレジストはその材料、及び架橋剤などの添加剤由来の自家蛍光を有している。本研究の最終目的である細胞のスクリーニングは主に蛍光顕微鏡を利用した作業であるため、自家蛍光は細胞からのシグナルをマスクする方向に働いてしまう。細胞からの微弱な信号を確実に観察するためには、バックグラウンドを最小限に抑える必要があり、フォトレジストからの自家蛍光抑制は大きな課題となった。そこで細胞に対して無害でかつ自家蛍光を持たないシリコンを薄くレジスト表面に成膜することで、下地の蛍光を遮光した。また、さらにシリコンの上にシリコン酸化膜を成膜することで、抗体結合に関してコントロールできる表面を実現した。

(2) 試作工程とスクリーニング結果

試作工程は図4の通りである。ガラス基板にスパッタでCr薄膜を成膜、フォトリソグラフィで磁気スポットパターンを形成する。続いて電気めっきにより、Ni薄膜を2~3 μm 形成し、レジストを完全に剥離した。厚膜レジストを塗布後、裏面から磁性膜をマスクパターンとするセルフアライメント方式によ

り露光、マイクロウェルを形成した。スパッタでシリコン、シリコン酸化膜を形成し、最後に表面をシリル化した。

図5はシリコンチップと本研究チップとの細胞捕獲の比較である。シリコンチップは捕獲性能が劣ることからマイクロウェル数の4倍量の細胞、開発品には0.65倍量の細胞

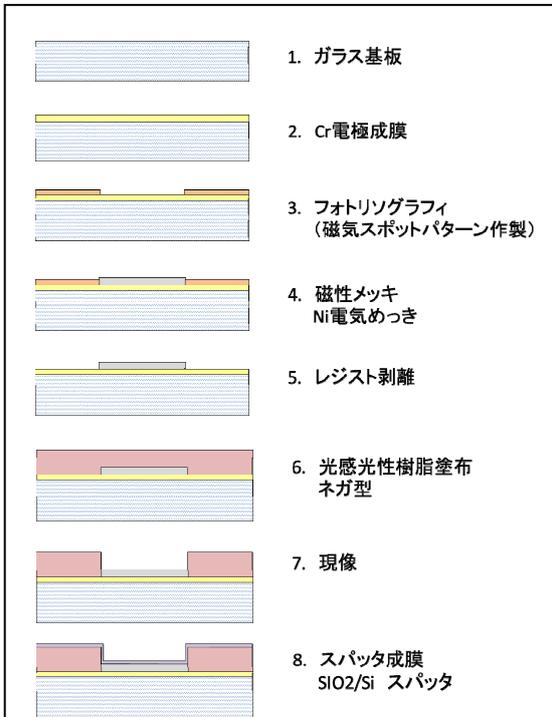


図4 試作プロセス例

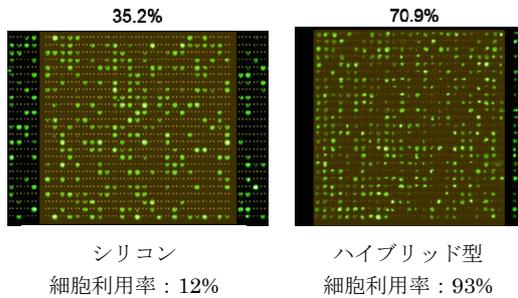


図5 細胞利用率

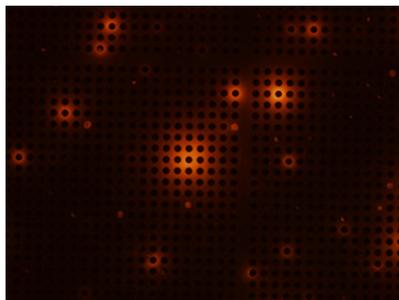


図6 ISAACによる評価

胞を投入した。投入細胞数とそのウェルへの充填率から細胞収容率を比較すると、シリコンは20%程度にとどまるのに対し、開発品は90%以上であることがわかった。さらに図6のように抗体探索においても良好な結果が得られた。

(3) チップの透明化検討

開発したチップの汎用性を向上させるために倒立顕微鏡で観察可能な透明なチップの開発を検討した。

チップの透明化にあたり、課題となるのは以下の点である。

- ・透明なフォトリソの探索
- ・自家蛍光

透明なレジストは、ダウコーニングのWL-5351が挙げられる。シリカベースのシリコン樹脂であるため、自家蛍光が非常に低い。しかしながら検討中に生産のディスコンが決まったことから新たな材料を探索した。東京応化工業(株)と共同で、従来からある透明レジストを最適化することにより低自家蛍光のレジストを実現することが判明したことから、当該レジストTMMR-0034PMの開発に協力し、商品化をおこなった。図7は従来のレジストと当該レジストの自家蛍光強度の比較である。ゲレースケールで5分の1に自家蛍光が抑制されている。さらに自家蛍光を抑制するために、励起波長による照射処理により蛍光の消光に成功し、さらに30%の自家蛍光を減少させた。

マイクロウェル中に収められた細胞を蛍光観察するには、従来のベタの磁性スポット形状では実現ができない。そこでスポット形状をドーナツ型とし、磁性膜中心部からウェ

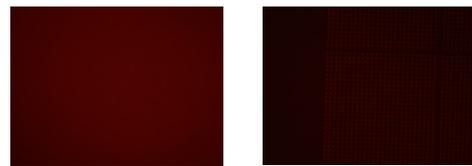


図7 従来品(左)と新型レジスト(右)における自家蛍光の比較(※右は感度を上げて撮影)

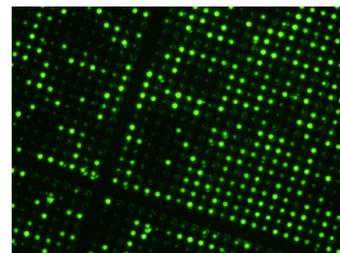


図8 チップ裏面からの観察

ル中の細胞を観察可能とした。図8はチップ裏面からウェルに収められた樹脂ビーズを観察したものである。

(4) まとめ

以上のように磁気を利用して細胞の利用効率を格段に向上させた、リンパ球などによる抗原特異的免疫細胞スクリーニングチップを実現した。

試作したチップは、富山大学医学部免疫学およびビバリス・ジャパン・トヤマ株式会社などで評価され、今後も検討を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①小幡勤、医療用デバイスとめっきによる高機能化、表面技術、査読無、62巻、2011、625-629

[学会発表] (計1件)

①小幡勤、医療用デバイスとめっきによる高機能化、表面技術協会 将来めっき技術検討部会、2011年1月28日、大崎会館(東京都)

②小幡勤、高見幸子、岸裕幸、抗原特異的抗体産生細胞スクリーニングチップの開発、平成23年電気学会全国大会(大阪大学豊中キャンパス)

③Hiroyuki Kishi, Tsutomu Obata, Sachiko Takami, Masayuki Kazui, Tatsuhiko Ozawa, A kio Ogawa, Atsushi Muraguchi, ANALYSIS OF CELLULAR RESPONSES AT SINGLE CELL LEVELS WITH A HYBRID MAGNETIC MICROWELL ARRAY CHIP, The 6th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis

[図書] (計1件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計6件)

名称: マイクロウェルアレイチップおよび細胞の回収方法

発明者: 小幡勤、岸裕幸、高見幸子

権利者: 富山県、富山大学

種類: 特許

番号: 特願2011-015652

出願年月日: 2011年1月27日

国内外の別: 国内

名称: マイクロウェルアレイチップおよび細胞の回収方法

発明者: 小幡勤、岸裕幸、高見幸子

権利者: 富山県、富山大学

種類: 特許

番号: 特許、特願2011-219147

出願年月日: 2011年10月3日

国内外の別: 国内

名称: マイクロウェルアレイチップおよび細胞の回収方法

発明者: 小幡勤、岸裕幸、高見幸子

権利者: 富山県、富山大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/76938

出願年月日: 2011年11月22日

国内外の別: 国外PCT

名称: マイクロウェルアレイチップおよび細胞の回収方法

発明者: 小幡勤

権利者: 富山県

種類: 特許

番号: 特願2012-163286

出願年月日: 2012年7月24日

国内外の別: 国内

名称: マイクロウェルアレイチップおよび細胞の回収方法

発明者: 小幡勤

権利者: 富山県

種類: 特許

番号: 特願2012-264012

出願年月日: 2012年12月3日

国内外の別: 国内

名称: マイクロウェルアレイチップおよび細胞の回収方法

発明者: 小幡勤

権利者: 富山県

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/56605

出願年月日: 2013年3月11日

国内外の別: 国外PCT

○取得状況 (計1件)

発明者: 小幡勤、岸裕幸、高見幸子

権利者: 富山県、富山大学

種類: 特許

番号: 特許第4951144号

取得年月日: 2012年3月16日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡 勤 (OBATA TSUTOMU)

富山県工業技術センター 中央研究所・副

主幹研究員
研究者番号：30416143

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
大永 崇 (ONAGA TAKASHI)
富山県工業技術センター 中央研究所・副
主幹研究員
研究者番号：
岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)
富山大学医学薬学研究部・准教授
研究者番号:60186210
小岩一郎
関東学院大学工学部・教授
研究者番号：40186599