

医療応用を目指したマイクロ・ナノ構造による単一細胞加工技術の開発

豊橋技術科学大学 次世代半導体・センサ科学研究所
永井 萌土

1. テーマ設定の背景

細胞治療・再生医療・創薬スクリーニングにおいては、「大量の細胞を、短時間で、品質を保ったまま処理する」という需要がある。この要請に応える技術基盤の確立に筆者らは取り組んできた。具体的には、実用上の高い目標として、 $10^5 \sim 10^8$ 個規模の細胞に対し、細胞を生かしたまま物質を導入し、条件に適合する細胞だけを選別・回収する一連の工程を対象とした。従来の単一細胞操作は、導入効率と生存率のトレードオフ、作業依存のばらつき、試薬消費と時間の増大といった課題により、実務的なスループットの達成が難しかった。

そこで筆者らは、素形材技術を基盤にマイクロ・ナノ構造を設計・作製し、光・熱・流体のエネルギー投入制御を実装し、各機能を実証することにした(図1)。特に単一細胞加工のうち、物質導入、選別・隔離、液滴操作の「スピードと品質を同時に高める」ことを目標に据えた。目標指標は、1時間あたり1,000個以上・生存率90%以上である。この数値を基準に、工程全体の自動化と並列化による時間当たり処理数の段階的拡大を図った。

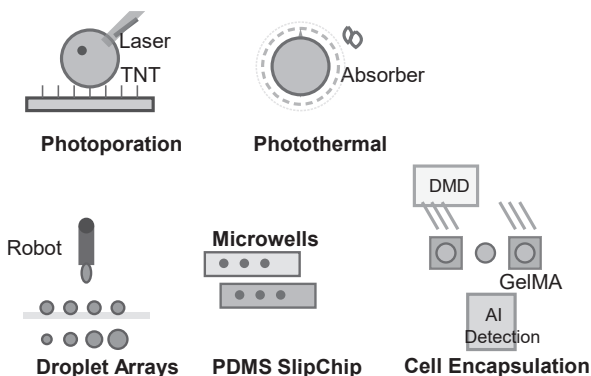


図1 素形材を利用した単一細胞加工のためのエネルギー変換の模式図

2. 素形材分野との関連性

本研究では、細胞サイズ(10~20 μm)に整合する機能構造を形成する必要がある。そこでシリコン、ガラス、チタン・金などの金属薄膜、光硬化性樹脂(SU-8、GelMA)、シリコーン(PDMS)を用途に応じて使い分けた。これらの材料に対しては、成膜、フォトリソグラフィ、エッチング、型取り、3D造形といった微細加工プロセスを利用できる。

特徴的な材料としては、光を吸収してエネルギーを変換できるものである。例えば、酸化チタンナノチューブ(TNT)やスパイク状の金ナノ構造である。これはパルス光と相互作用して、膜透過を一時的に高め、導入効率を押し上げる。光硬化性のタンパク質であるGelMAは顕微鏡下で選択的に硬化できる。単一細胞の包埋・隔離・回収を精密化する。

その他、PDMSで作製するスリップチップは、低粘度シリコーンオイルによる潤滑・シール最適化が必要である。一方で簡便に作製できて、単純な操作で再現性の高い混合・濃度勾配生成を可能にする。

これら素形材を有するデバイスを利用し、より高次元の顕微鏡観察系、ロボット制御、パルスレーザ光学系、画像認識(AI)と統合した。実験室の原理検証にとどまらない「工程化・標準化」を志向した融合研究である。

3. 研究開発の成果

3.1 高効率導入と高生存率の両立

物質導入効率を高めるほど細胞が傷み、生存率を保つと導入量が不足するというトレードオフが障壁であった。TNT基板上に細胞を培養し、その後でナノ秒パルスレーザによる光穿孔技術を構

築した¹⁾。これにより基板表面とパルス光の相互作用を利用して、膜に瞬時の微小孔を形成するものである。また、スパイク状金ナノ構造に赤外パルス光を照射する光熱効果により局所的に細胞膜を穿孔した。この効果としてPI (Propidium Iodide) の導入 90 ~ 95%、10,000 Daの蛍光デキストラン導入が 80 ~ 85%、生存率 95%を同時に実証した。さらに金ナノ構造では従来比 5 倍以上の導入効率向上を達成し、難導入細胞への大分子搬入を容易化した。さらに広域スキャン光学系により観察と面処理を両立し、運用性を高めた。

3.2 多条件評価の省試薬・高並列化

薬剤濃度や組合せ条件の探索は、液量・時間・人手の制約によりスループットが伸びにくい。そこで一つには、直交ロボットとペン型マイクロノズルを統合した液滴プリンティングを構築し、FC-40 フロリナート油中でナノリットル液滴を基板上に接触印刷する方式を採用した^{2), 3)}。流量とノズル移動速度をプログラム制御し、液滴体積の線形応答を定式化した。これにより均一配列、交互配列 (図 2)、組合せ、濃度勾配、細胞封入といった多様な液滴アレイを安定に作製した。ナノリットル単位で条件を並列化でき、試薬消費を抑えつつ実験網羅性を高め、前処理から評価までの総所要時間を短縮した。

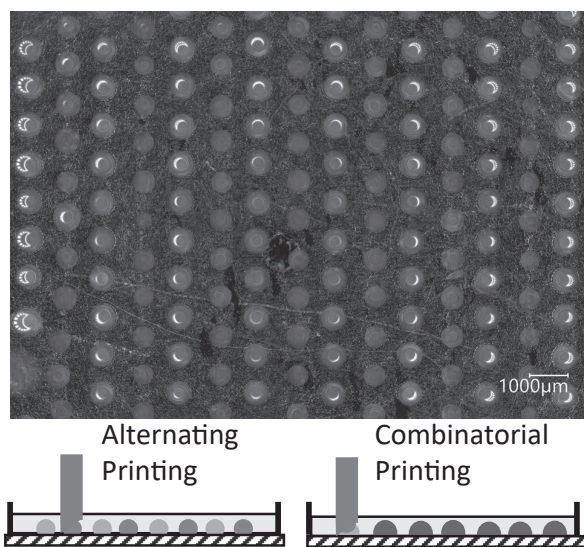


図2 ロボットプリンティングを利用した微小液滴の交互配置。

3.3 混合・希釈・濃度勾配の定量的再現

微小スケールの混合・希釈では、界面の挙動により再現性が損なわれやすい。装置・操作依存のばらつきが残った。そこでPDMS製のスリップチップの潤滑条件 (低粘度シリコンオイル) とシール性を最適化した⁴⁾。上下基板の微小ウェルの接触・スライドのみで、段階的な濃度勾配を形成する手順を確立した。これにより、蛍光強度と理論濃度の間に良好な線形性を確認し、狙いの濃度を定量的に再現した。また薬剤スクリーニング等で要求される「所望濃度の確実な提示」を、簡便操作で実現した。

3.4 単一細胞の選別・回収の半自動化

単一細胞を見分け、包み、取り出す作業は熟練者の手技に依存しており、処理速度と品質均一性に限界があった。そこで顕微鏡観察で細胞を観察したあと、DMDによる標的多点照射でGelMAを局所硬化し、50 μ m ~ 100 μ m程度の正方形のゲルを形成することにした⁵⁾ (図 3)。

ここで画像処理とAI (Mask R-CNN) により単一細胞を自動検出し、サイズ等の条件に合致する細胞だけを選択的に包埋した。二段階硬化により、トリプシンでの溶解時間を制御可能とした。孤立細胞では高率 (条件下で 100%) に包埋を実証した。機械学習による物体検出では、Precision 約 0.97 と F1 スコア 約 0.89 で自動検出した。これにより、選別フローの半自動運転によって作業員依存とばらつきを低減する方法が開かれた。

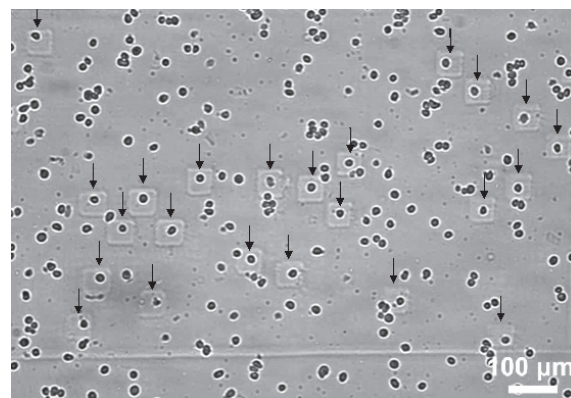


図3 画像観察後の選択的な単一細胞への光照射。多点照射デバイス (DMD) を用いて、細胞周囲の光硬化性ゼラチンゲルを光硬化させた。JRM 2023, Micro 2023 Venkatesh, 永井ら。

3.5 工程全体のスループット拡大に向けた実装

細胞治療で現実的なスループット ($10^5 \sim 10^8$ 個) の工程を設計するには、要素技術間の連結と標準化が不可欠である。ここでは細胞内デリバリーと細胞スクリーニングを連結することにした。特に顔料を用いて、細胞内導入と細胞死をエネルギーのみで使い分けることにした。これにより、細胞内導入の高効率化と不要細胞の処理速度の向上を行った。ここでは顕微鏡観察・ロボット制御・スキャン光学系・AI認識と結合した。一連の工程ができるシステムを整備した。

4. 訴求点

本研究の独自性は、細胞を処理できるように素形材由来のマイクロ・ナノ構造を核にしたことである。さらにエネルギーである光・熱・流体を投入し、物理的に変換して細胞の処理に利用したことにある。これにより、「検出性×導入効率（並列化×自動化）×生存率」という単一細胞加工の主要KPIを同時に引き上げている。

例えば、TNTを使った光穿孔と金ナノ構造の光熱効果では、生存率を保ちながら高効率導入を達成している。さらに液滴プリンティングでは、省試薬・多条件化を実現、スリップチップで濃度制御の定量性を確保して、濃度条件の探索を可能にした。GelMA×DMD×AIの組み合わせでは、細胞の検出・選別・回収を半自動化した。これらは、遺伝子導入・薬物送達の前処理、創薬スクリーニングの条件展開、再生医療の細胞選別・品質管理といった現場課題に直結する。

今後は、これらの原理を拡大しながら、周辺装置・消耗品・作業手順の標準化を通じて「スピードと品質の両立」を具体的に支える。処理規模のさらなる拡大と評価指標の標準化、工程間インターフェースの最適化（フォーマット統一、データ連携）を進め、産学連携のもと実用化と社会実装を加速する。

参考文献

- 1) L. Mohan *et al.*, "Can titanium oxide nanotubes facilitate intracellular delivery by laser-assisted photoporation?," *Applied Surface Science*, vol. 543, p. 148815, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.148815.
- 2) M. A. Maqbool, S. Okamoto, T. Shibata, T. Subhra Santra, and M. Nagai, "Self-regulating pen-needle-based micronozzle for printing array of nanoliter droplets under fluorinated liquid," *Instrumentation Science & Technology*, vol. 53, no. 3, pp. 332-350, May 2025, doi: 10.1080/10739149.2024.2390907.
- 3) M. A. Maqbool, M. Z. Maqbool, S. Okamoto, T. Shibata, T. S. Santra, and M. Nagai, "Combinatorial and alternating droplet printing with self-regulating pen-needle-based micronozzle," *MRS Advances*, July 2025, doi: 10.1557/s43580-025-01338-0.
- 4) R. Inaam, M. F. Bolontrade, S. Okamoto, T. Shibata, T. S. Santra, and M. Nagai, "PDMS SlipChip: Optimizing Sealing, Slipping, and Biocompatibility Using Low-Viscosity Silicone Oils," *Micromachines*, vol. 16, no. 5, p. 525, Apr. 2025, doi: 10.3390/mi16050525.
- 5) V. K. Panneer Selvam *et al.*, "Single-Cell Screening through Cell Encapsulation in Photopolymerized Gelatin Methacryloyl," *Micro*, vol. 4, no. 2, pp. 295-304, Apr. 2024, doi: 10.3390/micro4020018.