

フジシール財団 研究助成事業
成果報告書

公益財団法人フジシール財団
理事長 岡 崎 裕 夫 殿

報告日 2023年 5月 14日

研究課題	ウイルス感染症の高機能検査のための細胞培養のパッケージング	助成金額
		300 万円
ふりがな	ふたい のぶゆき	研究助成申請年度
研究者氏名	二井 信行	2021年度
所属機関	芝浦工業大学 工学部 機械工学科	研究期間
		2021年4月～2022年3月
役 職	教授	
連絡先	〒135-8548 東京都江東区豊洲 3-7-5 芝浦工業大学機械工学科 TEL 03 (5859) 8016 E-mail futai@shibaura-it.ac.jp	

下記の通り、研究成果を報告いたします。

記

1. 研究成果の概要（こちらに報告いただいた内容はそのまま当財団ホームページ上で公開します。）

(1) ソフトロボットによる真空中プラズマ接合技術

シリコーンなど一部の樹脂は、真空中プラズマ処理により、接着剤なしで接合することが知られている（プラズマ接合）。化学処理や大気圧プラズマと比べて、表面の微細形状の破壊を最小限にできるため、マイクロ・フレキシブル・透明な光学・電子・流体デバイスなどの生産に有望である。しかし、真空中プラズマ照射後に真空チャンバを大気圧に戻してから接合操作をする必要があり、スケールアップが難しいだけでなく、気泡のかみ込みや活性種消失による接着不良を生じやすい。また、位置決めを伴う接合は極めて困難である。

そこで、内外の差圧により一定方向に変位する空気圧ソフトロボットを真空チャンバ中で動作させ、チャンバ内部の被接合物をプラズマ照射後に接近・圧接することを着想した。我々は、**図 2A** に示す1方向に直動するソフトロボットを設計試作した。低硬度シリコーン円筒と大径でより高硬度のシリコーン円筒とを交互に接着した構造であり、空気導入時に中央の低硬度シリコーン円筒が膨張し伸長する。ソフトロボット内部の圧力と変位の間には単調増加の関係があることから、圧力差によりソフトロボットを駆動できることがわかる。

ソフトロボットは柔軟であるため、エンドエフェクタは本質的に6自由度すべてを有する。しかし、位置合わせを保った状態で接合するには、直進方向1自由度を残して拘束しなければいけない。そこで、**図 2B** に示すジグを3Dプリンタで作成して、鉛直方向にのみソフトロボットが変位するように拘束した。また、コンフォーマル圧接のためのパッド構造をソフトロボット本体と一体成型した。パッドに接合対象の片方を摩擦力により密着保持し、ソフトロボットを伸長させることで、その伸長した先に配置したもう片方の対象に接合できる。次いで、上記の接合用アクチュエータを真空中で動作させ、プラズマ照射直後の接合を実機で実証するため、プラズマ装置（SC-708, サンヨー電子）に**図 3A** に示す流体回路を増設することで駆動した。

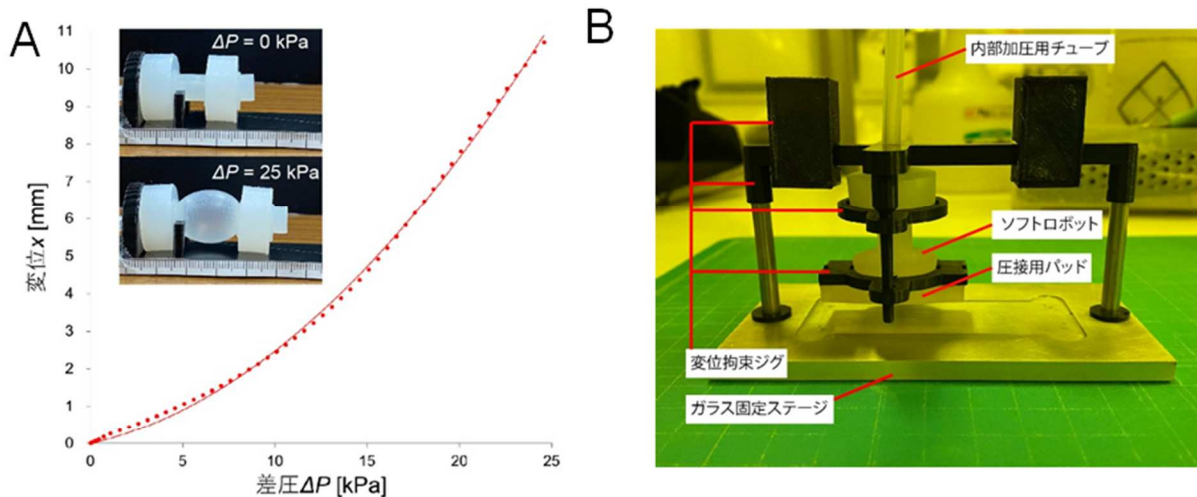


図 1 エラストマー1方向変位空気圧ソフトロボット A) ソフトロボット内外差圧と伸長変位との関係 25kPa の圧縮空気を導入. B) 真空プラズマ接合装置の試作. A)に示すソフトロボット, 圧接用パッド, 内部加圧用チューブを一体化し, ソフトロボットの変位方向を直進方向に制限するためのジグを統合した

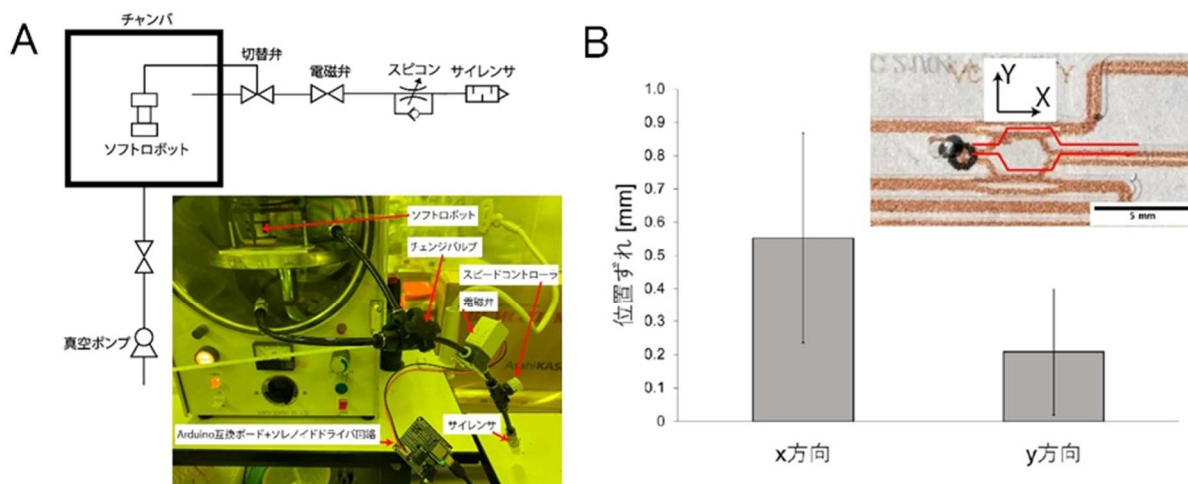


図 2 プラズマ装置へのソフトロボットの組み込み. A)アクリルドアを介してソフトロボットと外気を連通する空圧システム. B)ソフトロボットによりガラスに接合した 55x14x0.3mm の PDMS 膜の位置ずれ

その結果, 事前に位置決めを試行し水平方向に生じる変位を補正することにより, 図 2B に示すように, PDMS フィルム(50x14x0.5 mm) 2 枚を, 水平方向の位置ずれを平均で 0.2 ~ 1.0 mm の範囲に収まるようにして気泡なしで真空中接合することに成功した.

(2) オンチップ細胞培養デバイスへのウイルス検体導入法の開発と感染効率評価

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の検査は, 現在, SARS-CoV-2 のウイルス RNA を検出する RT-qPCR 検査が主流だが, 感染力のないウイルスの RNA も検出してしまうという問題がある. 検体のウイルス活性, ひいては感染力の有無の判断は, 変異ウイルスの脅威の的確な判断に資するとともに, 過不足のない的確な感染者の隔離による感染拡大の抑制及び社会活動の早期回復にの両立につながる. そこで, 我々は, 検体中のウイルスの活性の判定のため, 細胞を輸送しつつ培養できるデバイスに, ウイルスを含む検体を導入し, 細胞に感染させ, かつ安全にウイルス含有の培地を取り出せるデバイスを開発した. RT-qPCR 検査や細胞変性効果の判定と

組み合わせることで、ウイルスの活性判断を可能とする。

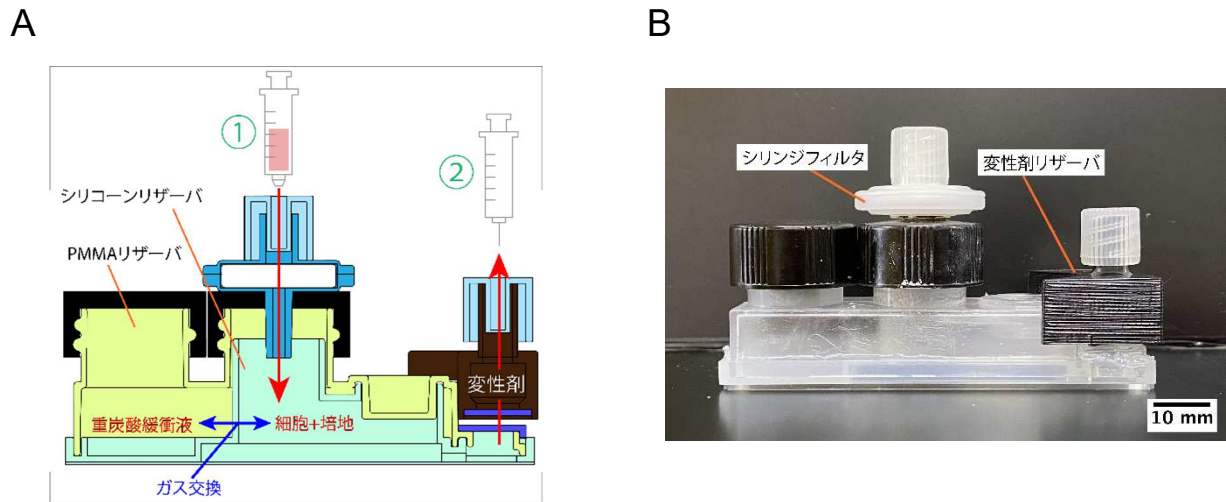


図4 A) ウイルス検体培養デバイスの概略図. 左側のねじ口から重炭酸緩衝液、右側のシリンジフィルタ付ねじ口から細胞あるいは培地を導入し細胞を接着させる. 検体は①に示すようにシリンジフィルタを介して培地に加える. 培地の抽出は、②に示すように、ニードルで変性剤リザーバとPDMS膜(青線)を貫通して培地を吸引し、先端が変性剤リザーバに達するまでニードルを戻し、変性剤を吸引してから引き抜く. B) デバイス全体の側面の外観写真.

ウイルス培養用のポータブルデバイスとして、図4に示す On-chip Incubation 機能をもつデバイスを設計、試作した. 微生物による培地のコンタミネーションを防ぐため、細胞培養後、フィルタを組み合わせたキャップを介してウイルス含有の検体をデバイスに導入する. そしてウイルスを不活化して取り出す為、PDMSシートを介して培地と接するリザーバに変性剤を満たし、ニードルでPDMSシートを貫通して培地を吸引し、その後上部の変性剤を吸引することで、安全に培地を取り出す構造にした.

次いで、上記のデバイス内で、細胞培養とウイルス感染の検出が可能であるかを検証した. ジャケットリザーバを重炭酸緩衝液で満たし、内側リザーバに、培地 4.5ml に懸濁したサル腎臓由来細胞株の一種 COS-7 を導入してキャップを閉め、37°Cサーモプレート上で1d培養した. その後キャップをフィルタ付きのものに交換し、緑色蛍光タンパク遺伝子を導入したアデノ随伴ウイルス(AAV2-EGFP)粒子を約 7×10^8 個含む培地 0.5 ml を、フィルタを介してデバイスに導入し3 d 培養した. ウイルス感染により発現した緑色蛍光タンパク質(GFP)の蛍光像を倒立蛍光顕微鏡(Leica DMI8)で取得した. その後、培養された細胞の像培養された細胞の専有面積と蛍光像のそれとの比を画像処理により算出することで、細胞のウイルス感染率を取得した.

さらに、ウイルスを含む培地を不活化しつつデバイス外に抽出し、さらにウイルスの核酸をPCRで検出可能であるかを検証した. 上記と同様にデバイスに含ウイルス粒子培地を導入し、変性剤リザーバに0.5 w/v% NaClOを封入した. 次に、25Gニードルで、変性リザーバとその下のPDMS膜を貫通させて培地を0.1ml吸引し、続いてニードルを変性剤リザーバまで戻して変性剤を0.4 ml吸引することで、ウイルスを変性(不活化)しながら抽出した. 抽出した培地の一部は変性剤除去のためオーバーナイト透析した. その後、抽出した培地をCOS-7培養に加えて感染能を評価するとともに、AAVのゲノムDNAをターゲットとした定量PCR(qPCR)にてウイルス量を推定した.

図4Aに、唾液検体を想定したウイルス溶液をフィルタを通して導入したデバイスにて、蛍光による細胞のウイルス感染の状態を、全細胞に対する感染細胞数(感染率)の24 h毎の増加を示す. ウイルス溶液の導入後24 h経過時点でAAV2の感染を確認し、経過時間と感染率は正の相関を示した. このことから、フィルタを介した検体導入と培養の続行が可能なのことがわかった. 図4Bに、定量PCRによって、変性(と透析)の有無と

AAV2 ゲノム DNA の検出量を調べた結果である。qPCR によって検出された DNA 量は、NaClO による変性のないサンプルに比べて、変性ありの場合は明確に少なくなった。透析を行わないケースでは未処理時の 1/500 となり、Cq 値で 9 程度の上昇を結果となった。なお、変性のない場合は透析の影響は小さかった。

しかし、そもそも NaClO は核酸除去のために使用されている薬剤であり、むしろ NaClO 処理しながらも DNA が検出可能であったことで有望であったといえる。そして、不活化(+透析)した検体について、予想通り AAV の感染力は失われた。SARS-CoV-2 の場合は、NaClO より核酸を保存する変性剤を用いることができることを考慮すると、本デバイスにおいて、ウイルスを不活化した安全な状態で抽出でき、PCR 検査が可能といえる。

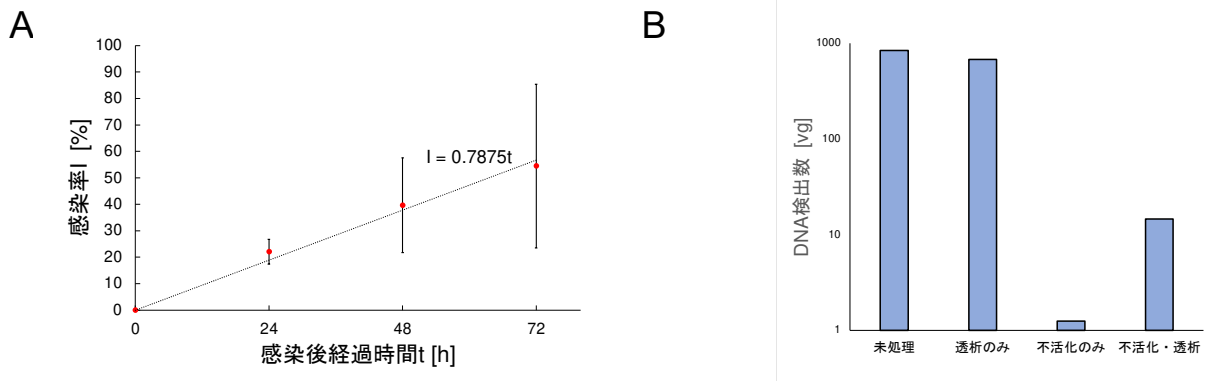


図4 A) 細胞培養デバイスにフィルタを介して導入した蛍光 AAV のデバイス内 COS-7 細胞の感染率の時間変化。B) デバイスから抽出した含 AAV 培地サンプルからの DNA 検出数の比較。「未処理」は、不活化処理を行わなかったものを示す。透析は、抽出後に変性剤を取り除き、細胞毒性を低減するために行った。

ここまで、増殖性・病原性のない AAV を用いて細胞培養パッケージのの評価をしてきて、ウイルス培養の器具としての有用性を実証することができた。今後は、医療機関の協力を得て、新型コロナウイルスまたは他の増殖能と病原性のあるウイルスを用いて、デバイスのハンドリングの効率や病原体・細胞封込めの能力を検証していく計画である。

2. 研究成果のパッケージ産業への貢献の可能性（こちらに報告いただいた内容はそのまま当財団ホームページ上で公開します。）

- (1) の真空中プラズマ接合技術は、接着のみならず、ラミネート、ラッピング、印刷、封止など、パッケージングに有用な技術を真空中で低コストで実施できるようになることに貢献できる可能性がある。真空を使うことで、空気に関与するパッケージングの不良の原因（気泡や、空気中の水分や酸素など）を低減することが期待できる。また、嫌気性の材料の適用、真空プラズマによる前処理の適用が容易となる。
- (2) のウイルス培養デバイスは、細胞やウイルスを生きたままお届けできるパッケージというべきもので、パッケージ産業が展開する一つの方向性を具体的に示した例になったと考える。細胞やウイルスをパッケージとして供給するには、物理的・生物学的封じ込めが必須であり、パッケージに求められる特性である気密性・汚染防止の機能が十二分に生かされなければいけないものである。また、サンプルや薬液の安全な導入、光学的アクセスの確保、生体適合性を低コストで満たさなければいけない。これらの要素を同時に満たすようなパッケージを達成するため、パッケージ産業で培われた最新のパッケージ技術の適用は大きなアドバンテージになると考えられ、逆に、細胞やウイルスの封じ込めのためのデバイスの出現が、パッケージ産業の一つの目標となるとも考えられる。

3. 学会発表、学会誌等への論文掲載、産業財産権出願などの実績（現時点で未発表・未掲載・未出願のため、上記「1. 研究成果の概要」、「2. 研究成果のパッケージ産業への貢献の可能性」の当財団ホームページ上の公開の延期を希望される場合、その旨 記載してください。）

山口真生，二井 信行，オンチップ細胞培養デバイスへのウイルス検体導入法の開発と感染効率評価，日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2021，2021年12月11日

野口 悠斗，長谷川 翔大，二井 信行，ウイルス培養のためのモバイル完全閉鎖系細胞培養デバイスの開発，第97回日本感染症学会総会・学術講演会 2023年4月28日

成果報告書の作成上の留意事項

- (1) 当財団指定の様式（A 4 サイズ）を用い、報告書の様式は変更しないでください。「1. 研究成果の概要」、「2. 研究成果のパッケージ産業への貢献の可能性」、「3. 学会発表、学会誌等への論文掲載、産業財産権出願などの実績」の間での行数の変更は可能ですが、総ページ数を3ページとしてください（本留意事項を除く）。
- (2) 日本語で作成してください。但し、英語での業績、論文、成果は英語のまま記入してください。
- (3) フォントは MS明朝の10.5ポイントを使用してください。
- (4) すべてのページのフッター部分に研究者の氏名を記入してください。

以上