

非破壊の細胞診断に適した 新ペイント式ラマン顕微システム

国立研究開発法人産業技術総合研究所

細胞分子工学研究部門

ステムセルバイオテクノロジー研究グループ

研究員 赤木 祐香

2022年9月8日

従来の細胞識別技術と問題点

細胞を識別する機器として、フローサイトメトリや磁気ビーズによる手法があるが、

コスト

手技の複雑性

万単位の細胞数が必要

侵襲的

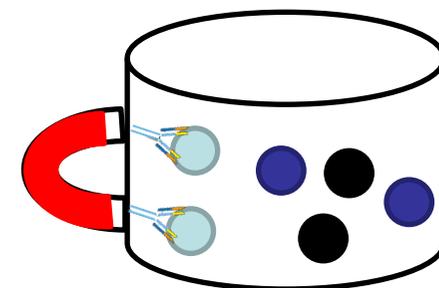
等の問題があり、非侵襲な評価方法が必要とされている。



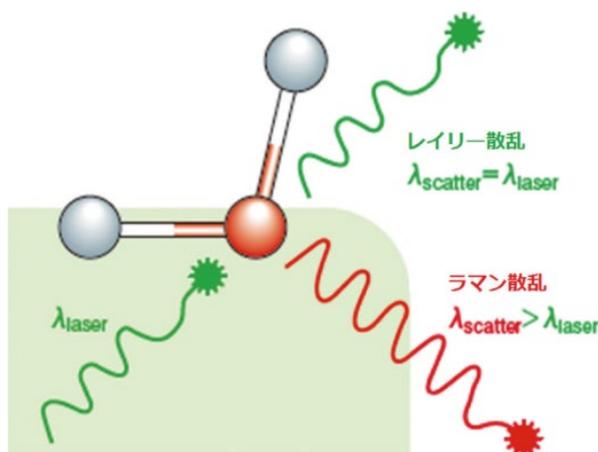
+ 蛍光タンパク



+ 磁性ビーズ



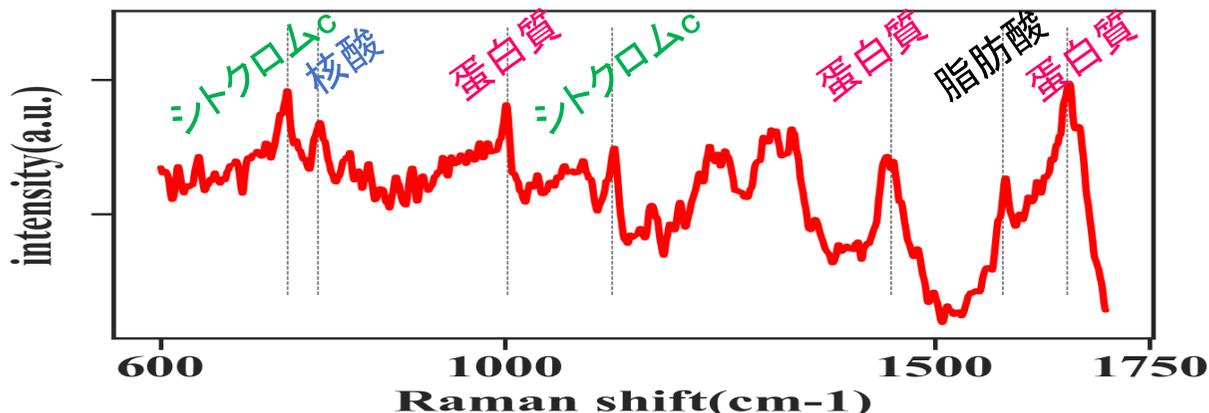
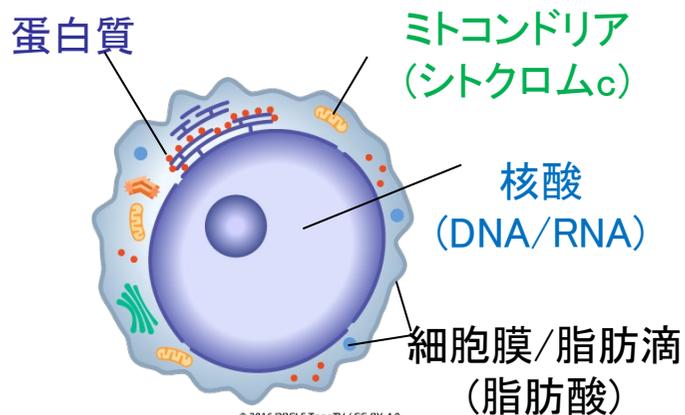
ラマン分光法とは



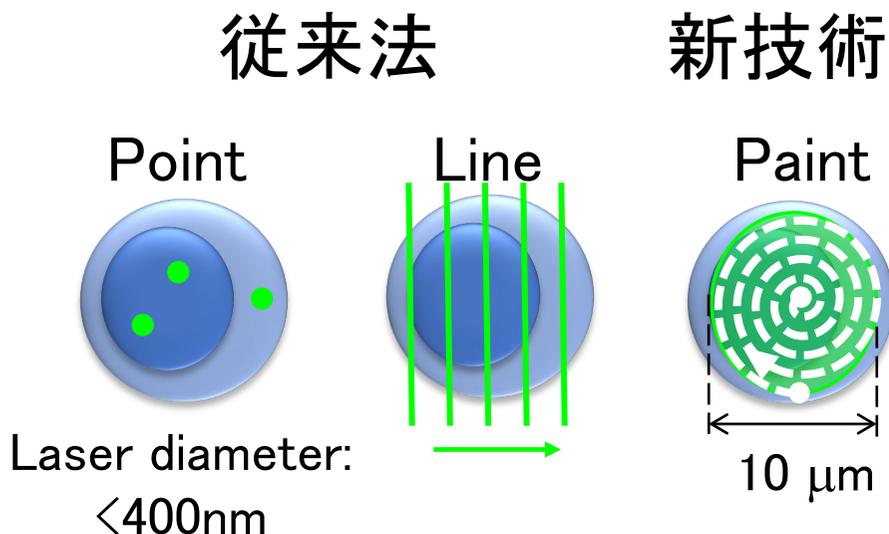
一般社団法人日本分析機器工業会HPより引用

- 物質に光を照射すると散乱光が発生する
- 散乱光は物質内の化学結合の振動エネルギーに対応している
- 散乱光を分光したスペクトルから物質の同定や分子の構造解析および定量が可能
- 固体、液体、気体のいずれの状態においても前処理を必要としないで測定できる

細胞由来のラマンスペクトル (縦軸: 散乱光強度, 横軸: ラマンシフト (波数))



新技術の特徴・従来技術との比較

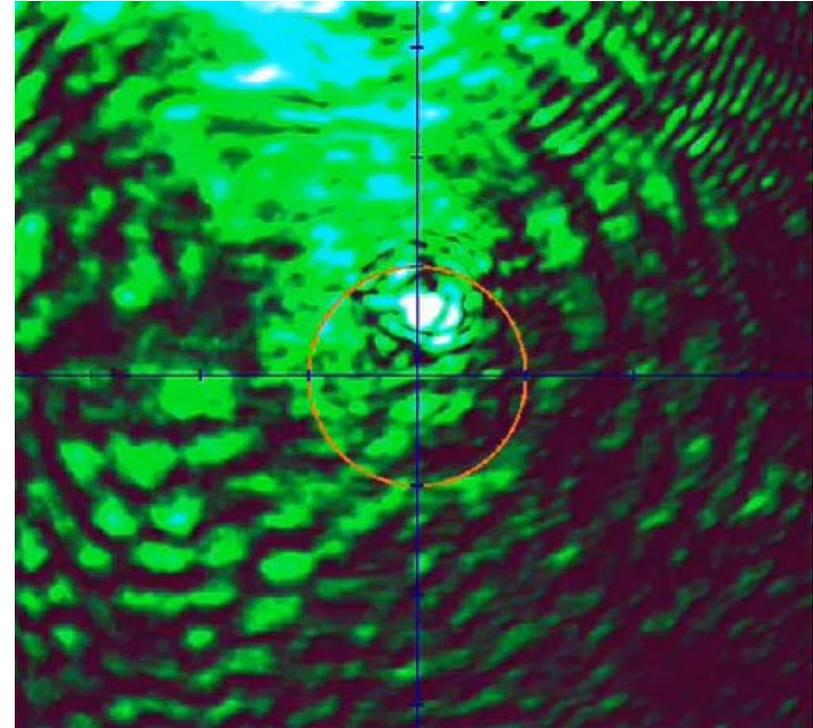
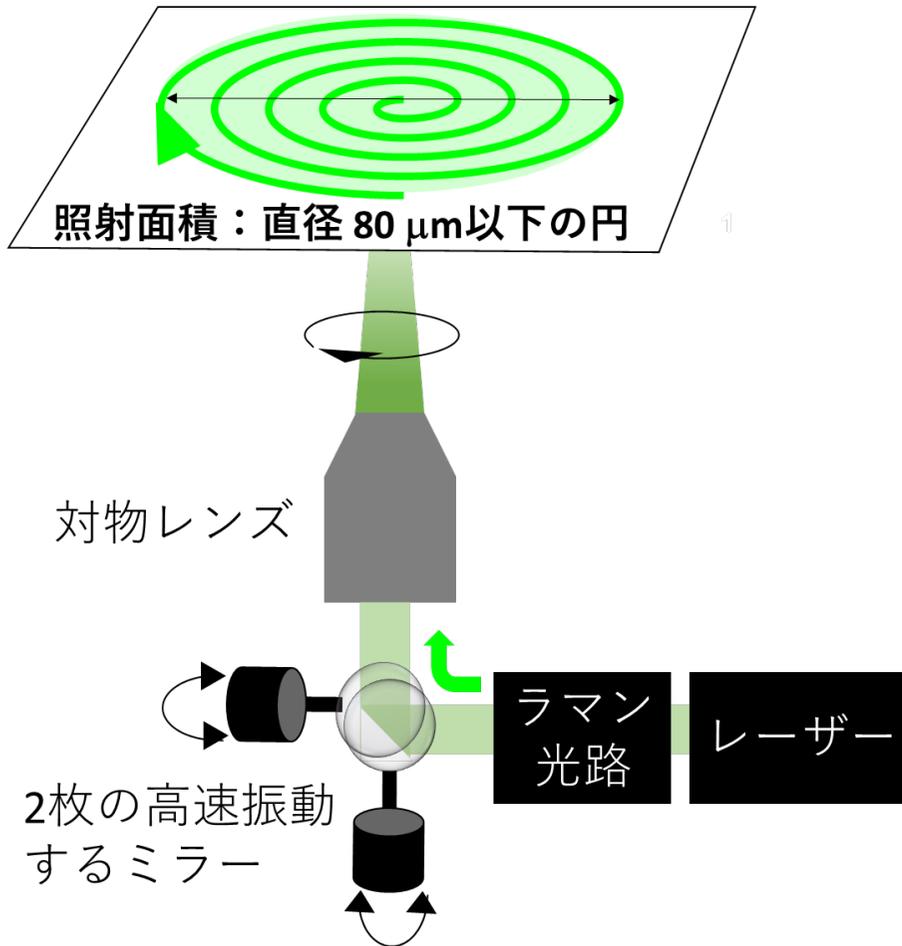


Akagi Y., et al., Sci Rep., 11, 8818, 2021
特願2021-68916, PCT/JP2022/013239

	従来法	新技術
測定領域(円領域, 直径)	約400nm	6 ~20 μm
測定箇所のはらつき	高い	低い
1細胞あたりの測定時間	3~15分	3~5秒

数秒間で細胞のスペクトルを測定できる

ペイント式ラマン分光顕微鏡

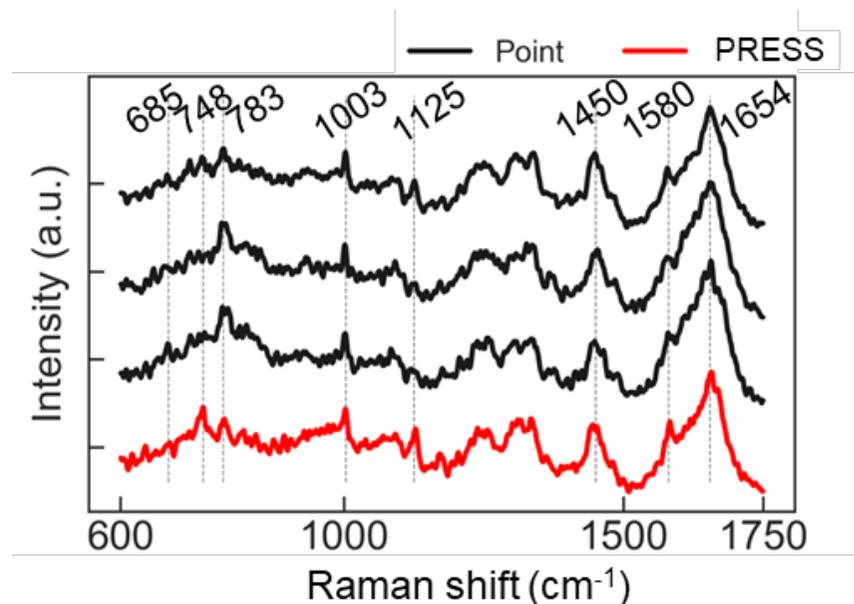
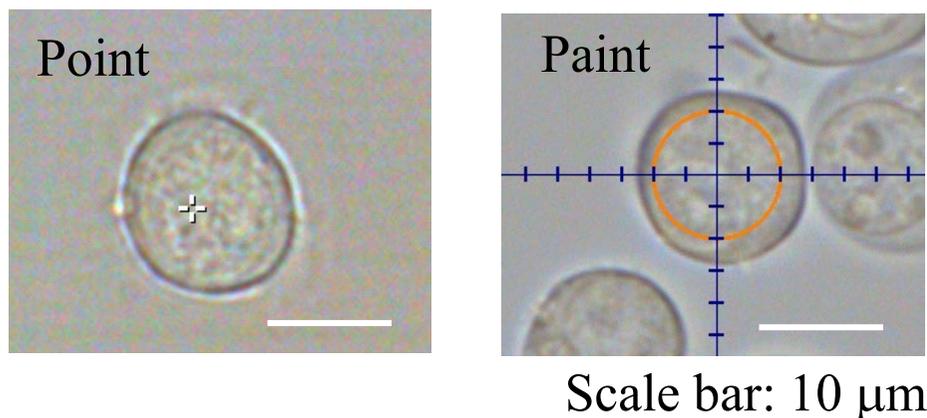


Akagi Y., et al., Sci Rep., 11, 8818, 2021
特願2021-68916, PCT/JP2022/013239

2軸のガルバノミラーを高速回転させることで、
レーザー光を巡回状に走査させる

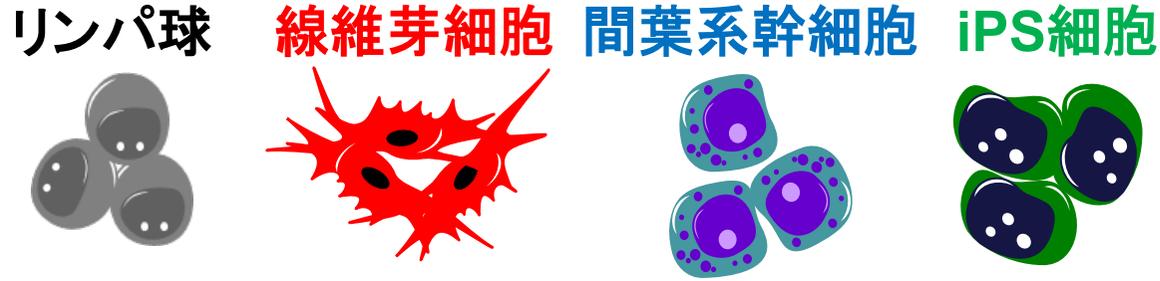
新技術の特徴

ヒトT細胞由来のラマンスペクトル

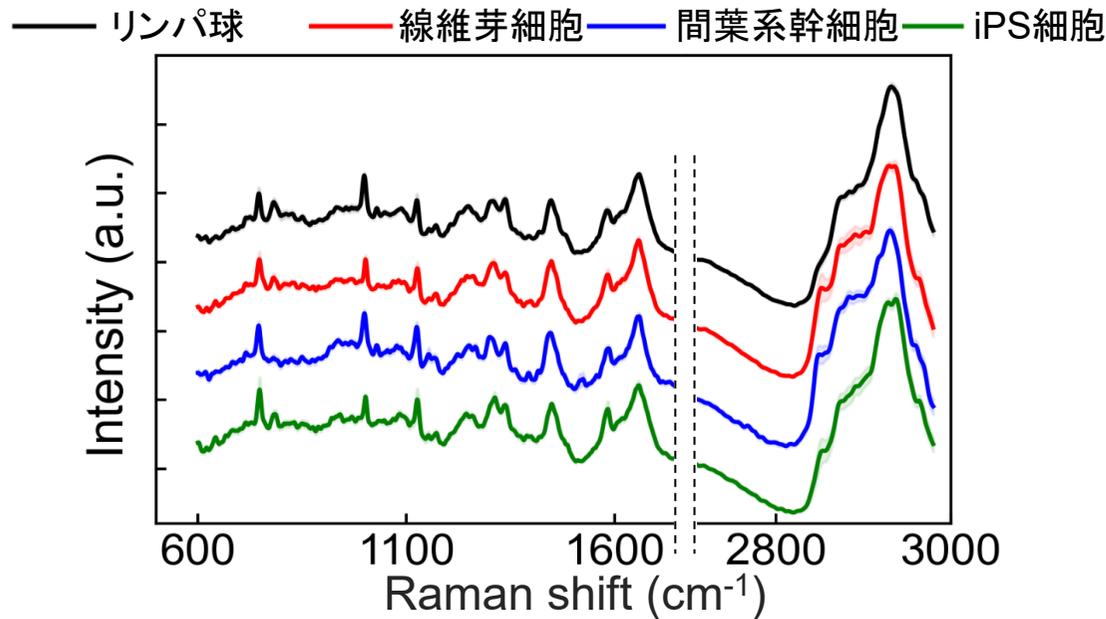


- 広範囲を高速でスキャンできる共焦点レーザー顕微鏡システム
- 1細胞あたり数秒間で測定が可能になり、細胞へのダメージレスな測定が可能である。
- 核酸や蛋白質の抽出を必要としない
- 抗体や蛍光物質などのプローブを用いた標識は不要

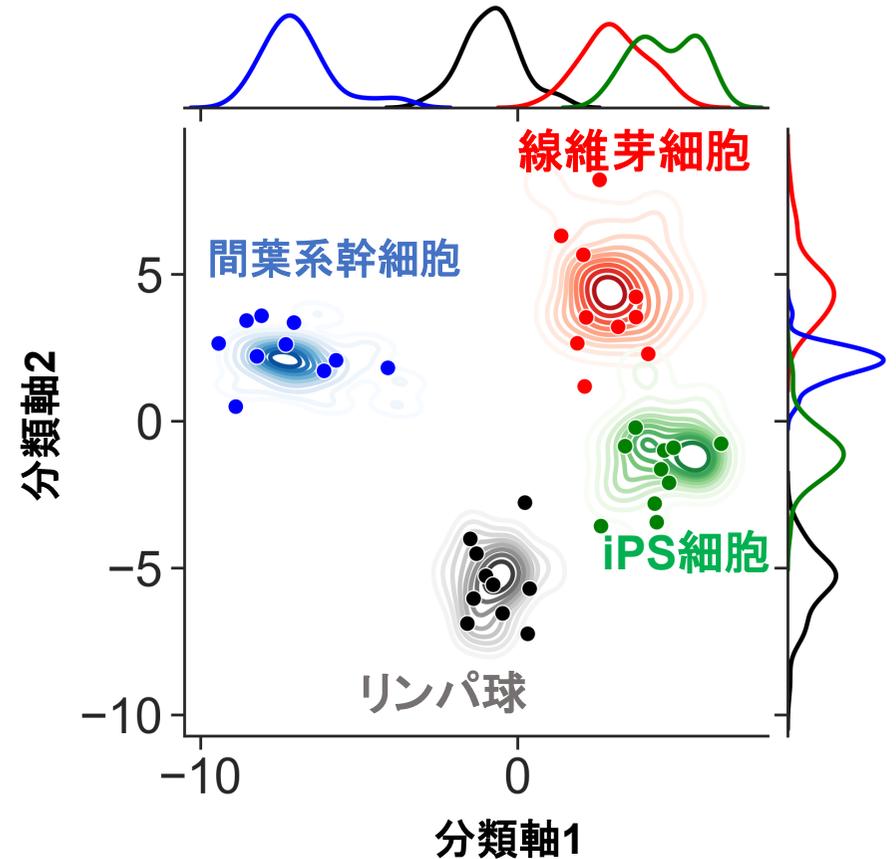
実施例：細胞の分類



4種の細胞のラマンスペクトル

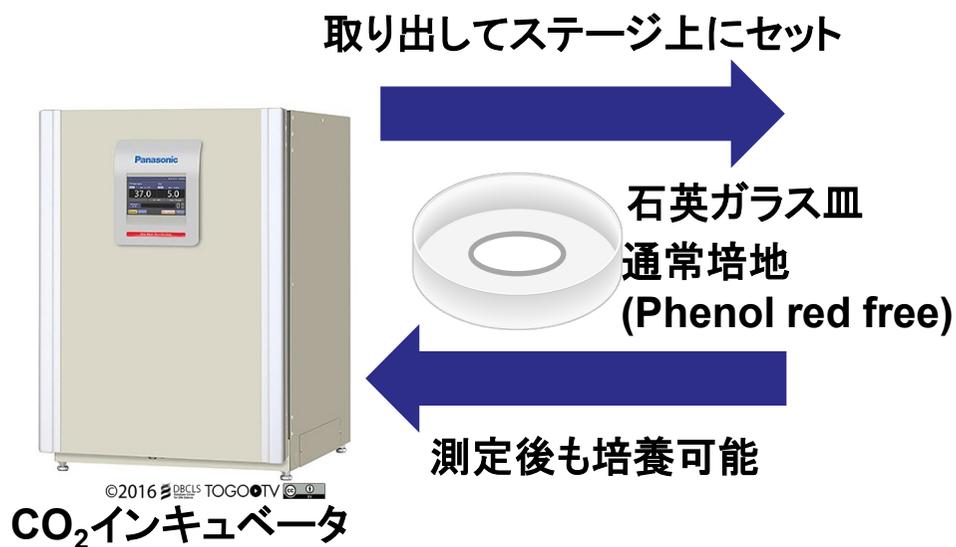


機械学習による判別分析

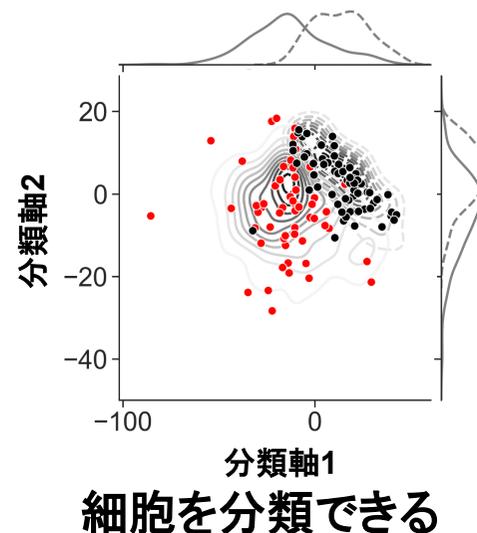
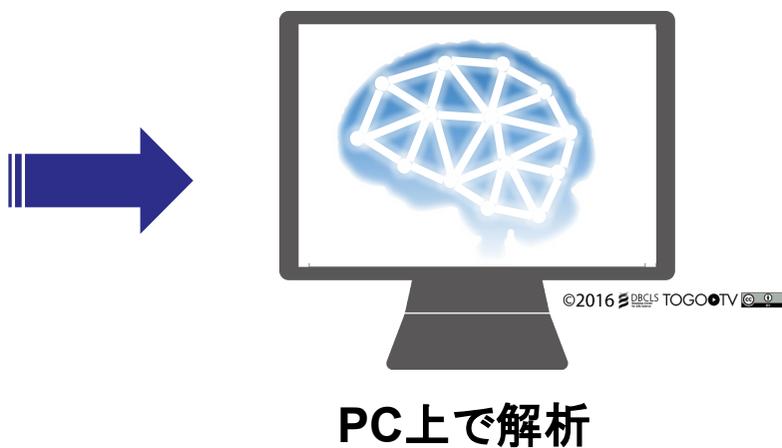


スペクトルのピーク変動から細胞種を分類できる

実際の測定手順



当技術でスペクトルデータを取得



手順が少なく、簡単な作業

想定される用途

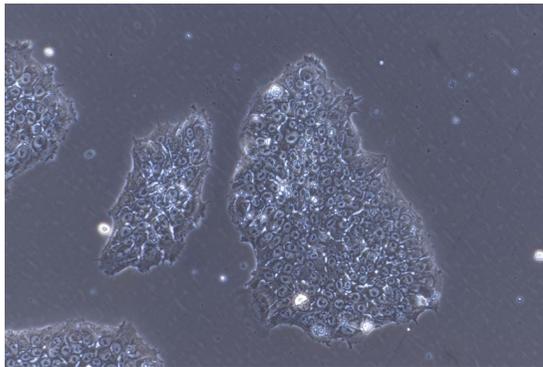
本技術は、顕微鏡を用いた非侵襲な細胞評価方法であることから、下記のような細胞評価を安全かつ効率よく行うことが可能である。

- 再生医療に使われる細胞の品質管理
- バイオ燃料やスマートセル産業における物質生産
- 創薬スクリーニング
- 受精卵など、希少細胞の細胞診断

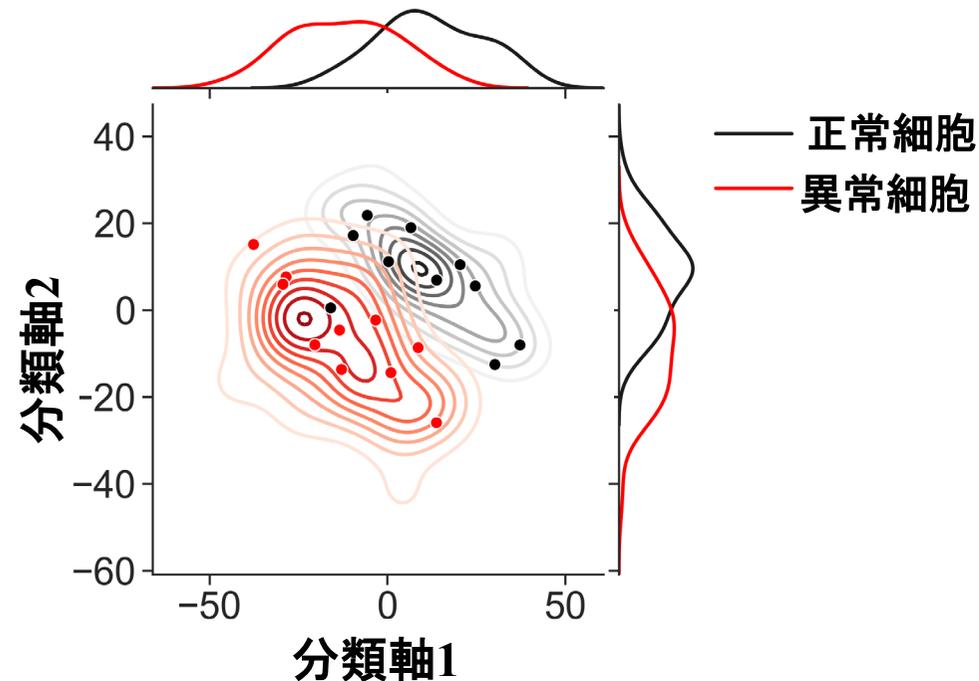
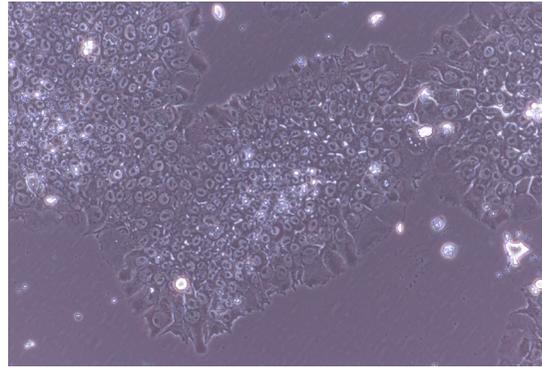
想定される用途と実施例1

－ 再生医療に使われる細胞の品質管理

正常なiPS細胞



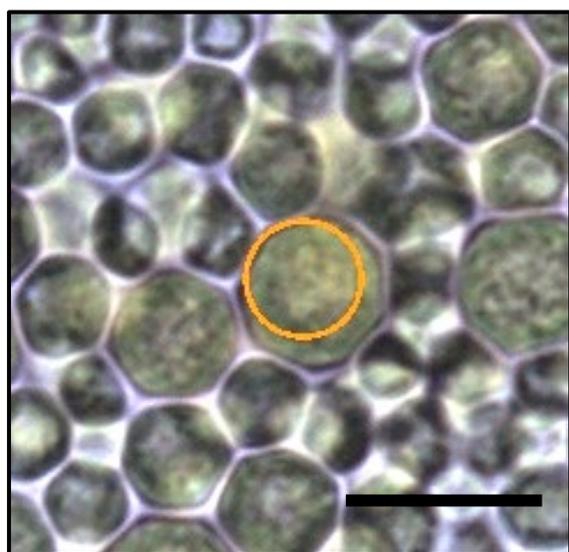
異常なiPS細胞



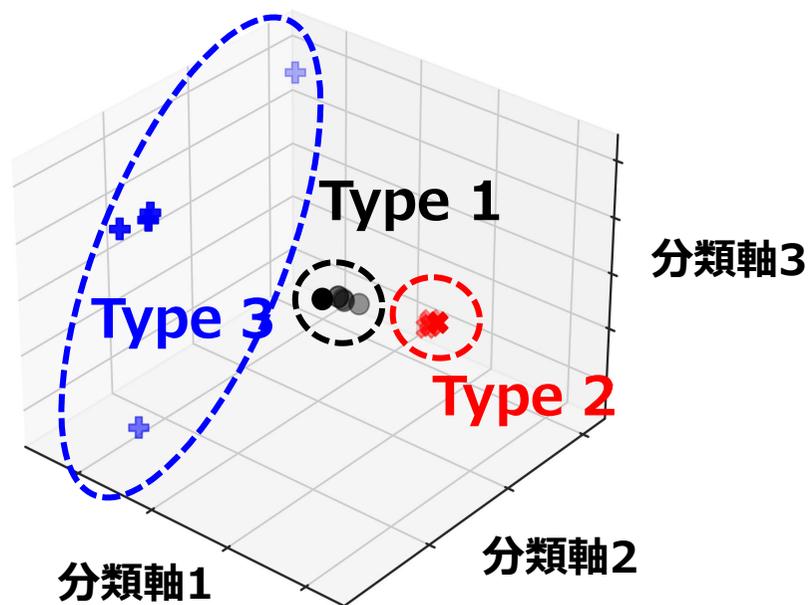
精密で正確な培養が必要とされる、
ヒトiPS細胞を診断できる

想定される用途と実施例3

ー バイオ燃料やスマートセル産業における物質生産



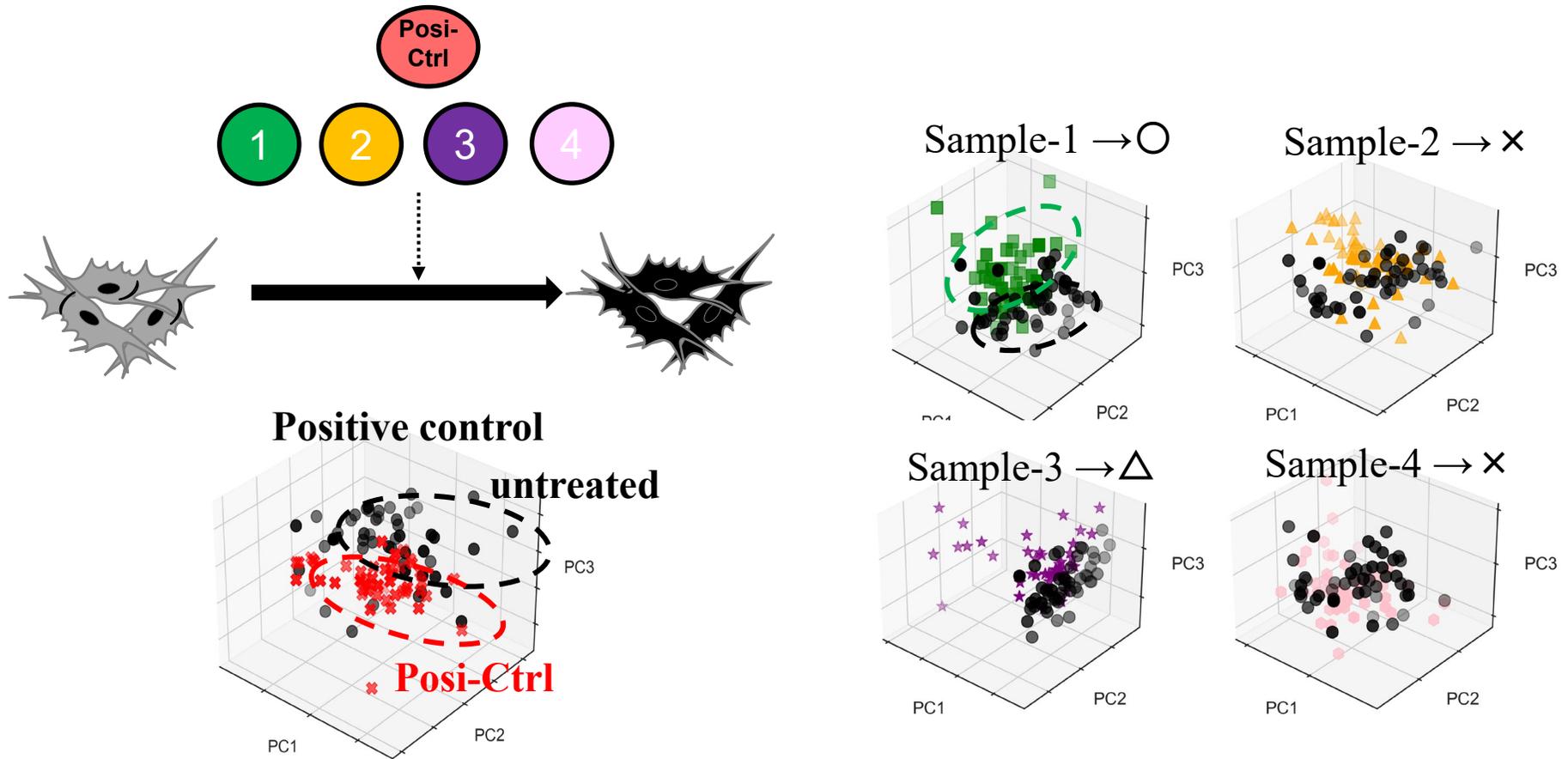
Scale :10 μm



蛋白質が豊富なスーパーフードなど、
高品質な微細藻類を識別できる

想定される用途と実施例4

－創薬スクリーニング



薬剤や食品刺激に反応する細胞を
判定することができる

想定される最適な用途

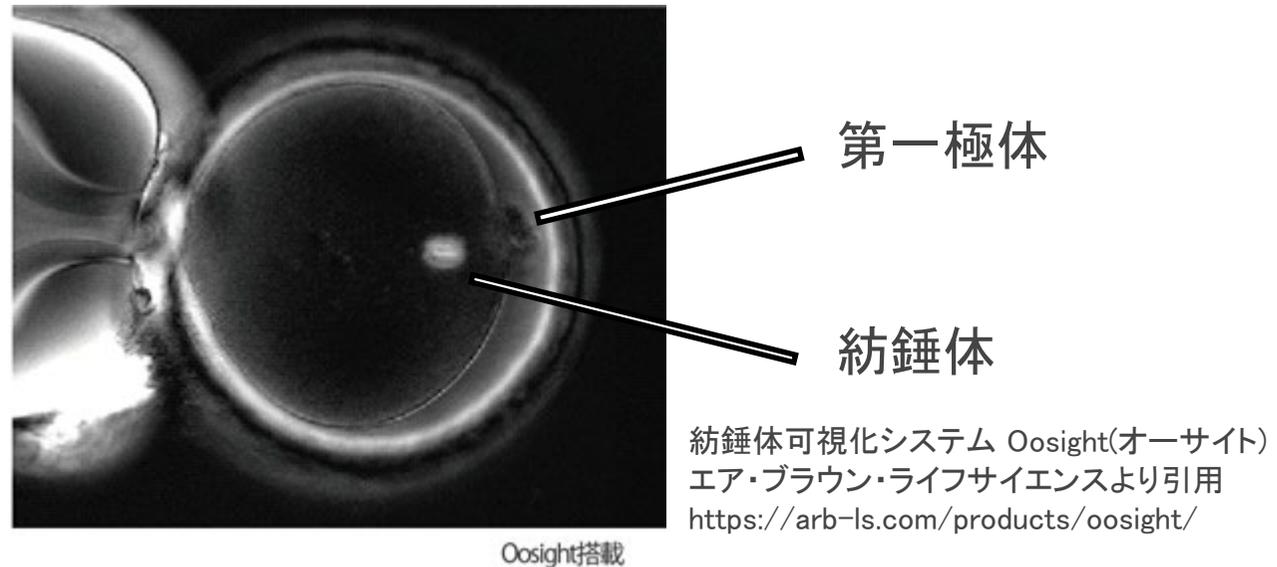
当技術は顕微鏡を用いて測定するため、
少数細胞を対象にした分類が可能



受精卵など、希少細胞の細胞診断に応用

従来の卵子評価方法

卵子は胚培養士の目視による形態評価が行われる



卵子の質を客観的かつ定量的に
評価することは難しい

従来の受精卵評価方法

着床前胚の遺伝学的検査により染色体異常を評価



受精着床学会ART生涯教育プログラム資料より抜粋
https://www.kinutani.org/conference/pdf/2019_07_10.pdf

母体年齢42歳以上において生児獲得率(対移植)は
非検査胚10%に対し70%まで増加

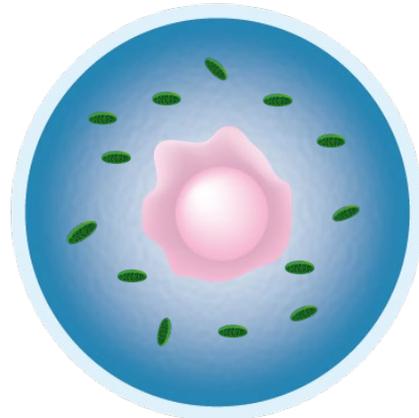
Simon AL., et al, Fertil Steril., 110, 113-121, 2018

検体採取は胚を破壊するリスクが高い

卵子の質はミトコンドリア機能に依存する

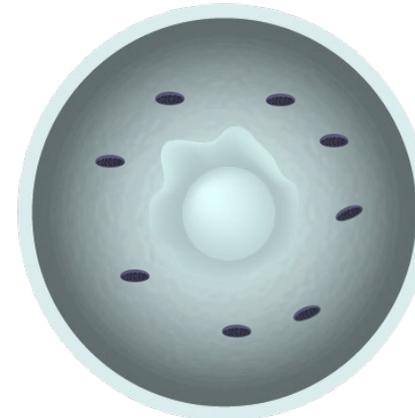
ミトコンドリア機能が正常

ミトコンドリア機能が低下



酸化

加齢



質の良い卵子

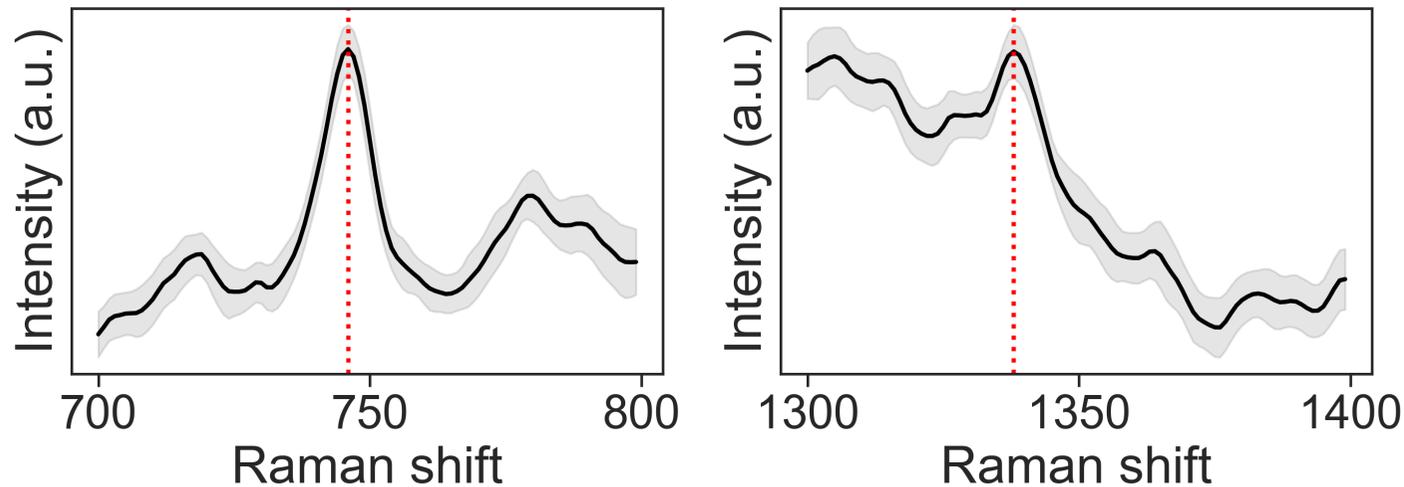
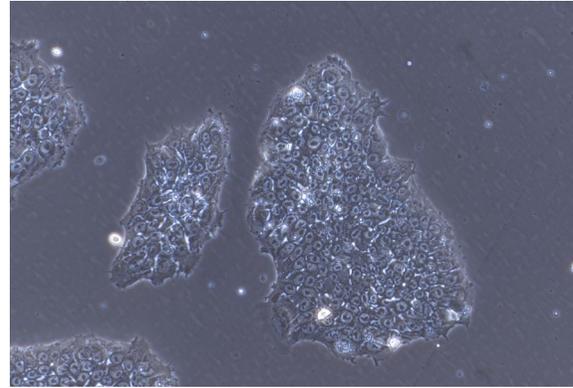
卵子の質におけるミトコンドリアについての報告

- 形態異常が増加 (de Bruin et al., Biol Reprod 2004)
- 膜電位が低下 (Wilding et al., Hum Reprod 2001)
- DNAの欠失・変異が増加 (Keefe et al Fertil Steril 1995, Barrutt et al., Reprod Biomed Online 2000)
- 活性酸素レベルが増加 (Takahashi et al., Biol Reprod 2009)
- 酸化ストレスが増加 (Takahashi et al., Mol Reprod Dev 2003)
- 機能低下により減数分裂の非対称分裂を誘発 (Babayev E. and Seli E., Curr Opin Obstet Gynecol. 2015)

非侵襲にミトコンドリア機能を評価する技術が必要

ラマン分光法によるミトコンドリア機能評価

ヒトiPS細胞



シトクロムcに由来するスペクトル(746, 1338 cm^{-1})は
ミトコンドリアを評価できる

実用化に向けた課題

- これまで、細胞や藻類における非侵襲評価が可能なところまで検証済み。
- 現在、マウスや牛の胚について実験データを取得中であり、胚診断に適用するための条件設定を行っている。
- 汎用性の向上のため、細胞認識→測定→解析における高速化、オートメーション化が必要である。

企業への期待

- 胚診断機器として使用するために、インキュベーション機能を備えた自動測定および判定が可能なシステムを想定している。
- 測定および判定の自動化については、高精度なAIの技術により克服できると考えている。
- 細胞認識およびデータ解析を自動化するため、AI技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- 測定に適した胚培養皿を開発するため、石英ガラス加工の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、再生医療用細胞を開発中の企業、バイオ産業分野への展開を考えている企業においても、本技術の導入が有効と考えている。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : スペクトルデータ取得方法、細胞の分類方法、
およびラマン分光システム
- 出願番号 : 特願2021-068916, PCT/JP2022/013239 (WIPO)
- 出願人 : 国立研究開発法人 産業技術総合研究所
- 発明者 : 赤木 祐香、木田 泰之、森 宣仁、高山 祐三

お問い合わせ先

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
スタートアップ推進・技術移転部
技術移転室

TEL : 029-862-6158
e-mail : aist-tlo-ml@aist.go.jp