

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「統合 1 細胞解析のための革新的  
技術基盤」  
研究課題「環境細菌 1 細胞ゲノム解析のための  
マイクロデバイス開発」

## 研究終了報告書

研究期間 平成26年10月～平成30年3月

研究代表者：本郷 裕一  
(東京工業大学生命理工学院、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

環境中の微生物種の大多数は難培養性であり、その生理・生態はほとんど未知で、産業応用も困難である。本研究課題では、数  $\mu\text{m}$  しかない細菌 1 細胞を静電力で捕捉し、全ゲノム増幅反応を行って産物を回収する半自動システムの開発を目指した。

本郷グループ(東京工業大学・生命理工学院)が装置の仕様策定と生物学的検証実験を、コアマイクロデバイス「細菌 1 細胞アレイ」(下図左参照)の開発を山本グループ(東京工業大学・工学院)、同デバイスの電源部及び半自動で操作するシステム(下図右参照)の開発を鳥山グループ(ケーディークロート株式会社)がそれぞれ担当し、緊密に協力して効率的・高品質な細菌 1 細胞ゲノミクスを可能とする装置の開発に取り組んだ。

本研究で開発したマイクロデバイス「細菌 1 細胞アレイ」は、石英ガラス基板に微細なクロム電極を配し、その上に直径 0.2~2  $\mu\text{m}$  程度の微小チャンバを 96 個構築したものである。その上にさらにマイクロ流路を設置してあり、数 10~数 100  $\mu\text{L}$  程度の試料を添加すると、静電力の一種である誘電泳動力によって、細菌 1 細胞を同チャンバに捕捉することが可能である。余剰の細胞やゴミはマイクロ流路を通じた流水で洗浄できる。洗浄後にマイクロ流路を外し、細胞捕捉チャンバ上に容量 2  $\mu\text{L}$  の微小反応炉を装着する。高速微量分注装置でアルカリ(KOH)溶液を添加して溶菌・DNA 変性を行い、ついで Phi29 DNA polymerase を含む全ゲノム増幅試薬を添加し、数時間以上湿潤箱でインキュベートする。全ゲノム増幅産物は、遠心力で個別かつ一度に回収可能である。

試作品の性能を評価したところ、大腸菌、枯草菌、放線菌、メタン菌など多様なモデル原核生物において 1 細胞ゲノム配列を取得可能であることが実証され、ゲノム配列取得成功率は約 7 割に達している。取得した 1 細胞ゲノムの完成度については、従来の蛍光自動細胞分取装置(FACS)で細胞単離して 10  $\mu\text{L}$  以上のスケールで全ゲノム増幅反応を行う手法と、同等のレベルは達成した。実際の環境サンプル(シロアリ腸内細菌叢)を用いた検証実験にも成功しており、例えば培養不能なシロアリ腸内原生生物細胞内共生細菌の 1 細胞ゲノムを 81%の完成度で取得できている。今後、反応時間を制御することでゲノム増幅バイアスを低減し、ゲノム完成度をさらに高めることを目指していく。

開発した「細菌 1 細胞アレイ」システムの、従来法には無い長所は、誘電泳動用の電極を用いて電気パルスで細菌細胞を破碎できる場合があることで、アルカリ処理などでは溶菌できなかった種類の原核生物を標的とできる可能性がある。また、細菌捕捉チャンバの直径を 0.5  $\mu\text{m}$  以下に設計すれば、FACS などでは捕捉できない極小原核生物種の 1 細胞ゲノミクスも可能となる。これらの機能は現在、検証を継続しているが、1 細胞ゲノミクスの対象となる微生物種の範囲を拡大できる大きな可能性を持っている。

今後、プロトタイプの実証・改良を続けて装置を熟成し、広く実用できることを目指したい。

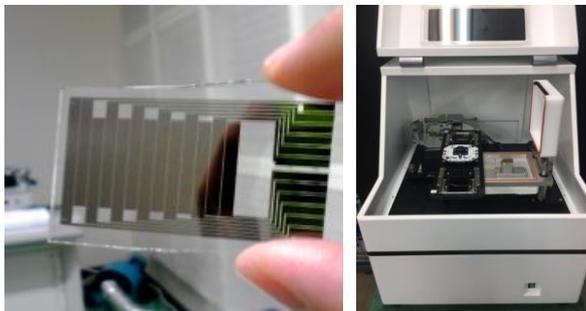


図. コアマイクロデバイス「細菌 1 細胞アレイ」(左)と半自動操作システム(右)。

## (2) 顕著な成果

### < 優れた基礎研究としての成果 >

#### 1. 細菌 1 細胞ゲノミクスに資する新規装置開発

概要:環境中の細菌の大多数は難培養種で構成されており、1 細胞ゲノミクスによるそれらの生理・生態の解明が近年の注目の的となっている。本課題では、これまでに開発されてきた手法とは全く異なる細菌 1 細胞単離機構を実装することに成功し、従来法で捕捉できない微小細菌単離や難溶菌性種からの DNA 抽出などの可能性を持っている。今後、装置を熟成させることで、従来研究対象とはできなかった原核生物種の 1 細胞ゲノミクスが期待できる。

#### 2. 静電力による単一細菌細胞操作法の開発

概要:底面に配置した電極が発生する誘電泳動力(静電力の一種)によって、微小チャンバに細菌 1 細胞のみを捕捉する技術の開発に成功し、必要な電界強度や周波数依存性を明らかにした。これにより、静電力によって多様な細菌種を 1 細胞レベルで分離、濃縮するなどの操作が可能であることを実証した。本研究で開発した「細菌 1 細胞アレイ」は、細菌 1 細胞レベルでの様々なバイオアッセイに拡張可能な基盤技術として、高い波及効果を期待できる。

#### 3. 電気パルス破碎による細菌細胞からの DNA 抽出法の開発

概要:微小チャンバに捕捉した細菌 1 細胞に電気パルスを印加することで、DNA 抽出を伴う溶菌を容易にする手法を開発した。本手法により、従来のアルカリ溶液などでは溶菌困難であった細菌種においても、DNA を抽出して遺伝子解析等を実現する可能性を示した。

### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

#### 1. 細菌 1 細胞操作技術の開発

概要:新たな潮流である 1 細胞解析の分野では、1 細胞という微小な生物体の扱いが重要であり、新技術の開発競争が激化している。本研究成果は真核生物細胞の 1/1000 の体積しかない細菌 1 細胞の操作を実現するものであり、世界に先駆ける技術となり得る。既に実用化の一手前まで成果が出ており、事業化されればライフサイエンスにおける様々な分野での基盤的役割を果たすとともに、産業的なイノベーションが期待できる。

#### 2. 細胞捕捉・化学反応技術の開発

概要:本研究で開発した「細菌 1 細胞アレイ」は、ゲノム解析にとどまらず、1 細胞レベルでの様々なバイオアッセイに利用できる可能性を秘めた、汎用性の高い基盤技術である。細菌だけでなく、より細胞サイズが大きい、ヒトなどの哺乳類細胞に応用することは容易であり、例えば、薬剤に対する効果のスクリーニングや感染症診断など、幅広いアプリケーションが考えられる。

#### 3. 細菌 1 細胞ゲノム解析がもたらす応用展開

概要:細菌を含む微生物は様々な産業で応用されているが、培養可能な微生物種はごく一部であり、それ以外の種の産業利用は困難であった。本研究で開発した装置は従来の手法による 1 細胞ゲノミクスでは解析困難であった細菌種を標的にできる可能性を持っており、遺伝子資源として利用可能な微生物種の範囲の拡大へとつなげていきたい。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「本郷」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
本郷 裕一	東京工業大学・生命理工	教授	H26.10～H30.3
桑原 宏和	同上	研究員→助教	H27.4～H30.3
河合 幹彦	同上	研究員	H27.4～H30.3
村上 匠	同上	院生→研究員	H28.4～H30.3
猪飼 桂	同上	研究員	H29.4～H30.3
楊 路	同上	研究員	H29.4～H29.10
茂木 克雄	同上	特別研究員	H29.4～H30.3
橋本 優生	東京工業大学・工学院	博士課程院生	H29.4～H30.3
木原 久美子	東京工業大学・生命理工	研究員	H26.11～H27.3
白瀧 千夏子	同上	研究員	H27.4～H28.6
原田 えりみ	同上	技術支援員	H28.4～H29.3
伊澤 和輝	同上	博士課程院生	H28.4～H29.3

##### 研究項目

- ・ 装置の仕様策定(サイズ・材質を含め、生物学的見地からの要求)。
- ・ 装置試作品の実験的検証と評価、フィードバック。
- ・ モデル生物種と環境試料を使用した結果の評価と、既存手法(FACS)との比較。

#### ②「山本」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
山本 貴富喜	東京工業大学・工学院	准教授	H26.10～H29.8
茂木 克雄	同上	特任助教	H26.11～H29.3
楊 路	同上	研究員	H27.4～H29.3
橋本 優生	同上	博士課程院生	H27.4～H29.3
Pungetmongkol Porpin	同上	博士課程院生	H26.10～H27.9

##### 研究項目

- ・ 細菌 1 細胞トラップ装置「細菌 1 細胞アレイ」の開発。

#### ③「鳥山」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
鳥山 武利	ケーディークロート株式会社	マネージャー	H26.10～H30.3
日下部 元一	同上	マネージャー	H26.11～H30.3
白石 利治	同上	技術顧問	H26.10～H30.3

##### 研究項目

- ・ 「細菌 1 細胞アレイ」の電源の開発。

- ・「細菌 1 細胞アレイ」で捕捉した細胞のゲノム増幅反応炉の開発。
- ・ゲノム増幅反応用微量溶液添加機構の開発。
- ・ゲノム増幅産物回収機構の開発。
- ・「細菌 1 細胞アレイ」を核とする装置全体の半自動化システムの開発。

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 細菌 1 細胞ゲノミクス用装置の仕様策定と検証(東京工業大学 本郷グループ)

本郷 G では、山本 G が作製する細菌 1 細胞捕捉・破碎用コアデバイス「細菌 1 細胞アレイ」及び鳥山 G が作製するゲノム増幅反応炉とコアデバイス半自動操作システムの仕様を策定するとともに、試作品の検証実験を行い、その結果を山本・鳥山 G にフィードバックすることで、装置・手順の最適化に取り組んできた。また、本課題で開発する細菌 1 細胞ゲノミクス用装置と、最も普及している FACS (蛍光自動細胞分取装置) を用いた 1 細胞ゲノミクスの手法を比較するため、BD FACS-JAZZ を使用した、大腸菌と枯草菌の 1 細胞ゲノミクスの結果も取得した。これらの 1 細胞ゲノム解析結果を迅速に評価・比較するため、情報解析パイプラインを構築した。なお、本研究課題では、全て Illumina MiSeq (300 塩基のペアエンド解析) を使用して DNA 塩基配列を取得した。

##### (1) 1 細胞ゲノム情報解析パイプラインの構築

1 細胞ゲノミクスに特化した情報解析パイプラインを構築した。パイプラインは、  
 (A) ゲノム既知(モデル生物など)の場合(既知ゲノムデータベースへの取得配列マッピング解析)  
 (B) ゲノム未知(環境試料)の場合(*de novo* アセンブルと分類群推定)  
 の2種類を用意した(図 3.1.1)。

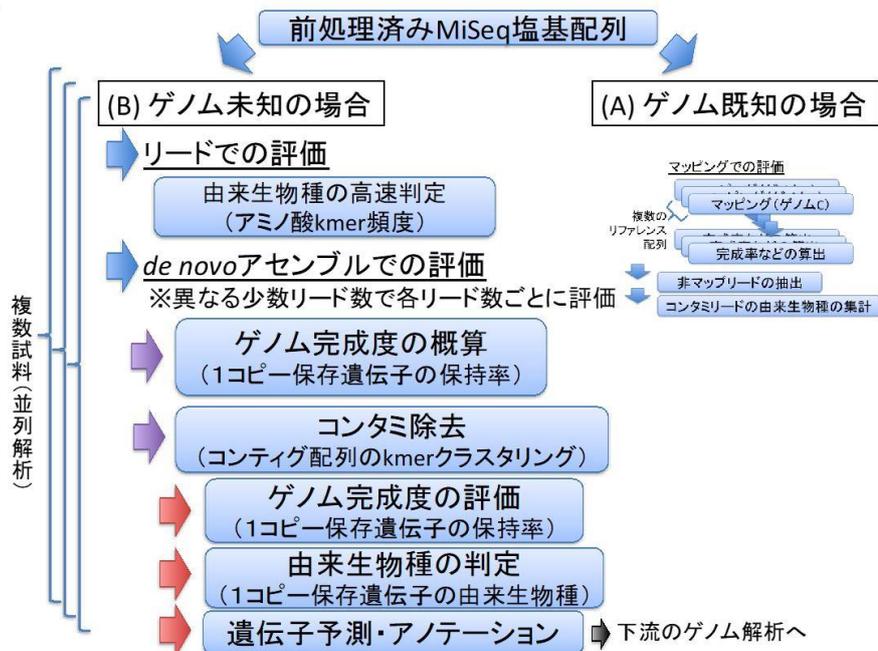


図 3.1.1. 1 細胞ゲノミクス用情報解析パイプラインの概略図

作成したパイプラインの特徴は、配列アッセンブル過程の並列化に加え、1 細胞ゲノム解析特有の問題点である、(a)ゲノム増幅バイアスと、(b)非標的ゲノム配列の混入(コンタミネーション)、の程度を評価するプログラムを実装した。特に、高効率なゲノム完成度判定に重点を置いた。実装した機能の概略を以下に示す。

##### (i) ゲノム完成度の評価

多くの細菌分類群間で保存されているシングルコピー遺伝子の保持率によってゲノム完成度を評価(プログラム CheckM の組み込み)。

##### (ii) 標的外 DNA 混入の程度の評価

既知ゲノムとの配列類似性で混入 DNA の割合を評価(アミノ酸 k-mer 頻度に基づく kaiju プログラムと類似性検索プログラム blast+の組み込み)。

(iii) ゲノム増幅バイアスの程度の評価

取得配列の既知ゲノムへのマッピングにより、ゲノム領域間での増幅バイアスを可視化する。

(iv) 由来生物の分類群推定

シングルコピー保存遺伝子の類似性検索結果から lowest common ancestor (LCA; 最小共通生物分類)を推定することで、由来生物の分類群を特定(類似性検索プログラム blast+と LCA 推定プログラム blast2lca の組み込み)。

(v) 少量の配列解析でのゲノム完成度予測システム

FACS を用いてモデル細菌あるいは実際の環境サンプルを解析する場合、1 細胞分取やゲノム増幅時の失敗、また増幅バイアスや混入 DNA による低品質の増幅産物生成などにより、ゲノム解析に値する高品質なサンプルの取得率は高くない。そこで、失敗・低品質サンプルを高効率に判定する手法の開発が求められてきた。本研究において、少量の配列でゲノム増幅産物の品質(コンティグ総量)を判定するパイプラインの開発に成功した。

この情報解析パイプラインを用いて、以下のように開発装置の性能評価を行った。

## (2) モデル細菌種を用いた「細菌 1 細胞アレイ」装置の評価

試行実験のモデルとして、主に、*Escherichia coli* K12(大腸菌、グラム陰性)、*Escherichia coli* K12+pAcGFP1 (GFP 発現大腸菌)、*Bacillus subtilis* NBRC111470 (枯草菌、グラム陽性)、*Corynebacterium glutamicum* JCM1318 (放線菌、グラム陽性)、*Deinococcus proteolyticus* JCM6276(放射線耐性菌、グラム陽性)、*Methanobrevibacter ruminantium* JCM13430(メタン生成古細菌)を使用した。GFP 発現大腸菌は、細胞捕捉と破碎状況を観察するために使用したが、1 細胞ゲノム配列解析では GFP 遺伝子導入プラスミドが大量に増幅されてしまうため、途中から細胞の観察には、生細胞にも適用できる細胞膜蛍光染色試薬 FM1-43 を使用した。同蛍光試薬はゲノム増幅反応を阻害しないことを確認済みである。これらの菌株のうち、特に *Deinococcus* と *Methanobrevibacter* は堅牢な細胞壁を持ち、一般に、難 DNA 抽出性である。

電気パルスによる細菌細胞破碎の検証については、主にレーザー描画作製による「細菌 1 細胞アレイ」チップで試行してきた。しかしながら、同チップの素材がゲノム増幅反応を阻害することが後に判明し、チップの作製方法を FIB (focused ion beam) 法へと抜本的に変更せざるを得なくなった(詳細は山本 G の報告書に記載)。この新デザインの「細菌 1 細胞アレイ」チップ(捕捉チャンバ直径 2  $\mu\text{m}$ )を使用して、上記の種々の菌株を使用した試行実験を行った。

実験は、

- ① 「細菌 1 細胞アレイ」チップほか、関係するパーツ全てを UV 処理して DNA を除去。チップに PDMS 製マイクロ流路(山本 G 報告書参照)を接着して、0.02%の Tween 20 で洗浄。
- ② 各種培養菌株(単一あるいは混合)を適当な密度に希釈して、数 10~数 100  $\mu\text{L}$  を「細菌 1 細胞アレイ」上のマイクロ流路に添加。
- ③ 電圧を印加して細菌を微小チャンバにトラップ。純水を流して洗浄。チップの一部について、1 細胞ずつ捕捉されていることを蛍光顕微鏡で確認。
- ④ マイクロ流路をはずして、PEEK+PDMS 製の反応炉(鳥山 G 報告書参照)を装着。
- ⑤ 分注装置(Mantis)で 0.2  $\mu\text{L}$  の純水を添加。
- ⑥ (オプション)細胞破碎用の電気パルス印加。
- ⑦ 細胞溶解・変性用の KOH 溶液を添加し、数分間室温でインキュベート。
- ⑧ UV 処理済みゲノム増幅試薬(GenomiPhi V2)を添加。合計 1.9  $\mu\text{L}$  で o/n 反応。
- ⑨ 反応液を回収して DNA を蛍光染色し、Qubit で DNA 濃度測定。
- ⑩ 増幅が見られたものについて、Nextera XT キットでライブラリを調製し、MiSeq で配列解析。

という手順で行い、1 細胞ゲノム取得状況を評価した。なお、逐次各部材・手順の改良を行うために、分注作業以外はほぼ手動で行っているが、条件が確定した段階で、チップ、反応炉、マイクロ流路(脱着可能)が一体となったデバイスを作製し、半自動的に処理する予定である。

以下に、MiSeq でのゲノム配列解析結果に基づく「細菌 1 細胞アレイ」の性能の評価を示す。電気パルスの細胞破碎効果とゲノム配列解析への影響を評価するため、基本的には、同一チップを2区画に分けて電気パルス有り(Y)と無し(N)の両方を試みている。

### ① 「細菌 1 細胞アレイ」の 1 細胞ゲノム増幅成功率

チップ 1 枚(あるいは 1 枚を2分割した1区画)当たりの 1 細胞ゲノム増幅成功率を図 4.1.2 に示した。使用した菌株は、大腸菌、枯草菌、放線菌、メタン菌で、試行回によって混合する菌株の組み合わせが異なっていたり、チップの仕様や手順の違いが有るものの、いずれにせよ電気パルスの有無による相違はほぼ見られなかった(図 3.1.2)。個別の菌株で見た場合、メタン菌を含めてどの菌株も KOH 溶液のみによる溶菌でもゲノム増幅に成功しており、電気パルスの効果の評価には不適であった。上記4株に対し、*Deinococcus* は KOH のみでは溶菌できでいないが、電気パルスを印加してもゲノム増幅成功率は低く、2018 年 3 月時点で電気パルス破碎効果を実証できていない。電気パルスの有無にかかわらず、成功率は最大で 7 割前後以上となっており、当初の目標の 50% 以上をクリアしている。

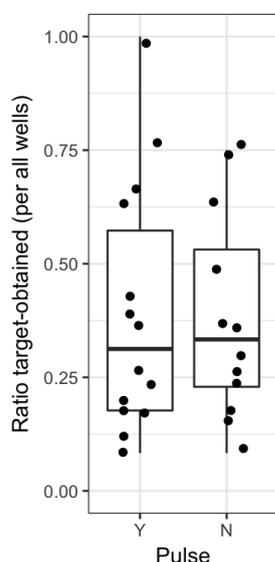


図 3.1.2.「細菌 1 細胞アレイ」によるモデル細菌種の 1 細胞ゲノム配列取得成功率。各プロットは、各試行回における標的ゲノム配列取得成功率。電気パルス有り(Y: n = 14)と無し(M: n = 12)に分けて表示した。数 10 サンプル/MiSeq ランで配列を取得しているため、1 サンプル当たりの配列数は制限されており、標的細菌配列が完成度 10%以上で得られていれば「成功」と定義した。電気パルスの有無で、成功率の平均値に差は無かった(有:39%、無:38%)。いずれも試行回によって成功率のバラツキが大きいのが、常にチップの仕様と作業手順を改定しながらデータを取得してきたためである。

### ② 「細菌 1 細胞アレイ」と FACS を用いた場合での 1 細胞ゲノム完成度の比較

次に、「細菌 1 細胞アレイ」で取得した 1 細胞ゲノムの完成度と、BD FACS-JAZZ を使用して得た 1 細胞ゲノムの完成度を比較した(図 3.1.3)。双方ともに使用したのは大腸菌と枯草菌で、メタン菌、放線菌、*Deinococcus* は「細菌 1 細胞アレイ」のみのデータだが、参考のために示した。いずれも比較のために、MiSeq の配列数を 20 万リード、ランダムに抽出して完成度を計算した。ともに多くの例数がある大腸菌で比較すると、完成度の平均値は「細菌 1 細胞アレイ」で 31%、FACS で 20%と、前者の方が高いが、全体の傾向としては低い完成度(20%程度)から高い完成度(75%程度)まで幅広くばらついており、高い完成度の 1 細胞ゲノム取得率をコンスタントに得る、という目標には達していない。なお、ゲノム完成度の平均値がいずれも 30%程度以下しかないのは、上記のように 20 万リードに制限をしているためで、1 細胞ゲノムミクスにおいて高い完成度を得るには、本来、この 10 倍程度の配列数が必要である。

1 細胞ゲノムの完成度が FACS と比較してあまり改善していないのは、「細菌 1 細胞アレイ」のゲノム増幅反応炉を当初の nL スケールから  $\mu$ L スケールに変更したためと考えられる。実践的な扱いやすさと、取得したゲノム増幅産物を遺伝子資源として確保するため変更だが、そのために nL スケールで得られたであろうゲノム増幅バイアスの低減を犠牲にしている(図 3.1.4)。現在の仕様で一晩(16 時間程度)ゲノム増幅を行うと、約 200~600 ng 程度の DNA 産物を得ているが、目的としてはこの 1/10 あるいは 1/100 程度の産物量で良いため、保湿チャンバの温度の時間制御機構を追加して反応時間を短くすることで、増幅倍率を抑え、増幅バイアスの低減を試みたい。

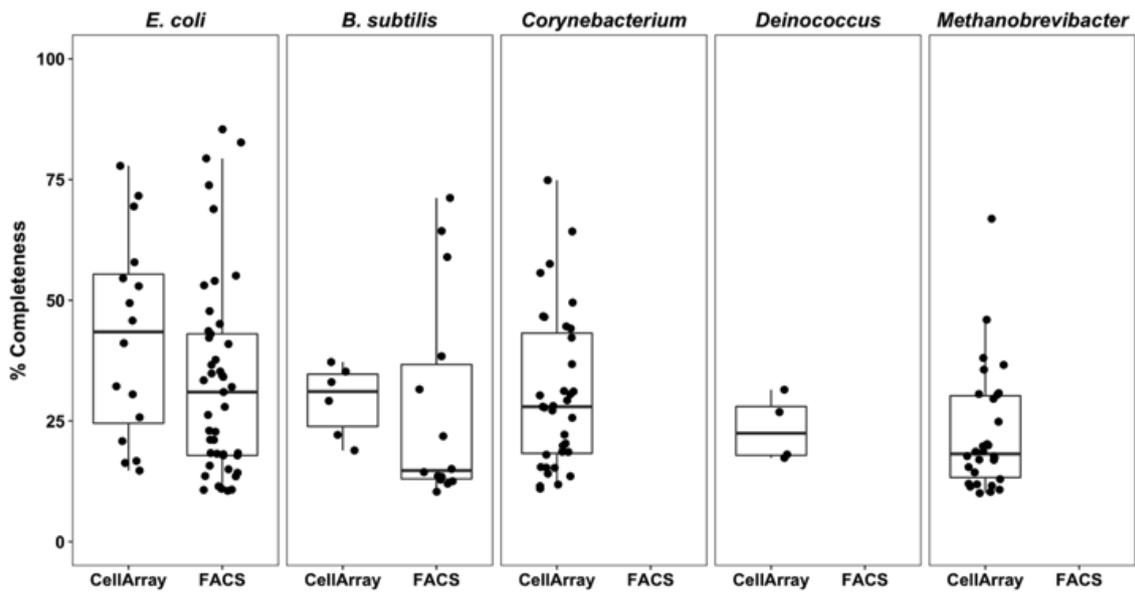


図 3.1.3.「細菌 1 細胞アレイ」と FACS を用いた手法間での 1 細胞ゲノム完成度の比較。それぞれ MiSeq で取得した配列から 20 万リードをランダムに抽出して比較。大腸菌 (*E. coli*) のゲノム完成度の平均値と標準偏差は、「細菌 1 細胞アレイ」で  $31 \pm 25\%$  ( $n = 26$ )、FACS で  $20 \pm 19\%$  ( $n = 78$ )。他細菌やヒトゲノムなどのコンタミネーションが多かったサンプルと、標的細菌ゲノムの完成度が 10% に満たないものは、失敗サンプルとして除外した。

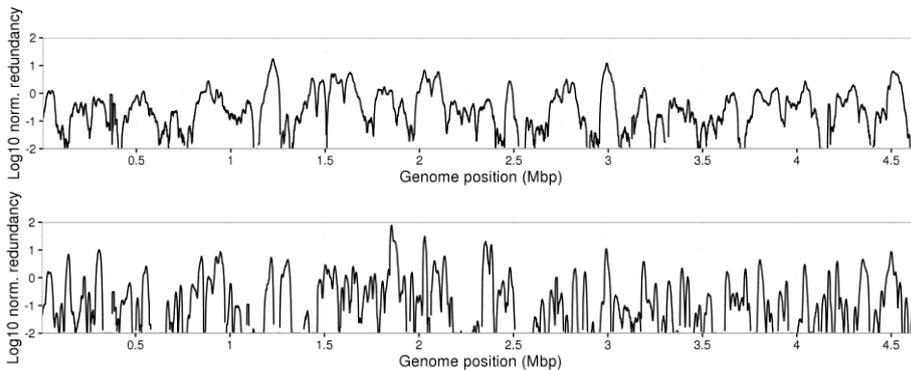


図 3.1.4.「細菌 1 細胞アレイ」(上) と FACS (下) を用いて取得した 1 細胞ゲノム増幅バイアスの比較。それぞれ典型例を示した。

③ 「細菌 1 細胞アレイ」で取得した 1 細胞ゲノム完成度の電気パルス有無での比較

電気パルス破碎ステップの有無で、1 細胞ゲノム取得成功率に差が見られなかったという結果は上述のとおりであるが、ゲノム完成度についても比較を行った。チップの版や菌株によって差が有り得るので、ある試行回の結果を一例として図 3.1.5 に示した。放線菌の場合、全体にパルス有りの方がゲノム完成度が高い傾向にあったが、更なる検証が必要である。

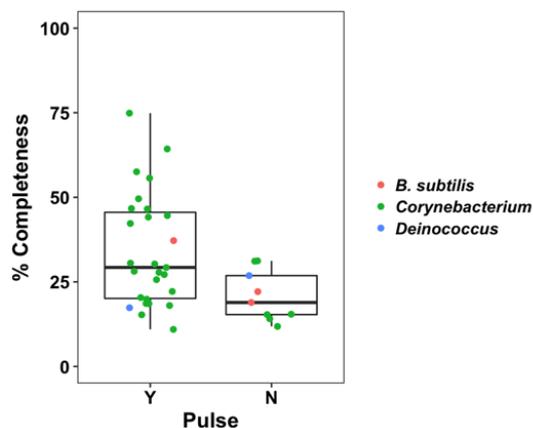


図 3.1.5.「細菌 1 細胞アレイ」で取得した 1 細胞ゲノム完成度の電気パルス破碎ステップの有 (Y) 無 (N) 間での比較。プロットは、ピンク: 枯草菌、緑: 放線菌、青: *Deinococcus* をそれぞれ示す。同 3 種を混合して添加した結果である。

### (3)「細菌 1 細胞アレイ」による環境サンプル(シロアリ腸内細菌叢)の 1 細胞ゲノム解析

実際の環境サンプルを使用した場合の結果を評価するため、日本の代表的な木材害虫であるイエシロアリ(*Coptotermes formosanus*)とヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)の腸内微生物叢を材料として、「細菌 1 細胞アレイ」での細菌 1 細胞ゲノム配列取得を試みた。木片や組織片などの混入を防ぐため、低速遠心での沈殿除去と 5 μm 径での濾過処理後、DNase I 処理で溶存 DNA を除去し、遠心洗浄後にチップに添加した。

2018 年 3 月までに複数回試行し、原生生物細胞内共生メタン菌、同 *Azobacteroides* 細菌の他、シロアリ腸内に特異的な各種細菌系統の 1 細胞ゲノム配列の取得に成功した。成功率(ゲノム完成度が 10%以下のもの、混入細菌ゲノムのゲノム完成度が 10%以上に達していたものは除く)は、10%-50%の間でバラついた。不安定さの最大の理由は、チップの出来の不安定さが解消されていない(反応阻害が生じることがある)ためだが、環境サンプルでは、細菌同士の凝集や溶存 DNA 混入を防ぎきれないことが多く、FACS を用いた場合でも複数種由来のゲノムが混合することは少なくない。今後、溶存 DNA の洗浄法などについては、更なる改善をしていきたい。

配列解析したイエシロアリ腸内細菌サンプルのうち、20 万リード以上の配列を取得したものについて、ランダムに 20 万リードを抽出して、BD FACS-JAZZ によるシロアリ腸内細菌叢解析の結果と比較した(図 3.1.6)。「細菌 1 細胞アレイ」でのゲノム完成度(推定値)は、12.5%から 81.9%に達している。異なるシロアリ種を用いた結果であるため、単純な比較はできないが、FACS と遜色ないゲノム完成度を得ている。複数菌種由来の DNA 配列の混入率も、同程度である(図 3.1.7)。図 3.1.6 で示した上位の 5 試料について 200 万リード以上解析したところ、推定ゲノム完成度は 90-96%に到達しており、十分に、論文発表できる品質である。電気パルス破碎の有無による相違については、今のところ得られた菌種などに顕著な差は見られていない。今後、さらに環境サンプルを用いた実践例を重ね、装置と手順の最適化を進めたい。

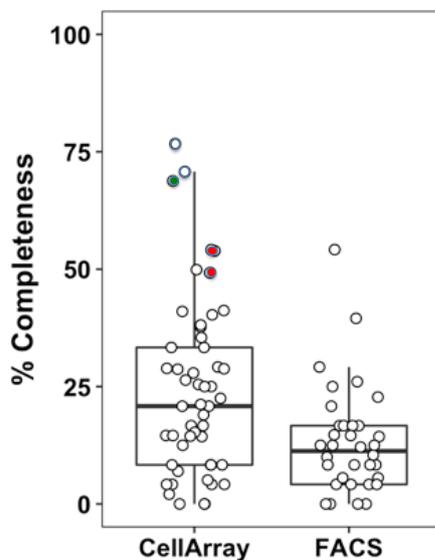


図 3.1.6. 「細菌 1 細胞アレイ」と FACS により取得したシロアリ腸内細菌 1 細胞ゲノムの完成度の比較。前者ではイエシロアリ腸内細菌叢を、後者ではタカサゴシロアリ腸内細菌叢を使用した。いずれも MiSeq のリード数をランダムに 20 万本抽出して比較した結果である。ゲノム完成度(縦軸)は、多様な細菌分類群間で保存されているシングルコピー遺伝子の保有率によって推定した。

青：細胞内共生 *Azobacteroides pseudotrichonympha*; 緑：*Dysgonomonas* sp.; 赤：細胞内共生 *Methanobrevibacter* sp. いずれも未培養原核生物種である。

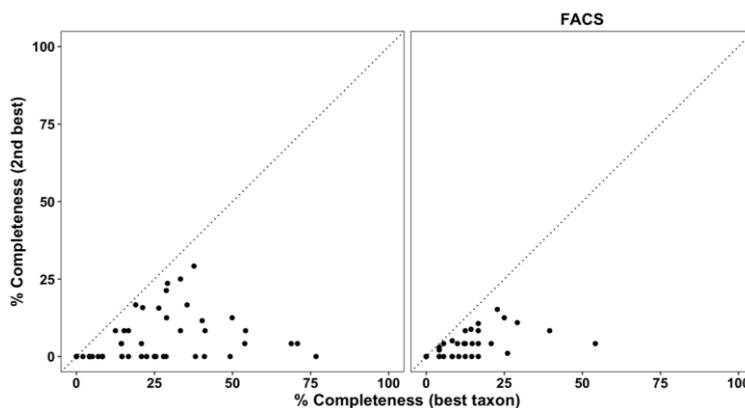


図 3.1.7. 「細菌 1 細胞アレイ」(左)と FACS(右)でのシロアリ腸内細菌 1 細胞ゲノム解析における、複数種由来 DNA 混入度の比較。横軸が主たる細菌種のゲノム完成度で、横軸が混入種の DNA の完成度。

### 3.2 「細菌 1 細胞アレイ」の開発(東京工業大学 山本グループ)

#### (1) 「細菌 1 細胞アレイ」作製方法の確立

電極基板作製の外部委託と集束イオンビーム(FIB)による微小チャンバの自製により、本研究の技術仕様を満たす「細菌 1 細胞アレイ」の作製プロセスの開発に成功した。

本課題で作製する細菌 1 細胞ゲノム増幅装置のコアとなるのは、2  $\mu\text{m}$  以下程度のサイズしかない細菌細胞を誘電泳動力で 1 細胞ずつ捕捉し、その破碎(DNA 抽出)と全ゲノム増幅反応を実行するマイクロデバイス「細菌 1 細胞アレイ」である。その作製上の大きな技術課題は、電極ギャップと細胞捕捉用チャンバ(以下チャンバと略す)の作製に最高精度の加工技術を要することである。本デバイスは、図 3.2.1 に示すように、パターンニングされた電極基板と細菌 1 細胞サイズのチャンバとの 2 層構造であり、例えば精度目標である電極ギャップ 0.5  $\mu\text{m}$  に対し、直径 0.5-3.0  $\mu\text{m}$  のトラッピングチャンバを整列するには、最低でも 0.1  $\mu\text{m}$  程度の加工精度と位置精度の両立が必要となるため、MEMS 微細加工技術を用いても容易ではない。本研究では、このような技術的な課題の解決に加え、経済的合理性も満たすことを目標に置き、作製プロセスの開発を行った。

一般的に、マイクロデバイスの作製にはフォトリソグラフィなどの微細加工技術を利用するケースが多いが、安価で大量生産が可能な反面、実際には数  $\mu\text{m}$  程度の加工精度にとどまる。本デバイスの仕様はその限界付近にあり、作製が難しいことが予想される(半導体デバイス生産に用いられる短波長光源を利用した装置群を用いれば可能と予想されるが、経済的合理性を満たせないため、ここでは対象としていない)。一方、電子ビーム描画による加工であれば、要求する精度は満たすものの作製には時間がかかり、高コストとなるデメリットがある。

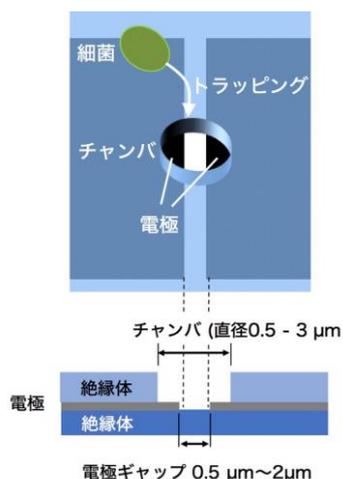


図 3.2.1.「細菌 1 細胞アレイ」の概念図。実際は上記のユニットが多数配列されたデバイスである。一般的な細菌サイズの小さいものとして 0.5  $\mu\text{m}$  程度を想定し、電極ギャップ 0.5  $\mu\text{m}$ 、チャンバの直径 0.5  $\mu\text{m}$  程度を加工における目標寸法とした。

#### ・フォトリソグラフィによるデバイス作製(フォトマスクによるデバイス作製)

本課題で実用化を目指す「細菌 1 細胞アレイ」は、コンタミネーションを防ぐ為に使い捨てを原則としており、低コストであることが望ましく、かつ事業化の際には外部委託生産が可能である必要がある。そこで、加工精度の限界付近で難しいことが予想されたものの、作製できれば MEMS ファウンドリーで低コストでの量産が可能となる、フォトリソグラフィでの作製に着手した。その結果、電極ギャップとチャンバ径、共に 2  $\mu\text{m}$  程度までは成功したものの、より微細な構造の作製は困難であった。外部の MEMS ファウンドリーとも相談して様々な条件検討と試作を行ったが、これ以上の精度を出すことは難しく、別の加工法に切り替えざるを得ないとの結論に達した。

限られた時間内で作製法を確立するため、計画当初よりバックアッププランとして予定していた、より高精度が期待できるレーザー直接描画、および電子ビーム直接描画による作製法を同時進行で検討することにした。この間、サイトビジットにおけるアドバイスもあり、製品化後のチップ量産化を想定し、外部ファウンドリーでも可能な加工プロセスの検討と試作を平行して進めた。

### ・レーザー及び電子ビーム描画によるデバイス作製

レーザー描画装置と電子ビーム描画装置を使用して、それぞれによるデバイス作製を行った。その結果、レーザー描画ではフォトリソグラフィよりも高い加工精度が得られたものの、電極パターンに関しては1  $\mu\text{m}$  程度、細胞捕捉チャンバに関しては2  $\mu\text{m}$  程度の精度が限界であった。しかも、レジストがゲノム増幅酵素反応を完全に阻害することが明らかとなったため、使用を断念した。一方、電子ビーム描画では増幅反応阻害も無く、0.1  $\mu\text{m}$  以下の精度が得られ、直径0.5  $\mu\text{m}$  のチャンバを0.5  $\mu\text{m}$  幅の電極ギャップ上に位置合わせの上で作製することに成功した。ただし、高さが1  $\mu\text{m}$  以上のチャンバを作製する場合はチャージアップ(帯電による位置ずれ)により位置精度が出せず、様々な素材、有機導電膜やオスmiumコーティングによるチャージアップ防止、電子ビーム描画装置のソフトウェア改良による画像処理での位置補正などの改良を試みたが、改善しなかった。この問題の解決に当たっては、装置メーカーや電子ビーム用の材料メーカーとも検討したが、現状の技術と素材では解決困難との結論に至った。

以上、レーザー描画では加工精度が不足する上にゲノム増幅反応を阻害してしまい、電子ビーム描画では加工精度は満たされるものの位置精度が不足する結果となった。ただ、従来品より高性能かつ低コストなドイツ製(Allresist社)の新しい電子ビーム用レジストとチャージアップ防止剤の日本国内での取り扱いが始まったため、購入して電子ビームプロセスの見直しを進めているところである。

### ・電極基板の外部委託+FIBでのチャンバ作製によるデバイス製作(最終的な作製法)

電極基板のみを外注作製し、細胞捕捉チャンバは集束イオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)加工で自ら作製することで、生産性と経済的合理性の両立を図った。電極基板は、上記のように外注によって安定的に電極ギャップ長1.0  $\mu\text{m}$  のものが作製でき、再現性は低いもののギャップ長0.5  $\mu\text{m}$  も作製可能である。この電極基板に対して、山本Gが所有するFIB加工装置を用いたチャンバの作製を検討した。最終的な作製プロセスを図3.2.2に示す。

電極パターンの作製と、電極パターン上に厚さ2-3  $\mu\text{m}$  のシリコンレジンをコーティングするステップまでは外注する(図3.2.2①②)。様々な素材を本郷Gと評価した中で、シリコンレジンは全ゲノム増幅反応を阻害せず、さらに表面が疎水性のため増幅産物回収も容易であることから、チャンバ材料として採用した。次に、最終的な洗浄プロセスで必要(後述)となるポリメタクリル酸メチル樹脂(PMMA)層をコーティングする(同図③)。ところで、FIB加工では被加工面の最表面しか観察できず、従ってシリコンレジンを介すると電極ギャップに位置合わせできない。そこで、電極ギャップ部の可視化のために、位置合わせ用パターンをフォトレジストでシリコンレジン上に作製する必要がある(同図④)。この際、フォトレジスト層が厚すぎるとFIB加工時のチャージアップにより位置ずれが生じるため、最終的に厚さ約400 nmのフォトレジスト層をパターンニングした上に厚さ約20 nmのオスmium(Os)をコーティングすることにした(同図⑤)。チャージアップ防止用としては導電性が高い方が良いので、Auなど他の金属でも代用可能であるが、導電性、フォトレジストの密着性、二次電子の放出量による可視化性のバランスに優れる材料として、我々が評価した限りにおいてはOsが最も優れていた。次に、表面のフォトレジスト構造で電極ギャップ部に位置合わせをしつつ、FIB加工でチャンバを作製する(同図⑥)。この時、FIBによりPMMA層、シリコンレジン層、石英層まで貫通させて、最終的なチャンバ構造を形成した。図3.2.3はFIBによる穴開け後の走査型イオン顕微鏡像である。同図a)は加工後の上面図で、電極形状、チャンバ形状、および両者の位置関係が、本デバイスの精度仕様を満たしていることを確認した。同図b)はチャンバ周囲の断面形状で、図4.2.2の工程における各層と、イオンビームの形状によってV字型のチャンバになっていることが確認された。最後に、フォトレジストとPMMAをアセトンで除去し、デバイスを完成させた(図3.2.2 ⑦)。

なお、本プロセスに必要なポジ型フォトレジストは、いずれの種類であっても、強力にゲノム増幅反応を阻害することが判明し、フォトレジストは一切の残渣無く完全に除去する必要が生じた。ところが、フォトレジスト除去に一般的に使用されるアセトンやDMSOなどの有機溶媒を始め、強酸、強アルカリ等で複数回洗浄しても阻害を防げなかった。酸素プラズマ洗浄であればフォトレジストを完全に除去できるものの、同処理の副作用で親水化された表面が増幅反応を阻害することも判明し、

結局、一旦フォトリソが接触した表面はゲノム増幅反応には適さないと結論づけた。そこで、レジスト剥離後の表面に、フッ素などの表面コーティングを施して反応阻害を抑制することにしたが、今度は表面コーティングによるチャンバ内形状の変化に起因した細胞トラッピング阻害が生じるようになった。様々な検討の結果、最終的な解決方法として、犠牲層となる PMMA 層を介してフォトリソをパターニングし、フォトリソの洗浄時はフォトリソが触れた表面である PMMA ごと除去する方法で、フォトリソに起因する反応阻害を解決する方法を編み出した。

以上、本課題で求められる仕様を満たす「細菌 1 細胞アレイ」の作製プロセスの開発に成功した。これを本プロジェクトにおける最終的なデバイス作製法とし、基本的にはチャンバ径 2 μm で作製したデバイスを各評価実験に用いた。

なお、本デバイスの作製は、FIB 加工の部分も含めて全て外注で作製可能であるものの、手間と時間を要するため、使い捨てデバイスに求められる価格との経済的合理性を満たすとは言いがたい。そこで、今後も継続してより低コストな作製プロセスを探索する予定である。

図 3.2.4 に、これまでに研究した様々な作製法のまとめを示す。FIB 加工ではチャンバ径 0.5 μm 以下でも作製可能であり、FACS で捕捉できない極小細菌細胞も標的にできる可能性がある。

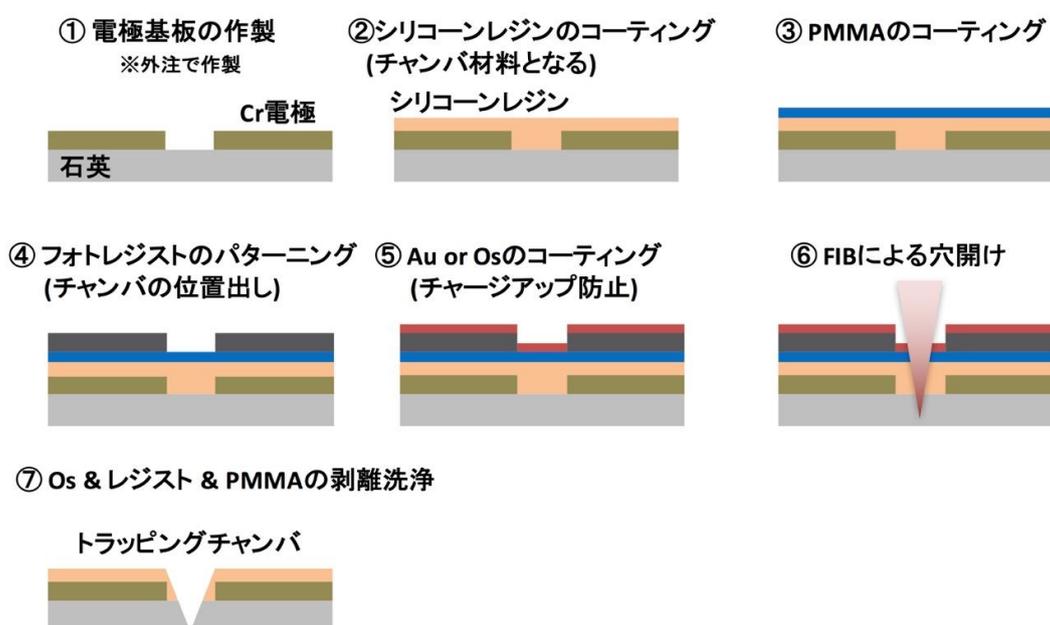


図 3.2.2. FIB 加工による細菌 1 細胞捕捉チャンバ作製プロセス



直径0.2 μm程度までのチャンバを位置合わせの上で作製可能  
チャンバの断面形状はV字型

- a) 電極とチャンバのサイズと位置関係  
b) チャンバ周囲の断面図

図 3.2.3. FIB 加工で作製したチャンバの走査型イオン顕微鏡 (SIM) 像

	フォトリソグラフィ	レーザー直描	電子ビーム直描	FIB 直描
電極ギャップ	2 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	< 0.5 $\mu\text{m}$	
チャンバ径	2 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	< 0.5 $\mu\text{m}$	< 0.5 $\mu\text{m}$
チャンバ高さ	> 3 $\mu\text{m}$	> 3 $\mu\text{m}$	< 1 $\mu\text{m}$	> 3 $\mu\text{m}$
位置合わせ	2 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$	チャージアップにより測定不可	< 0.1 $\mu\text{m}$

図 3.2.4 各種加工法による加工精度と位置合わせ精度

## (2) 「細菌 1 細胞アレイ」による細菌 1 細胞トラッピング

「細菌 1 細胞アレイ」における電気力学的操作に、マイクロ流路を用いた流体力学的操作を融合することによって、再現性の良い細菌 1 細胞のトラップを実現した。捕捉率(トラップされたチャンバ数/全チャンバ数)や、捕捉数(単一 or 複数)などの定量的なデータの取得は継続中であるが、条件が良い場合の 1 細胞捕捉率は 100%近くを達成することに成功した。

本課題の研究期間を通じて、様々な手法でデバイスを作製して細菌 1 細胞のトラッピング評価を行ってきたが、ここでは最終的な方法である FIB 作製によるデバイスの評価を中心に報告する。

最初に、フォトリソグラフィで作製した直径 3  $\mu\text{m}$  の細菌捕捉チャンバを持つ「細菌 1 細胞アレイ」チップを用い、トラッピングに必要な誘電泳動力の生成条件を検討した。同条件は、細胞や溶液の導電率・誘電率などの物性値と、印加電界の強度・周波数など様々なパラメーターに依存する。そこで、まずは大腸菌の捕捉に必要な電界強度および周波数依存性を検討した。

SYBR Gold(核酸蛍光染色試薬)で可視化した大腸菌生細胞の動きを超高感度カメラで観察し、細胞捕捉の成否を評価した。図 3.2.5 は、統計処理のため顕微鏡 1 視野内に多数の細胞捕捉チャンバが入るように集積度を上げたチップでの細菌 1 細胞捕捉結果である。図の右側の一連の写真は大腸菌捕捉のタイムラプス画像であり、チャンバに大腸菌が引きこまれていく様子がわかる。本チップは集積度が高いために隣り合う電極との間隔が狭くなり、チャンバ以外の電界強度も高くなることから、電極エッジにも大腸菌が捕捉されている。また、大腸菌に比べてチャンバの直径がやや大きい場合、複数細胞が捕捉されているチャンバも観察された。

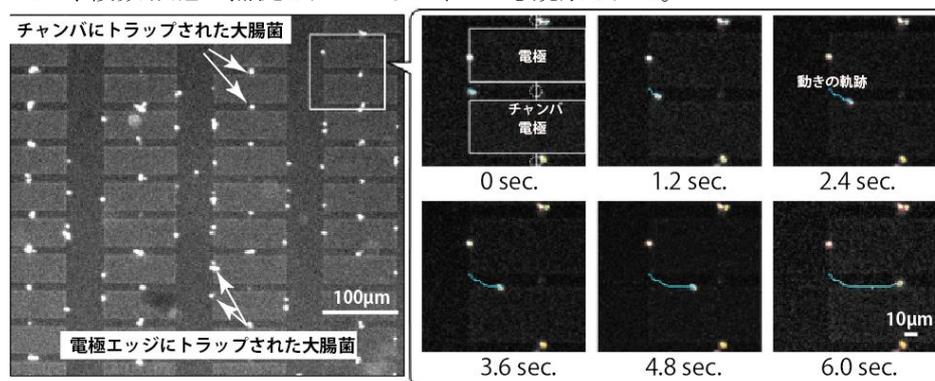


図 3.2.5. 細菌 1 細胞アレイ試作装置による大腸菌捕捉の様子

次に、誘電泳動力の制御による大腸菌 1 細胞の捕捉を目的とし、最適な電界強度と周波数を求めた。まず、大腸菌が捕捉できる条件を大まかに求めたところ、電界強度 10 MV/m 以上、周波数 100 kHz~3 MHz となった。ちなみに、10 MV/m の高電界は、電極ギャップが 1 cm ならば 10 万 V もの高電圧が必要だが、電極ギャップが 1  $\mu\text{m}$  の本デバイスではわずか 10 V で実現可能である。これは、微小スケールで静電操作を行う大きな長所である。

さらに詳細な条件を検討したところ、電圧と周波数を低下させることで、チャンバに捕捉される大腸菌細胞数をかなり抑制できた(図 3.2.6)。ただし、同時に細胞捕捉力自体も低下してしまうため、余剰細胞の洗浄方法、試料中の細菌細胞密度、チャンバの物理的形狀も合わせて総合的に条件

を検討する必要が生じた。

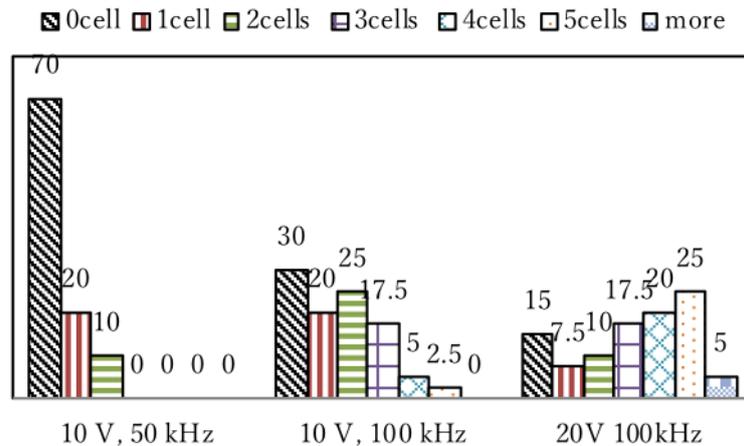


図 3.2.6 電界強度・周波数と捕捉大腸菌数の関係

まず、試料液および洗浄液の供給を自動化・安定化するため、「細菌 1 細胞アレイ」上に装着するマイクロ流路(マイクロポンプ駆動型)の開発に着手した(図 3.2.7)。圧損による流速低下を最小化し、溶液交換を効率化するため、「細菌 1 細胞アレイ」のデザインに対応した 8 本のマイクロチャンネルが並列するデザインとした。マイクロ流路は機械切削で作製したアルミ製の金型に対し、シリコーンゴムの一種である Polydimethylsiloxane (PDMS)の型取りによって作製した。PDMS は自己接着性を有するため、チップ上に配置すればそのまま接着し、かつ使用後は簡単に引き剥がせるので、チャンバ(+反応ウェル)への試薬添加と産物回収の支障にはならない。陽圧で送液をすると流路内の内圧が上昇して流路が剥がれるため、流路の出口から陰圧で駆動した。マイクロポンプは最大-50kPa の駆動圧を出力し、最大出力下では数秒で流路内の全液を交換しつつ余剰細菌を洗い流せる、ハイスループットな構成とした。

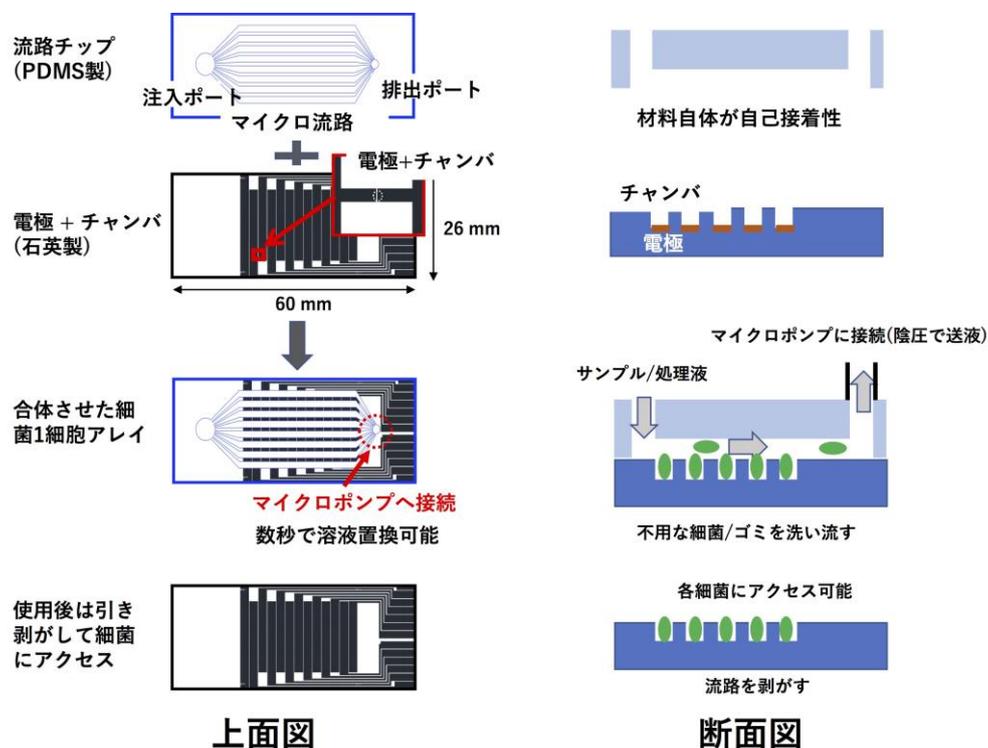


図 3.2.7 マイクロ流路と「細菌 1 細胞アレイ」を組み合わせた細菌 1 細胞捕捉の概念図

図 3.2.8 は、「細菌 1 細胞アレイ」で捕捉した細菌の例である。細菌は細胞膜染色蛍光色素(FM 1-43)で可視化してある。様々な電極デザインの「細菌 1 細胞アレイ」を評価してきたが、同図は最終候補の 2 つを並べたものである。トラッピング時の電圧条件は、同図 a)のデザインでは 30 V<sub>p-p</sub>、b)のデザインでは 70 V<sub>p-p</sub>、周波数はいずれも 1 MHz である。図 a)は電極幅 10 μm、チャンバ径は 2 μm で、大腸菌が鉛直方向に捕捉されている。図 b)のデザインは、チャンバ以外での余剰の細胞捕捉の低減を目的としたもので、電極幅 2 μm、チャンバ径 2 μm で、1 μm 程度のサイズの放線菌 (*Corynebacterium glutamicum*) を捕捉している。同図ではわからないが、図 b)のデザインの方が、圧倒的に非特異的捕捉が少なく、優れている。

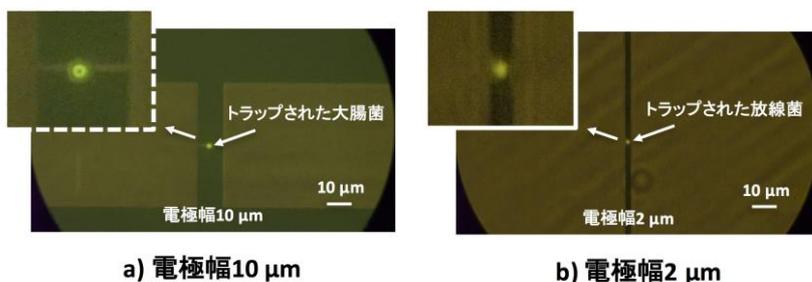


図 3.2.8. 異なる 2 つの電極デザインの「細菌 1 細胞アレイ」による細菌 1 細胞捕捉。黒い部分が Cr 電極。

図 b)のタイプは電極幅が細菌サイズのため、マイクロ流路内で細菌を流しながら細胞の捕捉をすると、一旦電極上に引き寄せられた細菌がレールの上を滑るがごとく(実際に溝があるわけではない)、電極に沿って移動しながら最終的にチャンバにトラップされ、余剰の細胞はそのまま流されていく(図 3.2.9)。

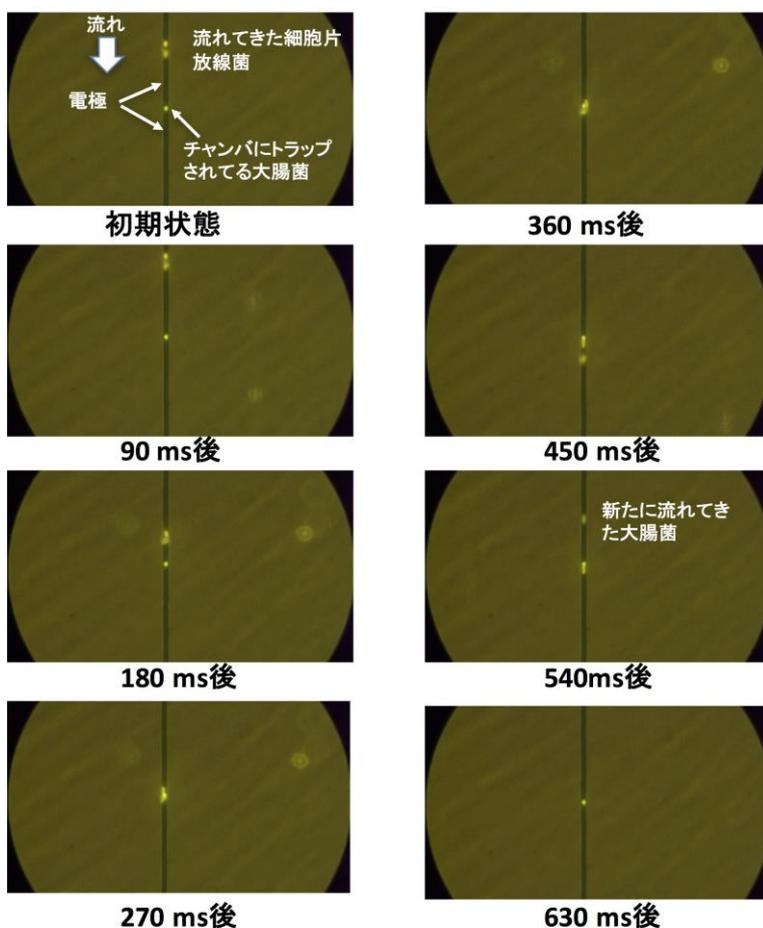


図 3.2.9.「細菌 1 細胞アレイ」での細菌 1 細胞捕捉と、洗浄による余剰細菌細胞の挙動。大腸菌と放線菌の混合サンプルを使用。上下の細い黒線が Cr 電極で、中央付近に細胞捕捉チャンバがある。複数の細菌細胞が電極上を滑り流れて来るが、既に細菌がチャンバにトラップされていると、他の細菌が入る物理的空間が無くなること、および捕捉されている細胞が蓋をする形となって電場が弱くなることから、流体力で余剰な細菌は電極上を滑るのように洗い流されていく。細菌細胞は FM1-43 で蛍光染色してある。

このように、マイクロ流路の設置によって単に溶液交換の自動化が容易になっただけでなく、流体力学的な力(ストークス力)により余剰の細菌を洗い流せるようになった。つまり、流体力学的操作と電気力学的操作のバランスのコントロールによって、細菌 1 細胞トラップの再現性が向上した。細菌とチャンバの相対サイズにより捕捉成功率は変化し得るが、マッチングが良い場合の 1 細胞捕捉率は 100%近くを達成している。

### (3) 捕捉した細菌細胞の電気パルス破碎の検討

電気パルスによる細菌細胞破碎は、先述したレーザー描画作製によるチップで条件検討してきたが、同チップがゲノム増幅を阻害するために、使用を中止した。最終案の FIB 作製による「細菌 1 細胞アレイ」では、再現性が不安定であるが、チャンバに捕捉した細菌・古細菌細胞の電気パルス印加による破碎が可能であることを確認した。しかし、今後さらなる条件検討が必要である。

細菌の種類・状態によっては、従来のアルカリ(KOH)溶液処理だけでは細胞壁の溶解が困難な場合がある。本デバイスも基本的には一般的な全ゲノム増幅法と同様に KOH 溶液を用いた細菌細胞溶解と DNA 変性を行うが、誘電泳動用の電極を利用した電気パルス破碎を補助的に行うことで、DNA 抽出成功率を上げられる可能性がある。

そこで、捕捉した細菌 1 細胞の電気パルス印加による破碎の評価を行った。様々な細菌で評価した中から、大腸菌と、細胞壁が堅牢なことで知られるメタン生成古細菌 (*Methanobrevibacter ruminantium*) のパルス破碎の例を、図 3.2.10 に示す。大腸菌、メタン菌いずれの場合も、電気パルス印加によって破碎が可能であることを実証できた。

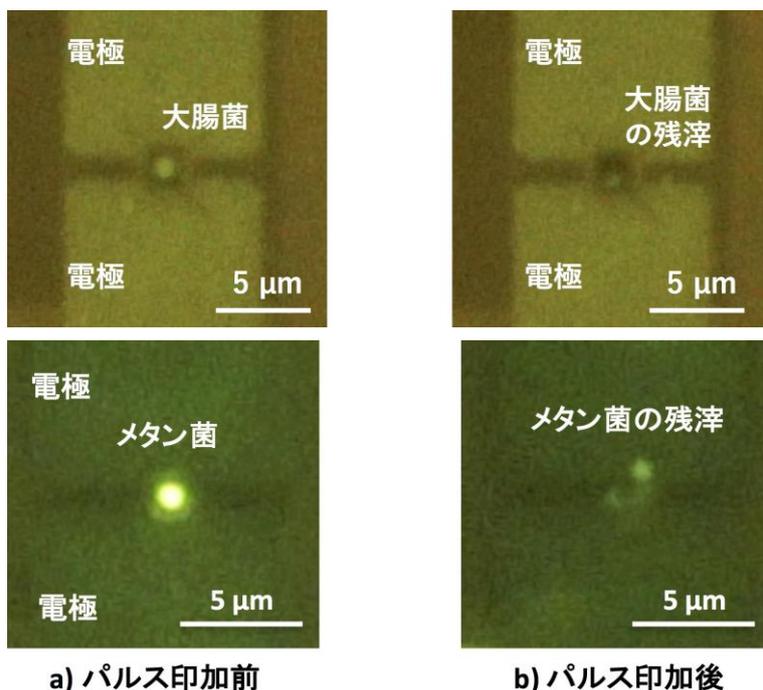


図 3.2.10.「細菌 1 細胞アレイ」による大腸菌(上)とメタン菌(下)の 1 細胞捕捉と電気パルス破碎。細胞は SYBR Gold で核酸蛍光染色してある。パルス幅 10  $\mu$ s、電圧 150 Vp のローレンツパルスを 1 秒に 10 発印加した際の、パルス印加前後における菌体の様子を示した。

しかしながら、現時点では再現性に難があり、多くの場合、パルスを印加しても細胞に外見上の変化が見られない。ただし、全ゲノム増幅反応のための DNA 抽出に使う目的では必ずしも菌体を破碎する必要はなく、KOH 溶液での溶解を補助できれば良い。完全な破壊はむしろ内部の DNA を損傷する恐れがある。全ゲノム増幅反応に最適な形で菌体にダメージを与える最適なパルス条件に関しては、実際の増幅反応と MiSeq によるゲノム配列解析の結果に基づく評価を継続している(本郷 G 報告参照)。今後、菌種ごとの最適なパルス条件や、様々な菌に対してユニバーサルに使えるパルス条件等を見つける必要がある。

また、本デバイスへの組み込みを想定した超小型の電気パルス発生装置を鳥山 G と共同開発した。単 3 電池数本で動作する携帯・装置組み込みが可能なサイズに設計しており、改良を重ねた第 3 世代では細胞捕捉用回路とパルス破碎用回路の両方を内蔵している。パルス電圧は最大 4000 V、パルス幅  $\mu\text{s}$ ~ $\text{ms}$  で可変である。詳細は鳥山 G 報告書に記載した。

#### (4) 細菌捕捉成否の電氣的検出

交流インピーダンス計測により、電気抵抗あるいは電気容量のいずれにおいても、細胞捕捉チャンバにおける細菌捕捉の成否を検出することに成功した。

細菌 1 細胞の観察には蛍光顕微鏡を使用するのが一般的だが、①(組み入れると)装置の大型化・高額化を招く、②蛍光試薬の添加によるコンタミネーションの可能性の増加や酵素反応阻害等をもたらす可能性がある、③全ての細胞捕捉チャンバを観察するには時間がかかり自動化とハイスループット化が困難、などの問題が生じ得る。サイトビジットでもこの点の指摘を受けており、システム運用の効率化と使い勝手の向上を図るため、当初計画には含めていなかったが、「細菌 1 細胞アレイ」を構成する個々のチャンバにおける細菌捕捉の成否を自動判定する技術の検討を行った。具体的には、デバイスに内蔵した誘電泳動・電気パルス破碎用の電極を、電気測定に兼用することで、細菌捕捉の成否判定や細菌種(タイプ)の大まかな同定および電気パルス破碎の成否判定を、コンパクトかつ高効率に実現する着想を得て、その初期評価を行った。

本デバイスの場合、一般的な電気化学におけるファラデー電流を利用した計測は、①電極が消耗して細菌の捕捉やパルス破碎に悪影響が出る、②電極金属のイオンが溶出してゲノム増幅反応を阻害する可能性がある、などの理由により適用困難である。そこで、電極反応が生じない非ファラデー電流での交流インピーダンス計測により、電気抵抗あるいは電気容量の変化で検出する手法を検討した。各チャンバを独立して計測できるように電極パターンの変更の末、市販のインピーダンス計測器を用いて検証した。使用した測定器(IM3570、HIOKI)の特性に合わせ、精度が最も良い周波数(1 kHz)で測定した場合の、細胞捕捉前後における電気抵抗と電気容量の変化を図 3.2.11 に示す。大腸菌、放線菌(*C. glutamicum*)のいずれにおいても、電気抵抗と電気容量が両方とも増大した。いずれの値も既存技術での測定が難しい範囲であり、本システム専用の小型の組み込み測定回路も実現可能と思われ、その試作を検討している。

以上、まだ初期データが得られた段階であるが、交流インピーダンス測定により細菌捕捉を検出することに成功している。

	大腸菌	放線菌
電気抵抗 (M $\Omega$ )	2.3	7.8
電気容量 (pF)	4.4	4.0

IM3570、HIOKI で計測

図 3.2.11. 細菌の捕捉前後におけるインピーダンス変化

なお、山本 G は 2017 年 8 月をもって JST との契約を終了しており、残りの課題は、本郷 G と鳥山 G が引き継いで取り組んだ。

### 3.3 「細菌 1 細胞アレイ」半自動化システムの開発(ケーディークロート株式会社 鳥山グループ)

#### (1) 「細菌 1 細胞アレイ」半自動化システム全体の設計と試作

細菌 1 細胞を単離するためのマイクロデバイス「細菌 1 細胞アレイ」を搭載して半自動で制御するシステムの設計と試作を進めた。初期計画にしたがって試作した 1 号機を図 3.3.1 に示した。



図 3.3.1. 「細菌 1 細胞アレイ」半自動化システム試作 1 号機本体の外観。サイズは 850(W)×500(D)×600(H)mm、重量 100 kg。電装制御 BOX が別途附属。クリーンブースに入れて使用。

同試作機を本郷 G と山本 G が検証し、そのフィードバックを取り込んで各パーツの方式変更・改良、機能の改廃を行い、以下のように小型化した 2 号機を設計・製作した(図 3.3.2)。

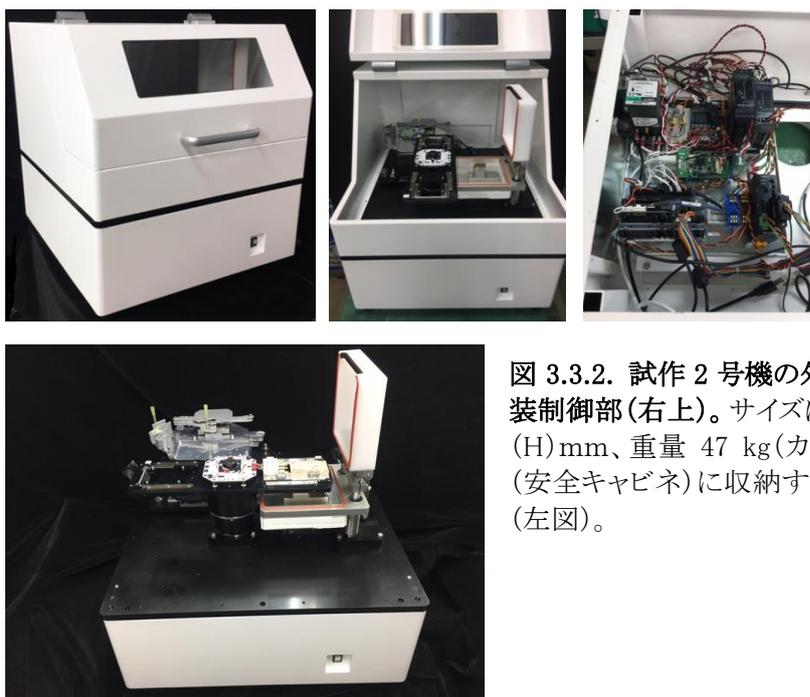


図 3.3.2. 試作 2 号機の外観(左上 2 枚)と内部の電装制御部(右上)。サイズは 500(W)×500(D)×550(H)mm、重量 47 kg(カバー含む)。クリーンベンチ(安全キャビネ)に収納する場合は、カバーをはずす(左図)。

#### (2) 「細菌 1 細胞アレイ」電源の開発

山本 G が作製する「細菌 1 細胞アレイ」チップの電源部を開発した。誘電泳動による細菌細胞捕捉と電気パルスによる細胞破碎の両方を可能とし、かつ超小型サイズにする必要があった。電気パルス破碎に必要な高電圧から誘電泳動回路を保護する機構を備え、コンピューター上で電圧と周波数を操作可能とした(図 3.3.3 と 3.3.4)。また、捕捉用の電圧をかけながら顕微鏡観察や排液ができるように、充電電池駆動も可能な仕様にした。



図 3.3.3. 「細菌 1 細胞アレイ」電極基板 (左) と試作 1 号機用の遠心廃液装置 (右)。

高圧発生基板      トラップ電圧発生基板

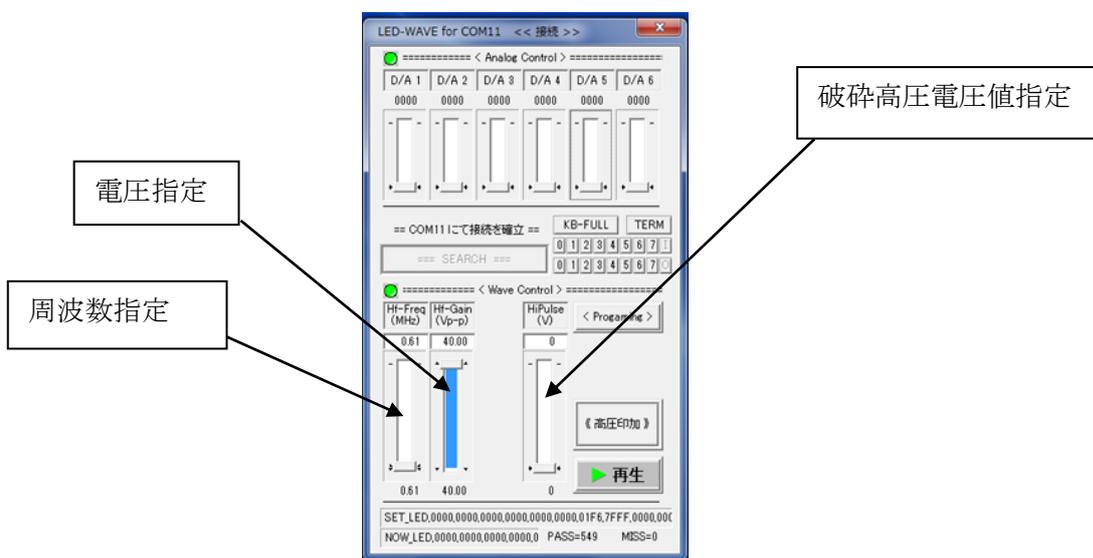


図 3.3.4. 「細菌 1 細胞アレイ」電源操作パネル(コンピューター制御)。

しかしながら、この電源ユニットはサイズが大きく、また出力電圧の操作がアナログ的であるため、使い勝手と再現性に問題があった。そこで、以下の改良を行った(図 3.3.5 と 3.3.6)。

- 細胞捕捉と電気パルス破碎を兼用した電源基板の設計・製作(出力部の共通化)。
- 細胞捕捉用回路の発生電圧のデジタル化(出力電圧の再現性向上)。
- 無線通信機能を装備(デバイス部のみ携帯して作業可能)。

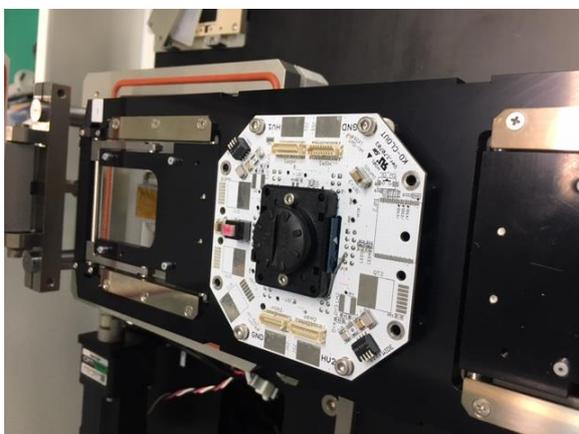


図 3.3.5. 「細菌 1 細胞アレイ」搭載用ステージに組み込んだ八角形の電源ユニット。ユニット中央の黒い部分に充電電池を収納。

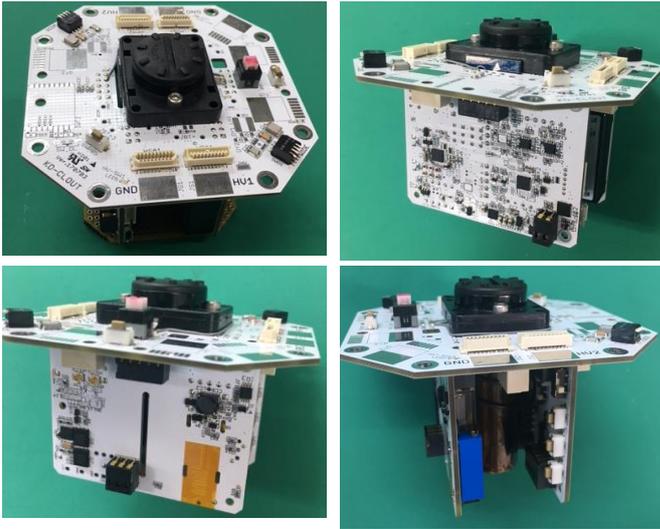


図 3.3.6. 「細菌 1 細胞アレイ」用改良型電源ユニットの各部。バッテリー駆動で、高電圧、高速パルスの印加が可能で、無線通信機能も装備。携帯して操作することも可能である。

細胞捕捉用電圧発生基板の外観と仕様は以下の通りである (図 3.3.7)。



図 3.3.7. 「細菌 1 細胞アレイ」細菌捕捉用電源基板とその仕様。

- ・周波数発生回路 (400KHz~40MHz)
- ・増幅回路 (最大 20Vp-p) × 2Ch
- ・Li<sup>+</sup>充電電池から 5V2.1A を安定供給
- ・5V から 3.3V 及び ±12V を発生
- ・制御用マイコン装備
- ・DIO、USB、無線モジュール装備

細胞破碎用高電圧発生基板の外観と仕様は以下の通りである (図 3.3.8)。



図 3.3.8. 「細菌 1 細胞アレイ」細菌細胞破碎用電源基板とその仕様。

- ・可変昇圧回路 A (5V から DC100~5000V)
- ・可変昇圧回路 B (5V から DC0~100V)
- ・増幅回路 (最大 100Vp-p)

これらの電源は以下の制御用アプリ画面で操作する (図 3.3.9)。

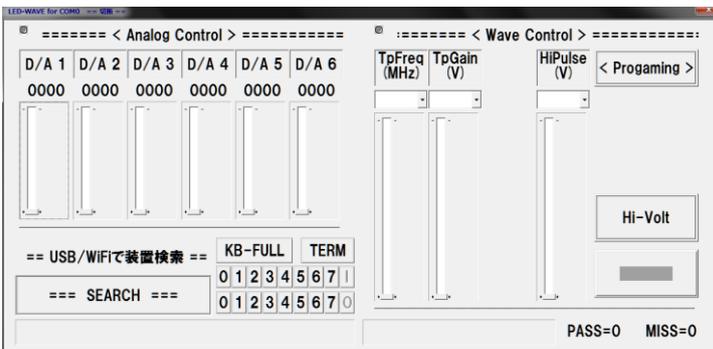


図 3.3.9. 「細菌 1 細胞アレイ」用電源制御アプリの画面。

### (3) 「細菌 1 細胞アレイ」上での細菌捕捉状況の蛍光観察システム導入

「細菌 1 細胞アレイ」上での細菌細胞捕捉状況を視覚的にモニタするため、蛍光デジタルマイクロスコープを改造して、試作 1 号機のシステムに組み込んだ(図 3.3.10)。ただし、これは「細菌 1 細胞アレイ」試作品の検証用であり、試作 2 号機には搭載していない。



図 3.3.10.「細菌 1 細胞アレイ」用の細菌細胞の蛍光観察システム。

### (4) 細菌細胞捕捉後の洗浄・排液システムの開発

細菌細胞を微小チャンバで捕捉した後、余剰の細胞や試料中のゴミを除去する洗浄機構が必要である。当初案は、遠心力で排液し、吸着剤に吸水するというものであった。サイトビジット時に、遠心操作時のエアロゾル汚染の危険性を指摘されたため、溶液飛散防止カバーも装着した。しかし最終的には遠心による洗浄を止めて、PDMS 製マイクロ流路をチップに装着し、マイクロポンプで純水を流して洗浄する方式に変更した。サンプル添加時も同様である(山本 G 報告書参照)。

### (5) 「細菌 1 細胞アレイ」用化学反応炉の開発

「細菌 1 細胞アレイ」で細菌細胞を各微小チャンバに捕捉し、洗浄した後、細菌細胞を溶解して DNA を抽出、全ゲノム増幅反応を行う必要がある。初期計画では細胞捕捉チャンバと微小反応炉を一体型としていたが、技術的に作製困難であったため、「細菌 1 細胞アレイ」チップと分離したウェル板(金属または合成樹脂)に(液漏れ防止のための)PDMS 製シートを貼付したものを作製し、チップに圧着させて反応炉を構成することとした(図 3.3.11)。

当初、耐久性と強度を考慮して SUS316(ステンレス)製のウェル板を使用していたが、本郷 G による検証の結果、SUS316 がゲノム増幅反応を完全に阻害することが判明した。フッ素コートをして阻害は改善せず(おそらくピンホールの存在や角部などのコートが不完全なためか)、セラミックス(ホトベール)や PPS-GF40(強化ガラス繊維)など複数の素材を試したが、阻害が無くならないか、あるいは強度や生産性の問題で使用に適さないものが多く、最終的には、強度にやや難があるものの増幅を阻害しない PEEK 材(ポリエーテルケトン樹脂)を使用することとした(図 3.3.11)。

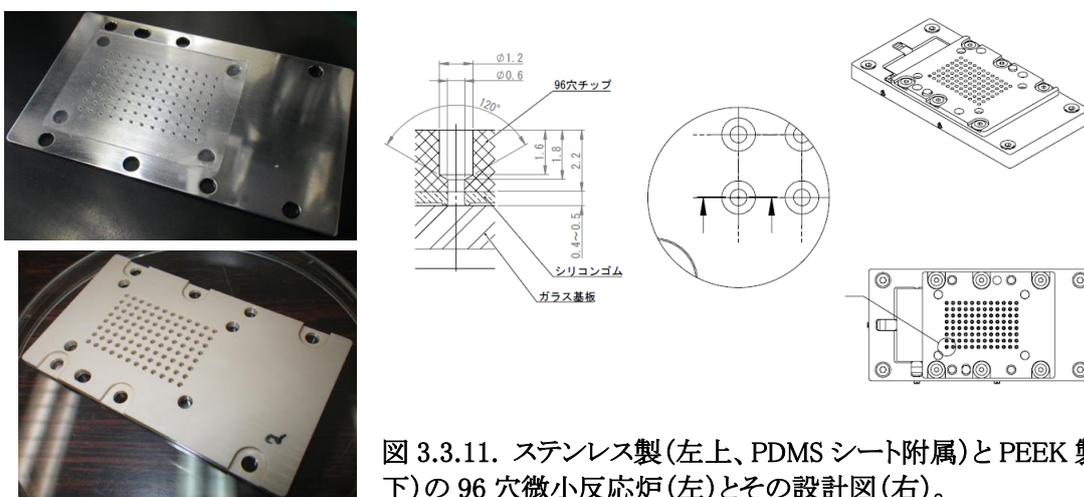


図 3.3.11. ステンレス製(左上、PDMS シート附属)と PEEK 製(左下)の 96 穴微小反応炉(左)とその設計図(右)。

### (6) ゲノム増幅反応試薬の添加機構の開発

「細菌 1 細胞アレイ」上に配置した微小反応炉に、当初はインクジェット(マイクロジェット社製 PJK-200H)で、溶液を段階的に nL スケールで添加できるようにしていた。しかし、微量の場合、吐出流量が不安定であったり、溶液がアレイ面まで到達しない、乾燥対策が容易ではない、などの諸問題が生じた。最終的に、nL スケールでゲノム増幅反応を行っても、配列解析するには二次増幅が必要となることを考慮して、操作を簡明にする意図もあり、反応スケールを  $\mu\text{L}$  スケールとすることになった。そこで、添加液量の関係から、インクジェットをマイクロダイヤフラム方式のディスペンサー(フォミュラートリクス製 MANTIS)へと変更した(図 3.3.12)。同装置は、分注速度と精度において優れており、またデッドボリュームが少ない(6  $\mu\text{L}$ )ことから試薬コストが低いという利点がある。

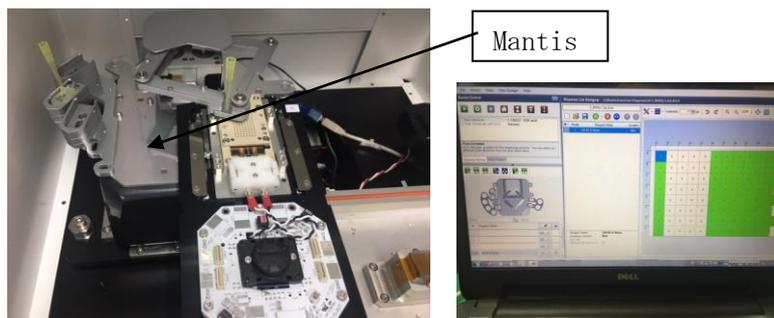


図 3.3.12. 分注装置 Mantis を組み込んだ「細菌 1 細胞アレイ」半自動システム 2 号機(左)と制御アプリの操作画面(右)。

### (7) ゲノム増幅反応機構(インキュベータ)

「細菌 1 細胞アレイ」に微小反応炉を配置して、(電気パルスと KOH による)細胞破碎と DNA 変性を行い、試薬を添加してゲノム増幅反応を数時間～一晩で行う手順である。当初は、「細菌 1 細胞アレイ」ホルダに組み込んだペルチェ素子(熱伝導シートを貼付)で温度制御をしながら、ウェル上面にミネラルオイルを上層して密閉することで乾燥防止を図った。しかしながら、ミネラルオイルも製品によって DNA 増幅反応を阻害することが判明し、不安定な結果をもたらしたため、ミネラルオイルを使用しない「ミストチャンバー(湿潤箱)」に変更して試作 2 号機に組み込んだ(図 3.3.13)。「細菌 1 細胞アレイ」をホルダにセットした状態のまま、密閉空間を構成し、加湿しながら温度制御することが可能である。

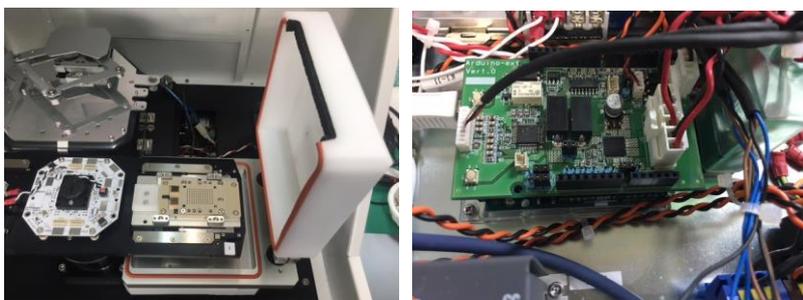


図 3.3.13. 「細菌 1 細胞アレイ」用のゲノム増幅反応用ミストチャンバ(左)と温度制御用基板(右)。

### (8) ゲノム増幅産物回収機構

ゲノム増幅反応産物の回収には、当初、nL スケールの溶液をミネラルオイルの下から回収するために、凍結して金属ピンに引っ掛ける機構を試作したが、検証した結果、産物回収中に融解してクロスコンタミネーションの原因となりかねないことなどから中止した。試行錯誤の結果、使い捨ての金属パイプを用い、温度差を利用して吸引吐出をする装置を開発した。しかしながら、金属パイプ(外径 0.3 mm)の着脱操作が煩雑であり、96 穴全てに金属パイプを配置する構成を取ることが難しい等の問題があった。そこで、遠心力を使って 96 穴チップ 2 枚分、つまり 192 穴分の溶液を同時に回収する機構を製作した。回収装置全体の外観と設計図は図 3.3.14 に示した。

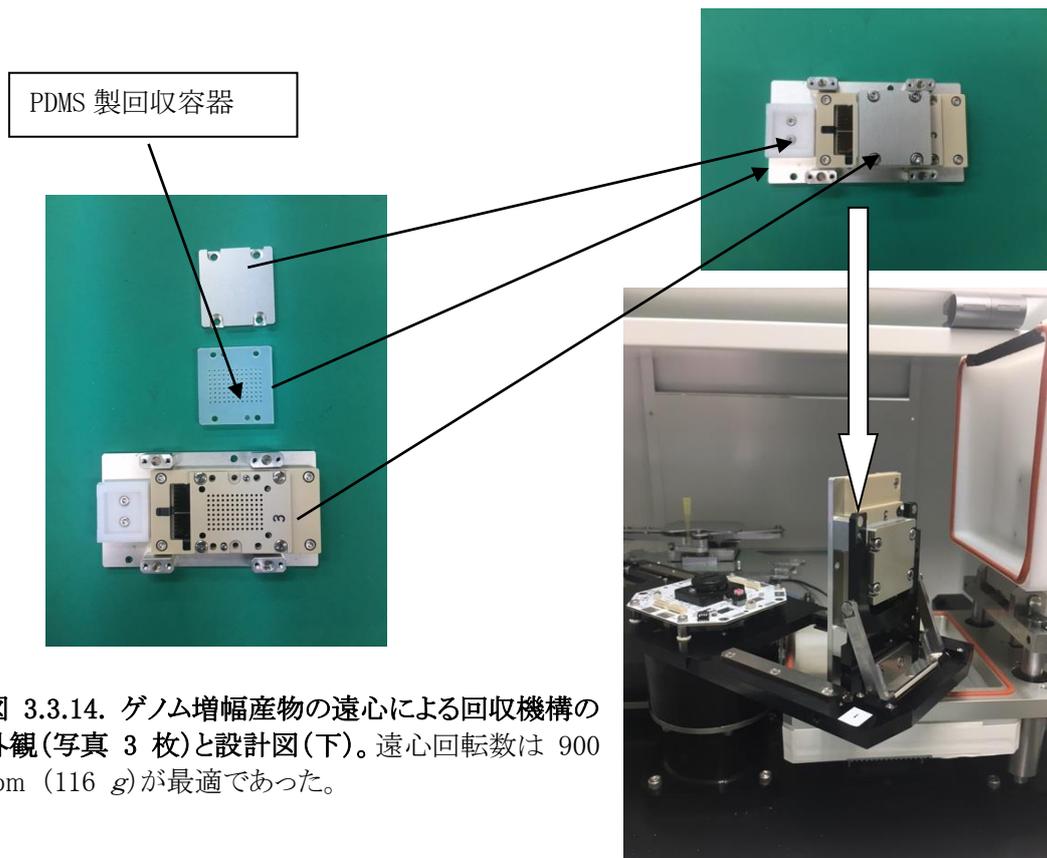
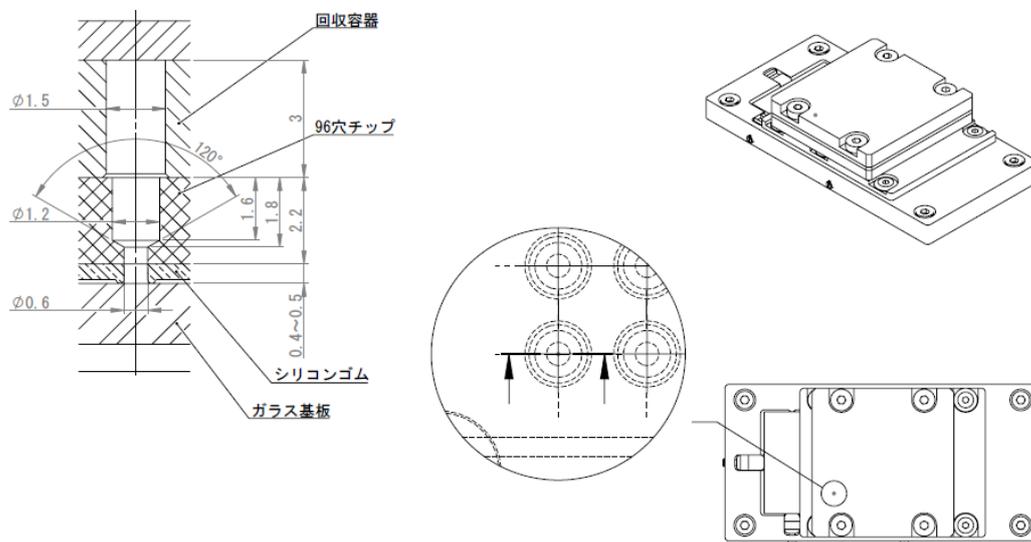


図 3.3.14. ゲノム増幅産物の遠心による回収機構の外観(写真 3 枚)と設計図(下)。遠心回転数は 900 rpm (116 g)が最適であった。



以上、「細菌 1 細胞アレイ」の電源部を含む半自動操作システムの試作機を開発し、検証実験を継続中である。

## § 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌2件、国際(欧文)誌11件)

1. Katsuo Mogi, Yuki Hashimoto, Takeshi Tsukahara, Motoki Terano, Masahiko Yoshino, and Takatoki Yamamoto. “Nanometer-level high-accuracy molding using photo-curable silicone elastomer by suppressing thermal shrinkage.” *RSC Advances* 5 (14): 10172–10177 (2015)
2. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto. “Nanoscale three-dimensional optical visualization method for a deformation of elastomer printing plate to realize soft nano-printing technology.” *Surface and Interface Analysis* 47 (6): 723–727 (2015)
3. Porpin Pungetmongkol, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto. “Conformation dependent non-linear impedance response of DNA in nanofluidic device.” *Proceedings of the 15th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2015)*: 1163–1166 (2015)
4. Ryuji Hatsuki, Ayae Honda, Masayuki Kajitani, Takatoki Yamamoto. “Nonlinear electrical impedance spectroscopy of viruses using very high electric fields created by nanogap electrodes.” *Frontiers in Microbiology* 6: e940 (2015)
5. Katsuo Mogi, Chikako Shirataki, Kumiko Kihara, Hirokazu Kuwahara, Yuichi Hongoh and Takatoki Yamamoto. “Trapping and isolation of single prokaryotic cells in a micro-chamber array using dielectrophoresis.” *RSC Advances* 6 (114): 11300–11306 (2016)
6. 橋本優生、茂木克雄、山本貴富喜 「真空紫外光によるシリコーンのガラス化を利用したガラス製モスアイ構造の作製法」 *電気学会論文誌E* 136 (11): 488–492 (2016)
7. 坂田健士郎、楊路、茂木克雄、山本貴富喜 「親疎水性界面と多孔質膜を利用したリキッドゲートによる連続的サンプリング機構の初期評価」 *電気学会論文誌E* 137 (6): 169–173 (2017)
8. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto. “Vacuum ultraviolet light assisted bonding and nanoscale pattern transfer method for polydimethylsiloxane”. *Microelectronic Engineering* 176: 116–120 (2017)
9. Yuki Hashimoto and Takatoki Yamamoto. “Solid state direct bonding of polymers by vacuum ultraviolet light below 160 nm.” *Applied Surface Science* 419: 319–327 (2017)
10. Yuniar Devi Utami, Hirokazu Kuwahara, Takumi Murakami, Takahiro Morikawa, Kaito Sugaya, Kumiko Kihara, Masahiro Yuki, Nathan Lo, Pinsurang Deevong, Sasitorn Hasin, Warin Boonriam, Tetsushi Inoue, Akinori Yamada, Moriya Ohkuma and Yuichi Hongoh. “Phylogenetic diversity and single-cell genome analysis of ‘*Melainabacteria*’, a non-photosynthetic cyanobacterial group, in the termite gut.” *Microbes and Environments* 33: 50–57 (2018).
11. Yuki Hashimoto, Takatoki Yamamoto. “Fabrication of an anti-reflective and super-hydrophobic structure by vacuum ultraviolet light-assisted bonding and nanoscale pattern transfer”, *Micromachine* 9: 186–197 (2018)
12. Yuki Hashimoto, Satoshi Matsuzawa, Takatoki Yamamoto. “Subsurface investigation of the surface modification of polydimethylsiloxane by 172-nm vacuum ultraviolet irradiation using ToF-SIMS and VUV spectrometry”, *Surface and Interface Analysis* online early (2018)
13. Katsuo Mogi, Kei Hayashida and Takatoki Yamamoto. “Damage-less handling of exosomes using an ion-depletion zone in microchannel.” accepted .

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Lu Yang and Takatoki Yamamoto. “Quantification of virus particles using nanopore-based resistive-pulse sensing techniques.” *Frontier in Microbiology* 7: e1500 (2016)

2. 山本貴富喜「真空紫外光による光加工技術の新展開」 *OPTRONICS* 10: 123–127 (2016)
3. 本郷裕一「難培養微生物の 1 細胞ゲノム解析」 *化学療法の領域*(医薬ジャーナル社) 33: 90–99 (2017)
4. 本郷裕一「環境微生物学研究に革命をもたらしたシングルセル解析」 実験医学別冊「シングルセル解析 実験ガイド(菅野純夫編)」(羊土社): 40–46 (2017)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議8件、国際会議5件)
  1. Yuichi Hongoh.(東工大)“Diversity and functions of the ecto- and endosymbionts of cellulolytic protists in the gut of termites.” Annual Conference 2015 of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM2015)、Marburg (ドイツ)、2015年3月2日
  2. Takatoki Yamamoto and Katsuo Mogi.(東工大)“Evaluation of a novel UV-curable PDMS for nanoscaled molding.” International Workshop on Extended-nano Fluidics、東京、2015年3月26日
  3. Takatoki Yamamoto and Ryuji Hatsuki.(東工大)“Electrical single bio-particle detection in nanofluidics device.” International Workshop on Extended-nano Fluidics、東京、2015年3月27日
  4. 本郷裕一(東工大)「ゲノムから解き明かすシロアリ腸内複合共生系」日本農芸化学会 2015 年度大会シンポジウム「多様性を基盤にした微生物研究の最前線」、岡山大、2015年3月29日
  5. Yuichi Hongoh.(東工大)“Single-cell genomics deciphers the complex symbiotic system in the termite gut microbiota.” The 11th International Workshop on Advanced Genomics (IWAG-11)、東京、2015年5月21日
  6. 山本貴富喜(東工大)「ウイルスセンシング技術が先導するイノベーション」ナノ茶論(川崎市主催)、新川崎・創造のもり、2015年9月17日
  7. 山本貴富喜(東工大)「マイクロ・ナノ流体チップの今昔 –医療・ヘルスケア応用を中心に–」京都府立医科大学セミナー、京都、2015年11月11日
  8. 山本貴富喜(東工大)「真空紫外光によるシリコーンインクのガラス化によるモスアイ構造の作製」第30回先端光量子科学アライアンスセミナー「ナノ・マイクロファブリケーションを活用した光科学の展開」シンポジウム、慶応大日吉キャンパス、2016年3月17日
  9. 本郷裕一(東工大)「ゲノムから読み解くシロアリ腸内難培養微生物群集の多重共生機構」第 89 回日本細菌学会総会シンポジウム「ゲノム解析手法の最前線」、大阪国際センター、2016年3月26日
  10. 山本貴富喜(東工大)「レーザー描画装置とナノインプリント装置の活用事例」四大学ナノ・マイクロファブリケーションコンソーシアム・シンポジウム、新川崎・創造のもり、2016年3月29日
  11. Takatoki Yamamoto.(東工大) “Electrical single-molecule measurement and manipulation by nanofluidic systems.” Andor Academy、東京、2016年5月16日
  12. 本郷裕一(東工大)「1 細胞ゲノムとメタゲノムから読み解くシロアリ腸内多重共生系」豊橋技術科学大学開催:平成 28 年度 EIIRIS プロジェクト研究成果報告会 –バイオ情報技術の社会応用–、豊橋技大、2017年3月10日
  13. 本郷裕一(東工大)「シロアリはなぜ木だけを食べて生きられるのか」名古屋大学理学部セミナー、名古屋、2017年9月29日
  14. Yuichi Hongoh (東工大) “Single-cell genomics deciphers the termite gut ecosystem.” 第 91 回日本細菌学会総会国際シンポジウム “Frontiers in Bacterial Genomics”、福岡、2018年3月28日

② 口頭発表 (国内会議3件、国際会議6件)

1. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. "Three-dimensional visualizing method at nanoscale resolution for printing behavior." The 15th IEEE International Conference on Nanotechnology, Rome (Italy), 2015年7月27日
2. Porpin Pungetmongkol, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. "Conformation dependent non-linear impedance response of DNA in nanofluidic device." The 15th IEEE International Conference on Nanotechnology, Rome (Italy), 2015年7月27日
3. 橋本優生、茂木克雄、山本貴富喜「真空紫外光によるシリコンのガラス化を利用したガラス製モスアイ構造の作製法」第32回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム. 朱鷺メッセ(新潟)、2015年10月27日
4. 茂木克雄、白瀧千夏子、本郷裕一、山本貴富喜「マイクロ/ナノギャップ電極を用いた誘電泳動カトラッピングによる微生物単離」第32回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム. 朱鷺メッセ(新潟)、2015年10月27日
5. Ryuji Hatsuki, Aya Honda, Masayuki Kajitani and Takatoki Yamamoto. "Electrical single virus detection using transimpedance circuit integrated nanofluidic chip." 環太平洋国際化学会議(Pacificchem 2015)、Hawaii (USA)、2015年12月15日
6. Kenshiro Sakata and Takatoki Yamamoto. "Sampling micro-nano size aerosol by droplet formation and using liquid-based gating mechanism." 宮城、2015年8月22日
7. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. "Release agent-free low-cost double transfer nanoimprint lithography for moth-eye structure." 宮城、2015年8月22日
8. 河合幹彦、Nancy Merino、白瀧千夏子、木原久美子、本郷裕一「Quality assessment of single-cell genomes」第11回日本ゲノム微生物学会年会、慶応大湘南キャンパス、2017年3月2日
9. Yuki Hashimoto and Takatoki Yamamoto. "Improvement of transmittance in silicone at vacuum ultraviolet region by irradiation with 172 nm Xe2\* lamp." The 17th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2017)、Pittsburgh (USA)、2017年7月25日
10. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. "Study on the mechanisms of direct bonding of plastics by vacuum ultraviolet light less 160-nm wavelength." *Proceedings of the 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017)*、October 22-26, 2017

③ ポスター発表 (国内会議5件、国際会議9件)

1. Porpin Pungetmongkol and Takatoki Yamamoto. "Direct evaluation of electric double layer in nanochannel by electrical impedance spectroscopy." International Workshop on Extended-Nano Fluidics、東京、2015年3月26日
2. Porpin Pungetmongkol, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. "Non-linear electrical impedance spectroscopy of DNA in nanogap electrode." The 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems、京大、2015年6月8日
3. Katsuo Mogi, Yuki Hashimoto and Takatoki Yamamoto. "Nano-pattern molding technique using photo-curable silicone elastomer." The 15th IEEE International Conference on Nanotechnology, Rome, Italy, 2015年7月27日
4. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. "Release agent-free

- ultraviolet nanoimprint lithography using cyclic olefin polymer and polydimethylsiloxane mold.” Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology 2016 (APCOT 2016)、金沢、2016年6月26日
5. Katsuo Mogi, Kei Hayashida and Takatoki Yamamoto. “Concentration and separation of bio-makers by utilizing combination of ion depletion and electrophoresis.” Micro and Nano Engineering 2016, Vienna (Australia), 2016年9月19日
  6. Kenshiro Sakata and Takatoki Yamamoto. “Influence of experimental parameters on the device continuously sampling micro-nano size aerosol using liquid-based gating mechanism.” Micro and Nano Engineering 2016, Vienna (Australia), 2016年9月19日
  7. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. “Vacuum ultraviolet light assisted nano-pattern transfer to fabricate nanostructure with heterogeneous materials.” Micro and Nano Engineering 2016, Vienna (Australia), 2016年9月19日
  8. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. “Room temperature atmospheric direct bonding of various plastics by vacuum ultraviolet less than 160 nm wavelength.” The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences MicroTAS 2016, Dublin (Ireland), 2016年10月9日
  9. 坂田健士郎、楊路、茂木克雄、山本貴富喜 「親疎水性界面と多孔質膜を利用したリキッドゲートによる連続的サンプリング機構の初期評価」第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、長崎、2016年10月24日
  10. 村田遼介、茂木克雄、山本貴富喜 「インクジェットパターンニングによる細菌1細胞アレイ作製の研究」第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、長崎、2016年10月24日
  11. 橋本優生、茂木克雄、山本貴富喜 「低表面エネルギー材料をモールドとした離形処理フリーナノインプリント法」第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、長崎、2016年10月24日
  12. 河合幹彦、Nancy Merino、白瀧千夏子、木原久美子、本郷裕一 「Quality assessment of single-cell genomes」第11回日本ゲノム微生物学会年会、慶応大湘南キャンパス、2017年3月2日
  13. 河合幹彦、Nancy Merino、白瀧千夏子、木原久美子、本郷裕一 「Quality assessment toward single-cell comparative genomics」環境微生物系学会合同大会2017年8月29日、東北大、
  14. Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi and Takatoki Yamamoto. “Study on the mechanisms of direct bonding of plastics by vacuum ultraviolet light less 160-nm wavelength.” The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), Savannah (USA), 2017年10月22日
  15. Yuniar Devi Utami, Hirokazu Kuwahara, Takumi Murakami, Katsura Igai, Takahiro Morikawa, Kaito Sugaya, Masahiro Yuki, Akinori Yamada, Moriya Ohkuma and Yuichi Hongoh. “Genome analyses of non-photosynthetic cyanobacteria associated with protist cells in the termite gut.” 第12回日本ゲノム微生物学会年会(京大)

#### (4) 受賞・報道等

##### ① 受賞

\* 山本貴富喜: 電気学会 E 部門貢献賞、H26 年 10 月 20 日

(5)成果展開事例

①社会還元的な展開活動

- ・新規装置開発を主眼とした課題であり、開発途中での社会還元は難しい。

## § 5 研究期間中の活動

### 5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H26年 10月29日	大田サイエンス・スクール	東工大	30名	清水窪小学校の生徒を対象としたアウトリーチ
H27年 2月20日	GRENE 人材育成講座 「ナノバイオコース」	東工大	20名×2回	1細胞ゲノミクス等のナノバイオの重要性と現状を企業・大学関係者に講演
H27年 8月8日	東工大オープンキャンパス	東工大	150名	高校生への1細胞ゲノミクスなどに関する講演
H27年 8月18日	INPA(国立アマゾン研究所)セミナー	INPA(マナウス、ブラジル)	15名	ブラジルの研究員・学生との学術交流で1細胞解析の重要性を紹介
H27年 10月29日	大田サイエンス・スクール	東工大	30名	清水窪小学校の生徒を対象としたアウトリーチ
H28年 1月13日	GRENE 人材育成講座 「ナノバイオコース」	東工大	20名	1細胞ゲノミクス等のナノバイオの重要性と現状を企業・大学関係者に講演(基礎)
H28年 1月14日	GRENE 人材育成講座 「ナノバイオコース」	東工大	5名	ナノバイオに関連する実習
H28年 1月15日	GRENE 人材育成講座 「ナノバイオコース」	東工大	20名	1細胞ゲノミクス等のナノバイオの重要性と現状を企業・大学関係者に講演(応用)
H28年 10月20日	大田サイエンス・スクール	東工大	60名	清水窪小学校の生徒を対象としたアウトリーチ
H29年 9月4日	東工大附属高校への研究室公開・セミナー	東工大	8名	高校生への1細胞ゲノミクスなどの重要性と概要説明
H29年 10月10日	大田サイエンス・スクール	東工大	60名	清水窪小学校の生徒を対象としたアウトリーチ

## § 6 最後に

本課題に応募した元々の動機は、本郷(代表)自らが使用したい細菌1細胞ゲノミクス用の装置が存在しないため、それを自ら開発する必要に迫られたことにある。本郷自身は生物学を専門としており、装置開発自体は、それを専門とする東工大・工学院・機械制御システム専攻の山本貴富喜准教授、およびバイオ及び医療機器の検査装置等の開発を行っていたゲーディークロート株式会社の鳥山武利氏の協力を仰ぐことになった。

プロジェクト運営上では、やはり専門分野が全く異なることに起因する、知識の前提や目標の共有、意思疎通等の問題が生じたが、最終的には真に緊密な共同研究を遂行できるようになった。

研究課題の達成度については、様々な問題で開発工程が遅延してしまい、ようやく研究が軌道に乗り、有意義なデータが次々に出始めたところで 3.5 年の期限が来てしまったのは残念である。結果として、初期目標をクリアする一歩手前となっている。しかしながら、残り期間半年の現時点で、従来法である FACS 装置を用いた細菌 1 細胞ゲノミクスに、ある面では匹敵する成果が出始めたことには、安堵している。FACS には多くの長所もあるが、本課題で開発してきた装置は、FACS の分離解像度以下のサイズの細菌を捕捉できる可能性と、従来法では溶解できなかった細菌種のゲノム配列取得の可能性を秘めており、FACS や他の手法では解析困難な細菌種を対象とできる将来性がある。残り研究期間で、可能な限り、この装置の特有の機能の有用性実証と、半自動システムとしての利便性向上を図りたい。