

# 40年の技術開発の経験

日立製作所 中央研究所 神原秀記

技術・研究開発は楽しいことである。研究開発費が多く研究スタッフが多ければうまくいくというわけではない。ある時期には負け組だったものが時代の変遷と共に勝ち組になることもある。多くの人が「それはいかげなものか?」といった分野や技術が発展する事もある。「研究者には博打性が必要」と言っていた人がいたがそうかもしれない。40年間技術開発に従事してきたが、リスクの少ない出来上がった技術の改良よりも、リスクの大きい全く新しい技術あるいは分野の開拓の方がワクワクすることが多い。これまでに、質量分析用新しいイオン化技術、DNA シーケンサ関連技術あるいは1細胞解析技術などの技術開発を行ってきたが、その間に学んだ事、どのように課題に取り組み、その分野が発展していったかなど若い方々の参考になるかもしれないことを中心にお話します。

## [最初の技術開発]

世の中の進歩発展は新たな道具が

切り開く。道具ができるといういろいろな人々がそれをさまざまな形で活用したり改良したりして目覚ましい勢いで発展して新たな分野が創生されていく。最初に作る道具はその目的の通りに使われるわけではない。むしろ、思いもしない使われ方をして発展することが多い。たとえば筆者が日立中央研究所で最初に取り組んだ高感度ガス分析技術のプラズマクロマトグラフィー(PC)は1気圧のもとで効率よく公害成分などをイオン化してイオンの移動度の差を利用して種類を識別する分析法である。もともとは物理分野で、減圧下でイオンの特性の評価に使われていた技術だったが Karasek は動作圧力を1気圧にすることでイオン化効率を上げた高感度分析技術を新たに開発した(1)。その分析技術としての評価が筆者の最初の課題として入社後に与えられた。種々検討したが、Karasek の技術は感度は高いが測定されている物質が何か同定が難しかった。そこで大気圧下で効率よく

イオンを作製し、質量分析する方法へと発展させ、種々物質が高感度で測定できることを確認し喜んでいた。大気圧イオン化質量分析計の誕生である(2)。

高感度ガス分析技術として、公害分析にも使用できると事業部に製品化を持ちかけたが、ガス分析装置は製品がすでにあり、新装置の市場の大きさが見えないので製品化は見送りとなった。「製品化は見送りのようなので、この研究も止めて別のことを始めたい」と研究グループのリーダーに言うと、「止めても良いけど、『けり』をつけてください。民間だから製品になればそれも『けり』だが、製品にならないなら一流の雑誌に投稿して論文を残してください」と言われた。そんな時、Anal Chem に大気圧イオン化質量分析計の報告が Horning によりいち早くなされた(3)。一番乗りを失するといろいろな事を付加しないと論文にならない。また、論文を書くのは苦手だったので手間取ったが何とか Anal Chem に掲載された。それを見た化技研(現産総研)の先生から公害検定用にと注文が入り、研究所製品として納入された。その後いろいろな分野でこの装置は活用され発展していった。『けり』をつけなかったら何も残らなかっただろうし、最初に評価したPCの改良に留まっていなくてもあまり発展はしなかっただろうと思う。時々、なぜ、Karasek はイオンの移動度測定に留まり、大気圧イオン化質量分析計に進まなかったのだろう。Karasek はプラズマクロマトグラフ(大気圧ドリフトチューブ)の創始者であり、

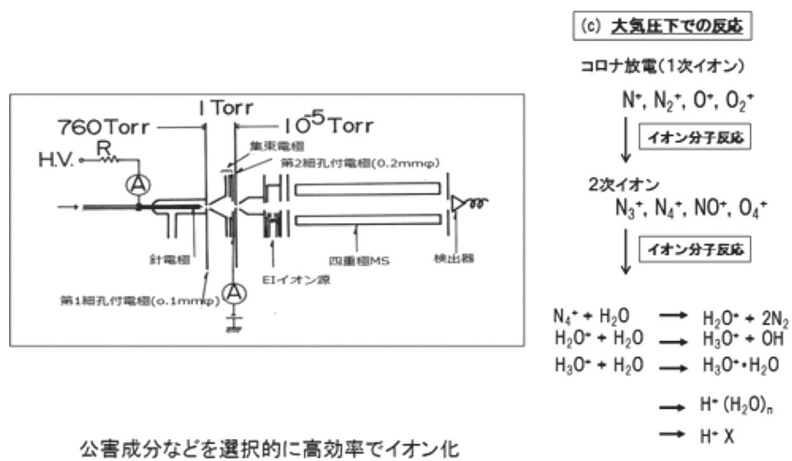


図1 大気圧質量分析計

どちらがより分析装置として優れているかの判断よりも自分の創始した方法に固執したのではないかと推測している。このように技術開発をしていると、初期の目的と少し外れたところにさらに発展した技術や大きな応用分野が存在することが良くあるので広い視野を持つことが重要と感じている。

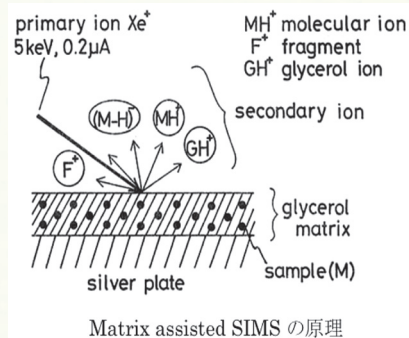
【研究者としての基礎を築いた時代：生体関連物質の分析へ】

1970年代に入ると熱に弱く不揮発性の生体関連物質の質量分析に注目が集まり始めた。それまでそれらはそのままではイオン化できず、極性の官能基を化学修飾して揮発性に変えてイオン化していた。これら不揮発性物質をそのままイオン化して質量分析する最初の技術は西ドイツBeckyによるField Desorptionである(4)。FDの登場で生命科学分野が活気づいているころ、米国ではアポロ計画を取りやめ、生命科学分野に研究費を重点配分する方針が打ち出された。これにより多くの人々が研究テーマを生命科学分野へシフトさせ始め、質量分析関連分野でも生体関連物質を対象とする研究テーマのシフトが始まった。そんな中で1976年西ドイツのBeninghovenは金属表面にアミノ酸を塗布してイオン衝撃するとアミノ酸にプロトンの付いた疑似分子イオンが観測できることを報告した(5)。固体を高速イオン衝撃してスパッタで得られるイオンを測定する技術(SIMS: Secondary Ion Mass Spectrometry)は個体の元素分析方法として発展し、半導体や材料科学分野では有力なツールとして長年使われてきた。固体の表面分析は高真空下で行われ、真空度が悪いと真空ポンプ油などが表面に吸着して

それらが邪魔者として観測されていた。固体分析を行っていた物理学者のBeninghovenは「吸着有機物が観測できるなら不揮発性の物質を塗布しても何らかのイオンが観測されるはずで、うまくいくと分子イオンが観測されるかも知れない。不揮発性分子の分子イオンの測定ができれば分子量が直接わかるのでインパクトが大きいと生命分野の人は言っている。一つ測ってみよう。まずは簡単なアミノ酸だ」と考えたかもしれない。同時期にレーザーを用いて表面吸着した分子をスパッタして質量分析する報告もなされたがやはり対象は小さな分子であった(6)。不揮発性化合物を修飾しないでイオン化して質量分析する報告は多くの人に刺激を与えた。筆者はBenninghovenの報告に刺激を受け、生体関連物質については全くの素人であったが不揮発性化合物用のSIMS技術の開発をスタートした。高速イオンが固体表面を衝撃すると固体を構成する原子と衝突して通路に沿った原子にエネルギーを与えながら内部に潜り込む。エネルギーをもらった原子群は弾き飛ばされて(スパッタ)一部イオンになり表面から放出される。表面に不揮発性物質があるとそれらは下から突き上げられてスパッタされた原子群と一緒に表面から脱離する。「表面から放出される原子数が多いほど表面に塗布された大きな有機物の脱離には有利に違いない。そうなら衝撃イオンは軽いものより重いほうが表面近傍に沢山エネルギーを与えるので良いのではないかと考え通常用いられているArに代わってXeを用いたりした。また、「不揮発性物質をイオンスパッタにより分解せずに気相に放出させるには分子同士の結合力を弱めたり、過剰のエネルギー

を周りの分子に効率よく吸収させたりした方が良くに違いない」などと考えグリセロールマトリックスを使ってみた。するとそれまで測定が困難であった種々物質の疑似分子イオンが面白いように観測された(7)。これで世の中の人をびっくりさせることができるかと喜んでいると、米国から1通の手紙が来た。「来年9月(1981年)にアシロマーで質量分析の会議をするが、あなたは面白い成果を出していると聞いたので招待する」と書いてあった。初めて国際会議で招待されるので喜んで会議に備えてデータを集積していった。

「1981年の2月にピッツバーグで行われた分析化学の会議で、イギリスのBarberらによりイオンでなく中性原子衝撃(FAB: Fast Atom Bombardment)により、種々生体関連物質の疑似分子イオン観測が可能であることが報告され話題になっている」とのうわさを耳にした(8)。話を聞くと自分の開発した方法と酷似している。違いは高速中性粒子を用いるか高速イオンを用いるかの違いである。彼らもグリセロールマトリックスを用いていたが、イオン衝撃では固体表面が帯電して測定はできず、中性粒子衝撃がキーであると主張していた。「アシロマー会議まで6カ月ある。イオンでも中性粒子でもあまり違いはない。粒子衝撃して不揮発



Matrix assisted SIMS の原理  
図2 マトリックスを用いた SIMS



性物質を固体表面から脱離させてイオン化する (Desorption Ionization) 技術はアシロマー会議のころまでには世界中で良く知られた技術になっているだろう。そこでイオン衝撃でいろいろな化合物の測定ができると講演しても聴衆に何のインパクトも与えないだろう。どうしようか。」と悩んだ。そんな折に人から「FABでは大量に試料を消耗する」と聞いた。「生体関連の物質は何トンもの試料から抽出と精製を繰り返し、ようやく数 mg の生体関連物質が得られるにすぎない。」とある研究者から聞いたことを思い出した。「貴重な試料なのだから微量の試料で測定ができれば研究者はうれしに違いない。FABの1/100の試料量で測定すればインパクトはあるだろう。」と必死に努力をして会議に臨んだ。努力しただけのことはあって会議では非常に注目を集め、世界に名前が知られるきっかけとなった。世の中の進歩はデジタル的に起こる。必死に努力すると、あるときにチャンスを手掴みで少し飛躍する。このような繰り返しが大きな差を生むように思う。「講演には光るものを入れ、まあいいやとあきらめないで必死に努力する」ことの重要性を実感した。マトリックスを使う技術は後年レーザーデソープションにも活用され (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)、田中耕一氏 (2002年ノーベル賞) の仕事にもつながった。当時はレーザーデソープションに用いる TOF (飛行時間差型質量分析計) の分解能が悪く、実用にはならなかったが、脱離イオンのエネルギー分布を補正して高分解能を得る技術が開発されて応用範囲が広がり生体物質分析の標準方法の一つとして確立していった。

### [質量分析から DNA シーケンサへ]

1980年代に入ると日立中央研究所もニクソンショック・オイルショックから回復してきて新しい技術を開発して世界をリードしようと言う機運が満ち始めていた。世の中では1970年代に遺伝子組み換え技術とDNA配列決定方法の確立がなされ、DNA分野の発展が始まりつつあった。そんな中、人員も研究費も少ない状態で研究成果を出していた筆者は「成果を出しているので人手と研究費をもっとほしい」と部長に掛け合いに行った。しかし、「質量分析のような古い分野でなく、これから世界をリードして新しい分野を開拓するような技術開発でなければ人も研究費もつけられない」と言われた。新たな分野と言われてもなかなか考え着かない。面白そうに見える分野はすでにその分野を面白くした人たちがいた。自分が活躍する余地があるかは疑問であった。そんな折、新聞などで遺伝子組み換え技術のニュースを見た。「この分野は発展するかもしれない。そこで必要な事で自分が寄与できるのはDNA分析装置の開発であろう」とDNAシーケンサの開発を1982年にスタートした。この分野は全くの素人であり、本当に発展するかどうか不安であった。人は困難に遭遇すると自分に都合の良い理屈をつけてそこから逃げ出したくなる習性をもつ。自分もそうなるかもしれないと思った。昔、年配の研究者から「10年一仕事。物事は10年も続けていると技術は世界トップレベルになるし、特許も集積される。追いかける方も10年リードされていると思うと力が入らなくなる」と聞いたことを思い出した。「うまく行くかどうかかわからないけど10年は続けよう。この分野は発展するに違いな

い。」と自分に言い聞かせてのスタートであった。さて、DNAシーケンサ開発をスタートしてみると、世の中には偉い人がいるもので、当時東大の和田昭允教授がDNA自動読み取り技術開発プロジェクトを既にスタートしていた。そこで、途中から和田プロジェクトに参加させてもらった。和田プロジェクトでは埼玉大学の伏見譲教授が蛍光式DNAシーケンサをめぐって蛍光標識DNAの電気泳動分離とその実時間検出の基礎検討を既に行っていた。筆者らも実時間電気泳動装置の開発をめざしたが、多くの試料を同時に効率よく測定するために、側面照射技術を開発した。薄い平板ゲルの側面からレーザーを当てて、一度にすべての泳動路を照射して得られる蛍光信号をラインセンサで検出する技術である (9)。

DNAシーケンサの開発をしている時には自分たちが先行していると思っていたが、技術開発が終了するころ、米国カリフォルニア工科大学 Lee Hood 教授のグループから蛍光式DNAシーケンサの論文がいち早く提出された (10)。改めて世界の広さを感じた。世界で最初の国際会議が和田プロジェクトの終了報告会を兼ねて1987年岡山県で開かれた。世界中からDNA解析に興味を持つ人々が集まった。Lee Hood やその技術の実用化を目指すABIのMike Hunkapillarなども参加者に含まれていた。筆者の発表のあと、EMBL (Europe Molecular Biology Laboratory) の所長が質問に立ち、側面入射技術は感度が高く良い方法だと偉く褒めてくれた。通常、講演の後こんなに褒めることはないので奇妙だと思っていたら、二つ後の講演で彼が側面入射を用いた装置の発表を行った。検出器は光増倍管を泳動路ごとに並べたものだ

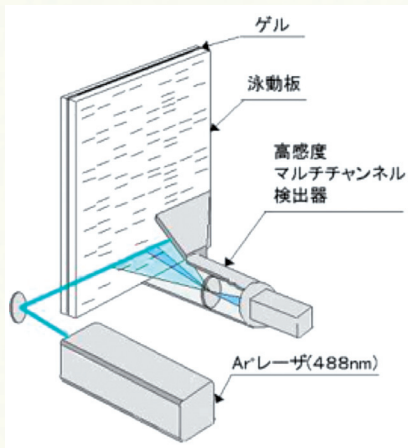


図3 側面入射方式のDNAシーケンサ

が筆者の装置に酷似していた。彼は「この技術は日立の報告と同じ側面入射を用いて高感度である。論文も出したし(11)、側面入射の特許も申請した。技術を使用したい人は自分にコンタクトせよ」と言って講演を終えた。「論文で先んじられ、特許も取られたのでは立つ瀬がない。この数年間は何だったのだろう。」と意気消沈して岡山から東京に戻ってきたのを鮮明に覚えている。その後、特許では日立の方が1年以上早く提出しており、側面入射技術は日立の技術と世界的に認められ、一安心した。「素晴らしいことを思いついても、世界には同じことを考える人間が2-3人はいる。だから思いついたことは必死に迅速に行わなければだめだ。」と昔聞いたがその通りだと実感した。

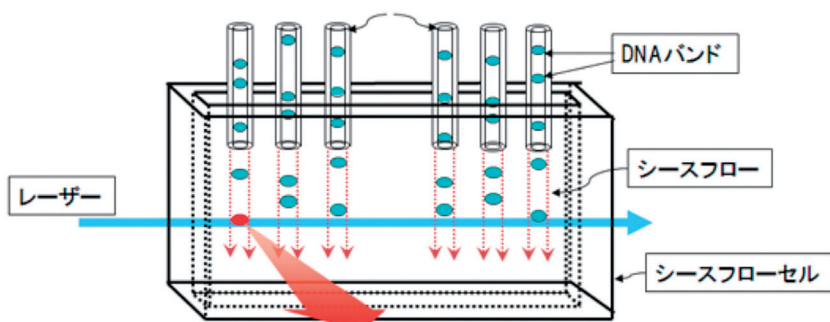
**[ヒトゲノム解析計画のスタート]**

DNA 関連分野が発展するか危ぶみながらの技術開発スタートであったが、その後の発展の原動力となった「ヒトゲノム解析計画」が1990年スタートした。計画の遂行にはもっと能力の高い装置が必要であった。解析能力を上げるには2つの方法が考えられた。第1は全く斬新な方法を開発すること、第2は現在実用になっているゲル電気泳動を用いたシス

テムの能力向上をすること、の2つである。前者の例としてDNAプローブアレーを用いる方法が提案された。この方法はDNAシーケンシングには使われなかったが、遺伝子発現解析の基本ツールとして後に発展する(12)。更に、1つのDNAを用いたDNAシーケンシング法も提案されたがいずれも実用化には長い時間が必要と思われた。後者では泳動板の幅を広げて多くの泳動路を確保したり、薄いゲル板を使ったり(13)、板に溝を設けて細い泳動路とすることで放熱性を上げて高速電気泳動を実現したりすることが試みられた。そんな中、当時高速電気泳動が可能な技術として注目され始めていたキャピラリー電気泳動に注目した。キャピラリーにゲルを充填して泳動路とし、それを沢山並べれば高性能の装置が実現するかもしれないと考えた。「平板ゲル方式の改良では基本的な特許を得ることはできないが、キャピラリーを用いる方式は新しい技術要素が中心になる。基本的な特許も取れる可能性が高い。」と考え技術開発をスタートした。ほぼ同時期に世界数か所でも技術開発がスタートし、競争となった。まず、1本のキャピラリーにゲルを詰めたシステムの報告がなされた(14)。しかし、数十本のキャピラリーを並べたキャピラリーアレーにレーザー照射し高感度で蛍光を検出するのは難しかった。最初にキャピラリーアレーシステムの報告をしたのはRichard Mathiesであった(15)。レーザー स्क্যানと高感度蛍光検出技術を用いたものであったが、感度は充分とは言えなかった。彼の論文を見て筆者らは進めていたレーザー側面入射技術を用いたシステムの開発を加速した。「10月(1992年)には松原謙一先生主催のDNA解

析に関する国際会議が浜松で開かれる(16)。ここに招待されているが講演には光るものとしてキャピラリーアレーの成果を入れたい。これに間に合わせないと完全に出遅れる」と思った。筆者らはレーザー側面入射技術を平板ゲルシステムに使い、レーザー स्क্যান技術に比べてはるかに高感度が得られることを実感していた。断面積が小さく使用できるDNA量が従来の1/100程度のキャピラリーアレーで使えるのはこの技術しかないと思った。しかし、小さなロッドレンズが並んだようなキャピラリーアレーをいかに一括レーザー照射するかが大きな課題であった。数本のキャピラリーは並べてレーザー照射できるが数十本となると容易ではなかった。そんなときに思いついたのが、平板ゲルで試みたが失敗したDNA抜き出しレーザー照射である。DNAシーケンサ開発初期にはPCR技術はまだなく、少ないDNAで計測できるように検出感度を上げようと工夫をしていた。実効感度を決めているのはゲルからの背景蛍光でこれを低減しようとしていた。ゲル素材を調べても蛍光は出ず、ゲル生成に伴う重合反応で蛍光が現れた。これでは、レーザー照射をゲルのないところで行うしかないと考えた。DNAを平板ゲルの端面から溶媒中に抜き出し、レーザー照射することを試みたが失敗した。泳動路幅(数mm)が広く、ゲル端面の形状の乱れによりDNAバンド幅が広がり実用にならなかった。必死に努力した経験は失敗しても潜在意識の中に残り、後日役に立つものである。この経験を思い出し、キャピラリーゲルのように泳動路の断面積が小さなシステムではうまくいきそうだと直感した。実験してみるとDNA断片がキャピラ





思いつきのきっかけは過去の失敗経験

図4 マルチプルシースフロー DNA シーケンサ

りから抜き出たところで止まってしまった。電界強度がキャピラリー内と溶液中で大きく異なっていたためである。そこで、溶液の流れを利用してレーザー照射部までDNAバンドを運ぶことにした。高感度のDNAシーケンサ(マルチプルシースフロー装置)が誕生した。

成果を10月に浜松で行われた国際会議で発表した。発表の後、ヒトゲノム解読のブレークスルーになると思ったのか参加者からどよめきのようなものが起こった。主催者の松原先生が近寄ってきて「招待した外人が啞然としていた。とても愉快だった」といった。ネイチャー・ジャパン支社長デイヴィッド・スウィンバンクが寄ってきて「聴衆が感銘を受けたようなのでネイチャーのショートノートに出してはどうか」と勧めてくれた。これは日立の技術が世界に知られるきっかけとなった(17)。**発表は単に話せばよいのではなく、最大限努力して光るものを入れれば次の発展につながる**と実感した。会議に参加していたシドニー・ブレンナー(2002年ノーベル賞)はこの技術が気に入って中央研究所までわざわざ見学に来た。発表の後「この技

術が実用化されればヒトゲノム計画完了は時間の問題」と実感した。シースフローを用いたキャピラリー電気泳動は1本のキャピラリーを用いたものがDovichiにより既に報告されていたが、彼らは多くのキャピラリーを一行に並べるのはうまくいかないとキャピラリーを2次元配置にした装置を後に報告している(18)が実用にはなっていない。

開発していた技術がひとまず完成すると「ヒトゲノム計画終了後は多くの人々がDNA配列決定をするだろう。そうなったときにこの技術で良いのだろうか」と不安が出てきた。「人生山あり谷ありである。少しくまういったからと言って喜んでしまうとすぐ新しい技術に凌駕されてしまう。次の時代には何が必要になるのだろうか。」と考えた。このシステムではシースフローセルが汚れやすく、洗浄を頻繁に行う必要があった。「誰でも使える保守不要の装置を作りたい。それにはキャピラリーを並べて直接レーザー照射するのが良い。以前うまくいかなかったが原因追求を十分にはしてない。もう一度挑戦しよう」とキャピラリーアレー直接照射方式の開発をメンバーの一人に指示した。

彼はいろいろ努力して直接照射がうまくいかない原因を突き止めた。キャピラリーは折れやすいので強度を補強するためにポリイミド皮膜で覆われている。レーザー照射するにはこれを除去して照射窓を作る必要がある。被覆を焼却除去するときにキャピラリーが歪み、アレー状に並べたときにキャピラリーの軸が平面からずれるものができるのが原因であった。酸素プラズマを利用して熱をかけずに被覆を除去する方法を開発して困難を克服した。串刺し照射キャピラリーアレー DNA シーケンサの基礎技術が完成した(19)。

これらの技術を搭載したキャピラリーアレー DNA シーケンサは日立-ABIの提携で、まずマルチプルシースフロー方式が1998年(ABI PRISM 3700)、ついで串刺し照射方式が2000年(ABI PRISM 310)に製品化された。1995-6年当時ABIは平板に溝を掘ったタイプの装置開発を行っていた。関連技術の特許を筆者らが提出しているのを見て特許交渉を持ちかけてきた。その過程で、むしろ一緒に事業を行おうということになったが、それなら溝を用いるタイプよりもキャピラリーアレーの方が優れているのでそれを実用化しようということになった。ABIはすでに溝型技術を搭載した装置を試作していたのでそれに日立のシースフローを用いたキャピラリーアレー技術が載るように改造したものがまず実用化された。次いで串刺し照射方式はABIと協力し日立ハイテクの工場が開発・生産された。DNAシーケンサの開発を始めて20年近くが経過していたが一つの区切りがついた。これら装置はヒトゲノム計画に寄与するとともにライフサイエンス分野の発展に貢献した。

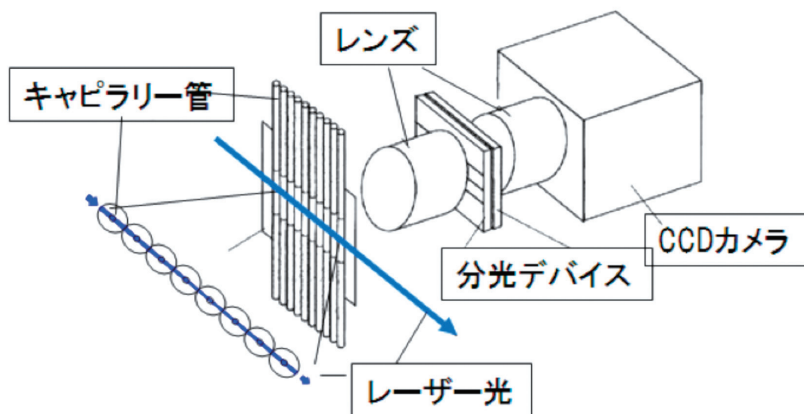


図5 串刺し照射方式のDNAシーケンサ

### [1 細胞解析へ向けて新たな出発]

2000年になると若手育成の意味もあり、グループの解散・再編成があり筆者は一人になってしまった。NEDOの研究費をもらい、中国に行き、ポスドクを募集して新たな研究開発を始めた。DNAシーケンサは高価であり、裕福なグループは高価な装置を購入して成果を出せる。それを元に、また、研究費や開発費を得る。一方でお金がないところは装置も買えず成果も出にくくなる。一種の貧富の差が生じてくる。筆者は研究費のない状態で過ごすことが多かったのでお金がない人でも買える小型で安価なDNAシーケンサを作りたいと思った。用いた技術は段階的なDNA相補鎖合成反応を用いるパイロシーケンシングであった。まず簡単なデバイスを作り試したところDNA塩基配列決定ができることが分かり、小型装置の開発は比較的順調に進んだ(20)。

そんな時、「反応セルを小さくしていくとどうなるだろう。小さな反応セルでシーケンシングが可能なら面白い装置ができるかもしれない。」と思い、反応セルを小さくしてみたが、信号が見えなくなりました。酵

素などが固体表面に吸着されたためのものであった。担当者が転職したので中途半端に終わったが、数年後に545 life scienceから微小反応セルを並べた大容量パイロシーケンサ(21)が市販されるとのニュースを聞き、残念なことをしたと思った。

1992年の浜松の会議で会ったシドニーブレンナーとはその後何回か会う機会があった。彼はビーズにmRNAを捕獲して1コピーずつシーケンシングする方法を考案し、技術開発を進めていた(22)。最初話を聞いた時には「原理的には可能だが、突拍子もないこと」のように思えた。しかし、現在、その系統の技術は次世代DNAシーケンサとして実現している。新たな技術やシステムを生み出すには、物事を否定的にみるのではなく、まず行動し、問題点を具体化して一つずつ解決していくことが重要だと改めて感じた。

2003年ヒトゲノム完全解読が宣言され、遺伝子データを医療など種々分野に活用する時代へと移行していった。米国ではヒトゲノムを\$1000で解読する技術開発に研究開発費をつける\$1000ゲノムプロジェクトがスタートし、次々に次世代

DNAシーケンサが開発されていた。プロジェクト推進の中心人物はNIHのJeffery A. Schlossであった。「我々はバイオ・メディカル分野でどんな動きがあるか非常に注意深くチェックしている。この分野では絶対に他国に負けない手を打つのがミッションである。分野を切り開く手を打ち、ベンチャーなどを中心に事業化が見えてきたらその分野は民間に任せ、次に重要となるかもしれない新たな分野へとプロジェクトを移していく。」と彼は言う。彼は技術も良く知っており、国家的研究企画にこのような人材を多数持つ米国と競争をするのだから日本は技術開発競争に勝てる体制を構築しないといけないと常々感じる。

\$1000ゲノムプロジェクトをきっかけに次世代DNAシーケンサ開発がますます盛んになってきた。医療応用・医薬品開発など豊富な応用分野をにらんで多くの資金を得た様々なベンチャー企業が開発競争に乗り出してきた。こうなると資金と人手のあるところにはかなわない。「人がまだあまり行ってない新たな分野を見つけて新しい取り組みを始めよう。」と思っていたところ、大学の仲間と提案した文部科学省特定領域研究「ライフサイバヤをめざして」が認可され、2006年スタートした(23)。中心課題の一つは1細胞解析関連技術の開発である。筆者らは1細胞中の遺伝子発現解析をターゲットに新たな技術開発を始めた。DNAシーケンサ開発を始めたとき同様、細胞については何も知らない。自分たちが目指している方向が正しいのか不安である。いろいろな方々に「1細胞中の遺伝子発現ができるようになりますとどんな嬉しいことがありますか」と訊ねまわった。多くの場合、「現在い



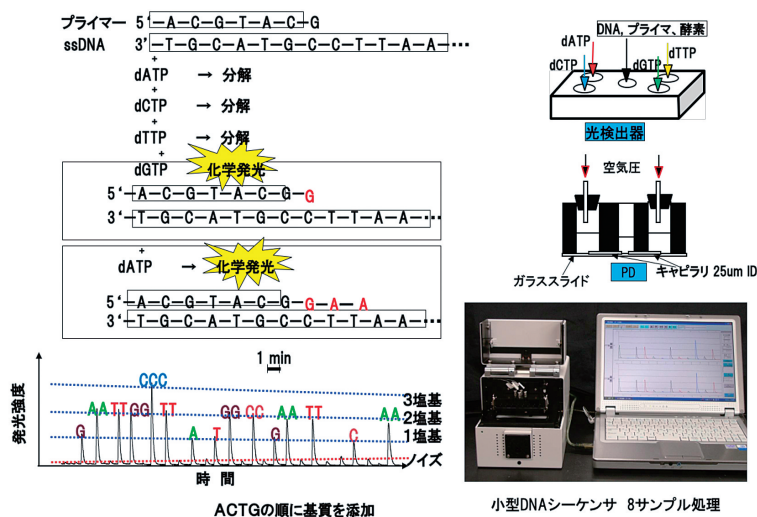


図6 小型DNAシーケンサ

ろいろな新しい情報が細胞集団で得られており、それで十分です。1細胞解析なんて必要ありません。1細胞のデータが出てきたら膨大なデータになるのでどう扱うのですか。」などの答えが返ってきた。それでも、有意義であるという理屈を自分で考え、自分を説得して技術開発を進めてきた。最近では1細胞解析が重要という認識が世界的に広がりつつあり、大きな変化を感じている。

「1細胞中には種々 mRNA があるが何コピーくらいあるのだろう。あまりはっきりとは知られていないのでできるだけ正確にコピー数をまず測定しよう。」と定量PCRによる方法を開発した。扱う mRNA の量が少ないので容器の表面は高分子の皮膜で覆い、吸着防止をするなど細心の注意を払った。最初溶液中で反応を行っていたが、逆転写反応に使用した試薬がPCR反応を阻害することが分かった。そこで不要になった試薬の洗浄除去と種々遺伝子についての測定を可能にする磁気ビーズ固定cDNAライブラリーを開発した(24)。

この方法のダイナミックレンジは広く、数コピーの mRNA から数万コ

ピーの mRNA まで正確に測定できる。1細胞中の遺伝子発現量を測定してみると、同じように調製したはずの細胞中の遺伝子発現量が違う。何度測り直してもばらつく。測定精度を確認するために標準試料を作製して測定したがこちらは再現よい結果が得られた。もしかして細胞の個性かもしれないと思った。論文を提出したがクレームがついて戻ってきた。データを全て取り直すとともに追加データを加えたが手間のかかる作業で1年余り遅れてしまった。この間、遺伝子発現が細胞毎に揺らぐ指摘が他からも報告されはじめた。細胞分析に対する興味は次第に増大した。

定量PCRによる方法では同時に解析できる遺伝子の種類に限界がある。発現遺伝子を一網打尽に解析するには大容量DNAシーケンサによるしかない。幸運にもセルイノベーションプログラムに途中から参加させてもらい、技術開発をスタートした。DNAシーケンス解析するにはcDNAのコピー数を増やす必要がある。1細胞cDNAライブラリーを一括増幅してDNAチップで分析するバイオニア的な報告が斉藤通紀教授らにより

2006年になされ(24)、009年にはそれをシーケンシング用に手直した報告がTangらによりなされていた(25)。これまでの経験から反応ステップの多いDNAシーケンシングにはcDNAライブラリーをビーズ上に構築して利用するのが良いと考え、ビーズ法と一括増幅法を結びつける技術開発に注力した。各反応ステップを詳細に定量的に評価し、問題点を抽出して最適化した(26)。現段階では一番精度の高い1細胞発現解析技術が開発できたと感じている。現在、この技術を動物細胞だけでなく植物細胞に応用したり、非常に多くの1細胞解析を実現するためのツール開発をしたりあるいは多くの1細胞発現解析データをどう処理しようかなどを考えている。

[経験から学んだこと]

40年余りの研究・技術開発からいろいろなことを学んだ。それらは、1) どんなに優れた研究をしても他の人に理解してもらえなければ殆ど価値はない、2) 研究にはけりをつける、3) 分析技術は仲間内で良いと評価されているうちはまだ本物ではない、本当に使おうとする人たちが喜んでくれるかが重要、4) どんなことでも精一杯努力する、努力してダメなら自分の能力がないとあきらめるが、努力もせずにあきらめることだけはやめる、などである。

分野の立ち上げは一人ではできない。多くの方々と協力し、仲間を作りながら行う必要がある。これには国際会議の開催などが有効であった。最初の会議のきっかけは恩返しである。2000年にグループが解散し一人で新たなスタートを始めたときにパイロシーケンサ開発を一生懸命行ってくれたのは中国から来たポストドク

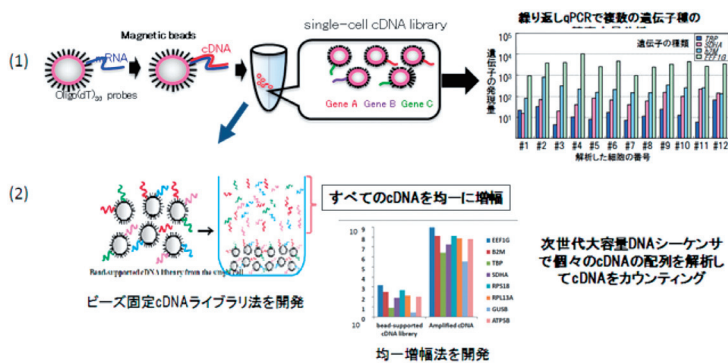


図7 ビーズを用いた1細胞遺伝子発現解析の概要

周国華氏（現南京医科大学教授）であった。彼が帰国した時に何とかサポートしたいと2002年中国で国際会議（International Forum on Post Genome Technology）を開いた。この会議は今日まで続いているがこれを通して多くの人々と知り合いになった(27)。この会議に参加したチェコの教授からチェコでも開催したいとの要望を受け、2005年にチェコで小さな会議を開催した。その帰りにスウェーデンのUppsala大学Landegren

教授のところへ寄ってきたが、途中の飛行機の中で「ヨーロッパで会議をするのもよいな」と思った。そこでLandegren教授に「来年Uppsallaで国際会議をしないか」と持ちかけた。テーマは1細胞解析にしようということになり世界で最初の1細胞関連の国際会議The 1<sup>st</sup> International Workshop on Approaches to single-cell Analysisが開催された。幸い2006年に大学のまかの応募した特定領域研究「ライフサーベイヤ」が認可され、

スタートしていたこともあり多くの方々が参加してくれた。また、Nature Methodの編集長も参加して会議を盛り上げてくれた(28)。この会議は今日まで毎年続いており、去年はスタンフォードで、今年はケニアで行う予定である。このような過去を振り返ると、「良いと思ったことはまず行動し、一生懸命努力をしていると思わない方向に発展するものだ」とつくづく感じる。物事はうまくいかないことを想像すると行動力が鈍る。うまくいくことを想像しながら努力すると良い結果につながるようである。

長い技術開発の経験を通して日本では新たな技術を事業に結びつける仕掛けがまだ十分でなく非常に長い時間と多大な労力が必要のように感じる。残された人生では新たな技術をスムーズに事業化する仕掛け作りをしていきたいと考えている。

参考文献

- 1) FW Karasek, MJ Cohen and DI Carroll : J Chromatogr. Sci. 9, 390 (1971).
- 2) H Kambara and I Kanomata : Anal Chem 49, 270 (1977).
- 3) EC Horning, MG Horning, DI Carroll, I Dzidic and RN Stillwell : Anal Chem 45, 936 (1973).
- 4) HD Beckey : "Principle of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry", Pergamon, Oxford (1977).
- 5) A Benninghoven and WK Sichtermann : Appl. Phys. 11, 35 (1976).
- 6) DM Hecules, RJ Day, K Balasanmugan, TA Dang and CP Li : Anal Chem 54, 280A (1982).
- 7) H Kambara, Y Ogawa, K Mochizuki and S Hishida : 質量分析 30, 169 (1982).
- 8) M Barber, RS Bordoli, RD Sedgwick and AN Tyler : J Chem Soc Chem Commun, 1981, 325.
- 9) H Kambara, T Nishikawa, Y Katayama and T Yamaguchi : Biotechnology 6, 816 (1988).
- 10) LM Smith, JZ Sanders, RJ Kaiser, RJ Hughes, C Dodd, CR Connell, C Heiner, SBH Kent, LE Hood : Nature 321, 674 (1986).
- 11) Hayashibara Forum 1987. Proceeding of international workshop on automatic and high speed DNA-base sequencing. Okayama, Japan.
- 12) W Ansorge, BS Sproat, J Stegemann and C Schwager : J Biochem Biophys Methods 13, 315 (1986).
- 13) M Schena, D Shalon, R Heller, A Chai, PO Brown and RDW Davis : Proc. Natl Acad Sci USA 93, 10614 (1996).
- 14) AT Woolley, GF Sensabaugh and RA Mathies : Anal Chem 69, 2181 (1997).
- 15) H Drossman, JA Luckey, AJ Kostichka, J D'Cunha, and LM Smith : Anal Chem 62, 900 (1990).
- 16) XC Huang, MA Quesada and RA Mathies : Anal Chem 64, 967 (1992).
- 17) The first international conference : Gene sequencing and mapping : Photonics Applications, November 11-13 (1992), Hamamatsu, Japan.
- 18) H Kambara and S Takahashi : Nature 361, 565 (1993).
- 19) J Zhang, M Yang, X Puyang, Y Fang, LM Cook and NJ Dovichi : Anal Chem, 73,1234 (2001).
- 20) T Anazawa, S Takahashi and H Kambara : Anal Chem. 68, 2699 (1996).
- 21) H Kambara and G Zhou : "DNA analysis with a Photo-Diode Array Sensor" in Biosensors and Biodetection Chaptor 19, Methods and Protocols Volume 503 : Optical-Based Detectors, edited by A Rasooly and KE Herold, Humana Press (2009).
- 22) M Margulis, M Egholm, W Altman, et al. : Nature 2005, 437, 376.
- 23) S. Brenner, M Johnson, J Bridgham, DH Lloyd et al : Nat Biotechnol 18, 630 (2000).
- 24) 「シングルセル解析の最前線 Frontier of Single Cell Analysis」神原秀記、松永是、植田充美 監修 シーエムシー出版 (2010).
- 25) K Taniguchi, T Kajiyama and H Kambara : Nat. Methods, 6, 503 (2009).
- 26) K Kurimoto, Y Yabuta, Y Ohinata, Y Ono, KD Uno, RG Yamada, HR Ueda and M Saitou : Nucleic Acids Res. 34, e42 (2006).
- 27) F Tang, C Barbacioru, Y Wang, E Nordman, C Lee, N Xu, X Wang, J Bodeau, et al. : Nat. Methods, 6, 377 (2009).
- 28) H Huang, M Goto, H Tsunoda, L Sun, K Taniguchi, H Matsunaga and H Kambara : Nucleic Acid Research 2013, 1.
- 29) "Going single, but not alone" Nat Methods, 3, 581 (2006).