医療用デバイスとめっきによる高機能化

小 幡 勤^a^a 富山県工業技術センター 中央研究所(〒 933-0981 富山県高岡市二上町 150)

Medical Chip Devices Functionalized by Plating Technology

Tsutomu OBATA^a^aCentral Research Institute, Toyama Industrial Technology Center(150, Futagami-machi, Takaoka-shi, Toyama 933-0981)

Keywords : Medical Device, Antibody, Plating, MEMS, Magnetic Thin Film

1. はじめに

次世代医療として、ES 細胞、iPS 細胞などによる再生医療と並んでテーラーメイド医療が注目されている。患者の疾患に対する治療方法は、これまで画一的な療法を適用することが中心となってきた。しかし、このような患者に対して同じ治療方法を施すやり方から、患者個々の疾患の状態に対して有効な最も適期した治療を行うことが必要であることがわかってきた。個々にあった医療を行うことは、治療がより有効でかつ副作用についても最小限に抑えられる可能性も秘めている。なかでも抗体医薬は、ヒトがもともと体内に有する免疫機能を利用したものである。血液中のリンパ球が創り出す抗体を利用することで、副作用のない薬も実現可能と考えられている。

また近年、上記抗体医薬を開発する技術として、細胞を一つ一つ取り扱いそれを個々に評価するシステムの開発が行われている。個々の細胞の特性、性質などを把握することで、細胞の刺激に対する応答選別や病変などの予兆をモニターしようというような用途へ応用されようとしている。例えば、我々のグループが行っているような細胞に対しての抗原刺激による反応を観察することで、血液中に低頻度で存在する抗原特異的抗体分泌細胞のスクリーニングが可能である^{1)~3)}。また、個々の細胞の硬さを計測することで病気発症の予知や健康状態を把握するなどへの応用も考えられている⁴⁾。

富山大学大学院医学薬学研究部免疫学と富山県工業技術センターは共同で、抗体医薬開発に必要な抗原特異的抗体産生細胞のスクリーニング技術を開発している。ある特定の抗原例えばインフルエンザに対して免疫反応を示すリンパ球は非常に少ないため、なるべく多くの候補の中から効率よく選別できる技術が必要である。我々が開発したシリコンマイクロウェルアレイチップ⁵⁾は、微細加工技術である MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を応用して表面に約 10 ミクロン程度の穴を数十万個形成し、そこへリンパ球を一つ一つ収容することで単細胞での評価が可能となっている。しかしながら、シリコンをベースとした本システムは、細胞の投入

量に対するウェルへの収容率が悪いことから 1 回の細胞投入でのウェルへの細胞充填率は 10 ~ 20 % 程度とあまりよい数値が得られていない。実際は、チップ上への細胞の播種とウェルへの収容の作業を数回繰り返すことで実用的な充填率を得ている。しかしこの作業は細胞を弱らせるばかりか、作業者の熟練度によって結果のばらつきが起り、システムを広く普及させるにはこの投入した細胞をいかに効率よく利用するか(=細胞利用率)を向上させるかが鍵となっている。

このシリコンベースのチップは、細胞のウェルへの収容を重力による沈降に任せている。よってチップ上に播種された細胞は、懸濁液を浮遊しながら重力で沈降していく過程で偶然ウェルに収まっていく。つまり実用化に耐えうる効率の高いシステムを構築するためには細胞に外力を加えることで強制的にチップ上に配列させることが必要となる。

本稿では、我々が開発しためっきによる磁性膜を用いて効率よく細胞をスクリーニング可能なシステムを例に医療用デバイスのめっきによる高機能化の可能性について解説する。

2. 磁性めっき膜

めっきによって作製される磁性膜は、磁気記録媒体であるハードディスクドライブ(HDD)をはじめとして、磁気ヘッド、磁気センサなどに応用されている。我々が開発しているシステムでは、一般的なニッケルめっき膜や軟磁性膜である Co-Ni-Fe 三元合金などを利用した。関東学院大学の竹田ら⁶⁾は、ホウ酸 0.40 mol/dm³、塩化アンモニウム 0.20 mol/dm³、硫酸ニッケル 0.20 mol/dm³、硫酸コバルト 0.0875 mol/dm³、硫酸鉄 0.045 mol/dm³、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 0.01 g/dm³で細胞捕獲用磁性膜形成に用いる Co-Ni-Fe 三元合金めっき浴を建浴した。これをベースとして基本浴から構成される金属塩を 1 種類除いて、二元合金の磁性めっき膜の磁気特性を評価している。振動試料型磁力計(VSM)を用いた評価では、Ni を除いた Co-Fe 浴での磁性膜の磁束密度は最大の Br 値を示した。ここで Br 値を比較すると、Fe が磁束密度の大きさを左右することがわかった。さらにこの Co-Fe 浴にて電流密度による磁束密度の変化を評価している。このとき Br 値は

ある値で最大値をとった後、電流密度を上げるに従って Br 値が低下する現象が見られた。これは磁性膜の結晶性が影響しているものと思われ、最大の Br 値を示した電流密度での磁性膜の SEM 観察では、微細な結晶粒の成長が観察されている。このようにして作製された磁性膜は、半導体集積回路製造における要素技術の一つフォトリソグラフィー技術によって数ミクロンのドット状に加工される。ニッケルめっき膜は比較的形成が容易であることから医療現場から要求される用途も広範囲に対応できる。また Co-Ni-Fe 膜は軟磁性であるため、高い透磁率により細胞を効率よく引き寄せ、また保持力が小さいことから磁性膜に捕獲した細胞の取り出しも容易となる。いずれのめっき膜も電気めっきにより形成する。下地電極は、スパッタなどによって形成された導電膜あるいは無電解めっきによる Ni-P 非磁性めっき膜などを利用している。めっきによる磁性膜形成は、浴組成や温度だけでなく、基板の前処理条件も重要であり次に述べる微小なスポットパターンを形成する際は特に気をつける必要がある。

以上のようにめっき法により磁性膜は形成されるが、アレルギーや生体毒性を考慮して、実用段階ではさらに周辺技術を検討していかなければならない。

3. 磁気スポットアレイの形成

磁性めっき膜により構成される磁気スポットは、半導体集積回路製造技術であるフォトリソグラフィーにて形成される。微細なパターンを形成可能な本技術を利用することで、基板であるガラスなどの表面に数万～数十万個の磁性膜によるマイクロスポットが形成可能である。磁性膜の形成方法にはスパッタ蒸着法もあるが、特にマグネトロンスパッタ装置では磁性膜の成膜速度が遅いため、厚膜化には不向きで生産効率が著しく劣る。また磁気テープなどに使われる塗布型コート材も細胞を吸引するのに必要な磁力が得られにくいいため検討から外している。今回解説する磁気スポットアレイは、大量生産が可能で比較的小ロットから効率よく対応可能なめっき技術にて形成されている。めっき技術は、スパッタ蒸着とは違い真空雰囲気が必要としない。つまり大がかりな設備を必要とせず、ピーカー一つからでもその成膜工程が実現できる。また、真空排気などの時間のかかる工程ではないのでスループットも優れている。しかし、前述のようにフォトリソグラフィーによって開口した部分へのめっきを行う際は、めっき前の微小パターンへのめっき液の十分な浸透はもとより、フォトレジストのスカムにも注意する必要がある。数ミクロンのパターンが多数配列される磁気スポットアレイの場合、フォトレジストのスカムによってめっき膜の密着性が著しく劣ってしまうことがある。よって、フォトレジスト、現像条件などを十分検討し、清浄な下地膜が露出するように気をつける。

図1は磁気スポットアレイの製造方法例である。はじめに、基板に下地電極となる金属膜を蒸着あるいは無電解めっき法などにより形成する。その電極上にフォトレジストを塗布し、スポットパターンが描かれたフォトマスクを透して露光、現像を行うとスポットパターン上に下地電極が露出する。この後スルファミン酸浴による電気めっきを施すことで露出開口部にニッケル膜によって構成される磁性めっき膜が成長する。ここではニッケルめっき液は市販のものを利用し、液温 50℃にて行っている。フォトレジストはこの工程後にアセトンなどの有機溶剤により剥離される。このときめっきの膜厚は2～3ミクロン程度である。薄すぎると磁性が弱い場合細胞の捕獲が難しく、逆に厚いとめっき膜がボール状に基板上に形成されるため、膜上への単細胞のみの捕獲が難しくなる。また、スポットのサイズは一つのスポットに1つの細胞のみを捕獲するためには重要なパラメータである。ターゲットとする細胞、例えばリンパ球のサイズは約8ミクロン程度である。よってスポットサイズが十数ミクロンと大きくなると、一つのスポットに複数の細胞がトラップされてしまう。よってスポットサイズは細胞の大きさよりも小さくすることが好ましく、リンパ球などを対象とする場合、例えば5ミクロンくらいの大きさが一つの基準となってくる。図2はスポットサイズを5ミクロンと10ミクロンに設定し、約6ミクロンの磁気ビーズを Co-Ni-Fe 膜へトラップさせた結果である。基板上にばらまかれた磁気ビーズは、基板下に配置

(a) 10 ミクロン径

(b) 5 ミクロン径

図2 磁気スポット径と磁気ビーズ

図1 磁気スポットアレイの製造方法例

された永久磁石から伸びて、磁気スポットへ入る磁束に捉えられ、磁気スポット上へ引き寄せられる。この磁気ビーズは、10 ミクロンのスポットサイズだと複数の磁気ビーズが一つのスポットに捕獲されるが、5 ミクロンのスポットサイズだと一つのスポットに一つの磁気ビーズのみが捕獲されている。これらの結果から磁気スポットのサイズをターゲットにより最適化することで容易に1細胞レベルでの取り扱いが可能であることがわかる。

4. 抗原特異的抗体産生細胞のスクリーニング

磁気による生体細胞の取り扱いについては、すでにいくつかのグループによって行われている。名古屋大学の K.Ino らのグループ⁷⁾は、ネオジウム磁石を機械加工によってマイクロボール状にし、薄いシートを介してシート上の細胞を配列させることを試みている。ハーバード大学の H.Lee ら⁸⁾は、CMOS 技術を組み合わせてチップ表面に10 ミクロン程度のマイクロコイルアレイを形成し、細胞一つ一つをマニピュレーションすることを実現している。またコロンビア大の M.Tanase⁹⁾らは、電気化学析出によってニッケルのナノワイヤーを形成し、ナノワイヤーに磁極をつくることでその両端に細胞を固定することに成功している。富山大学医学薬学研究部の村口・岸のグループは筆者と共同で、シリコン型マイクロウェルアレイチップを使って、特定の抗原に対して結合する抗体を産生する細胞をスクリーニングする技術である、「ISAAC (Immunospot-array assay on a chip)法」を開発し、従来1～3ヶ月必要とした工程を1週間まで一気に短縮させた¹⁰⁾。本技術は、マイクロウェルアレイに1つに対し、1つのリンパ球を収容させ、これら個々の細胞が産生する数十万種類以上に及ぶ抗体をピンポイントで選別可能にしている。本技術の特色は、マイクロウェルに収容されている各々の細胞が産生する抗体をチップ表面に固定させさらにその上から蛍光標識した抗原をばらまくと、その抗原と親和性の高い抗体と結合することから、抗原に対して免疫反応を示す抗体を産生するリンパ球が特定できる。図3は実際にB型肝炎の抗体をスクリーニングした例¹⁾である。マイクロウェルの周りが光っているところの細胞(矢印)がB型肝炎の抗体を産生している。抗原の蛍光標識は、細胞の蛍光標識色のグリーン色と異なるオレンジ色としている。よってそれぞれの蛍光を別々に観察した結果をマージしてやれば、容易にスクリーニ

図3 ISSAC 法によるスクリーニング

ング結果を得ることができる。また抗体と抗原の親和性(抗体と抗原間の結合性)がオレンジ色の強度として現れるので、より抗原を抑えるのに適した抗体を産生する細胞の選別が可能となっている。さらに本技術では、複数の抗原に結合する抗体を同時に観測することも可能である。抗原に修飾する蛍光色素の種類を変えることで、同じ細胞群に対して複数のスクリーニングを実施することができる。従来は抗原で刺激されたリンパ球内部の Ca^{2+} イオン濃度の上昇を、細胞にローディングされた蛍光色素によってモニターすることで抗原特異的抗体産生細胞のスクリーニングを行っていた¹¹⁾。しかしながら、ターゲットとしている抗原による刺激以外にも反応してしまうことがありスクリーニング性能が十分でなかったが、本 ISAAC 法では非常に優れたスクリーニング性能を示すことがわかっている。しかし、現状のシリコンをベースとしたチップシステムでは、細胞のウェルへの導入が効率的ではないため、例えば実際の臨床での応用では被検者に対して負担を強いることになる。これに対して本磁気スポットアレイチップは、細胞の一つ一つを強制的に配列させることが可能なため、ISAAC システムと組み合わせることでスクリーニング性能の大幅な向上が期待できる。

5. 細胞の回収と抗体の生産

図4は、シリコン型マイクロウェルアレイチップを用いた際の抗体スクリーニングのプロトコルである。磁気スポットアレイチップでも同様の細胞操作を行う。磁気スポットにトラップされた細胞は、マイクロピペットなどにより吸引することにより容易に回収される。回収した目的細胞から mRNA を取り出し、これを鋳型とすることで DNA を合成、増幅する RT-PCR 法 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) によって、cDNA を合成、増幅を行う。この cDNA を CHO (Chinese Hamster Ovary: チャイニーズハムスターの卵細胞) 細胞などの発現ベクターに組み込み導入することで目的の抗体を産生する。このような方法によって、抗体を人工的に産生させることができれば、特定の疾患に効能がある抗体医薬が開発できるようになる。通常、抗体の発見から市販まで8年程度の期間を要

図4 抗体スクリーニングのプロトコル

すると言われており、幸運にも目的の抗体の取得に成功しても、さらに地道な作業を続けていく必要がある。

6. 磁気スポットアレイチップの試作と評価

磁気スポットアレイチップには、マイクロウェルを有するマイクロウェル型と前述の基板に磁気スポットを形成しただけの平面型の2種類がある。マイクロウェル型は、従来のシリコン型マイクロウェル型細胞チップの底に磁気スポットを形成したような形態となるが、ガラス基板ベースにビルドアップによる樹脂マイクロウェルを形成することでシリコンプロセスを使わなくても簡単にチップが製作できる。しかしながらISAACによるスクリーニングは、生物学・医学における研究や各種検査に一般的に用いられている蛍光顕微鏡を必要としており、このような形態では樹脂などからの自家蛍光によるバックグラウンドの影響により観察が困難になる。一方平面型は、ガラスなどの基板に磁気スポットを形成しただけで実現可能で、非常に簡単な工程で大量生産も可能、前述の自家蛍光などの影響もない。とくに簡易検査用途では安価で大量にディスポーザブルなチップが求められるため、平面型は非常に優れたアイテムとなりうる。

先に紹介した図1は平面型磁気スポットアレイチップの試作工程である。この時点で所望するチップとしての性能面は完成しているが、ニッケルの生体毒性などを考慮して、PDMSやポリパラキシリレンなどの保護膜をコートしてやる。マイクロウェル型の場合は、さらにフォトリソグラフィ工程を追加するなどをしてチップを形成する。

完成した磁気マイクロウェルアレイチップの評価については、ダミーとして細胞の大きさに近い大型磁気ビーズ(6ミクロン径)によるものと実際に細胞表面に磁気ビーズを修飾させたもので行っている。生体細胞での評価の場合、細胞の粘性と鮮度に結果が左右されることもあるため、磁気ビーズでの評価はチップ性能の傾向を知るには最適である。3000 Gauss程度の垂直磁化された永久磁石を用意し、その上にチップを固定し、大型磁気ビーズを播種する。播種されたビーズは数秒で磁気スポットへ固定される。シリコンチップで問題となっていたウェル以外へのビーズの浮遊は見られず、ほぼ全スポットにビーズが固定され、スポット間にはビーズは観察されない。しかしここで注意が必要なのは、磁気ビーズでの評価があくまで傾向を知るための手段であり、実際の生体細胞での挙動とは異なることである。生体細胞での評価の場合、その細胞の接着性や大型の磁気ビーズと違いナノサイズの磁気ビーズを表面に修飾する形となるので、磁気吸引による効果は劣ってしまう。しかし、大型磁気ビーズの活用は、磁気スポットアレイチップの工業化において、信頼性評価などの手段として有効であり検討を続けている。例えば、細胞とより近い評価をする手段として、細胞の大きさに近い蛍光ビーズにナノサイズの磁気ビーズを修飾する方法がある。図5は約5ミクロンの蛍光ビーズ表面にN-ヒドロキシスクシンイミド基(NHS基)で活性させ、アミノ基(NH₂基)をリガンドとして修飾した磁気ビーズを結合させたものである。これらは特別な前処理なしに混ぜることだけで容易に反応するため、工学分野の技術者でも蛍光顕微鏡を利用すれば生体細胞

に近いレベルでの評価ができる。

次に生体細胞での性能評価を試みた。生体細胞を利用した評価については、富山大学医学薬学研究部内にて実施した。生体細胞には水溶性ビタミンであるビオチンを結合(ビオチン化)させ標識とし、これと非常に強く結合する糖タンパク質の一種であるストレプトアビジンが固定された磁気ビーズを結合させることで磁気標識している。なお、細胞はオレグログリーン蛍光標識を行い、チップ上での配列状況を蛍光顕微鏡で緑色の発光でモニターできるようにした。図6はシリコン型と磁気スポット型(マイクロウェル型)における細胞の捕獲の様子を時系列で観察したものである。磁気スポット型は20秒程度ですでに移動する細胞が観察されず、スポットに整然と配列されていることがわかる。逆にシリコン型は浮遊している細胞が常に観察され、少しずつチップ上に落ちていく様子が観察される。その沈降に要する時間は5分程度で、すべての細胞の沈降にはそれ以上の時間が必要と思われる。またシリコン型は重力による沈降に頼っているため、マイクロウェル以外の場所にも細胞が観察される。これらの細胞は、スクリーニングの際にエラーとなるので、洗浄にて取り除く必要がある。しかし、この洗浄の際に、せっかくウェルに収容された細胞までも取り除かれる、あるいは移動してしまうことがあり、その操作には熟練度が求められている。以上から、磁気スポット型が従来のシリコン型に比較して、無駄なく効率よく細胞を配列可能でかつ省力化と熟練を要しないデバイスであることがわかった。またこれらの結果は、本システムの自動化に際しても有利であり、これまで人に頼っていた細胞を配列させるプロセスを機械化できる可能性を提供し、

図5 磁気ビーズ修飾された蛍光ビーズのSEM写真

図6 シリコン型と磁気スポット型の細胞誘引の様子

表1 シリコン型と磁気スポット型の細胞利用率

	細胞投入量	充填率	細胞利用率
シリコン型	総ウェル数の4倍個	47.2 %avg	11.8 %
磁気スポット型	総ウェル数の0.65倍個	60.3 %avg	92.7 %

図7 シリコン型と磁気スポット型の細胞収容比較

スクリーニングプロセスまでを一気に自動化させることも実現可能にしている。

また実際に臨床での応用を目指す場合、患者の負担をできるだけ軽くするために、採血量は極力減らさなければならない。一般的な検査用採血管の容量は約数 mL 程度で、概ね 10 mL 以下の採血量であり、臨床でも同等の採血量に抑制することが好ましい。この限られた少量の血液のなかに含まれる頻度の少ない細胞を効率よく回収するためには、チップへの細胞投入量に対してチップ上にトラップされる細胞の数ができるだけ同じになることが好ましい。つまり 100 % に近い細胞利用率が得られるような性能を有するチップが開発されることが目標となってくる。表1は従来のシリコン型マイクロウェルアレイチップと磁気スポットアレイチップ(マイクロウェル型)の比較データである。また図7は、実際に両者を比較したときの写真である。シリコン型マイクロウェルアレイチップはマイクロウェルへの収容率が低いため、ウェル数の4倍の細胞を播種している。また磁気スポットアレイチップはその効果を見込んでスポット数の0.65倍に減らした細胞数で播種した。シリコン型マイクロウェルアレイチップの方は、4倍の細胞濃度であるにもかかわらず1回の播種でのウェルへの収容率は50 % 程度である。よって、細胞の利用率は12 % 程度とふるわない。この結果から実際に実験などに利用するには、何度も細胞の播種と洗浄を繰り返し収容させていくことが求められる。一方、磁気スポットアレイチップの方は、ほぼ全数の細胞がトラップされており、シリコン型と比較して圧倒的な性能を有することがわかった。さらに ISAAC 法にも対応可能であることも実験によりわかっており、今後、シリコン型マイクロウェルアレイチップから磁気スポットアレイチップへシステムをシフトしていく予定である。この高い細胞利用率と ISAAC 法によって、抗体探索だけでなく様々な用途への応用へも展開していく可能性もある。例えば、がんの治療・診断、各種薬剤の薬理作用の解析、環境関連分野(環境ホルモンなど)などにも貢献できるものと期待される。

磁気スポットアレイチップの細胞利用率は、今後患者から取り出される少量の血液サンプルを評価するような事例で大きなアドバンテージとなる。テーラーメイド医療のように同じ病気であっても患者の状態は個々でばらばらであり、例えば同じインフルエンザであっても細かな変位によって抗原性

を変えて行ってしまうような場合、患者によって異なる免疫療法が必要となる。本チップは、感染症やガンなどに対して免疫機能を発揮する抗体を患者個人ごとにスクリーニングしてやることなどにより、個の医療を実現することが期待される。

7. まとめ

以上、筆者が開発してきたバイオチップとそのめっき技術導入による高機能化について簡単に述べた。めっき技術導入による利点は、本稿で指摘したところだけではなく、安価でバッチ処理が可能、設備も比較的簡単ですむことなど数多くある。また、めっき技術は、先端的なデバイスにおいてプラスアルファの要素として取り入れることで優れた機能をそれにもたすことがわかった。近年さかんに医工連携という言葉が叫ばれるようになり、電子技術や半導体技術のようなハイテク技術だけではなく、このような昔から親しまれてきた成膜技術をうまく取り入れていくことで、これまで接点の少なかった医療用アイテムの技術進歩を実現し、ひとの役に立つ技術としての発展が望まれる。

謝 辞

本研究に関して富山大学医学薬学研究部免疫学講座の村口篤教授、岸裕幸准教授、高見幸子氏、軟磁性膜開発に関して関東学院大学工学部物質生命科学科小岩研究室のご協力に深く感謝の意を表する。また、本研究は文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム「ほくりく健康創造クラスター」および日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究C(22510128)により行われた。ここに感謝の意を表する。

(Received August 30, 2011)

文 献

- 1) A.Jin, T.Ozawa, K.Tajiri, T.Obata, S.Kondo, K.Kinoshita, S.Kadowaki, K.Takahashi, H.Kishi, T.Sugiyama, A.Muraguchi ; *Nature Medicine*, **15**, 1088 (2009).
- 2) A.Jin, T.Ozawa, K.Tajiri, Z.Lin, T.Obata, I.Ishida, H.Kishi, A.Muraguchi ; *European Journal of Immunology*, **40**, 3591 (2010).
- 3) Z.Lin, A.Jin, T.Ozawa, K.Tajiri, T.Obata, I.Ishid, F.Jin, H.Kishi, A.Muraguchi ; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **395**, 251 (2010).
- 4) 廣瀬優紀, 福井航, 東森充, 多田陽建二郎, 金子真, 新井健生, 坂田泰史, 山本一博, 川原知洋, 山西陽子, 新井史人 ; 計測自動制御学会論文集, **47**, 221, (2011).
- 5) 小幡勤 ; 表面技術, **59**, 382 (2008).
- 6) 竹田拓史, 高梨博, 小幡勤, 小岩一郎 ; JPCA SHOW2011 アカデミックプラザ, AP-07 (2011).
- 7) K.Ino, M.Okochi, N.Konishi, M.Nakatochi, R.Imai, M.Shikida, A.Ito, H.Honda ; *Lab on a Chip*, **8**, 134 (2008).
- 8) H.Lee, Y.Liu, D.Ham, R.M. Westervelt ; *Lab on a Chip*, **7**, 331 (2007).
- 9) M.Tanase, E.J.Felton, D.S.Gray, A.Hultgren, C.S.Chen, D.H.Reich ; *Lab on a chip*, **5**, 598 (2005).
- 10) A.Jin, T.Ozawa, K.Tajiri, T.Obata, H.Kishi, A.Muraguchi ; *Nature protocols*, **6**, 668 (2011).
- 11) Y.Tokimitsu, H.Kishi, S.Kondo, R.Honda, K.Tajiri, K.Motoki, T.Ozawa, S.Kadowaki, T.Obata, S.Fujiki, C.Tateno, H.Takaishi, K.Chayama, K.Yoshizato, E.Tamiya, T.Sugiyama, A.Muraguchi ; *Cytometry Part A*, **71A**, 1003 (2007).