

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2008

課題番号：19681015

研究課題名（和文）

ダイナミックマイクロアレイによる一細胞の網羅的解析デバイス

研究課題名（英文）

A Device for quantitative, single cell analysis with dynamic microarray

研究代表者

竹内 昌治 (TAKEUCHI SHOJI)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：90343110

研究成果の概要：

本研究の目的は、我々がこれまでに発案したダイナミックマイクロアレイを利用して、細胞の網羅的な解析が可能なマイクロ流体システムを実現することである。

一万個レベルの細胞のアレイ化を実現するために、まずは、細胞サイズのビーズのアレイ化を検討した。さらに取り出しに細胞へのダメージを軽減させるためのデザインを検討した。これまでには、レーザーの照射によりバブルを発生させていたが、熱に拠るダメージが危惧されてきた。そのため、バブル発生源をサンプルから遠ざける機構を検討した。

また、ここでは、我々が考案したプロセスを用いて、アルギン酸カルシウムゲルによるマイクロビーズを作成し、サイズ調整、細胞の分散化などの条件を導き出し、効率的なカプセル化を行なった。これによって、細胞を均一直径のゲルビーズで囲むことによって、細胞自身の直径のばらつきを軽減でき、効率的にアレイ化することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2008 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目： ナノ・マイクロ科学；マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学システム、マイクロカプセル、細胞アレイ、MEMS、Lab on a Chip, microTAS, Dynamic microarray, マイクロ流体デバイス、細胞のカプセル化、Cell encapsulation

1. 研究開始当初の背景

ゲノム配列が解明され、その配列の意味を理解するポストゲノムが発展し、一つ一つのタンパク質の機能が明らかになってきた。最近では、これら個々のタンパク質がどのようなネットワークで機能しているのか網羅的に調べる研究アプローチが盛んに行なわ

れている。この際、少量の薬品で、大量に実験が行なえること、また最後に大量のサンプルの中から一つ一つ取り出し、PCR による DNA の増幅・配列読み取りや、タンパク質の機能解析、細胞の培養などのポストプロセスができることが重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々がこれまでに発案したダイナミックマイクロアレイを利用して、細胞の網羅的な解析が可能なマイクロ流体システムを実現することである。

3. 研究の方法

本研究は、申請者の個人研究であるが、必要に応じて、研究協力者（生物学者や化学者）に協力を依頼できる体制で行なった。

一万個レベルの細胞のアレイ化を実現するために、まずは、細胞サイズのビーズのアレイ化を検討した。さらに取り出しに細胞へのダメージを軽減させるためのデザインを検討した。これまでは、レーザーの照射によりバブルを発生させていたが、熱に拠るダメージが危惧されてきた。そのため、バブル発生源をサンプルから遠ざける機構を検討した。

接着細胞でも、ゲルでカプセル化すれば、細胞はゲルに"接着"していると錯覚し、浮遊化してビーズのように扱うことができる。細胞のカプセル化には人工イクラなどの主材料である生体適合性の高いアルギン酸カルシウムゲルが一般的に用いられている。ここでは、我々が考案したプロセスを用いて、アルギン酸カルシウムゲルによるマイクロビーズを作成し、サイズ調整、細胞の分散化などの条件を導き出し、効率的なカプセル化を行なった。これによって、ゲルのポアサイズなどを調整すれば、薬剤を選択的に通過させることも可能となる。また、均一直径のゲルビーズで囲むことによって、細胞自身の直径のばらつきを軽減でき、効率的にアレイ化できる。

4. 研究成果

(1) ここでは、一万個レベルの細胞のアレイ化を実現するために、まずは、細胞サイズのビーズのアレイ化を検討した。図1に示すように、マイクロ流体デバイスを利用することで実際に細胞をカプセル化することにより、細胞が壊死せずに、培養できるかなどを評価した。また、これらのカプセルを利用した実用性を検討するために、実際にデバイスに導入し、アレイ化する実験を行なった。そ

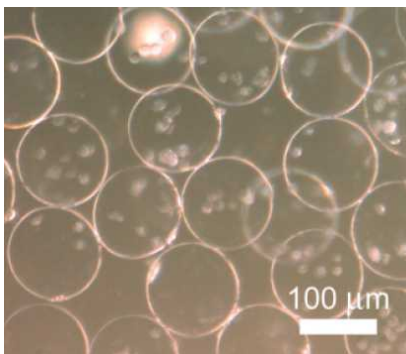


図1：均一直径アルギン酸ゲルビーズによりカプセル化された細胞

の結果、アルギン酸ハイドロゲルに内包された細胞が、ダイナミックマイクロアレイ中に

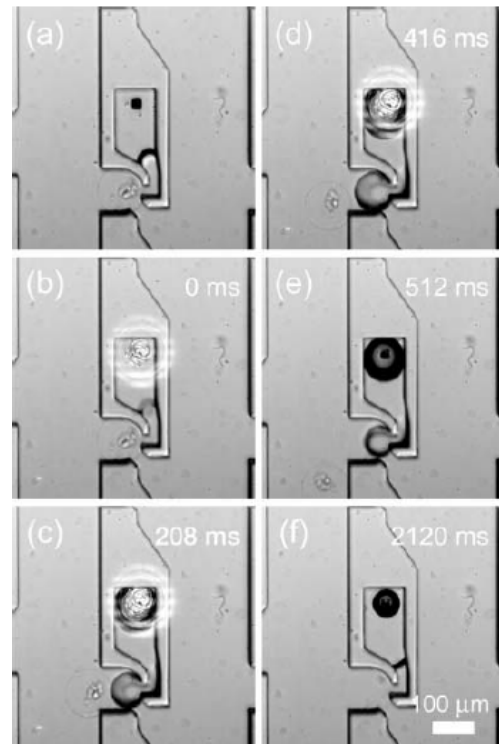


図2：レーザーによる発熱のダメージを軽減させたダイナミックマイクロアレイの機構。レーザー源をビーズから離し、バブル発生近辺には沸点の低い液体を利用した。これにより、図1で作成したアルギン酸ゲルビーズ内の細胞を活かしたままビーズを回収することができた。

トラップされ、効率よくアレイ化できることがわかった。さらに、簡便な生死判定試薬を導入し、これらの細胞が生きていることを確認した。

(2) 次に、これらの細胞ビーズを利用した実験を効率的に実施するためのダイナミックマイクロアレイの検討をおこなった。これまで、レーザーの照射によりバブルを発生させていたが、熱に拠るダメージが危惧されてきた。そこで、ここでは、図2のように、バブル発生源をサンプルから遠ざける機構を検討し、取り出しに細胞へのダメージを軽減させるための流路デザインを考案した。その結果、レーザーによるバブル発生によって細胞ゲルビーズを取り出すことにも成功した。

以上の結果から、細胞研究に利用するためのダイナミックマイクロアレイの要素技術が確立されたと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. Y. Morimoto, W. H. Tan, and S. Takeuchi:

- Monodisperse semi-permeable microcapsules for continuous observation of cells, Lab on a Chip, online.
2. Y. Morimoto, W. H. Tan, and S. Takeuchi: Three-Dimensional Axisymmetric Flow-Focusing Device using Stereolithography, Biomedical Microdevices, vol. 11, no. 2, pp. 369-377, 2009
 3. H. Onoe, and S. Takeuchi: Microfabricated Mobile Microplates for Handling Single Adherent Cells, Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 18. p. 095003(7pp), 2008
 4. D. Collard, S. Takeuchi, H. Fujita: MEMS technology for nano-bio research, Drug Discovery Today, vol. 13, no. 21-22, pp. 989-996, 2008.
 5. W-H. Tan and Shoji Takeuchi: Dynamic microarray system with gentle retrieval mechanism for cell encapsulating hydrogel beads, Lab on a Chip vol. 7, pp. 259 - 266, 2008.
 6. 竹内昌治: マイクロ流体デバイスを用いたナノバイオ研究、電気学会誌 C 部門誌、vol. 129, pp. 208-212, 2009
- [学会発表] (計 29 件)
1. Y. Tsuda, Y. Morimoto and S. Takeuchi: Mobile micro-tissues in monodisperse 3D cell culture beads, IUMRS-ICA 2008, p.KP-4, 2008.
 2. Y. Tsuda, M. Negishi-Kato and S. Takeuchi: Size-controlled islet-cell spheroids for geometric analysis of insulin secretion, MEMS2009, pp. 432-426, 2008
 3. K. Iwai and S. Takeuchi: A Dynamic Microarray with Pneumatic Valves for Selective Trapping and Releasing of Microbeads, MEMS2009, pp. 371-374, 2008
 4. Hirotaka Ishihara, Kuribayashi Kaori and Shoji Takeuchi: Arraying Single Adherent Cells by Microplate Self-Assembly, MEMS2009, 367 - 370, 2008
 5. Y. Tsuda, Y. Morimoto and S. Takeuchi: 3D cell culture using monodisperse peptide hydrogel beads, microTAS2008, pp. 1799-1801, 2008
 6. Y. Morimoto, K. Kaori and S. Takeuchi: Formation of Monodisperse Microsized-Emulsions using an Axisymmetric Flow-Focusing Device Fabricated by Photolithography and Stereolithography, microTAS2008, pp. 1015-1017, 2008
 7. Y. Tsuda, Y. Morimoto and S. Takeuchi: 3D cell culture using monodisperse peptide hydrogel beads, microTAS2008, pp. 1799-1801, 2008
 8. K. Iwai, N. Misawa, and S. Takeuchi: Dynamic Microfluidic Devices with Nanochannels for the Array of 1Micron-Sized Objects, microTAS2008, pp. 474-476, 2008
 9. Yuya Morimoto, Wei-Heong Tan, Shoji Takeuchi: "Housing" for Cells in Monodisperse Microcages, MEMS2008, pp.304-307, 2008
 10. Kosuke Iwai, Wei-Heong Tan, and Shoji Takeuchi: A Resettable Dynamic Microfluidic Device, MEMS2008, pp.649-652, 2008
 11. Hiroaki Onoe, and Shoji Takeuchi: Assembly of Single Adhesion Cells on Mobile Microplates, MEMS2008, pp.300-303, 2008
 12. Hajime Nakamura, Kaori Kuribayashi, Hiroaki Onoe and Shoji Takeuchi: Eukaryotic Flagella as Motile Tools for Microfluidic Devices, microTAS2007, pp. 1222-1224, 2007
 13. A. Adachi, Y. Morimoto, Y. Tsuda and S. Takeuchi: Encapsulation of biomaterials in semi-permeable membrane, The 25th SENSOR SYMPOSIUM, pp.399-402, 2008.
 14. Y. Morimoto, K. Kaori and S. Takeuchi: Formation of Monodisperse Microsized-Emulsions using an Axisymmetric Flow-Focusing Device Fabricated by Photolithography and Stereolithography, The 25th SENSOR SYMPOSIUM, pp.617-620, 2008.
 15. Hirotaka Ishihara, Kosuke Iwai and Shoji Takeuchi: A Resettable Dynamic Micro Array, Proceedings of The 25th Sensor Symposium, pp. 625-628, 2008.
 16. Y. Morimoto and S. Takeuchi: Formation of Monodisperse Hydrogel Membrane Capsules for Cell Encapsulation, 第 46 回生物物理, p.S73, 2008.
 17. 安達亜希, 森本雄矢, 竹内昌治: 均一直径半透膜マイクロカプセルの生化学実験応用, 生物物理第 46 回年会, p.S73, 2008.
 18. 岩井孝介, 三澤宣雄, 竹内昌治: 大腸菌アレイ: ナノ流路を有するマイクロ流体デバイス, 第 46 回日本生物物理学会年会, p.70 (講演番号: 1P-311), 2008.
 19. 石原 宏尚, 栗林 香織, 竹内 昌治: マイクロプレートを用いた接着細胞のハンドリング, 第 46 回日本生物物理学会, p.S73, 2008.
 20. 安達亜希, 森本雄矢, 竹内昌治: 半透膜カプセルで生体材料を包む, 「細胞を創る」研究会 1.0, p.59, 2008.
 21. 津田行子, 森本雄矢, 竹内昌治: 三次元ヘテロ組織化へむけた均一直径細胞ビーズの調製, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, p.170, 2008.
 22. 津田行子, 森本雄矢, 竹内昌治: 三次元ヘテロ組織化へむけた均一直径細胞ビーズの調製, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, p.170, 2008.
 23. Y. Tsuda, Y. Morimoto and S. Takeuchi: Microfluidic Technology for Tissue

- Engineering , The 15th international display workshops , vol.2 , pp.1307-1310 , 2008 .
24. Y. Tsuda, Y. Morimoto and S. Takeuchi : Mobile micro-tissues in monodisperse 3D cell culture beads , IUMRS-ICA 2008 , p.KP-4 , 2008 .
 25. 森本雄矢, 竹内昌治 : 溶液交換可能な半透膜マイクロカプセル, 膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス , p.15 , 2008 .
 26. Wei-Heong Tan, Yuya Morimoto and Shoji Takeuchi , "細胞の網羅的解析のためのダイナミックマイクロアレイ", 「細胞を創る」研究会 0.0, pp. 15, 2007.
 27. 森本雄矢, 陳偉雄, 竹内昌治 , "3次元マイクロ流路を用いた微生物の均一径ハイドロゲルカプセル化", 第45回日本生物物理学会年会, pp. s100, 2007.
 28. 岩井 孝介, Wei-Heong Tan, 竹内 昌治 , "細胞解析の為にトラップ及びリリース機構を有するマイクロ流路デバイス (Trap-and-release Microfluidic Device For The Analysis of Cells)", 第45回日本生物物理学会年会, pp. s101, 2007.
 29. Yuya Morimoto, Wei-Heong Tan and Shoji Takeuchi , "Formation of Monodisperse Hydrogel Capsules using Three-Dimensional Microfluidic Channel", 第24回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, pp. 325-328, 2007.

〔図書〕(計1件)

竹内昌治 : 生体材料を利用したバイオハイブリッドプロセス, pp. 473-478, MEMS/NEMS工学全集, テクノシステム, 2009

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 昌治 (TAKEUCHI SHOJI)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号 : 90343110

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし