

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20360094

研究課題名 (和文) 電気融合による生体内への耐凍結・乾燥物質の高速高効率導入バイオチップの開発

研究課題名 (英文) Development of the high performance electrofusion device for loading lyo-, cryoprotective agents in vivo

研究代表者

白樫 了 (SHIRAKASHI RYO)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：80292754

研究成果の概要 (和文)：乾燥や極低温状態で細胞を損傷なく長期間保存する為に有効な耐凍結・乾燥保護物質を効率よく細胞内に導入する技術として、細胞と保護物質を内包したリポソームの電気融合に着目し、融合を高効率に行うためのデバイスの開発と高効率融合に必要な電気操作のパラメータの最適化をおこなった。

研究成果の概要 (英文)：The electrofusion of a mammalian cell and a giant unilamellar vesicle encapsulating lyo-, cryoprotectants has been investigated. In this study, a prototype of electrofusion device allowing the fusion one-on-one pair of cell and GUV has been proposed. In addition, the designing method of electrofusion process by calculating the electric field and membrane potential during electrofusion has been developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生体熱工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：バイオチップ，電気融合，細胞電気物性

1. 研究開始当初の背景

ある種の糖類は細胞内に比較的低濃度で存在することで細胞膜やタンパク質を凍害や乾燥から保護することが知られており、毒性も全くないことから凍害防御剤や凍結乾燥の添加剤、食品の保存剤としての利用が広まりつつある。典型的な研究例として、低温保存が極めて困難である為、5日程度で破棄してい

た血小板細胞が、糖類を導入して凍結乾燥することで1年近く保存できることが実験的に証明され、米国の赤十字等が精力的に研究を進めはじめている。

しかしながら、この種の糖類は細胞膜を透過しないため、低侵襲で高効率大量に細胞内に輸送する手法が技術上のハードルとなっており、非侵襲で効率が高い手法の開発が望ま

れている。電気融合による同手法は、1細胞ごとの操作ではなく、大量の細胞に対して適応できるメリットがあるものの、より実用的な導入速度にするためには、細胞スケールの操作をシステムティックにおこなう必要があることから、一連の融合操作を半自動的におこなう為のバイオチップの開発を着想するに至った。

2. 研究の目的

申請研究では、平成19年度までの研究を実用レベルにまで上げるため、高分子を内包した巨大リポソーム(GUV)を細胞と電気融合するまでの一連のプロセスを自動的に実現するバイオチップを開発する。即ち、細胞・GUVの電気操作と支持液の流れを操作することにより、別々にバイオチップに供給された細胞と高分子(糖類)を内包したGUVを高効率で間欠的に融合をするシステムを構築する。また、いままでの申請者が得た知見と作製したバイオチップによる実験を通じて、電極配置と電場印加パターン、支持液の交換操作を設計するに十分な電気融合の解析モデルを提案する。さらに、時間的余裕があれば、融合細胞の凍結挙動や、融合した細胞中の糖類濃度の実測、細胞増殖能力の測定、酸素代謝測定などをすることで融合細胞の健全性を評価する。

3. 研究の方法

(1)細胞、巨大単膜リポソーム(GUV)の供給-接触配列-融合-配列の一連の操作を可能にするチップの設計と作製

電気融合は、融合する細胞-GUVを1対1で電極間に配列させた後に、電極間にパルス電場を印加する操作を行うことで開始する。提案したチップは、前半の細胞配列も誘電泳動で行う機構をとったので、細胞の誘電泳動による配列の調査が重要となる。そこで、細胞-細胞対を実現する電極間隔をワイヤー電極の間隔を変えて調べ、その結果にもとづき、GUVと細胞を独立して電極間に供給できる配置と流路構造をもつ2種類のデバイスの設計と試作をおこなった。

図1に示す楕円電極をもつチップは、1本の流路の両側壁に楕歯状に配列し、この流路から分岐した枝路よりGUVと細胞を別々に供給して、楕歯電極間に並べる構造となっている。図2に示す柱構造が向かい合って電極を成すチップは、柱構造の裏側(位置Hexa-1, -2)よりGUVと細胞を供給し、電気泳動により柱間をすり抜けて向かい合った金属柱の間で配列をつくる構造となっている。前者のチップは、マイクロエンボス加工にてポリカーボネイトを基板として研究室で作製し、後者は構造が複雑であることからガラスを基板として、MEMSファンダリーに外注して作製した。

(2)細胞-GUV融合率の測定、融合後の細胞の浸透圧応答機能の評価

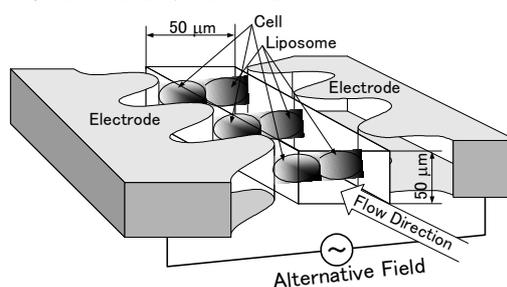


図1 楕円電極チップ概要

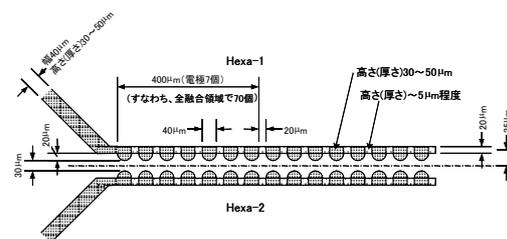


図2 柱状電極チップ上面図

細胞(ヒトTリンパ細胞:Jurkat cell line)とGUV(L- α -Phosphatidylcholine)が電気融合する電場の電界強度とパルス長さの条件を、直径100 μ m、電極間距離100 μ mのワイヤー電極を用いて測定した。融合率の測定では、統計の母集団の数を増やす為、約50cmのワイヤー電極対を螺旋状にプラスチック円柱に巻き、円筒容器に入れたGUVと細胞の混合懸濁液につけて電場を印加した。融合率は、(融合した細胞の数/電場印加前の細胞の数)より算出した。測定では、電界強度1-3kV/cm、パルス長さ25-100 \cdot secの電場を印加した。

電気融合では、細胞とGUVは浸透圧100mOsmol/kg程度の水溶液に懸濁されているので、融合後に生理的浸透圧300mOsmol/kgに再懸濁した時の融合細胞の大きさの変化を測ることで、膜の浸透圧応答の健全性を評価した。

(3)電気融合現象の解析モデルの構築

電気融合は、細胞やGUV等の融合対象や懸濁液の電気物性、印加電場と融合対象の配置、印加電場の条件(強度、パルス長さ)といった操作パラメータを、融合率が高くなる様に設計する必要があることから、実験結果と整合性のある電気物性の測定と電場解析法を確立することが、この技術を発展させる上で重要である。

細胞とGUVを2対の直交した電極間におき、位相が90度ずれた種々の周波数を印加するElectrorotation法により、細胞とGUVの電気物性を測定した。本手法は、回転電場を測

定対象に印加したとき、対象の回転速度とその回転周波数のスペクトルが対象の電気物性で可変誘電緩和時間に依存することを利用して、回転スペクトルより電気物性を算出する手法である。本研究では、電気融合の懸濁液と同じ組成の水溶液中の細胞とGUVの電気物性を測定した。

電気融合では、細胞やGUVは様々な形状に変形・配列し、印加電場も電極の形状と配置に依存する上に過渡的に変化するので、電場解析手法として非構造格子を用いた非定常解析法が必要となる。本研究では、有限要素法(FEM)による電場解析を用いて、まず、測定した電気物性と解析結果の間の整合性を、球形の単一細胞やGUVについてステップ電場応答を計算して、測定された回転スペクトルから算出できるステップ電場応答と比較することで、手法の妥当性を検証した。

電気融合の電場解析では、2)と同じ形状のワイヤー電極間で配列した細胞-GUVの顕微鏡観察画像より抽出した細胞-GUVの形状にもとづき、FEMによる非定常電場をおこなった。計算にあたっては、測定した細胞やGUVの電気物性を用い、ステップパルス電場に対する膜電位分布の時間変化を数 msec まで計算した。これらを融合率の測定結果と比較して、印加電場条件と電気融合、膜電位の関係を調べた。

4. 研究成果

(1)細胞、巨大単膜リポソーム(GUV)の供給-接触配列-融合-配列の一連の操作を可能にするチップの設計と作製

直径 100-80・ μm の Ni またはステンレス製のワイヤー電極間に Jurkat 細胞の 1 対 1 のペアができる間隔を実験的に調査し、隙間が約 30-40・ μm が適当であることがわかった(図 3)。

櫛形電極をもつチップは、電極間に停滞が困難で、細胞の流路外への流出があり(図 4)、チップの形状としては不適当と判断された。

柱状電極をもつチップは、外注で 30 個作製したものの、ほとんどのチップについて図 5 のように電極の破損、導電性の喪失がみられ、歩留まりが非常に低い。また、電極が脆弱で洗浄・密封操作により容易に破損した。破損がないチップについて、開放状態で誘電電気泳動を行ったところ、電極の隙間から細胞が侵入して、電極間で 1 対または 3 つの細胞の配列が形成された(図 6)。また、電圧を上げることで細胞融合が起きたことから(図 7)、チップの形状としては当初の目的を満足する可能性が高いことが示唆された。ただし、機械的強度が非常に脆弱なことから、構造の改善か、製作上の工夫が必要と思われる。

(2)細胞-GUV 融合確率の測定、融合後の細胞の浸透圧応答機能の評価

ワイヤー電極をもちいて、細胞-GUV の融合確率を計測し、図 8 の結果がえられた。最大で約 20%以上の融合率を実現する電場印加条件(電場強度 kV/cm 、パルス長・sec)を見いだした。

融合した GUV を生理的浸透圧に再懸濁する

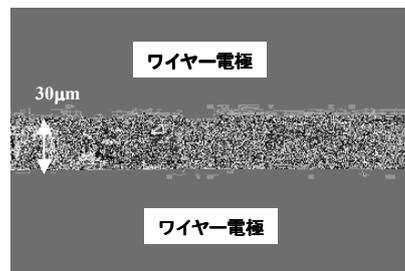


図 3 ワイヤー電極間に配列した細胞対

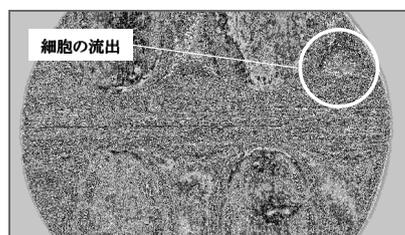


図 4 櫛形電極チップに挿入した細胞

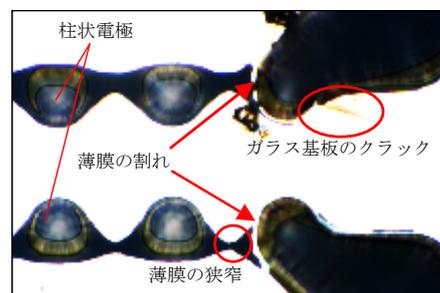


図 5 柱状電極チップの欠損状態

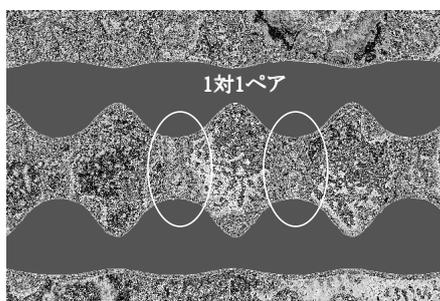


図 6 柱状電極チップの電極(黒い部分)間に配列した細胞対(印加交流電圧, 1MHz, 10V)

と、融合細胞の体積が約 1/3 に収縮したことから、浸透圧に対する膜の透過性は維持されており膜に損傷は存在しないことが確認され

た。

(3) 電気融合現象の解析モデルの構築

表 1 に示す細胞と GUV の電気物性が electrorotation の回転スペクトルより算出された。この値を用いて、単一の細胞や GUV の電場と膜電位のステップパルス応答を FEM により電場解析した結果が、回転スペクトルより電気物性を算出した双極子理論と一致した。この結果より、配列・大変形をした GUV-細胞対に対して、測定された電位物性を用いた FEM 電場解析が可能となった。(発表論文：白樫, 機論 B, 74-743(2008) 参照)

電気融合実験(2)と同じ直径-間隔のワイヤ電極で顕微鏡撮影された GUV-細胞対の形状に基づき、測定した電気物性をもちいて FEM 電場解析を行い、(2)で測定された膜融合確率と比較した結果、電気融合に必要な膜電位の条件が明らかになった。即ち、膜融合では、GUV と細胞の接触した膜全体が同時に絶縁破壊をおこし、他の部分の膜では絶縁破壊が起きないことが必要であること、接触部の不可逆的な絶縁破壊膜電位は、約 3V リン脂質膜 1 層分では 1.5V 程度となり、電気穿孔に必要な膜電位(1層で 1V)とほぼ同じか、やや高い絶縁破壊膜電位であることがわかった。以上より、融合に必要なパルス電場の電界強度とパルス長さの関係が図 9 のようになることが推定された。(発表論文：白樫, 機論 B (No. 2011-JBR-0076, (2011)参照)

以上の成果は、従来は対象毎に経験的に決めていた、細胞や GUV の融合を行う際の電場操作条件の推定について、対象の電気物性測定から解析手法までの手法と理論を明確にした点で、学術的意義があると思われる。また、電気融合に必要な膜電位分布の条件等も明らかになり、電極の形状の設計等の技術的發展に対する寄与も認められる。

本研究全体を通じて、当初の目的のうち、電気融合の理論解析と設計手法の開発は実現できたものの、電気融合チップの実現までに至らなかった。この種の電気融合チップは世界的に開発が行われており、研究期間中に1

表 1 Jurkat 細胞と GUV の電気物性 (100mOsmol/kg-Solbitol 懸濁液, R_0 :半径, σ_{in} :内部導電率, ϵ_{in} :内部誘電率, c_m :膜静電容量, σ_{ex} :懸濁液導電率, N:測定サンプル数)

	GUV	Jurkat
$R_0, \mu\text{m}$	5.8 ± 1	11.6 ± 1
σ_{in}	0.79 ± 0.28	3.0 ± 0.8
ϵ_{in}/ϵ_0	89 ± 46	114 ± 25
$\mu\text{F}/\text{cm}^2$	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.07
σ_{ex}	62	72
N	6	11

対1の配列を高確率で実現し、これまでの融

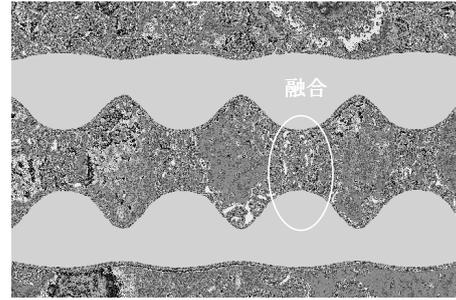


図 7 柱状電極チップにより融合した細胞対 (印加電圧 1MHz, 14V)

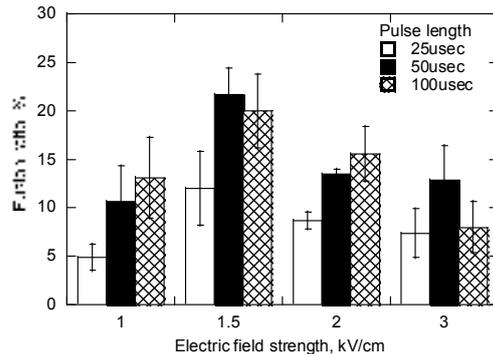


図 8 印加電場強度とパルス長さに対する Jurkat 細胞と GUV の融合率

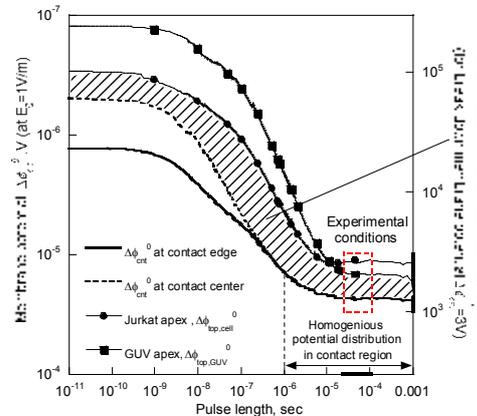


図 9 膜の絶縁破壊を 3V とした時の融合に必要な電場強度(右縦軸)とパルス長さ(横軸)(斜線内が融合可能範囲. 図中の赤枠は実験条件を示す.)

合率を大きく上回る高性能の電気融合チップが海外のグループ (Skelley, A. M., et. al., Nature Methods, Vol.6(2), (2009), p.147 より発表されている)。このグループで開発した電気融合チップは、高精度のMEMS加工技術や、複雑な流体操作を必要としており、使い勝手にやや難点があるので、多少の改良を加えることで、より使いやすい簡便なチップ

の開発ができるものと考えられる。本研究で提案したチップは、細胞の配列操作がほとんど電場の操作のみで行えるので、この難点を克服できると期待できるが、製作技術の問題点を解決するか、製作技術にあわせた構造の改善が必要と思われる。

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3件)

① 白樫 了, Randolph Reuss, Alexander Schulz, Vladimir L. Sukhorukov, Ulrich Zimmermann, 巨大単膜リポソーム-Jurkat 細胞の電気融合に及ぼす電場の影響 (パルス電場印加による巨大単膜リポソーム-Jurkat 細胞対の電場・膜電位解析と融合率の測定), 日本機械学会論文集 (B編), Vol. **77** (777), (2011), pp.1269-1278. (査読有)

② Ryo Shirakashi, Randolph Reuss, Alexander Schulz, Vladimir L. Sukhorukov, and Ulrich Zimmermann, Evaluation of FEM Electric Field Analysis Using the Electric Properties of Giant Unilamellar Vesicles (GUV) and Jurkat Cells Measured by Electrorotation Spectroscopy : Introduction of Cryo and Lyoprotectants by Electrofusion of GUVs and Living Cells, Heat Transfer Asian Research, Vol. **38** (3) (2009), pp.168-182. (査読有)

③ 白樫 了, Randolph Reuss, Alexander Schulz, Vladimir L. Sukhorukov, Ulrich Zimmermann, GUV, Jurkat 細胞の電気物性測定と有限要素法による電場解析モデルの検証 (GUV-細胞の電気融合による凍結・乾燥保護物質の高効率導入に関する研究), 日本機械学会論文集 (B編) 74 巻 743 号 (2008), 1625-1632. (査読有)

[学会発表] (計3件)

① 白樫 了, 細胞-リポソームの電気融合における電場解析, 熱工学コンファレンス 2010 2010. 10. 31, 長岡技術科学大学

② 白樫 了, トレハロースと細胞凍結・乾燥保存, 第 13 回トレハロースシンポジウム 2009 2009. 11. 09, 東京ビッグサイト

③ R. Shirakashi, Calculation of Cellular Membrane potential by FEM Electric Field Analysis using Cellular Electric Properties from Electrorotation Spectroscopy, 2nd International Forum on Heat Transfer, 2008. 11. 17, The University

of Tokyo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白樫 了 (SHIRAKASHI RYO)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号: 80292754

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高野 清 (KIYOSHI TAKANO)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号: 60302626