

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23246045

研究課題名(和文)細胞内物質導入の基礎研究

研究課題名(英文)A study of transporting molecules into cell

研究代表者

小寺 秀俊 (Kotera, Hideyoshi)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20252471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,100,000円

研究成果の概要(和文)：エレクトロポレーションによる核内への物質導入原理に関して、P垂直壁に設けた数マイクロンの孔に細胞を吸着し、Q-dotを導入することで、基本原理の検討を行った。また、マイクロデバイス上でエレクトロポレーションを行うと同時に電気泳動により外来プラスミドを核に送達する原理に関する研究を行い、そのシステムを開発した。このデバイスと導入原理を用いて、体細胞に4つの山中因子を導入し、細胞の初期化が実現した。この遺伝子直接送達法は、タイミングを正確に制御して即時にかつ目的とする1細胞に対して遺伝子を導入できるという特徴があり、今後の細胞のリプログラミングや分化制御の研究に役立つ物と期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel gene delivery system based on on-chip electroporation, where plasmids are directly transported into the nucleus by electrophoresis. The basic concept is examined by micro orifice fabricated on vertical PDMS wall with quantum dot and FEM simulation. The cells are cultured on micro-orifices and placed between electrodes, to which a electric pulse was applied in a DMEM medium containing GFP plasmids. Most cells showed GFP expression after pulsation, suggesting that the plasmid was directly fed into the cell nucleus. Then we applied the system to produce iPS cells. After introduction of Yamanaka factors, cells were cultured on the orifice for three weeks after electroporation, and then reprogramming of nucleus was checked. The fact that the plasmids are instantaneously transported directly into nucleus of selected cells, with precisely controllable timing, suggests that the method will find its applications in re-programming or differentiation control studies.

研究分野：バイオナノテクノロジー

キーワード：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス 微細加工 細胞融合 初期化 再生医療 静電気 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

エレクトロポレーション法は細胞への物質導入として広く使われる方法である。しかしながら、通常のエレクトロポレーション法は、数百ボルトの電圧を加えることから細胞自体がダメージを受けて生存率が低く、導入の収率も低いという問題があった。

我々は、この導入収率が低い原因が、「細胞懸濁液にパルス電圧を印加した時に膜に誘導される電圧が細胞の粒径に依存するため、細胞懸濁液中の粒径分布を持つ細胞に適用した場合、小さい細胞は膜電圧が低いため何の影響も受けず、大きい細胞は過度の膜電圧が生じて死滅してしまい、結果としてある範囲の粒径を持つ細胞に対してのみエレクトロポレーションが生ずる」ことに原因があることを突き止めた。また、この事実に基づき、次のようなマイクロデバイスを考案した。すなわち、細胞径より小さいマイクロオリフィスを持つ絶縁性シート上に細胞を付着培養あるいは吸引固定し、その両側においた電極に電圧を印加する。このような構造の作る電位降下は、ほとんどオリフィス周囲のみ生ずるので、電極に印加した電圧が、細胞の粒径によらず、そのままオリフィス部分の細胞膜に印加されることになる。従って、数Vという低印加電圧で、細胞径に依らない細胞膜の穿孔が可能で、それを通して拡散により物質を導入するか、さらに、直流電界を重畳することで、プラスミドDNA等の荷電粒子を電気泳動により細胞内へ導入することが実現される。申請者らは、このデバイスを用いてこれまで、Hela細胞やMin6細胞等の浮遊系細胞や接着性細胞への物質導入を行ってきた。エレクトロポレーションは、これまで、単なる手法として使われることが多く、これを実現するデバイス等の研究事例も本研究グループ以外にも見られるが、いずれにおいても、結果としての物質導入の成否のみを評価の対象としており、エレクトロポレーション時の細胞膜の挙動・膜穿孔を通しての分子移動・細胞内でのローカライゼーション・プラスミドの核への到達など、そのメカニズムに関する研究はほとんど行われていないのが現状である。

一方、近年においては、iPS細胞の作製やiPS/ES細胞の分化制御、形質転換等、細胞内に物質導入を行って細胞機能の制御を行う研究が進展している。これらの研究においては、細胞周期中の適切なタイミングで物質を細胞内の適切な場所に導入し、その経時変化を1細胞レベルで追跡する必要がある。このような研究のツールとしては、申請者らのオンチップエレクトロポレーションデバイスが強力な手段となり得る。

2. 研究の目的

本研究は、エレクトロポレーション時の細胞膜挙動・穿孔された膜を横切る物質移動・物質の細胞内での移動等を、1分子観察等の実験的手段を用いて解明し、さらに、プラスミドを細胞核に効率的に導入するなど、細胞内でのローカライゼーションを制御する方法を開発するとともに、導入物質の発現やそれによる細胞機能の変化等の挙動を1細胞レベルでトレースする技術を開発し、エレクトロポレーションの生物学的メカニズムを明らかにする。同時に、これらの知見に基づいた効率よいエレクトロポレーションデバイスを構築し、これを用いて細胞の初期化時・分化時の細胞内分子挙動と分子ローカライゼーションの研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではまず、オリフィスによる集中電場が細胞核への分子輸送に与える影響を定量的に評価することを目的

とした。細胞核膜孔に対して分子透過性を持たない量子ドットを導入分子として用いて電気穿孔をおこなった。細胞核内部と細胞質の蛍光分布から細胞核への導入率を測定し、電圧や細胞とオリフィスの位置関係から細胞核の膜透過性の向上に重要なパラメータについて考察した。また、マイクロ穴に固定した細胞に対して初期化実験を行うとともに、ヒトiPS細胞の細胞培養へ展開を図った。

4. 研究成果

4.1 細胞核の膜透過性の向上に関する研究成果

図1にマイクロ流体デバイスにおける電気穿孔の概要図を示す。本デバイスはオリフィスで接続された二本の流路から構成されている。オリフィスは直径数 μm の大きさで、吸引によって単体の細胞を固定できる。各流路のウェルにはAg/AgCl製のワイヤ電極が挿入されている。電極間に電圧を印加することでオリフィスに電場が集中し、固定した細胞膜に膜電位を与えることができる。細胞はヒト由来の子宮頸がん細胞株HeLa S3を用いた。

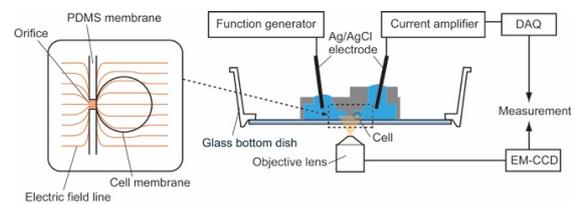


図1 マイクロ流体デバイスにおける電気穿孔の概要

4.1.1 細胞膜の電気穿孔

本デバイスで電圧印加による膜穿孔の形成を実験的に確認した。細胞懸濁液には予めcalcein-AM (life technologies, C3099) を1 μM の濃度で混合した。Calcein-AMは細胞膜に対して膜透過性を持ち、細胞質に入ることによって緑色蛍光(517 nm)を持つcalceinへと変化する。Calceinは膜透過性を失っているため、細胞内部に溜まり増加することで、細胞全体が強い緑色の蛍光を発する。この性質は細胞膜が破損している死細胞では起こらないため、通常calcein-AMは細胞の生死判定に用いられる。本実験では、このcalceinの性質を利用して、細胞の輝度値変化から細胞膜上の穿孔の形成を評価した。図2はオリフィスに固定した細胞の明視野画像、及び蛍光画像である。細胞固定の後、電極間に+1 ~ +5 V, 500 msの電圧を印加し、電圧印加時における蛍光輝度値の変化を測定した。

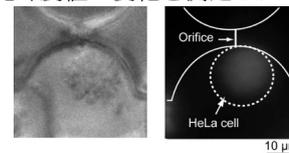


図2 Fluorescence image of cell immobilized on orifice
細胞核膜の分子透過性についての考察

細胞懸濁液に量子ドット (Invitrogen, Qdot525 Carboxyl Quantum Dots, Q21341MP) を8 nM, ethidium homodimer

(Invitrogen, E1169) を50 nM混合して電気穿孔を行った。量子ドットおよびEthidium homodimerは、共に細胞膜に対する透過性を示さないため、両者が細胞内に導入された場合は、電気穿孔による細胞膜の分子透過性上昇を意味する。なお、ethidium homodimerの拡散係数は $152 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と推算され、Stokes-Einsteinの法則に基づいて等価直径を算出すると3.43 nmと得られた。一方で量子ドットは拡散係数の計測値 $40.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ より等価直径13.0 nmと算出された。HeLa細胞の核膜孔の大きさは4.0 nmと報告されており、ethidium homodimerは拡散により核内に輸送される可能性があるが、量子ドットは核膜の分子透過性が上昇しない限り核内へ導入されないと考えられる。Ethidium homodimerは細胞

核内のDNAと結合することで強い赤色蛍光 (617 nm) を発するため、細胞核の標識として用いた。デバイスには+1 ~ +10 V, 500 msの電圧を印加した。図3に電圧印加されたオリフィス上の細胞の蛍光画像を示す。写真は左から順にデバイス底面より5 μm , 10 μm および15 μm の位置で撮影した共焦点蛍光像を示している。図中の白線でオリフィス周辺のデバイス概形および細胞膜の位置を示した。

Ethidium homodimerの蛍光画像からは細胞内部において蛍光が確認でき、電圧印加によって細胞膜に穿孔が形成されたことがわかる。また、量子ドットが細胞質内及び細胞核内に分布していることが確認できる。この結果から、電気穿孔によって核膜の分子透過性が上昇した可能性が示された。

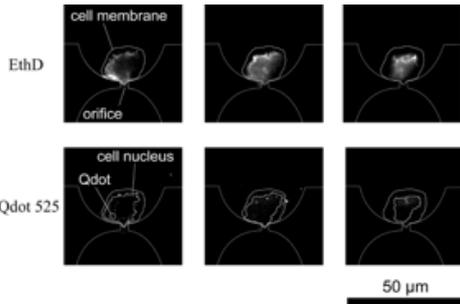


図3 Fluorescence image of EthD and Qdo

本デバイスにおいてethidium homodimer, 量子ドットの混合溶液中において電気穿孔を実施したところ、細胞核内部において両分子の蛍光分布が確認された。量子ドットは細胞核に対して膜透過性を持たないため、電圧印加によって細胞核の分子透過性が向上したと考えられる。また、バルクの電気穿孔法では細胞の核内部に量子ドットの蛍光はほとんど見られなかった。そのため、この核膜の分子透過性の向上はオリフィスによる集中電場によって引き起こされたものと考えられる。また細胞の位置関係と細胞核への量子ドットの導入率を比較したところ、オリフィスと細胞核膜間の距離と導入率に負の相関関係が見られ、この距離が細胞核への分子の直接導入にとって重要なパラメータであることが明らかとなった。

4.2 オリフィスシートによる細胞へのプラスミドの導入研究

一般に、プラスミドベクターを用いた遺伝子導入の収率の低さは、細胞内への取り込み・核到達の不確実さ、細胞質内の核酸分解酵素やpHの変化によるプラスミドの分解が原因していると考えられている。従って、プラスミドを核内に直接送達することができれば、高収率な遺伝子発現が期待される。この点に鑑みて、本研究では、接着細胞をあらかじめオリフィスシート上で培養し、接着・伸展させた細胞の核内にプラスミドを直接送達する手法の開発を行った。図4はその原理で、2つの電極間に設けられたオリフィス列を持つ絶縁性薄膜 (オリフィスシート) を用いる。このオリフィスシート上で付着性の細胞を培養すると、細胞はシートに接着し扁平な状態に広がる。この時、核の直下に1個以上のオリフィスが存在するよう、オリフィスは10 μm 程度のピッチで配置してある。この状態で、図の上側に導入すべきプラスミドを入れ、上側電極が負極性、下側電極が正極性になるようにパルス電圧を印加すると、まずオリフィス直下の膜に可逆的膜破壊が生じ、次にここを通して流れる電流により細胞上側が可逆的膜破壊をおこし、この電流の作る電気力線に沿ってプラスミドが細胞の中に入る。ここで、核の直下には1個以上のオリフィスがあるように作られているので、ここを通るような力線に沿って電気泳動するプラスミドは、核に直接送達され、核の中に高密度で存在する染色体などの構造にトラップされ、発現する。本研究で

は、この電界集中を用いたオンチップエレクトロポレーションによる細胞核への遺伝子直接送達の現象の実証と、それを用いたiPS細胞の作製を行った。

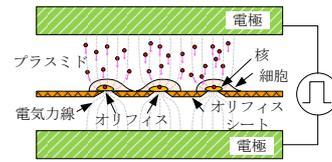


図4 オンチップエレクトロポレーションを用いた細胞核への遺伝子直接送達

4.2.1. 研究成果

まず、核にプラスミドを送達することが可能であることを示すため、オンチップエレクトロポレーション下でのDNA分子の実時間観察を行った。図5は、プラスミドをQdotにより蛍光ラベルし、オリフィスに吸引固定した細胞に、2.0 V, 100 ms の方形波パルスを数回印加するという条件で導入を行った時の蛍光像で、核の中にプラスミドが導入されている。

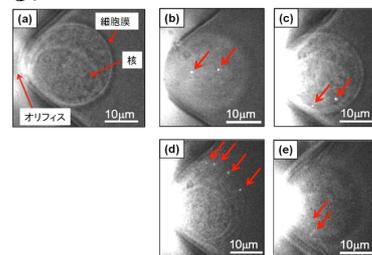


図5 細胞内に導入されたQdot標識DNA

一般に、細胞内に導入されたプラスミドが発現するためには、核内に入って遺伝情報を読み出す必要がある。しかし、プラスミドは、核膜孔 (開口部直径約10nm) を通過できないため、細胞質内のプラスミドが核内に入るためには、核膜が消失する細胞分裂を経験しなければならない。すなわち、通常の方法でプラスミドを導入した場合、発現までには細胞周期1周期 (約24時間) が必要となる。これに対し、本法により核に直接送達されたプラスミドは、細胞周期をまたぎ、すぐに発現を開始する。図6は、ヒト正常二倍体表皮線維芽細胞 (TIG-120) に、GFPプラスミドを導入した直後からの経時観察の結果である。パルス条件は電極ギャップ1mmで、矩形波パルス4V-200msecを1回印加した。写真中央付近に、13個のオリフィスが設けられており、パルス印加後60分の時点で既にGFPが発現し、この細胞全体が緑色の蛍光を発している。

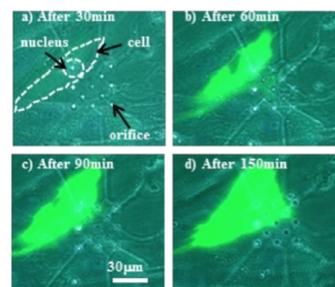


図6 Electroporationによるプラスミド導入

エレクトロポレーション後の経時観察結果を図7に示す。図7a-2は、パルス印加から5時間後のGFP発現状況で、約20%程度の細胞がGFPを発現しており、エレクトロポレーション自体はうまくいっていることが分かる。6日目 (図7b) 頃から、分裂して増殖した細胞が寄り集まって集合しやすくなった。このような細胞の集合は、山中因子を導入していない細胞では見られない現象である。7日目以降から使用したmTeSR-1培養液は、ヒトiPS細胞用に調製されており、通常の体細胞はほとんど増殖できない。これに対し、図7cで

は細胞が全体的に増えているので、山中因子が導入され初期化されようとしている細胞が分裂・増殖しているといえる。このまま培養を続行すると、15日目ぐらいにコロニーの出来始めがみられ、コロニーとしてはっきりと認識できる程度になったのは18日目(図7d-1)であった。通常、iPS細胞のコロニー形成においては、山中因子導入後の細胞をフィーダー細胞上に再播種して培養を行うが、その場合、2~3週間でコロニーができ始めて大きな塊となる。すなわち、オンチップ培養でも、フィーダー細胞を用いる従来の方法とほぼ等しい期間で初期化細胞が得られたことになる。

図8は、20日経過後の細胞をOct3/4抗体とNanog抗体で免疫染色した結果である。図a~dは、チップ上の細胞の全体像で、図aは明視野像、図bは細胞の核を染めたDAPI染色像、図cはOct3/4抗体による免疫染色像、図dはNanog抗体による免疫染色像である。また、各図内で示した四角点線で囲った領域の拡大図を、図e(領域A)、図f(領域B)に示す。四角点線内のコロニー状の細胞の核がOct3/4とNanog抗体で染色されていることより、Oct3/4とNanogを発現しているのがわかる。Oct3/4は、山中因子にも含まれるが、エピソーマルプラスミドを用いた場合でも、3週間後の残存率は5%程度であることより、図e-2に見られるようにコロニー内の全細胞に発現しているOct3/4は染色体由来のもので、形成されたコロニーは初期化された細胞の集合体であるといえる。

以上、本手法を用いれば、フィーダーフリーでiPS細胞を複製できることが判明した。iPS細胞を再生医療に応用するためには、異種成分を含まない培養系の確立が求められることより、自己細胞をフィーダー様細胞としている本手法は、有効な方法になりうると期待される。

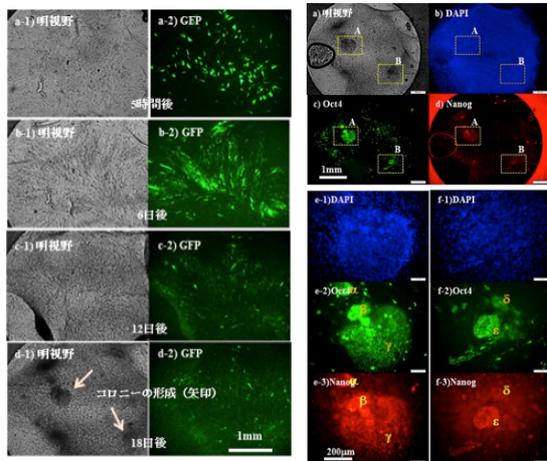


図7 山中因子導入からコロニー形成までの経時観察
図8 免疫染色による初期化細胞の確認

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計13件)

- [1] K. Terao, C. Masuda, M. Gel, H. Oana, M. Washizu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa and F. Oohira: Characterization of optically driven microstructures for manipulating single DNA molecules under a fluorescence microscope, IET Nanobiotechnology, 査読有, (2015), in press, DOI: 10.1049/iet-nbt.2015.0036
- [2] Okeyo, K. O., Kurosawa, O. O., Yamazaki, S., Hidehiro, O., Kotera, H., Nakauchi, H., Washizu, M., Cell Adhesion Minimization by a Novel Mesh Culture Method Mechanically Directs Trophoblast Differentiation and Self-Assembly Organization of Human Pluripotent Stem Cells, Tissue Eng Part C Methods, 査読有, (2015) DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0038

- [3] Tamai, H., Maruo, K., Ueno, H., Terao, K., Kotera, H., Suzuki, T., Development of low-fluorescence thick photoresist for high-aspect-ratio microstructure in bio-application, Biomicrofluidics, 査読有, 9,2,p. 022405(2015) DOI: 10.1063/1.4917511
- [4] Hidehiro Oana, Kaori Nishikawa, Hirotsada Matsuhara, Ayumu Yamamoto, Takaharu G. Yamamoto, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraokade and Masao Washizu: Non-destructive handling of individual chromatin fibers isolated from single cells in a microfluidic device utilizing an optically driven microtool Lab Chip, 査読有, 2014, 14, 696-704 (2014) DOI: 10.1039/C3LC51111A
- [5] 黒澤修・オケヨ ケネディ オモンディ・小穴英廣・沖田圭介・小寺秀俊・鷲津正夫: 「オンチップエレクトロポレーションを用いた接着細胞核への遺伝子直接送達法の開発」 静電気学会誌, 査読有, Vol.38, No.1, p.28-33 (2014)
- [6] K. Terao, G M. el, A. Okonogi, A. Fuke, T. Okitsu, T. Tada, T. Suzuki, S. Nagamatsu, M. Washizu, H. Kotera, Subcellular glucose exposure biases the spatial distribution of insulin granules in single pancreatic beta cells, Sci Rep, 査読有, 4,4123, (2014) DOI: 10.1038/srep04123
- [7] T. Matsumura, K. Tatsumi, Y. Noda, N. Nakanishi, A. Okonogi, K. Hirano, L. Li, T. Osumi, T. Tada, H. Kotera, Single-cell cloning and expansion of human induced pluripotent stem cells by a microfluidic culture device, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, Vol.543, 1, p. 131-137(2014) DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.081
- [8] M. Washizu, B. Techaumnat: Analysis of general multipolar images on dielectric layers for the calculation of DEP force, Journal of Electrostatics, 査読有, 854-861(2013) DOI: 10.1016/j.elstat.2013.06.010
- [9] Y. Kimura, Y. Goto, H. Oana, M. Washizu: Optical sequence probing with the homologous recombination protein RecA, Journal of Biotechnology, 査読有, 164, 254-259 (2012) DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.006
- [10] M. S. Hung, O. Kurosawa, M. Washizu: Single DNA molecule denaturation using laser-induced heating, Molecular and Cellular Probes, 査読有, 26 (2012) DOI: 10.1016/j.mcp.2012.03.008
- [11] K. Terao, A. Okonogi, A. Fuke, T. Okitsu, T. Suzuki, M. Washizu, H. Kotera: Localized substance delivery to single cell and 4D imaging of its uptake using a flow channel with a lateral aperture, Microfluidics and Nanofluidics, 査読有, 12(1), 423-429 (2012) DOI: 10.1007/s10404-011-0885-3
- [12] Boonchai Techaumnat and Masao Washizu: Equivalent image charges of a prolate spheroid under an external electric field, Journal of Electrostatics, 査読有, Vol.69, No.4, p.388-393 (2011) DOI: 10.1016/j.elstat.2011.05.001
- [13] Yuji Kimura, Murat Gel, Boonchai Techaumnat, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu: Dielectrophoresis-assisted massively parallel cell pairing and fusion based on field constriction created by a micro-orifice array sheet, Electrophoresis, 査読有, 2011, 32, 2496-2501 (2011) DOI: 10.1002/elps.201100129

〔学会発表〕 (計22件)

- [1] Hiroki Mori, Kennedy Omondi Okeyo, Masao Washizu and Hidehiro Oana: Mapping positional distribution of higher-order structures along unfragmented native chromatin fibers isolated from single cells in a microchannel, micro-TAS 2015 Gyeongju, Korea,

- p.1259-1261 (25-29, October,2015)
- [2] Kennedy O. Okeyo, Rina Yanaru, Osamu Kurosawa, Satoshi Yamazaki, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera, Masao Washizu, Technique for Cell Adhesion Control and Initiation of Cellular Structure Formation Employing Suspended Microstructured Meshes, ISMM 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, Kyoto(8-10, June, 2015)
- [3] Leqian Yu, Li Liu, Junjun Li, Wei Yang, Fuchou Tang, Nanae Fujimoto, Minako Nakajima, Yong Chen, Hidetoshi Kotera, Single cell culture of human pluripotent stem cells, International Society for Stem Cell Research 2015, Stockholm(24-27, June, 2015)
- [4] Leqian Yu, Developing single cell culture platform human pluripotent stem cell, Conf. on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE NEMS 2015)Xi'an(7-11, April, 2015)
- [5] Leqian Yu, Li Liu, Junjun Li, Yong Chen, Hitrohumi Shintaku, Ryuji Yokokawa, Takaaki Suzuki, Masao Washizu, Kenedy M. Okeyo and Hidetoshi Kotera: Importance of substrate and interaction between cell for culturing and realizing nano-human, 2nd Africa International Biotechnology and Biomedical Conference, Nairobi (17-18, September, 2015)
- [6] H.Kotera, Interactive Bio Surface of Micro Fluidic Device for Organ on a Chip, The 6th Taiwan- Japan Symposium on Nanomedicine, Taipei,(8-9, January, 2015)
- [7] K.O. Okeyo, T. Isozaki, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu: Stable and long term culture of stem cells under shear flow on a microstructured mesh sheet embedded in a fluidic chamber, μ TAS2014, p. 907-909, San Antonio, Texas, (26-30, October, 2014)
- [8] Yutaro Itagaki, Kennedy O. Okeyo, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Miwako Narita, Hidetoshi Kotera, and Masao Washizu, Cytoplasmic Transfer without nuclei mixing between dentric cells and tumor cells achieved by one-to-one electro fusion via micro-orifices in a microfluidic device, μ TAS2014, San Antonio, Texas, p. 814-816(26-30, October, 2014)
- [9] K. O. Okeyo¹, R. Yanaru, O. Kurosawa¹, H. Oana, H. Kotera and M. Washizu, generation of epithelial cell sheets with defined cell orientation using microstructured mesh sheets as substrates for cell culture, μ TAS2014, San Antonio, Texas, p. 1128-1130(26-30, October, 2014)
- [10] H.Kotera, Function of single cell and tissue for regenerative medicine, Joint Meeting of the 1st Africa International Biotechnology & Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, Nairobi(10-12, September, 2014)
- [11] K. O. Okeyo, Y. Hayashi, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu: On-chip electroporation device for direct introduction of plasmids into cell nucleus and observation of cell reprogramming process, μ -TAS 2013, p.113-115, Freiburg, Germany (27-31, Oct., 2013)
- [12] K. O. Okeyo, N. Omasa, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu, Cell adhesion control initiate cell sheet formation in a medium suspension, μ -TAS 2013, p.113-115, Freiburg, Germany (27-31, Oct., 2013)
- [13] 黒澤修, オケヨケネディーモンディー, 小穴英廣, 沖田圭介, 小寺秀俊, 鷺津正夫, オンチップエレクトロポレーションを用いた差接着細胞核への遺伝子直接送達法の開発, 静電気学会, 千葉 (9-11, September, 2013)
- [14] オケヨケネディーモンディー, 西垣内康宏, 近藤武宏, 黒澤修, 小穴英廣, 小寺秀俊, 鷺津正夫, 電界集中型細胞融合法による抗体産生細胞の高収率取得, 静電気学会, 千葉(9-11, September, 2013)
- [15] H. Oana, K. Nishikawa, H. Matsuhara, A. Yamamoto, T. G. Yamamoto, T. Haraguchi, Y. Hiraoka and M. Washizu, Non-invasive handling of chromatin fibers isolated from individual cells in a microchannel utilizing an optically driven microtool - Toward direct epigenetic analysis by microscopy, μ -TAS 2013, p.1995-1997, Freiburg, Germany (27-31, Oct., 2013)
- [16] 重里優子, 横川隆司, 小寺秀俊, 新宅博文, 分子濃縮によるオンチップ電気穿孔法の効率化, マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 127-128, 仙台 (5-7, Nov., 2013)
- [17] 梶本剛生, 岡洗佑, 新宅博文, 横川隆司, 小寺秀俊, 電場集中を用いた電気穿孔法における細胞内小器官への分子輸送の可視化計測([J026-02]細胞および分子のマイクロ・ナノスケール解析(2)), 機械学会全国大会, J026022-1-J026022-4, 岡山 (8-11, September, 2013)
- [18] Hidehiro Oana, Tatsuya Shino, Kaori Nishikawa, Masao Washizu: Real-time fish using optically driven microspheres functionalized by the homologous recombination protein, RecA μ TAS2012 Okinawa, Japan 770-772 (October 28 - November 1, 2012)
- [19] 新宅博文, 梶本剛, 鷺津正夫, TECHAUMNAT Boonchai, 小寺秀俊, Effects of cell electroporation using focused electric field on organelle, 流体工学部門講演会講演論文集 2012, 289-290, 金沢 (9-12, September, 2012)
- [20] 梶本剛生, 新宅博文, 横川隆司, 小寺秀俊, 電界集中を用いた細胞の電気穿孔法における物質輸送の可視化計測, マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2012, 51-52, 北九州市 (22-24, Oct., 2012)
- [21] 梶本剛生, 小此木孝仁, 鈴木孝明, 新宅博文, 横川隆司, 小寺秀俊, エレクトロポレーションにおける導入物質観察の為の微小流路デバイス, 機械学会全国大会, J161044-1-J161044-4, 金沢 (9-12, September, 2012)
- [22] 重里優子, 駒井章治, 小此木孝仁, 大岡正孝, 巽和也, 新宅博文, 横川隆司, 小寺秀俊, 光応答性タンパク質による細胞刺激の為のマイクロデバイス, 機械学会全国大会, J161043-1-J161043-3, 金沢 (9-12, September, 2012)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕 (計0件)

○出願状況

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp>

<http://www.washizu.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小寺秀俊 (KOTERA, Hidetoshi)

京都大学大学院工学研究科・教授

研究者番号: 20252471

(2) 研究分担者

鷺津正夫 (WASHIZU, Masao)

東京大学大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 10201162

(3) 連携研究者

(該当なし)