

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：32619

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289059

研究課題名(和文)電界誘起型マイクロナノバブルインジェクションメスによる機能創発

研究課題名(英文)Emerging functions of electrically induced bubble injection device

研究代表者

山西 陽子(Yamanishi, Yoko)

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号：50384029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では指向性電界誘起マイクロバブル列現象を活用し、細胞・生体組織等を低侵襲・高精度に三次元加工し、同時に試薬や遺伝子を導入するというこれまでにないインジェクション法を達成した。侵襲性は対象物の固さによって異なるが、先端構造を最適化したプローブを使用することにより、これまで困難であった比較的固い植物組織といった固い対象に対してもインジェクションに成功し、ダイナミックレンジの大きい固さを有する対象に対するインジェクション技術を達成した。これまで遺伝子導入等が困難であった対象からの新しい知見が期待されており、今後の様々な対象物に対するインジェクション装置としての実用化及び研究の発展が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：For this research, we have successfully invented and operated electrically-induced bubble injector based on the directional micro-bubble flow. The novelty is the simultaneous perforation and transportation of reagent. Although the invasiveness is depends on the hardness of object, the device has succeeded in injection to plant tissue which used to be very difficult to be injected. This injection device has achieved to inject to the various hardness of material with higher dynamic range. This injection method can contribute to wide range of research fields such as gene therapy and direct gene injection to biological materials of variety hardness.

研究分野：マイクロナノ工学

キーワード：マイクロナノバブル キャピテーション 圧壊 インジェクション 精密加工

1. 研究開始当初の背景

医療あるいはバイオ産業など生物工学分野では、ウェットな環境下で細胞の狙った位置における局所加工や遺伝子導入及び悪性細胞の局所的な死滅処理等の技術の発展が喫緊の課題となっている。高精度の細胞加工においては電子ビーム加工装置などが利用されてきたが、大型で高額、真空中での使用となり、加工に時間がかかることなどの問題があり、加工対象の適応範囲を限定しなくてはならないという課題があった。他の国内外の細胞加工に関する研究動向については、スタンフォード大学のパランカー教授のグループが2008年より放電を利用した細胞加工を行っており、生体組織を数 μm の焼結範囲で切開できることを示している。一方、レーザーを利用した細胞加工は現状で対物レンズに装着する製品化されている技術もあるが、2011年UCLAのChiou准教授のグループがプローブにレーザーを照射することで発生する気泡により細胞加工を行う技術を報告している。研究代表者はこれまで先端にバブルリザーバを設けた特殊構造を持つマイクロガラス電極から指向性を持つ単分散のマイクロ・ナノスケール気泡列発生現象を発見し、その圧壊現象により、これまで加工が困難であった大気圧液中下の生体組織を低侵襲三次元加工することに成功し、卵子の除核作業等への実証試験を分担者赤木研究者とともに行ってきた。本研究では大気圧液中下の微小領域における加工技術と試薬・遺伝子等の導入技術を確立し、幅広い拡張性・多機能性を利用したバイオ・メディカル分野の機能創発を行うものである。加工と導入を狙った位置に同時に行う技術は他に例がなく、この技術を用いることでこれまで治療が困難であった箇所の悪性細胞の死滅や遺伝子発現メカニズムの解明に大きく寄与することができると考える。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が発見した指向性電界誘起マイクロナノバブル列現象を活用し、細胞・生体組織等を低侵襲・高精度に三次元加工し、同時に気泡の気液界面に封入した試薬や遺伝子を導入するというこれまでにない新しい局所加工・インジェクション法の機能創発を目的とする。この技術の特長的な点は高速気泡列が対象物に当たる瞬間に気液界面の圧壊現象により加工できるものであり、さらに気液界面に存在する試薬を加工面のみにも供給するというこれまでに存在しなかった技術である。圧壊による加工精度は理論上数十nmが可能であり、本研究ではMEMS技術による超精密電極加工及びパルス信号制御による高分解能を有しデジタル制御可能なバブル加工・インジェクションを目指し、バイオ・メディカル産業分野へ向けた早期実用化を目指す。

3. 研究の方法

本実験に用いたバブルメスについて述べる。バブルメスは図1に示す通り、ガラス管が導線(銅)を覆った形状をしている。ガラス管先端と銅線との間には空間があり、ここをバブルリザーバーと呼んでいる。バブルメスが電解質溶液中にあるとき、導線に電圧を印加する。このとき、銅が電気分解を起こすためバブルリザーバー内で急激に気体が発生する。気体はガラス管の外に排出されるが、ガラス管端面と溶液中において、急激な圧力差が生じ、気泡となって放出される。

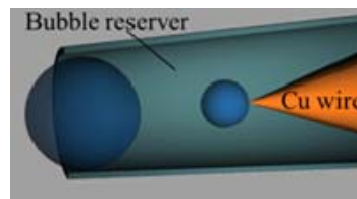


図1. 電界誘起インジェクション気泡メス概観図

図2に実験装置のシステム全体図を示す。卵子把持のためのホールディングピペットとバブルメスは顕微鏡下でマニピュレータにより位置制御される。出力の発振装置は医療用電気メス電源に無誘導抵抗を外挿して細胞レベルに出力を落とすものを使用する。このデバイスはアウトプット周波数450kHzである。また、電源外部には、出力電圧の低下と分解能向上のために無誘導抵抗(10.82k Ω)を接続している。実験の様子は実体ズーム顕微鏡により観察する。

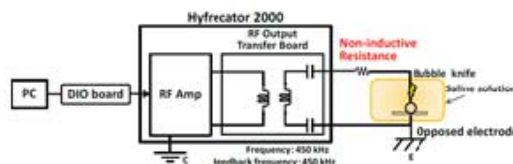


図2. 電界誘起インジェクション気泡メス実験システムセットアップ図

バブルインジェクターでの試薬導入は、気泡の圧壊と気泡のもつ吸着力の二つの要素で実行される。

図3にバブルインジェクターによるインジェクションのコンセプト図を示す。電解質溶液中でバブルインジェクターに高周波パルス印加すると、先端部のバブルリザーバー内で気泡が発生し、オリフィスより離脱する際に膨張・圧壊する。このとき、高速かつ微細な流体のジェットがバブルを貫くように発生し、ターゲットとなる細胞などの生体組織に微小な孔を空ける。その後、気泡は直径5 μm 程の大きさになり、さらに収縮し細胞内に高速で導入されていく。この微細な気泡の移動速度は約2 m/s程である。

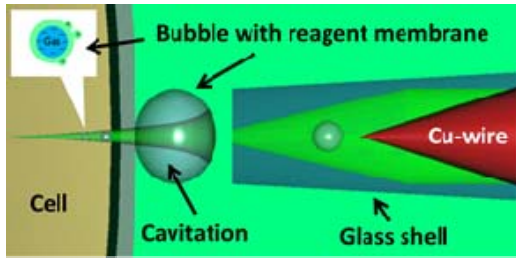


図3 バブルインジェクターによる試薬導入のコンセプト図

図4にバブルインジェクターの構成図を示す。バブルインジェクターは直径30 μmまたは100 μmの細い銅線を絶縁層であるガラス管で覆った電極（バブルメス）の外側を、試薬を供給するための試薬供給シェルが覆っている構造となっている。比較的柔らかい対象には直径30 μmの銅線を用いる。比較的硬い対象には直径100 μmの銅線を使用する。バブルメスの先端にはオリフィスをもつ小さな空隙（バブルリザーバ）を有する。図5には実際のインジェクション実験のセットアップ図を示す。

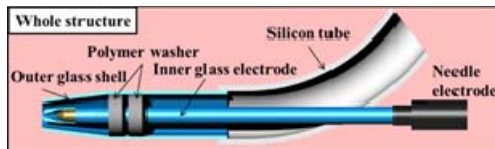


図4 バブルインジェクターの構成

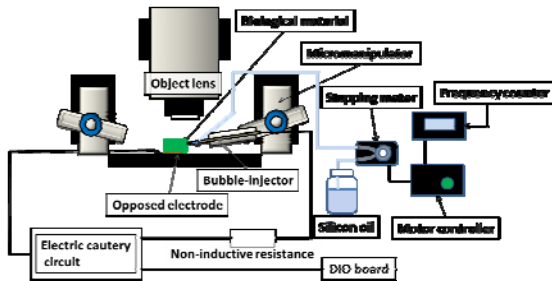


図5 実験セットアップ図

4. 研究成果

バブルインジェクターの選択的局所導入能力を評価するため、動物細胞・植物細胞を対象に試薬導入実験を行った。動物細胞のターゲットとしてアフリカツメガエル卵母細胞を(図6)、植物細胞のターゲットとしてカイワレ大根の葉を使用した(図7)。選択的かつ局所的にインジェクションが出来ていることを示すため、細胞に「SIT」の文字を描き、インジェクション領域を評価した。インジェクション位置はマニュアルマニピュレータによりバブルインジェクターのを操作することで決定した。導入試薬はFluorescein isothiocyanate-dextran(10,000MW)(SIGMA)を用いた。

図8、9に鶏肉および玄米に蛍光ビーズをインジェクションした結果を示す。比較的硬

い対象であっても問題なく蛍光ビーズをインジェクションできることが確認された。

穿孔径の観察が比較的容易なアフリカツメガエル卵母細胞及び鶏肉を対象に、インジェクション時に出来た孔の直径を測定し、印加した電圧との関係を図10に示す。図より印加電圧の調整によりダイナミックレンジの広い対象の生体試料に穿孔できる様子がわかる。

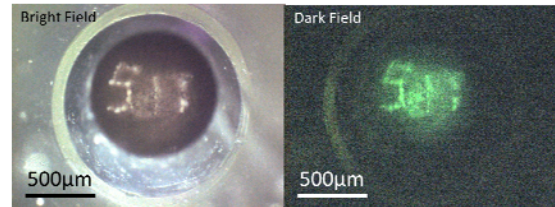


図6 「SIT」の文字を蛍光試薬を導入によりパターンニングしたアフリカツメガエル卵母細胞。

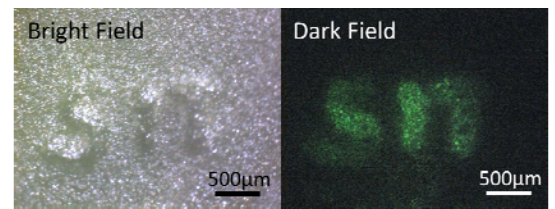


図7 「SIT」の文字を蛍光試薬を導入によりパターンニングしたカイワレ大根の葉。

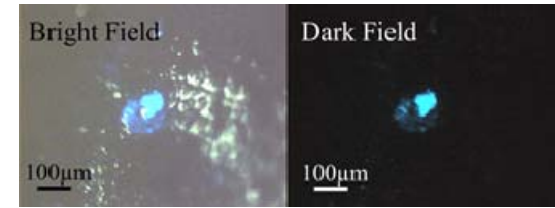


図8 鶏肉への蛍光ビーズ導入の確認

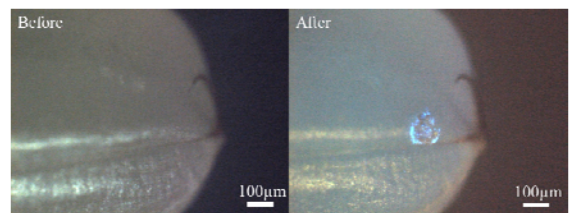


図9 玄米への蛍光ビーズ導入の確認

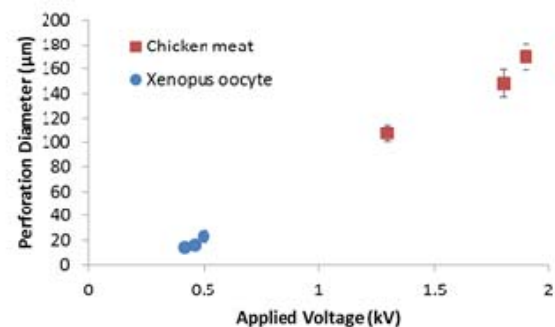


図10 Injection時の穿孔径の変化

本研究の成果を纏めると以下のように記載できる。高周波パルスにより生成するマイク

ロバブルの圧壊現象を用い、様々な生体試料を対象に選択的かつ局所的に試薬を導入するデバイスとして、バブルインジェクターを開発し、以下の結果を得た。

1. 動物細胞のターゲットとしてアフリカツメガエル卵母細胞を、植物細胞のターゲットとしてカイワレ大根の葉を使用し、それぞれに「SIT」の文字を描きながら試薬を導入することに成功した。この結果は、特定の細胞を狙って試薬を導入できることを示しており、生体の特定部位の機能解明や特定部位へ選択的かつ限定的な機能発現に有用であると考えられる。

2. 鶏肉や玄米という、比較的硬く試薬導入が難しいと考えられる生体試料に対しバブルインジェクターが有効であるか検証するため、直径 2.1 μm の蛍光ビーズの導入実験を行った。その結果、鶏肉、玄米どちらの対象物にも、局所的に蛍光ビーズが導入されたことが確認できた。特に鶏肉は資料を液中ではなく空気中での試薬導入に成功した。このことから、バブルインジェクターは、液中のみならず空気中でもインジェクションできる汎用性の高いデバイスとして今後の応用が期待できる。

3. アフリカツメガエル卵母細胞及び鶏肉を対象にインジェクション時の穿孔径を測定した。どちらの対象物の場合も出力電圧の増加と共に穿孔径は増加する傾向があることが確認できた。アフリカツメガエル卵母細胞への穿孔径は最小で約 9 μm 、鶏肉での穿孔径は最小で約 48 μm であった。今後は更に低侵襲にインジェクションできるデバイスを目指し開発を進めていく。

ゆえに、本研究の目的である細胞・生体組織等を低侵襲・高精度に三次元加工し、同時に気泡の気液界面に封入した試薬や遺伝子を導入するというこれまでにない新しい局所加工・インジェクション法の機能創発を行うことについて達成したと言える。

謝辞

本研究は、JST さきがけ、文科省科研費(25289059, 25108504, 15H00903, 15K13917 及び 25630091) の助成を得て行われた。

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山西陽子, 電界誘起気泡による針なし注射器, 自動車技術, 査読無, 69 巻, 2015, pp. 86-87.

②山西陽子, 電界・プラズマを利用したマイクロバブル射出による細胞加工, 日本機械学

会誌, 査読無, 117 巻, 2015, pp. 28-81.

③山西陽子, 電界誘起気泡メスと機能性界面, 生体の科学, 査読無, 65 巻, 2015, pp. 510-511.

[学会発表] (計 35 件)

①Takudo Shu, Takasawa, Yoko Yamanishi, Rounding of Protein Crystal by High-Speed Bubble Jet in Microfluidic Chip, ISMM 2015 (国際学会), 2015 年 6 月 8 日, Kyoto, JAPAN

②Yohei Hamano, Takuya Kambayashi, Yoko Yamanishi, Transportation of Multiple-reagent Using Adsorption and Contraction Force of Micro-bubble Jet in Microfluidic Chip, ISMM 2015 (国際学会), 2015 年 6 月 8 日, Kyoto, JAPAN

③Takudo Shu, Takasawa, Yoko Yamanishi, Rounding of Protein Crystal by High-Speed Bubble Jet in Microfluidic Chip, ISMM 2015 (国際学会), 2015 年 6 月 8 日, Kyoto, JAPAN

④Kazuki Takahashi, Yuta Arakawa, and Yoko Yamanishi, High Dynamic Ablation and Injection by Electric Cavitation for Wide Range of Materials, The 28th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2016) (国際学会), 2016 年 1 月 25 日, Shanghai, CHINA

⑤Sohei Itabashi, Takuya Kambayashi, Takatoshi Shimamura, Kazuki Takahashi, Yoko Yamanishi, In-Situ Cellular-Scale Injection for Alive Plants by Micro-Bubble Injector, 11th IEEE Annual International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS) (国際学会) 2016 年 04 月 20 日, Matsushima Bay and Sendai MEMS City, Japan

⑥山西陽子, プラズマ誘起気泡によるバイオメディカル応用, 63 回応用物理学会春季学術講演会, 特別シンポジウム (招待講演), 2016 年 03 月 20 日, 東京工業大学大岡山キャンパス

⑦神林 卓也, 濱野 洋平, 山西陽子, マイクロアレイ電極による多筒式インジェクション, ROBOMECH 2015 in Kyoto, 2015 年 5 月 19 日, みやこめっせ, 京都

⑧高橋和基, 山西陽子, 針なし気泡注射器による試薬インジェクション, ROBOMECH 2015 in Kyoto, 2015 年 5 月 19 日, みやこめっせ, 京都

⑨荒川佑太, 大村実樹子, 辻本大介, 山西陽子, プラズマ誘起気泡の圧壊による新液中マイクロ加工, ROBOMECH 2015 in Kyoto, 2015 年 5 月 19 日, みやこめっせ, 京都

⑩高橋和基, 山西陽子, 電界誘起バブルインジェクターによる多種生体試料への試薬パターンニング, 第 39 回静電気学会全国大会, 2015 年 09 月 25 日. 首都大学東京, 東京

⑪荒川佑太, 辻本大介, 山西陽子, プラズマ気泡による新液中マイクロ加工と力計測,

- 2015年10月30日, 朱鷺メッセ, 新潟
- ⑫ 嶋村恭敏, 高橋和基, 山西陽子, 電界誘起気泡を用いた卵母細胞クローニング技術への研究, 日本機械学会第7回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2015年10月30日, 朱鷺メッセ, 新潟
- ⑬ 神林卓也, 濱野洋平, 山西陽子, 3次元マイクロアレイ電極誘起気泡によるインジェクションデバイス, 日本機械学会第7回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2015年10月30日, 朱鷺メッセ, 新潟
- ⑭ 市川啓太, 前田真吾, 山西陽子, 皮膚深部への低侵襲インジェクション技術へ向けた基礎研究, 第33回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2016年04月26日, 東京大学生産技術研究所, 東京
- ⑮ 山西陽子, 針なし注射器の開発とその応用, 日本機械学会関東支部 東京ブロックイブニングセミナー (招待講演), 2015年7月25日, 芝浦工業大学豊洲キャンパス.
- ⑯ 山西陽子, 針のない注射器の実現に向けたマイクロ流体を用いたインジェクション技術の開発 (招待講演), 2016年6月7日, 文部科学省 科学技術, 学術政策研究所.
- ⑰ Yoko Yamanishi, Emerging Functions of Electrically-induced Bubble Knife, 水素先端世界フォーラム2015 (HYDROGENIUS 研究シンポジウム) (招待講演), 2015年02月04日~2015年02月04日, 九州大学伊都キャンパス
- ⑱ 山西陽子, 電界誘起気泡による機能創発, No14-173 バイオロボティクス 特別講演会, 日本機械学会 (招待講演), 2015年02月23日~2015年02月23日, 信州大学繊維学部
- ⑲ 山西陽子, 電界・プラズマを利用したマイクロバブル射出による機能創発, 第7回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム (招待講演), 2014年12月19日~2014年12月19日, 横浜国大
- ⑳ 山西陽子, 電界誘起気泡メスによる機能創発, 日本機械学会熱工学部門, 熱工学カンファレンス (招待講演), 2014年11月08日~2014年11月08日, 芝浦工大豊洲キャンパス
- ㉑ Yoko Yamanishi, Emergent Functions of Electrically-Induced Bubbles, IUMRS-ICA2014 (招待講演), 2014年08月24日~2014年08月24日, 福岡大学
- ㉒ Kazuki Takahashi, Shun Omi, Yoko Yamanishi, Minimally Invasive Needle-free Bubble Injector for Gene Therapy, The 28th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2015), 2015年01月21日~2015年01月21日, エストリル, ポルトガル
- ㉓ So Takasawa, Takudo Shu, Yoko Yamanishi, Carving of Protein Crystal by High-speed Micro-bubble Jet Using Micro-fluidic Platform, The 28th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2015), 2015年01月22日~2015年01月22日, エストリル, ポルトガル
- ㉔ Kazuki Takahashi, Shun Omi, Yoko Yamanishi, Minimally-invasive Local Injection by Electrically-driven Narrow Orifice Channel, International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2014), 2014年11月10日~2014年11月10日, Nagoya University, JAPAN.
- ㉕ S. Takasawa, Y. Fujiwara, T. Kobayashi, M. Oomura, H. Kamegawa, and Y. Yamanishi, Micro-bubble Ring Generation by Electrically-driven High-speed Bubble Strike under Micro-fluidic Environment, 18th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (micro-TAS 2014), 2014年10月29日~2014年10月29日, サンアントニオ, アメリカ.
- ㉖ K. Takahashi, W. Kawaguchi, Y. Hamano, S. Hosoda, Y. Arakawa, and Y. Yamanishi, Electrically Induced Bubble Capillary-oration, 18th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (micro-TAS 2014), 2014年10月27日~2014年10月27日, サンアントニオ, アメリカ.
- ㉗ S. Takasawa, K. Takahashi, H. Kuriki, F. Arai, Y. Yamanishi, Local injection using regent-laden micro-bubbles, 5th International conference on Plasma Medicine (ICPM5), 2014年05月20日~2014年05月20日, Nara, JAPAN.
- ㉘ 神林卓也, 濱野洋平, 山西陽子, 多筒式電極誘起気泡による二次元試薬インジェクション, 日本機械学会第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2014年11月21日~2014年11月21日, 松江, 島根
- ㉙ 濱野洋平, 神林卓也, 山西陽子, 多層界面を有する気泡生成デバイス, 日本機械学会第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2014年11月21日~2014年11月21日, 松江, 島根
- ㉚ 高澤曹, 山西陽子, 微小空間における渦輪生成への研究, 第30回化学とマイクロナノシステム研究会, 2014年10月03日~2014年10月03日, 札幌, 北海道
- ㉛ 川口航, 高橋和基, 山西陽子, 気泡帯電局所破壊によるウシ卵子の低侵襲加工, 2014年10月03日~2014年10月03日, 札幌, 北海道
- ㉜ 藤原裕也, 石川博康, 山西陽子, 磁気タグインジェクションによる細胞情報トレーシング, 2014年10月03日~2014年10月03日, 札幌, 北海道
- ㉝ 富田貴直, 高澤曹, 栗木宏樹, 新井史人, 山西陽子, 微小空間放電による気液界面生成の研究, ROBOMECH 2014 in Toyama, (社) 日本機械学会ロボメカ部門, 2014年05月27日~2014年05月27日, 富山

- ③④ 高橋和基, 栗木宏樹, 新井史人, 山西陽子, 気液界面輸送による局所遺伝子導入, (社)日本機械学会ロボメカ部門, 2014年05月27日~2014年05月27日, 富山
- ③⑤ 高橋和基, 濱野洋平, 細田駿介, 荒川佑太, 山西陽子, 微小空間内放電による流れ場と局所試薬輸送, 第29回化学とマイクロナノシステム研究会, 2014年05月23日~2014年05月23日, 日本女子大学, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

①名称: 気泡噴出チップ、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、並びにインジェクション装置及びインジェクション方法

発明者: 山西陽子, 神林卓也, 高橋和基

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特願 2015-205948

出願年月日: 2015年10月19日

国内外の別: 国内

②名称: 気泡噴出部材、気液噴出部材、局所アブレーション装置及び局所インジェクション装置

発明者: 山西陽子, 神林卓也, 高橋和基

権利者: 芝浦工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-226699

出願年月日: 2014年11月7日

国内外の別: 国内

③名称: 有機結晶加工用チップ、有機結晶回転装置及び有機結晶加工装置

発明者: 山西陽子, 高澤 曹, 周 澤道

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特願 2014-213243

出願年月日: 2014年10月17日

国内外の別: 国内

④名称: 渦輪発生装置、該渦輪発生装置を含む洗浄装置

発明者: 山西陽子, 高澤 曹

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特願 2014-201439

出願年月日: 2014年9月30日

国内外の別: 国内

⑤名称: 気泡噴出チップ、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、並びにインジェクション装置及びインジェクション方法

発明者: 山西陽子, 濱野洋平, 神林卓也

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特願 2014-201440

出願年月日: 2014年9月30日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.sic.shibaura-it.ac.jp/~yoko/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 陽子 (YAMANISHI, Yoko)

芝浦工業大学工学部機械工学科・准教授

研究者番号: 50384029

(2) 研究分担者

川原 知洋 (KAWAHARA, Tomohiro)

九州工業大学・学内共同利用施設等・准教授

授

研究者番号: 20575162

赤木 悟史 (AKAGI, Satoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・その他部局等・研究員

研究者番号: 70414696

(3) 連携研究者

東山 哲也 (HIGASHIYAMA, Tetsuya)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号: 00313205