

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820087

研究課題名(和文)ハイスループット細胞機能解明のための超並列デジタル細胞操作システムの開発

研究課題名(英文)Development of Digital Cell Manipulation Station for Massively Parallel Analysis of Single Cells

研究代表者

永井 萌土(Nagai, Moeto)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00580557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：疾患の原因解明や治療法の開発に向けて、生命現象を高効率に解明するツールとして、単一細胞レベルで超並列に細胞操作するシステム“iCellStation”(intelligent CellStation)の開発を目標とした。細胞操作システムの基盤技術として、次の3項目を研究成果としてあげた。(1)電気浸透流を用いた複数の単一細胞を同時に操作する技術を開発した。(2)誘電体被覆電極と誘電泳動力を用いた単一細胞操作技術を確立した。(3)超並列に細胞内デリバリーを行うためのナノニードルアレイ作製技術を開発した。これらの成果により、細胞パターンングと細胞内デリバリーを超並列に行うための基礎技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to develop a cell manipulation system capable of handling single cells at massively parallel manner (over 10 cells) named as “iCellStation” toward understanding the mechanism of diseases and establishing medical treatments. For establishment of fundamental technologies of the cell manipulation system, I achieved the following three research items: (1) Parallel manipulation technique of single cells based on electro-osmotic flow. (2) Single-cell manipulation technique using dielectrophoresis with dielectric coated electrodes. (3) Fabrication technology of nanoneedle array for massively intracellular delivery. Basic technologies for massively parallel cell patterning and intracellular delivery have been developed.

研究分野：マイクロ・ナノ工学

キーワード：細胞操作 細胞内デリバリー マニピュレータアレイ ナノニードルアレイ 細胞機能解明

1. 研究開始当初の背景

治療が難しく原因が未解明な疾患が存在し、この解明や治療法の開発には高いニーズがある。このニーズに応えるには、生体の基本的な要素である細胞機能を理解し、生命現象を解明することが大きな手掛かりになる。生命現象を統合的に理解するには、(1)単一細胞レベルの機能発現制御と細胞内のメカニズム、(2)複数細胞間の相互作用の理解が求められる。さらに複数サンプルを用いた統計的な理解も不可欠である。従来の *in vitro* (試験管) での実験は手動で、効率、自由度に課題が残り、かつ集団での平均値の理解に留まっている。細胞機能解明には、細胞の高い自由度での操作、個々の振る舞いのデジタル (離散) 的なハイスループット解析が重要な要件である。

2. 研究の目的

in vitro 環境での単一細胞のハイスループット自動操作は、生体機能解明に極めて有効である。本研究では複数の単一細胞を自動操作する「超並列デジタル細胞操作システム」*iCellStation (intelligent CellStation)* を開発して、*in vitro* 環境において単一細胞および細胞間相互作用の機能をハイスループットで解明する基盤技術の開発を目的とする。

自由なタイミングで細胞に生体物質を注入する「細胞内デリバリー技術」と高い空間分解能で細胞を任意のパターンに配置する「細胞パターンニング技術」で単一細胞機能、細胞相互作用を解明して、医学・生物学に有用なツールを開発する。

3. 研究の方法

(1)電気浸透流を利用した複数の単一細胞を同時に操作するシステムの開発、(2)誘電体被覆電極と誘電泳動力を用いた単一細胞操作システムの開発、(3)超並列に細胞内デリバリーを行うためのナノニードルアレイの開発を通じて、「細胞パターンニング」と「細胞内デリバリー」を行うための技術を確認する。

細胞操作と細胞内デリバリーに利用する力は主に、①正負の誘電泳動力、②電気浸透流、③電気泳動力とする。これらの力を活用して、「細胞パターンニング技術」、「細胞内デリバリー技術」を開発する。

使用するための電極、マイクロ流路、ナノニードルは、マイクロ・ナノ加工技術を使用して作製した。

4. 研究成果

「細胞パターンニング」と「細胞内デリバリー」を行うための技術を確認した。具体的には次の3項目が研究成果である：(1)電気浸透流を利用した複数の単一細胞を同時に操作するシステムの開発、(2)誘電体被覆電極と誘電泳動力を用いた単一細胞操作システムの開発、(3)超並列に細胞内デリバリーを行う

ためのナノニードルアレイの開発である。以下により詳細な成果を記載する。

(1)電気浸透流を利用した複数の単一細胞を同時に操作するシステムの開発

マイクロノズルアレイと流路・電極を一体形成したマイクロデバイスを作製した(図1)。16本の各ノズルそれぞれに、独立した流路とポンプを形成し、単一ノズルでの流れの個別制御が可能である。またノズルとポンプは透明な材料から形成され、顕微鏡での透過観察ができるものである。搭載したポンプは電氣的に操作できることから集積性に優れる利点がある。

デバイスの作製後、作製したポンプ一体型マイクロノズルアレイを利用して、ポンプの特性評価と電氣的な細胞操作を行った(図2)。ここで高い生存率での電氣的な細胞操作を実現するため、DCバイアス AC 電気浸透流による細胞操作手法を提案し、ポンプ流れの双方向制御を実現した。ポンプ流れの方向と大きさの制御は、電気信号を調整して達成できる。2方向の制御は DC バイアス電圧の正負の方向を変えることで、流速の制御は DC バイアス電圧と AC 電圧の振幅を変えることで行った。このポンプ一体型マイクロノズルアレイを用いて、発生させる電気浸透流により、細胞をノズル内に吸引操作した。ポンプ一体型デバイスにて、細胞を電氣的に操作できることを実証した。

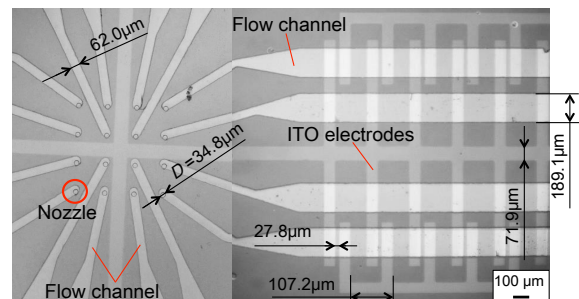


図 1. ポンプ一体型ノズルアレイの顕微鏡写真。

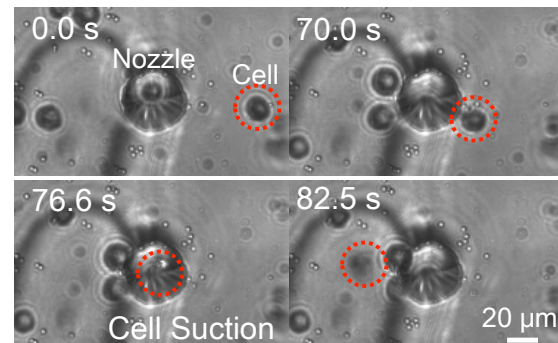


図 2. 電気浸透流によりマイクロ流路中の細胞の吸引を示す顕微鏡画像。

(2)単一細胞操作のための誘電体被覆電極と誘電泳動力を用いたシステムの開発

電極を誘電体で被覆した状態にて細胞を

誘電泳動力で操作すれば、電場の集中や溶液の化学反応を防ぎながら低侵襲に細胞を操作することができる。細胞操作のデバイスには、ヒト由来の細胞よりも若干大きいサイズの電極間距離を持つ平面電極を形成して、その上に誘電体の樹脂を被覆したものを用いた。交流電圧を印加すると、4x4 の電極間に細胞がトラップされた。

誘電泳動による細胞操作の侵襲性を評価し、電極を誘電体膜で被覆すると低侵襲な細胞操作になることを確認した(図 3)。電極と細胞が直接接触する場合、細胞が電極上にトラップされると細胞が膨張し、細胞を染色した蛍光分子(Calcein)が拡散して、細胞体内から減少した。細胞膜の電気穿孔が示唆される。電圧印加を止めた後、細胞は付着して、基板からリリースされなかった。一方、誘電体膜で電極をコートした場合、細胞は電極間にトラップされた後も、細胞の膨張と Calcein の減少は見られない。つまり細胞の電気穿孔が防止されたと考えられる。さらに電圧印加を止めた後、細胞は基板に付着しておらず、基板からリリースされた。

開発したシステムと手法を用いて、低侵襲かつ超並列的に細胞操作を行うことが可能になる。

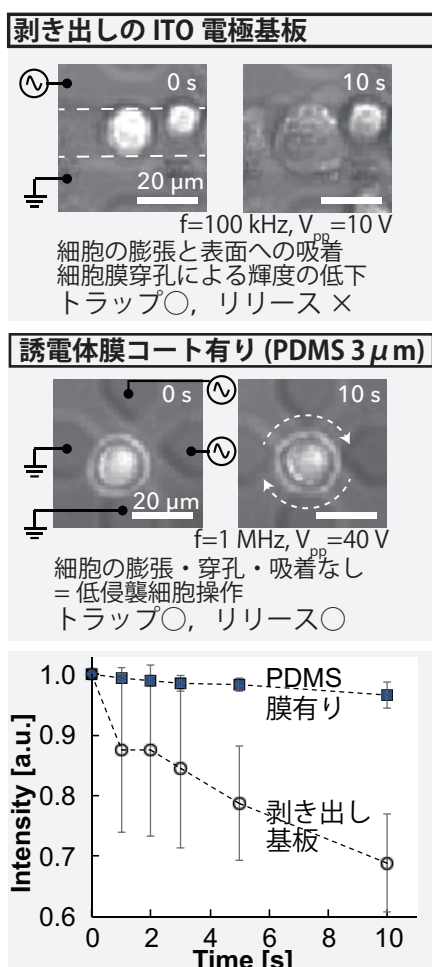


図 3 剥き出しの ITO 電極と誘電体膜でコートした電極での細胞操作結果の比較。上) 顕微鏡像。下) 細胞の蛍光強度の時間推移。

(3)超並列に細胞内デリバリーを行うためのナノニードルアレイの開発

ニードルのパターンニングには、マイクロ・ナノ加工技術における i 線ステッパーを用いた。深掘り RIE(Reactive Ion Etching)にて両面から SOI (Silicon on Insulator)ウエハの Si をエッチングした。SOI ウエハの埋め込み酸化膜層にて、導入部側のパターン内でのエッチレートの差を均一化し、安定したニードルの接続を実現した。表面と裏面の接続を確実に行って、歩留まり高く段付きナノニードルアレイを作製した(図 4)。図 4(a)にニードルアレイを SOI 基板の Si から露出させたものを示す。ニードルは 100 本中 100 本がニードル構造を有していた。図 4(b)にニードルの平面観察像を示す通り、内径 734 nm、外径 1.17 μm と先端径制御されたニードルを作製した。また図 4(c)に横方向から観察し、ニードルの高さを計測したものを示す。ニードル高さは 9.21 μm であった。

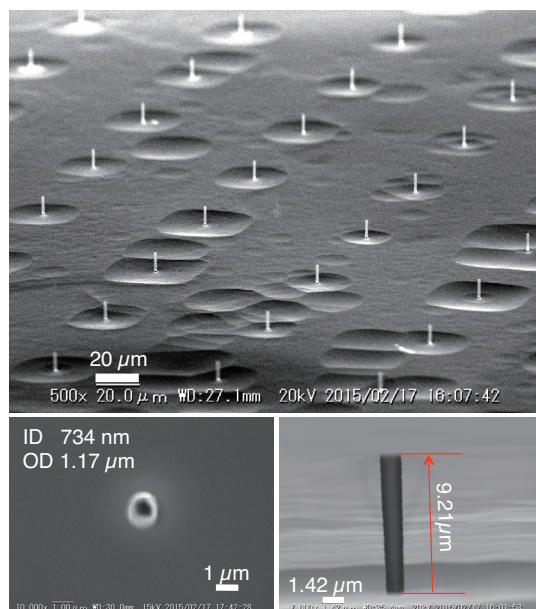


図 4 中空ナノニードルアレイの作製結果の SEM 像。(a)全体像。(b)平面(中空穴を示す)。(c)側面。

溶液吐出実験にて、連通が確認できたニードルは 99/100 本だった。図 5 に印加電圧 4 V 印加後 30.5 s 後の取得画像を示す。ニードルからの吐出が確認されたのは 99/100 箇所であった。画像右側のニードルからの吐出量が多い理由は、電極位置が近く、電圧降下が僅少になり、より多くの量が吐出されたと考えられる。個々のニードルからの吐出量の違いは、微細形状の違いによるものである。さらに電場駆動力を利用していることから、電場の印加が異なると吐出にも分布が現れる。

導入部と安定した接続プロセスを開発し、ナノニードルアレイ作製プロセスを確立した。開発したニードルは細胞への超並列なデ

リバリーを可能とする基盤ツールである。

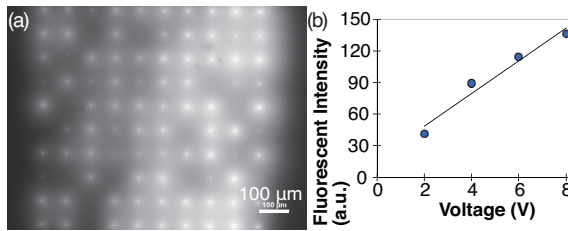


図 5 中空ナノニードルアレイデバイスからの蛍光 DNA 吐出結果. (a) 蛍光顕微鏡像. (b) 印加電圧と輝度の関係.

以上の成果により、「超並列デジタル細胞操作システム」"iCellStation (intelligent CellStation)"における基礎技術が確立された。今後はこれらの技術を発展させて、超並列デジタル細胞操作システムを完成し、実際の細胞機能解明に活用する。

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 2 件)

1. Moeto Nagai*, Kiyotaka Oohara, Keita Kato, Takahiro Kawashima, and Takayuki Shibata, "Development and Characterization of Hollow Microprobe Array as a Potential Tool for Versatile and Massively Parallel Manipulation of Single Cells," *Biomedical Microdevices*, Vol. 17, Issue 2, 11 pp, (2015).
2. Moeto Nagai*, Tokuma Miyamoto, Takahiro Kawashima, and Takayuki Shibata, "Fabrication and Characterization of Hollow Needle Array for Electrokinetic Intracellular Delivery of Biomolecules," *AIP Conference Proceedings*, Vol. 1585, pp. 117-122, (2014).

[学会発表] (計 22 件)

1. 永井萌土, 宮本篤真, 柴田隆行, 「超並列細胞内デリバリーのための中空ナノニードルアレイの開発」電気学会 バイオ・マイクロシステム研究会, 中央大学後楽園キャンパス, 2015 年 5 月 29 日(金), 37-42 pp.
2. 永井萌土, 「超並列シングルセル解析のための MEMS プラットフォームの構築」, 医療機器学会, パシフィコ横浜, 2015 年 5 月 28 日.
3. 永井萌土, 坂本良作, 川島貴弘, 柴田隆行, 「ニードルアレイと微小電極を融合した細胞内デリバリーシステムの基礎的検討」京都市勧業館「みやこめっせ」 2015 年 5 月 17 日(日)~19 日(火), 2A2-Bo8, 3pp.
4. 松瀬優也, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行 「低侵襲・超並列細胞操作のための誘電泳動プローブアレイの開発と評価」2015

5 年度精密工学会春季大会学術講演会, 東洋大学 白山キャンパス, 2015 年 3 月 17 日(火)~19 日(木)

5. Yuya Matsuse, Moeto Nagai, Takahiro Kawashima, and Takayuki Shibata, "Minimally Invasive Dielectrophoretic Manipulation of Single Cells with Polymer-Coated Microelectrodes," *The Irago Conference 2014*, 7P-78 (1 pp), AIST, Tsukuba, Ibaraki, November 6-7th, 2014. Poster.
6. M. Nagai, K. Kato, S. Soga, T. Kawashima, and T. Shibata, "Microprobe Array Integrated with Bidirectional Electroosmotic Pump for Massively Parallel Cell Manipulation," *APCOT 2014 (7th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies)*, 12-6 (2pp), EXCO, Daegu, Korea, June 29th-July 2nd, 2014. Oral.
7. 坂本良作, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行 「アレイ状中空ニードルと平面電極を統合した選択的細胞内デリバリーの基礎的検討」電気学会バイオ・マイクロシステム研究会, pp. 19-22, 名古屋駅前イノベーションハブ会議室 (愛知県名古屋市), 2014 年 12 月 2 日(火).
8. 河原田翔, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行 「細胞消費量を低減した往復流型シングルセルフィーダの開発」電気学会バイオ・マイクロシステム研究会, pp. 27-30, 名古屋駅前イノベーションハブ会議室 (愛知県名古屋市), 2014 年 12 月 2 日(火).
9. 宮本篤真, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, 「超並列細胞内デリバリーのためのナノニードルアレイの先端形状制御」, 第 6 回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 20am2-A6, 2pp., くびきメッセ(松江、島根県), 2014 年 10 月 20 日(月)~22 日(水).
10. 松瀬優也, 永井萌土, 曾我智史, 川島貴弘, 柴田隆行, 「幹細胞機能解析のための微小環境場の構築—集積化プローブおよびマルチウェルによる高効率単一細胞操作—」日本機械学会 2014 年度年次大会, J0270203, 5pp., 東京電機大学 東京千住キャンパス 2014 年 9 月 7 日-10 日.
11. 永井萌土, 松瀬優也, 曾我智史, 河原田 翔, 川島貴弘, 柴田隆行, 「超並列シングルセル解析のためのデジタル細胞操作ステーションの開発」, 電子情報通信学会 電子デバイス研究会, pp. 33-38, 豊橋技術科学大学 ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー (VBL), 2014 年 7 月 10 日(木), 11 日(金).
12. 曾我智史, 永井萌土, 松瀬優也, 川島貴弘, 柴田隆行, 「超並列細胞操作のための双方向制御型電気浸透流ポンプの特性解析」, 電気学会 E 部門総合研究会バイオ・マイクロシステム研究会, pp. 29-33, 東京大学生産技術研究所, 2014 年 5 月 27, 28 日,

- 東京都目黒区。
13. 曾我智史, 永井萌土, 加藤啓太, 川島貴弘, 柴田隆行「双方向制御型電気浸透流ポンプを用いた超並列細胞操作技術の開発」, 日本機械学会東海支部第 63 期総会・講演会, #307 (2 pp), 大同大学, 2014 年 03 月 18-19 日, 愛知県名古屋市。
 14. 松瀬優也, 永井萌土, 加藤啓太, 川島貴弘, 柴田隆行「超並列細胞アセンブリのための電場駆動力を利用した透明セルフィーダの開発」精密工学会 2014 年度春季大会, F05, pp. 443-444, 東京大学本郷キャンパス, 2014 年 3 月 18-20 日, 東京都文京区。
 15. 加藤啓太, 永井萌土, 曾我智史, 松瀬優也, 川島貴弘, 柴田隆行「双方向制御型電気浸透流を利用した超並列細胞操作用マイクロプローブアレイの開発」精密工学会 2014 年度春季大会, F34, pp. 477-478, 東京大学本郷キャンパス, 2014 年 3 月 18-20 日, 東京都文京区。
 16. 加藤啓太, 永井萌土, 曾我智史, 川島貴弘, 柴田隆行, "双方向制御型電気浸透流を利用した超並列細胞操作用マイクロプローブアレイの開発" 1A2-2, 第 23 回ライフサポート学会フロンティア講演会, 2014 年 2 月 28 日 (金)・3 月 1 日 (土), 東京理科大学 葛飾キャンパス, 口頭発表。
 17. M. Nagai, Y. Matsuse, T. Kawashima, and T. Shibata, "Electrokinetic manipulation of cells using DC-biased AC electric fields," The Irago Conference 2013, 25P-3, p. 34, October 24th-25th, 2013, Irago Sea-Park&Spa Hotel, Tahara, Aichi, Japan. Poster 査読有
 18. M. Nagai, T. Miyamoto, T. Kawashima, and T. Shibata, "Fabrication and Characterization of Hollow Needle Array for Electrokinetic Intracellular Delivery of Biomolecules," The Irago Conference 2013, 25P-4, p. 35, October 24th-25th, 2013, Irago Sea-Park&Spa Hotel, Tahara, Aichi, Japan. Poster 査読有
 19. Moeto Nagai, Yuya Matsuse, Keita Kato, Takahiro Kawashima, Takayuki Shibata, "Fabrication of Openly Accessible Cell Station in Transparent Materials for High-throughput Cell Analysis," 39th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE 2013), p. 112, Imperial College London, London, UK, 16 - 19 September 2013. Oral 査読有
 20. 加藤啓太, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, 「超並列デジタル細胞操作ステーションの開発-電場駆動力を利用した単一細胞の同時並列操作-」第 5 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 6AM2-D-4, pp. 129-130, 2013 年 11 月 5 日~7 日, 仙台国際センター, 宮城県仙台市。口頭発表
 21. 松瀬優也, 永井萌土, 加藤啓太, 川島貴弘, 柴田隆行, 「超並列デジタル細胞操作ステ

ーションの開発-透明構造をもつシングルセルインジェクタの作製-」2013 年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp. 889-890, 2013 年 9 月 12-14 日, 関西大学千里山キャンパス, 大阪府吹田市。口頭発表・ポスター発表

22. 加藤啓太, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, 「複数の単一細胞解析を目指した超並列デジタル細胞操作ステーションの開発」日本機械学会 2013 年度年次大会, J026034 (5pp), 2013 年 9 月 8 日~11 日, 岡山大学津島キャンパス, 岡山県岡山市。口頭発表

〔その他〕

ホームページ等

<http://mems.me.tut.ac.jp/>

6. 研究組織

研究代表者

永井萌土 (NAGAI MOETO)

豊橋技術科学大学 大学院・工学研究科 助教

研究者番号: 00580557