

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310072

研究課題名(和文) 細胞アッセイ用マイクロデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of Microdevices for Cell Assay

研究代表者：

渡慶次 学 (TOKESHI MANABU)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60311437

研究成果の概要(和文)：細胞培養から遺伝子発現解析までの一連のバイオアッセイが可能なマイクロバイオデバイスの開発を行った。浮遊性細胞(酵母)を培地交換をしながら還流培養を可能とするデバイスと、遺伝子解析(リアルタイムPCR)が可能な分析・解析デバイスを開発した。これら二つのデバイスを統合した統合デバイスを試作し、その性能評価・最適化を行い、当初目的を達成することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a micro device that a series of bioassay from the cell culture to the gene expression analysis is possible. Two kinds of devices were developed: a device that enables circumfusion culture of suspension cells (yeast) while exchanging media, and a genetic analysis device that enables real-time PCR. An integrated device of these two devices was successfully developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：マイクロ化学システム

科研費の分科・細目：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学チップ、細胞アッセイ、リアルタイムPCR

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生命の構成部品であるDNAやタンパク質に関する情報は、DNAシーケンサーやマイクロアレイの出現により、大量に取得・解析することが可能となり、生命の部品レベルの知識が急速に拡大している。しかし、生命の本質は、部品間の複雑なネットワーク(相互作用)にあり、個々の部品レベルの知識の集積化では、生命の本質には到達できない。生命の本質を理解するためには、生命をシステムとして理解しなくてはならない。生命をシステムとして理解すること目的とする研究分野を“システムバイオロジー”と言い、近年急速に発展している。しかし、生命を構成

している大量の部品群のネットワーク解析には、部品調達とアッセイに要する時間が長いといった大きな問題点がある。従来法のアッセイでは、それぞれの部品(生体由来のDNAやタンパク質など)が大量に必要であり、また、細胞培養から発現解析までに数日を要する。したがって、微量試料で迅速にアッセイできるシステムの開発が強く望まれている。

一方、ガラスやプラスチック基板上に化学操作を集積化した $\mu$ TASやLab on a Chipと呼ばれる微小デバイスの研究が世界中で行われている。これは、試料量の低減、分析・解析の高速化、並列化、自動化といった利点があり、化学のみならずバイオ研究の次世代の

研究ツールとして期待されている。申請者は、1998 年から  $\mu$ TAS の研究に取り組んでおり、これまでに微量化学物質分析システム、タンパク質分析システム、DNA 解析システム、細胞アッセイシステムなど、様々なマイクロ化学・バイオシステムを開発してきた。これまで報告された（申請者も含む）微小デバイスは、上述した微小デバイスの利点である、試料量の低減、分析・解析の高速化、自動化は実現しているが、並列化についてはあまり進んでいないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞培養から遺伝子発現解析までの一連のバイオアッセイが可能なマイクロバイオデバイスの開発を目的とする。具体的には、システムバイオロジー研究では世界的に著名な北野らが開発した遺伝子綱引き法 (genetic Tug-Of-War : gTOW) が可能なマイクロバイオデバイスを開発する。本研究では、最終的な並列化マイクロバイオデバイスを開発するための前段階である、1 種類の標的遺伝子を gTOW 法で試験することが可能なマイクロバイオデバイスの開発を目的とした (図 1)。

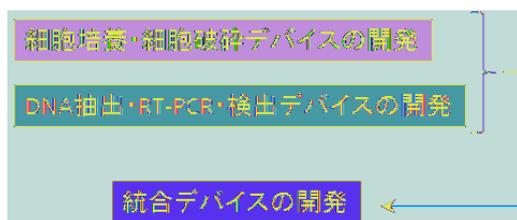


図 1 本研究の目的

## 3. 研究の方法

gTOW 法は、標的の遺伝子がクローニングされたプラスミドを酵母に導入し、培養増殖させ、そのプラスミドのコピー数の増加を定量する方法である。具体的には、gTOW 法は図 2 のような流れ操作からなり、これらの一連の操作が可能な微小デバイスを構築すればよい。

図 2 の一連の操作は、培養→細胞破碎と DNA 抽出→リアルタイム PCR→蛍光検出の 2 つに分けて考えることができる。これらを同時に進め、2 つデバイスを開発した後に、一連の操作を 1 枚のチップ上で実現することを目指す。最終年度に開発したデバイスの性能評価・改良・最適化を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞培養・細胞破碎デバイスの開発

これまでに報告されているマイクロデバ



図 2 gTOW 法の流れ

イス内での細胞培養のほとんどは、接着性細胞に限定されており、浮遊性細胞の培養技術の開発だけでも十分意義深い。本研究では、流路内に細胞回収用のピラー構造を作製した新規の細胞培養システムを開発した。図 3 にその概略を示す。マイクロデバイスでは、流路に対して斜めに配列された円柱状構造体を持つ細胞回収機構によって特定の幅の相似な流れが形成される。流れの幅以上の粒子半径を持つ酵母を 1 箇所回収し、還流システムによって再び導入することで、培地交換も同時に達成できる。作製したデバイスを用いて酵母の回収を評価したところ、導入した酵母の 72.3% を回収することに成功した。また、回収率は流体の流量ではなく、円柱状構造体の配列角度に依存していることが明らかとなった。また、還流システムについては、シミュレーションにより、最適化を行い設計した。

このシステムにおける細胞破碎は、培地導入口から細胞破碎液を導入することで行うことができる。

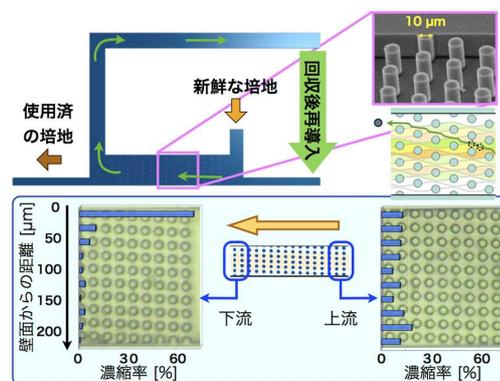


図 3 細胞培養・細胞破碎デバイスの概略

### (2) DNA 抽出・RT-PCR・検出デバイスの開発

図 4 の示す流路デザインの DNA 抽出・リアルタイム PCR (RT-PCR)・検出デバイスを作製した。測定システムは、温度制御用のペルチェ素子、反応場として用いるマイクロデバイス、DNA 検出のための蛍光顕微鏡から構成される。図 5 に測定システムの概略を示す。反応の検出は、デバイスとペルチェ素子が接触している側の反対側から、DNA にインターカラーとした蛍光分子からの蛍光を観察した。上下 2 本の流路は、それぞれ目的遺伝子と参照遺伝子の観察用流路である。

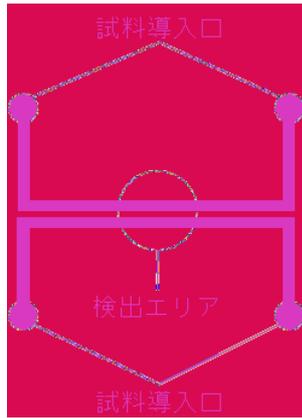


図4 DNA抽出・RT-PCR・検出デバイスの流路デザイン

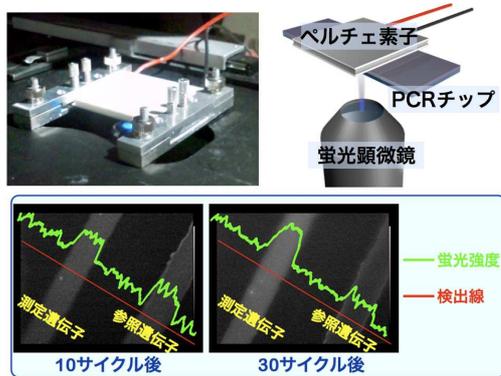


図5 測定システムの概略

図6に構築したシステムの温度応答性を温度センサーを用いて評価した結果を示す。図6より、リアルタイムPCRに必要な温度サイクル(95°C→60°C→72°C)が実現できていることを確認した。

鋳型DNAは、ウラシルおよびロイシン要求性を持つプラスミド(pTOWug2)によって形質転換させた酵母から抽出した。プライマーには、プラスミド上のLEU2に作用するプライマー対(F: GCTAATGTTTTGGCCTCTC, R: ATTTAGGTGGGTTGGTTCT)と、酵母の染色体上のLEU3に作用するプライマー対(F: CAGCAACTAAGGACAAGG, R: GGTCGTTAATGAGCTCC)の2組のプライマーを使用した。前者を測定遺伝子、後者を参照遺伝子とした。図7に開

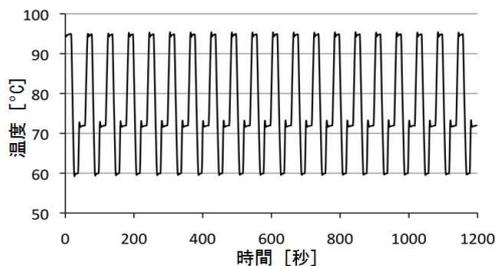


図6 構築したシステムの温度応答性(PCRサイクル)

発したデバイスで測定遺伝子と参照遺伝子のPCRをそれぞれリアルタイム観測した結果

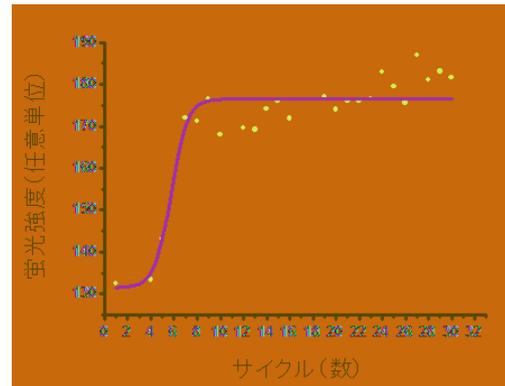


図7 増加曲線(リアルタイムPCR)

を示す。これにより、リアルタイムPCRが可能であることを確認した。

### (3) 統合デバイスの開発

培養・細胞破碎デバイスとDNA抽出・リアルタイムPCR・検出デバイスを統合した統合デバイスを試作したが、温度昇降に伴い溶液の漏れが発生することが分かった。これを解決するために、光硬化性樹脂とテフロンフィルムを利用した新規マイクロバルブを開発した。図8にマイクロバルブの概略を示す。このバルブは、加熱すると反応場の下部に作製されたチャンバーが膨張し、自発的に反応場を隔離するバルブとなる。このバルブを用いることで、PCR時に溶液の漏れをなくすことに成功した。

最後に、上記バルブを組み込んだ統合デバイスを試作し、その性能評価・最適化を行った。これにより、細胞培養から遺伝子発現解析までの一連のバイオアッセイが可能なマイクロバイオデバイスの開発に成功した。

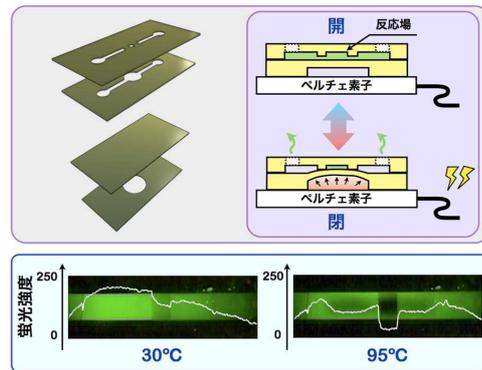


図8 新規マイクロバルブ

### 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 8 件)

- ① 杉浦佳奈子、加地範匡、岡本行広、渡慶次学、馬場嘉信、電気学会論文誌 E、130 巻、471-475 (2010)、査読有
- ② Hiroshi Yukawa, Yukimasa Kagami, Masaki Watanabe, Koichi Oishi, Yoshitake Miyamoto, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Noritada Kaji, Hirofumi Noguchi, Kenji Ono, Makoto Sawada, Yoshinobu Baba, Nobuyuki Hamajima, Shuji Hayashi, Biomaterials, 31, 4094-4103 (2010). 査読有
- ③ Kanako Sugiura, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Proc.  $\mu$ -TAS 2009, 2, 1243-1245 (2009). 査読有
- ④ Toyohiro Naito, Ai Yatsuhashi, Noritada Kaji, Taeko Ando, Kazuo Sato, Hisao Moriya, Hiroaki Kitano, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Proc.  $\mu$ -TAS 2009, 1, 627-629 (2009). 査読有

[学会発表] (計 32 件)

- ① 内藤豊裕、加地範匡、岡本行広、渡慶次学、馬場嘉信、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 11 日、要旨集
- ② Toyohiro Naito, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, International Symposium : Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules (ISSMA 2011), 2011 年 1 月 24 日, Kyoto, Japan.
- ③ Toyohiro Naito, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), 2010 年 12 月 16 日, Hawaii, USA.
- ④ Kanoko Sugiura, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2009), 2009 年 10 月 3 日, Jeju, Korea.
- ⑤ Toyohiro Naito, Ai Yatsuhashi, Noritada Kaji, Taeko Ando, Kazuo Sato, Hisao Moriya, Hiroaki Kitano, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2009), 2009 年 10 月 2 日, Jeju, Korea.
- ⑥ 八橋愛、内藤豊裕、加地範匡、岡本行広、渡慶次学、馬場嘉信、第 19 回化学とマイ

クロ・ナノシステム研究会、2009 年 5 月 29 日、広島大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/III-2/baba-ken/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡慶次 学 (TOKESHI MANABU)

名古屋大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：60311437

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

馬場 嘉信 (BABA YOSHINOBU)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：30183916

加地 範匡 (KAJI NORITADA)

名古屋大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：90402479

張 勇 (CHAN YU)

名古屋大学・大学院工学研究科・研究員  
研究者番号：40467329