

平成 22 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20860017
 研究課題名（和文） 誘電泳動による細胞パターンニング法を用いたチップ上での動物モデルの作製
 研究課題名（英文） Dielectrophoresis-based cell patterning for cell culture chip

研究代表者
 伊野 浩介（INO KOSUKE）
 東北大学・大学院環境科学研究科・助教
 研究者番号：00509739

研究成果の概要（和文）：本研究では、誘電泳動による細胞パターンニング法の開発を行い、細胞チップの作製を目指した。誘電泳動とは分極した微粒子が不均一な電場中を泳動する現象であるが、微細な電極を用いる事で、不均一な電場を形成させて自由に微粒子を操作する事が可能である。そこで、本研究では、電極デバイスのデザイン、電場シミュレーションを行い、様々な誘電泳動用電極デバイスを開発した。本研究では、これらのデバイスを用いて、細胞などの生体微粒子を高解像度にパターンニングする事に成功しており、本デバイスの組織工学などへの応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, dielectrophoresis-based cell patterning was developed for cell culture chip. Electrodes were designed and electric field simulations were performed to manipulate bioparticles toward target areas. Based on the simulation results, several kinds of devices were fabricated for the formation of localized and non-uniform electric fields. When an appropriate AC voltage was applied to the electrode, array patterns of microparticles such as polystyrene beads, yeasts and cells were rapidly fabricated on the target substrate with ease. The results suggest that the devices can be widely applied for tissue engineering and drug screening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,530,000	759,000	3,289,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能 バイオプロセス

キーワード：誘電泳動、細胞パターンニング、細胞チップ、バイオ MEMS

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、薬物代謝や毒性試験には、マウスやラットを用いた動物実験が行われている。動物実験は生体に近いデータが得られるが、動物愛護の観点から、動物実験に反対する声

は大きい。したがって、実験動物を用いない系の確立が強く求められている。

実験動物を用いない実験系として、培養細胞を用いた系がある。培養細胞を用いた系は実験動物を必要とせず、安価で簡単であるが、

通常の培養法による細胞は生体組織を大きくかけ離れているため、期待するデータが得られない場合がある。したがって、有用なデータを得るためには、細胞を緻密に配置し、生体に近い状態を再現する必要がある。そこで、本研究では誘電泳動と呼ばれる物理化学現象に注目し、細胞などの生体微粒子のパターニング法の開発を行った。

2. 研究の目的

誘電泳動は、不均一な電場内で微粒子が泳動する現象である。したがって、不均一な電場を形成させる事で、細胞などの生体微粒子を目的の場所に配置できる。そこで本研究では、誘電泳動により細胞を操作する事が可能な微小電極デバイスの開発を行った。また、そのデバイスを用いた細胞のパターニングを行った。

3. 研究の方法

誘電泳動により微粒子を泳動させるためには、不均一な電場を形成させる必要がある。そこで、まず始めに、電極のデザインとシミュレーションを繰り返し、目的の形に微粒子をパターニングできるような電極デバイスの形状を決定した。続いて、リソグラフィの技術を用いて、微小電極を作製した。

動物細胞のモデルであるポリスチレンビーズを用いて、電極デバイスの評価を行った。評価後、酵母や動物細胞のパターニングを行った。

4. 研究成果

(1) まず始めに、電極のデザインと電場シミュレーションを行った(図1)。このデザインした電極は、アレイ状の不均一な電場を形成するため、微粒子をアレイ状にパターニングさせることが可能である。さらに誘電泳動による微粒子の動きをシミュレーションしたところ、培養基板上に微粒子がパターニングできる事を確認した(図2、3、表1)。そこで、デザインした電極を作製して(図4)、誘電泳動で微粒子をパターニングしたところ(図5)、高解像度にアレイ状に微粒子をパターニングする事に成功した(図6)。

現在、様々な誘電泳動を用いた細胞パターニング法が開発されているが、それらの手法の多くは、電極基板側に細胞をパターニングする手法であり(Biotechnol J, 1, 949-957, 2006)、培養基板が限定されてしまう場合がある。一方、本研究で開発した手法は、培養基板側に微粒子を押し付けるため、培養基板を制限しない。したがって、本デバイスを用いる事で、様々な応用が可能であり、そのインパクトは大きい。

1 細胞解析などの分析の分野においても、細胞パターニングは重要である。本手法は、

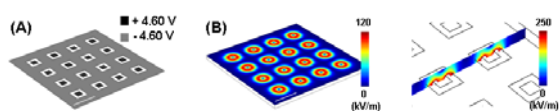


図1 電場シミュレーション。(A) デザインした電極デバイス。格子型電極(灰色)とドット型電極(黒色)にそれぞれ+4.60 V、-4.60 Vを印加。(B) 電極デバイスから30 μm上方(左)と断面(右)の電場の様子。

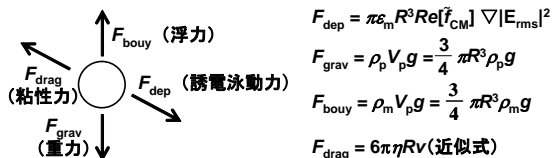


図2 微粒子の働く力。微粒子の動きのシミュレーションには、誘電泳動力、粘性力、浮力、重力を考慮し、図中の式を用いた。使用したパラメータを表1に示す。

表1 各パラメータ

Parameter	Value	Unit
Medium viscosity	η	1.00×10^{-3} Pa s
Medium permittivity	ϵ_m	78 ϵ_0
Medium density	ρ_m	1.0×10^3 kg/m ³
Particle radius	R	3.0×10^{-6} m
Particle density	ρ_p	1.05×10^3 kg/m ³
Clausius-Mossotti factor	$\text{Re}[\tilde{\epsilon}_{CM}]$	-0.32
Gravitational constant	g	9.81 m/s ²
Permittivity of free space	ϵ_0	8.85×10^{-12} s ⁴ A ² /m ³ kg

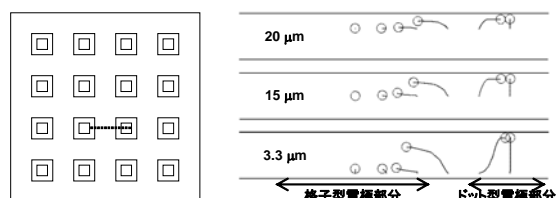


図3 各高さ(3.3 μm、15 μm、20 μm)におけるポリスチレン微粒子(6 μm)の動きのシミュレーション。電圧を印加してから0.1秒後までの軌跡。ドット型電極の上方に微粒子が押し付けられる。

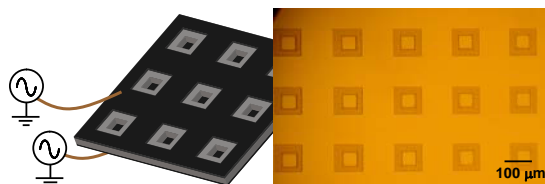


図4 作製した電極デバイス。デザイン通りに作製するために、多層構造の電極デバイスを作製した(左:イメージ図、右:顕微鏡写真)。

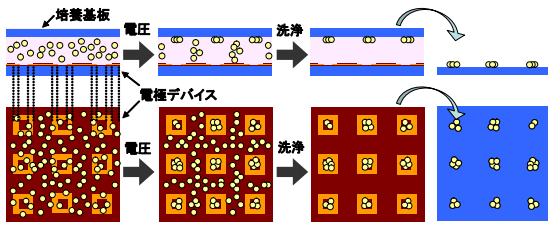


図5 実験スキーム。電極デバイスに培養基板を重ね、ポリスチレン微粒子 (6 μm) を基板側に押し付けた。余分な微粒子を洗浄し、微粒子ドットアレイを回収した。

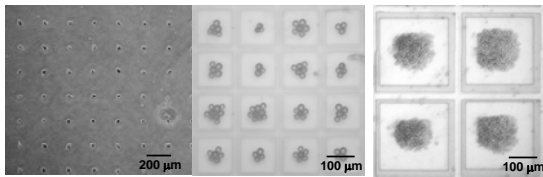


図6 微粒子のパターニング。(A) ポリスチレン微粒子 (6 μm) (B) ポリスチレン微粒子 (20 μm、回収前) (C) 酵母 (回収前)

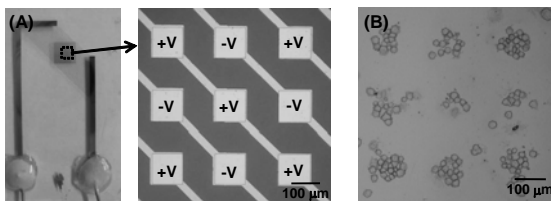


図7 細胞パターニング。(A) ドットクシ型電極デバイス。隣り合う電極で、位相が180°ずれるように交流電圧を印加。(B) 3T3 細胞のアレイ状パターニング。

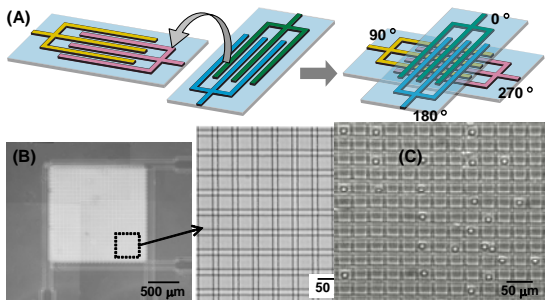


図8 3次元クシ型電極デバイスによる微粒子のパターニング。(A) 3次元的にクシ型電極を配置させ、それぞれの電極に0°、90°、180°、270°位相がずれるように交流電圧を印加。(B) 3次元クシ型電極デバイスの顕微鏡写真。(C) ポリスチレン微粒子のアレイ状パターニング。各格子点に微粒子が泳動した。

高解像度に微粒子のアレイ状パターニング能である。

本研究の成果は、生物化学工学の雑誌である *Biotechnology and bioengineering* に掲載された (雑誌論文②)。

(2) 図1-6で開発した電極デバイス以外にも、デザインの異なるデバイスも開発した。このデバイスも同様に、電極デザインとシミュレーションを繰り返し、電極デバイスの形状を決定した。このデバイスを用いて、培養基板側に3T3細胞 (マウス繊維芽細胞) を押し付け、3T3細胞のアレイパターンを取得した (図7)。

本研究では、細胞をアレイ状にパターニングしているが、繊維芽細胞上に肝臓細胞のアレイ状パターンを作製する事で、培養細胞でも高い肝臓機能を再現できる事が知られている (*Nat Biotechnol*, 26, 120-126, 2008)。現在、HepG2細胞 (肝ガン細胞) と3T3細胞の共培養を実施しており、肝臓モデル作製へ期待ができる。

(3) この他にも、3次元クシ型電極デバイスの開発にも成功しており、微粒子アレイ、細胞アレイの作製が可能になっている (図8、論文投稿準備中)。

このデバイスは、回転電場を誘導し、微粒子を回転させる事ができる (図9)。この回転の速度は、細胞膜を評価できるため (*Biotechnol Lett*, 29, 1307-1313, 2007)、本デバイス用いた細胞・組織評価への応用が考えられる。

(4) また、細胞の操作が可能なチップ型流路デバイスの開発にも成功しており、内分分泌攪乱物質の検出とった分析への展開を行った (雑誌論文①)。

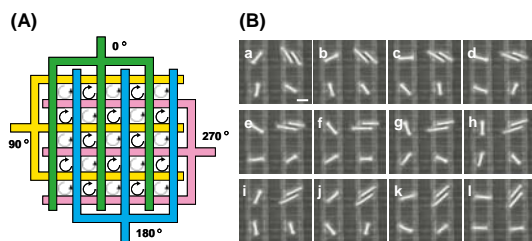


図9 3次元クシ型電極デバイスによる回転電場の形成。(A) イメージ図。各格子点に回転電場が形成される。(B) 微粒子の回転。回転の様子を分かり易くするために、ガラスロッドを使用した。スケールバー: 20 μm。

本研究では、電極デバイスの開発をメインで行い、様々なデバイスを開発した。主に細胞モデルであるポリスチレン微粒子でデバイス評価を行ったが、図 5、6 で示したように細胞でのパターンニングにも成功しており、細胞チップ作製への展開に期待できる。

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 Kosuke Ino, Yusuke Kitagawa, Tsuyoshi Watanabe, Hitoshi Shiku, Masahiro Koide, Tomoaki Itayama, Tomoyuki Yasukawa, Tomokazu Matsue, Detection of hormone active chemicals using genetically engineered yeast cells and microfluidic devices with interdigitated array electrodes, *Electrophoresis*, 査読有, Vol. 30, No. 19, 2009, pp. 3406-3012.

② Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Fumisato Ozawa, Tomoyuki Yasukawa, Tomokazu Matsue, Manipulation of microparticles for construction of array patterns by negative dielectrophoresis using multilayered array and grid electrodes, *Biotechnology and bioengineering*, 査読有, Vol. 104, No. 4, 2009, pp. 709-718.

[学会発表] (計 7 件)

① Kosuke Ino, Yusuke Kitagawa, Hitoshi Shiku, Masahiro Koide, Yoshiko Horiguchi, Tomoaki Itayama, Tomoyuki Yasukawa, Tomokazu Matsue, A microfluidic device with interdigitated array electrodes for detection of hormone active chemicals using genetically-engineered yeast cells, *Micro TAS 2009 (The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences)*, 2009 年 11 月 1 日-5 日, 韓国・Jeju

② 小沢文智, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一, 誘電泳動による生体微粒子のドットアレイパターン形成, 化学教育研究協議会東北大会, 2009 年 9 月 20 日-21 日, 福島

③ Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Fumisato Ozawa, Tomoyuki Yasukawa, Tomokazu Matsue, Construction of dot arrays of microparticles by negative dielectrophoresis using multilayered electrodes, *The 60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)*, 2009 年 8 月 16 日-21 日, 中国・北京

④ 伊野浩介, 小沢文智, 安川智之, 珠玖仁, 末永智一, 誘電泳動を用いた生体微粒子のアレイパターンニング, 電気化学会第 76 回大会, 2009 年 3 月 29 日-31 日, 京都

⑤ 伊野浩介, 小沢文智, 安川智之, 珠玖仁, 末永智一, 細胞アレイ作製に向けた誘電泳動用多層電極の開発, 第 18 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2008 年 12 月 8 日-9 日, 京都

⑥ 伊野浩介, 小沢文智, 安川智之, 珠玖仁, 末永智一, 生体微粒子のアレイ状パターンニングに向けた誘電泳動用多層電極の開発, 電気化学会東北支部 第 22 回若手の会, 2008 年 11 月 28 日, 福島

⑦ 伊野浩介, 小沢文智, 安川智之, 珠玖仁, 末永智一, 微小電極を用いた誘電泳動による三次元細胞パターンニング法の開発, 日本生物工学会 60 回大会, 2008 年 8 月 27 日-29 日, 仙台

[図書] (計 1 件)

① 末永智一, 伊野浩介, 珠玖仁 "lab on a chip" 技術で作製した電気化学的デバイスと組み替え酵母を利用した内分泌攪乱物質の検出, *化学センサ*, 24 巻, 4 号, 2008, 168-173

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~bioinfo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊野 浩介 (INO KOSUKE)
東北大学・大学院環境科学研究科・助教
研究者番号 : 00509739

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

末永 智一 (MATSUE TOMOKAZU)
東北大学・大学院環境科学研究科・教授
研究者番号 : 70173797

珠玖 仁 (SHIKU HITOSHI)
東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号 : 10361164