

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651152

研究課題名(和文)細胞操作システムの導入による生体分子間の結合力測定法の開拓

研究課題名(英文)antigen-antibody based on cell manipulation systems

研究代表者

水谷 文雄(Mizutani, Fumio)

兵庫県立大学・物質理学研究科・教授

研究者番号：80118603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：1万個のマイクロウェルアレイを有する電極を用いた誘電泳動により、迅速で簡便に大量の細胞を操作できる技術を開発し、細胞表面に発現する抗原と電極に固定化した抗体間の結合力計測に応用した。正の誘電泳動を用いると抗体を固定化した個々のマイクロウェルアレイ電極に数秒レベルで細胞を捕捉できた。免疫反応を進行させた後、負の誘電泳動を用いて捕捉された細胞の除去を行った。細胞を除去する際の負の誘電泳動に使用する電圧を増加させると、ウェルから除去させる細胞の割合が増加した。

研究成果の概要(英文)：Rapid and simple cell manipulation technique was developed by dielectrophoresis (DEP) based on the DEP devices consisted of an array of 10,000 (100 × 100) microwells and applied to the assay between the antigen expressed on living cells and antibody immobilized on electrodes in microwells. Cells were trapped within 1 s in the microwells by positive-DEP by applying an alternating current voltage between the upper ITO and the lower microwell array electrode. Negative-DEP was used to remove cells captured in microwells via immunoreactions. The ratio of the cells removed from microwells increased with increasing the intensity of the applied voltage for the removal of cells with negative-DEP.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：誘電泳動 結合力 ナノバイオテクノロジー 抗原抗体反応

1. 研究開始当初の背景

この約 20 年間に、細胞接着分子の接着力や抗原抗体反応などの力を測定するための手段として、光ピンセット、磁気ピンセット、原子間力顕微鏡(AFM)などが利用され、優れた手法が開発されてきた。しかし、これらはすべて単一細胞を対象とした計測法であり、個々の細胞を対象として丹念に実験を繰り返す、力の分布を得る必要があった。よって、この分野における簡易かつ迅速で、ハイスループットな新規計測手法の出現は強く望まれるところである。

我々は、最近、表面抗原を発現した細胞のみを迅速に捕捉する方法として、誘電泳動と免疫反応の融合を提案した。表面抗原を発現した細胞を正の誘電泳動(引力)を用いて集積化し免疫反応により捕捉する。さらに、負の誘電泳動(斥力)を用いて未反応細胞を分離した。この手法により超高速(1分)で表面抗原のスクリーニングを達成した。この際、大きな斥力を用いると免疫捕捉された細胞も解離されることがわかった。そこで、生体分子間結合により電極基板上に固定化された微粒子や細胞を負の誘電泳動による斥力を用いて「引き離す」ことにより、これらの「結合力」を計測可能であると着想し本提案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞接着分子や抗原抗体反応、糖-レクチンや相補的 DNA の結合などピコ~ナニュートン単位の生体分子の結合力を測定するための新手法の提案にある。誘電泳動を利用して微小電極を配置した基板の適切な位置に微粒子(細胞含む)を誘導し生体反応等を介して固定化する。次に、誘電泳動力を反転させ、固定化微粒子に斥力を加えて引き離す。そのときの誘電泳動力から結合力を計測する。本法は、誘電泳動による迅速性(1分程度)および電極セルと交流電源だけで計測可能と簡便性に優れ、数千個レベルの微粒子群を対象に一括で結合力測定が可能であるため統計学的解析に有利であることを特長とする。モデルとして CD33 修飾微粒子および HL60 細胞表面の CD33 抗原と抗 CD33 抗体の結合力測定を行い、本法の有効性を実証する。

3. 研究の方法

通常のリソグラフィを利用して、インジウム-スズ酸化物(ITO)製の透明導電性基板上に 10,000 個のマイクロウェルを有するマイクロウェルアレイ電極を作製した。ここでは、直径 30 μm 、高さ 25 μm のマイクロポールアレイを作製し、マイクロポールアレイで囲まれた領域をマイクロウェルアレイ電極として使用した。図 1 に、作製したマイクロウェルアレイ電極の顕微鏡写真を示す。円形領域がネガティブフォトレジストで作製されたマイクロポールであり、ポ

ールに囲まれた星形の部分が ITO 面の露出したマイクロウェルである。

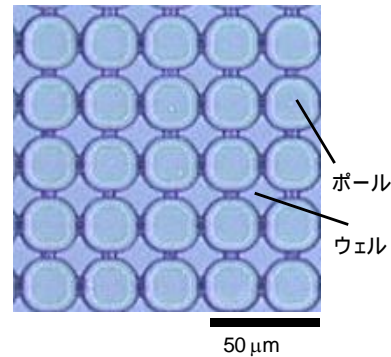


図 1. マイクロウェルアレイ電極の顕微鏡写真

このマイクロウェルアレイ電極をシラン化剤および化学架橋剤を用いて処理し、表面をスクシンイミド活性エステル化し、アミノ基を有する抗体(抗 CD33 抗体)を固定化した。さらに、ウェルアレイ電極をポリエチレングリコール鎖を有するシランで処理し、細胞の非特異的な吸着現象を抑制させた。マイクロウェルアレイ電極上に ITO 電極を設置し、マイクロ流路構造を構築して細胞操作のために誘電泳動デバイスを完成させた。

図 2 に、誘電泳動デバイスを利用した細胞のマイクロウェル内への導入方法および免疫捕捉された細胞の除去方法を示す。マイクロ流路の高さを 30 μm に設定した。まず、マイクロ流路に、CD33 抗原を発現している HL-60 細胞(ヒト骨髄性白血病細胞株, $4.0 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$)を導入した(図 2A)。次に、上面の ITO 電極および下面のマイクロウェルアレイ電極間に交流電圧(電圧強度: 20 V_{pp}, 周波数: 1.0 MHz)を印加し細胞をマイクロウェルアレイ内へと導入した(図 2B)。この際の細胞捕捉時間、単一細胞の捕捉効率について詳細に検討した。さらに、マイクロ流路内に誘電泳動用の溶液を導入し、ウェル内に導入されなかった細胞を除去した(図 2C)。最後に、上下の電極に交流電圧(周波数: 500 kHz)を印加し細胞をマイクロウェルアレイから除去するために必要な電圧を調査した。

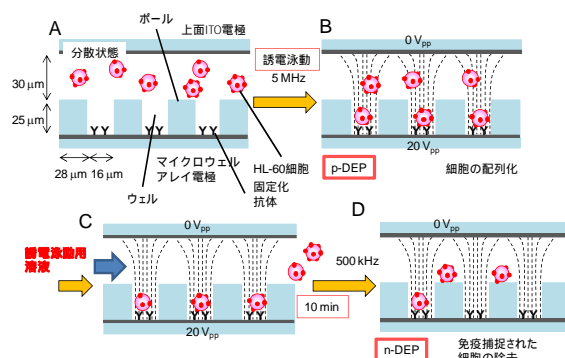


図 2. 誘電泳動デバイスを利用した細胞のマイクロウェル内への導入方法および免疫捕捉された細胞の除去方法

4. 研究成果

誘電泳動デバイスを利用して細胞捕捉を調査した。蛍光色素を用いて緑に染色した細胞を誘電泳動デバイスに導入し、上下の電極に交流電圧を印加した。図3に、交流電圧印加前後の蛍光顕微鏡写真を示す。電圧印加前にマイクロ流路内でランダム分散している細胞は、わずかな流れにより一定方向に移動していた(図3A)。ここで、交流電圧をすると、細胞は瞬時(1秒以内)にマイクロウェルの存在位置で移動を停止しウェル内に導入された。これは、交流電圧の印加によりデバイス内に不均一電場が形成され、さらに、細胞に正の誘電泳動の作用する周波数領域の交流電圧を印加したためである。すなわち、細胞は正の誘電泳動により電場強度の強いマイクロウェルアレイ内へと移動した。

図3Bは、マイクロ流路内に誘電泳動用溶液を流し、余分な細胞を除去後の蛍光顕微鏡写真である。1個のウェルに2個以上の細胞が捕捉されることもあるが、ウェルの上側に捕捉された細胞は、流路内への溶液導入により下流へ流された。しかし、ウェルの下側に捕捉された細胞は、流れにより下流へと流されることなくウェル内にとどまった。これは、マイクロウェルの横幅を単一細胞サイズ、高さを2個の細胞サイズで作製できているためである。図3Cに正の誘電泳動により捕捉された細胞の光学顕微鏡写真を示す。個々の細胞が、マイクロポールアレイに囲まれたマイクロウェル内に捕捉されている様子がよくわかる。これらの結果から、正の誘電泳動を用いると、簡便で迅速にマイクロウェルアレイ電極上に細胞アレイを作製できることを示せた。

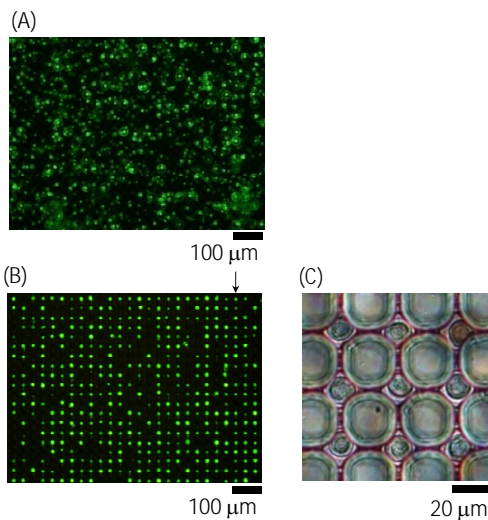


図3. 正の誘電泳動を用いた蛍光染色細胞のマイクロウェル内への捕捉。(A)交流電圧印加前の蛍光顕微鏡写真。(B)交流電圧を印加し、余分な細胞を除去後の蛍光顕微鏡写真。(C)マイクロウェル内に捕捉された細胞の光学顕微鏡写真。

図4Aに、図3Bの矢印で示した列に沿った

蛍光強度を示す。この列には、20個のマイクロウェルアレイが存在する。等間隔に蛍光シングルが観測されている。これらの蛍光シングルは、マイクロウェルに捕捉された蛍光染色細胞に相当する。蛍光シングルは、マイクロウェル間の領域からは観測されない。すなわち、ほとんどすべての捕捉されなかった細胞が、流路への溶液導入(図2C)によって除去されたことを示している。図4Aの左側から9番目と7番目のマイクロウェルの顕微鏡写真を図4Bおよび4Cに示す。9番目のマイクロウェルには細胞が捕捉されていないので、ウェルから蛍光は観測されない。しかし、7番目のウェルには単一細胞が捕捉されているため、明らかに蛍光シングルが観測されていることがわかる。2つの細胞が捕捉されている4番目のウェルから得られた蛍光シングルは、単一細胞が捕捉されたウェルから得られた蛍光強度と比較してわずかに大きい。これは、細胞がウェル内で縦方向に配列して捕捉されているためである(図4D)。

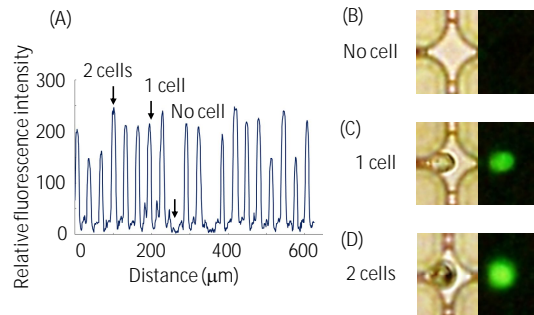


図4.(A)図3Bの矢印で示した列に沿った蛍光強度。マイクロウェルに捕捉された細胞の光学および蛍光顕微鏡写真。(B)左側から9番目,(C)7番目および(D)4番目。

1個のマイクロウェルに捕捉された細胞の数とマイクロウェルから得られた蛍光強度の関係を調査した。単一細胞が捕捉されたマイクロウェルから得られた相対蛍光強度は、100-225であることがわかった。単一ピクセル(0.64 × 0.64 μm)から得られた蛍光強度の平均輝度を相対蛍光強度とした。マイクロウェル内への単一細胞の捕捉される捕捉率を評価したところ、10回の操作から65-85%とわかった。捕捉率の大きな差は、マイクロウェルアレイ上に存在する初期細胞濃度に大きく依存すると考えられ、現在、細胞の導入方法について検討を続けている。なお、誘電泳動操作を行わず、30分間細胞を誘電泳動デバイス内で放置したが、細胞はウェル内に取り込まれなかった。

この手法を用いて細胞をマイクロウェルアレイ内へと導入し、免疫反応により捕捉した。さらに、負の誘電泳動を用いて捕捉された細胞をウェル内から排除するために必要な電圧を調査した。正の誘電泳動を用いて細胞をマイクロウェル内に導入後、10分間保持して免疫反応を進行させた。その後、細胞に

負の誘電泳動が作用する周波数領域である 500 kHz の交流電圧を印加した。図 5 に、正の誘電泳動よりウェルに捕捉された細胞と、負の誘電泳動による細胞除去後の顕微鏡写真を示す。ここでは、負の誘電泳動による細胞除去のために $5 V_{pp}$ を印加した。正の誘電泳動により細胞はマイクロウェル内に導かれ細胞アレイを形成した(図 5A および 5B)。周波数を切り替え負の誘電泳動を作用させると、ウェルから除去された細胞は 1.8% とわずかであった(図 5C)。抗体未修飾のマイクロウェルアレイ電極を用いた場合には、除去率が 13% に向上した(図 5D)。すなわち、ウェル内で免疫捕捉された細胞は $5 V_{pp}$ に相当する力では排除されないことを示している。一方、負の誘電泳動による細胞除去時に $10 V_{pp}$ の電圧を用いると、抗体修飾マイクロウェルアレイ電極に捕捉された細胞も抗体未修飾マイクロウェルアレイ電極に捕捉された細胞も、ほぼ同じ割合でウェル外へと除去されることがわかった。すなわち、 $10 V_{pp}$ の電圧に相当する誘電泳動力は、細胞表面に発現している CD33 抗原とウェルに固定化した抗体間の免疫複合体の結合を切断するために十分な力であると考えられる。

今後、細胞の排除に必要な電圧の詳細な調査、デジタルシミュレーションによるウェル内電場強度解析および細胞のウェルアレイへの非特異吸着現象の抑制に関する研究を遂行し、結合解析デバイスの構築に取り組む。

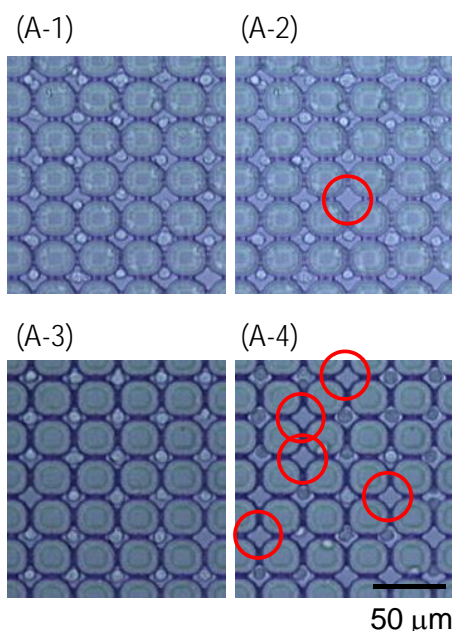


図 5.(A) 正の誘電泳動により抗体修飾マイクロアレイ電極に導入された細胞。(B) 負の誘電泳動により抗体修飾マイクロアレイ電極から細胞を排除後の顕微鏡写真。(C) 正の誘電泳動により抗体未修飾マイクロアレイ電極に導入された細胞。(D) 負の誘電泳動により抗体未修飾マイクロアレイ電極から細胞を排除後の顕微鏡写真。

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 7 件)

Y. Yoshimura, C. Fujii, M. Tomita, F. Mizutani, T. Yasukawa, Array of single-cell pairs on a microwell array based on positive dielectrophoresis, *Chem. Lett.*, 査読有, in press.

T. Horii, M. Yamamoto, T. Yasukawa, F. Mizutani, Rapid Formation of Cell-Particle Complexes via Dielectrophoretic Manipulation for the Detection of Surface Antigens, *Biosens. Bioelectron.*, 査読有, in press.

T. Yasukawa, Y. Yoshida, H. Hatanaka, F. Mizutani, Line patterning with microparticles at different positions in a single device based on negative dielectrophoresis, *J. Robot. Mechatron.*, 査読有, 2013, 25 (4), 650-656

T. Yasukawa, J. Yamada, H. Shiku, F. Mizutani, T. Matsue, Positioning of cells flowing in a fluidic channel by negative dielectrophoresis, *Sens., Actuator. B*, 査読有, 2013, 186, 9-16.

T. Yasukawa, H. Hatanaka, F. Mizutani, Simple detection of surface antigens on living cells by applying distinct cell positioning with negative dielectrophoresis, *Anal. Chem.*, 査読有, 2012, 84(20), 8830-8836.

M. Yamamoto, T. Yasukawa, M. Suzuki, S. Kosuge, H. Shiku, T. Matsue, F. Mizutani, Patterning with Particles Using Three-Dimensional Interdigitated Array Electrodes with Negative Dielectrophoresis and Its Application to Simple Immunosensing, *Electrochim. Acta*, 査読有, 2012, 82, 35-42.

T. Yasukawa, J. Yamada, H. Shiku, F. Mizutani, T. Matsue, Negative Dielectrophoretic particle positioning in a fluidic flow, *Intelligent Automation and Soft Computing*, 査読有, 2012, 18(2), 201-211.

[学会発表](計 14 件)

吉村友希, 安川智之, 富田昌弘, 水谷文雄, マイクロ孔アレイ電極を用いた誘電泳動による迅速な細胞ペアリング, 電気化学会第 81 回大会, 2014 年 3 月 29 日 - 31 日, 関西大学(大阪府吹田市)

T. Yasukawa, F. Mizutani, Simple and rapid sensing of surface antigen based on dielectrophoresis, 日本化学会第 94 春季年会(2014), 2014 年 3 月 27 日 - 30

日, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市千種区)

T. Yasukawa, Y. Minakuchi, H. Hatanaka, F. Mizutani, Discrimination of Cells with Specific Surface Antigens Based on Negative Dielectrophoretic Cell Positioning, 15th International Meeting on Chemical Sensors, 16-19 March 2014, UCA Conventional Center, Buenos Aires, Argentina

Y. Yoshimura, T. Yasukawa, M. Tomita, F. Mizutani, Rapid Fabrication of cell pattern with positive dielectrophoresis on micro-chamber array, 第 23 回日本 MRS 学術シンポジウム, 横浜市開港記念会館 (神奈川県横浜市), 2013 年 12 月 9-11 日

T. Yasukawa, F. Mizutani, Biosensors based on the manipulation of particles and cells with dielectrophoresis, International Conference on Surface Engineering (ICSE2013), 18-21 November, 2013, Haeundae Grand Hotel Busan, Korea

吉村友希, 安川智之, 富田昌弘, 水谷文雄, マイクロ孔アレイ電極を用いた誘電泳動による迅速な細胞アレイの作製, 2013 年電気化学秋季大会, 2013 年 9 月 27 日 - 28 日, 東京工業大学 (東京都目黒区)

水口悠暉, 安川智之, 水谷文雄, 負の誘電泳動による表面抗原発現細胞識別の細胞分化への適用, 日本分析化学会第 62 年会, 2013 年 9 月 10 日 - 12 日, 近畿大学東大阪キャンパス (大阪府東大阪市)

Y. Yoshimura, T. Yasukawa, M. Tomita, F. Mizutani, Development of microhole array with two different cells based on dielectrophoresis, JAIMA Discussion on Analytical Science and Technology, 幕張メッセ国際会議場 (千葉県千葉市), 2013. 9. 5 - 6

堀井拓真, 安川智之, 水谷文雄, 誘電泳動による迅速な細胞-微粒子複合体形成を指標とした細胞表面抗原識別, 第 27 回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 東北大学 (宮城県仙台市), 2013 年 5 月 23-24 日

安川智之, 畠中啓伸, 尾野諒平, 水谷文雄, 負の誘電泳動を用いた表面抗原発現細胞の識別, 日本分析化学会第 73 回分析化学討論会, 2013 年 5 月 18 日 - 19 日, 北海道大学 (北海道函館市)

安川智之, 水谷文雄, 誘電泳動による微粒子操作の生体分子計測への応用, 電子情報通信学会 OME・SDM 研究会, 屋久島環境文化村センター (鹿児島県屋久島), 2013 年 4 月 25 日 - 26 日

T. Yasukawa, H. Hatanaka, F. Mizutani, Rapid and Simple

Discrimination of Cells with Specific Surface Antigen with Dielectrophoresis, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Oct 2012, Okinawa
M. Furutani, T. Yasukawa, F. Mizutani, Development of rapid and simple biosensing system based on dielectrophoretic particle manipulation, RSC Tokyo International Conference, JASIS Conference, Makuhari Messe, Japan, September 6-7, 2012.

T. Yasukawa, H. Hatanaka, F. Mizutani, Rapid and simple discrimination of cell surface antigen based on dielectrophoretic manipulation, IUMRS-International Conference on Electronic Materials (IUMRS-ICEM 2012), 25 September, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/index-j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 文雄 (MIZUTANI Fumio)
兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・教授
研究者番号: 80118603

(2) 研究分担者

安川 智之 (YASUKAWA, Tomoyuki)
兵庫県立大学・大学院物質理学研究科・准教授
研究者番号: 40361167

(3) 連携研究者