

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24686032

研究課題名(和文) 光機能制御ゲルツールを用いた細胞内の光操作・計測

研究課題名(英文) Optical Manipulation and Measurement Using Optically-Controlled Gel-Tool for Intracellular Analysis

研究代表者

丸山 央峰 (Hisataka, Maruyama)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60377843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、pHや温度等の複数の細胞の状態を計測可能な蛍光微粒子センサを、細胞へ低侵襲に選択的かつ高速に導入する手法を提案する。細胞への選択的固定には、照射光の波長によってゼータ電位が変化する高分子を生体膜に導入し、任意にゼータ電位の正負を切り替えて細胞付着性を制御する。細胞内導入にはエンドサイトシスまたはリポフェクションを用いるが、光ピンセット操作による固定したセンサの周期的振動による細胞膜への力刺激により高速細胞導入を実現する。提案手法を用いて、細胞への低侵襲な選択的細胞固定及び高速細胞導入に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed selective and rapid injection of fluorescence sensor encapsulated in the artificial biomembrane into the cell for intracellular measurement. The biomembrane contains photochromic chemical, 1, 3, 3-Trimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylospiran (SP), for optical control of zeta potential. The structure of SP changes between spiropyran (SP) type and merocyanine (MC) type by UV/VIS illumination. Zeta potential of the biomembrane is switched from negative to positive by photoisomerization of SP. The sensor in the positive-charged biomembrane adheres to the cell membrane by electrostatic force since the cell membrane is negative-charged. The cyclic mechanical stimulus using optical tweezers is applied to the cell membrane for rapid injection of the sensor by membrane fusion and endocytosis. We demonstrated selective adhesion of the liposome to the cell membrane by optical control of zeta potential. We also demonstrated short-time injection of 1 μ m fluorescence sensor.

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

キーワード：マイクロ・ナノメカトロニクス 光ピンセット フォトクロミック材料 マイクロ流体チップ

1. 研究開始当初の背景

近年の生命科学分野の進展に伴い、ES 細胞や iPS 細胞に代表される再生医療や、遺伝子治療等が急激に進歩を遂げているが、細胞自体の機能や特性について未だ不明な点が多く残されており研究が盛んに行われている[1]. 大量の細胞を用いた生化学的解析は統計的な解析に有効であるが、細胞単位では平均された情報しか得られない。細胞個々の特性解析には単一細胞レベルでの計測が必要であり、マイクロ・ナノスケールでの操作及び計測技術が有効である[2]. 単一細胞計測により、従来解析が困難であった対象、例えばウイルス感染細胞の状態変化等を詳細に解析可能となる[3]. また細胞内はタンパク合成等により温度及び pH 等が変化することが考えられる。細胞内の状態計測には、マイクロ・ナノセンサを細胞内へ低侵襲かつ選択的に導入する技術が必要となる。

2. 研究の目的

細胞内へのセンサ導入法として、従来からマイクロインジェクション、エンドサイトーシス、リポフェクション等が用いられてきた。マイクロインジェクションは、先端径が数 μm のガラス管を細胞に挿入しセンサを細胞内に導入する、もしくは先端から高速に噴出された流体の力により細胞内へナノ粒子を導入する手法である[4]. 本手法はロボット技術を適用しやすいが、導入数の制御、細胞の損傷等が課題となる。エンドサイトーシスは、細胞が細胞膜に付着した約 $1\ \mu\text{m}$ 以下の物体を取り込む細胞活動の一つである[5]. リポフェクションは、導入する物質を包含した人工生体膜の微粒子と細胞膜の融合により物質を細胞内へ導入する手法である[6]. 両手法とも負にゼータ電位を有する細胞膜へ付着させるために正のゼータ電位を有する微粒子が用いられる。従来は微粒子の帯電状態を任意に制御する技術が無いため、細胞単位及び細胞上の任意の部位に選択的に微粒子を固定することは困難だった。またエンドサイトーシス及びリポフェクションは低侵襲であるが、導入速度は細胞活性に依存していた。

本稿では、pH や温度等の複数の細胞の状態を計測可能な蛍光微粒子センサを、図 1 に示すように細胞へ低侵襲に選択的かつ高速に導入する手法を提案する。細胞への選択的固定には、照射光の波長によってゼータ電位が変化する高分子を生体膜に導入し、任意にゼータ電位の正負を切り替えて細胞付着性を制御する。細胞内導入にはエンドサイトーシスまたはリポフェクションを用いるが、光ピンセット操作による固定したセンサの周期的振動による細胞膜への力刺激により高速細胞導入を実現する。提案手法を用いて、細胞への低侵襲な選択的細胞固定及び高速細胞導入に成功したので報告する。

3. 研究の方法

実験システム

本研究では、倒立顕微鏡(IX-71, オリンパス)にホログラフィック光ピンセット装置及び 3 次元レーザー共焦点蛍光観察装置を組み込んだシステムを

用いた[7]. 光ピンセットには近赤外レーザーと開口数 1.4 の 100 倍の油浸対物レンズを用いた。レーザーの波長は $1064\ \text{nm}$ 、出力は最大 $10\ \text{W}$ で可変である。 $1064\ \text{nm}$ の波長の光は生体及び水への吸収が少なく生体操作に適している。ホログラム生成には空間光変調器 (X10468-03, 浜松ホトニクス) を用い、 $80\ \text{ms}$ の応答速度で $60\ \text{Hz}$ でホログラムを生成し 30 点以上の同時多点操作が可能である[8]. ステージはピエゾ駆動の XYZ ステージ (P-563, Physik Instrumente GmbH co.) を用いた。このステージは $300\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m} \times 130\ \mu\text{m}$ の動作範囲を有する。蛍光観察にはレーザー共焦点ユニット (CSU-X1, 横河電機) を用いた。レーザーの波長は $488\ \text{nm}$ よ $561\ \text{nm}$ である。対物レンズ駆動用のピエゾステージ (P-E662, Physik Instrumente GmbH Co.) は $40\ \text{mm}$ の駆動範囲を有する。画像取得には冷却 CCD (iXon Ultra アンドール) を用いた。スピロピランの光異性化の制御のための紫外光照射は水銀ランプを用いた。ステージ上の細胞は細胞培養チャンバ(Zilcos, 東海ヒット)の中で温度 $37\ ^\circ\text{C}$ 、二酸化炭素の濃度 5% の環境で維持される。

pH・温度計測センサ

温度と pH の複数の状態を計測する蛍光微粒子センサを作製した。アミノ基を表面に有するポリスチレン (PS) ビーズに、温度感受性を有する蛍光色素のローダミン B を内部に導入し、pH 及び温度に感受性を有する蛍光色素 FITC を表面に修飾した[9]. PS ビーズの屈折率は約 1.5 と水 (屈折率: 約 1.33) より高く、光ピンセットにより細胞内 (屈折率: 約 1.38) において操作できる[10]. センサの作製プロセスについて述べる。

1. PS ビーズ溶液と Rhodamine B のエタノール溶液 ($100\ \text{mmol/l}$) を 1:1 の割合で混合する。
2. 1 分間攪拌後、5 分静置しビーズを染色する。
3. DI 水を加えた後遠心分離を行い、上澄み液を除去する。
4. PS ビーズを FITC の飽和水溶液に導入し 1 時間静置し、PS ビーズ表面のアミノ基と FITC のカルボキシル基を結合させ修飾する。

$1\ \mu\text{m}$ のビーズを用いて作製した蛍光センサの蛍光画像を図 3 に示す。Rhodamine B は $561\ \text{nm}$ の波長で励起し $580\ \text{nm}$ の蛍光を、FITC は $488\ \text{nm}$ の波長で励起し $515\ \text{nm}$ の蛍光をそれぞれ発する。Rhodamine B と FITC の励起波長は十分に離れているため干渉は生じない。蛍光強度は一般に式 1 で表される。

$$I(t) = I'_0 \cdot C \cdot \Phi \cdot \varepsilon \cdot \exp(-\varepsilon \cdot x \cdot C) \cdot \exp(-t/\tau) \quad (1)$$

I [W/m^3] は蛍光強度、 I'_0 [W/m^3] は励起光強度、 C [g/m^3] は蛍光色素の濃度、 Φ は量子収率、 ε は吸光係数、 x [m] は粒子サイズ、 τ [s] は蛍光寿命、 t [s] は励起時間、 Φ は蛍光色素の種類に応じて pH、温度、イオン濃度に依存する変数である。同じセンサにおいて、 C 、 ε 、 x は定数である。 I'_0 の時間揺らぎ

及び蛍光強度の時間的減少については同じ視野内にリファレンス用センサを設置し、計測用センサと比較することで補償でき、蛍光強度変化からの変化に対応する環境変化量を算出できる。また、複数のサイズのビーズを同時利用も可能である。

Rhodamine B は温度に対して、FITC は温度及び pH に依存性を有する。図 2 に 38°C, pH5 における蛍光強度を基準とした相対蛍光強度と pH 及び温度の校正結果を示す。Rhodamine B の蛍光強度は温度に強い相関性を有し、FITC は温度及び pH に強い相関性を示した。校正結果を式 2 及び式 3 に示す。

$$\Delta F_{R(Rho.B)} = -0.034 \cdot \Delta T \quad (2)$$

$$f(T) = -0.047 \cdot T + 1.93 \quad (3)$$

$$\Delta F_{R(FITC)} = f(T) * \Delta pH \quad (4)$$

$\Delta F_{R(Rho.B)}$ はローダミン B の相対蛍光強度変化、 ΔT [°C] は温度変化、 $f(T)$ は FITC の pH 感度 (温度の関数)、 T [°C] は温度、 $\Delta F_{R(FITC)}$ は FITC の相対蛍光強度変化、 ΔpH は pH 変化を示す。ローダミン B と FITC の蛍光強度を同時に取得することで、ローダミン B の計測結果と初期温度から FITC の pH 感度を補正でき、pH と温度の同時計測が可能となる。

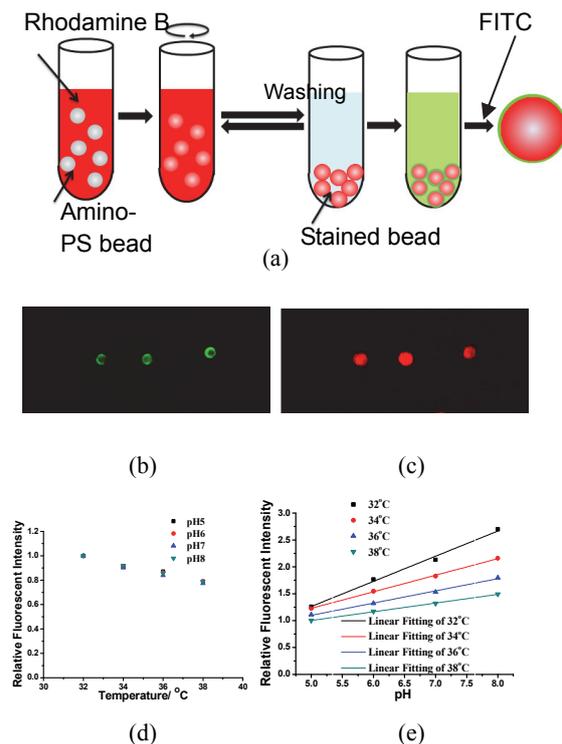


Fig. 2 Multi-fluorescence sensor. (a) A Schematic of fabrication process (b) Fluorescence from FITC (excited at 488nm). (c) Fluorescence from Rhodamine B (excited at 561nm). (d) Calibration of relative fluorescence intensity of Rhodamine B with pH and temperature. (e) Calibration of relative fluorescence intensity of FITC with pH and temperature.

光ゼータ電位制御による人工生体膜の付着制御

本研究では、センサを内包した人工生体膜の細胞膜への付着を制御するために、照射光の波長に応じて分子構造及びゼータ電位が可逆的に変化するフォトクロミック材料の 1,3,3-Trimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylo-spiran (SP) を導入した人工生体膜を作製した[11]. 人工生体膜のセンサへの被覆方法として、異なる電荷を有する脂質を用いて脂質二重膜を積層する手法を用いた。作製プロセスを図 3(a)に示す。

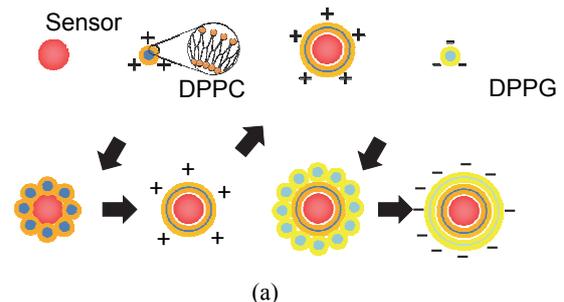
1. 正電荷の脂質である 1,2-dipalmitoylsn-glycerol-3-phosphatidylcholine (DPPC) と SP (40 mmol/l) の混合物の単層脂質カプセルを作製し、負のゼータ電位を有するセンサ表面に付着させる。
2. 超音波処理で脂質カプセルを融合し、センサ表面に正の脂質二重膜を 2 層積層する。
3. 負電荷の脂質である 1,2-dipalmitoylsn-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG) と SP (40 μmol/l) の混合物の単層脂質カプセルを作製し、正電荷の脂質膜表面に付着させる。
4. 超音波処理で脂質カプセルを融合し、脂質膜表面に負の脂質二重膜を 2 層積層する。

上記のプロセスにより、表面が負のゼータ電位を有する人工生体膜に内包されたセンサを作製する。脂質二重膜は 2 層ずつ積層され、合計 4 層の脂質二重膜となる (図 3(c)).

図 5 に SP の光異性化による分子構造変化を示す。SP は可視光下では閉環構造であり電的に中性であるが、紫外光を照射すると開環構造となりメロシアン(MC)に変化し表面電位が上昇する(図 4(a)). 静電センサ (qNano) の通過時間とゼータ電位計 (Zetasizer nano ZS, Malvern) を用いた校正結果を図 4(b)及び式 5 に示す。

$$V_z = 30.6 \cdot D - 15.6 \quad (5)$$

V_z はゼータ電位[mV], D は静電センサの通過時間[ms]である。UV を照射した人工生体膜表面の DPPG の静電センサの通過時間は 5.67 ms であり、ゼータ電位は 17.4 mV と負から正に変化するため、光により細胞付着性を制御できることを確認した。また SP の生体適合性を検証するため、培養環境中に SP を導入した環境で細胞培養を行い、図 4(c) のようにコントロールとほぼ同じ増殖を示し、生体適合性を確認した。



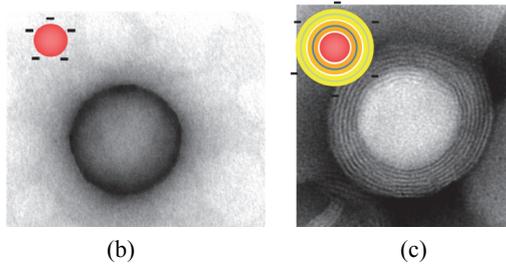
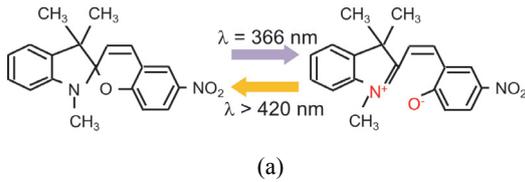


Fig. 3 Fabrication of artificial biomembrane (a) Fabrication process. (b) TEM image of sensor (100 nm). (c) TEM image of biomembrane (4 lipid bilayers) encapsulating sensor.



	Material and condition			
	PS bead	Amio-PS bead	DPPC (VIS)	DPPG (VIS)
Zeta potential mV	-54	-47.4	10.4	-73.2

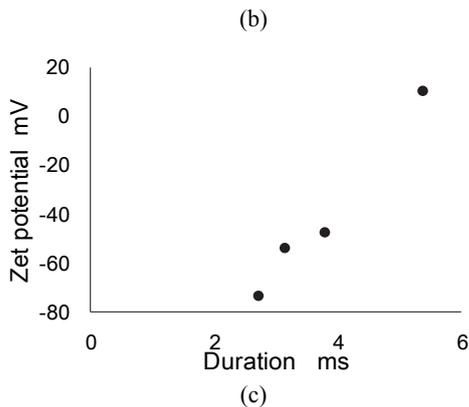


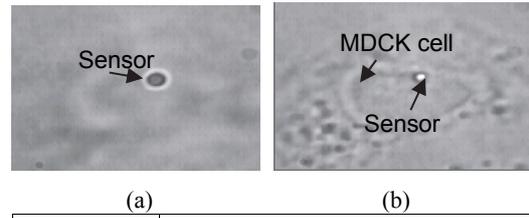
Fig. 4 Optical zeta potential control using SP (a) A schematic of photoisomerization of SP. (b) Zeta potential of materials. (c) Calibration result of duration with zeta potential.

4. 研究成果

光ゼータ電位制御による人工生体膜の選択的細胞付着

図 5 に光ピンセットを用いてセンサ内包人工生体膜を操作し、細胞（犬腎臓細胞、MDCK, 表面電位: -40.5 mV [12]) に対して光照射によりゼータ電位を制御し、選択的に細胞膜表面へ付着させた結果を示す。センサの比屈折率は約 1.6 であり培養液（比屈折率: 約 1.3）中において、光ピンセットで操作できる。光ピンセットで細胞膜上まで搬送後、紫外光を照射し人工生体膜のゼータ電位を負から正に変化させることで、細胞膜へ付着させることに成功した。付着の成功率は、正電荷の脂質膜と細胞膜の付着と同程度であり、紫外光未照射の生体膜は細胞膜へ殆ど付着しなかった。ま

た付着したセンサは、図 6 に示すようにそのサイズに応じた時間経過後に細胞内へ導入された ($1 \mu\text{m}$: 約 3 時間, $0.5 \mu\text{m}$: 約 2 時間)。細胞膜は赤色、センサは緑色の蛍光により識別している。



	Experimental condition		
	Sensor w/o UV illumination	Sensor with UV illumination	Sensor coated by DPPG lipid
Adhesion rate %	13	71	77

Fig. 5 Selective adhesion of the sensor. (a) Transport of sensor by optical tweezers. (b) After adhesion with UV illumination. (c) Adhesion rate of sensor with and without zeta potential control.

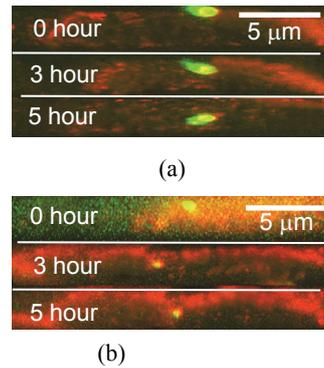
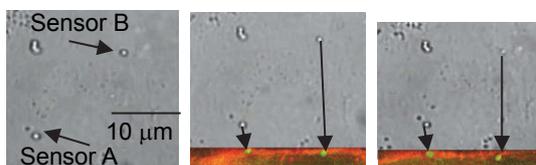
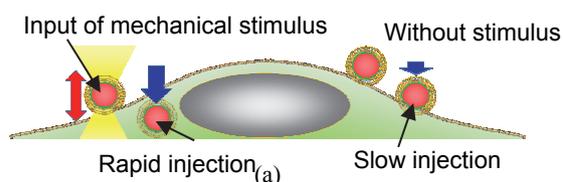


Figure 6. Cell injection of the sensor. (a) 3D image of cell injection of $1 \mu\text{m}\phi$ sensor without mechanical stimulus. (b) 3D image of cell injection of $0.5 \mu\text{m}\phi$ sensor.

振動印加によるセンサの細胞内導入の高速化と高効率化

細胞内導入の高速化を目的として、図 7(a)に示すように細胞膜へ付着したセンサを光ピンセットで垂直方向に周期的に動かすことで細胞膜へ力刺激を印加し、細胞導入時間の変化を観察した。図 7(b)-(d)に示すように、 $1 \mu\text{m}$ のセンサ B に対して $2 \mu\text{m}$ の振幅で 1Hz の周期で力を印加したところ、力を印加したセンサのみが 30 分以内に細胞内へ導入されることを確認した。これは力未印加時の 17% の時間である。また、細胞内導入率も力印加時には細胞内へ導入されないものもあったが、力を印加したセンサは全て細胞内に導入された。振幅と周期を変えた条件で実験したが、導入の高速化に適した条件があることが示唆された (図 7(e))。これは適切な条件による力印加により、細胞が物質を取り込む遺伝子または膜タンパク等の活性が向上したものを考えられるが、今後の課題である。



	Experimental condition		
	1 μmφ w/o stimulus	0.5 μmφ w/o stimulus	1 μmφ with stimulus
Average injection time hours	3	2	0.5
Injection rate %	60	75	100

(e)

Fig. 7. High throughput injection of the sensor by mechanical stimulus. (a) A schematic diagram of mechanical stimulus. (b) Before mechanical stimulus. (c) 10 minutes after (Upper optical microscope image, under: 3D slice image, green; sensor, red; cell membrane) (d) 30 minutes after. (e) Comparisons of average time and rate on sensor injection.

本課題では、細胞内の温度や pH 状態計測を実現するために、複数のパラメータを計測可能なマルチ蛍光センサを細胞内へ選択的かつ高速に導入する手法として、光ゼータ電位による選択的細胞付着と、光ピンセットによる力刺激による高速細胞導入を提案した。マルチ蛍光センサは温度と pH を計測することが可能であり、感度をお互いの計測結果を用いて補正することで正確な計測が実現できる。光ゼータ電位制御を用いることで不要なセンサの細胞付着を防止でき、細胞へ低侵襲な細胞内計測が実現できる。今後はウイルスに感染した細胞内でウイルス増殖時の細胞内の温度・pH 変化など、これまで明らかにされていなかったマイクロ・ナノスケールの計測へ適用を行っていく。

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.

著者名 : Hisataka Maruyama, Taisuke Masuda, Fumihito Arai

論文表題 : Fluorescent-Based Temperature Measurement with Simple Compensation of Photo-Degradation Using Hydrogel-Tool and Color Space Conversion

雑誌名 : Journal of Robotics and Mechatronics

査読の有無 : 有

巻 : 25

発行年 : 2013

最初と最後の頁 : 596-602

DOI : 無し

<http://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?mode=present&inputfile=ROBOT002500040002.xml>

2.

著者名 : Hengjun Liu, Hisataka Maruyama, Taisuke Masuda, Fumihito Arai

論文表題 : Multi-Fluorescent Micro-Sensor for Accurate Measurement of pH and Temperature Variation in Micro-Environment

雑誌名 : Sensors and Actuators B

査読の有無 : 有

巻 : 203

発行年 : 2014

最初と最後の頁 : 54-62

DOI : doi10.1016/j.snb2014.06.079

3.

著者名 : Hengjun Liu, Hisataka Maruyama, Taisuke Masuda, Fumihito Arai

論文表題 : Vibration-assisted optical injection of a single fluorescent sensor into a target cell

雑誌名 : Sensors and Actuators B

査読の有無 : 有

巻 : 220

発行年 : 2015

最初と最後の頁 : 40-49

DOI : doi:10.1016/j.snb.2015.04.135

〔学会発表〕 (計 1 件)

1.

発表者名 : 丸山央峰

発表表題 : 光誘起表面電位制御カプセルによる単一ナノ温度センサの選択的細胞導入と温度計測

学会等名 : ロボティクス・メカトロニクス講演会 2013

発表年月日 : 2013 年 5 月 23 日

発表場所 : つくば国際会議場

2.

発表者名 : Hisataka Maruyama

発表表題 : Selective Cell Injection of Fluorescence Particle Sensor Encapsulated in Fusogenic Liposome Using Optical Manipulation and Control of Surface Potential Using Photochromic Chemical

学会等名 : 2013 International Conference on Robotics and Automaton

発表年月日 : May 9, 2013

発表場所 : Karlsruhe (German)

3.

発表者名：丸山央峰
発表表題：光表面電位制御脂質カプセルを用いた細胞内状態計測のための蛍光センサの選択的細胞導入
学会等名：第 31 回日本ロボット学会学術講演会
発表年月日：2013 年 9 月 6 日
発表場所：首都大学東京

4.

発表者名：Hisataka Maruyama
発表表題：Optically-Controlled Selective Transfection of Particle Sensor Using Multilayered Liposome Containing Photochromic Chemical into a Cell Nucleus
学会等名：The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences
発表年月日：October 28, 2013
発表場所：Freiburg (German)

5.

発表者名：Hisataka Maruyama
発表表題：Selective Injection of Fluorescence Sensor Encapsulated in the Functional Lipid Capsule for Intracellular Measurement
学会等名：2013 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science
発表年月日：November 12, 2013
発表場所：Nagoya

6.

発表者名：Hisataka Maruyama
発表表題：Selective and Rapid Injection of Fluorescence Sensor Encapsulated in Liposome Using Optical Control of Zeta Potential and Local Mechanical Stimulus by Optical Tweezers
学会等名：2014 IEEE International Conference on Intelligent Robots and Systems
発表年月日：September 17, 2014
発表場所：Chicago

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞及び細胞集合体の蛍光酸素消費計測方法及び蛍光酸素消費計測システム
発明者：丸山央峰，新井史人
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2014-119977
出願年月日：平成 26 年 5 月 24 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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
丸山央峰 (Maruyama Hisataka)
名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：
60377843

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号：
なし

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：
なし