

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」
平成 18 年度採択研究代表者

H22 年度 実績報告

小寺秀俊

京都大学大学院工学研究科・教授

再生医療に向けたバイオ/ナノハイブリッドプラットフォーム技術の構築

§1. 研究実施の概要

本プロジェクトは、当研究グループに属する研究者がこれまで開発してきた細胞計測技術や細胞内への物質導入および MEMS・NEMS の創製技術と再生医療および再生科学を担当するものが有機的に連携し、細胞・組織の再生に関する研究シーズ・ニーズを元に、新たな研究手法としてのマイクロ・ナノシステムの構造と原理およびその使用方法を組織・細胞の再生の的確な実現に向けて進めるものであり、それぞれの研究者が強固に連携して開発を進める。

年次計画としては、最初の 3 年間で各々の要素技術の開発および集積化デバイスの構築を行うとともに、膵島細胞を構成する α 細胞・ β 細胞・ δ 細胞を対象に、細胞の分離技術さらに配置技術の開発、細胞間相互作用の計測方法の構築を行う。後半の 3 年では、前期 3 年の成果を元に、細胞間の相互作用および細胞の融合による初期化を行い、さらに細胞の分化・増殖へのバイオナノハイブリッドプラットフォームの利用を試みる。さらに細胞から組織の再構築を目指す。

平成22年度は、平成21年から開始した細胞間相互作用の計測、初期化細胞の取得および細胞再生、細胞組織の構築を継続して推進し、デバイスや細胞実験手技の改良を並行して行いながら、マイクロデバイスの細胞機能計測・再生医療における有効性を実証する。さらに、プラットフォーム技術としての確立に向けて、細胞機能計測・細胞間相互作用の計測デバイスおよび細胞融合デバイスのさらなる高度化とともに、膵島以外の細胞・組織へも適用可能な汎用性を実現する研究を行った。

§2. 研究実施体制

(1) 細胞配列・相互作用計測グループ

①研究分担グループ長: 小寺秀俊 (京都大学大学院工学研究科、教授)

②研究項目:

- 1) 細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発
- 2) 細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御
- 3) 臓器組織の人為的構築

(2) 「再生・分化誘導」グループ

①研究分担グループ長: 藤田博之 (東京大学生産技術研究所、教授)

②研究項目

- 1) 細胞内物質導入・細胞質移植のためのマイクロデバイスを用いた高効率細胞融合法の開発
- 2) 細胞系の組立・カプセルングのための MEMS 技術の開発
- 3) 膵 β 細胞のモニタリングのための MEMS センサの開発

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

A. 細胞配列・相互作用計測グループ

(1)研究題目:

細胞配列・相互作用計測のためのバイオナノプラットフォーム技術の構築

- 1) 細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発
- 2) 細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御
- 3) 臓器組織の人為的構築

(2)研究の目的および内容

生体から分離した細胞を配置し、長期間培養でき、細胞間相互作用の因子分析が可能なマイクロ流体デバイスと細胞保持構造の構築を行う。それを用いて異なる種類の細胞を所望の位置に配置し、その活性を維持しつつ、細胞個々に各種刺激(化学的・物理的)を加え、細胞間伝達物質を拡散させてしまうことなく隣接する細胞に制御された形で導き、1細胞レベルでの細胞間相互作用の計測を行う。また1細胞内で起きる刺激応答反応にも着目し、局所薬剤刺激に対する細胞内応答の高空間・時間分解能を持った計測を実現する。さらに、これらデバイスを集積化し、臓器組織の人為的な構築技術の研究開発を行う。

具体的には、実際に脾島から分離した細胞間の相互作用・細胞内刺激応答を計測するとともに、再構築による機能発現に関する研究を実施する。また、細胞内物質導入による分化・増殖の誘導の実験を幹細胞などを用いて実施する。細胞・組織の実験は雇用研究員とともに医学研究科・再生医科学研究所の興津・三浦・多田・岩田が担当し、デバイスは雇用研究員とともに小寺・鈴木が主体となり、他の機関のデバイスグループと連携し研究を進めた。

(3)本年度の研究実施項目・概要

最初の3年間で各々の要素技術の開発および集積化デバイスの構築を行うとともに、脾島細胞を構成する α 細胞・ β 細胞・ δ 細胞を対象に、細胞の分離技術さらに配置技術の開発、細胞間相互作用・細胞内刺激応答の計測を行う。後半の3年では、前期3年の成果を元に、細胞間の相互作用および細胞の融合による初期化を行い、さらに細胞の分化・増殖へのバイオナノハイブリッドプラットフォームの利用を試みる。さらに細胞から組織の再構築を目指している。

平成22年度は平成21年度から開始した、①細胞間相互作用解析・細胞内刺激応答解析、②細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御、③臓器組織の人為的構築の実験を継続して進め、これまでに開発したシステムの実証を行った。

テーマ1)と2)は共通のデバイスを用いた実験系であることから、まとめて概要を示し、次に3)の概要を述べる。

1)細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムの開発(小此木・寺尾・横川・鈴木・岩田・興津・小寺)

2)細胞内物質導入・細胞質移植を通じた分化・増殖の誘導と制御(木村・ムラト・小穴・鷺津・岩田・多田・小寺)

平成21年度までに、細胞間相互作用解析のための集積化マイクロ化学分析システムとして、複数の細胞を配列し細胞間相互作用を解析するシステム(1,2-1)と、単一細胞に局所刺激を与え細胞内応答を解析するシステム(1,2-2)について、デバイスおよび実験装置を開発してきた。平成22年度は、システムの実証実験を行うとともに、膵島細胞の刺激応答に関する生物学的知見を得ることを目的に研究を遂行した。

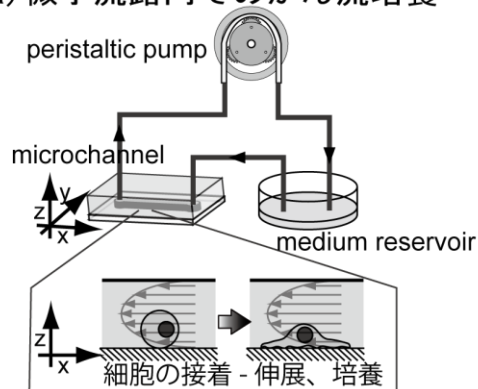
1,2-1)細胞間相互作用解析

膵島の微小循環に依存する液性細胞間相互作用と細胞同士の配置に依存する接触性細胞間相互作用によるインスリン分泌制御の分析デバイスの開発を行い、細胞間相互作用を計測することが本項目の目標である。そのため、マイクロ流路とオリフィスアレイを作製し、マイクロオリフィスに細胞を吸引・固定し、マイクロ流路を用いて細胞を刺激し、細胞からの拡散および細胞を固定した流路における流れ場により生ずる液性細胞間相互作用を計測するためのデバイス開発および計測を行った。

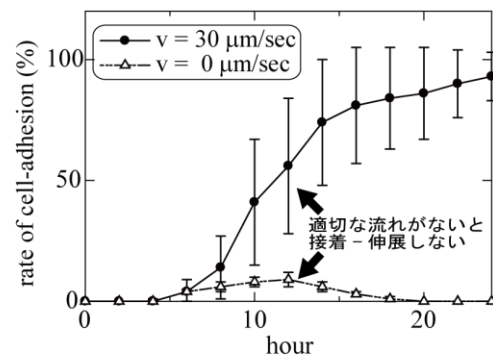
細胞間コミュニケーションを計測するには細胞活性の維持が不可欠であるが、流路内に置かれた細胞では細胞周囲の溶液の流れの有無がその細胞活性に大きく影響を及ぼすことがわかった(図 A-1-1 b)。そこで、まず、“流れのある流路内で培養した細胞”が“流れがない培養皿で培養した細胞”と同様の性質を示すか確かめるため、両者の“細胞の増殖速度”と“接着面積”を比較した。その結果、両者の間で有意な差はなく同様な細胞の性質をもつことが確かめられた(図 A-1-1 c, d)²⁾。

次に、細胞にグルコース刺激およびインスリン刺激を与え、細胞から放出されるインスリンにより刺激を受けていない他の細胞が反応するかを計測した。反応の計測には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とインスリン顆粒の分泌を指標にして蛍光顕微鏡観察を行った。目標とする膵島細胞 1 個のみにグルコース刺激を与えることが可能であるこのデバイスを用いて(図 A-1-2)、刺激を与えた細胞から周囲の細胞へ刺激応答の反応(細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇)の伝播が計測可能であることが実証された((図 A-1-3)。このデバイスを用いて、平成22年度末から平成23年度にかけて細胞間相互作用が細胞機能を調節する“細胞の学習効果”の計測結果を得る。

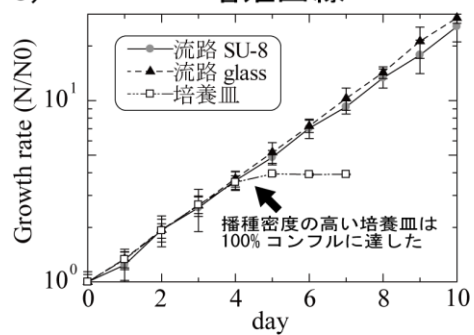
a) 微小流路内でのかん流培養



b) 接着 - 伸展した細胞の割合



c) 増殖曲線



流路と培養皿の間に有意差はない

d) 接着面積 (投影面積)

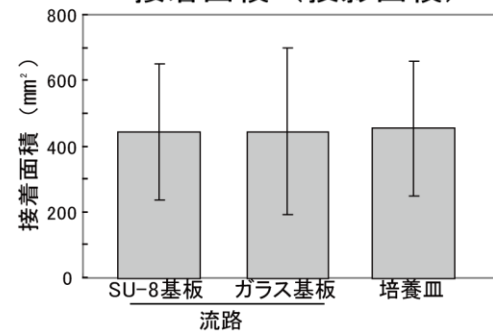


図 A-1-1 流路内で細胞活性維持

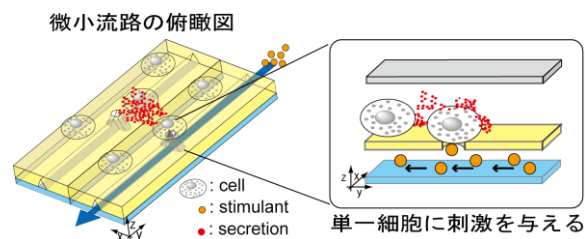


図 A-1-2 細胞間相互作用の計測の方法

刺激を与えた細胞から周囲の細胞へ刺激応答の反応の伝播

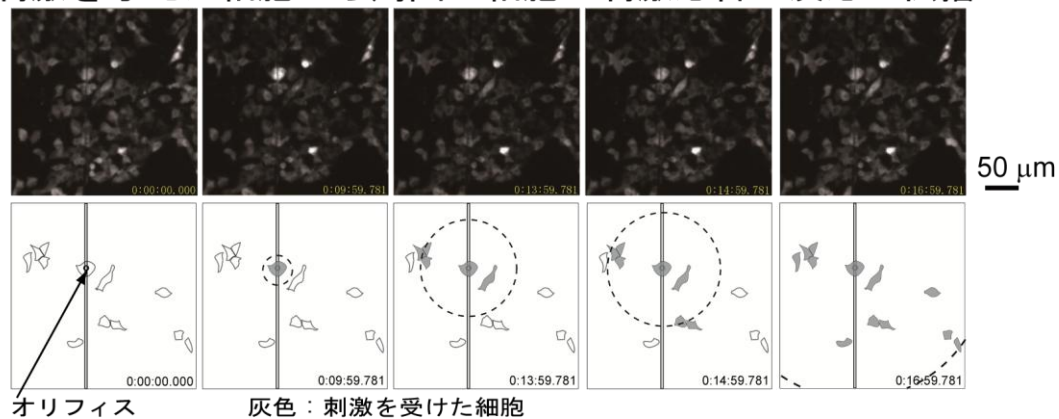


図 A-1-3 細胞間相互作用の計測

1,2-2) 細胞内刺激応答解析

生体内の膵島細胞には極性があり、動脈側血管に接した面でグルコース・液性細胞間伝達物質による刺激を受け、静脈側血管にインシュリン等の分泌を行うとされている。しかし、細胞の一部に刺激を受けたときの細胞応答を解析する技術は未だ確立されていない。本研究では、局所刺激デバイスを開発し、細胞の極性形成に関する知見を得ることで、膵島の再構築に応用することを目指している。

平成 22 年度は、平成 21 年度に開発した局所刺激デバイスを実際の膵 β 細胞を用いた刺激実験に用いるため、デバイス内での細胞培養を検討し、さらにインスリン GFP 発現株を用いてグルコース局所刺激に対する細胞内応答についてデータの取得を開始した。具体的には、流路内の圧力調節が容易な PDMS(ポリジメチルシロキサン)デバイスを設計製作し、流路内での膵 β 細胞の安定培養を実現した(図 A-2-1)。本デバイスを用いて、局所グルコース刺激に対する細胞内インスリン総量の変化をモニタする実験を行い、表面積比 10%程度の局所刺激であっても表面全体刺激と同等のインスリン量変化応答を示すという新たな知見が得られた(図 A-2-2)³⁾。

平成 23 年度は、流路内で長期間培養し継続的な局所刺激に対する細胞内応答のデータ取得と解析を進め、刺激時間・溶液環境に対する細胞内応答の変化や、細胞内シグナル局在化や伝搬などの極性形成の解析に取り組み、膵島組立にかかわる極性の人為的形成について研究を進める。

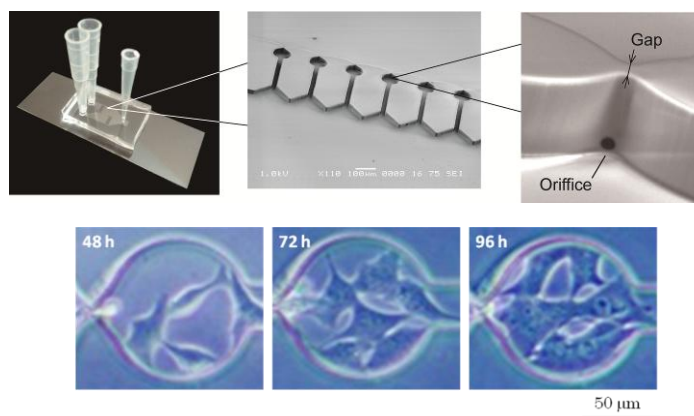


図 A-2-1 局所刺激応答計測デバイスと細胞培養結果。
上：デバイス外観及び流路 SEM 像、
下：膵β細胞培養結果（96 時間）

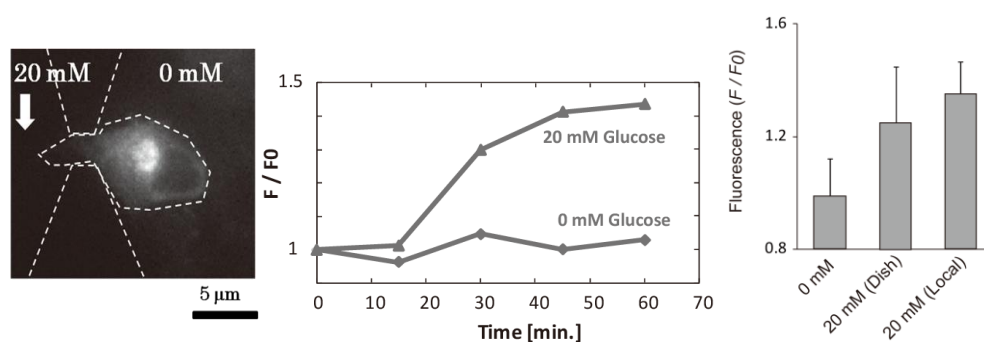


図 A-2-2 グルコース局所刺激に対する細胞内インスリン量変化. 左:インスリン GFP 蛍光像。膵・細胞の一部が 20mM グルコースによって刺激される。中:グルコース局所刺激後の細胞内インスリン量時間経過。右:刺激前後の細胞内インスリンの変化量の比較(0 mM: 刺激なし、20 mM Dish: ディッシュ内の細胞全面への刺激、20 mM Local:本デバイスを使った局所刺激)

3) 臓器組織の人為的構築

3-1)膵島組織内の細胞極性の観察-評価

本年度は、膵島細胞と血管細胞の相互作用を解明するため、まずマウス膵臓組織および培養系の膵島細胞 (pseudoislet) に関して、細胞極性に関連する因子の検索を行った。その結果、通常の意味での細胞極性因子や平面極性因子等では、血管に接触している部分に集中する分子は特定できなかった。また、膵島血管の動静脈マーカーとして ephrinB2, EphB4 の膵臓での局在の検索を行ったが、免疫染色や Eph, ephrin の Fc 融合タンパク質を用いても血管内皮細胞内での局在は確認できず、むしろ膵島の β 細胞に局在が見られた。これは、抗体や Fc 融合タンパクが膵島内で発現している他の Eph, ephrin 蛋白と交差しているためと思われる。In situ hybridization を用いて mRNA の発現を検索した結果、これらの動静脈のマーカーはかなり中枢側に近い太い血管にしか発現せず、毛細血管では現時点では検出できていない。

しかし、免疫染色で膵島組織内の血管と細胞膜、核の位置を同時に可視化した結果、血管側に核が寄っている細胞、血管側から核が明確に離れている細胞が存在し、血管と細胞に何らかの相互作用があり、それが構造に影響を及ぼしている可能性が示唆された。これらの結果を香川大学の寺尾助教の工学的な膵島細胞の局所刺激の結果と比較する予定である。

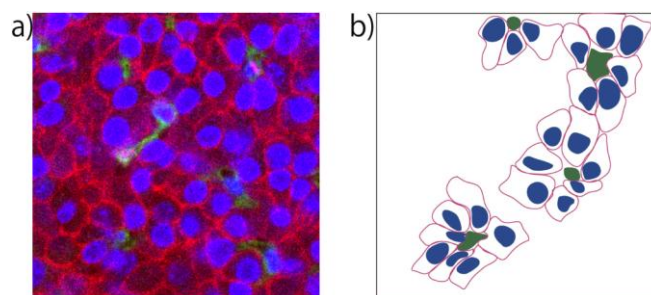


図 A-3 膵島細胞の核と血管の位置関係

a) 膵島組織の免疫染色：膵島組織内の細胞核（青）；血管（緑）；細胞膜（赤）

b) 免疫染色の結果を図示：細胞核（青）；血管（緑）；細胞膜（赤）

3-2) 細胞系の組立・カプセル化のための MEMS 技術の開発(竹内・興津)

本年度は、Min6 を内包したハイドロゲルファイバーを糖尿病マウスに埋め込む実験を行った。何匹かには、数日後に、血糖値が安定する症状が見られた。引き続き観察を進める予定である。写真は(図 A-4)、ファイバーを腎皮膜下に埋め込んでいる様子(埋め込み前(a),後(c))である。埋め込み後、インスリンの継続的な放出に血糖値の低下が見られた。平成 23 年度に継続して実験を継続しその有効性を確認する。

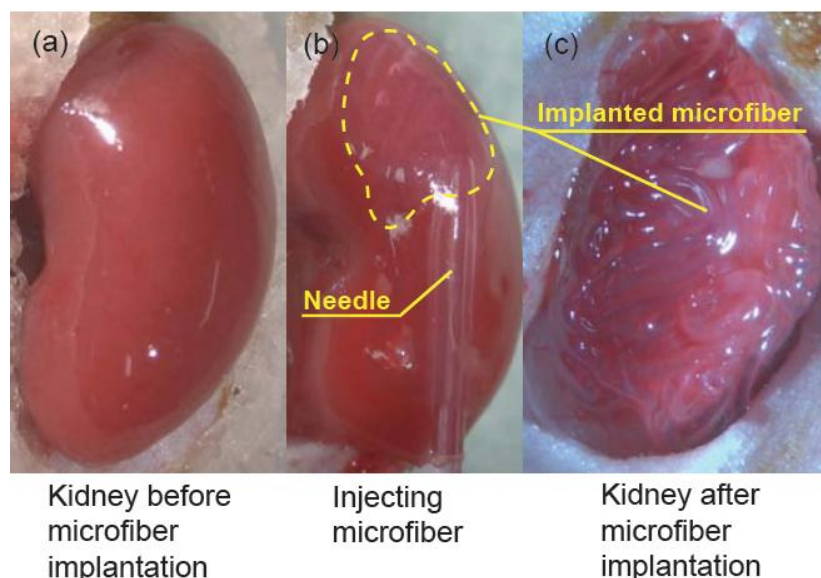


図 A-4 PLL カプセルに内包した MIN6 細胞

B. 再生・分化誘導グループ

(1) 研究題目:再生・分化誘導のためのバイオナノプラットフォーム技術の構築

- 1) 細胞内物質導入・細胞質移植法の開発と細胞分化・増殖の誘導・制御
- 2) 半導体マイクロ・ナノ加工技術の細胞並列同時操作と分子計測への応用

(2) 研究の目的および内容

分化・増殖にかかわる因子を細胞に定められたタイミングで添加し、細胞の分化・増殖を人為的に制御するための手法、すなわちその場合エレクトロポレーションにより因子を細胞にタイミングを制御して導入する手法や、マイクロ構造を利用した細胞手術による細胞質移植法の実現を行う。また、これらの手法を用いて、細胞の分化・増殖の誘導・制御を試みるとともに、臍帯細胞再生への応用を行う。さらに、細胞移植のための MEMS 技術を用いた細胞のエンカプシュレーション技術や、細胞の機能評価のための細胞応答リアルタイム計測用 MEMS センサの開発を行うことを目的としている。

細胞内物質導入・細胞質移植法の実現は、東京大学の鷺津・小穴・ムラトが、MEMS 技術による細胞操作は東京大学の藤田・竹内、静岡大学の橋口が、分子計測は東京大学の藤田が主体となり、細胞・組織の生物学的・医学的実験に関しては、京都大学のグループ(小寺・岩田・多田・三浦・横川)と連携し推進してきた。

(3) 本年度の研究実施項目・概要

研究期間全体を通じて、以下に述べるステップで研究を遂行している。最初の 3 年間で各々の要素技術の開発および集積化デバイスの構築を行うとともに、精製可能な因子を導入するためのその場合エレクトロポレーション法、および特定されていないあるいは微量で精製不能な因子を導入するための細胞質移植法の実現を行うとともに、細胞の配置・カプセル化技術、および細胞より分泌される分子のリアルタイム計測のための基盤技術の開発を行う。後半の 3 年では、その成果を元に、臍帯細胞の分化・増殖の制御を行い、さらに臍帯の再構築を目指す。

平成 22 年度においては平成 21 年度に行った、実際の細胞を用いた研究をさらに推進し、1) 細胞内物質導入法・細胞融合法を用いた細胞分化・増殖・初期化に関する基礎研究の推進、特に、ES 細胞を用いた細胞融合による細胞初期化の試行、2) 臍帯細胞カルシウムモニタリング用およびリアルタイムインシュリン計測用 MEMS センサの開発、の各項目について研究開発を行ってきた。

以下にその項目別の概要を述べる。

1) 細胞内物質導入・細胞質移植のためのマイクロデバイスを用いた高効率細胞融合法の実現(鷺津・小穴・ムラト・木村・黒澤)

平成 22 年度は、細胞融合を用いた細胞の初期化に関して、細胞核より小さいオリフィスをはさんで ES 細胞と体細胞の細胞融合を行うことにより、細胞核が融合しない(すなわち遺伝子の混合が生じない)状況

で ES 細胞の持つ初期化因子を体細胞に導入することにより細胞の初期化を試みることを目標とし、京都大学多田研究室と共同で、初期化がおきると OCT4-GFP が発現するように遺伝子改変されている MEF 細胞と ES 細胞との融合を行い、融合後の実時間観察を行った^{6,9)}。また、細胞初期化・分化制御のための手法として、細胞を付着伸展させて行うオンチップエレクトロポレーションの手法を開発し、遺伝子導入を実証した。得られた結果は次のようである。

1. 融合細胞がオリフィスを通過してしまう現象の観察と、選択的フィブロネクチンコーティングによるその防止法の開発

従来から用いているオリフィスアレイチップにより、これら 2 種類の細胞の融合後の挙動を観察したところ、オリフィス径を顕微鏡により観察される核の大きさよりも小さくしても ($<1.5 \mu\text{m}$)、細胞は変形することによりオリフィスを通り抜けてしまうことが判明した。これでは遺伝情報の混合を伴わない細胞融合法による体細胞の初期化という目標を達成できない。しかしながら、MEF-ES 融合細胞がオリフィス部を抜ける様子を何例も観察すると、融合細胞が MEF 側へと抜け出る場合が主であることが判明した。これは MEF 細胞側の方が細胞の接着伸展運動が盛んなので、融合細胞がこちら側に引きずり込まれてしまうことに起因すると考えられる。そこで、接着伸展運動があまり活発でない ES 細胞側の流路のみを細胞接着性のフィブロネクチンでコートして ES 細胞側をチップ上へとアンカリングする一方、MEF 細胞側にはこのコーティングを施さずに接着伸展運動を抑制することにより、上記の融合細胞のオリフィスからの抜けだしを防ぐことにした。実際、ここで開発したチップ上で細胞を培養すると、図 B-1 に示すように、流路上の片側に細胞が接着しやすく、他方に接着しにくいという明確な結果が得られた。

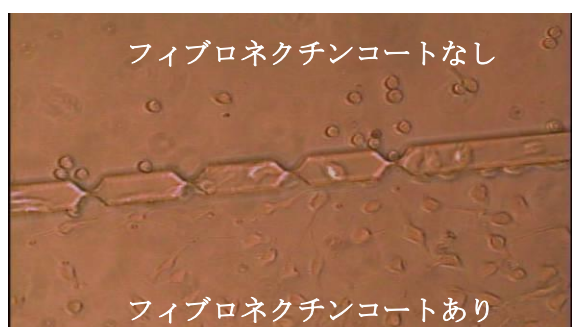


図 B-1 フィブロネクチンによる流路の表面処理

2. 選択的フィブロネクチンコーティングを用いた融合後の初期化の観察

上記のような選択的フィブロネクチンコーティングを施した、 $1.5 \mu\text{m}$ 径のオリフィスを 6 個持つ PDMS 製のチップを作製した(図 B-2)。このチップを電極を持つ基板の上に密着させることによりチャンバーを形成し細胞融合を行い(図 B-3a)、融合した細胞がオリフィスに拘束されることを利用して融合細胞を釣り上げ(図 B-3b)、インキュベータ内で観察を行った(図 B-3c)。また、間欠的に Oct4-GFP の発する蛍光有無を観察することで、MEF(マウス胎児繊維芽細胞)が初期化されたか否かの評価を行った。

この実験においては、まずフィブロネクチンコーティングが予想通り MEF 側の接着伸展をある程度抑え、融合細胞がオリフィス部へ留まりやすくする効果を持つことが判明した。融合細胞の中には、一旦オリフ

イスを挟んで融合したものの、核がオリフィスを通過することなく、時間の経過とともに両側に伸展して二つに分離するものもあった。このような、細胞膜が融合しているが核は分離されているという状況がある程度の期間にわたり保持できれば、遺伝情報の混入を伴わず、ES 細胞からの初期化因子の供給により体細胞を初期化することが期待できる。

しかしながら、図 B-2 のチップにおいては、このような再分離を起こす例は少数で、多くは融合細胞がオリフィスを通過してしまった。このようなすり抜けた融合細胞の観察を続けると、図 B-4 のように、融合 18 時間後に緑色の蛍光を確認できるものがあった。この緑色蛍光は OCT4-GFP の発現を示しており、融合細胞が初期化したことを示唆している。本例に加え、これまでに 3 例の GFP 発現(ゆえに融合細胞の初期化)を確認している。

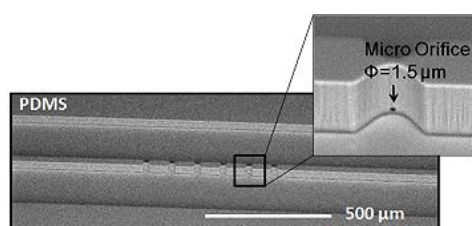


図 B-2 PDMS チップ SEM

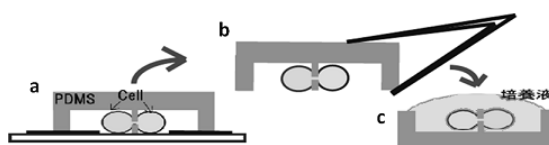


図 B-3 融合後の細胞の挙動の経時観察

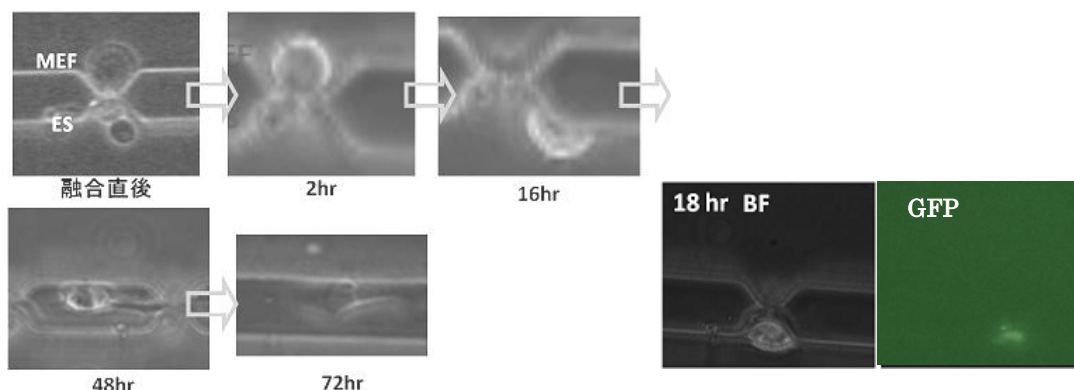


図 B-4 PDMS チップ上での培養と OCT4-GFP 発現

3. チップ内培養法の開発とオリフィス位置による再分離の助長

以上の実験では図 B-3 に示したように細胞融合処理後、PDMS チップを一旦電極基板から引きはがし、表裏反転して培養液を満たしたシャーレ内に置き培養を行って経時観察を行ってきた。この方法は、細胞の培養条件という面からは望ましいが、同図 b のプロセスで融合細胞を釣り上げるのに失敗することが多かった。そこで、細胞培養用シャーレに直接電極を作製し、PDMS チップを密着させたまま細胞融合及び培養観察を行えるようにデバイスを変更した(図 B-5)。流路等の長さを最短化するなどの工夫により、チップ内での閉空間でも数十時間の細胞培養が可能であり、これにより、より多くの融合細胞の挙動の観察が可能になった。また、このデバイスでは、図 B-5 に示すように、オリフィスの位置がシャーレ底面から

離れた位置にあるため、観察したすべての例で、一旦融合した細胞が再分離するのが観察されている（図 B-6 に一例を示す）。上記フィブロネクチンの選択的コーティングに代わる、より簡単な核融合を伴わない体細胞の初期化技術への応用が期待される。

ただし、現状では、細胞の初期化が生ずる前に再分離がおきているらしく、初期化は観察されていない。今後は融合細胞のシャーレ面への接着を制御することにより、融合状態を長時間保つことにより、細胞の初期化を試みる。

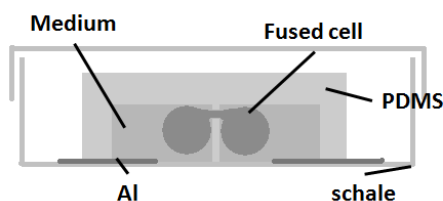


図 B-5 シャーレ電極上での培養

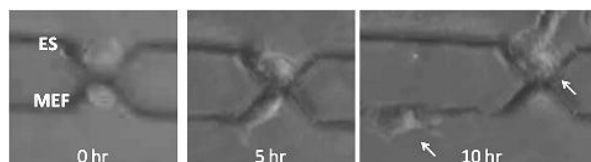


図 B-6 シャーレ電極上での培養結果

4. エレクトロポレーション法による細胞内物質導入⁸⁾

iPS細胞における細胞の初期化は、遺伝子を導入することにより行われている。また、初期化した細胞の分化誘導にも細胞内物質導入が有効な手段となり得る。しかしながら、ウイルスを用いる遺伝子導入法には外来遺伝子を導入することに対する危惧があり、また、エレクトロポレーション法には、細胞種依存性や侵襲性・収率等の問題がある。そこで、我々は、細胞種非依存・低侵襲・高収率な細胞内物質導入法として、オリフィス部における電界集中を利用したオンチップエレクトロポレーション法を開発してきた（図 B-7）。

平成 22 年度においては、この技術の細胞再プログラミングへの実用をめざし、遺伝子導入の実証を行った。オリフィスシート上で培養した接着細胞（MSC：間葉系幹細胞）に対して、接着・伸展を維持したままでプラスミド（pmaxGFP）を導入し、GFP の発現状況を調べた。その結果、数 10ms 以上のパルスを印加するとプラスミドが電気泳動により核の中へと直接導入されることが判明した。図 B-8-a は、パルス印加から 5 時間後の細胞の発現する GFP の発する蛍光で、図 B-8-b は同じ位置の生細胞をカルセインで染色して可視化したものである。通常のエレクトロポレーションにより細胞内に導入されたプラスミドは分裂の際に核内に取り込まれて発現するため、発現を開始するまでに、細胞周期程度の時間（本実験で利用した細胞では約 24 時間）がかかる。それに対し、この実験で 5 時間以内に多数の GFP 発現が生じたという事実は、細胞周期非依存的に、オリフィスシート上に接着した細胞の核内にプラスミドが直接導入されたことを示している。この即効性は、神経細胞やプライマリー細胞への遺伝子導入の新手段となることも期待される。

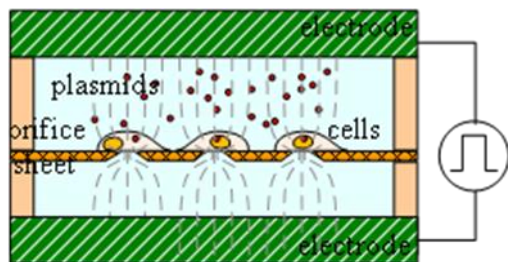


図 B-7 オンチップエレクトロポレーション

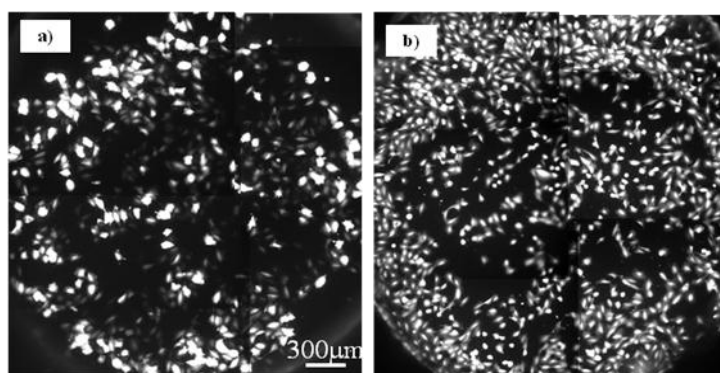


図 B-8 パルス印加から 5 時間後における GFP 発現とカルセイン染色した細胞

2) 膵島細胞カルシウムモニタリング用およびリアルタイムインシュリン計測用 MEMS センサの開発 (藤田)

(1) Ca^{2+} 電気化学センサ⁴⁾

Ca^{2+} センサを集積化したマイクロ流路内に肝細胞 (Hep2G/C3A) を培養し, 刺激に対する細胞の反応を測定した. $23\mu\text{m} \times 23\mu\text{m}$ サイズのプラチナ電極にイオン選択膜を付けて, Ca^{2+} のみを選択的に検出するセンサを製作し, マイクロ流路内に配置した (図 B-9). 150 個/ $1\mu\text{l}$ 濃度の細胞をマイクロ流路内に入れて 3 日間インキュベータ内にて細胞培養した. それから細胞刺激用の 20mM の KCl をマイクロ流路内に注入し, 刺激による細胞外の Ca^{2+} 濃度変化をイオンセンサーで測定した (図 B-10). Ca^{2+} 濃度が徐々に上昇し, 約 30 分後に安定した. 刺激前後の起電力差は約 44mV で, Ca^{2+} 濃度が約 50 倍程度の上昇があった. さらに濃度変化時に 1 分当り 2.33 回ぐらいの周波数で濃度変化があった. それは細胞間コミュニケーションによる Ca^{2+} 濃度変化のためだと考えている.

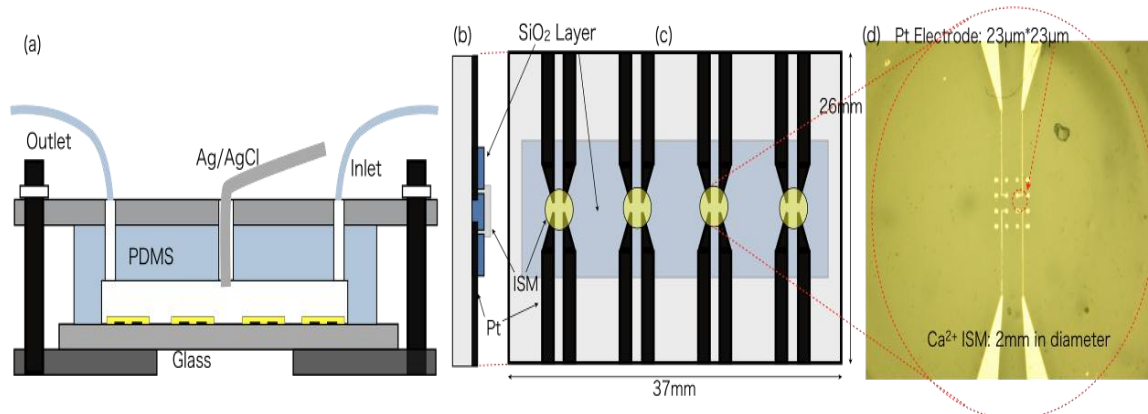


図 B-9 Ca^{2+} センサーの構造, ポテンシャルメータでプラチナ電極と銀/塩化銀電極間の起電力を測定する方法. (a) イオンセンサーとマイクロ流路の横断面図, (b) イオンセンサーの縦断面図: 電極上にイオン選択膜 (ISM) がある. (c) イオンセンサー, (d) イオン選択膜とプラチナ電極の顕微鏡写真

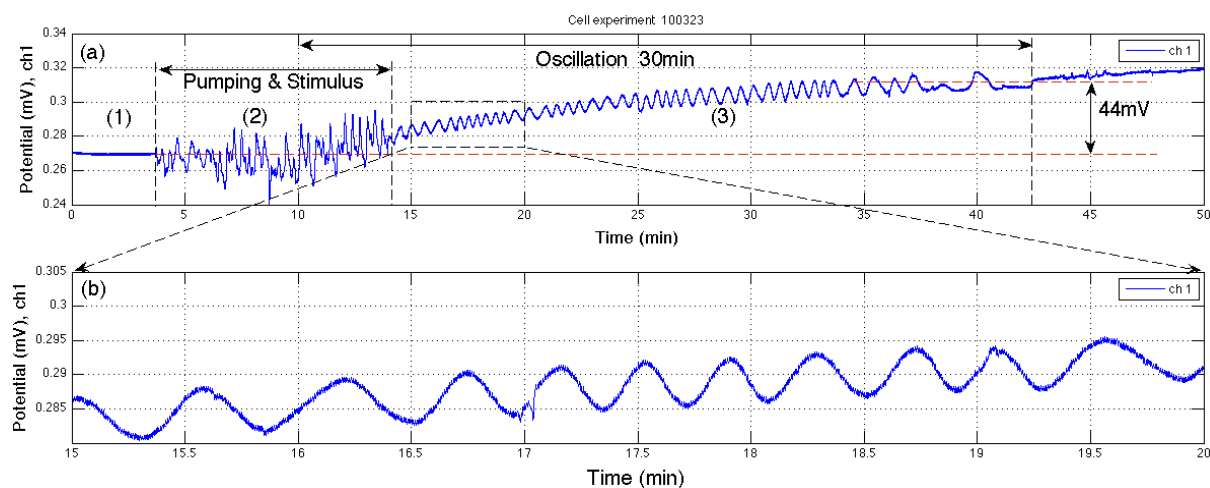


図 B-10 イオンセンサーで測定した時間 (横軸) によるカルシウムイオン (縦軸) の上昇.

(a) 全体のグラフ, (b) 15 分から 20 分間の拡大グラフ

(2) カンチレバー振動型インスリンセンサ⁵⁾

カンチレバー共振子の液体粘性抵抗を減らすため, 空気と液体の界面で振動するカンチレバーを考案した (図 B-11-左). しかしカンチレバーは上面だけ水圧を受ける構造であるため, マイクロ流路内の液体圧によって共振周波数が変わることがあった. それで押し引きタイプのシリンジポンプを用いて, 共振周波数を安定化した. バイオ実験にはカンチレバーの表面をインスリン抗体で機能化し, インスリン結合による共振周波数を測定した. インスリン抗体の結合によって, 共振周波数は 4kHz 下がり (図 B-11-右(a)), そしてバイオバッファーで表面を洗って, 共振周波数が少し上昇した (図 B-11-右(b)). 最後にインスリン濃度 6ng/ml に増加すると, およそ 12kHz の共振周波数の変化があった. (図 B-11-右(c)).

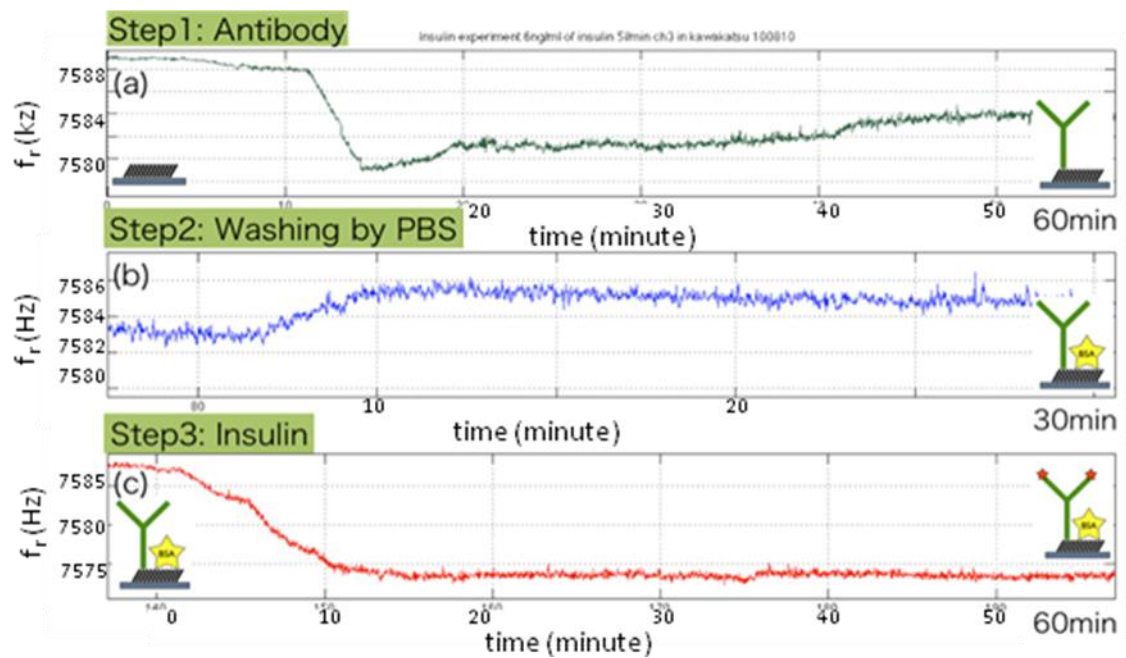
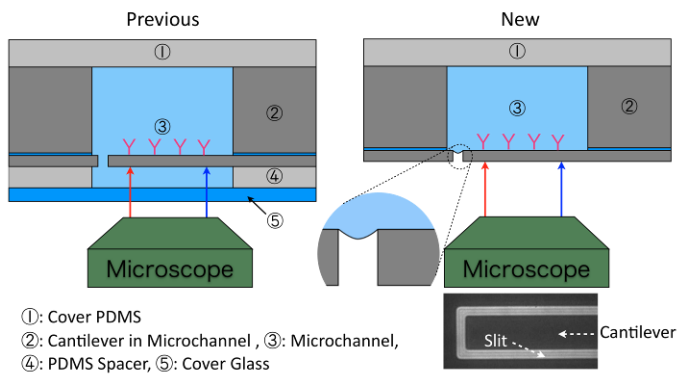


図 B-11

カンチレバー共振型インスリンセンサ,従来(水中で振動)と新たな形(気液界面で振動)の構造比較(上),

カンチレバーの表面にインスリン抗体の修飾からインスリン結合までの共振周波数の変化(下)

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. K. Terao, Y. Kitazawa, R. Yokokawa, A. Okonogi, H. Kotera, "Open-Access and Multi-Directional Electroosmotic Flow Chip for Positioning Heterotypic Cells", Lab on a Chip, in press, DOI:10.1039/C0LC00634C, 2011.
2. R. Yokokawa, Y.Sakai, A. Okonogi, I. Kanno, and H. Kotera, "Force Measurement and Modeling for Motor Proteins between Microsphere and Microfluidic Channel Surface," μ -TAS 2010, pp. 372-374, Groningen, NETHERLANDS, Oct.3-7, 2010.
3. Okonogi, K.Terao, T.Okitsu, T.Suzuki, R. Yokokawa, M.Ohka, and H. Kotera, "Development of Simple Microfluidic Cell Culturing System toward Observation of Cell-to-Cell Communication," μ -TAS 2010, pp. 854-856, Groningen, NETHERLANDS, Oct.3-7, 2010.
4. K. Terao, M. Gel, A. Fuke, A. Okonogi, T. Okitsu, T. Suzuki, T. Tada, M. Washizu, and H. Kotera: "Analysis of intracellular response to localized chemical stimulation on tissue-mimicking microdevice", μ -TAS 2010, W61A, p.1631-1633, 2010.10.4-7, Groningen, Netherlands (2010)
5. J.W. Park, R. Meissner, O. Ducloux, H. van Lintel, P. Renaud, H. Fujita, "A Ca^{2+} Ion-Selective Electrode Biosensor in Microfluidics to Monitor Hepatocyte's Activities", Micro-TAS2010, Groningen, Netherlands, October 2010, pp. 247-249
6. J.W. Park, S. Nishida, H. Fujita, "Novel type of Microcantilever Biosensor Resonating at the Interface Between Liquid and Air", MEMS2011, Cancun, Mexico, January 2011 (Accepted)
7. Murat Gel, Yuji Kimura, Osamu Kurosawa, Hidehiro Oana, Hidetoshi Kotera and Masao Washizu: " Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array", Biomicrofluidics 4, 022808 (8 pages) (2010)
8. Y. Kimura, Y. Nishigaichi, Y. Nakada, Y. Mori, H. Iwanari, M. Gel, O. Kurosawa, H. Oana, T. Hamakubo, H. Kotera, and M. Washizu: "Size-independent electro cell fusion with massive parallelism", μ -TAS 2010, 2A1 (Oral), p.693-695, 2010.10.4-7, Groningen, Netherlands (2010)
9. Kurosawa, Y Sumita, M. Gel, H. Oana, H. Kotera, T. Kato, J. Toguchida, and M. Washizu: "Direct introduction of plasmid into nucleus using on-chip electroporation", μ -TAS 2010, M49A, p.217-219, 2010.10.4-7, Groningen, Netherlands (2010)
10. M. Gel, Y. Kimura, S. Suzuki, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera and M. Washizu: "Micro

- orifice based high yield cell-cell fusion: on-chip analysis of post-fusion phenomena", μ -TAS 2010, T66A, p.956-958, 2010.10.4-7, Groningen, Netherlands (2010)
11. Yamaguchi, S., Hirano, K., Nagata, S. and Tada, T (2010). "Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate", Stem Cell Res, in press (refereed).
 12. Shineha, R., Kawakami, M., Kawakami, K., Nagata, M., Tada, T., and Kato, K. (2010). "Familiarity and prudence of the Japanese public with research into induced pluripotent stem cells, and their desire for its proper regulation", Stem Cell Rev 6, 1-7 (refereed).
 13. T. Miura, M. Nagayama, "反応拡散系の生物のパターン形成現象への応用", 蛋白質核酵素., 55(1) 114-122.
 14. T. Miura, "Mechanism of lung branching morphogenesis" Biological and Physical Constraints on the Evolution of Form in Plants and Animals, Vienna series in Theoretical biology, (in press).
 15. D. Hiramaru, H. Senzai, A. Okonogi, K. Terao, T. Miura, T. Suzuki, I. Kanno and H. Kotera, "Development of Hybrid Bio-device with Self-Organized HUVEC Vessels and Artificial Micro-Channels", Technical Digest of The 5th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro-Nano Technology [APCOT2010], p.155, 2010/7/6-9, Perth, Australia.

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 3 件)