

研究報告書

「ナノ電気メスによる高精度細胞センシング・加工システム」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 山西 陽子

1. 研究のねらい

医療あるいはバイオ産業など生物分野では、ウェットな環境下で狙った位置の加工や遺伝子導入及び局所的な悪性細胞死滅等の技術の発展が喫緊の課題となっている。本研究では従来医療分野で使用されている電気メスの技術を応用し、これまでにないまったく新しいアプローチによる高周波電気メスを製作し、ナノスケールオーダーの細胞加工技術を構築し、従来にはなかった液中加工技術を確立することにある。これまで電気メスによる生体組織加工における切開面には高電圧による熱侵襲が避けられず、単一細胞等小さい加工対象におけるダメージが大きい。ため、できるだけ放電時間を短くかつ、高精度加工のための絶縁領域の確保が必要であった。電気メスによる細胞等のマイクロナノスケール加工技術については他に例がなく、唯一スタンフォード大学のランカー教授のグループが生体組織の加工研究を行い絶縁層で挟み込むことにより熱侵襲領域を数 μm 程度に収めている。しかしながら熱侵襲の存在は単一細胞加工への応用において大きな弊害となる。一方、フェムト秒レーザーを利用した加工技術においては大阪大学の増原教授のグループが2005年にタンパク質結晶の加工に成功している。一方、レーザーを利用した細胞加工はZILOS等対物レンズに装着できる製品化されている技術もあるが、最近UCLAのChiou准教授のグループがプローブにレーザーを照射することで発生する気泡により細胞加工を行う技術を発表している。レーザー加工技術は高精度位置決めができるが、加工対象へのアクセシビリティ、無秩序な気泡の発生やコスト面において不利な面がある。

本研究では培養液中でも加工方向を制御しながらマイクロからナノオーダーにわたる幅広いダイナミックレンジで低侵襲細胞加工を行い、従来のガラスキャピラリーやレーザー等による細胞加工技術を凌駕し、顕微作業で行われきたクローニング作業での卵子の核移植作業を低侵襲・低コスト・高効率に行うことを目標とし、細胞内の遺伝子操作など遺伝子工学や発生工学等の分野の発展に大きな影響を与えることがねらいである。また大気圧液中下の微小領域における加工技術と試薬等の導入技術を確立し、光学顕微鏡のマニピュレータや内視鏡の先端に組み込むことで安価で汎用性のある革新的加工技術を確立することについてもねらいとしている。

2. 研究成果

(1) 概要

我々は、大気圧液中下の微小領域における加工技術と試薬等の導入技術を確立し、光学顕微鏡のマニピュレータや内視鏡の先端に組み込むことで安価で汎用性のある革新的加工技術を確立することを目標に研究を行った。

研究当初は銀ナノワイヤ表面を自己組織化単分子絶縁膜により導電性を制御し、磁気駆動マイクロツールにそのワイヤを固定し、電磁コイルによる外部磁場を集中させることでナノメートルオーダーの位置決め精度を有し、回転電場を与えることで加工対象を回転させることよ

り3次元加工を可能にするという内容で研究を進めていた。しかしながら、液中放電による無秩序な気泡の発生や、ナノワイヤ電極自体の高電圧による電極摩耗や加工対象細胞からの蛋白質等の電極への付着など高精度加工について困難な課題が多く存在することがわかった。

そのような困難な課題を解決する過程においてガラス絶縁層内の導電性ワイヤの先端にバブルリザーバという空隙を設けることにより、指向性のあるサイズの揃った微細気泡列が高速で発生する特異な現象を発見し、その気泡の圧壊を用いることで細胞加工を行うというアイデアに至った。この気泡メスを用いることで、従来の電気メス加工における加工対象への熱侵襲ダメージを回避することができ、指向性があることにより加工方向を制御することができる。またプローブ先端径を変化させることにより、ナノからマイクロメートルオーダーにわたる幅広いダイナミックレンジで低侵襲加工を実現できる。例えばウシ卵子の除核操作をこの電界誘起型微細気泡・インジェクションメス(気泡メス)を用いて行ないガラスキャピラリーによる顕微操作と同等の発生率を得ることに成功している。また細胞壁が堅固な植物細胞への有効性も確認している。一方、気泡メスは気泡の気液界面に試薬・遺伝子等を入れることにより加工と同時にインジェクションも行うことができるという優れた機能も持っている。このような気泡メスにおける低侵襲・高解像度な3次元加工・導入技術は高速な現象であり試薬の周囲への拡散速度よりも高速に気泡が移動することや、気泡の気液界面の吸着力により試薬をより遠くへ輸送できるといった特徴がある。これまで遺伝子導入の困難であった植物細胞等の硬い細胞への遺伝子導入や、腫瘍マーキング技術など新たな界面技術の機能創発をねらいとして研究を行なっている。

(2) 詳細

さきがけ研究当初は全期間を通して下記の6つの研究項目に沿って研究を進めた。しかしながら上記の概要にも記載している通り、プロジェクト途中で当初の計画を変更し、気泡メスとして目標達成を行った。ここでは、最初に当初の6つのテーマの概要を記載し、その後気泡メスとしての研究テーマとその結果について詳述する。

研究テーマ①ナノワイヤによる電気メスの製作⇒当初計画のナノワイヤでの液中細胞加工実験では電極摩耗・無秩序な気泡の発生・電極へのタンパク質付着によりナノワイヤを使用した細胞加工の計画を変更し、2011年下半期に発見した気泡メスのアプローチにより新しい低侵襲電気メスの構造を考案・製作・実証した。

研究テーマ②最適電気回路・高周波電源の設計、及び 研究テーマ⑥フィードバック制御による細胞加工システムの最適化⇒従来の電気メスの電気回路を細胞レベル加工の出力に調整するため、数十から数百kΩの無誘導抵抗を高周波電流発生回路に組み込み、1秒間に45万回の出力データのサンプリングと3500回のフィードバックを行うことで加工対象のインピーダンスの変化に対応した出力調整を行い、またコンピュータ制御で出力時間や信号のDuty比を自由に設定させることを可能にした。(2011年上半期完了)

研究テーマ③ナノ磁場集中機構設計及び位置決め制御試験、及び 研究テーマ④加工対象位置制御及び加工評価⇒気泡メスを使用するアプローチによりナノワイヤを固定した磁気駆動マイクロツールの高精度位置決め方法を使用することなく高精度除核作業に成功したため、この磁場集中や位置決め制御について行う必要がなくなった。現在気泡メスを用いること

で数 μm の加工精度を達成しているが、気泡圧壊時に生じるマイクロジェットを利用することで nm オーダまで加工精度が向上する可能性がある。(2012 年上半期完了)

研究テーマ⑤センシング機能⇒当初はナノワイヤの接触センサによる細胞固さやインピーダンス計測を予定していたが、気泡メスとして電極と非接触に細胞を加工する手法に変更したため、センシング機能については次の研究フェーズへ持ち越しとなった。気泡メスのもう一つの機能としてインジェクション機能を付加することに最終年度に成功し、その気液界面に蛍光試薬や微小センサを吸着させて細胞内部へ打ち込むことにより、温度や pH 等を計測するなどを引き続き行なって行きたい。

研究テーマ: 電界誘起気泡メスによる細胞加工及びインジェクション

従来、液中の生体材料加工においては電極摩耗や気泡の発生、切開ブレードであるアクティブ電極表面に付着するタンパク質やデブリスなどの問題があり、無誘導抵抗を用いたシステムの最適化やガラスプラーを用いた堅固な絶縁膜の製作により加工精度を劣化させる気泡などの抑制に成功していた。しかし、電極先端のスケールを小さくすればするほど、そこに印加される高周波電圧に耐え切れず絶縁膜ごと吹き飛んでしまう現象が多々見受けられた。一方で、その現象時に電極内部から対向電極へ向かって発生する気泡はこれまで抑制しようとしていた気泡とは性質が異なり、指向性のある小さいスケールの気泡列が発生していることがハイスピードカメラによって確認された。そこで、アクティブ電極の先端構造を工夫し、電極先端にバブルリザーバとしての空隙を設け、電極に最小限に抑えた放電を発生させることで電極先端から対向電極まで一列に伸びる指向性を持ったマイクロナノスケールの気泡列を発生させることに成功した(図 1)。この気泡列は細胞膜表面に触れると気泡の圧壊現象により、低侵襲に加工することが可能であり、従来の電気メスのような焼結面を発生させずにタンパク質のダメージなく加工することができる(図 2)。(特願 2012-047053)

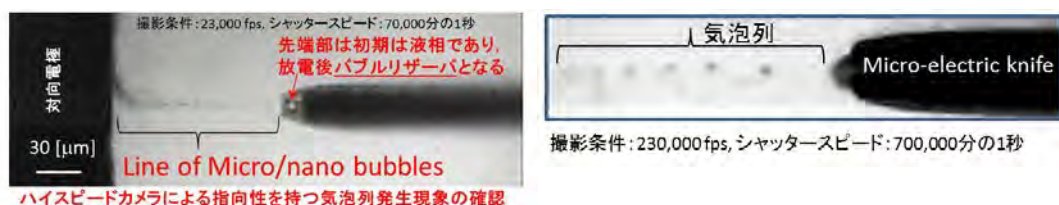


図 1. 指向性を持ったマイクロナノ気泡列の発生現象

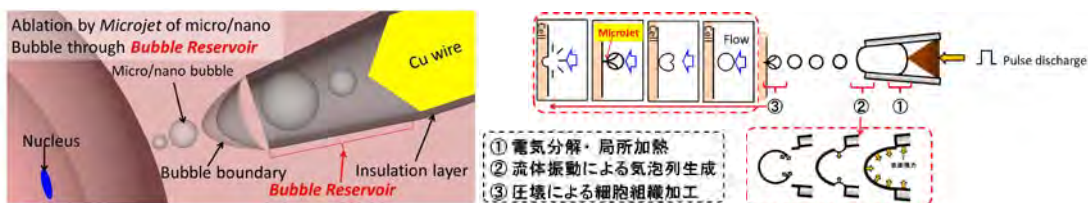


図 2. バブルリザーバを持った電気メス機構及び気泡圧壊による細胞組織加工メカニズム

気泡メスの加工精度を評価するために、実際にウシ卵子を加工し、その加工幅とメスから加工対象までの距離について共焦点顕微鏡画像を用いて評価を行ったところ、加工対象とメスの距離が離れるほど加工幅は小さくなり、例えばメスの先端である $10\mu\text{m}$ の距離分加工対象物から離れたところでは先端よりも小さい加工幅であることが確認できた。その後、2012 年 5

月より畜産草地研究所・家畜育種繁殖研究領域の赤木研究者とともに電界誘起気泡メスによるウシ卵子の除核操作、核移植、気泡メスを用いた体細胞クローニング技術の発生評価を行ない、結果として図4図5に示すように胚盤胞に達することに成功し、発生率評価について従来のガラスキャピラリ技術と比較を行ったところ、発生率に大きな違いはなく、実用化に向けた大きな一歩となっている。

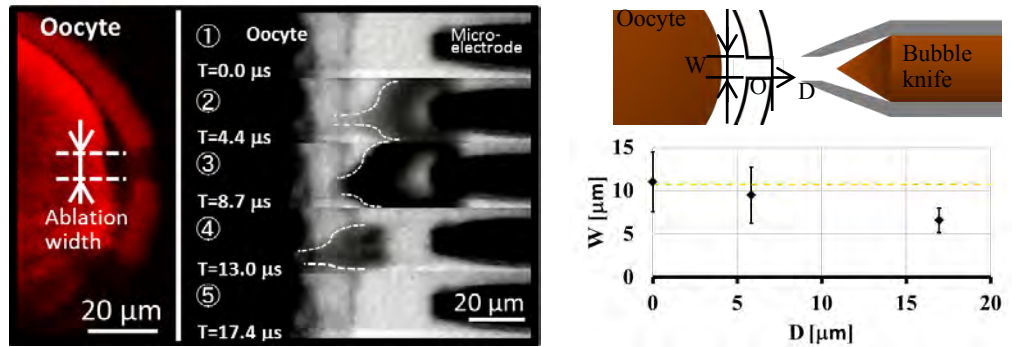


図3. 気泡メスによるウシ卵子の加工及び細胞加工幅と距離の関係

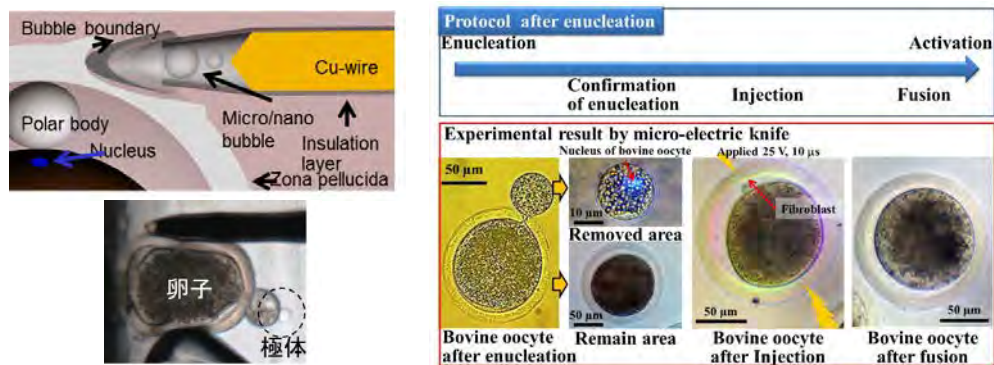


図4. 電界誘起気泡メスによる除核・融合実験

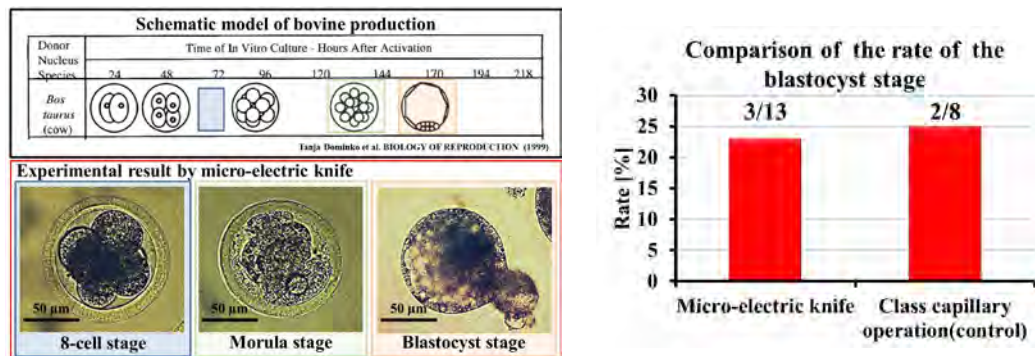


図5. 電界誘起気泡メスによる発生率評価

その後、気泡メスのもう一つの機能として、気泡の気液界面に試薬を入れた気泡を撃つことで、「加工しながらインジェクション」を行う新しい機能を生み出すことに成功した。図6のようにガラス管を2重にすることで新しい気泡メスを作成し、試薬としてメチレンブルーを入れたところ図7のように直径数 μm の試薬封入された気泡を発生させることに成功した。この気液界面

のメチレンブルーは約 100 μm 程度の飛距離において青色を失うことなく飛んでいくことが確認され、実際に卵子に向かって加工しながら撃ったところ穴を穿ちながら試薬を導入できることについても確認することができた。また名古屋大学理学部東山教授より提供されたタバコ細胞(BY-2)を用いて植物細胞への蛍光ビーズのインジェクション実験を行ない、細胞壁を穿つと同時に2つの蛍光ビーズを細胞内に導入することに成功した(図8)。今後は遺伝子等を導入するなど幅広い分野において試薬を加工と同時に局所的にインジェクションすることに応用していきたい。

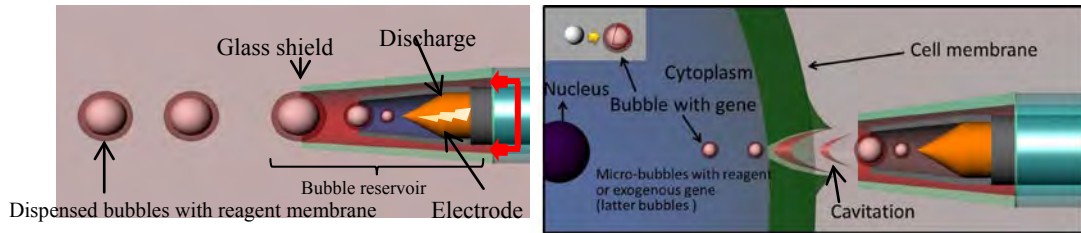


図6. 電界誘起気泡メスによる発生率評価

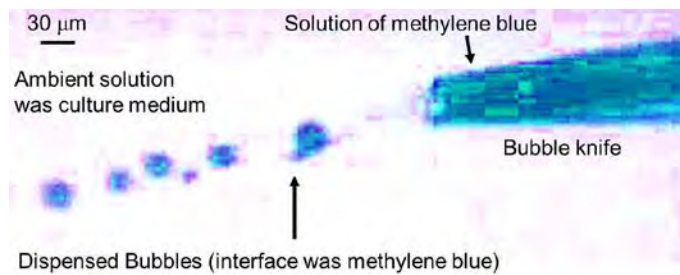


図7. メチレンブルー試薬を気液界面に吸着したまま液中を異動する気泡

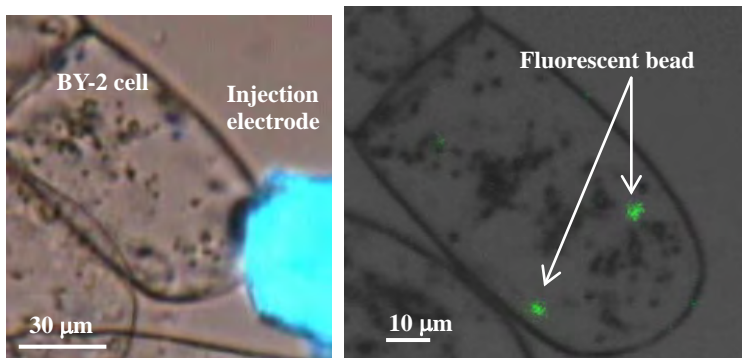


図8. タバコ細胞(BY-2)への蛍光ビーズインジェクション実験

3. 今後の展開

本研究で開発した電界誘起型微細気泡・インジェクションメス(気泡メス)は生体等の柔軟物を加工するだけでなく、加工対象を限定せずに狙った箇所のみ加工・導入できるところに強みがあり、従来の高周波メスや電気穿孔法、超音波穿孔法やレーザー加工技術にはない技術として、高速・高精度・低コストに行うことができる新しい液中加工・インジェクション技術としての発展が見

込まれる。

この技術の応用として、これまで遺伝子等の導入効率が低かった硬い細胞壁を持つ植物細胞などへの導入効率の向上や、気泡列の軌跡を制御した新しいパターンング・加工技術への応用が見込まれている。

また、治療が困難であった箇所への3次元アクセスによる悪性細胞の死滅やメカニズムの解明が期待でき、低コストで簡単に汎用顕微鏡マニピュレータや内視鏡などの汎用医用機器に取り付けることが可能であることより、高速・高精度治療や医薬品導入が期待できる。例えば高精度な腫瘍マーキング技術などに応用可能である。

一方、指向性気泡列の気液界面には固相・液相・気相と幅広い対象を封じ込めることができ、局所界面反応や気泡圧潰時の結晶化技術等、界面の要素技術分野での新しい応用が考えられている。また、気泡内のガスを反応性のガスなどに替え、気液界面に反応性の低い物質を吸着させることにより効率的に反応させ、気液界面の表面積の大きさを利用した液中反応場を作成することも考えられている。従来技術における気泡メスの位置づけについては下記図9に記載する。

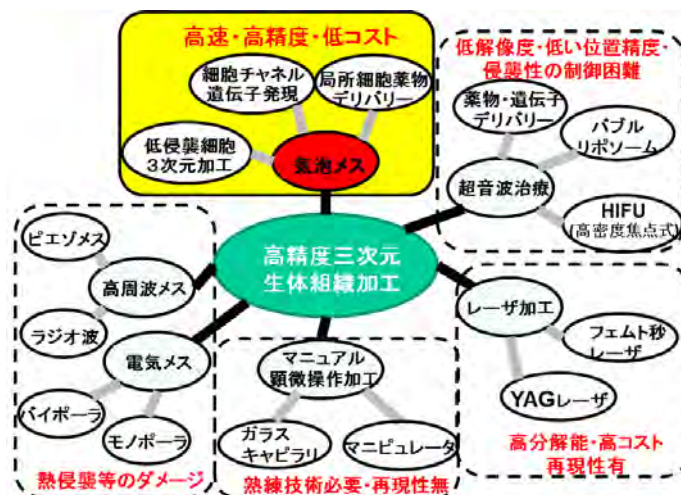


図9. 気泡メスの従来技術の対する位置付け

4. 自己評価

研究のねらいとして液中下で高精度に細胞加工を行うために、新しいアプローチによる高周波電気メスを製作しダイナミックレンジの大きい細胞加工技術を構築し、従来にはなかった液中加工技術を確立することにある。さきがけ研究当初は計画していた銀ナノワイヤを用いた電気メスによる細胞加工において多くの問題があり、それを解決している中で新たな気泡メスを用いる加工方法を発見し、それによって目標達成を目指した。結果として気泡メスを用いたウシ卵子の除核作業に成功し、その後の発生率評価においてもガラスキャピラリーと同等の結果を出すなど、新しいアプローチによる高周波電気メスを開発に成功したと言える。当初の目標であるナノスケール加工にはまだ加工精度が及ばないが、気泡圧壊時のマイクロジェットのnmオーダーの加工性能を用いることや、プローブ先端をさらに小さくし、発生する気泡サイズを小さくして圧壊すること

で十分達成可能であると考えられ、気泡の大きさを制御することにより幅広いダイナミックでの細胞加工が実現可能と考えられる。

今回は研究の途中で新たな機能創発を行うことができたことは、大変幸運であり、長田総括はじめアドバイザーの先生方やさきがけ研究者の方々からの多くのアドバイスによって導きだされたものであり深く感謝申し上げる次第である。今後新しい気液界面技術をベースとして幅広い分野における機能創発を行なっていきたい。

5. 研究総括の見解

本研究の狙いは新規の高周波電気メスを製作し、ナノスケールオーダーの非熱侵襲細胞加工技術を構築するとともに、従来になかった液中加工技術を確立することにある。

研究者はガラス絶縁層内の導電性ワイヤの先端にバブルリザーバという空隙を設けるとサイズの揃った指向性のある微細気泡列が高速で発生する現象を発見した。その気泡列は細胞壁表面に触れると気泡の圧壊現象により熱侵襲ダメージなしに細胞加工が可能であることも見出した。しかも、先端径を変化させることにより、ナノからマイクロメートルにわたって三次元低侵襲加工ができることもわかった。さらに気泡の気液界面に試薬・遺伝子、蛍光ビーズ等を入れることにより加工とインジェクションを同時に行うことができるという優れた機能も持っていることも実証した。

電気メスによる細胞等のマイクロナノスケール加工技術についてはこれまで例がなく、極めてインパクトの強い重要な発見であるといえる。この技術を応用すると、これまで困難であった植物細胞等硬い細胞への遺伝子導入や、腫瘍マーキングなど新たな界面技術の創製が可能となる。また、治療が困難であった箇所への3次元アクセスによる悪性細胞の死滅やメカニズムの解明の可能性も期待でき、近い将来の実用化が期待できる。本領域で得られたナノ「システム」の大きな成果の一つとして高く評価できる。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Yoko Yamanishi, Hiroki Kuriki, Shinya Sakuma, Kazuhisa Onda and Fumihito Arai. Local ablation by micro-electric knife. IEEE Nanotechnology Magazine. 2012, Vol.6, No.2, pp.20-24. |
|--|

(2)特許出願

研究期間累積件数:3件

1.

発 明 者: 山西 陽子, 佐久間 臣耶, 栗木 宏樹, 新井 史人

発明の名称: 切削及び局所アブレーション方法

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2012年3月2日

出 願 番 号: 特願 2012-047053



2.

発明者：山西 陽子, 栗木 宏樹, 佐久間 臣耶, 新井 史人
発明の名称：局所アブレーション装置及びインジェクション方式
出願人：名古屋大学
出願日：2013年1月11日
出願番号：特願 2013-003748

3.

発明者：山西 陽子, 佐久間 臣耶, 栗木 宏樹, 新井 史人
発明の名称：気泡噴出部材及びその製造方法、気液噴出部材及びその製造方法、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、インジェクション装置及びインジェクション方法、プラズマ気泡噴出部材、並びに治癒装置及び治癒方法
出願人：JST 及び名古屋大学
出願日：2013年3月1日
出願番号：PCT/JP2013/055703

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(主要な学会発表)

1. Yoko Yamanishi *et al.*, “Transportation of mono-dispersed micro-plasma bubble in microfluidic chip under atmospheric pressure”, *Transducers* (June 2013)(Accepted).
2. Yoko Yamanishi *et al.*, “Dispensing of mono-dispersed micro-bubbles for cell ablation”, *Proc. of IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2013)*, Karlsruhe, Germany, (May 2013), Accepted.
3. Yoko Yamanishi *et al.*, “Transportation of micro-plasma bubble in microfluidic chip under atmospheric pressure”, *IC-PLANTS2013(O-03)*, (2013).
4. Yoko Yamanishi *et al.*, “Simultaneous Ablation and Injection by Electrically-induced Mono-dispersed Bubble Knife for Biomedical Applications”, *Proc. of The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2013)*, p.209-212, (2013).
5. Yoko Yamanishi *et al.*, “Single cell surgery with monodispersed microbubbles generated by a pulsed discharge of microelectric knife”, *Proc. of the 16th Int. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MICAS)*, pp.183-185, (2012).
6. Yoko Yamanishi *et al.*, “Electrically-induced Bubble Knife”, *2012 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2012)*, pp.46-49 (2012).
7. Yoko Yamanishi *et al.*, “Local ablation by micro-electric knife”, *7th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS)*, Kyoto, Japan, pp. 177-180, (2012).
8. Yoko Yamanishi *et al.*, “Cell Ablation by Electrically-induced Mono-dispersed Bubble Knife”, *RSC Tokyo International Conference, JASIS Conference*, Tokyo, Japan, (2012).
- 9.山西他, “マイクロ・ナノバブルによる細胞の局所アブレーション”, *ROBOMECH 2012 in Hamamatsu*, (社)日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門, (1A2-V05),浜松, (2012).

10. 山西他, “拘束バブル流れ生成のためのバブルリザーバを有するマイクロ電極”, 第25回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (25th Cheminas), (2012), 熊本, 講演要旨集, 3P22.

11. 山西他, “マイクロ電極を利用した局所アブレーション”, 第24回化学とマイクロ・ナノシステム研究会(24th Cheminas), (2011), 大阪, 講演要旨集 p.83.

(受賞)

1. Robomec 表彰

Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma, Masaya Hagiwara, Tomohiro Kawahara, Fumihito Arai, 「マイクロプラズマによる局所アブレーション-マイクロ電極を利用したプラズマブレードによる細胞加工-」, 2012年5月28日, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門.

2. JRM 表彰

Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma, Tomohiro Iyanagi, Fumihito Arai, Tatsuo Arai, Akiyuki Hasegawa, Tamio Tanikawa, Akihiko Ichikawa, Osamu Satoh, Akihiro Nakayama, Hiroshi Aso, Mitsuhiro Goto, Seiya Takahashi, and Kazutsugu Matsukawa, 「Design and Fabrication of All-in-One Unified Microfluidic Chip for Automation of Embryonic Cell Manipulation」, 2011年5月27日, (JRM, Vol.22, No.3, p.371-379).

(展示会)

・中部地区 医療・バイオ系シーズ発表会,

「マイクロナノバブル電気メスによる低侵襲細胞加工」, 2012年12月4日

・Nanotech2013, 「電界誘起型微細気泡・インジェクションメス」, 2013年1月30日~2月1日