

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」

研究課題

「光ピンセットによる核内ウイルス RNP 輸送と染色  
体操作（～ウイルスゲノム除去への挑戦～）」

## 研究終了報告書

研究期間 平成20年10月～平成26年3月

研究代表者：本田 文江  
(法政大学・生命科学部、教授)

## §1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

当チームは“光ピンセットによる核内ウイルス RNP 輸送と染色体操作（～ウイルスゲノム除去への挑戦～）”をテーマとし、インフルエンザウイルス粒子及び核内ウイルスゲノム(vRNP)の核内での捕捉と搬送を行った。また、ウイルス感染・増殖による細胞の物理的変化の計測(膜強度、温度変化)、生化学的変化(脂質、糖鎖、蛋白質修飾)の解析を行ってきた。1)インフルエンザウイルスは直径 100 nm 程の粒子であり、粒子を構成する物質はタンパク質、脂質、核酸と不均一である。これまで光ピンセットで捕捉できる物質は均一な物質からなる球形で直径が 20 nm から捕捉可能と報告されていた。しかし不均一で不定形な物質でかつサイズが 100 nm 程の物質での捕捉成功の報告はなかった。ウイルスはサイズが光学顕微鏡で観察することができない 100 nm 位であったためこれまで細胞への感染様式や増殖機構に関する研究は生化学的、免疫学的方法により行われてきた。このような方法ではウイルスが細胞に感染し増殖した後の結果のみを明らかにすることはできたが、肝心のウイルスが細胞に付着する様子などを解析することはできなかった。ハーバード大学の Wang のグループがインフルエンザウイルスを蛍光標識し、細胞内の動きを追跡し、ウイルス膜とエンドソーム膜が融合する場所の観察報告だけであった。そこで光ピンセットによるインフルエンザウイルスの捕捉の可能性と細胞への付着の様子を観察するために、本田グループではインフルエンザウイルスの蛍光標識の試みと光ピンセットで捕捉した後のウイルスの追跡を試みることにした。蛍光標識はインフルエンザウイルスの核酸と脂質に挿入される蛍光色素で 2 重染色法の開発、蛍光の強さと減衰時間をスクリーニングした。新井グループでは光ピンセットによる単一ウイルス捕捉と細胞への搬送を目的とした**単一ウイルス感染システムを開発**した。このデバイスを利用して、蛍光標識したインフルエンザウイルス粒子を光ピンセットで周期の異なる細胞に搬送し、ウイルス粒子が細胞のどの周期に効率的に結合するかを解析した。興味深いことに**インフルエンザウイルスが分裂期の細胞に選択的に付着することを世界で初めて明らかにした**。また**世界で初めて不均一な物質からなる微小物質を光ピンセットで捕捉することに成功した**。この結果を基にウイルスが付着する細胞と付着しない細胞の違いを物理的手法で解析するために杉浦グループは**光ピンセットを用いて細胞膜を強度の違いとして解析する手法を開発**した。この手法を用いて静止期細胞と分裂期細胞の膜強度を計測した結果、**分裂期細胞が静止期細胞に比べ硬いことを世界で初めて明らかにした**。この結果を基に細胞膜成分を本田グループで解析した結果、**静止期細胞ではシアル酸量は分裂期に比べ圧倒的に高く、脂質量では分裂期のほうが静止期に比べ少し高いことを明らかにした**。2) これまでウイルス感染による細胞内遺伝子発現制御に関する研究は世界で多数行われてきているがウイルス感染した細胞がどのような物理的変化を起すかは研究されていなかった。すでに本田グループでインフルエンザウイルス感染による細胞内タンパク質の発現誘導の研究は行っていたがその中で大変興味深かったのは Ebp1 というタンパク質がインフルエンザウイルス感染後 2 時間ほどで大変強く修飾されることを発見していた。またウイルス感染後数時間でウイルスゲノムが数 1000 倍に増えるということも計測していた。これらの事実からインフルエンザウイルス感染細胞では温度上昇が観察されるのではないかと思い、温度計測を試みることにした。温度計測のためのツール作製は新井グループで行った。**温度感受性蛍光色素ローダミン B をポリスチレンビーズに導入し直径 1 μm のビーズでローダミンの蛍光減衰と温度変化が 30°C-40°C で相関する温度計測ツールを作製**した。温度計測ツールを細胞内に導入し、温度変化を計測するには至っていない。しかし蛍光標識したウイルスを細胞に搬送しウイルスが付着している細胞に温度計測ツールを運び細胞膜上で約 5 時間の細胞の温度変化を計測した。その結果**ウイルス感染細胞は非感染細胞に比べ約 5K 温度が上昇することを世界で初めて明らかにした**。この結果をもとにウイルス感染細胞での ATP 量の変化を定量すると、ウイルスが細胞に付着し細胞内に侵入する感染の初期段階で ATP の消費が観察され再度 ATP 合成が起り、ウイルス増殖に伴い ATP 量の減少が観察された。この結果は ATP の消費と細胞温度の上昇とが相関することを示していた。これは細胞膜上で計測した温度上昇に反映されていると

予測できる。3)細胞内ウイルスゲノムの除去という挑戦課題を実践するために *in vitro* でウイルス粒子から抽出したウイルスゲノムを光ピンセットで捕捉できるかどうかの試みを行った。インフルエンザウイルスゲノムは8本に分節したRNAゲノムにウイルス遺伝子由来RNAポリメラーゼとRNA結合タンパク質NPから成る約30 nm x 100 nmの不均一な形状である。まずカバーガラス上でウイルス粒子からウイルスゲノム-タンパク質複合体(vRNP)を取り出し、光ピンセットで捕捉・搬送を試みた結果、カバーガラス上で成功した。そこで核内に局在する蛍光標識したvRNPを光ピンセットで捕捉し搬送を試みた。その結果、vRNPをある領域内から動かすことができなかった。杉浦グループの計算からvRNPは約500 nm x 500 nmの楕円形状の範囲内に局在する可能性が示唆された。この観察は世界で初めてである。そこで核内に存在する機能の異なるタンパク質複合体の抗体を用い共局在の観察を行った結果、vRNPは核内でRNA修飾などを行っているかハールボディに局在する可能性が出てきた。さらに杉浦グループの技術で核内に局在するvRNPを動かすことによりウイルス複製が妨害されることが明らかになった。この結果はvRNPの局在領域はウイルスRNA合成にとり重要な役割を持つと考えられる。ウイルスRNAポリメラーゼは単一のゲノムRNAから2種類のRNA(cRNA, mRNA)を合成することはすでに報告されている(本田)。しかし2種類のRNA合成にはRNAポリメラーゼの機能変換が必要であり、この変換に感染宿主細胞因子が関与しているという予測はされている(本田)が、まだその因子が同定されていない。この結果をもとにウイルス増殖にもっとも重要な因子の同定が行われると考えている。

## (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. インフルエンザウイルスは選択的に静止期細胞に結合する((A Novel Single Virus Infection System Reveals That Influenza Virus Preferentially Infects Cells in G1 Phase, Plos One, e67011, July2013) 被引用件数:0件

概要: 蛍光色素で標識したインフルエンザウイルスを光ピンセットで捕捉し、周期の異なる細胞(分裂期と静止期)上で遊離しその細胞に付着するかどうかを観察した。その結果インフルエンザウイルスは静止期の細胞へ付着した。この結果をもとに静止期と分裂期の細胞膜組成や強度を解析した。その結果 1. インフルエンザウイルスのリセプターとなるシアル酸の付いた糖たんぱく質は静止期の細胞で約10倍ほど高かった。2. 一方膜脂質は分裂期のほうが数倍高かった。また3. 膜強度計測結果から、分裂期のほうが静止期より強いことを明らかにした。これまでの細胞周期の研究は細胞がどのように分裂するかが中心であったが細胞の物理的、生化学的違いに関する報告は本研究が世界初であった。

2. インフルエンザウイルス増殖は細胞の温度上昇を誘導する。(Multiplication of Influenza virus induce the rising temperature of the cell)

投稿準備中

概要: ウイルスは感染細胞でゲノムを多数複製するとともに、ウイルス独自の遺伝子発現、また細胞の遺伝子発現制御等細胞の代謝を大きく変化させる。この変化は細胞の物理的変化に影響を与えていると予測しインフルエンザウイルス感染細胞での温度変化計測を試みることにした。温度計測のためのツールとして温度感受性蛍光色素のローダミンBをポリスチレンビーズに封入し、その蛍光強度変化計測による単一細胞の温度計測システムを開発した。このシステムを利用してインフルエンザウイルスの感染細胞内での増殖は細胞の温度を約5度上昇させることを発見した。また同時にインフルエンザウイルス感染による細胞内ATP量が感染初期には消費されるがその後合成され、再び消費されることを明らかにした。

3. ① マイクロ流体チップ内での単一細胞への単一インフルエンザウイルス感染操作と誘電泳動によるウイルス濃縮のためのナノ操作(Nanomanipulation of single Influenza Virus Using Dielectrophoretic Concentration and Optical Tweezers for single virus infection to a specific cell on a Microfluidic Chip. Microfluids and Nanofluidics, 10,1109-1117,

2011)被引用件数:9件

② 光ピンセットで捕捉した粒子による細胞触診(Cell palpation with an optically trapped particle, Journal of Micro-Nano Mechatronics 7 131-136 2012.) 被引用件数:2件

概要:① ウイルス感染を定量的に解析するために単一ウイルス感染システムを構築した。このシステムは細胞培養チャンバー、ウイルス導入用流路、ウイルス輸送用流路から成る。このシステムにはウイルス捕捉効率化のために誘電泳動力によるウイルス濃縮機構を導入している。また流路内からのウイルス侵入防止のため光硬化性樹脂によるウイルス搬送後の流路を閉じるシステムを導入している。

② 細胞の力学特性を3次元的に評価できるよう3次元力計測システムを開発した。本システムでは細胞上に固定した粒子の光軸方向位置を粒子のボケ像の大きさから推定することで、10nmの測定精度を実現した。光ピンセットのビーム位置を光軸方向に徐々に移動することで粒子への光軸方向力を変化させ、その際の細胞膜変形を計測することで力学特性を求める。

① 及び②の基礎的研究・開発がウイルスの光ピンセットによる捕捉・搬送を可能にし、その結果、インフルエンザウイルス感染が細胞周期特異的であることを世界で初めて報告することになった。またウイルスの選択的細胞付着性の結果から細胞膜の物理的特性、脂質組成の特異性を世界で初めて報告することができた。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. インフルエンザウイルスの静止期細胞への選択的付着による薬剤や治療法開発の期待

概要:光ピンセットを用い、蛍光標識したインフルエンザウイルスの捕捉・搬送ができるようになったことにより、インフルエンザウイルス感染の第一段階である細胞付着が細胞周期特異的であることを明らかにした。このことからウイルス付着・非付着細胞の細胞の特異性を様々な手法を用いて解析しその違いをあきらかにした。これまで細胞周期に関しては核分裂がいかんにして起こるか、細胞がいかんにして二分されるかに関する研究は多く報告されてきているが、細胞の物理的性質や化学的組成に関する報告はなかった。即ち新しい手法により新しい細胞の側面が明らかになってきたといえる。これらの手法を他の多くのウイルスに適用することで、ウイルス感染と細胞間の関係に関してこれまでと異なる結果が出てくると考えられる。また、様々なウイルスの付着細胞特異性を明らかにしていくことはウイルス感染に必要な細胞因子がこれまでとは異なる方法で見つかるようになるため新規性が高くなることが予想される。これらの方法の利用はウイルス研究の進展を加速するとともに、細胞学分野においても新しい発見が出てくると考えられる。また様々なウイルスの細胞付着特異性がより詳細にわかるようになることによりウイルス特異的阻害剤(インフルエンザウイルスでは静止期の細胞を分裂期に促進するよう様な薬や物理的処理、あるいはエンドサイトーシスを一次的に阻害する薬)のこれまでと異なる薬剤や治療法の開発が期待される。

2. 光ピンセットの携帯化と操作性の向上

概要:光ピンセットを用いたウイルス捕捉の成功から単一ウイルス感染システムがこれまでに明らかにできなかった細胞とウイルスの関係の新しい展開に至った。この手法を多くのウイルスに応用しウイルス感染による細胞の変化などの解析により得られた知見を基に新規の抗ウイルス剤、診断薬の開発のためには光ピンセットを簡単に持ち運べどこの研究室でも利用が簡単にできるようになることが必須になる。さらに一度に多数のウイルスを多数の細胞に感染するシステムができると解析の数を増やすことができ、より早く結論を得ることができるようになりウイルス特異的抗ウイルス剤や診断、治療薬の開発の促進につながると考える。

3. ウイルス捕捉のためのマイクロ流体チップの開発

概要:気中、水中に存在するウイルス粒子は濃度として非常に低いため、誰もが光ピンセットを

利用して捕捉する実験にはかなり難しい。またウイルス粒子を多く集めて生化学的解析などを行うときにも超遠心を利用して濃縮するには場所と設備が必要になり汎用性が低い。このような困難さをウイルス研究で克服するには誘電泳動によるウイルスの濃縮システムは今後必要になってくると思う。更にウイルスの光ピンセットによる捕捉の際も低い濃度のウイルスを簡単に探し出し捕捉をより簡単にできるようにするためにこのより安定ウイルス濃縮システムの開発が望まれる。

## §2. 研究構想

### (1) 当初の研究構想

当初掲げた目標は1. インフルエンザウイルスゲノム複製・転写の領域が核内であるため核内の局在部位の特定と光ピンセットによる捕捉・搬送実験から物理的解析により核内の環境を計測すること。2. ウイルス RNA ポリメラーゼに結合してくる核内物質の生化学的解析による特定であった。目指した目標：1. 光ピンセット操作による単一ウイルスの単一細胞への搬送とウイルスRNP(vRNP)の *in vitro*、および感染細胞核内での捕捉・搬送であった。理由はより詳細なウイルス感染機構を明らかにする目的であった。またウイルスを光ピンセットで捕捉するということに対する挑戦であった。光ピンセットによるウイルスの捕捉・搬送は可能にできた。またウイルスRNP(vRNP)の *in vitro* および核内での捕捉・搬送の可能性を世界で初めて示した。これらの実験結果を基に単一ウイルス感染を単一細胞に行うことが可能になり、その結果生物学的にも新しい事実を示すことができた。光科学分野でも単一物質からなるナノ粒子の捕捉だけでなく異なる分子から構成されるナノ粒子の捕捉の可能性を世界で初めて示した。vRNP の核内での捕捉・搬送実験も世界初であったが、この結果から vRNP の核内での局在領域を明らかにすることができた。さらに vRNP が核内で動きにくい光ピンセットで動かすことによりウイルス増殖を抑制することができることが明らかになった。またインフルエンザウイルスポリメラーゼの核内環境条件解析のための核内環境計測ツール(温度、pH 計測ツール)を開発したが細胞質内に導入することは極めて難しかった。最近、改良を加え可能性が出てきている。ウイルス RNA ポリメラーゼに結合してくる物質の同定は大まかできた。3. ウイルス感染細胞変化の計測を行うための方法開発、膜強度計測法の開発を行った。目標1は予定より早い段階で成果を出すことができた。光ピンセットによる単一ウイルス感染の結果を基に生化学的解析法によりウイルス付着・非付着細胞の特徴を解析できた(世界初、PLoSOne 掲載 2013)。

核内環境計測をもとに染色体を光ピンセットで操作する計画を立案したが、核内に導入するツールの作製・導入法の開発は困難であった。現在も核内導入用ツール作製は進行中である。vRNP の核内での捕捉と移動を試みた結果狭い範囲でしか動かないためこの vRNP を確実に動かすために瞬間巨大力発生システムの開発を行ったが、まだ核内の vRNP 移動には応用していない。狭い範囲で動かした vRNP の結果を基に核内ですでに知られているタンパク質集合体との共局在を観察した結果 Cajal body との共局在が観察された。さらに狭い範囲の移動でもウイルスの複製は阻害されたことから人為的に核内タンパク質の発現を抑制した系を作りウイルス増殖への影響を解析している。核内環境計測の進捗が遅れたことと凝縮染色体操作を光ピンセットで行うのは困難であることが判明したため計画を中止した。粘性計測の 3次元イメージング法開発は途中で断念した。

### (2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

#### ① 中間評価で受けた指摘や助言、それを踏まえて対応した結果について

業績としての論文数が少な過ぎるという指摘に対して最終年度ではあるが 3 報ほどまとめる予定である。ただ 1 報の中に 3~4 の技術的、生物学的発見が盛り込まれるため、1 報でも 2~3 報分にはなるかと思う。今年、最初計画した研究結果は論文として公表された。後少なくとも2報は現在

進行中である。生殖医療への応用として染色体操作を光ピンセットやツール(酵素コート粒子)によることを計画していたが核内にツールを導入することが難しかった。そのためこの系を変更し、ゲノムの特異的領域を蛍光標識した短鎖 DNA の導入により蛍光物質に対応する光を当てると活性化酸素が出ることで核酸の炭素結合を切断することにより遺伝子破壊を行うことで以上な遺伝子発現を抑えるための方法開発を現在行っている。

② 中間報告書§2. 当初の研究計画に対する進捗状況「(3)今後の進め方、および研究成果の見通し」の記載事項に関し、研究を進めた結果について

単一ウイルス感染システムの開発、細胞膜の強度解析法の開発の利用によりウイルス感染細胞の同定、ウイルス感染、非感染細胞の特徴を明らかにすることができた。核内 vRNP は除去しなくても少し動かすだけでウイルス増殖を妨害することができた。中間報告後に提案した今後の研究の進め方では核内 vRNP の光ピンセットで動かすことができ、この vRNP の移動がウイルス増殖へ与える影響を解析した結果、ウイルス増殖を抑制することが明らかになった。ウイルス非感受性細胞を人為的操作法では現在分子生物学的手法により行っているが今後光を利用した方法も用いてみる予定である。ウイルス感染細胞と非感染細胞の化学的組成の総合的解析はインフルエンザウイルスに関しては行っている。細胞内温度、pH 計測システムはまだ完了していないが現在進行中である。vRNP 操作法を基盤とした細胞染色体切断、染色体手術は方法を蛍光試薬と光の利用により試みている。インフルエンザウイルス以外の動物ウイルスの光ピンセットを利用した感染機構解析は動物ウイルス研究を行っている研究室への機材の導入ができないため今後のことになると思う。ウイルス非感受性細胞の人為的操作法では現在までは vRNP が結合する Cajal body のタンパク質に対する siRNA 導入により Cajal Body のタンパク質の発現量を少なくすることによりウイルス増殖への影響を試みている。ウイルス付着細胞と非付着細胞の構成成分の違いからその異なる成分の発現量を制御した細胞でのウイルス増殖への影響を解析している。ウイルス感染により細胞の変化が起こることにより様々な因子(インターフェロンのような蛋白分子、イオン、細胞膜の電位変化など)を細胞外へ出し、ウイルス感染細胞から非感染細胞への情報が流れると考えている。何故ならこれらの因子を認識する機構が細胞には存在するためである。情報の流れの解析は単一ウイルス感染システムが必要であるがまだ完全に出来上がっていないため他の方法(ウイルス粒子付着細胞の周辺細胞約 1000 細胞程を残すようにレーザーで切り取る操作)を利用してウイルス感染細胞から非感染細胞への情報の流れの解析は行っていくことを考えている。インフルエンザウイルス以外のウイルスでの現技術の応用は場所の制約がありできていない。他のウイルスでの実験は P3 実験室の導入が必要になってくる。

③ 上記①②以外で生まれた新たな展開について

感染細胞の温度上昇の発見を基に細胞内 ATP 量の解析を行いウイルス遺伝子由来の RNA 合成が上昇するのに対応し減少することが分かった。またピルビン酸キナーゼもウイルス感染に大きく影響していることを明らかにすることができた。さらに ATP のウイルス感染細胞での局在領域の同定を行っていく予定である。細胞内に導入する環境計測ツールのシステム開発ができつつあり、この系を利用して実際の細胞内温度及び pH 計測が可能になる。ウイルス粒子中の vRNP の蛍光標識の成功により核内に局在する vRNP の移動領域が大変狭いことから今後ウイルス感染・非感染細胞の核内構造を STED 顕微鏡等の利用により行っていく予定である。日本国内でのインフルエンザウイルス以外のウイルス感染細胞変化の計測とともにこの系をより発展させ、診断・治療法、ワクチン開発のための計測を開始する予定になっている。

### §3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

#### ①「本田」グループ

研究参加者

| 氏名          | 所属                      | 役職           | 参加時期              |
|-------------|-------------------------|--------------|-------------------|
| 本田文江(法政大学)  | 法政大学 生命科学部              | 教授           | H20.10～H26.3      |
| 三林正樹        | 法政大学 生命科学部              | 博士研究員        | H20.10～H21.3      |
| 大寺美登里       | 法政大学 生命科学部              | 研究補助員        | H20.10～<br>H20.12 |
| 岩田紀子        | 法政大学 生命科学部              | 研究補助員        | H20.10～H21.3      |
| 江島美穂        | 法政大学 生命科学部              | D1           | H20.10～H21.3      |
| 高畑辰郎        | 法政大学 生命科学部              | 学部 4 年生      | H20.10～H22.7      |
| 花田俊彦        | 法政大学・マイクロナノテクノロジー研究センター | 研究補助員        | H20.11～H22.3      |
| 向井政博        | 法政大学 生命科学部              | 研究補助員(博士研究員) | H21.4～H22.2       |
| 川口徹也        | 法政大学 生命科学部              | 学部 4 年生      | H21.4～H23.3       |
| シュウ・カーラム    | 法政大学 生命科学部              | 研究補助員(博士研究員) | H21.8～H22.1       |
| スティーブン・ラーセン | 法政大学 生命科学部              | 研究補助員(博士研究員) | H22.5～H23.2       |
| 杉山将         | 法政大学 生命科学部              | 学部 4 年生      | H22.4～H23.3       |
| 加藤昂         | 法政大学 生命科学部              | 学部 3 年生      | H23.2～H24.3       |
| 吾妻さくら       | 法政大学 生命科学部              | 技術者          | H23.4～H23.9       |
| 大場 誠介       | 法政大学 生命科学部              | 特任准教授        | H23.4～H26.3       |
| 川口 奈々子      | 法政大学 生命科学部              | 研究補助員(博士研究員) | H23.6～H23.9       |
| スペンサープラット   | 法政大学 生命科学部              | 研究補助員(博士研究員) | H23.12～H25.3      |
| 菅野 未知子      | 法政大学 生命科学部              | 技術者          | H24.3～H24.3       |
| 箕浦 憲彦       | 東京工科大学 応用生物学部           | 教授           | H24.11～H26.3      |
| 樺山 一哉       | 東海大学 糖鎖科学研究所            | 准教授          | H24.11～H26.3      |
| 遠藤 竜太       | 法政大学 生命科学部              | 技術者          | H25.8～H26.2       |

研究項目

・光ピンセットによるインフルエンザウイルス粒子・ウイルス RNP の捕捉・搬送

#### ②「新井」グループ

研究参加者

| 氏名          | 所属                       | 役職 | 参加時期         |
|-------------|--------------------------|----|--------------|
| 新井史人(名古屋大学) | 東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻  | 教授 | H20.10～H22.3 |
| 新井史人(名古屋大学) | (名古屋大学)大学院工学研究科機械理工学工学専攻 | 教授 | H22.4～H22.9  |

|                  |                                |       |              |
|------------------|--------------------------------|-------|--------------|
| 新井史人(名古屋大学)      | (名古屋大学)大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻 | 教授    | H22.10～H26.3 |
| 丸山央峰(名古屋大学)      | 東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻        | 助教    | H20.10～H22.3 |
| 丸山央峰(名古屋大学)      | (名古屋大学)大学院工学研究科機械理工学専攻         | 助教    | H22.4～H23.3  |
| 丸山央峰(名古屋大学)      | (名古屋大学)大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻 | 助教    | H23.4～H25.6  |
| 丸山央峰(名古屋大学)      | (名古屋大学)大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻 | 准教授   | H25.7～H26.3  |
| 益田泰輔             | (名古屋大学)大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻 | 助教    | H22.10～H25.9 |
| 山西陽子             | 東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻        | 助教    | H21.4～H21.9  |
| 恩田一寿             | 東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻        | D1    | H20.10～H24.3 |
| Benoit Chapurlat | 東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻        | M2    | H20.10～H21.3 |
| 飯塚 龍             | 東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻        | M2    | H20.10～H22.3 |
| 港谷恭輔             | 東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻        | M2    | H20.10～H23.3 |
| 井上直也             | (名古屋大学)大学院工学研究科機械理工学専攻         | B4    | H22.4～H23.3  |
| 中村祥平             | (名古屋大学)工学部機械・航空工学科             | B4    | H23.4～H24.3  |
| 深田翔太             | (名古屋大学)大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻 | M1    | H23.4～H26.3  |
| 長谷川 貴之           | (名古屋大学)大学院工学研究科機械理工学専攻         | B4    | H25.4～H26.3  |
| 劉 恒君             | (名古屋大学)大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻 | D1    | H25.4～H26.3  |
| 塚本裕子             | (名古屋大学)大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻 | 研究補助員 | H25.4～H26.3  |

#### 研究項目

- ・ マルチビームによるマイクロツールの高速操作を用いた染色体操作



①「杉浦」グループ  
研究参加者

| 氏名            | 所属                    | 役職    | 参加時期         |
|---------------|-----------------------|-------|--------------|
| 杉浦忠男(奈良先端大)   | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | 准教授   | H20.10～H26.3 |
| 佐藤 哲大         | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | 助教    | H20.10～H26.3 |
| 松本 将宜         | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | 博士研究員 | H20.10～H24.3 |
| 三好 秀明         | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | D2    | H20.10～H22.3 |
| 前田 紗希         | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | D3    | H20.10～H22.3 |
| 東 信也          | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | M2    | H22.4～H24.3  |
| 井元 健太郎        | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | M2    | H22.4～H24.3  |
| MARY-CLARE,DY | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | D3    | H23.4～H26.3  |
| 與那嶺 崇         | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | M2    | H23.4～H25.3  |
| 中 久枝          | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | M2    | H23.4～H25.3  |
| 増田 有利子        | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | M2    | H24.4～H26.3  |
| 中島 往馬         | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | M2    | H24.4～H26.3  |
| 藤原 一優         | 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 | M1    | H25.4～H26.3  |

研究項目

- ・細胞分裂期の染色体局在の物理的環境測定技術の開発

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について  
(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)  
イギリスの HPA、理研、中部大学、インド国立科学研究所との共同研究

## §4 研究実施内容及び成果

### 4.1 光ピンセットによるウイルス・ウイルス RNP 操作と核内からウイルスゲノムの除去 (法政大学 本田グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### 実施方法

光ピンセットを用いて単一ウイルスの単一細胞への感染を行った(図 1)。

##### 実施内容と成果

インフルエンザウイルスの蛍光色素による標識を行い、蛍光標識したウイルスを光ピンセットで捕捉し、まず分裂期の細胞に搬送しウイルスの遊離を行い、付着しなかったため再び同じウイルスを捕捉し静止期の細胞に再び遊離すると静止期の細胞には付着した(図2)。この結果を実証するために細胞周期の S, G2, M 期で発現するプラスミド (pFucciGFP) を細胞に電圧ポレーションで導入しその後蛍光標識したインフルエンザウイルスを入れ、細胞への付着具合を観察した結果、インフルエンザウイルスは90%以上静止期の細胞に付着した(図3)。この結果はインフルエンザウイルスが G1 期の細胞に特異的に付着することを明らかにした。この結果を基に静止期細胞と分裂期細胞の違いを細胞の成分で生化学的に解析した結果、静止期細胞は分裂期細胞に比べシアル酸量が 10 倍ほど高いこと(図 4A)、また分裂期細胞は静止期細胞に比較し脂質量が 3 倍ほど高いことが明らかになった(図 4B)。これらの結果を基に細胞膜強度の違いをコラーゲンコートしたビーズを細胞膜上のインテグリンに結合させ光ピンセットで力を加えてその変化を解析した結果分裂期細胞が静止期細胞に比べ硬いことを明らかにした。(図 5)。これらの結果はまだ細胞周期細胞の特徴として報告されていない。



図 1 単一ウイルス感染システム

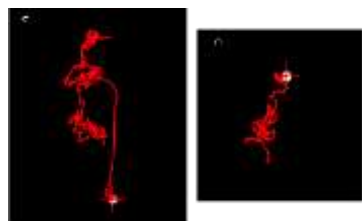


図 2 ウイルスの分裂期・静止期での動き



図 3 ウイルス付着細胞  
白丸:ウイルス 緑:分裂期細胞

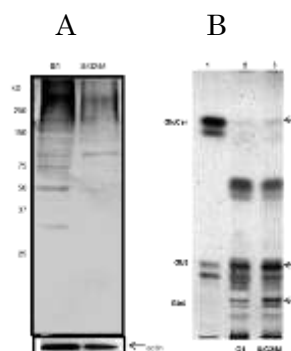


図 4 静止期・分裂期細胞のシアル酸(A)、脂質(B)の比較  
B;lane1.マーカー、2.静止期、3.分裂期

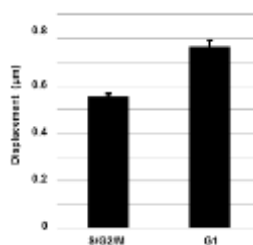


図 5 膜強度比較

## インフルエンザウイルス感染細胞変化解析

### <感染細胞の温度上昇>

インフルエンザウイルスはマイナス鎖の RNA をゲノムとしその塩基数は約 14000 である。ゲノムからは自己複製のための相補鎖 RNA, ウイルスゲノム RNA, mRNA 合成 (図 7) があり、約 8 時間たつとその合成量は 1000 倍以上になると考えられる。興味深いことに**ウイルス感染時間とともに温度上昇が計測された**。温度上昇は約 5K であった。一方同じディッシュ内で培養した非感染細胞では温度上昇は検出できなかった (図 10)。

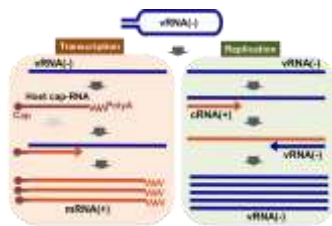


図 7 インフルエンザウイルス RNA 合成

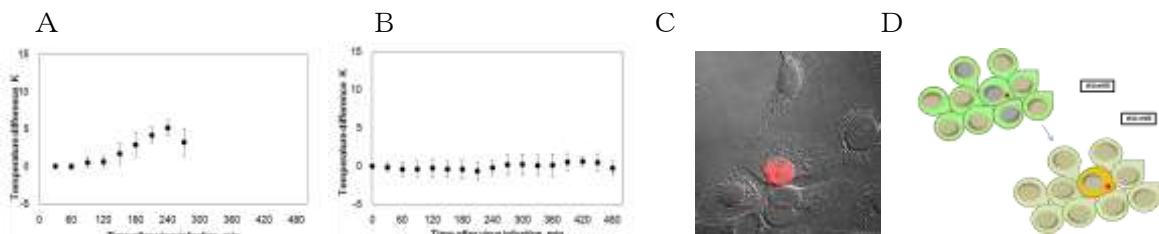


図 10 インフルエンザウイルス感染による細胞温度変化: A ウイルス感染細胞; B; 非感染細胞; C; 培養ディッシュ内のウイルス感染細胞 (赤) と非感染細胞; D; ウイルス感染・非感染細胞のモデル (赤色; ウイルス、黄色; 温度上昇細胞)

### <ウイルス感染制帽の脂質膜強度変化解析>

膜強度変化解析法を利用してインフルエンザウイルス感染細胞の膜強度解析を行った結果、インフルエンザウイルス感染時間 4 時間で膜強度が弱くなる現象を観察した (図 11)。膜強度変化の原因が脂質成分の変化と予測し、またインフルエンザウイルス感染では脂質ラフトが必要であるという報告が出ていることからウイルス感染による細胞膜の脂質変化の解析を行った。その結果**インフルエンザウイルス感染細胞ではコレステロールの量が感染 4 時間で上昇しその後減少する結果**を得ることができた (図 12)。

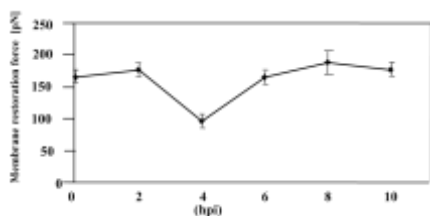


図 11 インフルエンザウイルス感染細胞の膜強度変化

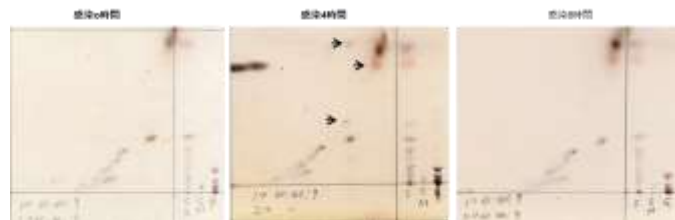


図 12 インフルエンザウイルス感染による脂質量変化

## インフルエンザウイルスゲノム vRNP の核内での局在領域

### <光ピンセットによる in vitro での vRNP 捕捉・搬送>

インフルエンザウイルス粒子内の vRNP は 8 本のゲノム RNA にウイルスポリメラーゼと RNA

結合タンパク質が結合した RNP 複合体として存在している。この 8 本の RNP が集合した構造は球形でなく細長いサイズの異なる長さの RNP からなっている。この RNP を界面活性剤で処理したウイルス粒子から取り出しカバーガラス上で光ピンセットによる捕捉搬送を試みた。その結果 vRNP の捕捉搬送に成功した(図 13)。この結果はウイルス粒子内の vRNP は 8 本が集合していると予測された。細胞に感染したウイルスから核近傍で遊離され核内に侵入した vRNP の捕捉搬送ができるかどうかを試みた。その結果 vRNP の捕捉はできたが移動距離は短かった(図 14)。この結果を基に vRNP 局在領域の解析を行った。その結果 vRNP は核内で RNA 修飾に関する Cajal body に共局在している示唆する結果を得た(図 15)。



図 13 in vitro でのインフルエンザウイルス vRNP の捕捉・搬送  
左;蛍光標識した vRNP と核内での局在、中;vRNP 搬送の軌跡右;vRNP 構造予測

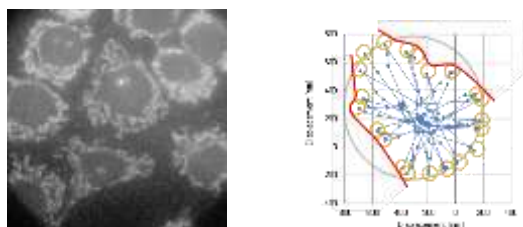


図 14 核内での vRNP の捕捉と移動  
左;vRNP の核内での局在、右;vRNP の動いた軌跡

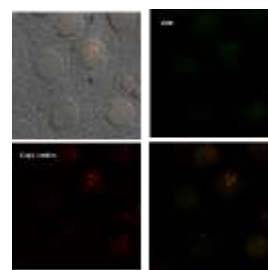


図 15 vRNP と Cajal body の局在

<核内 vRNP の光ピンセットによる移動がウイルス増殖に及ぼす影響>

擬似ウイルスの作成:核内の vRNP はウイルスゲノムを鋳型として 3 種類の RNA を合成している。この合成に関与する酵素はインフルエンザウイルス遺伝子にコードされているウイルス特異的 RNA 依存 RNA 合成酵素によっている。また鋳型 RNA から同じウイルス RNA 合成酵素が 2 種類の RNA (cRNA,mRNA) の合成をするには酵素の構造変換が必要である。そこで核内での局在領域は酵素の構造変換に必須の因子が存在する領域であることが予測される。すでに前のセクションで紹介しているように Cajal body に因子が存在する可能性がある。そこで光ピンセットで vRNP を動かした後ウイルス由来の遺伝子が発現しているかどうかを簡単に観察できるように擬似ウイルスの作製を試みた。擬似ウイルスは一つの遺伝子を蛍光タンパク質に置換し、ウイルス形成時にウイルス粒子に取り込ませ擬似遺伝子を持ったウイルスを再感染後核内で vRNP を動かした後蛍光タンパク質の発現が有るかどうかを検出する目的で作製した(図 16)。



図 16 擬似ウイルス作製  
左;インフルエンザウイルス遺伝子を蛍光タンパク質に置換、右;擬似ウイルス感染細胞

## 4.2 マルチビームによるマイクロツールの高速操作を用いた染色体操作(名古屋大学 新井グループ)

### (1)研究実施内容及び成果

#### 1. 単一ウイルスの単一細胞への感染・ウイルス RNP(vRNP)の in vitro での捕捉搬送 ・流路製作技術の開発

##### 単一ウイルスの単一細胞への搬送と感染

インフルエンザウイルス増殖は細胞内環境に左右されると考えられるが、細胞内環境が不均一な細胞集団を用いた解析では定量的解析が不可能である。ウイルス感染の総合的な定量的解析のためには単一ウイルスが感染した単一細胞を用いた解析が必要であり、単一ウイルスの単一細胞への感染を目的としたマイクロ流体チップを作製した。

マイクロ流体チップは細胞培養チャンバー、ウイルス導入用流路、ウイルス輸送用流路、光硬化性樹脂導入用流路から構成される(図 1 参照)。チップはフォトリソグラフィ技術と転写法を用いて作製した。ネガ型のフォトレジスト SU-8 のシリコン基板上にスピコートしフォトマスクを用いたフォトリソグラフィにより凸型のモルドを作製した。作製したモルドをシリコン樹脂のポリジメチルシロキサン(PDMS)で転写することでマイクロ流体チップを作製した。有限要素法を用いた流体解析に基づき、ウイルス搬送経路の流体の安定性が向上するよう流路形状を設計した。またウイルス捕捉作業の効率化のため、ウイルス導入流路底面に電極を加工し負の誘電泳動力によるウイルス濃縮機構を搭載した。電極はガラス基板上にコートされた透明電極の酸化インジウムスズ(ITO)を、フォトリソグラフィで櫛刃上にパターニングすることで作製した。流路のサイズはウイルス導入流路以外を幅は 100  $\mu\text{m}$ 、深さは 115  $\mu\text{m}$  に統一しチップ内の流体の変動を抑制した。ウイルス導入流路の深さを 15  $\mu\text{m}$  と低くすることで流路内でのウイルスの発見を容易とした。細胞培養チャンバーは長径 8 mm とし、CO<sub>2</sub>の濃度変化の抑制及び細胞の播種・採取のため上部は開放可能で PDMS のシートにより閉じることができる。ウイルス輸送用流路は光硬化性樹脂により閉じることができ、ウイルスの搬送後の余分なウイルスの混入防止及びチャンバー内の環境の安定化が可能である。

感染プロセスは以下の通りである。ウイルス導入用流路から導入したウイルスを誘電泳動力で濃縮後、光ピンセットでウイルス輸送用流路を経由し細胞培養室に導入し細胞に感染させる。感染後、光硬化性樹脂のポリエチレングリコールジアクリレート(PEG-DA)を導入し局所重合によりウイルス輸送用流路を閉じる。

図 2 に示すように、ウイルス溶液の導電率を 10 mS/m に調整し 20 V<sub>pp</sub>、3 MHz の方形波の電圧を印加することで、負の誘電泳動力によりウイルスを電極間に捕集することに成功した。また負の誘電泳動力による捕集がウイルスのガラス基板への付着を抑制する効果があることを確認した。図 3 に示すようにウイルス導入流路内の蛍光試薬 DiI で染色したウイルスを光ピンセットにより搬送し、細胞培養チャンバー内に播種した H292 細胞へ接触・固定することに成功した。以上の結果より、本チップを用いた単一ウイルスの単一細胞への搬送と感染の有効性を確認した。

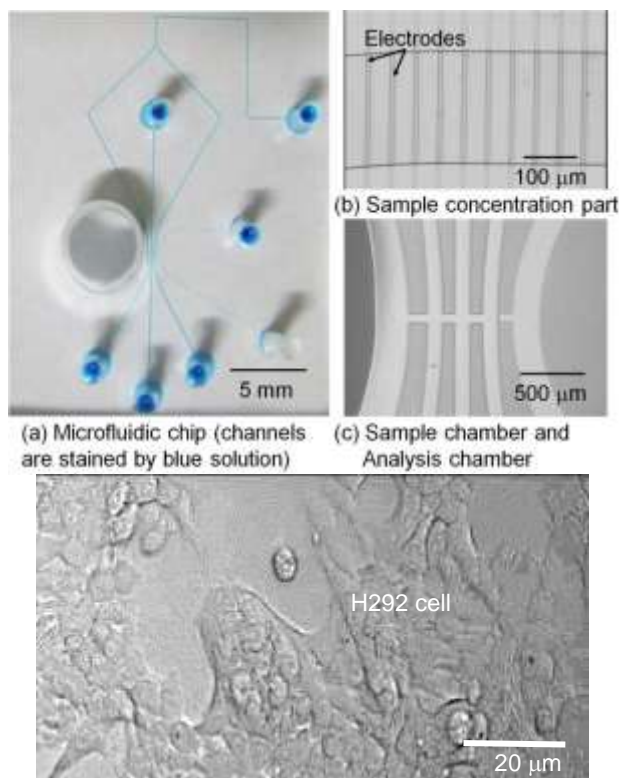
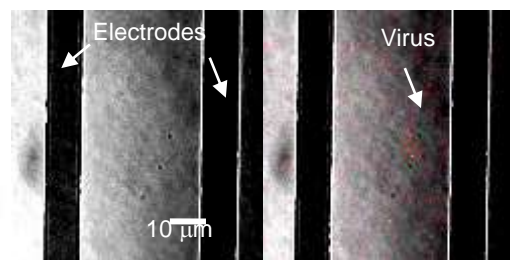
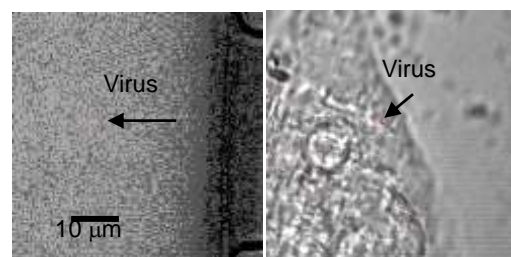


図 1 単一ウイルス感染用マイクロ流体チップ



(a) Before DEP concentration (b) After DEP concentration

図 2 誘電泳動力によるウイルス捕集



(a) Virus transport by optical tweezers (b) Contact of single virus to a cell

図 3 単一ウイルスの特定細胞への搬送

### 単一ウイルス感染システムの改良(ウイルス濃縮機構の改良)

単一ウイルス感染用マイクロ流体チップにおいて、誘電動力によるウイルス濃縮の効率化を図るために、電極間の流路形状を 3 次的に設計し、電極間に誘電体を配置し電気力線を集中させ局所的に電界勾配を向上させることでより大きな力を発生させる iDEP (Insulator-based Dielectrophoresis) を用いたインフルエンザウイルスの濃縮機構の作製を行った。

有限要素法を用いた電場解析に基づき、流路形状と電極配置をし、マイクロ流体チップの設計を行った(図 4 参照)。2 次元流路よりも 3 次元流路にすることで電場の勾配を大きくすることができ、同じ電極配置においてもより大きな力を発生できることを確認した(図 5 参照)。3 次的な狭窄部を有する流路をマスクレス露光装置によるグレースケールリソグラフィにより作製した(図 5)。細胞チャンバーは従来通り細胞播種及び回収用に上部を開閉可能にした。図 6 に示すように、ウイルス溶液の導電率を 20 mS/m に調整し 20 V<sub>pp</sub>、10 MHz の正弦波の電圧の印加により、誘電泳動力でウイルスを流路流で濃縮することに成功した。濃縮した DiI 標識ウイルスを光ピンセットにより搬送し、細胞培養チャンバー内へ搬送できた。本手法は従来のチップに比べウイルス濃縮部を細胞チャンバーに近傍に設置できるため、従来よりも単一ウイルス搬送・細胞感染の作業性が向上できた。また、ウイルス濃縮部はその 3 次元に絞った形状から、これまで懸念されてきたガラス基板へのウイルス付着を抑制し得る可能性が示された。現状では同マイクロ流体チップを用いた単一ウイルス感染細胞の回収にはまだ至っておらず、今後も継続して改良を行う。

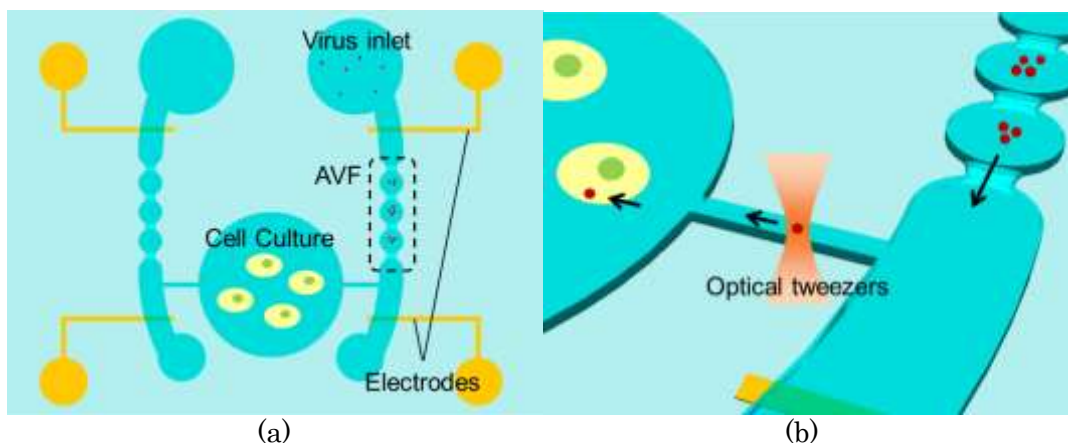


図4 iDEPによるウイルス濃縮機構を用いた単一ウイルス感染用マイクロ流体チップ (a) 全体図 (b) ウイルスの搬送経路

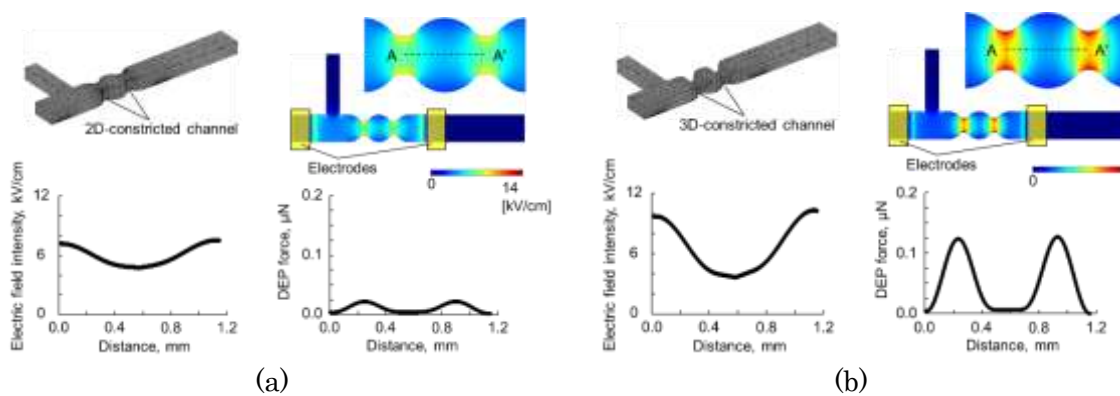


図5 FEM解析による流路中の電場分布及び誘電泳動力の解析 (a) 2次元流路での解析結果 (b) 3次元流路での解析結果

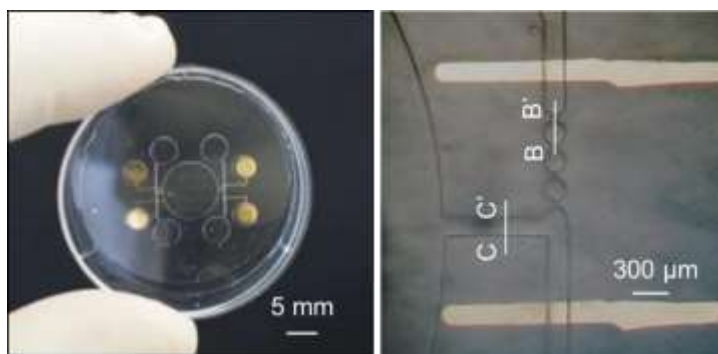


図6 マイクロ流体チップと電極配置

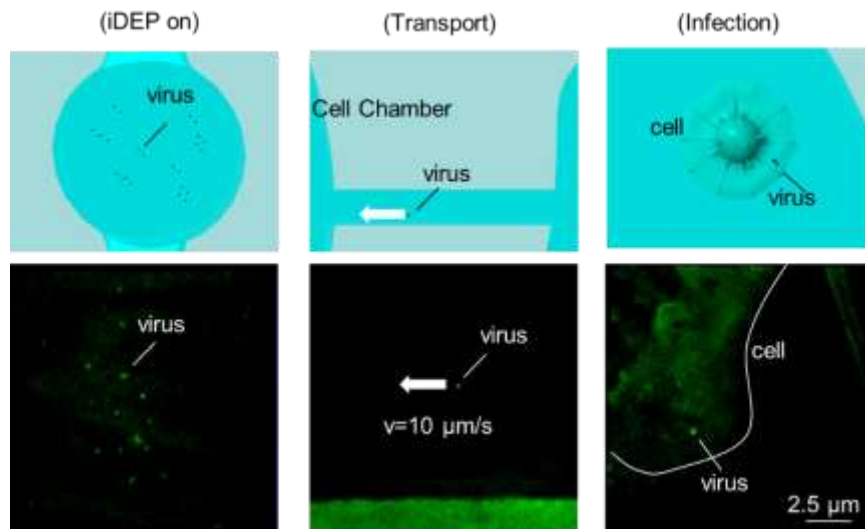


図 7 iDEP によるウイルス濃縮と光ピンセット操作による単一細胞への操作

## 2. 核内環境計測とvRNPの核内での補足搬送 計測及び操作技術の開発及び核内環境測定

### 温度・pH 計測ツールの開発

ウイルスに感染した細胞表面及び細胞内(細胞質内, 核内)の温度と pH のマルチパラメータを計測可能な蛍光センサとして, 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 と pH 感受性を有する蛍光色素 FITC を導入したものを温度・pH 計測ツールを作製した. 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)において操作可能である. Rhodamine B は温度上昇に従い蛍光強度が低下し, FITC は pH の上昇に伴い蛍光強度が上昇する.

マルチ蛍光センサの作製プロセスを以下に説明する.

1. PS ビーズ溶液と Rhodamine B のエタノール溶液 (100 mmol/l) を 1:1 の割合で混合する. 1 分間攪拌後, 5 分静置しビーズを染色する.
2. DI 水を加えた後遠心分離を行い, 上澄み液を除去する. この過程を 3 回の繰り返し PS ビーズを洗浄する.
3. 洗浄した 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に FITC を修飾する.
4. 遠心式フィルターを用いた遠心分離処理し, 四溶液中の FITC を除去.

3  $\mu$ m の PS ビーズを用いて作製したマルチ蛍光センサの蛍光写真を図 8 に示す. Rhodamine B は 561 nm の波長で励起することで 580 nm の蛍光を, FITC は 488 nm の波長で励起することで 515 nm の蛍光を発する. 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ず, 蛍光強度の相対変化を計測することで, 図 9 に示すように温度及び pH の計測が可能となる. マルチ蛍光センサの作製はサイズに依存せず, 他のサイズのビーズを用いても作製可能である. また, FITC の pH の感度は温度に依存するため, 正確な pH 計測のためには温度計測を併用する必要がある. 本プロジェクトでは温度が変動する細胞表面及び細胞内での計測が必要である. このため Rhodamine B の温度計測結果を FITC の pH 感度の補正に用いることでより正確なマルチパラメータ計測が実現できる(現在特許申請準備中). また, このセンサが細胞に存在すると考えられるカリウムやナトリウムなどのイオンに影響を受けないことも確認した. 現在, 作製したセンサを脂質膜に封入し, ウイルス感染細胞の細胞内での温度及び pH 変化の計測実験を行っている.



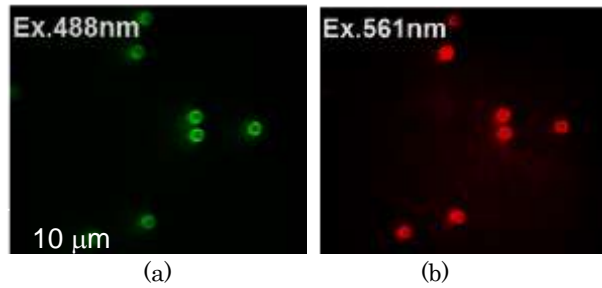


図 8 マルチ蛍光センサの蛍光画像. (a)FITC の蛍光画像. (b) Rhodamine B の蛍光画像.

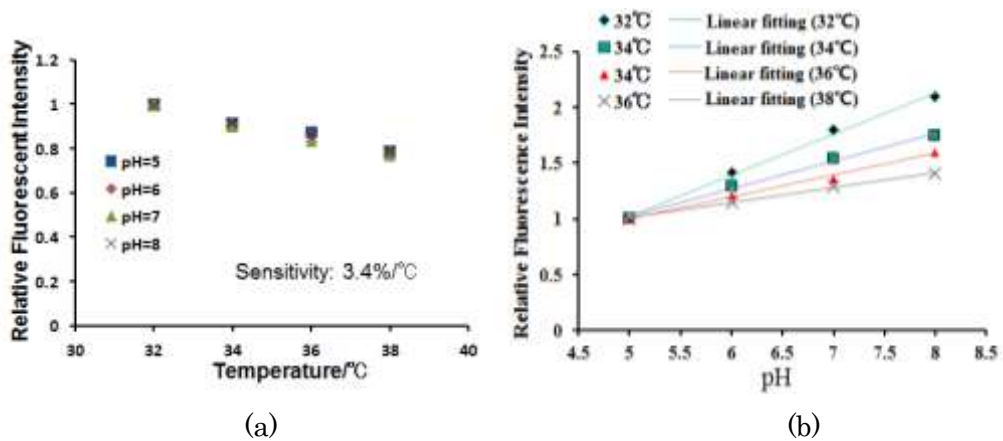


図 9 Rhodamine B 及び FITC の蛍光強度と温度及び pH の較正結果 (a) Rhodamine B の較正結果. (b) FITC の較正結果.

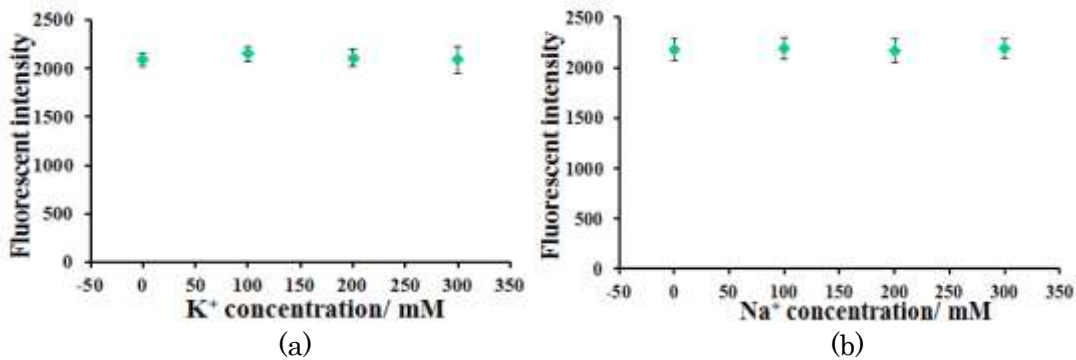


図 10 FITC の蛍光強度とナトリウムイオン及びカリウムイオンの関係 (a) カリウムイオン (b) ナトリウムイオン

#### 細胞表面に設置した温度センサによるインフルエンザウイルス感染細胞の温度変化解析

作製した温度センサを用いて、インフルエンザウイルスに感染した細胞と非感染の細胞の温度変化の違いを計測した。光ピンセット操作により直径  $1 \mu\text{m}$  の温度センサを操作し、インフルエンザウイルスを接触させた H292 細胞膜上に固定し、蛍光強度の時間変化を計測した。計測は 5 時間行い、計測後に Cy3 で細胞の免疫染色を行い増殖したウイルスを染色することで感染細胞の判別を行った。結果として、ウイルス感染細胞では感染後 2 時間後から温度が上昇し、4 時間後に約  $5\text{K}$  温度が上昇し、その後温度が低下することを確認した(図 11)。しかし非感染細胞では温度変化は見られなかった。これによりインフルエンザウイルス感染による細胞の温度変化を計測システムができたと考えており、現在細胞内の温度計測及び温度・pH 計測を行っている。

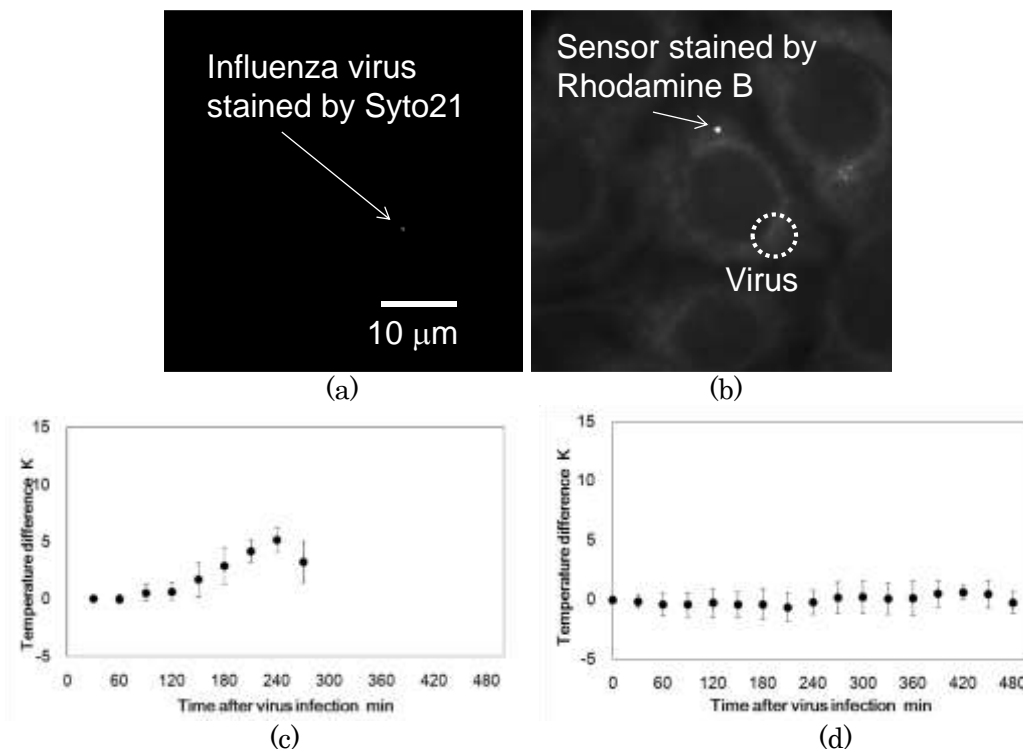


図 12 ウイルス感染・非感染細胞の温度計測 (a) ウイルスの蛍光画像 (b) センサの蛍光画像 (c) ウイルス感染細胞 (d) ウイルス非感染細胞

#### 核内環境計測のためのツールの細胞内・核内導入

異なる周期及びウイルス感染前後の細胞内及び核内の生理環境 (pH・温度等) を計測するためのツールを選択的に導入するための技術を開発した。昨年度は環境計測用センサ (環境応答性蛍光色素を導入した高分子ビーズ) を、膜融合性を有するリポソームに封入することで、細胞内へのセンサの導入に成功した。昨年度の時点では細胞への付着には正電荷の脂質をリポソームに加えることで負に帯電している細胞膜へ付着させていたが、この手法では、センサ 1 個単位での選択的導入は困難であった。今年度は、(1) 正電荷、負電荷の脂質二重膜を交互に積層させることで任意の層数の脂質二重膜でセンサをコートする技術、(2) 光照射で表面電位を制御することでセンサ 1 個単位での細胞への付着を制御する技術、に関して研究を行った。

(1) 任意の層数の脂質二重膜をセンサにコートは下記に示す方法で行った。図 13 に示すように、センサ表面に正の電荷を有する脂質 (DPPC) の単層リポソームで表面をコートした超音波処理により融合し脂質二重膜を形成する。次に負の電荷を有する脂質 (DPPG) の単層リポソームを同様の方法でコートし、最終的に表面電位が負で 4 層の脂質二重膜をセンサにコートする。図 14 に示すようにセンサに対し任意の層数の脂質膜をコートすることに成功した。この手法では、脂質膜表面は負に帯電しているため、細胞との静電的な付着が生じない。細胞との選択的な付着は(2)の光照射による表面電位制御により行う。脂質膜の表面電位の光制御の評価として、qNano と呼ばれる微粒子径及び表面電荷評価装置を用いてセンサを内包した脂質膜の表面電位変化の評価を行った。粒径に関しては脂質膜のコート処理毎に約 10~11 nm 粒径が増加しており、脂質二重膜 (1 層約 6nm) が 2 層ずつコートすることに成功していることを確認した。

今後は、作製した脂質膜の層数の定量評価を行い、任意の層数の脂質膜コートの条件出し及びデータ収集を行う。

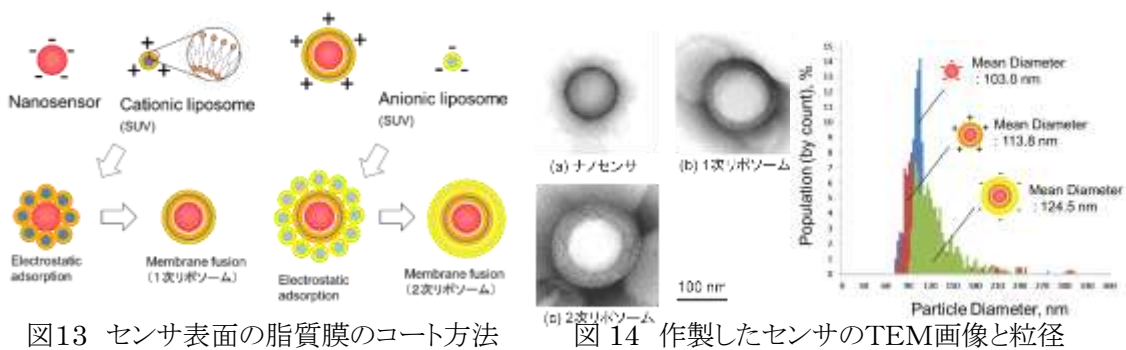


図13 センサ表面の脂質膜のコート方法

図14 作製したセンサのTEM画像と粒径

(2) 光照射による脂質二重膜の表面電位制御に関しては、フォトクロミック材料の 1,3,3-Trimethylindolino -6'- nitrobenzopyrylospiran (SP) を脂質二重膜に導入することで制御を行う。SP は図 2 に示すように可視光照射下ではスピロピラン型の構造をしているが、紫外光を照射するとメロシアン型に構造が変化する。この変化は可逆性であり、繰り返しの変化が可能である。メロシアン型では表面電位が上昇するため、SP の光異性化を利用して脂質二重膜の選択的細胞付着を実現する。表面電位の評価に関しては、図 15 に示すように、電極間に電圧を印加しその通過時間を比較することで表面電位の評価をおこなった。今回は電位が高い程通過時間は長くなる。表面が負の電位を有する DPPG は正の電位を有する DPPC よりも通過時間が短い、紫外光を照射することで通過時間が長くなった(図 16 参照)。これは、スピロピランの光異性化による表面電位の増大により DPPC の脂質膜表面が DPPC よりも高い表面電位に変化したことを示している。

光異性化による細胞付着性制御の確認のため、センサを光ピンセットで操作し MDCK 細胞への付着実験を行った。紫外光を照射する前は細胞への付着が見られなかったが、紫外光を照射したセンサは細胞膜へ付着した(図 17 参照)。また付着したセンサは可視光照射化で細胞から離脱し、その後再び紫外光を照射することで細胞への再付着が見られた。

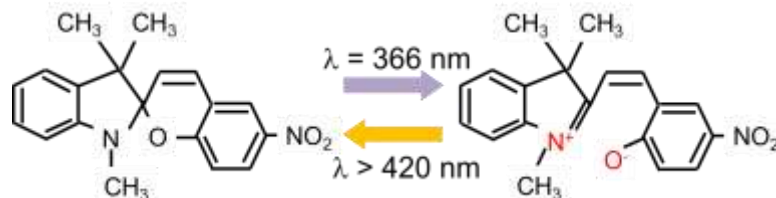


図 15 SP の光異性化による分子構造の変化

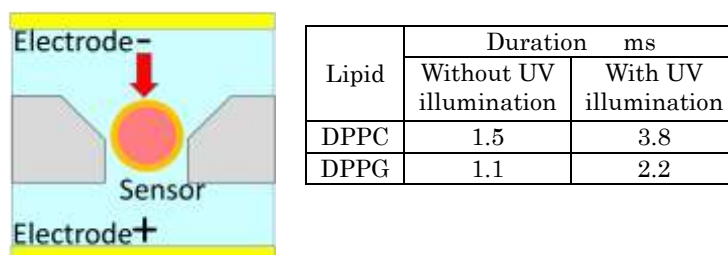
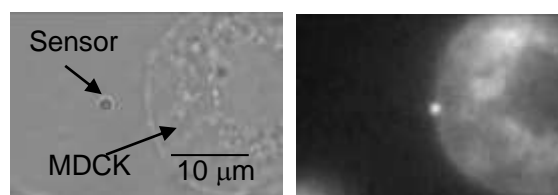


図 16 スピロピラン含有脂質膜の紫外照射による表面電位変化



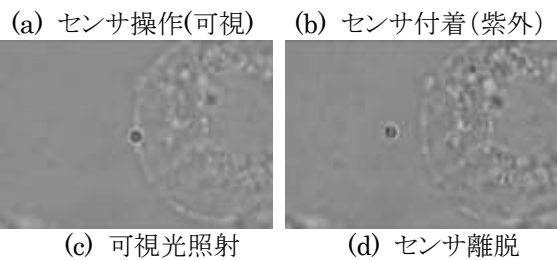


図 17 センサの選択的細胞付着と離脱

作製したセンサを用いて細胞内へのセンサの導入実験を行った結果を図 18 に示す。センサとしては直径 100 nm のポリスチレン製の蛍光ビーズ(緑色)を用いた。細胞核は Hoechst 33342 で染色している(青色)。センサを固定し 6 時間培養した後に、センサが核内に侵入したことを確認した(図 18(b),(c)。核内の 3 次元積層画像を図 18(d)に示す。核内(青色)の中にセンサ(緑色)が入っていることが確認でき、核内にセンサが導入できたことを確認した。細胞に固定した 6 個のセンサの内、最終的に 3 個が核内、3 個が細胞質内に導入された。今後はこれまでに開発してきた単一ウイルス感染チップ及び感染細胞計測技術と組みあわせ、ウイルス感染細胞内部の生理環境変化計測を実現する。

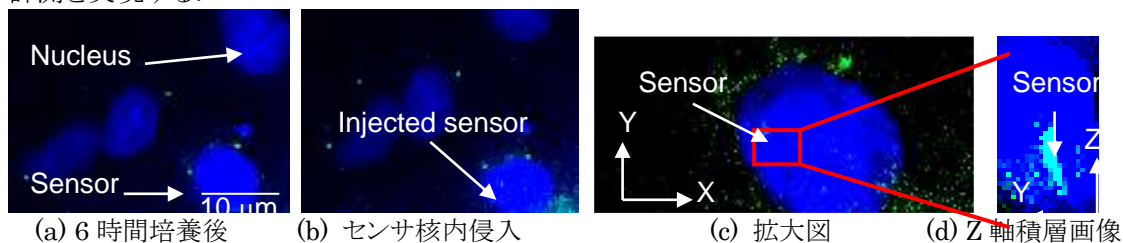


図 18 光表面電位制御を用いたセンサの細胞内導入実験結果

#### 4. 3 細胞分裂期の染色体局在の物理的環境測定技術の開発(奈良先端大学 杉浦グループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

##### 細胞膜強度計測システム開発

光ピンセットを利用して保持した粒子を細胞表面の狙った場所に固着させ、左右に往復運動をさせて振幅の減衰を計測することで細胞膜の固さを評価するシステムである計測システムを開発した。本システムでは、ウイルス感染時の細胞膜の力学的特性の変化を計測することを目的に開発を進めた。細胞膜の計測では、コラーゲンコートした粒子を細胞膜へ押し当てた状態で一定時間保持して固着させ、そして往復運動させることで細胞膜強度を計測でき、その後も印加した力学的刺激によって細胞の接着斑が成熟する。計測システムは数 pN オーダーの力計測精度を確認した。さらに接着斑下部で細胞骨格が形成されて行く様子を計測し、初期の接着斑形成から30分程度で接着斑が成熟し、その後60分程度は計測結果がほぼ一定であることを確認した。そのような条件の範囲であれば細胞膜の力学的特性を計測できることを示した。

### 力の 3 次元計測による細胞膜力学特性評価

細胞触診システムの開発をさらに進めて、細胞の力学特性を 3 次元的に評価できるよう 3 次元力計測システムを開発した。本システムでは細胞上に固定した粒子の光軸方向位置を粒子のボケ像の大きさから推定することで、10nm の測定精度を実現した。光ピンセットのビーム位置を光軸方向に徐々に移動することで粒子への光軸方向力を変化させ、その際の細胞膜変形を計測することで力学特性を求める。計算には Hertz モデルを用いた。細胞の力学特性計測に用いて、ヤング率を求め、その値が文献値と整合することを確認した。また本手法を用いて粒子のブラウン運動を計測して局所的な粘性係数を計測する系を構築した。



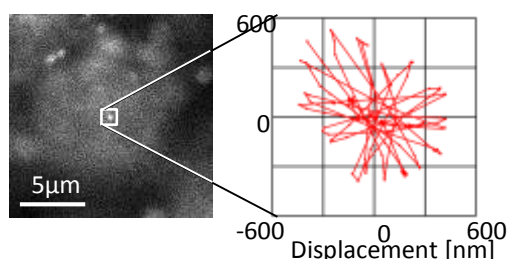
図10 パルスアシスト光ピンセットによる吸着性基板上での粒子の配列操作

### パルスレーザーアシスト光ピンセットの開発

基板表面や細胞中の膜構造など操作対象物の移動が阻まれた際に、瞬間的に大きな力を働かせることで窮地を脱するパルスレーザーアシスト光ピンセットを開発した。本手法では、通常の光ピンセットの連続波のレーザー光によって3次元トラップして操作しながら、大きな力が必要になった際にパルスレーザー光を同軸で入射して対象物に照射する。アシストに用いるパルスレーザー光は、パルス幅を 100ns~200ns 程度に長くすることで効率良く光ピンセットのアシストを行えることを力学的解析から見出し、160ns のパルス幅を持つパルス光源を特注にて作成し、パルスアシストの効率を評価した。その結果、アミノシラン処理した基板上に吸着したガラス粒子をほぼ100%の確率で引きはがせることを確認した。また引きはがした粒子を通常の光ピンセットでトラップして操作し、所望の位置で再度基板に吸着させることで粒子を整列させることに成功した。図 10 は、アミノシラン処理基板上のシリカ粒子(直径 1.57 $\mu\text{m}$ )をパルス光で引きはがして移動操作して、再吸着させることを繰り返して作成したパターンの一例である。さらに細胞適用実験を行い、細胞内に取り込ませた粒子操作を試みて捕捉搬送が可能であることを確認し、その粒子を細胞外へ取り出すことに成功した。

### 核内環境計測と vRNP の核内での捕捉・搬送

核内の捕捉搬送については核内に移行した vRNP を光ピンセットで捕捉し、500nm 程度移動させることができることを確認し、その可動範囲が核内では制限されていることを確認した。



さらに 可動範囲の時間変化を計測し、ウイルス感染から時間を経るにつれて可動範囲が減少することを見出した。

### 凝縮染色体の部分精製・in vitro での凝縮染色体の捕捉搬送と計測

#### 「フェムト秒パルスによる細胞膜および vRNP 切除」

フェムト秒パルス光による vRNP 切除に関して、DNA 上の特定箇所の遺伝子を不活性化する手法を考案し、in vitro での実験を行い、光照射することで DNA の二重らせん構造を壊すことができることを確認した。また、フェムト秒パルス光を任意位置に照射する光学系を開発した。

in vitro で染色体内特定領域の DNA とウイルス RNP 切除の試み

「外来遺伝子(GFP)挿入染色体を持つ細胞の構築と外来遺伝子除去実験」

染色体上の特定遺伝子の機能を半永久的にノックアウトする手法として、蛍光分子からの活性酸素種発生による DNA 不活性化を試みた。

## §5 成果発表等

(1)原著論文発表(国内(和文)誌 1 件、国際(欧文)誌 17 件 )

和文誌

1. 恩田一寿、新井史人, 計算機ホログラムによる高速マルチビーム隔操作、日本ロボット学会誌、Vol. 29、No. 7、pp. 643-649、2011

欧文誌

1. Miyoshi,H, Sugiura,T and Minato,T: Cell Palpation System Based on a Force Measurement by Optical Tweezers for Investigation of Local Mechanical Properties of a Cell Membrane, 2009 Japanese Journal of Applied Physics 48 120223-1-3
2. Arai,F, Kohtani,K, Maruyama,H, Honda,A and Ejima, M: On-chip Robotics for Biomedical Innovation Manipulation of Single Virus on a Chip, Nanotechnology 113-118 2009
3. Maruyama,H, Masuda,T,Arai,F:Functional gel-microbead manipulated by optical tweezers for local environment measurement in microchip, March 2009, 6, pp 383-390 (DOI10.1007/s10404-008-0401-6)
4. Matsumoto,M, Sugiura,T, Minato,T: Illumination by near-critical-angle Incidence for imaging fluorescence correlation spectroscopy with electron-multiplying charge-coupled device camera, 2010 *Jap.J.Appl Phys.* 49,060208-1 to -3 (DOI: 10.1143/JJAP.49.060208)
5. Gopinath, M., Raju, S. , Honda,A and Shaila, M.S : The host factor Ebp1 inhibits Rinderpest virus transcription in vivo. 2010 *Virus Res. Archives of Virology* 155 455-462 (DOI:10.1007/s00705-010-0599-y)
6. Maruyama,H, Kotani,K, Masuda,T,Honda,A, Takahata,T, Arai,F:Nanomanipulation of single Influenza Virus Using Dielectrophoretic Concentration and Optical Tweezers for single virus infection to a specific cell on a Microfluidic Chip. *Microfluids and Nanofluidics*, 10,1109-1117, 2011 (DOI: 10.1007/s10404-010-0739-4)
7. Ejima,M, Kadoi,K and Honda,A :Influenza virus infection induces cellular *Ebp1* gene expression, *Genes to Cells* 16 927-937 2011 (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01541.x.)
8. Maruyama,H, Otake,T, Arai,F :Photoprocessible Hydrogel Microsensor for Local Environment Measurement on a Microfluidic Chip”, *IEEE/ASME TRANSACTIONS ON MECHATRONICS*, 16 845-852 2011 (DOI:10.1109/TMECH.2011.2161878)
9. Onda,K, Arai,F :Multi-beam bilateral teleoperation of holographic optical tweezers, *Optics Express*, 20 3633-3641, 2012 (DOI: 10.1364/OE.20.003633)
10. Maeda,S, Sugiura,T, Minato,T :Optical tweezers with assistance of sub-microsecond duration pulse laser beam, *Applied Physics Express*,vol.5. No. 4, pp.04701, 2012 (DOI: 10.1143/APEX.5.042701).
11. Sugiura,T, Miyoshi,H, Nishio,T, Honda,A :Cell palpation with an optically trapped particle, *Journal of Micro-Nano Mechatronics* 7 131-136 2012. (DOI: 10.1007/s12213-012-0051-3)
12. Sugiura,T, Maeda,S and Honda,A :Pulse Laser Assisted Optical Tweezers for Biomedical Applications, *Proceedings of 34th Annual International Conference of*

- the IEEE EMBS, 4476-4471 2012.
13. Ohara,K, Kawakami,D, Takubo,T, Mae,Y, Tanikawa,T Honda,A, Arai,T :Dextrous cell diagnosis using two-fingered microhand with micro force sensor, Journal of Micro-Nano Mechatronics 1-8 2012
  14. Ueda,R, Sugiura,T, Kume,S, Ichikawa,A, Steven Larsen, Miyoshi, H, Hiramatsu, H, Nagatsuka, Y, Arai,F, Suzuki,Y, Hirabayashi,Y, Fukuda,T, Honda,A :A Novel Single Virus Infection System Reveals That Influenza Virus Preferentially Infects Cells in G1 Phase, PloS One, e67011, 2013
  15. Masuda,T, Maruyama,H, Honda,A, Arai,F : Multi-Layered Liposome Containing Nanosensor for Transfecting into a Cell Nucleus, 13th IEEE International Conference on Nanotechnology, August 5-8, 2013
  16. H. Maruyama, T. Masuda, F. Arai: Fluorescent-Based Temperature Measurement with Simple Compensation of Photo-Degradation Using Hydrogel-Tool and Color Space Conversion, Journal of Robotics and Mechatronics 25 596-602 2013
  17. T. Hayakawa, S. Fukada, F. Arai: Fabrication of an On-Chip Nanorobot Integrating Functional Nanomaterials for Single Cell Punctures, IEEE Transactions on Robotics, 30 59-67 2013
  18. Taisuke Masuda, Hisataka Maruyama, Ayae Honda, Fumihito Arai Virus enrichment for single virus infection by using 3D insulator based dielectrophoresis PLoS One 2014 (in press)

(2)その他の著作物(原著論文以外の総説、解説、単行本など書籍)

1. Ejima, M, Ueda,R, Kume,S, Okazaki,D, Yamakawa,T, Shiku,H and Honda,A: Ebp1 expression is induced by influenza virus infection. Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE 214-218, 2008.
2. Takahata,T, Kume,S, Miyoshi,H, Sugiura,T and Honda,A: Analysis of cellular membrane changing induced by influenza virus infection. 2009 *Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE* 267-270
3. Mukai,M and Honda,A: Analysis of Promoter Binding proteins of Ebp1 that is Inhibitor Protein of Influenza Virus RNA polymerase. 2009 *Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE* 271-274
4. Takahata, T, Kume,S, Miyoshi,H, Sugiura,Tand Honda,A: Analysis of cellular membrane changing induced by influenza virus infection. Micro-Nano Mechanics and Human Science,IEEE267-270, 2009
5. 本田文江:ゲノムRNAの転写と複製 2010年11月 現代化学 34-38
6. 杉浦忠男:「細胞の硬さを測る細胞触診技術」、村田静昭編「リアルタイム計測による生命現象の解析」分担執筆、135-141、(シーエムシー出版、2011年3月)
7. 新井史人:「マイクロ流体チップを用いた細胞の「その場」解析技術、村田静昭編「リアルタイム計測による生命現象の解析」分担執筆、17~31 (シーエムシー出版、2011年3月)
8. 本田文江:「インフルエンザウイルス感染増殖機構の解析」、村田静昭編「リアルタイム計測による生命現象の解析」分担執筆、117~126 (シーエムシー出版、2011年3月)
9. Masuda,T,Maruyama,H,Honda,A, Arai,F: Multi-Layered Liposome Containing Nanosensor for Transfecting into a Cell Nucleus, 13th IEEE International Conference on Nanotechnology, August 5-8, 2013
10. Arai,F, Maruyama,H: Nanorobotic Manipulation and Sensing for Biomedical Applications, Nanorobotics, Current Approaches and Techniques, Edited by Constantinos Mavroidis, Antoine Ferreira, Springer, Part III Nano-Manipulation in Biomedical Applications, 169-190, Jan. 2013

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 42件、国際会議 24件)

〈国内〉

1. 本田文江:インフルエンザウイルスが好む細胞について 理研研究集会 2009年1月 横浜
2. 本田文江:インフルエンザウイルス感染細胞と非感染細胞における宿主蛋白質発現量の違い 第23回桂門会シンポジウム 2009年3月、東京
3. Honda,A: Inhibitory effect of Ebp1 on the influenza virus RNA polymerase function: Japan biophysics annual meeting 11.30,2009 Tokushima
4. 新井史人、「オンチップロボティクス:マイクロ流体チップとロボットの融合」、第2回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、医学部、2010年11月18日
5. 新井史人、「非接触駆動による精密位置決め技術とバイオメディカル応用」、Optics & Photonics International 2011、パシフィコ横浜、2011年4月20日
6. 益田泰輔、「バイオMEMSを用いたマルチスケール細胞操作」、第9回バイオレオロジーリサーチフォーラム、関西大学、2011年6月2日
7. 新井史人、「磁気駆動マイクロアクチュエータとバイオメディカル応用」、スマート・アクチュエータ/センサ委員会第89及び90回合同定例会、東京キャンパス・イノベーションセンター、平成23年6月8日
8. 新井史人、「近年のマイクロロボット研究開発にみるMEMS技術が支えるセンシング・アクチュエーションの技術革新と将来性」、第22回マイクロマシン/MEMS展・ROBOTEC、東京ビックサイト、平成23年7月15日
9. 新井史人、「単一ウイルスの光操作と感染細胞の光計測」、CREST講演会 光が拓く細胞解析の最前線、法政大学市ヶ谷キャンパスボアソナードタワー、平成23年7月25日
10. 本田文江、インフルエンザウイルス感染により誘導される細胞変化 第4回CREST講演会「光が拓く細胞解析の最前線」東京、2011年7月25日
11. 杉浦忠男、光ピンセットによる細胞機能の光計測 第4回CREST講演会「光が拓く細胞解析の最前線」東京、2011年7月25日
12. 新井史人、「バイオメディカル分野を拓くこれからのロボティクスに期待すること (MEMSとナノテクノロジーが可能とする高次機能システム統合の現状と展望)」、電子情報技術部会 MEMS分科会、東京都千代田区、社団法人 新化学技術推進協会、平成23年8月10日
13. 新井史人、「MEMS・ナノテクノロジーを基盤とするバイオメディカルロボティクス」、JSME 第三(東海)地区特別講演会、メディカルロボティクス、ロボティクスの医学応用への取り組み一、特別講演、平成23年11月11日
14. 新井史人、「バイオニックシミュレータの実現に向けて」、日本動物実験代替法学会 第24回大会、平成23年11月12日
15. 新井史人、「細胞の高速操作・計測・アセンブリに関する最新の話題」第28回医用高分子研究会講座(高分子学会)「高分子を活用した細胞周辺技術の基礎と新展開」、平成23年11月24日
16. 新井史人、「バイオニックシミュレータの実現に向けて」(血管シミュレータの加工、細胞操作・計測・アセンブリの現状と課題)、大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 講演会、平成23年12月20日
17. 杉浦忠男:細胞を触って診断する細胞触診システム、第24回バイオエンジニアリング講演会、大阪大学、2012年1月7日
18. 本田文江:インフルエンザウイルスRNAポリメラーゼ機能を阻害する宿主タンパク質について、桂記念シンポジウム、エーザイ会議室、2012年3月11日
19. 新井史人:「非接触駆動による精密位置決め技術とバイオメディカル応用」、Optics & Photonics International 2011、パシフィコ横浜、2011年4月20日
20. 益田泰輔:「バイオMEMSを用いたマルチスケール細胞操作」、第9回バイオレオロジーリサーチフォーラム、関西大学、2011年6月2日
21. 新井史人:「磁気駆動マイクロアクチュエータとバイオメディカル応用」、スマート・アクチュエータ/センサ委員会第89及び90回合同定例会、東京キャンパス・イノベーションセンター、平



成 23 年 6 月 8 日

22. 新井史人:「近年のマイクロロボット研究開発にみる MEMS 技術が支えるセンシング・アクチュエーションの技術革新と将来性」、第22回マイクロマシン/MEMS展・ROBOTEC、東京ビックサイト、平成 23 年 7 月 15 日
23. 新井史人:「単一ウイルスの光操作と感染細胞の光計測」、CREST 講演会 光が拓く細胞解析の最前線、法政大学市ヶ谷キャンパスポアソナードタワー、平成 23 年 7 月 25 日
24. 本田文江 :インフルエンザウイルス感染により誘導される細胞変化 第 4 回 CREST 講演会「光が拓く細胞解析の最前線」東京、2011 年 7 月 25 日
25. 杉浦忠男:光ピンセットによる細胞機能の光計測 第 4 回 CREST 講演会「光が拓く細胞解析の最前線」東京、2011 年 7 月 25 日
26. 新井史人:「バイオメディカル分野を拓くこれからのロボティクスに期待すること (MEMS とナノテクノロジーが可能とする高次機能システム統合の現状と展望)」、電子情報技術部会 MEMS分科会、東京都千代田区、社団法人 新化学技術推進協会、平成 23 年 8 月 10 日
27. 新井史人:「MEMS・ナノテクノロジーを基盤とするバイオメディカルロボティクス」、JSME 第三(東海)地区特別講演会、メディカルロボティクス、ロボティクスの医学応用への取り組み一、特別講演、平成 23 年 11 月 11 日
28. 新井史人:「バイオニックシミュレータの実現に向けて」、日本動物実験代替法学会 第 24 回大会、平成 23 年 11 月 12 日
29. 新井史人:「細胞の高速操作・計測・アセンブリに関する最新の話題」第 28 回医用高分子研究会講座(高分子学会)「高分子を活用した細胞周辺技術の基礎と新展開」、平成 23 年 11 月 24 日
30. 新井史人:「バイオニックシミュレータの実現に向けて」(血管シミュレータの加工、細胞操作・計測・アセンブリの現状と課題)、大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 講演会、平成 23 年 12 月 20 日
31. 杉浦忠男 :細胞を触って診断する細胞触診システム、第 24 回バイオエンジニアリング講演会、大阪大学、2012 年 1 月 7 日
32. 本田文江:インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ機能を阻害する宿主タンパク質について、桂記念シンポジウム、エーザイ会議室、2012 年 3 月 11 日
33. 丸山央峰:機能性ゲルツールを用いたオンチップ細胞状態計測、分子ロボティクス研究会、名古屋、2012 年 4 月
34. 本田文江 :人為的ウイルス感染により見えてきた細胞の違い、第 5 回 CREST 講演会、東京、2012 年 8 月 18 日
35. 新井史人:単一ウイルスの光操作と感染細胞の光計測、第 5 回 CREST 講演会、東京、2012 年 8 月 18 日
36. 杉浦忠男:光ピンセットによるウイルス RNP 操作と光計測の可能性、第 5 回 CREST 講演会、東京、2012 年 8 月 18 日
37. 新井史人:未来のメディカルロボットを創るー超精密機械システム技術への挑戦ー、第 39 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 ランチョンセミナー3、北九州国際会議場、小倉、平成 24 年 12 月
38. 木邨貴洋、本田文江:インフルエンザウイルス増殖を阻害する宿主蛋白質 Ebp1 について、桂記念シンポジウム、エーザイ会議室、2013 年 3 月 3 日
39. 本田文江:インフルエンザウイルスゲノムの核内局在領域について、第 6 回 CREST 講演会、東京、2013 年 8 月 24 日
40. 本田文江:上田竜太、杉浦忠男、糸眞一郎、市川明彦、平松宏明(中部大学) :インフルエンザウイルスの細胞への付着は細胞周期特異的である、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 月 12 日
41. Maruyama,H, Kawaguchi,N, Arai,F, and Honda,A :Influenza virus infection induce the temperature rising of cell, 2013 International Symposium on

Micro-Nano Mechatronics and Human Science,名古屋、2013年11月13日

42. 本田文江:ナノバイオテクノロジーにより見えてくるウイルス感染細胞変化の新展開、5 大学ナノ・バイオテクノロジーコンソーシアムシンポジウム、東京、2013年11月15日

〈国際〉

1. Arai,F, Kotani,K, Maruyama,H, Honda,A, and Ejima, M: On-Chip Robotics for Biomedical Innovation: Manipulation of Single Virus on a Chip, 2009 9th IEEE Conference on Nanotechnology, July 26-30, Italy (2009) pp. 133-138.
2. Honda,A, Arai,F, Fukuda,T :Influenza virus selects the cell to bind. BIT The 3rd World Congress of GENE Foshan, China Dec. 2009
3. Arai,F :On-chip Robotics: Technical Issues and Future Direction, *2010 IEEE International Conference on Robotics and Automation*, Anchorage, USA, May 3, 2010.
4. Arai,F:On-chip Robotics for Biomedical Device Innovations, *6th World Congress of Biomechanics*, Singapore, Singapore, August 4, 2010.
5. Arai,F:Nanomanipulation and Sensing on a Chip, *6th IEEE Conference on Automation Science and Engineering*, Toronto, Canada, August 21, 2010.
6. Arai,F:On-chip Robotics for Future Biomedical Device Innovations, *IEEE BioRob 2010*, Tokyo, Japan, September 28, 2010.
7. Arai,F:Micro-assembly in Liquid on a Chip, 2011 IEEE International Conference on Robotics and Automation, Workshop, Shanghai, May 9,2011.
8. Arai,F:On-chip Robotics for Biomedical Innovations, Int. Meeting for Future of Electron Device, Osaka, Japan, May 20, 2011.
9. Arai,F:Recent On-Chip Micro-Nano Robotics for Cellular Investigation, 33rd International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Boston, USA, August 30, 2011.
10. Arai,F:Recent Progress on Multiscale Force Sensing, 2011 Korea-Japan Workshop, Gamagori, July 17, 2011.
11. Arai,F:Recent Micro-nano Robotics in Microfluidic Chip for Cellular Investigation, The 6th Nagoya University-UCLA International Symposium, at UCLA, LA, CA, USA, August 27, 2011
12. Arai,F:Force Sensing by Microrobot on a Chip, 2011 International Symposium of Robotics Research (ISRR), Flagstaff, AZ, USA, August 29, 2011.
13. Arai,F:On-chip Robotics in Medicine and Life Sciences, 2011 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, Workshop, San Francisco, USA, September 25, 2011.
14. Arai,F:High-speed Microfluidic Systems for Biomedical Innovations, JSME, International Workshop on Micro/Nano-Engineering, Kyoto Univ., Japan, Invited talk, December 18, 2011.
15. Arai,F:Microrobots in Spotlight for Evolution of Biomedicine, 25th International Conf. on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), Paris, Plenary speaker, February 1, 2012.
16. Arai,F:High-speed Micro-robot in Microfluidic Chip, 2nd Workshop on Dynamics and Control of Micro and Nanoscale Systems, Newcastle, Invited talk, February 23, 2012.
17. Arai,F:Sensing and Manipulation in Microfluidic Chip Based on On-chip Robotics, 5th International Symposium on Nanomedicine(ISNM2012), Nagoya, Invited talk, March 17, 2012.
18. Arai,F:Current issues in the Lab.( Micro-Nano Robotics in Microfluidic Chip ), Advanced Robotics Workshop in Seoul National University, Seoul, Invited talk, march 19, 2012.
19. Sugiura,T:Nano-metric manipulation with optical tweezers and its application to

diagnostics of single cell, BIT's 5th Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2012, Xi'an China, April 27th, 2012

20. Arai, F: On-chip Robotics: Interdisciplinary Integration of Microfluidics and Robotics, The 4th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, Plenary, Taiwan, June 2012.
21. Arai, F: Integrated Robotic System on a Microfluidic Chip for Evolution of Biomedicine, 3M-NANO 2012, Keynote Report, Xi'an, China, Aug. 2012.
22. Maruyama, H, Arai, F: Micro and Nanorobotic for Biology and Medicine, 34th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Workshop, San Diego, USA, Aug. 2012.
23. Arai, F: Micro-nano robotic manipulation and biomedical applications, SPIE Nanosystems in Engineering + Medicine Congress – 2012, Keynote, Incheon Songdo Convention Center, Korea, Sept. 2012.
24. Arai, F: On-chip Robotics: High-speed Integrated Systems for Biomedical Innovation, Int. Union Materials Research Societies – Int. Conf. Electronic Materials, Invited, Yokohama, Japan, Sept. 2012.

② 口頭発表 (国内会議 40 件、国際会議 25 件)

〈国内〉

1. 本田文江 : ウイルス感染・非感染細胞の膜強度解析、特定領域 ”女性シンポジウム“ 2009 年 8 月
2. 新井史人 : オンチップ光操作・計測技術: ウイルス感染細胞の特性解明に向けて、第 2 回 CREST 講演会「光で拓く細胞からの染色体の世界」東京、2009 年 8 月 20 日
3. 杉浦忠男: 光による力学作用を用いた細胞計測とマニピュレーション 第 2 回 CREST 講演会「光で拓く細胞からの染色体の世界」東京、2009 年 8 月 20 日
4. 本田文江: 光ピンセットを利用したウイルス搬送・付着から見えてくる細胞の特徴 第 2 回 CREST 講演会「光で拓く細胞からの染色体の世界」東京、2009 年 8 月 20 日
5. Kotani, K, Maruyama, H, Yamanishi, Y, Arai, F : Nano-Biomanipulation for Single Virus Manipulation on a Microfluidic Chip, 第 27 回日本ロボット学会学術講演会、横浜国立大学、2009 年 9 月 15 日
6. 飯塚龍、恩田一寿、丸山央峰、新井史人: 自己組織化を利用した機能性マクロツールの作製と操作、第 27 回日本ロボット学会学術講演会、横浜国立大学、2009 年 9 月 16 日
7. 丸山央峰、港谷恭輔、飯塚龍、本田文江、江島美穂、新井史人 : 細胞内環境計測のための機能性ナノツールの作製、第 27 回日本ロボット学会学術講演会、横浜国立大学、2009 年 9 月 16 日、2B2-03
8. 高畑辰郎、本田文江: ウイルス感染による細胞変化測定 第 24 回桂シンポジウム 東京 2010 年 3 月 14 日
9. 本田文江: インフルエンザウイルス感染細胞と非感染細胞の比較 第 3 回 CREST 講演会「光で拓く細胞計測の世界」東京、2010 年 8 月 31 日
10. 杉浦忠男: 光ピンセットで明らかにする細胞の力学的性質 第 3 回 CREST 講演会「光で拓く細胞計測の世界」東京、2010 年 8 月 31 日
11. 新井史人: 単一ウイルスの操作と細胞内の感興計測 第 3 回 CREST 講演会「光で拓く細胞計測の世界」東京、2010 年 8 月 31 日
12. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎: パルスアシスト光ピンセットの細胞操作への応用、第 71 回 応用物理学会学術講演会、16p-C-15、講演予稿集 DVD 03-108、長崎、2010 年 9 月 16 日
13. 丸山央峰、益田泰輔、井上直也、新井史人 : 核内環境計測のための機能性ゲルツールの細胞周期を利用した核内導入、第 28 回日本ロボット学会学術講演会、名古屋、2010 年 9 月 22 日
14. 丸山央峰、井上直也、新井史人 : 機能性ゲルツールを用いた局所光 pH 制御、第 28 回日本ロボット学会学術講演会、名古屋、2010 年 9 月 23 日

15. 恩田一寿、新井史人 :計算機合成ホログラムによるマルチビーム操作、第 28 回日本ロボット学会学術講演会、名古屋、2010 年 9 月 23 日
16. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎:パルスレーザー・アシスト光ピンセットによる細胞操作、日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2010, 9aH2, pp. 314- 315、東京、2010 年 11 月 9 日
17. 益田泰輔、丸山央峰、本田文江、新井史人:能動ウイルスフィルタを用いた単一ウイルス操作、第 11 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会、仙台、2010 年 12 月 25 日
18. 益田泰輔、丸山央峰、本田文江、新井史人 :単一ウイルス分離のための能動ウイルスフィルタ、第 2 回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会、熊本、2011 年 1 月 8 日
19. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎:ロングパルスレーザーによるパルスアシスト光ピンセット (PLAT) 法、第 58 回応用物理学関係連合講演会、厚木、2011 年 03 月
20. 恩田一寿、新井史人:オンライン合成ホログラムを用いた光ピンセットの遠隔操作、第 16 回ロボティクス・シンポジウム、鹿児島、2011 年 3 月 14 日
21. 恩田一寿、新井史人:計算機合成ホログラムを用いた光ピンセットの高速遠隔操作、第 58 回応用物理学関係連合講演会、神奈川、2011 年 3 月 26 日
22. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎 :ロングパルスレーザーを用いた PLAT (Pulse Laser Assist optical Tweezers) による細胞操作、第 50 回日本生体医工学会大会、生体医工学第 49 巻 (2011) p. 85, 東京電機大学、2011 年 4 月
23. 本田文江:インフルエンザウイルス感染により誘導される細胞変化、第 4 回 CREST 講演会「光が拓く細胞解析の最前線」東京、2011 年 7 月 25 日
24. 杉浦忠男:光ピンセットによる細胞機能の光計測、第 4 回 CREST 講演会「光が拓く細胞解析の最前線」東京、2011 年 7 月 25 日
25. 新井史人:単一ウイルスの光操作と感染細胞の光計測、第 4 回 CREST 講演会「光が拓く細胞解析の最前線」東京、2011 年 7 月 25 日
26. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎、「PLAT におけるロングパルスレーザーのパルス波形の改良」、第 72 回応用物理学学会学術講演会 講演予稿集 p. 03-140 (31p-ZJ-11)、山形大学、2011 年 8 月 31 日
27. 丸山央峰、苅谷涼、益田泰輔、新井史人:蛍光スペクトル分布変化を用いた長寿命温度計測ゲルセンサ、芝浦工業大学、2011 年 9 月 8 日
28. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎:パルスレーザーのパルス波形による PLAT (Pulse Laser Assist optical Tweezers) への影響、Optics Photonics Japan 2011, 28aB2, 大阪大学、2011 年 11 月 28 日
29. 本田文江、江島 美穂、門井浩二:インフルエンザウイルス感染による宿主タンパク質 Ebp1 発現誘導機構、第 34 回日本分子生物学会、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 14 日
30. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎:PLAT による in vivo 光ピンセット操作の実現、第 59 回応用物理学関係連合講演会 講演予稿集, 17a-B9-2, 早稲田大学、2012 年 3 月 17 日
31. 丸山央峰、益田泰輔、本田文江、新井史人:光機能制御人工脂質膜によるナノセンサの選択的細胞導入、第 30 回日本ロボット学会学術講演会、札幌、2012 年 9 月
32. 中久枝、杉浦忠男、湊小太郎 :低 NA 対物レンズによる光ピンセット、第 73 回応用物理学学会学術講演会、松山、2012 年 9 月 13 日
33. Mary-Clare Dy, Sugiura,T, Minato,K, Axial particle displacement using optical tweezers, 第 73 回応用物理学学会学術講演会、松山、2012.9 月 14 日
34. 中久枝、杉浦忠男:低開口数対物レンズによる光ピンセット法、日本機械学会第23回バイオフロンティア講演会、弘前市、2012 年 10 月 5 日
35. 中久枝、杉浦忠男:低 NA・低倍率対物レンズによる光ピンセット、Optics and Photonics Japan, 東京、2012 年 10 月 25 日
36. 丸山央峰、劉恒君、益田泰輔、新井史人:細胞内状態計測を目的とした光表面電位制御脂質カプセルによる蛍光センサの選択的細胞導入、第 31 回日本ロボット学会学術講演会、首

都大学東京, 東京, 2013年9月7日

37. 本田文江、梶川純一:インフルエンザウイルスの細胞への付着と侵入、異分野融合ワークショップ、東京、2013年12月17日
38. 本田文江、三宅裕可里:インフルエンザウイルス感染と Ebp1、異分野融合ワークショップ、東京、2013年12月17日
39. 本田文江、梶川純一:インフルエンザウイルスは静止期細胞に特異的に結合する、第28回桂記念シンポジウム、東京、2014年3月2日
40. 本田文江:インフルエンザウイルスの増殖は細胞の温度上昇を誘発する、第2回環境ウイルスセンサー工学研究集会、東京、2014年3月3日

〈国際〉

1. Miyoshi,H,Sugiura,T and Minato,K :Cell palpation system for local mechanical properties of a cell with an optically manipulated particle”, BIOS SPIE, Jan. 28, 2009, San Jose, USA (2009)
2. Maruyama,H, Arai,F :Fabrication of Functional Gel-Nanotool for intracellular Measurement, International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya Nov. 2009
3. Ejima,M, Kurihara,T,Ueda,R, Kume,S, and Honda,A :Influenza virus infection induced host protein Ebp1 expression, Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE, International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, Nagoya Nov.2009
4. Maeda,S, Sugiura,T, Minato,K :Pulse laser assist optical tweezers for in vivo manipulation, Focus on Microscopy, WE-MO1-PAR-D, p.139, Shanghai March 2010
5. Honda,A,Kadoi,K:The mechanism of Ebp1 induction by influenza virus infection. World Congress of Virology Busan Aug. 2010
6. Maruyama,H, Kotani,K, Honda,A, Takahata, T, Arai,F :Nanomanipulation of Single Influenza Virus Using Optical Tweezers and Dielectrophoretic Force on a Microfluidic Chip, *10th Nanotechnology Conference: IEEE NANO 2010*, Seoul, Korea, August 18, 2010.
7. Maruyama,H, Kotani,K, Honda,A, Takahata,T, Arai,F :Injection and Laser Manipulation of Nanotool Using Photo Responsive Chemical for Intracellular Measurement, *10th Nanotechnology Conference: IEEE NANO 2010*, Seoul, Korea, August 18, 2010.
8. Maruyama,H, Kotani,K, Honda,A, Takahata,T, Arai,F :Nanomanipulation of Single Virus Using Dielectrophoretic Concentration on a Microfluidic Chip, *6th annual IEEE Conference on Automation Science and Engineering*, Toronto, Canada, August 22, 2010.
9. Maruyama,H, Inoue,N, Arai,F :Optical pH Regulation Using Photochromic Material for Selective Cell Injection of Nanosensors, *2010 IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conference*, Monterey, USA, October 13, 2010.
10. Maruyama,H, Masuda,T, Inoue,N, Honda,A, Takahata,T, Arai,F :Optical pH Regulation Using Functional Nanotool Impregnating with Photo-Responsive Chemical for Intracellular Measurement, *2010 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science*, Nagoya, Japan, November 9, 2010.
11. Maeda,S, Sugiura,T, Minato,T:Developments of Pulse Laser Assist Optical Tweezers (PLAT) for in vivo manipulation, *BiOS SPIE Photonics West 2011*, San Francisco, January 2011. (Accepted).
12. Honda,A :Influenza virus attaches on the cell selectively. World Congress on Biotechnology in Hyderabad, 21-23 March, 2011
13. Maruyama,H, Inoue,N, Masuda,T, Arai,F :Selective Injection and Laser Manipulation of Nanotool inside a Specific Cell Using Optical pH Regulation and

- Optical Tweezers, 2011 IEEE International Conference on Robotics and Automation, Shanghai International Conference Center, Shanghai, China, May 11, 2011
14. Masuda, T, Maruyama, H, Honda, A, Arai, F :Virus Enrichment for Single Virus Manipulation by Using 3D Insulator Based Dielectrophoresis, IEEE NANO 2011, Portland, USA, Aug. 16, 2011
  15. Maruyama, H, Masuda, T, Honda, A, Arai, F :Local Temperature Measurement Using Spectra Shift of Quantum-Dot Hydrogel Sensor, IEEE NANO 2011, Portland, USA, Aug. 16, 2011
  16. Maruyama, H, Masuda, T, Tomita, K, Arai, F :Local Temperature Measurement and Control Using Functional Gel-Tool Containing a Quantum Dot by Color Analysis of Fluorescence Spectrum, 1st Annual International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale, Changchun, China, August 30, 2011
  17. Maruyama, H, Masuda, T, Tomita, K, Arai, F :Temperature Measurement by Color Analysis of Fluorescent Spectrum Using Cell Investigation Tool Impregnated with Quantum Dot for Cell Measurement on a Microfluidic Chip, 2011 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, San Francisco, September 26, 2011.
  18. Maruyama, H, Masuda, T, Kariya, R, Arai, F :Long-Lifetime Measurement and Control of Local Temperature Using Functional Gel-Tool Containing Quantum dot by Color Analysis of Fluorescent Spectrum, 22nd Annual Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, Nagoya, November 7, 2011.
  19. Masuda, T, Maruyama, H, Honda, A, Arai, F:Optical-Controlled Selective Injection of Liposome Containing Nanosensor into a Specific Cell, IEEE NANO2012, Birmingham, United Kingdom, August, 2012.
  20. Honda, A :Optical tweezers for virus manipulation, 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Daegu, Korea, September 16-21th, 2012.
  21. Maruyama, H, Masuda, T, Arai, F :Fabrication and Cell Injection of Fusogenic Liposome Containing Single Sensor for Intracellular Measurement, IUMRS-International Conference on Electronic Materials 2012, Yokohama, Japan, Sept. 2012.
  22. Maruyama, H, Kariya, R, Nakamura, S, Masuda, T, Matsuda, Y, Niimi, T, Honda, A, Arai, F:Ultra Long-Lifetime and High-Sensitive Fluorescent Measurement Using Difference Compensation Method for Single Cell Analysis, 2012 IEEE/RSJ Int'l Conference on Intelligent Robot and Systems, Faro, Portugal, Oct. 2012.
  23. Fukada, S, Maruyama, H, Masuda, T, Arai, F :3D Fabrication and Manipulation of Hybrid Nanorobots by Laser for Single Cell Analysis, 2012 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, Nov. 2012.
  24. Fukada, S, Onda, K, Maruyama, H, Masuda, T, Arai, F :3D Fabrication and Manipulation of Hybrid Nanorobots by Laser 2013 IEEE International Conference on Robotics and Automation, Karlsruhe, German May 7, 2013.
  25. Maruyama, H, Masuda, T, Honda, A, Arai, F :Selective Cell Injection of Fluorescence Particle Sensor Encapsulated in Fusogenic Liposome Using Optical Manipulation and Control of Surface Potential Using Photochromic Chemical, Karlsruhe, German May 9, 2013

③ ポスター発表 (国内会議 33件、国際会議 17件)

〈国内〉

1. 飯塚龍、恩田一寿、丸山央峰、新井史人:レーザ駆動 Robot-on-a-chip に関する研究-その2、自己組織化現象を利用したマイクロツールの作製-、日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス

- 講演会 2009,福岡、2009年5月26日
2. 門井浩二、糸慎一郎、江島美穂、本田文江:インフルエンザウイルス感染による宿主タンパク質の発現誘導 第32回日本分子生物学会、2009年12月、横浜
  3. 高畑辰郎、三好秀明、杉浦忠男、本田文江:インフルエンザウイルス感染による細胞膜強度変化計測 2010年3月11日 福岡(九大)
  4. 川口徹也、門井浩二、本田文江:宿主蛋白質 Ebp1 のインフルエンザウイルス感染による発現誘導機構解析 2010年3月11日 福岡(九大)
  5. 本田文江、杉浦忠男、新井史人:光ピンセット手法利用によるウイルス感染機構の解析から細胞変化解析への新しい展開. 日本学術会議主催公開シンポジウム 先端フォトニクスの展望 東京(日本学術会議講堂)2010年4月9日、
  6. 港谷恭輔、丸山央峰、本田文江、高畑辰郎、新井史人、“オンチップ細胞計測に関する研究—その1:マイクロ流体チップ内での単一ウイルス操作—”、ロボティクス・メカトロニクス講演会‘10、旭川、2010年6月16日
  7. 丸山央峰、港谷恭輔、本田文江、高畑辰郎、新井史人、“オンチップ細胞計測に関する研究—その2:細胞内計測のためのナノツールの細胞導入と細胞内レーザ操作—”、ロボティクス・メカトロニクス講演会‘10、旭川、2010年6月16日
  8. 恩田一寿、新井史人 :計算機合成ホログラムによる光ピンセットのマスタスレーブ制御、Optics&Photonics Japan 2010, 東京、2010年11月9日
  9. 益田泰輔、丸山央峰、本田文江、新井史人、“能動ウイルスフィルタによるウイルス濃度制御”、第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、名古屋、2010年11月18日
  10. 中野琢磨、恩田一寿、池田誠一、福田敏男、松田武久、根来真、新井史人 :フェムト秒レーザによる三次元毛細血管モデルの試作、第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、名古屋、2010年11月18日
  11. 丸山央峰、益田泰輔、井上直也、新井史人、“光制御膜融合と光ピンセット操作による計測ツールの選択的細胞導入と細胞内計測”、第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、名古屋、2010年11月18日
  12. 石井皓介、本田文江:ピルビン酸キナーゼのインフルエンザウイルス増殖への影響、特定領域「マルチスケール」東京、2010年12月13日
  13. 松本 将宜、杉浦忠男、“一粒子追跡法および蛍光相関分光イメージング法による生体分子計測”、第5回新画像システム・情報フォトニクス討論会講演予稿集、東京工業大学、2011年5月
  14. 丸山央峰、井上直也、益田泰輔、本田文江(法政大)、新井史人、単一細胞生理環境計測のための細胞探査ツールによる局所温度計測、ロボティクス・メカトロニクス講演会‘11、岡山、2011年5月27日
  15. 新井史人、中野琢磨、恩田一寿、福田敏男、松田武久、根来真、フェムト秒レーザ・マスクハイブリッド露光 FMEEx —循環型三次元毛細血管シミュレータの構築—、ロボティクス・メカトロニクス講演会‘11、岡山、2011年5月27日
  16. 丸山央峰、富田恭平、新井史人、蛍光分光スペクトル分布による長寿命温度計測、第23回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、千葉大学、2011年6月10日
  17. 前田紗希、杉浦忠男、湊小太郎、「ロングパルスレーザーを用いた PLAT (Pulse Laser Assist optical Tweezers) による細胞および粒子操作」、第20回日本バイオイメージング学会学術集会 要旨集 pp. 187-188 (2P-8)、千歳科学技術大学、2011年9月2日
  18. 丸山央峰、細胞内生理環境計測のための光温度センサの開発、第2回 先端フォトニクスシンポジウム、東京、2011年10月7日
  19. Mary-Clare Dy, Sugiura,T and Minato,T, “Axial translation and position measurement of single particle in optical tweezers,” Optics Photonics Japan 2011, P67, 大阪大学、2011年11月30日
  20. 東真也、松本将宜、杉浦忠男、湊小太郎、“Z 偏光ビームを用いたナノ粒子のレーザートラップ,” Optics Photonics Japan 2011, P48, 大阪大学、2011年11月29日

21. 中 久枝, 杉浦忠男, 湊小太郎 : 光ピンセットによる高速操作技術の開発", 第 59 回応用物理学関係連合講演会 講演予稿集, 17p-GP1-5, 早稲田大学, 2012 年 3 月 17 日
22. 丸山央峰, 中村祥平, 益田泰輔, 本田文江, 新井史人, 細胞温度計測のための単一蛍光マイクロセンサの細胞内導入, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2012, アクトシティ浜松, 浜松, 2012 年 5 月
23. 丸山央峰, 益田泰輔, 新井史人, 単一ゲルセンサ導入リポソームを用いた細胞内・核内生理環境計測, 第 25 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 崇城大学, 熊本, 2012 年 5 月
24. 前田紗希, 杉浦忠男, 湊小太郎, Pulse-Laser Assisted optical Tweezers を用いた細胞に対する光ピンセット操作, 第 6 回新画像システム・情報フォトニクス研究討論会, 大阪, 2012 年 6 月 22 日
25. 中 久枝, 杉浦忠男, 湊小太郎, 高速操作光ピンセット, 第 6 回新画像システム・情報フォトニクス研究討論会, 大阪, 2012 年 6 月 22 日
26. Mary-Clare Dy, Sugiura, T, Minato, T, Axial displacement and position measurement of single particle using optical tweezers, 第 6 回新画像システム・情報フォトニクス研究討論会, 大阪, 2012 年 6 月 22 日
27. Mary-Clare Dy, Sugiura, T, Minato, T, Axial Manipulation of Particle and Investigation of Mechanical Property of Individual Cell using Optical Tweezers, Optics and Photonics Japan, 東京, 2012 年 10 月 23 日
28. 松本 将宜, 杉浦忠男, 蛍光相関分光イメージング法による細胞内粘度測定, 平成 24 年度日本分光学会年次講演会, 東京, 2012 年 11 月 27 日
29. 與那嶺 崇, 新井 万美子, 杉浦忠男, 本田文江, 光と活性酸素を利用した遺伝子不活性化制御法の開発, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012 年 12 月 13 日
30. 丸山央峰, 益田泰輔, 新井史人, 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, ロボティクス・メカトロニクス講演会'13, つくば, 2013 年 5 月 23 日
31. 三宅 裕可里, 江島 美穂(国立感染症研究所), 糸 慎一郎(基礎生物学研究所), 門井 浩二, 本田 文江 : インフルエンザウイルス感染による Ebp1 の修飾, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 12 日
32. Hengjun Liu, Hisataka Maruyama, Taisuke Masuda, Fumihito Arai, Multi-fluorescent particle sensor for optical sensing of pH and temperature of cell, 28 回化学とマイクロ・ナノシステム学会, 姫路, 2013 年 12 月 5 日
33. 本田文江: インフルエンザウイルス感染により誘導される細胞変化, 第 2 回環境ウイルスセンサー工学研究集会, 東京, 2014 年 3 月 3 日

〈国際〉

1. Honda, A, Carlum Shiu, Ichikawa, A, Suzuki, Y (中部大学), Arai, F, Fukuda, T: Selective attachment of influenza virus on the resting cells. Negative Virus Meeting Belgium June. 2010
2. Kawaguchi, T, Kadoi, K, Honda, A: Induction Mechanism of Ebp1 by Influenza virus infection. Negative Virus Meeting Belgium June, 2010
3. Takahata, T, Kawaguchi, T, Miyoshi, M, Sugiura, T and Honda, A: The changing of membrane stiffness by influenza virus infection. Negative Virus Meeting Belgium June, 2010
4. Maruyama, H, Kotani, K, Honda, A, Takahata, T, Arai, F: OPTICAL INJECTION AND MANIPULATION OF FUNCTIONAL NAOTOOL USING PHOTO-RESPONSIVE CHEMICAL AND OPTICAL TWEEZERS FOR INTRACELLULAR MEASUREMENT, *Int. Conf. Micro-TAS 2010*, pp. 1655-1657, Groningen, The Netherlands, October 6, 2010.
5. Maruyama, H, Kotani, K, Honda, A, Takahata, T, Arai, F: ON-CHIP NANOMANIPULATION OF SINGLE INFLUENZA VIRUS USING



- DIELECTROPHORETIC CONCENTRATION AND OPTICAL TWEEZERS, *Int. Conf. Micro-TAS 2010*, pp. 1877–1879, Groningen, The Netherlands, October 6, 2010.
6. Masuda,T, Maruyama,H, Honda,A, Arai,F:Active Virus Filter for Enrichment and Manipulation of Virus, *24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2011)*, pp.1099-1102, Cancun, Mexico, January 26, 2011.
  7. Maeda,S, Sugiura,T, Minato,K: Effect of pulse waveform in pulse laser assisted optical tweezers, *Focus on Microscopy 2011*, p. 349, コンスタンツ, 2011年4月
  8. Onda, K , Arai,F, “Robotic Approach to Multi-beam Optical Tweezers with Computer Generated Hologram”, 2011 IEEE International Conference on Robotics and Automation, Shanghai International Conference Center, Shanghai, China, May 10, 2011.
  9. Maeda,S, Sugiura,T, Minato,K: Pulse Laser Assist optical Tweezers (PLAT) with long-duration pulse laser," *Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics*, ミュンヘン, 2011年5月 (SPIE Vol. 8086, 808612 (2011)).
  10. Maruyama,H, Masuda,T , Tomita, K , Arai,F:LOCAL TEMPERATURE MEASUREMENT AND CONTROL USING FUNCTIONAL GEL-TOOL CONTAINNING A QUANTUM DOT BY COLOR ANALYSIS OF FLUORESCENCE SPECTRUM, *The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, Seattle, October 5, 2011.
  11. Mary-Clare Dy, Sugiura,T and Minato, K, Axial displacement and position measurement of single particle using optical tweezers, in *Biomedical Optics, OSA Technical Digest (Optical Society of America)*, Florida USA, April 28th, 2012.
  12. Honda,A, A novel single-virus infection system reveals that influenza virus preferentially infects resting cells, *3rd International Influenza Meeting*, University of Muenster, Germany, September 2-4th, 2012.
  13. Mary-Clare Dy, Sugiura,T, and Minato, K, Investigation of the mechanical property of individual cell using axial optical tweezers, *Proceedings of SPIE 8587, Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XI*, San Francisco, California USA, February 22<sup>nd</sup>, 2013.
  14. Honda,A, Kume,S, Miyake,Y, Kadoi,K :Influenza virus infection induced Ebp1 modification, *15<sup>th</sup> Negative Strand Virus Meeting*, Granada Spain, June 16-21<sup>st</sup>, 2013
  15. H. Maruyama , T. Masuda , F. Arai , OPTICAL CONTROL OF SURFACE POTENTIAL USING NANOCAPSULE FOR SELECTIVE INJCRION INTO CELL, *The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, Barcelona, June 18, 2013
  16. Honda,A, Maruyama,H, Ishii, K, Kawaguchi,N and Arai,F :Influenza virus infection induced the rising of cellular temperature, *Lyon France*, September 11-14<sup>th</sup>, 2013
  17. OPTICALLY-CONTROLLED SELECTIVE TRANSFECTION OF PARTICLE SENSOR USING MULTILAYERED LIPOSOME CONTAINING PHOTOCHROMIC CHEMICAL INTO A CELL NUCLEUS, *MicroTAS2013*, Freiburg, October, 2013

(4)知財出願

①国内出願 (2件)

1. 前田紗希、杉浦忠男、「パルスアシスト光ピンセット装置」特願 2010-46004 (2010/ 3/3 出願)
2. 出願番号 2011-257730 (JP), 蛍光温度計測方法及び蛍光温度計測システム, 出願人:国立大学法人, 発明人:丸山央峰, 新井史人

②海外出願 (0 件)

(5)受賞・報道等

①受賞

1. NANOKOREA AWARD (Certificate of Merit), Injection and Laser Manipulation of Nanotool Using Photo Responsive Chemical for Intracellular Measurement, Maruyama,H, Kotani,K, Honda,A, Takahata, Arai,F, NANO KOREA 2010 joint symposium with IEEE NANO 2010, 2010.
2. 第11回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, SI2010 優秀講演, 2010, 益田泰輔, 丸山央峰, 新井史人, 本田文江, 能動ウイルスフィルタを用いた単一ウイルス操作, 2010年12月25日
3. Maruyama,H, IEEE Robotics and Automation Society, Early Career Award, May 12, 2011 at ICRA 2011(Shanghai).
4. Best Paper Award, Maruyama,H, Masuda,T, Tomita,K, Arai,F, Local Temperature Measurement and Control Using Functional Gel-Tool Containing a Quantum Dot by Color Analysis of Fluorescence Spectrum, 1st Annual International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale, Changchun, China, and August 31, 2011.
5. 益田泰輔, 計測自動制御学会システムインテグレーション部門 2011 年度若手奨励賞, 平成23年12月24日, 京都大学, 第11回システムインテグレーション部門講演会(SI2010), 能動ウイルスフィルタを用いた単一ウイルス操作
6. 深田翔太, 日本機械学会若手優秀講演フェロー賞, 三次元ナノ露光・ナノ加工による液中マイクロロボットの光創製と光操作, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2012 2A2-S05, 平成25年5月23日, つくば
7. 丸山央峰, ベストプレゼンテーション表彰:Robotics and Mechatronics Division, Certificate of Merit for Best Presentation, 細胞温度計測のための単一蛍光マイクロセンサの細胞内導入, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2012 1A2-V03, 平成25年5月23日, つくば

(6)成果展開事例

①社会還元的な展開活動

得られた結果を国際会議等で話すことから興味を持った研究者が早急に私たちが開発した系を導入したいという話を聞くことができた。共同研究などは始まっているが興味を持つすべての研究者がシステムを導入することは難しく安く購入できるシステムが望まれている。ウイルスのワクチン開発をしている人に話し、大変興味を持たれた。

## §6 研究期間中の活動

### 6.1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

| 年月日         | 名称           | 場所   | 参加人数 | 概要                            |
|-------------|--------------|------|------|-------------------------------|
| 2008年11月22日 | チーム内ミーティング   | 法政大学 | 4    | 進捗状況報告<br>Kick off meeting 準備 |
| 2009年1月19日  | チーム内ミーティング   | 法政大学 | 6    | 進捗状況報告                        |
| 2009年3月3日   | 日印ウイルスシンポジウム | 法政大学 | 50   | 日印ウイルス研究者による研究発表              |

|                |            |            |    |                       |
|----------------|------------|------------|----|-----------------------|
| 2009年3月21日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 6  | 進捗状況報告                |
| 2009年4月27日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 6  | 進捗状況報告                |
| 2009年5月23日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告                |
| 2009年6月27日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告<br>シンポジウム打ち合わせ |
| 2009年8月1日      | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告<br>シンポジウム打ち合わせ |
| 2009年8月20日     | シンポジウム     | 法政大学       | 50 | 光ピンセット利用した研究の現状       |
| 2009年9月19日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告                |
| 2009年10月24日    | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告                |
| 2009年11月28日    | チーム内ミーティング | 松島(仙台)     | 7  | 進捗状況報告                |
| 2010年1月23日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告                |
| 2010年4月3日      | チーム内ミーティング | 法政大学       | 7  | 進捗状況報告                |
| 2010年5月15日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 7  | 進捗状況報告                |
| 2010年6月12日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 7  | 進捗状況報告                |
| 2010年7月17日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 7  | 進捗状況報告・シンポジウム打ち合わせ    |
| 2010年8月31日     | シンポジウム     | 法政大学       | 60 | 光ピンセットを利用した細胞計測       |
| 2010年9月25日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 7  | 進捗状況報告                |
| 2010年10月26日    | チーム内ミーティング | 東京八重洲ホール   | 6  | 進捗状況報告                |
| 2010年11月11日    | チーム内ミーティング | 法政大学       | 7  | 進捗状況報告                |
| 2010年12月14日    | チーム内ミーティング | 法政大学       | 6  | 進捗状況報告                |
| 2011年2月10日     | チーム内ミーティング | 東京八重洲ホール   | 7  | 進捗状況報告                |
| 2011年3月15, 16日 | チーム内ミーティング | 蒲郡(ホテル明山荘) | 7  | 進捗状況報告                |
| 2011年4月23日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告                |
| 2011年5月30日     | チーム内ミーティング | 法政大学       | 8  | 進捗状況報告                |

|                 |            |                        |    |                    |
|-----------------|------------|------------------------|----|--------------------|
| 2011年6月25日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 6  | 進捗状況報告             |
| 2011年7月25日      | シンポジウム     | 法政大学                   | 50 | 光が拓く細胞解析の最前線       |
| 2011年8月20日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2011年9月21日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2011年10月15日     | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2011年11月15日     | チーム内ミーティング | 名古屋大学                  | 9  | 進捗状況報告             |
| 2011年12月23日     | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2012年2月10日      | チーム内ミーティング | 八重洲ホール                 | 9  | 進捗状況報告             |
| 2012年3月12日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2012年4月21日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 8  | 進捗状況報告             |
| 2012年5月26日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 8  | 進捗状況報告             |
| 2012年6月16日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 8  | 進捗状況報告             |
| 2012年7月18日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 8  | 進捗状況報告             |
| 2012年8月18日      | シンポジウム     | 東京 品川<br>フロントビル<br>会議室 | 35 | 光が拓く細胞解析の新展開       |
| 2012年9月29日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 8  | 進捗状況報告             |
| 2012年10月20日     | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 8  | 進捗状況報告             |
| 2012年12月1日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2013年1月12日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2013年3月8<br>～9日 | CREST 会議   | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2013年4月13日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2013年7月20日      | チーム内ミーティング | 法政大学                   | 9  | 進捗状況報告             |
| 2013年8月24日      | シンポジウム     | TKP 東京丸<br>の内会議室       | 35 | 光が拓いた新しい細胞解析<br>技術 |

|               |            |                   |   |             |
|---------------|------------|-------------------|---|-------------|
| 2013年9月28日    | チーム内ミーティング | 法政大学              | 9 | 進捗状況報告      |
| 2014年3月28～29日 | CREST 会議   | 横須賀(メルキュールホテル横須賀) | 5 | 今後の実験計画について |

## §7 最後に

達成度としては少し遅かったと考えています。得られた成果はウイルス感染細胞変化の解析システムの開発、またそこから得られた結果を基に行った生化学的解析等は世界発のものが多く、この結果を理解してもらうのに少し時間がかかってしまっています。世界のウイルス研究者の中に物理学的・工学的手法を導入し始めている研究者がこの2～3年で出始めていますのでよかったと考えています。今後この研究はウイルス学研究者や細胞学研究者にも興味を持たれ始め様々な新しい発見が多く出てくることと思っています。研究遂行していく上で毎月ミーティングを行い進捗状況の議論を重ねてきたことはよかったと考えています。研究テーマの変更などもスムーズに行うことができました。毎年一度のシンポジウムも新しい方向で外部の研究者を招聘して行ってきたためより多くの研究者にこの領域の研究の面白さを理解していただくことができたと考えています。さらに新しい方向でのウイルス感染細胞の解析法へと展開しより詳細な研究を行っていくシステムが少しずつ出来上がっていったような予感がします。