

研究報告書

「電界誘起気泡インジェクションメスによる分子操作と再構成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 山西 陽子

1. 研究のねらい

本研究では研究代表者が発見した指向性電界誘起マイクロナノバブル列現象を活用し、その気液界面に遺伝子などの高分子を封入し高速微細バブルとして打ち出すことにより高効率なインジェクションを局所的に狙った位置に達成する技術として提案した。さらに放出された指向性気泡列は、そのサイズが微細なことより気泡内ガスが回りへ溶け出し気泡自体が収縮され、さらに気液界面に付着していた分子が濃縮されるメカニズムが存在していることを確認し、タンパク質結晶をはじめとした新しい再構成技術の確立を目標として研究をおこなった。放出される気泡の気液界面には固相・液相・気相などあらゆる相を封入でき、高粘度の高分子やセンサ等も封入することができる。特に微細化したワイヤレスセンサを封入して細胞内の狙った場所にインジェクションすることで細胞からの応答を発信させることにより高精度な細胞の機能発現へ繋がる技術となる。微細気泡を用いて加工とインジェクションを狙った場所に高速・高効率・高精度に行うことで細胞の高精密な再構成技術の確立を目指すものとする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではすでに発見した指向性電界誘起マイクロナノバブル列現象を活用し、その気液界面に遺伝子などの高分子を封入しナノバブルとして打ち出すことにより濃縮した高効率なインジェクションを局所的に狙った位置に行える技術として研究を進めた。さらに放出された指向性気泡列が断熱圧縮されることにより、気液界面に付着していた分子が濃縮され、タンパク質結晶をはじめ細胞膜や組織として生み出す新しい再構成技術の確立を目標として研究に取り組んだ。放出される気泡の気液界面には幅広い薬剤や人工物を付着させることが可能であり、狙った場所に高速・高効率・高精度に導入を行うことで細胞や組織の高精密な再構成技術の確立を目指した。

本研究では、幅広い対象へのインジェクション実験を行うことにより、それぞれに要求される問題を明確に分類し、幅広いダイナミックレンジの大きい対象や輸送される試薬の種類や大きさなどに対応するインジェクション技術の構築に取り組み、これまで困難とされてきた対象へのインジェクションを成功させるに至った。特に、気泡内にプラズマ放電が走る技術を用いることにより、より固い対象へのインジェクション技術を達成することを可能とし、その特異なメカニズムと制御性についての評価を行った。さらに使用者の習熟度によらず安定にインジェクションできる構造・及びインジェクション量の向上を達成するための多筒式インジェクタを構築するに至り、高速・高効率・高精度なインジェクションへむけた新しい展開が期待されている。

さらに、気液界面に付着するタンパク質分子の凝集によるタンパク質結晶生成について、そのメカニズムと従来法と比較しての優位性について評価を行い、結晶の生成時間と品質及び

気液界面収縮の凝集システムの評価を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A 「高精度遺伝子導入: 電界誘起気泡における気液界面の付着力計測」

試薬輸送能力は高精度遺伝子導入にとって大変重要な役割を担うが、そのメカニズムの解明の一貫として電界誘起気泡の気液界面の付着力の計測・評価を行った。電気分解や攪拌等で発生させた気泡と比較して電界誘起気泡の性質が異なることを証明するために、カセンシング付き光ピンセットで評価した。下図からもわかるように、攪拌による気泡と電気分解及び電界誘起気泡メスをを用いた気泡には誘引力に差があることがわかり、さらに印加電力を上昇させると誘引力も上昇することが確認された。実際の結晶化の実験においてもその傾向が見られたが、誘引力計測時と異なり、結晶生成率については電界誘起気泡メスの頻度が一番大きいことがわかり、この結果について書籍の一章(著作物成果の(1))に纏めるに至った。電界誘起気泡の優位性を示すこの結果により試薬輸送能力を確認するに至り、研究目的の一部を達成したと言える。



Fig.1 電界誘起気泡及びその他の発生源による気泡との気液界面の付着力計測

研究テーマ B 「高精度遺伝子導入: 2次元チップ化とオペレータによらない導入法について」

実用化へ向けた幅広い対象へ低侵襲かつ必要な導入深さを満たし、かつ高精度な位置決

め技術と導入量及びオペレータによらないロバストな構造とシステムについて検証と評価を行った。まずオペレータによらないロバストな構造とシステムについて解決するためにこれまで作成していた2次元多筒式インジェクションチップの完成度を上げて、下図に示すようにバックサイド露光という技術によるアスペクト比の大きな筒状のインジェクタを2次元チップ上に配列させ、これまで困難であった複数の筒からの気泡発生と圧壊の同時観察に成功した。これにより電気回路パターン最適化設計と電流回収を最適化にすることにより、高効率にインジェクションすることができ、柔軟な基板に電極構造を作り込むことにより3次元プローブから高集積・大容量のインジェクタを微小なエリアに構築することが可能となった。これにより現在 in-vivo 埋め込み式チップへの展開をスタートしている。

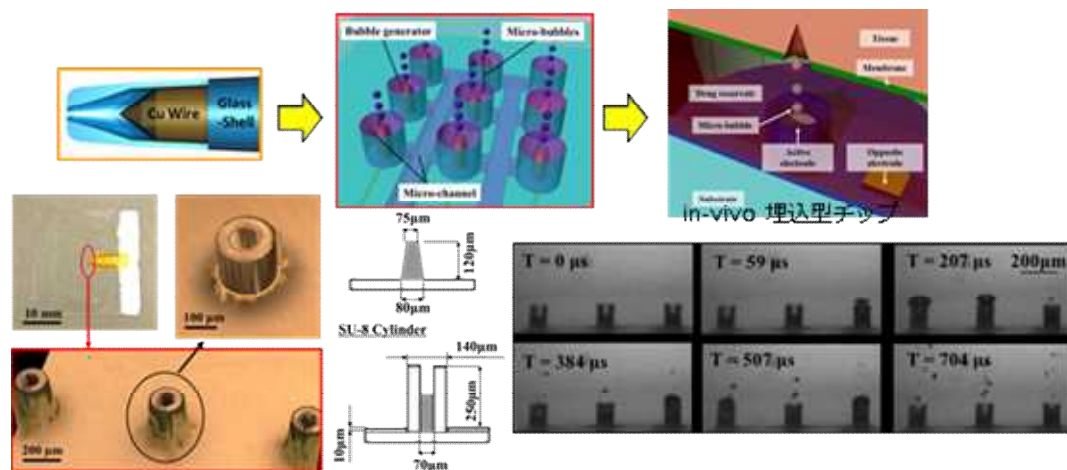


Fig.2 インジェクション気泡メスの2次元チップ化によるロバスト・高精度・ハイスループット化

研究テーマC「遺伝子導入の実用化:幅広い対象への遺伝子導入」

電界誘起気泡メスの実用化を目指し、幅広い対象へのインジェクションを可能にするため、幅広い固さを有する対象へのインジェクションを行った。この際、印加電圧を上昇させるとともに気泡内に放電が走るといった特異な現象を確認し、気泡の圧壊による物理的な穿孔能力だけでなく、電気的な穿孔能力も合わせたシナジー効果によって、穿孔能力の増大を達成するに至り、より固い対象へのインジェクションを達成するに至った。印加電圧が2.5kV以上になると金属も穿孔する能力があることがわかり、このことより、プラズマキャビテーションメスとしての新しい機能を生み出すことに成功した。回りが培養液環境下ではない、空気中でのインジェクションメスの構造についても達成したため、本技術を生育中の植物等へインジェクション可能な注射器として展開するに至った。幅広い対象へインジェクション可能となったため、多くの機能創発を行うに至り、幅広い業種への実用化へ向けた企業等との連携・スピノフ的な共同研究を数件立ち上げている。

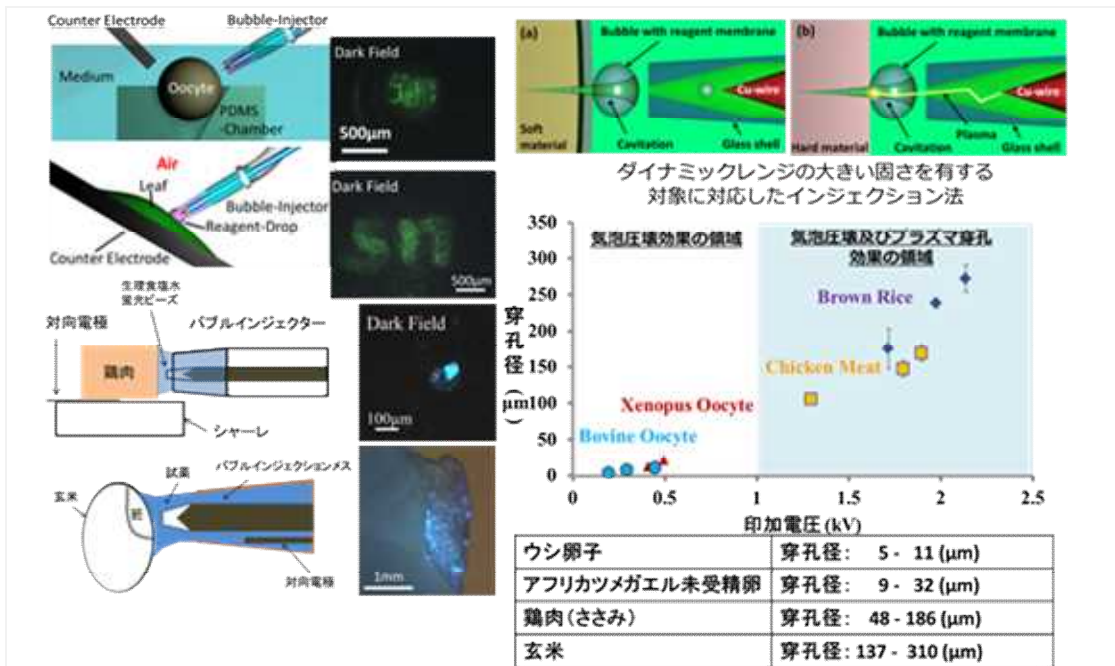


Fig.3 ダイナミックレンジの大きな固さを有する幅広い対象へのインジェクション結果

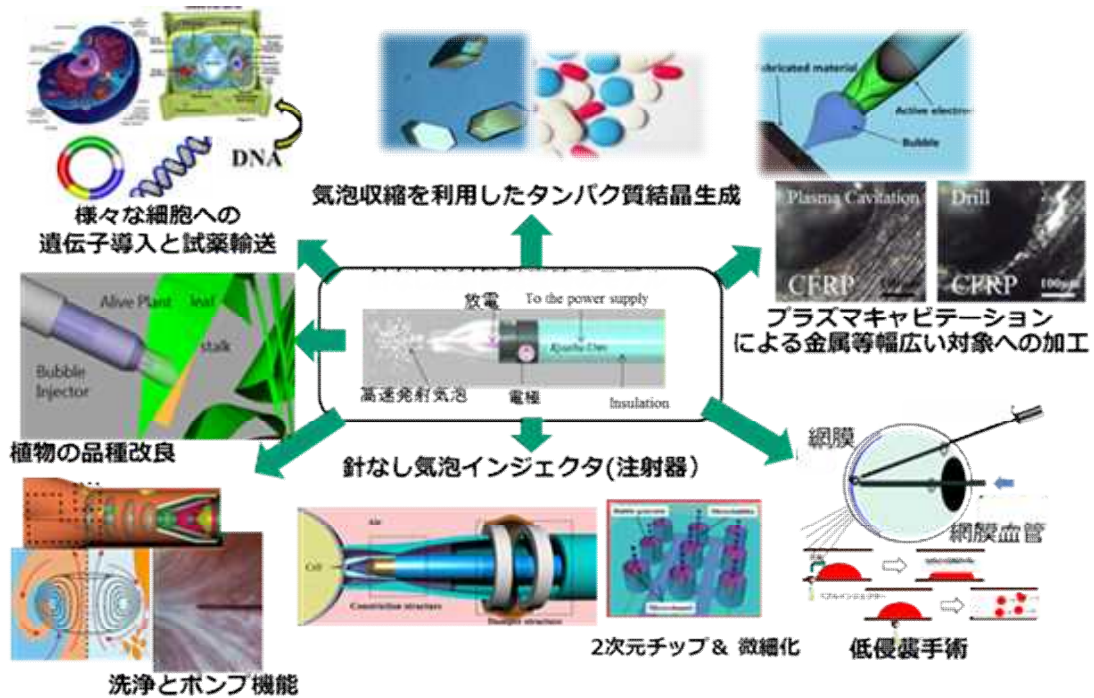
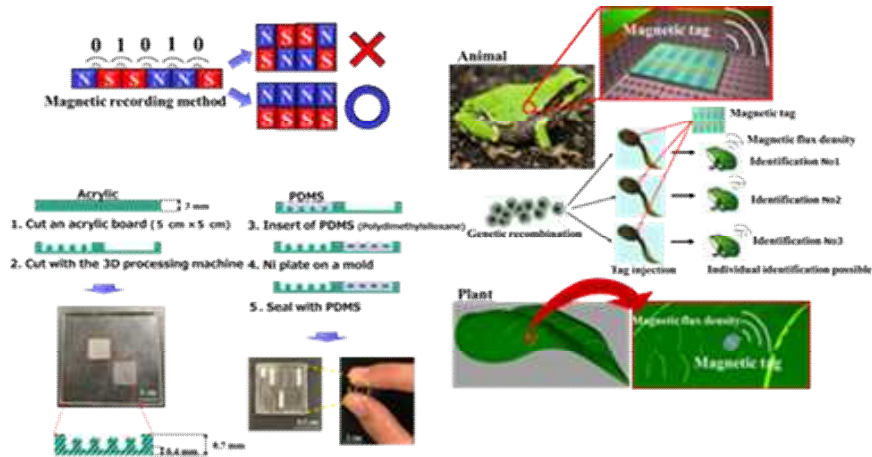


Fig.4 電界誘起インジェクション気泡メスにおける幅広い業種への実用化と機能創発

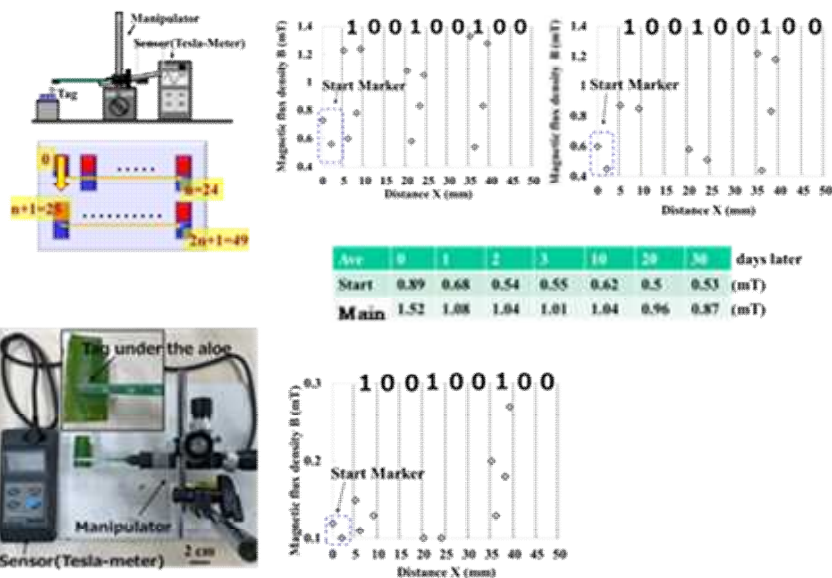
研究テーマD「細胞からの情報発信」

細胞からの情報発信については予備実験や試作を数多く行った結果、ウェットな環境下においても長期間安定な情報発信が可能な磁気タグを選択するに至り、現在ソフトなポリマー膜に覆われたソフトな磁気タグとなり、生体への埋込に向けた研究を続行中である。図5はソフト磁気タグのプロセス図とコンセプト図を示している。最終的には細胞レベルまでのスケール

ルに落とし込む前に、比較的大きな対象(カエルやオタマジャクシや植物等)への磁気タグのインジェクション実験を行ない、模擬生体膜等を透過しても長期間経過後に磁気信号を捉えることに成功している。今後はより小さい対象への埋込・実証実験を行っていく予定である。



(a)磁気タグ製作のコンセプト図とプロセス図



(b)着磁した磁気タグのセンシング

Fig.5 磁気タグセンシング方法 (PDMS 膜 300 μ m を通しての結果, S100100100=No.292)

3. 今後の展開

電界誘起で発生する特異な高速気泡列の発生メカニズムについては、印加電界によって変化する非平衡な電場(プラズマ放電)と非平衡な熱・流体場(キャビテーション)のシナジー効果によるものである可能性が高いことがわかってきた。今後はこの2種類の非平衡な場の制御し、気液界面におけるラジカル等の反応メカニズムをより詳細に研究していきたいと考えている。また現在インジェクション対象としての人工物としての磁気性タグの研究を行っており、細胞や組織といった微細な対象へのタグ付けやセンシングや発信などの研究に着手している。IoT 技術が進

む中で、インジェクション技術や薬剤放出の自動化さらには、インジェクションした対象細胞や組織のネットワーク化などへ繋がる技術としていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の狙いについては動植物細胞など幅広い固さを有する対象に遺伝子等をインジェクション可能にする新しいインジェクション技術の確立を目標としており、ほぼ達成したと言える。また電界誘起気泡の収縮と気液界面の凝集機能を利用したタンパク質結晶生成、人工物をインジェクションすることによる細胞からの発信技術など、この技術から図4に示すような数多くのスピアウトプロジェクトを作り出すことに成功した。また電界誘起気泡の穿孔とインジェクション技術の機序解明について気泡内の絶縁破壊などの理解を進めることができ、印加電圧ごとのマッピングを作成することに成功し、将来実用化の際の制御性に大きく貢献する知見を得ることができたといえる。また気液界面の収縮性及び分子凝集と付着についての物理的な評価を進めることができたことも、安定なタンパク質結晶生成へ大きく貢献したといえる。

今回は研究の途中で新たな機能を数多く生み出し実用化へ向かって進んでいることは、大変幸運であり、上田総括はじめアドバイザーの先生方やさがけ研究者の方々、共同研究者及び企業の方々からの多くのアドバイスによって実用化へより近づくことができ深く感謝申し上げます。今後新しい気液界面技術のみならず、気液界面上の反応性並びに気泡圧壊という大きな物理的な変化による電荷の生成という新たな知見を利用して、大きな物理的な変化を制御性のある電気的変化へと繋げる新しい学理を展開していきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ガラス毛细管内のマイクロ空間内に放電を発生させ、その爆発的なパワーによって液中に指向性を有する高速気泡列を発射する現象を利用して、高精度に遺伝子を導入するインジェクション技術を確立した。動物細胞から植物細胞まで固さなどが異なる細胞に対して遺伝子導入できるプラットフォームを開発した。生物学者のニーズを積極的に汲み取ろうとする姿勢も成果に繋がっており、領域内外で7件の共同研究を行うとともに、国内外に多くの特許を出願し、社会への貢献を視野に活動していることも評価できる。今後は、成果の原著論文としての発表も重要であろう。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Naoyuki Kurake, Hiromasa Tanaka, Kenji Ishikawa, Kae Nakamura, Hiroaki Kajiyama, Fumitaka Kikkawa, Masaaki Mizuno, Yoko Yamanishi, and Masaru Hori “Synthesis of calcium oxalate crystals in culture medium irradiated with non-equilibrium atmospheric-pressure plasma”, Applied Physics Express 9, 096201, (2016).

2. 山西陽子, “電界誘起気泡による針なし注射器”,自動車技術, 69(4), pp.86-87, (2015.4).
3. 山西陽子, “電界・プラズマを利用したマイクロバブル射出による細胞加工”, 日本機械学会誌, 117(1148), pp.28-31, (2014.7).
4. 山西陽子, “電界誘起気泡メスと機能性界面”, 生体の科学, 65(5), pp.510-511, (2014).
5. “Local Ablation of a Single Cell Using Micro/Nano Bubbles”, Hiroki Kuriki, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma, Satoshi Akagi, Fumihito Arai, Journal of Robotics and Mechatronics, 25-3, (2013), pp.476-483.

(2)特許出願

研究期間累積件数:6件

1.

発明者: 山西陽子, 神林卓也, 高橋和基
 発明の名称: 気泡噴出チップ、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、並びにインジェクション装置及びインジェクション方法
 出願人: 芝浦工業大学
 出願日: 2015年10月19日
 出願番号: 特願 2015-205948

2.

発明者: 山西陽子, 高橋和基, 小見駿
 発明の名称: 「気泡噴出部材、気液噴出部材、局所アブレーション装置及び局所インジェクション装置」
 出願人: JST
 出願日: 2015年11月4日
 出願番号: PCT/JP 2015-080998 WO2016/072408

3.

発明者: 山西陽子, 高澤曹, 周澤道
 発明の名称: 「有機結晶加工用チップ、有機結晶回転装置及び有機結晶加工装置」
 出願人: JST
 出願日: 2014年10月17日
 出願番号: 特願 2014-213243

4.

発明者: 山西陽子, 高澤曹
 発明の名称: 「渦輪発生装置、該渦輪発生装置を含む洗浄装置」
 出願人: JST
 出願日: 2014年9月30日
 出願番号: 特願 2014-201439

5.

発明者: 山西陽子, 濱野洋平, 神林卓也
 発明の名称: 「気泡噴出チップ、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、並びにインジェクション装置及びインジェクション方法」
 出願人: JST
 出願日: 2015年9月29日
 出願番号: PCT/JP 2015-077526 WO2016/052511

(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)

(著作物)

1. 山西陽子, “第6節 気泡の応用～電界誘起気泡メスについて～”,書籍「材料表面の親水・親油の評価と制御設計」の4章, 石井淑夫 監修, (株)テクノシステム, pp.213-218, 2016年7月27日発行.
2. 山西陽子, “ナイスステップな研究者から見た変化の新潮流”九州大学工学研究院機械工学部門流体医工学研究室山西陽子教授インタビュー, STI Hotizon, 2016年秋号, Vol.2, No3, pp.14-17, 文部科学省 科学技術・学術政策研究所, 2016年9月26日発行.

(主要な学会発表)

1. Y. Yamanishi, “Emerging Functions of Plasma-Induced Bubbles”, 2016 MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, November 27 - December 2, 2016, Boston, U.S.A. (発表日:2016.11.28), PM2.2(Plasma Processing via Liquid for Life Sciences and Environmental applications), Oral, 2016. (Invited)
2. Yoko Yamanishi, Takuya Kobayashi, “Concentration and Extraction of Plasma-induced Radical Species for Protein Crystallization”, (G1.04) Symposium G - Plasma Processing and Diagnostics for Life Science, 2015 MRS Fall Meeting&Exhibit, Boston(2015.11.29-12.04), U.S.A, (発表日:2015.12.3)Oral
3. Y. Yamanishi, S. Takasawa, H. Kuriki, F. Arai, “Electrically-driven micro-bubbles assisted protein crystallization”, 5th International conference on Plasma Medicine (ICPM5), 20-007. (発表日:2014.5.20).
4. 山西 陽子 “針のない注射器の実現に向けたマイクロ流体を用いたインジェクション技術の開発”, 近未来への招待状 ～ナイスステップな研究者 2015 からのメッセージ～, 科学技術・学術政策研究所主催講演会, 文部科学省 科学技術・学術政策研究所 (発表日:2016.6.7).

(受賞)

1. 「ナイスステップな研究者2015」文部科学省科学技術・学術政策研究所(2015.12.10)
2. 日本ロボット学会誌論文賞, 2014年9月5日

(プレスリリース等)

1. 「～マイクロレベルの気泡で高精度の試薬輸送を実現～高速発射気泡による「針なし注射器」の開発」芝浦工業大学(2014年12月2日)
<http://www.shibaura-it.ac.jp/news/2014/40140347.html>
2. TBS 夢の扉+「針のない」注射器に挑む!」, 2015年5月10日
3. ナース専科,カンゴのゴカン,「痛くない? 穿刺孔が見えない? 針なし注射器の話 気泡注射器の誕生」, Vol.17, p.70-75, 2015年5月号.
4. 日刊工業新聞「探訪:先端研究:微細気泡で穴あけ」, 2015年1月30日.
5. 毎日新聞「針なし注射器を開発」気泡の力で体内へ, 2015年1月3日.
6. 日刊工業新聞「痛み感じにくい注射器 微細気泡で試薬注入 芝浦工大」, 2015年12月4日.

(展示会)

1. JST フェア2015, 東京ビッグサイト,「低侵襲針なし気泡注射器による試薬導入」, 2015年8月27-28日

