

課題番号	LR038
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ナノニードルアレイを用いた革新的細胞分離解析技術の開発
研究機関・ 部局・職名	独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長
氏名	中村 史

1. 当該年度の研究目的

平成23年度の研究では、シリコンウエハを用いて100×100ナノニードルアレイの試作を行い、直径数百ナノメートルのニードルの作製を検討する。またナノニードルアレイを、細胞アレイに接近させる動作装置の設計を開始する。細胞アレイ基板の直上にナノニードルアレイを配置し、ピエゾ駆動で接近速度等を任意に設定できる装置の詳細を決定するための基礎的検討を行う。

ナノニードルアレイでは、同時に複数の細胞にナノニードルが挿入されなければならないため、ナノニードルの挿入効率を最大にする手法を考案する必要がある。AFMを用い、カンチレバー型のナノニードルの挿入において、ナノ薄膜法等を検討し、ナノニードルの挿入効率が最大となる条件を検討する。

抗体標識ナノニードルによる細胞の釣り上げ分離において、ニードル表面の抗体量を増大させれば、Fishing forceを増大させることができる。ナノニードルアレイ表面へ多くのタンパク質を均一に修飾する方法を検討する。

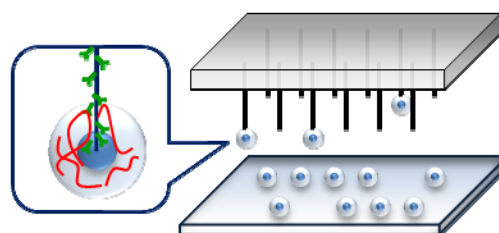


図1 ナノニードルアレイによる機械的細胞分離の概念図

2. 研究の実施状況

ナノニードルアレイの作製では、4インチのシリコンウエハに対して、光リソグラフィーとドライエッチングによってマイクロピラーアレイを作製し、このマイクロピラーアレイに対して1100℃で湿式熱酸化を行うことで、SiO₂層を形成させた。その後、フッ化水素によるSiO₂層除去によって、直径330nm、長さ11μmの高アスペクト比のナノニードルを作製した。

その後、レーザーステルスダイサーによってウエハを10mm角に切断し、10mm角あたりおよそ1万~4万本のナノニードルが配列したアレイを得ることに成功した。簡易型動作装置を用いた試験を行ったところ、細胞基板に対するナノニードルアレイの水平制御が困難であることが明

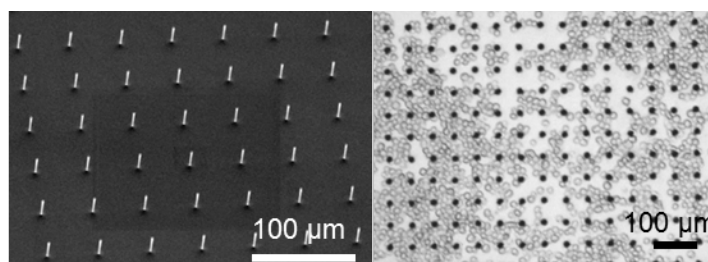


図1 作製されたナノニードルアレイ(左)BAM-BSAで固定された細胞とナノニードルアレイの微分干渉像(右)

らかとなった。そこで、ナノニードルアレイの動作装置の設計では、細胞培養基板に対して、高精度な水平制御を可能にするナノニードルアレイ動作装置を設計した。装置は H24 年度完成の予定である。

ナノニードルの細胞挿入には細胞表層の繊維状構造が必須であることが明らかになっている。そこで、挿入効率増大のために細胞外マトリックス成分であるフィブロネクチンを用いたナノ薄膜を細胞表面に形成し、ナノニードル挿入効率の向上を検討した。その結果、ナノニードル挿入が困難なマウス繊維芽細胞 Balb3T3 と培養 3 日目の神経細胞において、ナノ薄膜形成後に、それぞれ 24%、23%のナノニードルの挿入効率の増大が確認された。またナノニードルアレイを高周波振動させる加振法を検討した結果、アレイの動作に起因する流体の応力により、つり上げのために弱く接着した細胞を剥離させる問題があり、ナノニードルアレイ動作装置の完成後に加振条件の詳細な検討を行うこととした。

蛍光タンパク質 GFP を用いて、ナノニードルアレイ表面へのタンパク質修飾方法を検討した結果、従来法と比較してナノニードルごとのばらつきを示す蛍光強度の変動係数が 50%から 11%に低減し、均一性の高いタンパク質修飾に成功した。

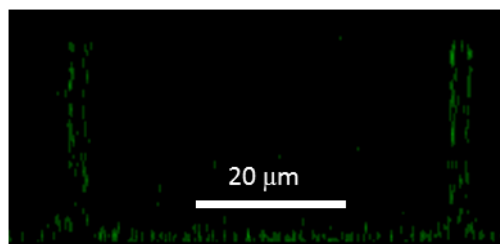


図2 GFP修飾ナノニードルアレイの共焦点蛍光顕微鏡像

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 2 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 件 Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Takanori Kihara, Tomoko Okada, Toshiya Sato, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake and Chikashi Nakamura Mechanical force-based probing of intracellular proteins from living cells using antibody-immobilized nanoneedles Biosensors & Bioelectronics, 31(1), 323-329 (2011) ISSN : 0956 - 5663</p> <p>Yosuke Amemiya, Keiko Kawano, Michiya Matsusaki, Akashi Mistui, Noriyuki Nakamura and Chikashi Nakamura Formation of nanofilms on cell surfaces to improve the insertion efficiency of a nanoneedle into cells Biochemical and Biophysical Research Communications, 420(3), 662-665 (2012) ISSN : 0006-291X</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 11 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件 中村 史 抗体修飾ナノニードルを用いた生細胞内タンパク質検出技術 第 5 回 バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成 23 年 9 月 12 日～9 月 14 日 主催：生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>下奥万梨恵、雨宮陽介、宇田みき、Sathuluri Ramachandra Rao、石原一彦、深沢今日子、中村史 ナノニードルアレイへの抗体修飾方法の検討 第 5 回 バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成 23 年 9 月 12 日～9 月 14 日</p>

	<p>主催:生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>大小瀬求、雨宮陽介、三枝真吾、Sathuluri Ramachandra Rao、中村 史 細胞分離技術の開発を目的とした細胞接着力の解析と調整 第5回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成23年9月12日～9月14日 主催:生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>Sathuluri Ramachandra Rao、雨宮陽介、小林 健、中村 史 単一細胞操作のための高密度シリコンナノニードルアレイの作製 第5回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、平成23年9月12日～9月14日 主催:生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、フロンティア生命化学研究会、ホスト-ゲスト超分子研究会</p> <p>雨宮陽介、岡田知子、石原一彦、中村 史 抗体修飾ナノニードルを用いた細胞内繊維状タンパク質の検出 第63回日本生物工学会大会、東京農工大学、平成23年9月26日～9月28日 主催:日本生物工学会</p> <p>雨宮陽介、三枝真吾、北川太郎、金城百合恵、石原一彦、木原隆典、三宅 淳、中村 史 AFMを用いた細胞骨格タンパク質の力学検出による細胞識別 生命科学における走査プローブ法と光ピンセット ワークショップ、駒場コンベンションホール、平成23年9月28日 主催:JPK インスツルメンツ</p> <p>中村 史 セルサージェリー技術を用いたバイオセンシング センサ・アクチュエータ・マイクロナノ/ウィーク 2011 次世代センサ総合シンポジウム、東京ビッグサイト、平成23年10月12日～14日 主催:次世代センサ協議会</p> <p>中村 史 ナノニードルアレイを用いた新規細胞分離技術の開発 平成23年度 第11回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、産総研つくばセンター共用講堂、平成24年1月31日～2月1日 主催:産業技術総合研究所、産技連ライフサイエンス部会バイオテクノロジー分科会</p> <p>大小瀬求、雨宮陽介、Sathuluri Ramachandra Rao、Silberberg Rafael Yaron、中村 史 細胞分離を目的とした細胞接着力調整方法の検討 日本化学会第92春季年会、慶應義塾大学、平成24年3月25日～28日 主催:日本化学会</p> <p>下奥万梨恵、雨宮陽介、Sathuluri Ramachandra Rao、石原一彦、深沢今日子、中村 史 細胞操作に向けたナノニードルアレイのタンパク質修飾方法の検討 日本化学会第92春季年会、慶應義塾大学、平成24年3月25日～28日 主催:日本化学会</p> <p>一般向け 計1件 中村 史 ナノニードルアレイセルソーター バイोजアパン 2011、パシフィコ横浜、平成23年10月5日～7日 主催:BioJapan 組織委員会</p>
--	--

様式19 別紙1

<p>図書 計2件</p>	<p>木原隆典、中村 史、三宅 淳 「ナノニードルによる細胞内分子評価と生体適合性高分子の利用」 月刊ファインケミカル 2011年10月号、33頁～40頁、シーエムシー出版、2011年、総88頁 ISBN:0913-6150</p> <p>中村 史 「抗体修飾ナノニードルを用いた生細胞内タンパク質検出技術」 バイオイメージング、20(3)、1頁～7頁、バイオイメージング学会、2012年、総20頁</p>
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-cme/ センサージェリー技術の開発 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門セルメカニクス研究グループ</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>「ナノニードルアレイセルソーター」 バイオジャパン 2011、パシフィコ横浜、平成23年10月5日～7日、対象者：一般および業界関係 者、参加者数：11,940人 内容：細胞内のマーカータンパク質を標的とした新しい細胞分離技術について、ポスター形式により 発表を行った。</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計1件</p>	<p>日経産業新聞平成23年5月17日10面 「ナノニードルによる細胞内 mRNA の検出」</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	132,000,000	60,146,000	0	71,854,000	0
間接経費	39,600,000	18,043,800	0	21,556,200	0
合計	171,600,000	78,189,800	0	93,410,200	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	58,588,177	0	0	58,588,177	51,759,956	6,828,221	0
間接経費	17,576,454	0	0	17,576,454	17,576,454	0	0
合計	76,164,631	0	0	76,164,631	69,336,410	6,828,221	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	33,370,224	集束イオンビーム加工装置、実験試薬等
旅費	948,547	研究成果発表旅費(Amsterdam)等
謝金・人件費等	12,976,027	博士研究員人件費、テクニカルスタッフ人件費
その他	4,465,158	学会参加費、通信料等
直接経費計	51,759,956	
間接経費計	17,576,454	
合計	69,336,410	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
集束イオンビーム 加工装置	SMI500V2	1	14,910,000	14,910,000	2011/10/28	東京農工大学
反射微分干涉顕微 鏡システム	オリンパス製	1	5,376,000	5,376,000	2011/12/22	産業技術総合研 究所
自動接触角計	協和界面科学製	1	1,584,450	1,584,450	2011/12/21	東京農工大学
ナノニードルアレイ 簡易動作装置	オリンパス製	1	1,260,000	1,260,000	2012/1/13	東京農工大学