

課題番号	LR038
------	-------

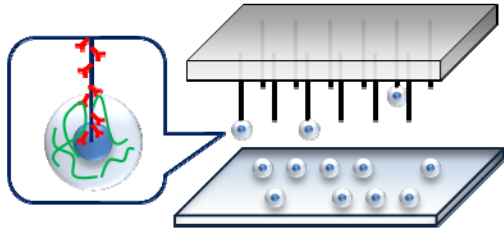
**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成24年度)**

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

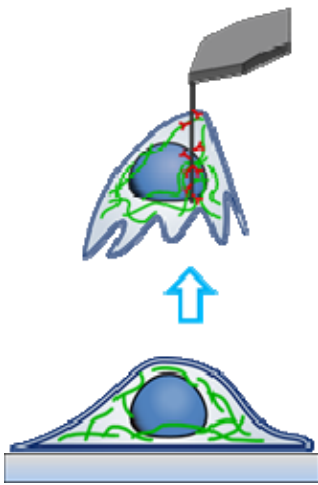
本研究プロジェクトでは、ナノニードルアレイを用いて機械的に細胞を分離する新しい細胞分離技術の開発を目的としている。細胞に高効率で挿入するためナノニードルは直径 200 nm 程度、長さ 10  $\mu$ m 以上の針状形状である必要がある。平成 23 年度の研究では、ナノニードルアレイの作製と評価を中心に研究を遂行した。平成 24 年度の研究では、細胞培養基板に対して、水平制御を行うことが可能なナノニードルアレイ動作装置の試作を行う。また、細胞釣り上げのための Fishing force と細胞接着力の関係を解析し、釣り上げに必要なパラメーターの検討を行った上で、ナノニードルアレイによる細胞釣り上げ試験を行うことを目的とする。



**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

平成 24 年度の研究では、まず実際に抗体修飾ナノニードルによる細胞の釣り上げ分離が可能であるかどうかを、カンチレバー型ナノニードルを用いて実証した。抗ネスチン抗体修飾ナノニードルを用いて、付着培養状態のネスチン陽性マウス胚性癌細胞 P19 を抗体の結合力で強制的に剥離させ分離することに成功した。釣り上げ時の力は 10 nN 以上であり、ナノニードル表面に固定化された抗体で細胞の釣り上げに十分な結合力が得られることを証明した。ナノニードルアレイによる細胞の釣り上げ試験を行うための、ナノニードルアレイの動作装置の作製、ナノニードル直下に細胞を配列した細胞アレイの作製、およびこれらを用いた挿入試験を行った。ナノニードルアレイ動作装置は、静岡大学と協力することによって、ピエゾモーターにより XYZ いずれの方向も 0.1~30  $\mu$ m/sec の任意の速度で動作可能である装置を作製した。細胞アレイの作製は、上記アレイ動作装置を用い、ナノニードルアレイの作製工程で得られるマイクロピラーアレイを用いたコンタクトプリント法により作製した。細胞膜修飾剤(BAM)のスポットを BSA 被膜上に配列し、単一細胞を繫留することにより細胞アレイを調製した。その結果、ナノニードル



**図2 抗体修飾ナノニードルによる細胞分離**

様式19 別紙1

の直下に細胞が配列した割合、細胞充填率は 60%であり、総数6千個の細胞を配列させることが可能であった。さらに、コンタクトプリントのインク液中の BAM 濃度を調整することによって細胞の接着力を調整することが可能であった。この細胞アレイに対してナノニードルアレイを動作装置により接近させ、挿入を試みた。その結果、微小な角度のずれによりニードルと細胞の位置が合わないことが明らかとなった。最終年度では、細胞アレイの細胞充填率を90%以上に増大させ、ナノニードルアレイ動作装置に対して微小回転調整治具の導入による改良を行い、抗体固定化ナノニードルアレイによって細胞の分離を行うことを目標とする。

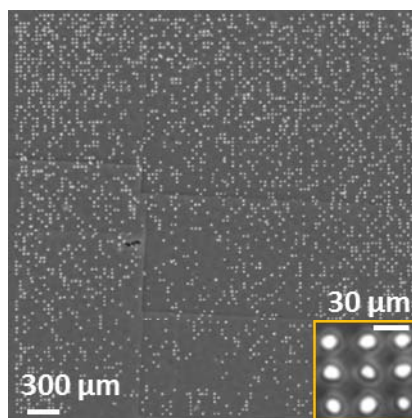


図3 作製された細胞アレイ

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 1 件 Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake and Chikashi Nakamura Evaluation of the actin cytoskeleton state using antibody-functionalized nanoneedle and AFM Biosensors &amp; Bioelectronics, 40(1), 3-9 (2013) ISSN : 0956 - 5663</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件 Seunghwan Ryu, Ryuzo Kawamura, Ryohei Naka, Yaron R. Silberberg, Noriyuki Nakamura, Chikashi Nakamura Nanoneedle insertion into the cell nucleus does not induce double-strand breaks in chromosomal DNA Journal of Bioscience and Bioengineering ISSN: 1389-1723</p> <p>Controlled cell adhesion using a biocompatible anchor for membrane-conjugated bovine serum albumin/bovine serum albumin mixed layer Ryuzo Kawamura, Mari Mishima, Seunghwan Ryu, Yu Arai, Motomu Okose, Yaron R. Silberberg, Sathuluri Ramachandra Rao, Chikashi Nakamura Lagmuir ISSN: 0743-7463</p>
<p>会議発表 計 27 件</p>	<p>専門家向け 計 25 件 Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake, Chikashi Nakamura Evaluation of cytoskeleton state in live cells using an antibody-immobilized nanoneedle Biosensors 2012, Cancun, Mexico, May 15-18, 2012 Elsevier</p> <p>Ramachandra Rao Sathuluri, Yosuke Amemiya, Takeshi Kobayashi, Marie Shimooku, Chikashi Nakamura Development of a silicon nanoneedle array with high-aspect-ratios for analyzing single-cell response Biosensors 2012, Cancun, Mexico, May 15-18, 2012 Elsevier</p> <p>Motomu Okose, Yosuke Amemiya, Yu Arai, Chikashi Nakamura Measurement and control of cell adhesion force to substrate Biosensors 2012, Cancun, Mexico, May 15-18, 2012 Elsevier</p>

	<p>中村 史          ナノニードルアレイを用いた新しい細胞分離技術の開発          平成 24 年度産官学フォーラム講演会、名古屋大学ES総合館ESホール、平成 24 年 7 月 14 日          電気化学会</p> <p>川村隆三、シルベルベルク ヤロン、柳 昇桓、深沢今日子、石原一彦、中村 史          抗体修飾ナノニードルを用いた細胞分離の力学解析          生体機能関連化学部会第 27 回若手フォーラム、北海道大学、平成 24 年 9 月 5 日          日本化学会、生体機能関連化学部会、若手の会</p> <p>川村隆三、シルベルベルク ヤロン、柳 昇桓、深沢今日子、石原一彦、中村 史          抗体修飾ナノニードルを用いた細胞分離におけるフォースカーブ解析          第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学高等教育推進機構、平成 24 年 9 月 6 日～8 日          生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、生体機能関連化学・バイオテクノロジーディビジョン、フロンティア生命化学研究会</p> <p>Chikashi Nakamura          Live cell analysis using a nanoneedle functionalized with molecular probes          The 6th KIFEE Symposium, Trondheim, Norway, September 10-12, 2012          NTNU</p> <p>Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake, Chikashi Nakamura          Evaluation of cytoskeleton state in live cells using an antibody-immobilized nanoneedle          IBS2012, Daegu, Korea, September 16-21, 2012          the International Union of Pure and Applied Chemistry, IBS</p> <p>Seung-Hwan Ryu, Taro Kitagawa, Ryuzo Kawamura, Chikashi Nakamura, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake          Evaluating the insertion efficiencies of tapered silicon nanoneedles into living single cells          PRiME 2012, Honolulu, Hawaii, October 7-12, 2012          The Electrochemical Society</p> <p>Marie Shimooku, Sathuluri Ramachandra Rao , Ryuzo Kawamura, Kazuhiko Ishihara, Kyoko Fukazawa, Chikashi Nakamura          Development of a method to modify nanoneedle arrays with molecular probes for the analysis of living cells          PRiME 2012, Honolulu, Hawaii, October 7-12, 2012          The Electrochemical Society</p> <p>Chikashi Nakamura, Yaron R. Silberberg, Ryuzo Kawamura, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Takanori Kihara, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Noriyuki Nakamura, Jun Miyake          Mechanical force-based probing of cytoskeletal proteins in living cells using antibody-immobilized          PRiME 2012, Honolulu, Hawaii, October 7-12, 2012          The Electrochemical Society</p> <p>柳 昇桓、Yaron Silberberg、川村隆三、中村 史          ナノニードルの細胞挿入における加振の効果          第 64 回日本生物工学会大会、神戸国際会議場、平成 24 年 10 月 23 日～26 日          日本生物工学会</p> <p>下奥万梨恵、川村隆三、石原一彦、深沢今日子、中村 史          ナノニードルアレイの抗体修飾方法の検討          第 64 回日本生物工学会大会、神戸国際会議場、平成 24 年 10 月 23 日～26 日          日本生物工学会</p> <p>中村 史          バイオセンサ開発に向けたナノニードルを用いた生細胞解析技術</p>
--	---

	<p>医療用バイオセンサの製品化を成功させるための最新研究開発と薬事対応、市場開拓、東京 大井町 きゅりあん、平成 24 年 10 月 30 日 株式会社技術情報協会</p> <p>Yaron Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Chikashi Nakamura A force-based approach for probing the intracellular cytoskeleton 3rd Kanazawa Bio-AFM Workshop, KKR Hotel Kanazawa, November 5-8, 2012 Kanazawa University</p> <p>Yaron Rafael Silberberg, Ryuzo Kawamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Chikashi Nakamura Mechanical force-based probing of cytoskeletal proteins in single living cells using antibody-immobilized nanoneedle International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, Kyoto Research Park, Kyoto, November 27-28, 2012 The Society for Single-Cell Surveyor</p> <p>Yaron R. Silberberg、三枝真吾、雨宮陽介、深沢今日子、石原一彦、中村 史 A novel method for the label-free detection of cytoskeletal components in live cells using antibody-immobilized nanoneedles 第 12 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 25 年 2 月 5 日～6 日 (独)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>川村隆三、Yaron R. Silberberg、柳 昇桓、深沢今日子、石原一彦、中村 史 細胞分離に向けた抗体修飾ナノニードルによる接着細胞の力学的解析 第 12 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 25 年 2 月 5 日～6 日 (独)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>Sathuluri Ramachandra Rao、小林 健、下奥万梨恵、川村隆三、中村 史 High aspect ratio silicon nanoneedle array fabrication for single cell manipulations 第 12 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 25 年 2 月 5 日～6 日 (独)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>Ramachandra Rao Sathuluri, Takeshi Kobayashi, Marie Shimooku, Ryuzo Kawamura, Chikashi Nakamura Development of High-aspect-ratio Silicon Nanoneedle Array for Single-cell Manipulations INDO-US International Workshop on Nanosensor Science &amp; Technology, Berhampur, Odisha, India, February 27-March 1, 2013</p> <p>川村 隆三、三島 麻里、シルベルベルグ ヤロン、深澤 今日子、石原 一彦、中村 史 細胞分離に向けた細胞接着制御とその力学的解析 日本化学会第 93 春季年会(2013)、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成 25 年 3 月 22 日～25 日 日本化学会</p> <p>中 涼平、柳 昇桓、川村 隆三、中村 史 γ-H2AX 発現解析によるナノニードル核挿入のリスク評価 日本化学会第 93 春季年会(2013)、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成 25 年 3 月 22 日～25 日 日本化学会</p> <p>宮崎 みなみ、川村 隆三、サトゥルリ ラマチャンドララオ、小林 健、石原 一彦、深澤 今日子、岩田 太、中村 史 マイクロピラーを用いたコンタクトプリント法による単一細胞アレイの作製 日本化学会第 93 春季年会(2013)、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成 25 年 3 月 22 日～25 日 日本化学会</p> <p>下奥万梨恵、宮崎みなみ、川村隆三、サトゥルリラマチャンドラ ラオ、小林健、辻村範行、中村徳幸、岩田太、中村史</p>
--	---

様式19 別紙1

	<p>ナノニードルアレイを用いた細胞への遺伝子導入法の開発 電気化学会第 80 回大会、東北大学川内キャンパス、平成 25 年 3 月 29 日～31 日 電気化学会</p> <p>柳昇桓、川村隆三、上野隆史、中村史 高効率な細胞へのナノニードル挿入方法の開発 電気化学会第 80 回大会、東北大学川内キャンパス、平成 25 年 3 月 29 日～31 日 電気化学会</p> <p>一般向け 計 2 件 中村 史 生きている細胞を小さな針で選り分ける 産総研一般公開、産総研つくばセンター、平成 24 年 7 月 21 日 (独)産業技術総合研究所</p> <p>中村 史 ナノニードルアレイセルソーター バイोजパン 2012、パシフィコ横浜展示ホール、平成 24 年 10 月 10 日～12 日 BioJapan 組織委員会、株式会社 ICS コンベンションデザイン</p>
<p>図 書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 2 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 2 件</p> <p>特許(外国) 中村 史 「細胞の分離法および分離装置」 独立行政法人産業技術総合研究所 US-2013-0005038-A1(US) 平成 25 年 1 月 3 日</p> <p>特許(外国) 中村 史 「細胞の分離法および分離装置」 独立行政法人産業技術総合研究所 2546328(EP) 平成 25 年 1 月 16 日</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-cme/">http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-cme/</a> 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>産総研一般公開「生きている細胞を小さな針で選り分ける」、平成 24 年 7 月 21 日、産総研つくばセンター 対象者:一般および業界関係者、参加者数:5,659 名 内容:見学ツアーにおいて、ナノニードルを用いて細胞を選別する方法を、子供達にも分かり易いようデモン ストレーションした。</p> <p>バイोजパン 2012 「ナノニードルアレイセルソーター」、平成 24 年 10 月 10 日～12 日、パシフィコ横浜展 示 ホール 対象者:一般および業界関係者、参加者数:12,369 名 内容:ナノニードルアレイを多数の細胞に対して同時挿入し、目的細胞を機械的に分離する装置の開発につ いてポスター形式で発表を行った。</p>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

22nd Anniversary World Congress on Biosensors において本研究プログラムの成果論文が  
Best Paper Award 2012, For an outstanding contribution to Biosensors and Bioelectronics  
を受賞した。受賞論文は

Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko  
Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake and Chikashi Nakamura

Evaluation of the actin cytoskeleton state using antibody-functionalized nanoneedle and AFM  
Biosensors & Bioelectronics, 40(1), 3-9 (2013)

である。日本のグループからの最高論文賞(1位)の受賞は初めての快挙である。

## 実施状況報告書(平成24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せん

## 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	35,214,000	36,640,000	0
間接経費	39,600,000	18,043,800	10,564,200	10,992,000	0
合計	171,600,000	78,189,800	45,778,200	47,632,000	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	6,828,221	35,214,000	0	42,042,221	40,464,498	1,577,723	0
間接経費	0	10,564,200	0	10,564,200	10,564,200	0	0
合計	6,828,221	45,778,200	0	52,606,421	51,028,698	1,577,723	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	15,021,391	共焦点顕微鏡用ソフトウェア、実験試薬等
旅費	1,992,961	研究成果発表旅費(カンコン)等
謝金・人件費等	22,210,368	博士研究員人件費、テクニカルスタッフ人件費
その他	1,239,778	学会参加費、通信料等
直接経費計	40,464,498	
間接経費計	10,564,200	
合計	51,028,698	

## 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
共焦点顕微鏡用ソフトウェア	U11158-02DC	1	864,675	864,675	2012/6/12	産業技術総合研究所
φ8"シリコンウェーハ	導電型:P型(ボロン)、結晶方位: <100>、直径: 200±0.5mm、厚 み:725±25μm	1	945,000	945,000	2013/2/12	産業技術総合研究所
				0		