

＊課題番号 : F-12-KT-0079
 ＊支援課題名 (日本語) : 細胞内物質導入の基礎研究
 ＊Program Title (in English) : Fundamental studies on delivery of molecules into living cells
 ＊利用者名 (日本語) : 梶本 剛生
 ＊Username (in English) : Takao Kajimoto
 ＊所属名 (日本語) : 京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻
 ＊Affiliation (in English) : Kyoto University, the Department of Micro Engineering

※概要 (Summary) :

細胞の形質変化を目的として、細胞への外来性遺伝子の導入が広く行われており、その手法の一つとして電気穿孔法が用いられている。近年、微小オリフィスによる集中電場を利用した電気穿孔法が提案されている(1)。しかし、本手法における遺伝子導入過程は不明な点が多く、先行研究(1)で主張されるような導入効率向上のメカニズムは明らかになっていない。そのため遺伝子の輸送過程における電気泳動や電気浸透流による効果と導入過程に依存した遺伝子発現の効率の変化を評価する必要がある。そこで本研究では遺伝子の輸送現象を解明することを目的として、光学顕微鏡による可視化観察に適した微小流路デバイスを作製した。本デバイス内部で電気穿孔法を実施し、蛍光分子の輝度値変化から膜穿孔の生成を評価した。

※実験 (Experimental) :

作製したデバイスの模式図を図 1(a)に示す。本デバイスは二本の微小流路で構成されており、それらは直径数 μm のオリフィスで接続されている。オリフィスの作製は Murat ら(2)が提案した作製方法を参考にした。図 1(b)は作製したオリフィスの SEM 画像を示している。

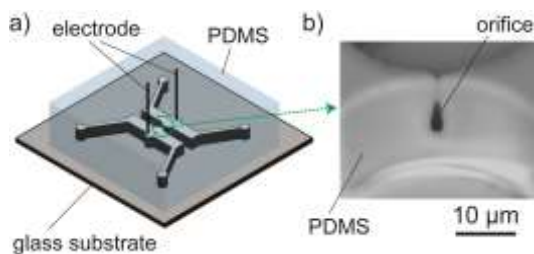


図 1 a)デバイス模式図, b)オリフィス SEM 画像

※結果と考察 (Results and Discussion) :

次に本デバイスによる電圧印可時の膜穿孔の形成を蛍光分子の導入によって評価した。細胞への導入分子として細胞膜に対して透過性を持たない calcein を用いた。細胞をオリフィスに固定した状態で電圧を印加

し、細胞内部の蛍光輝度値の変化を測定した。図 2 (a)に細胞が固定された様子を示す。図 2 (b)に示すように電圧印加時から蛍光輝度値が減少しており、膜穿孔の形成が確認できた。

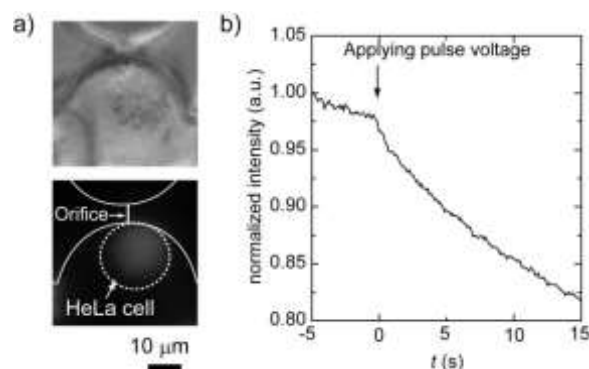


図 2 a)HeLa 細胞の明視野及び蛍光画像 b)電圧印加時の細胞内部における蛍光輝度値の経時変化

※その他・特記事項 (Others) :

本デバイス内部において、電気穿孔法が可能であることが確認できた。今後、本デバイスで遺伝子の導入を実施し、その導入過程を測定すると同時に細胞の長期培養による遺伝子の発現を視野に入れて研究を進めていく。
 (1) Valero, A. et al., Lab on a chip 8, (2008), 62-7.
 (2) Gel, M. et al., Biomicrofluidics 4, (2010), 1-8.

論文・学会発表 (Publication/Presentation) :

- 梶本剛生, 小此木孝仁, 鈴木孝明, 新宅博文, 横川隆司, 小寺秀俊, エレクトロポレーションにおける導入物質観察の為の微小流路デバイス, 日本機械学会 2012 年度年次大会, J161044, 金沢, 2012 年 9 月 12 日.
- 梶本剛生, 新宅博文, 横川隆司, 小寺秀俊, 電界集中を用いた細胞の電気穿孔法における物質輸送の可視化計測, 日本機械学会第 4 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, pp. 51-52, 北九州, 2012 年 10 月 23 日.