

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-31549

(P2015-31549A)

(43) 公開日 平成27年2月16日(2015.2.16)

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
GO 1 N 1/28 (2006.01) GO 1 N 1/28 G 2 G 0 5 2
 GO 1 N 1/28 J

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2013-160041 (P2013-160041)
 (22) 出願日 平成25年8月1日(2013.8.1)

(71) 出願人 304028346
 国立大学法人 香川大学
 香川県高松市幸町1番1号
 (74) 代理人 110001704
 特許業務法人山内特許事務所
 (72) 発明者 寺尾 京平
 香川県高松市林町2217番地20 国立
 大学法人香川大学工学部内
 (72) 発明者 竹村 祐人
 香川県高松市林町2217番地20 国立
 大学法人香川大学工学部内
 Fターム(参考) 2G052 AA33 CA18 CA46 EC04 EC05
 EC22 EC23 GA32

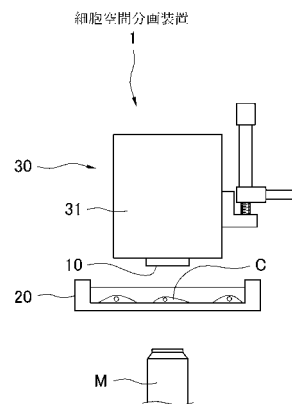
(54) 【発明の名称】 細胞空間分画装置および微細構造刃

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】細胞内部の位置情報を保持しつつ細胞を空間的に区画化できる細胞空間分画装置および微細構造刃を提供する。

【解決手段】細胞Cを空間的に区画化して切断する刃構造を有する微細構造刃10と、微細構造刃10を細胞Cに押圧する押圧手段30とを備える細胞空間分画装置1。微細構造刃10は、板状の基部と、基部上に形成された刃構造部とからなり、基部には、刃構造部の各区画に孔が形成されている。微細構造刃10を細胞Cに押圧することで、細胞内部の位置情報を保持しつつ細胞Cを空間的に区画化できる。基部に孔が形成されているので、その孔を通して区画化された細胞Cに薬液等を投与して処理を施すことができる。微細構造刃10の表側と裏側に圧力差を生じさせて、区画化された細胞Cを微細構造刃10に引き付け保持できる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を空間的に区画化して切断する刃構造を有する微細構造刃と、前記微細構造刃を前記細胞に押圧する押圧手段と、を備えることを特徴とする細胞空間分画装置。

【請求項 2】

前記微細構造刃は、板状の基部と、該基部上に形成された刃構造部とからなり、前記基部には、前記刃構造部の各区画に孔が形成されていることを特徴とする請求項 1 記載の細胞空間分画装置。

【請求項 3】

前記微細構造刃を超音波振動させる超音波振動子を備えることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の細胞空間分画装置。

【請求項 4】

前記細胞を保持する基板と、前記微細構造刃と前記基板との間に電気パルスを流す電気パルス付与手段と、を備えることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の細胞空間分画装置。

【請求項 5】

前記細胞は基板に保持されたゲル体中に固定されていることを特徴とする請求項 1、2、3 または 4 記載の細胞空間分画装置。

【請求項 6】

細胞を空間的に区画化して切断する刃構造を有することを特徴とする微細構造刃。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞空間分画装置および微細構造刃に関する。さらに詳しくは、細胞を空間的に区画化して切断する細胞空間分画装置、およびそれに用いられる微細構造刃に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞を切断する装置として、マイクロマニピュレータやレーザーを用いた装置が知られている。例えば、特許文献 1 に記載の細胞切断装置は、マイクロナイフで細胞を切断する装置である。また、特許文献 2 に記載の切断装置は、マイクロ流体チップの流路に細胞を流過させて細胞を切断する装置である。

【0003】

これらの装置を操作するには高度な技術を要するため、熟練したオペレータを必要とする。また、細胞を一個ずつ切断する必要があり効率的でない、細胞内部の位置情報を保持できない、細胞の特定部位の取得ができないという問題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2010 - 261757 号公報

【特許文献 2】特開 2009 - 142251 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は上記事情に鑑み、細胞内部の位置情報を保持しつつ細胞を空間的に区画化できる細胞空間分画装置および微細構造刃を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

10

20

30

40

50

第1発明の細胞空間分画装置は、細胞を空間的に区画化して切断する刃構造を有する微細構造刃と、前記微細構造刃を前記細胞に押圧する押圧手段と、を備えることを特徴とする。

第2発明の細胞空間分画装置は、第1発明において、前記微細構造刃は、板状の基部と、該基部上に形成された刃構造部とからなり、前記基部には、前記刃構造部の各区画に孔が形成されていることを特徴とする。

第3発明の細胞空間分画装置は、第1または第2発明において、前記微細構造刃を超音波振動させる超音波振動子を備えることを特徴とする。

第4発明の細胞空間分画装置は、第1または第2発明において、前記細胞を保持する基板と、前記微細構造刃と前記基板との間に電気パルスを通す電気パルス付与手段と、を備えることを特徴とする。

第5発明の細胞空間分画装置は、第1、第2、第3または第4発明において、前記細胞は基板に保持されたゲル体中に固定されていることを特徴とする。

第6発明の微細構造刃は、細胞を空間的に区画化して切断する刃構造を有することを特徴とする。

【発明の効果】

【0007】

第1発明によれば、微細構造刃を細胞に押圧することで、細胞内部の位置情報を保持しつつ細胞を空間的に区画化できる。

第2発明によれば、基部に孔が形成されているので、その孔を通して区画化された細胞に薬液等を投与して処理を施すことができる。また、微細構造刃の表側と裏側に圧力差を生じさせて、区画化された細胞を微細構造刃に引き付け保持できる。

第3発明によれば、微細構造刃の超音波振動により細胞膜を破壊でき、切断抵抗が低くなる。そのため、細胞を潰すことなく区画化でき、細胞内部の正確な位置情報を保持できる。

第4発明によれば、電気パルスにより細胞膜を破壊でき、切断抵抗が低くなる。そのため、細胞を潰すことなく区画化でき、細胞内部の正確な位置情報を保持できる。

第5発明によれば、細胞がゲル体中に固定されているので、作業中に細胞が移動することがなく、所望の位置で細胞を区画化できる。

第6発明によれば、微細構造刃を細胞に押圧することで、細胞内部の位置情報を保持しつつ細胞を空間的に区画化できる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本発明の第1実施形態に係る細胞空間分画装置の説明図である。

【図2】微細構造刃の縦断面図である。

【図3】微細構造刃の平面図であり、(A)はスリット状、(B)は格子状、(C)はハニカム状の刃構造を示す。

【図4】基板の縦断面図である。

【図5】空間分画方法の説明図であり、(A)は微細構造刃の押圧前、(B)は微細構造刃の押圧後である。

【図6】本発明の第2実施形態に係る細胞空間分画装置の微細構造刃部分の縦断面図である。

【図7】本発明の第3実施形態に係る細胞空間分画装置の微細構造刃部分の縦断面図であり、(A)は細胞を吸引した状態、(B)は微細構造刃を反転させた状態を示す。

【図8】本発明の第4実施形態に係る細胞空間分画装置の微細構造刃部分の縦断面図である。

【図9】本発明の第5実施形態に係る細胞空間分画装置の微細構造刃部分の縦断面図である。

【図10】空間分画の説明図である。

【図11】作製した微細構造刃のSEM画像であり、(A)は全体、(B)は(A)の破線

10

20

30

40

50

部分の拡大である。

【図12】(A)はスリット状微細構造刃で空間分画した細胞の画像、(B)は(A)における一点鎖線上の蛍光輝度を示すグラフである。

【図13】(A)は空間分画前の細胞の画像であり、(B)は格子状微細構造刃で空間分画した細胞の画像である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

つぎに、本発明の実施形態を図面に基づき説明する。

(空間分画)

本発明に係る細胞空間分画装置は、細胞を二次元空間的に区画化して切断する装置である。図10に示すように、単一の細胞Cを例えば格子状に区画化して切断する。以下、細胞Cを二次元空間的に区画化して切断する処理を「空間分画」と称する。また、区画化の最小単位の領域を「区画」と称する。

10

【0010】

このように細胞Cを空間分画することにより、細胞内部の位置情報と関連付けて種々の測定ができる。また、細胞Cの一部分の極小領域を回収したり、核や細胞質等の細胞小器官を採取したり、細胞核・細胞質移植に利用したりすることもできる。区画形状は格子状に限られず、目的に合わせてスリット状や八ニカム状等種々の形状を選択できる。また、区画寸法も目的に合わせて種々の寸法に設定できる。

【0011】

20

(第1実施形態)

図1に示すように、本発明の第1実施形態に係る細胞空間分画装置1は、細胞Cを切断する微細構造刃10と、細胞Cを保持する基板20と、微細構造刃10を細胞Cに押圧する押圧手段30とを備える。また、細胞Cを測定するための測定手段として、基板20の下方に顕微鏡Mが設置されている。

【0012】

図2に示すように、微細構造刃10は、板状の基部11と、基部11上に形成された刃構造部12とからなる。刃構造部12は、基部11上に垂直に立った刃からなり、この刃によって所定の区画形状、寸法の刃構造が形成されている。図3(A)に示すように、刃構造部12は平面視においてスリット状の刃構造を有している。後述のごとく、微細構造刃10を細胞Cに押圧することで、細胞Cを空間的に区画化して切断できる。そのため、刃構造部12は、対象の細胞Cよりも微細な構造を有している。例えば、刃構造部12の全体寸法は約200 μm 四方であり、刃の高さaは約10 μm 、刃の幅bは200~1,000nm、区画幅(刃と刃の間の幅)cは2~10 μm である。このような微細構造を有する微細構造刃10は、シリコンエッチング等の半導体加工技術を用いて作成できる。

30

【0013】

なお、刃構造部12の各寸法は、対象の細胞Cの大きさや、求める区画寸法等により適宜設定すればよい。また、刃構造部12は細胞Cを空間的に区画化して切断する刃構造を有していればよく、スリット状(図3(A))のほか、格子状(図3(B))や八ニカム状(図3(C))等、求める区画形状に合わせて種々の形状を採用できる。

40

【0014】

図4に示すように、基板20はガラス板21と、ガラス板21上に形成された皿部22とからなる。皿部22内にはゲル体23が保持されており、ゲル体23中に細胞Cが固定されている。ゲル体23としては、コラーゲンゲル、アガロースゲル、アルギン酸ゲル等を用いることができる。

【0015】

このような基板20は、例えば以下の手順で作成できる。まず、ガラス板21の表面にPDMS(ジメチルポリシロキサン)等の樹脂をコーティングし、その樹脂層の表面に周囲を囲うようにPDMS等の樹脂をボンディングして側壁を形成し皿部22とする。つぎに、皿部22の内部にコラーゲンゲル等をコーティングし、そのゲル層の表面に細胞Cを配置する。

50

さらに、皿部 2 2 の内部にコラーゲンゲル等をコーティングして細胞 C を埋没させ、ゲル体 2 3 中に細胞 C を固定する。

【 0 0 1 6 】

なお、基板 2 0 は細胞 C を保持できればよく、培養ディッシュ等の容器に培養液等の液体を満たし、その中に細胞 C を配置してもよい。本実施形態のように基板 2 0 の下方に顕微鏡 M を設置する場合には、基板 2 0 が透明である必要がある。

【 0 0 1 7 】

図 1 に戻り、本実施形態の押圧手段 3 0 は Z 軸ステージであり、その台座 3 1 の底面に微細構造刃 1 0 が固定されている。台座 3 1 は昇降可能であり、台座 3 1 の下方に基板 2 0 が配置されている。微細構造刃 1 0 は刃構造部 1 2 が基板 2 0 と対向するように、すなわち下方を向くように固定されている。なお、押圧手段 3 0 は Z 軸ステージに限定されず、微細構造刃 1 0 を細胞 C に押圧できる構成であれば、どのような構成のものを用いてもよい。また、微細構造刃 1 0 の押圧力を測定するために荷重センサを設けてもよい。

10

【 0 0 1 8 】

つぎに、細胞空間分画装置 1 を用いた細胞 C の空間分画方法を説明する。

まず、図 5 (A) に示すように、細胞 C を保持する基板 2 0 を微細構造刃 1 0 の下方に配置する。つぎに、図 5 (B) に示すように、押圧手段 3 0 で微細構造刃 1 0 を下降させ、微細構造刃 1 0 を細胞 C に押圧する。そうすると、刃構造部 1 2 により細胞 C を切断でき、細胞内部の位置情報を保持しつつ細胞 C を空間的に区画化できる。また、細胞 C がゲル体 2 3 中に固定されているので、作業中に細胞 C が移動することがなく、所望の位置で細胞 C を区画化できる。

20

【 0 0 1 9 】

微細構造刃 1 0 が細胞 C に刺さっている状態、あるいは微細構造刃 1 0 を引き上げて細胞 C と離間した状態で、顕微鏡 M 等の測定手段で細胞 C を測定する。なお、細胞 C の一部分の極小領域を回収したり、核や細胞質等の細胞小器官を採取したり、細胞核・細胞質移植に利用したりすることも可能である。

【 0 0 2 0 】

(第 2 実施形態)

図 6 に示すように、本発明の第 2 実施形態に係る細胞空間分画装置 2 は、微細構造刃 1 0 の基部 1 1 に表裏に通ずる孔 1 3 が形成された構成である。この孔 1 3 は刃構造部 1 2 の各区画 (刃で囲まれた領域) に形成されている。その余の構成は第 1 実施形態の細胞空間分画装置 1 と同様であるので、同一部材に同一符号を付して説明を省略する。

30

【 0 0 2 1 】

微細構造刃 1 0 の基部 1 1 に孔 1 3 が形成されているので、微細構造刃 1 0 を細胞 C に刺した状態でも、微細構造刃 1 0 の裏側 (基部 1 1 側) から孔 1 3 を通して区画化された細胞 C に薬液等を投与して処理を施すことができる。

【 0 0 2 2 】

例えば、孔 1 3 を通してトリプシンを投与することにより、細胞 C と基板 2 0 とを接着している細胞表面のタンパク質を破壊して、細胞 C を基板 2 0 から剥がすことができる (トリプシン処理)。トリプシン処理を施すことで、細胞 C が溶液中に浮かんだ状態になり、区画化された細胞 C の一部分を回収できる。

40

【 0 0 2 3 】

また、細胞 C を空間分画したそのままの状態でも処理を施し、細胞 C を測定することもできる。例えば、まず孔 1 3 を通して界面活性剤や消化酵素を導入して細胞膜や細胞内の不要な構造を破壊し、細胞 C 内部の計測したいターゲット分子を溶液中に拡散させる (抽出操作)。つぎに、ターゲット分子に特異的に結合する蛍光性や化学発光性等のマーカ分子を孔 1 3 を通して導入し、ターゲット分子をラベルして検出可能な状態にする (検出処理)。その後、センサ等でターゲット分子を検出する。

【 0 0 2 4 】

図 7 (A) に示すように、基部 1 1 に孔 1 3 が形成されているので、微細構造刃 1 0 の

50

表側（刃構造部12側）と裏側（基部11側）に圧力差を生じさせることもできる。微細構造刃10の表側を高圧、裏側を低圧とすれば、区画化された細胞Cを微細構造刃10に引き付け保持できる。圧力差を生じさせるには、微細構造刃10を流体中に入れ、微細構造刃10の一方の側から流体を流すか、吸引すればよい。

【0025】

細胞Cを微細構造刃10に保持したまま引き上げることができ、そのまま微細構造刃10を表裏反転させることもできる（図7（B）参照）。この状態で、微細構造刃10の表側から光ピンセット等のマニピュレータにより、区画化された細胞Cの一部を回収できる。

【0026】

（第3実施形態）

図8に示すように、本発明の第3実施形態に係る細胞空間分画装置3は、微細構造刃10を超音波振動させる超音波振動子40を備える構成である。超音波振動子40としては、圧電素子等種々の振動子を用いることができる。超音波振動子40により微細構造刃10を超音波振動させることができればよく、微細構造刃10に直接設けられてもよいし、押圧手段30を介して間接的に設けられてもよい。その余の構成は第1実施形態の細胞空間分画装置1と同様であるので、同一部材に同一符号を付して説明を省略する。

【0027】

このような構成であるので、細胞Cを空間分画するにあたり、微細構造刃10の超音波振動により細胞膜を破壊でき、切断抵抗が低くなる。そのため、細胞Cを潰すことなく区画化でき、細胞内部の正確な位置情報を保持できる。

【0028】

（第4実施形態）

図9に示すように、本発明の第4実施形態に係る細胞空間分画装置4は、微細構造刃10と基板20との間に電気パルスを流す電気パルス付与手段50を備える構成である。電気パルス付与手段50は、電源や電気パルスを生成する回路等から構成される。シリコンで形成された微細構造刃10は電気を通すことができる。また、基板20はITO（酸化インジウムスズ）等で形成することで電気を通すことができる。その余の構成は第1実施形態の細胞空間分画装置1と同様であるので、同一部材に同一符号を付して説明を省略する。

【0029】

このような構成であるので、細胞Cを空間分画するにあたり、電気パルスにより細胞膜を破壊でき、切断抵抗が低くなる。そのため、細胞Cを潰すことなく区画化でき、細胞内部の正確な位置情報を保持できる。

【実施例】

【0030】

つぎに、実施例を説明する。

（微細構造刃の作製）

シリコンエッチングにより微細構造刃を作製した。作製した微細構造刃のSEM画像を図11に示す。一枚のシリコン基板に、スリット状、格子状、ハニカム状の3種類の形状の微細構造刃を作製した。各微細構造刃の全体寸法は200 μ m四方である。また、刃の高さは10 μ m、刃の幅は292 \pm 22nmである。スリット状および格子状の微細構造刃の区画幅は5.04 \pm 0.07 μ mである。

【0031】

図11に示すように、シリコンエッチングにより、所望の区画形状、寸法を有する微細構造刃を作製できることが確認された。

【0032】

（スリット状微細構造刃）

作製したスリット状の微細構造刃を用いて細胞を空間分画した。対象の細胞として培養HeLa細胞を用い、コラーゲンゲルで基板に固定した。微細構造刃を細胞に押圧した後、微

10

20

30

40

50

細構造刃を引き上げて細胞と離間した状態で、基板上の細胞を顕微鏡を用いて観察した。

【0033】

顕微鏡により得られた細胞の画像を図12(A)に示す。なお、細胞は細胞染色用蛍光標識試薬を用いて細胞質を染色している。また、図12(A)における一点鎖線上の蛍光輝度を示すグラフを図12(B)に示す。図12(B)において、ギャップIの幅は $1075 \pm 350\text{nm}$ 、ギャップIIの幅は $347 \pm 31\text{nm}$ であった。ギャップIは、微細構造刃の刃の幅(292nm)よりも広い。これは、微細構造刃10を引き上げて観察しているため、区画化された細胞の一部が横にズレたためと考えられる。一方、ギャップIIは刃の幅と同程度である。以上より、スリット状の微細構造刃を用いて、細胞をスリット状に空間分画できることが確認された。

10

【0034】

(格子状微細構造刃)

作製した格子状の微細構造刃を用いて複数の細胞を一度に空間分画した。空間分画前の細胞の画像を図13(A)に示す。また、空間分画後の細胞の画像を図13(B)に示す。なお、細胞は細胞染色用蛍光標識試薬を用いて細胞質を染色している。

【0035】

図13より、細胞が格子状に切断されていることがわかる。これより、格子状の微細構造刃を用いて、細胞を格子状に空間分画できることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0036】

本発明に係る細胞空間分画装置は、物質局在解析、単一細胞計測等の細胞計測の前処理に利用できる。また、核分離、核移植、細胞質移植等のクローン技術に利用できる。さらに、細胞初期化誘導、細胞分化誘導、細胞機能改変等の再生医療に利用できる。

20

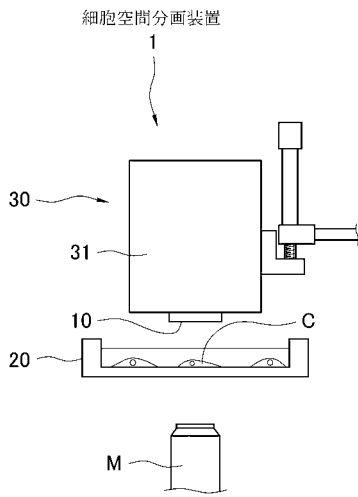
【符号の説明】

【0037】

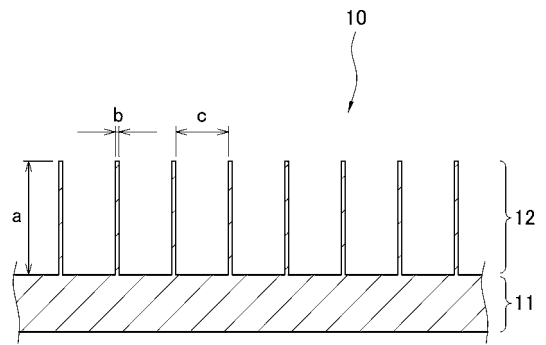
- 1 細胞空間分画装置
- 10 微細構造刃
- 11 基部
- 12 刃構造部
- 20 基板
- 30 押圧手段

30

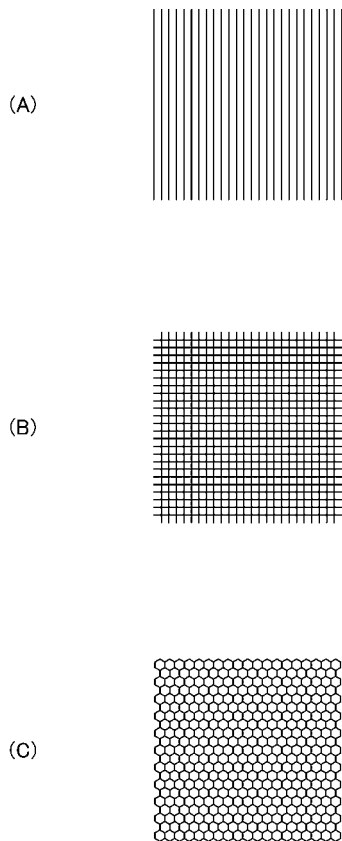
【 図 1 】



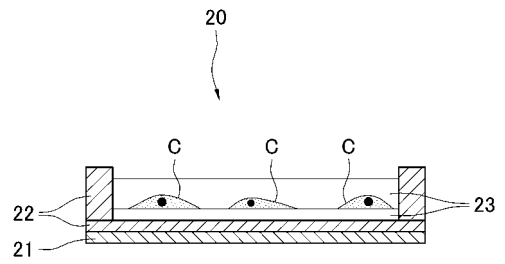
【 図 2 】



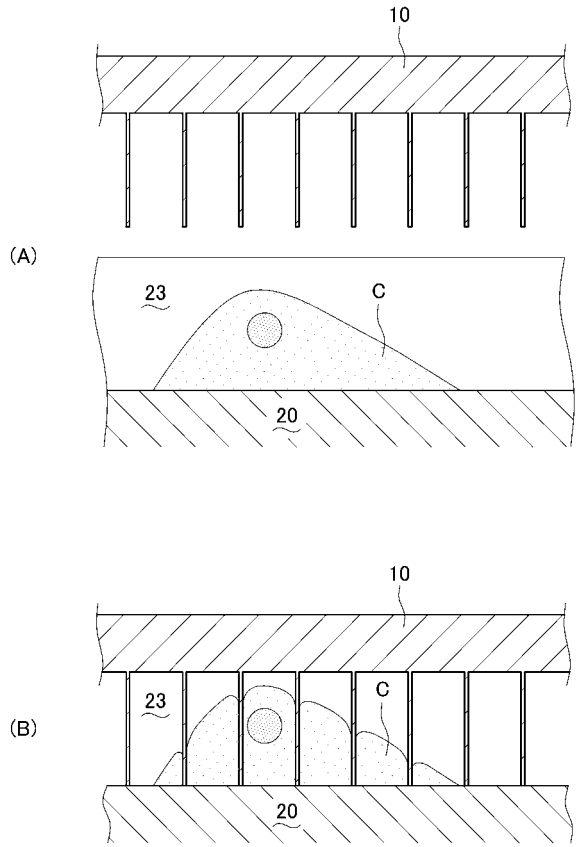
【 図 3 】



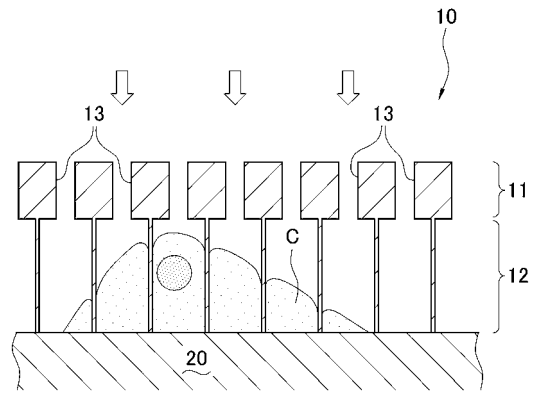
【 図 4 】



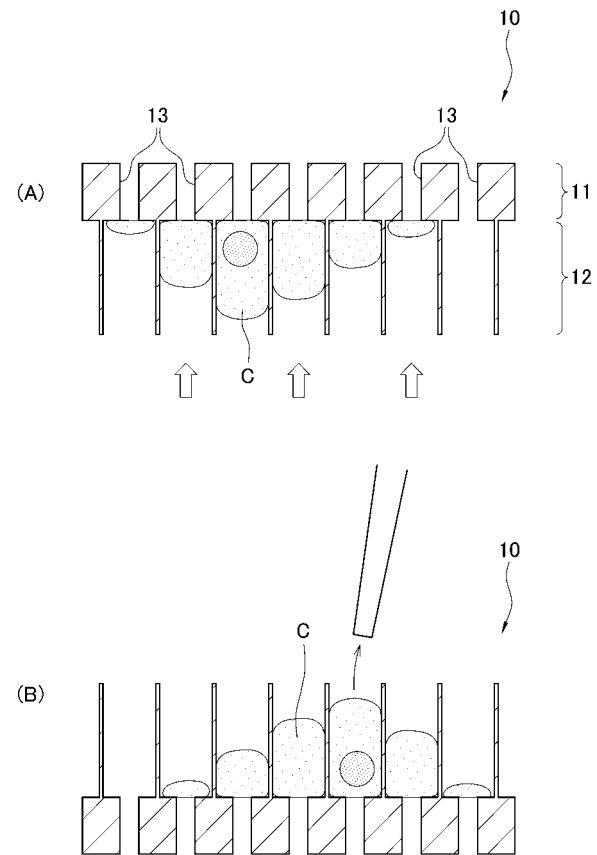
【図 5】



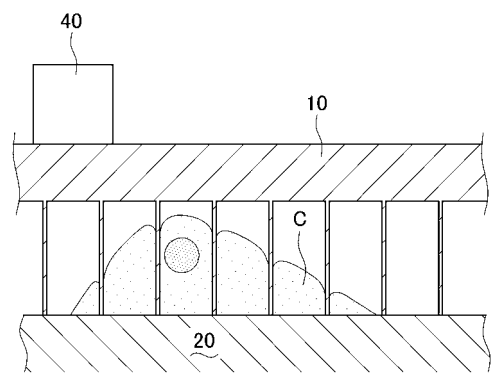
【図 6】



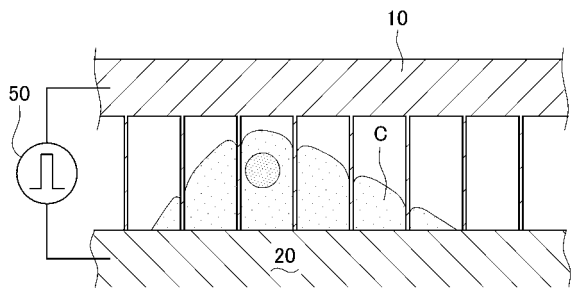
【図 7】



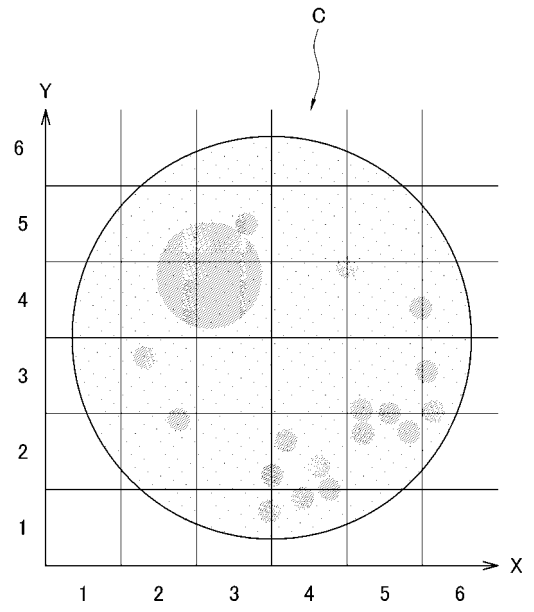
【図 8】



【 図 9 】

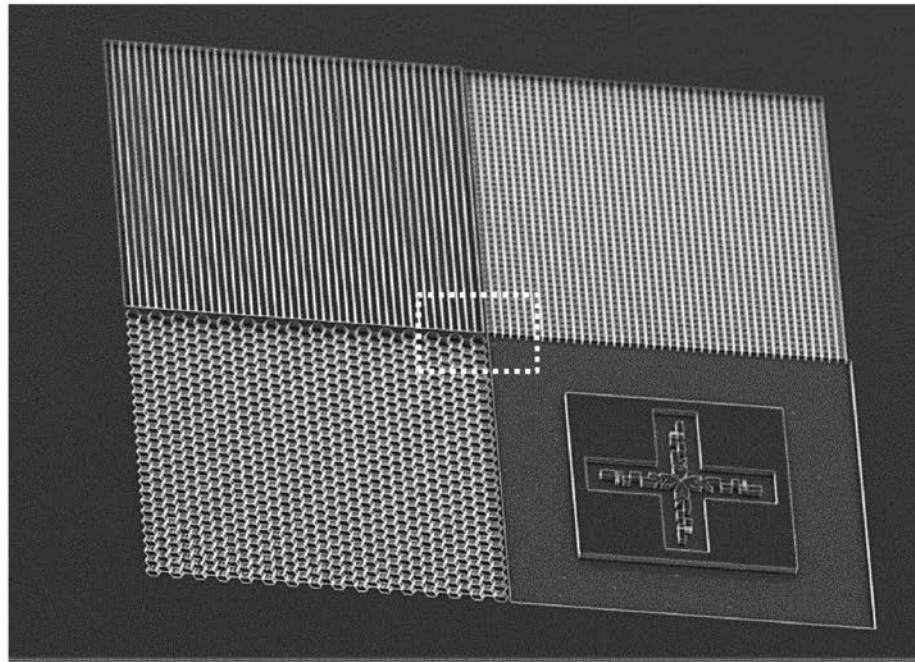


【 図 10 】



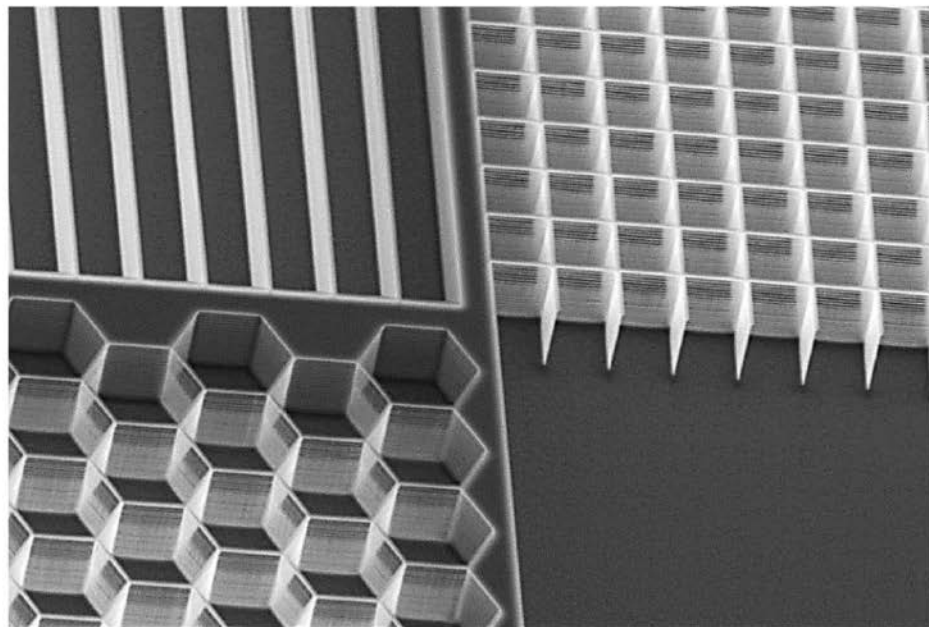
【 図 1 1 】

(A)



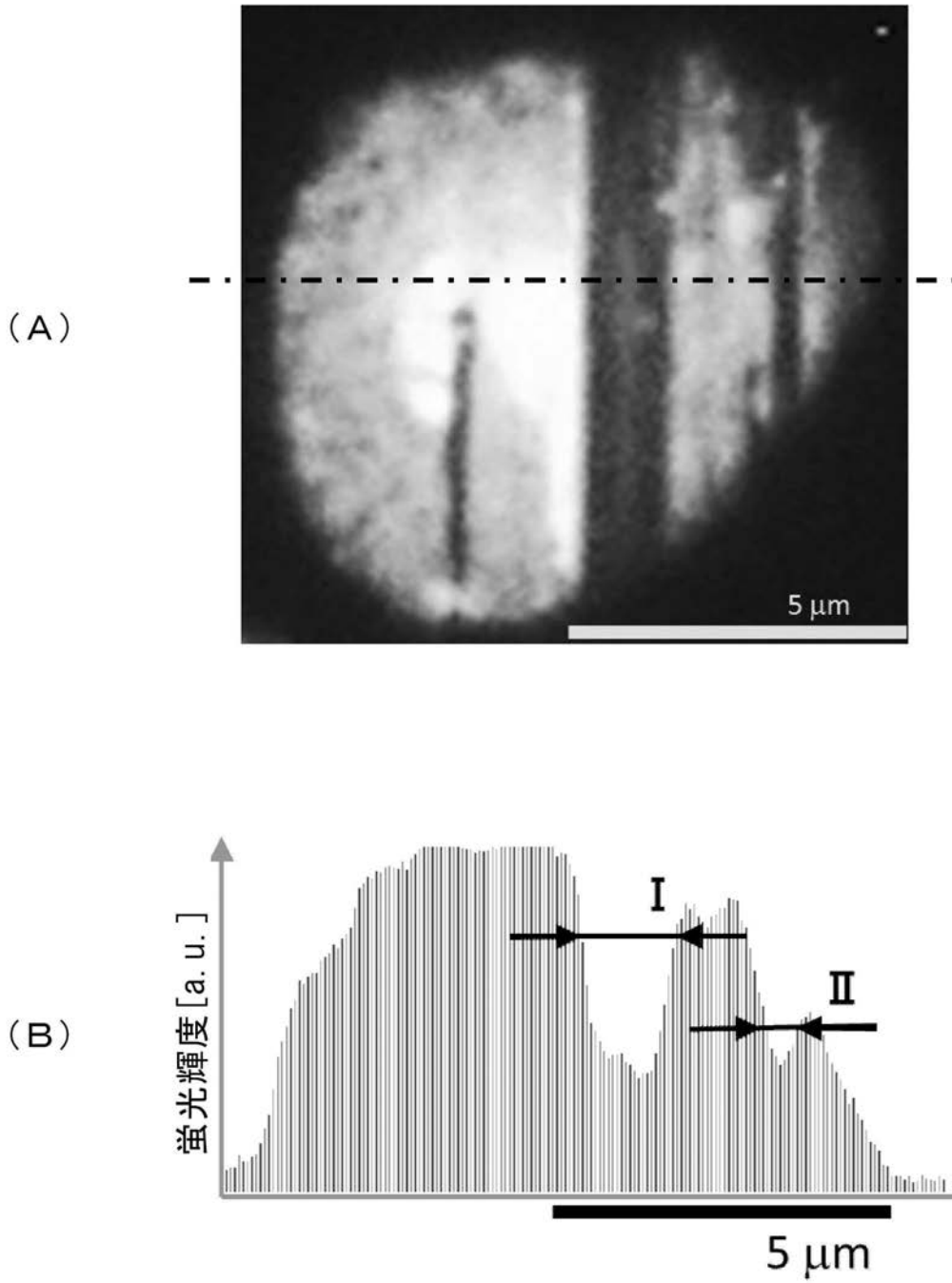
100 μ m

(B)



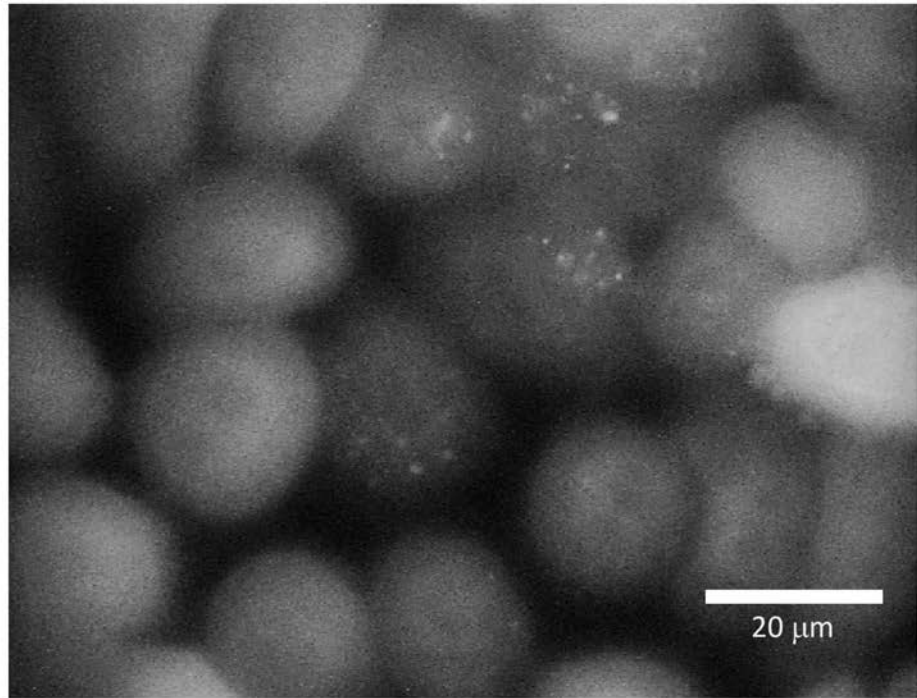
10 μ m

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

(A)



(B)

