

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6883517号
(P6883517)

(45) 発行日 令和3年6月9日(2021.6.9)

(24) 登録日 令和3年5月12日(2021.5.12)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 M 1/00 (2006.01)
C 12 N 13/00 (2006.01)C 12 M 1/00
C 12 N 13/00

A

請求項の数 10 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2017-535710 (P2017-535710)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月24日 (2015.12.24)
 (65) 公表番号 特表2018-500044 (P2018-500044A)
 (43) 公表日 平成30年1月11日 (2018.1.11)
 (86) 國際出願番号 PCT/KR2015/014292
 (87) 國際公開番号 WO2016/108526
 (87) 國際公開日 平成28年7月7日 (2016.7.7)
 審査請求日 平成30年12月19日 (2018.12.19)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0191302
 (32) 優先日 平成26年12月28日 (2014.12.28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2015-0178130
 (32) 優先日 平成27年12月14日 (2015.12.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(73) 特許権者 518086479
 株式会社フェムトバイオメド
 FEMTOB1OMED INC.
 大韓民國 京畿道 城南市 盆唐区 パン
 ギヨロ228ボンギル17 1ドン301
 ホ (三坪洞、パンギヨ7ベンチャーバレー
 2)
 (S a m p y e o n g - d o n g, P a n
 g y o S e v e n V e n t u r e V
 a l l e y 2 - d a n j i) 1 - 3 0 1
 , 1 7, P a n g y o - r o 2 2 8 b
 e o n - g i l l, B u n d a n g - g u,
 S e o n g n a m - s i, G y e o n g g
 i - d o 1 3 4 8 7, K O R E A

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞に物質を注入する装置および製造方法 (Device for Putting Material into Cell)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1つの素材で一体化された固体内部に形成された細胞が通過する第1通路；上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端の間の中間部分で前記第1通路に接続される前記固体内部に形成された第2通路；及び、前記第1通路と前記第2通路に圧力差又は電位差を印加する装置を含み、

前記第1通路と前記第2通路は前記1つの素材で一体化された固体内部にフェムト秒レーザーを照射して形成され、

前記第1通路の中間部分の内径が両末端の内径よりも小さく、

前記固体が5%以上の光透過度を有する固体であることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

10

【請求項 2】

請求項1に記載の装置において、前記第2通路が複数あることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【請求項 3】

請求項1に記載の装置において、前記第1通路の両末端の前記内径が10μm乃至200μmであることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【請求項 4】

請求項3に記載の装置において、前記第1通路の中間部分の前記内径が3μm乃至150μmであることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

20

【請求項 5】

請求項 1 に記載の装置において、前記第 2 通路の内径が 10 nm 乃至 1,000 nm であることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の装置において、前記細胞が、前記第 1 通路の両末端の間の圧力差又は電位差によって移動することを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の装置において、前記第 1 通路と前記第 2 通路との間の電位差が 0.5 V から 100 V であることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の装置において、前記第 1 通路と前記第 2 通路との間の電位差が 0.8 V から 50 V であることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の装置において、前記第 1 通路と前記第 2 通路との間の電位差が 1.0 V から 10 V であることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の装置において、前記固体が、ガラス、熱可塑性樹脂及び熱硬化性樹脂からなる群から選択される固体であることを特徴とする、細胞に物質を注入する装置。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、細胞に物質を注入する装置及びその製造方法に関するものである。より詳細には、本発明は、固体内部に形成された細胞が通過する第1通路；上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体内部に形成された第2の通路；前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差や電位差を印加する装置を含む、細胞内で物質を注入する装置とその製造方法に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

バイオ分野、電気電子分野やナノ加工分野の技術の目覚しい発展により、これらの分野の融合を通じた新たなバイオ医療技術の研究が最近盛んに行われている。

細胞操作の分野では、*in vitro*での患者の細胞を操作した後、患者の体内に注入して治療目的のために使用しようとすると、人間の細胞を操作して、次世代の新薬開発とターゲットの検証に使用する研究が多数行われている。

【0003】

最近の細胞操作技術は、有用な細胞治療剤の開発に焦点を当てているが、特に、山中因子 (Yamanaka factor) を用いた逆分化誘導多能性幹細胞 (iPS) を活用しようとする努力が大きく注目されている。

【0004】

山中因子は、4つの遺伝子 (Oct3 / 4, Sox2, cMyc および Klf4) を指す。山中因子をウイルス由来ベクターを用いて、細胞の染色体に挿入すると、分化がすでに終わった体細胞は、さまざまな種類の体細胞への分化が可能な多能性幹細胞に変わる。したがって誘導多能性幹細胞は、胚性幹細胞の倫理と生産性の問題および、成体幹細胞の分化限界をすべて克服することができる革新的な技術で評価される。

【0005】

しかし、ウイルス由来ベクターを細胞に使用することは安全性の懸念を発生させる。また、ウイルス由来のベクターを含有している誘導多能性幹細胞から分化された細胞や組織を人体に移植する場合、腫瘍を誘発させる危険もある。

【0006】

これらの問題点を解決し、革新的な誘導多能性幹細胞を利用して、有用な細胞治療剤を開発するには、ウイルス由来ベクターのような伝達手段を使用していないままDNAやRNA、

10

20

30

40

50

ポリペプチド、ナノ粒子などのような物質を、単一の細胞に直接注入することができる新しい細胞変換操作技術が必要である。

【0007】

ウイルス由来のベクターのような伝達手段を使用していない細胞の変換操作のための従来の方法は、細胞に電界を加えたり、細胞を化学的に処理したり、機械的せん断力を加えて細胞膜に損傷を加え、細胞外液に含まれている遺伝子などの物質が細胞内に流入するようにして、細胞の自己治癒力に依存して、破損された細胞壁が復元され、細胞が死なずに生存することを期待する方法が主流となっている。

【0008】

粒子の衝突方法やマイクロ注入方法、電気穿孔方法のような様々な細胞に変換する方法が開発されている。マイクロ注入方法を除いて、これらの方法は、多数の遺伝子やポリペプチドを多量に基づく統計確率的な (bulk stochastic) プロセスによって任意に細胞に流入させる方法に基づいている。

【0009】

細胞を変換させるために、現在最も広く使用されているこのような従来のバルク電気穿孔 (bulk electroporation) の方法では、注入量の精密な制御が不可能であるという短所がある。

【0010】

したがって、個々の細胞にマイクロ流体力学に基づいて、電気穿孔に物質を注入する (microfluidics-based electroporation) の方法が、新しい技術として登場している。これらのマイクロ流体電気穿孔法は、バルク電気穿孔法に比べて穿孔するための電圧を下げることができるという点、細胞の変換効率が高い点、細胞生存率を大幅に引き上げることができるという点などを含む、いくつかの重要な利点がある。

【0011】

2011年に、ナノチャネルに隣接して位置する細胞膜の狭い領域を、非常に大きな局所的電界に露出させるナノチャネル電気穿孔技術が一般に公開されたことがある (L. James Lee et al. "Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cell", Nature Nanotechnology vol. 6 November 2011, www.nature.com / naturenanotechnology published online 16, October, 2011,)。

【0012】

前記ナノチャネル電気穿孔装置は、ナノチャネルを介して接続される2つのマイクロチャネルを含んでいる。変換させる細胞は、ナノチャネルにかかっているマイクロチャネルに満たされて、別のマイクロチャネルは、注入される物質が満ちている。マイクロチャネル - ナノチャネル - マイクロチャネルに関連する構造は、それぞれの細胞を正確な位置に置かれるようにする。数ミリ秒間持続される1つ以上の電圧パルスは、2つのマイクロチャネル間に印加されて、細胞の変換を引き起こす。注入量の調節は、持続時間とパルスの数を調整することにより、行われる。

【0013】

ところで、上記の先行技術論文に記載されたナノチャネルの電気穿孔注入装置は、チップの基板上に刻印されて形成された樹脂で製作されたマイクロチャネルとナノチャネルを覆ってくれるポリジメチルシロキサンで製作されたカバープレートを含んでいる。

【0014】

上記ネイチャーナノテクノロジーに掲載された先行技術論文に記載されたナノチャネルの電気穿孔装置は、刻印されて形成される高分子樹脂で製作されたマイクロチャネルとナノチャネル層とポリジメチルシロキサンカバープレートの間に隙間の発生を避けることができない。このような理由は、機械的物性が互いに異なる材料で作られたカバープレートとチャネル形成層間のシールは絶対に完全できないからである。

【0015】

また、ポリジメチルシロキサンで製作されたカバープレートと高分子樹脂で製作されたマイクロチャネルとナノチャネルの機械的寸法安定性が非常に低いため、上記のカバー

10

20

30

40

50

プレートとチャンネル層間の密封は完全とすることはできない。したがって、上記カバーブレートとチャンネル層間に隙間を簡単に作成することができる。このように発生する隙間は溶液の浸透を可能にして、ナノチャンネル電気穿孔チップを汚染させる一方のチャネルとの間の細胞の移動と細胞との物質の注入のために加わる圧力チャイナ電界に様々な誤差を発生させることができる。

【0016】

したがって、この技術分野では、以上のような先行技術の問題点を克服するために、個別の細胞に様々な物質を注入するに当たり、誤差なく多種の物質を各細胞ごとに一時に注入する新しい技術の開発が長い間期待されてきた。

【0017】

本発明者は、フェムト秒レーザーを使用して、ガラスのような一体化された固体内部に多数のマイクロチャネルと、これ接続されている多数のナノチャンネルを形成してこれらに電位差を与えることができる電極を設置することにより、使用される材料の寸法安定性問題点や接合部位のシールの不完全ことにより発生する隙間に起因する従来の技術のいくつかの問題点を克服することができていることに着目して、本発明を完成するに至った。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

したがって、本発明の基本的な狙いは、ガラスのような硬い固体の内部に形成される細胞が通過する第1通路；上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体内部に形成される第2の通路；前記第1の通路と前記第2の通路との間に圧力差や電位差を印加するための装置を含む、細胞に物質を注入する装置を提供するものである。

【0019】

本発明のもう一つの目的は、フェムト秒レーザーを使用して、ガラスのような硬い固体の内部では、(i) 細胞が通過する第1通路を形成する段階；(ii) 上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続される第2の通路を前記固体内部に形成する段階；と(iii) 前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差や電位差を印加する装置を設置するステップを含む、細胞に物質を注入する装置の製造方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0020】

以上、本発明の基本的な狙いは、フェムト秒レーザーを使用して、ガラスのように硬い固体の内部に形成させた、細胞が通過する第1通路；上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続され、上記固体の内部に形成された第2の通路；前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差や電位差を印加する装置を含む、細胞に物質を注入する装置を提供することにより達成することができる。

【0021】

レーザー (LASER) はLight Amplification Stimulated Emission of Radiationの略で大きく連続ビームレーザー (continuous beam laser) とパルスビームレーザー (pulsed beam laser) に分けられる。二重フェムト秒レーザーは、パルスビームレーザーの一種で、パルスの時間幅、パルスエネルギー、パルス波長、パルス繰り返し速度などが主なパラメータである。

【0022】

これらのパラメータのうち、パルスの時間幅を基準に、パルスビームレーザーを再区分するが、例えば、ナノ秒レーザー、ピコ秒レーザー、フェムト秒レーザーに細分される。つまり、フェムト秒レーザーパルスの時間幅が1~999フェムト秒を持つパルスビームレーザーをいう。ここでフェムト (femto-) は10-15を表す単位で、ナノ (nano-) の百万分の一に相当する。

【0023】

10

20

30

40

50

フェムト秒レーザーが注目され始めたのは、自然界に現在まで知られているすべての現象がフェムト秒よりも長い時間領域にあるからで、時間的にすべての自然現象を停止形で分析することができるからである。最初のフェムト秒レーザーも化学反応で最外殻の電子が共有されたり分離されている現象を時間的に可視化するために誕生した。

【0024】

特に、フェムト秒より長い波長のレーザービームとは異なり、非常に短い時間の間にビームが形成されるので、以前には、簡単に見ることができなかつた多光子現象 (multi-photon phenomena) を起こすようになり、長波長の低エネルギーービームでも短い波長の高エネルギーービームのような現象を起こす。特に、焦点の内部の非常に局所的な領域でのみ多光子現象を起こす場合と解像度の加工と可視化を実現することができる。また、物質を切断する際に熱が発生していない特徴があり、産業的応用価値が非常に高い。

10

【0025】

フェムト秒レーザーを利用することができる分野の中で、レーザー加工分野が代表的である。既存のレーザー加工は、熱による溶融または酸化を引き起こす方法であるため、熱変形や劣化を伴う。これに対し、フェムト秒レーザー加工は、熱を全く用いずに、非常に瞬間的に加わる強いビームの電磁力により対象物質のイオン化を誘導（多光子イオン化）して物質の破壊が起こる。レーザービームの時間幅が、エネルギーが熱に変化する時間（ナノ秒 - ピコ秒）より短いので、事実上、熱が発生するずっと前に、すべての加工が終わる。このため、劣化を引き起こすレベルの熱の発生がない周辺損傷することなく必要な領域のみ加工することができる。

20

【0026】

また、フェムト秒レーザーは透過度が非常に高い透明母材にも優れた加工特性があり、ガラスなどの母材を用いたバイオや医療機器の分野での利用率が高い。

特に、フェムト秒レーザービームを利用する場合には、光の回折限界を超える加工分解能の実現が可能であることが、2004年に米国ミシガン大学で明らかにしたが、これはナノ工程の分野で重要な発見である。Hard X-rayのような短波長の高エネルギーーレーザービームを小型の設備で作ることが事実上非常に困難な状況でフェムト秒レーザーを用いてこれを実現したのは、ナノテクノロジーの分野に様々な貢献をすることができる。

【0027】

細胞に物質を注入するための本発明の装置を製作するために、細胞を含有する流体が移動する多数のマイクロチャネルとナノチャネルをフェムト秒レーザーを使用して、ガラス固体内部に形成させることができる。

30

【0028】

2000年以降、最近急速に発展したマイクロ流体力学の分野では、バイオ及び医療用流体チップのことを核心内容に扱う分野である。

これらの流体チップには、複雑なマイクロ流体通路がクモの巣のように絡み合っており、様々な表面改質が加えられて、抗原検出物質が適用され、内部電極に電圧を印加して電気化学的現象を誘導し、圧力勾配、電気浸透圧現象に流体流れが駆動される非常に複雑な機構である。

【0029】

40

流体チップが満たさなければなら様々な条件は、特にガラス素材を使用したとき、最も理想的に満足させることができ、これは長い時間、医療分野での主要な材料として使用されてきて、安全性が検証されたからである。具体的には、ガラスは、バイオ適合性、耐薬品性、電気絶縁性、寸法安定性、構造剛性、接合強度、親水性、透明性などの利点は、非常に多様である。

【0030】

ただし、従来の流体チップの製造が、半導体工程であるエッチング工程を通じてほとんど行われるため等方性エッチングによる加工の解像度の限界、縦横比の制限、加工断面を多様にすることのできない制限、エッチング後の接合工程の難しさなど研究開発分野などの小規模多品種開発など困難が大きい。

50

【 0 0 3 1 】

これらの困難のために、液状で型枠に注ぎ固めするPDMS (polydimethylsiloxane) シリコーンゴムを用いた流体チップの製造が広く行われていた。PDMS材料を使用する場合は、チップ製造が容易な利点があるが、医療用材料として適用するにバイオ適合性がガラス素材よりも劣り、耐薬品性が低く、寸法安定性、構造剛性、接合強度が非常に脆弱である。

【 0 0 3 2 】

特に、流体チップに適用する場合には、ガラスの床面との接合強度が低く、内部流体が新しい出やすく、高い電界を加える場合、接合面に乗って電流がリークしやすく、電気化学的な適用をするには制限が大きく続く。また、疎水性表面特性により、バイオ適合性を高めるために、表面改質が必要だが、プラズマ酸化を介して一時的な親水表面への改質をすることは可能である。 10

【 0 0 3 3 】

このような理由から、医療目的の流体チップは、特に細胞を操作する場合のような高バイオ適合性が要求される場合は、ガラス素材の適用が大きく要求される。

また、細胞操作のために必要な圧力と電圧の様々な適用を安全に実行するには、構造の剛性、接合面の接合強度、寸法安定性などの高い素材が要求され、ガラス素材と同様の特性を有する透明性固体を素材として適用する必要性が大きい。

【 0 0 3 4 】

特に、素材の価格と特性の両方を考慮すると、実際に上のガラス素材が最も理想的な素材であるため、ガラス素材の加工と接合の難しさと限界を克服するための新しい加工方法の開発が非常に重要である。 20

【 0 0 3 5 】

既存のガラスを用いた流体チップの製造は、一方のガラス板の素材にマイクロ流体チャネルをエッティングにより加工し、また、他のガラス板（主にエッティングがない評判の構造）と接合を介して行われる。

【 0 0 3 6 】

これらのエッティングと接合工程による製造の限界は、1) 等方性エッティングによる寸法、アスペクト比、断面形状の制約と2) ガラス - ガラス間の接合の難しさと限界が最大の問題である。特に、1ミクロンレベルでナノメートルレベルの超微細形状の製造が、上記問題点に起因し事実上不可能だが、これを解決するためには、接合工程が必要ない加工工程が最も必要である。 30

【 0 0 3 7 】

フェムト秒レーザー三次元ナノ加工工程は、2004年に米国ミシガン大学で初めてフェムト秒レーザーパルスを用いたナノ加工現象を発見し、この後、三次元ナノ加工工程へと発展した。本方法を利用すると、ナノスケールの三次元構造をガラス内部に直接加工することができるようになり、接合工程がなく、流体チップを製造することができるようになる。

【 0 0 3 8 】

加工の便宜上、流体チップの大部分を占めるマイクロスケールの2次元流体構造は、従来のエッティング工程と接合工程で製造し、ナノ構造だけフェムト秒レーザーを用いて三次元加工する方法がより効率的である。 40

【 0 0 3 9 】

ただし、ナノスケールの完全な三次元構造は、フェムト秒レーザー三次元ナノ工程でのみ可能であり、既存のエッティングと接合工程では、実際に上製造が不可能である。

本発明の細胞に物質を注入する装置に形成された前記第1の通路は、両末端の中間部分の方向に内径が徐々に減少する形状を有することができる。また、前記第1通路の両末端の内径は、 $10 \mu\text{m} \sim 200 \mu\text{m}$ であり、前記第1の通路の中間狭くなっている部分の内径は、 $3 \mu\text{m}$ 乃至 $150 \mu\text{m}$ であることができる。

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

本発明の細胞内での物質の注入装置に形成された前記第2の通路は、一つ以上することができます。また、前記第2の通路の内径は、10nmないし1,000nmであることができる。

本発明の細胞内での物質の注入装置に適用することができる上記細胞は、原核細胞または真核細胞であることができる。より詳細には、上記原核細胞は、細菌 (bacteria) または古細菌 (archaea) であることができ、上記真核細胞は、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞であることができる。

【0041】

本発明の一つの実施例では、上記動物細胞が体細胞、生殖細胞または幹細胞であることができる。具体的には、上記体細胞は上皮細胞、筋肉細胞、神経細胞、脂肪細胞、骨細胞、赤血球、白血球、リンパ球または粘膜細胞であることができる。また、前記生殖細胞は、卵子または精子であることができる。また、上記幹細胞は、成体幹細胞または胚性幹細胞であることができる。

【0042】

本発明の一つの実施例では、上記成体幹細胞は、造血幹細胞、中葉幹細胞、神経幹細胞、纖維芽細胞、肝臓芽細胞、網膜芽細胞、脂肪由来幹細胞、骨髄由来の幹細胞、臍帯血由来の幹細胞、臍帯由来幹細胞、胎盤由来幹細胞、正由来幹細胞、末梢血管由来幹細胞または羊膜由来幹細胞であることができる。

【0043】

本発明の細胞内での物質の注入装置を介して細胞内に注入することができる物質は、タンパク質、ペプチド糖蛋白質、リポタンパク質、DNA、RNA、アンチセンスRNA、siRNA、又クレオチド、リボザイム、プラスミド、染色体、ウイルス、薬物、有機化合物、無機化合物、ヒアルロン酸、コラーゲン、細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソム、リボソームまたはナノ粒子、またはこれらの混合物であることができる。

【0044】

細胞に物質を注入する本発明の装置では、細胞は、前記第1通路の両末端との間の圧力差や電位差によって移動することができる。例えば、前記第1通路の両末端の間に圧力差を発生させるためのポンプを使用することができる。

【0045】

また、前記第1通路の両末端の間に電位差を発生させるために直流電源または交流電源を使用することができて、パルス形態の電圧を適用することもできる。特に、前記第1通路の両末端の間の電位差は、好ましくは10Vから1,000V、より好ましくは15Vから500V、最も好ましくは20Vから200Vであることができる。

【0046】

また、前記第1の通路と前記第2通路に加わる電位差は、好ましくは0.5Vから100V、より好ましくは0.8Vから50V、最も好ましくは1.0Vから10Vであることができる。

本発明のもう一つの狙いは、フェムト秒レーザーを使用して、ガラスのような固体の内部に、(i) 細胞が通過する第1通路を形成する段階；(ii) 上記細胞に注入する物質が通過し、前記第1通路の両末端との間の任意の位置で前記第1通路に接続される第2の通路を前記固体内部に形成する段階；と(iii) 前記第1の通路と前記第2の通路に圧力差や電位差を印加する装置を設置するステップを含む、細胞に物質を注入する装置の製造方法を提供することにより、達成することができる。

【0047】

前記第1の通路は、両末端の中間部分の方向に内径が徐々に減少する形状を有することができます。また、前記第1通路の両末端の内径は、10 μmないし200 μmであり、前記第1通路の中間部分の内径は、3 μm乃至150 μmであることができる。

【0048】

また、前記第2の通路は、一つ以上とすることができます。また、前記第2の通路の内径は、10 nmから1000 nmであることができる。

また、前記第1の通路と前記第2の通路との間の電位差は、好ましくは0.5Vから100V、より好ましくは0.8Vから50V、最も好ましくは1.0Vから10Vであることができる。

10

20

30

40

50

【0049】

また、本発明の細胞内での物質の注入装置の製造方法に使用される前記フェムト秒レーザーは、パルス幅が10 - 15秒～10 - 12秒超人パルスレーザーであることができる。

本発明の装置を使用すると、顕微鏡を使って細胞を動きを確認しながら、圧力差または電位差を調整して、前記細胞の前記第1の通路への流入を効果的に制御することができる。

【0050】

また、前記第1の通路と前記第2の通路との間に加わる電位差を調整して前記細胞の内部に注入される物質の量を調節することができる。

本発明の一つの実施例によると、細胞に注入される物質の量は、(i)注入する物質に蛍光物質を標識した後、蛍光強度を測定したり、(ii)物質を注入するときに発生する電流の量を測定して計算することができる。

【発明の効果】

【0051】

本発明の物質注入装置を使用して、タンパク質、遺伝子、薬物、ナノ粒子など、様々な物質を細胞に注入することができる。特に、本発明は、単一の細胞に注入される物質の量を電位差を利用して調節することができるので、注入収率が非常に高く、細胞間の注入量が違い出ないように制御することができる。したがって、多くの様々な細胞操作と誘導多能性幹細胞を含む細胞治療剤の研究開発に、本発明の装置が広く使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】図1は、本発明によって、1つの物質通路（第2通路）を有する細胞内での物質の注入装置（図1a）と、6つの第2の通路を有する細胞内での物質の注入装置（図1b）の概略図である。

【図2】図2は、本発明による細胞内への物質注入装置の拡大概略図である。

【図3】図3は図2の細胞内への物質の注入装置で第1の通路と第2通路の3次元構造（図3a）と、第1の通路と第2通路が接続されている部分の拡大図（図3b）である。

【図4】図4は、本発明の装置を使用して、細胞に物質を注入する過程を説明する図である。

【図5】図5は、細胞に物質を注入する本発明の装置の20倍拡大顕微鏡写真である。

【図6】図6は、ガラス内部に形成させた本発明の物質注入装置の外観写真である。

【図7】図7は、実施例2で本発明の装置を使用して、人間肺胞の基底上皮細胞（ATCC CCL-185）に赤色蛍光タンパク質を注入する過程を撮影した蛍光顕微鏡（TE2000-U、Nikon）の写真である。

【図8】図8は、実施例3で、本発明の装置を使用して臍帯血由来の幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入する過程の蛍光顕微鏡写真である。

【図9】図9は、実施例4で、本発明の装置を使用して、胎盤由来幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入する過程の蛍光顕微鏡写真である。

【図10】図10は、実施例5で、本発明の装置を使用して、人間肺胞の基底上皮細胞（ATCC CCL-185）にプラスミドDNA（cy3）を注入して12時間培養した後に撮影した写真である。

【図11】図11は、実施例1でフェムト秒レーザーを使用してガラス（23）の内部に3次元構造のマイクロチャネルとナノチャンネルを形成させる装置の分解斜視図である。

【発明を実施するための形態】

【0053】

以下、次の図面及び実施例を挙げて本発明の装置をより具体的に説明する。ただし、以下の図面及び実施例の説明は、本発明の具体的な実施形態を特定し、説明しようと意図するものであるだけであり、本発明の権利範囲をこれらに記載された内容に限定したり、制限解釈しようと意図するものではない。

【0054】

10

20

30

40

50

実施例1

フェムト秒レーザーを使用して、ガラスの内部にマイクロチャネルとナノチャネルを形成させるプロセス。

【0055】

図11でフェムト秒レーザー(21)(Pharos、4W、190fs、frequency doubled 510nm、DPSS chirped pulse amplification laser system)のレーザーパルスを対物レンズ(22)(from 40× to 100×、NA from 0.5 - 1.3、Olympus & Zeizz)を介して単一のガラス素材(23)(borosilicate glass、Corning)の外側表面から内部まで焦点が形成されるようにした。ガラス素材は、3軸ナノ線形送り機構(100×100×100 μm3、±1nm、Mad City Labs、Inc.、Madison、WI)に設置して、レーザーの焦点に対して三次元的に動くようにした。

10

【0056】

表面に形成されたレーザーの焦点がガラス素材の内部に入ると、フォーカスが通るパスをこのようにガラス素材が削除され、三次元構造が形成されるようした。三次元構造物は、数値コードを生成して3軸ナノ線形送り機構を制御するようにし、CCDカメラ(24)を設置して監視した。構造物を加工する最小サイズは理論上10nmまで可能であり、本実施例では、約200nmの大きさに加工した。光学操作を介して処理されるチャンネルの内径は、これよりも大きくなることがあり、より小さくなることもあった。透明材料であるガラス素材の内部に三次元構造を形成したので、すべての三次元形状を制限せずに実装することができた。

20

【0057】

実施例2

本発明の装置を使用して、人間肺胞の基底上皮細胞に赤色蛍光タンパク質を注入する過程

赤色蛍光タンパク質(dsRed fluorescence protein、MBS5303720)を1mg / mlの濃度に希釈し(溶媒:PBS、Hyclone、SH30028.02、pH 7.4)して懸濁液を準備した。A549(ATCC CCL-185、human alveolar basal epithelial cells)細胞を10%FBS DMEM(high glucose)を使用してincubatorで継代培養(humidified 5%CO2、37)した。

【0058】

T-flaskで培養された細胞をTrypLE(gibco)を利用して分離した。1 mM EDTA in D-PBS(gibco) solutionに交換した。Debris除去のために、40 μm cell strainer(BD)を用いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37 incubatorで15分間染色した。1mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計(hemocytometer)を利用して、2 x 106 cells / mlの濃度でA549細胞懸濁液を準備した。

30

【0059】

A549細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質(RFP)の懸濁液を、それぞれ1ml注射器に入れ、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。

【0060】

細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。

40

【0061】

細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込み後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。

【0062】

この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置に電圧をかけてもらい、物質注入通路に沿って1.76Vが形成されるようにして、3秒間の電圧をかけてくれた。オシロスコープ(VDS3102、Owon)を利用して電圧を測定した。蛍光顕微鏡(TE2000-U

50

、Nikon)を介して細胞の位置を把握し、赤色蛍光タンパク質注入過程を撮影して、図7に示した。

【0063】

実施例3

本発明の装置を使用して、人間臍帯血由来の中間葉幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入する過程

赤色蛍光タンパク質 (dsRed fluorescence protein、MBS5303720) を1mg / mlの濃度に希釈し (溶媒: PBS、Hyclone、SH30028.02、pH 7.4) して懸濁液を準備した。人間臍帯血由来の中間葉幹細胞は、C H A 病院で分譲を受け構築した細胞株を使用した。培養培地は、MEM-alpha (Gibco)、10%FBS (Hyclone)、25 ng / ml FGF-4 (Peprotech)、1 ug / ml Heparin (Sigma) を使用し、humidified 5%CO₂、37 °C incubatorで継代培養した。

【0064】

T-flaskで培養された細胞をTrypLE (gibco) を利用して分離した。1mM EDTA in D-PBS (gibco) solutionに交換した。Debris除去のために、40 μmcell strainer (BD) を用いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37 °C incubatorで15分間染色した。1mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計 (hemocytometer) を利用して、2 x 10⁶ cells / mlの濃度で臍帯血由来の幹細胞懸濁液を準備した。

【0065】

臍帯血由来の幹細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質懸濁液をそれぞれ1ml注射器に入れ、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。

【0066】

細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。

【0067】

細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込み後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。

【0068】

この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置に電圧をかけてもらい、物質注入通路に沿って電位差が1.45Vが形成されるようにして、3秒間の電圧をかけてくれた。オシロスコープ (VDS3102、Owon) を利用して電圧を測定した。蛍光顕微鏡 (TE2000-U、Nikon)を介して細胞の位置を把握し、赤色蛍光タンパク質注入過程を撮影して図8に示した。

【0069】

実施例4

本発明の装置を使用して、人間の胎盤由来中間葉幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入する過程

赤色蛍光タンパク質 (dsRed fluorescence protein、MBS5303720) を1mg / mlの濃度に希釈し (溶媒: PBS、Hyclone、SH30028.02、pH 7.4) して懸濁液を準備した。人間の胎盤由来中間葉幹細胞は、C H A 病院から分譲を受け構築された細胞株を使用した。培養培地は、MEM-alpha (Gibco)、10%FBS (Hyclone)、25 ng / ml FGF-4 (Peprotech)、1 ug / ml Heparin (Sigma) を使用し、humidified 5%CO₂、37 °C incubatorで継代培養した。T-flaskで培養された細胞をTrypLE (gibco) を利用して分離した。1mM EDTA in D-PBS (gibco) solutionに交換した。Debris除去のために、40 μmcell strainer (BD) を用いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37 °C incubatorで15分間染色した。1 mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計 (hemocytometer) を利用して、2 x 10⁶ cells / mlの濃度でヒト胎盤由来中間葉幹細胞懸濁液を準備した。

【0070】

10

20

30

40

50

ヒト胎盤由来幹細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質懸濁液をそれぞれ1ml注射器に入れ、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。

【0071】

細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。

【0072】

細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込み後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。

10

【0073】

この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置に電圧をかけてもらい、物質注入通路に沿って0.87Vが形成されるようにして、5秒間の電圧をかけてくれた。オシロスコープ (VDS3102、Owon) を利用して電圧を測定した。蛍光顕微鏡 (TE2000-U、Nikon) を介して細胞の位置を把握し、赤色蛍光タンパク質注入過程を撮影して図9に示した。

【0074】

実施例5

本発明の装置を使用して、人間肺胞の基底上皮細胞にプラスミドDNA (cy3) を注入する過程

20

プラスミドDNA (MIR7904、Mirus) が $1\mu\text{g}/2\mu\text{l}$ 濃度で含有された溶液を準備した。人間肺胞の基底上皮細胞 (A549、ATCC CCL-185、human alveolar basal epithelial cells) を10%FBS DMEM (high glucose) を使用してincubatorで継代培養 (humidified 5%CO₂、37°) した。

【0075】

T-flaskで培養された細胞をTrypLE (gibco) を利用して分離した。1mM EDTA in D-PBS (gibco) solutionに交換した。Debris除去のために、40 μmcell strainer (BD) を用いて、フィルタをした後、Calcein-AMで37° incubatorで15分間染色した。1mM EDTA in D-PBSで交換した後、血球計 (hemocytometer) を利用して、 $2 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ の濃度でヒト肺胞の基底上皮細胞A549の懸濁液を準備した。

30

【0076】

A549細胞懸濁液と赤色蛍光タンパク質懸濁液をそれぞれ1ml注射器に入れ、それぞれの注射器は、シリコンチューブを介して細胞ロードのチャンネルと物質ローディングチャンネルの入口に接続し、注射器の操作を介してチャネルの内部に注入操作した。

細胞および物質ローディングチャンネルの反対側の入り口には、PBSで満たされた1ml注射器をシリコンチューブを介して同様に接続して、物質注入構造物で細胞を選択的に置くことができるよう構成した。

【0077】

細胞ローディングチャンネルの両端に接続された細胞懸濁液とPBSを含む1ml注射器を操作して、標的細胞を物質注入構造物の内部に押し込み後、物質注入ナノ通路と出会う中央に位置させた。

40

【0078】

この後、物質ローディングチャンネルの両端に設置した電極印加装置に電圧をかけてもらい、物質注入通路に沿って1Vが形成されるようにして、2秒間の電圧をかけてくれた。オシロスコープ (VDS3102、Owon) を利用して電圧を測定した。蛍光顕微鏡 (TE2000-U、Nikon) を介して細胞の位置を把握し、RFP注入過程を撮影して、図10に示した。

【0079】

Plasmid DNA注入後、細胞を回収し、96 Well Plateに注入し、200 μlに該当する培養培地を添加してくれた。バッジ添加後humidified 5%CO₂、37° incubatorで12時間培養した

50

。以後蛍光顕微鏡 (TE2000-U、Nikon) を介して赤蛍光反応を確認し、これにより、plasmid DNAが発現したことを確認した。

【0080】

図1には、1つの物質注入通路（第2通路）を有する細胞内での物質の注入装置（図1a）と6つの第2の通路を含む（図1b）、細胞に物質をする注入する本発明デバイスを示した。

* 102度1aを見ると、物質を注入しようとする細胞（8）が物質注入通路である第1通路（4）を介して移動する。外部電源（20）によって物質（2）を注入する通路（第2通路）（2a）と、第1通路（4）の間に電位差が発生し、上記細胞（8）が第1の通路の中間の狭くなつた部分を通過する際に、上記の細胞にかかる電位差によって、第2通路（2a）の物質（2）が前記細胞（8）に注入される。このように物質が注入された細胞（11）は、第1通路の排出口（5）を介して回収される。 10

【0081】

図1bには、6つの第2の通路が形成された本発明の物質注入装置を示した。図1bに示した本発明の装置を利用すれば、6つの物質を一度に細胞に注入することができる。

図1a及び図1bで第2の通路と、第1の通路との間にかかるそれぞれの電位差を調節することにより、注入する各物質の量を制御することができる。

【0082】

図2は、2つの第2の通路を備えた本発明に係る物質注入装置の平面透視図である。図2に、細胞を含む溶液の流入と流出通路（4）、前記細胞に注入する物質の流入と流出通路（6、7）、物質が注入された細胞を回収する通路（5）、上記細胞を含む溶液の流入と流出通路（4）と、前記物質が注入された細胞を回収する通路（5）のそれと両末端が接続されており、中間部分が狭い第1通路（1）前記第1の通路（1）の中間部分で前記第1通路に接続された二つの第2通路（2,3）を示した。 20

【0083】

細胞一つが第1通路（1）の中間の狭くなつた部分を通過するとき、前記第1通路の内壁と密着される。これらの細胞と第1通路（1）の内壁との密着によって第1通路（1）と第2通路（2,3）の間の電位差が弱まることが最小限に抑えられる。第1通路の中央部分を過ぎると再び広くなりながら物質が注入された細胞が排出される。

【0084】

第2通路（2,3）の末端は、細胞に物質を注入する注射針と同じような役割をする。つまり、外部電源により第2通路（2,3）に集中している伝える第2通路（2,3）と隣接する細胞の細胞膜（または細胞壁）を穿孔する機能をしながら、同時に物質を上記穿孔を介して細胞内部に浸透させる。 30

【0085】

* 108細胞を含む溶液の流入と流出通路（4）の圧力差（例えば、ポンプを使用）や電位差（外部電位差発生装置、例えば、直流電源または交流電源を使用）をかけてくれば、細胞が第1通路（1）に流入される。第1通路（1）を通過しながら物質の注入が行われた細胞は、通路（5）を介して排出される。物質の流入と流出（6,7）通路には、細胞の内部に注入する物質が移動する。 40

【0086】

図3は、図2に示した第1通路（1）と第2通路（2,3）を3次元的に描写した図である。図3bに示すように、第2の通路（2,3）は、第1通路（1）と接続されている。

図4は、単一の細胞に2つの物質を同時に注入する過程を示している。第1の通路の片側の入口に流入した細胞（8）は、第1の通路の中間の狭くなつた部分（9）で第2通路（10）を介して2つの物質を注入された後、第1の通路の反対側流出口（11）を介して回収される。

【0087】

図5は、本発明の一つの実施例に基づいて製造された細胞に物質を注入する装置の20倍の顕微鏡写真である。（外部の電位差印加装置は示されていない）。

図5の左側の写真は、細胞を含む溶液の流入と流出通路（5）、前記細胞内に注入する物 50

質の流入と流出通路（6、7）、および物質が注入された細胞を回収する排出通路（4）が形成された写真である。

【0088】

図5の右側の写真は、上記図5の左側の写真に示された、細胞を含む溶液の流入と流出通路（5）と、前記物質が注入された細胞を回収する通路（4）のそれぞれの両末端で接続されて、中間部分が狭い形態である第1通路（1）と、前記第1通路の中間部分で前記第1通路に接続され、物質の流入流出通路（6、7）と、それぞれ接続された二つの第2通路（2、3）が形成されている本発明の装置の20倍拡大写真である。

【0089】

図6は、ガラス状の固体内部に形成された本発明の物質注入装置の外観写真である。

10

図7は、本発明の装置を使用して、人間肺胞の基底上皮細胞（A549、ATCC CCL-185）に赤色蛍光タンパク質（red fluorescence protein、RFP）を注入する過程を撮影した写真である。A459細胞をカルセインAM（Calcein AM）で処理して緑色蛍光を発生させる場合、タンパク質が注入された細胞が生きていると評価した。

【0090】

図7aは、生きている（緑色蛍光）A549細胞が第1の通路の中央に位置することを示して、図7bは、第2の通路と、第1の通路との間に電位差を加えたときRFPが第2の通路を介して移動し、前記A549細胞内部に注入が開始された様子（赤色蛍光）を示し、図7cはA549細胞内でRFPが注入されていることを明らかに示して（赤色蛍光）、図7dはRFPの注入後もA549細胞が生きていることを見せてくれ（緑色蛍光）、図7eおよび7fは、上記のプロセスを2回繰り返した場合でも、A549細胞内でRFPが正常に注入されたことを示す。

20

図8は、ヒト臍帯血の幹細胞の内部にRFPを注入した過程を撮影した写真である。カルセインAMを使用して、細胞が生存するかどうかを確認した。

【0091】

図8aは緑色蛍光（14）を介して第1の通路の中央に位置し、ヒト臍帯血の幹細胞が生きていることを示して、図8bは、赤色蛍光（15）を介してRFPが第2の通路に入力されており、緑色蛍光を介してヒト臍帯血の幹細胞にRFP注入準備が整っていることを示しており、図8cは、第2通路の末端部分に、より明るい赤色蛍光（16）を介してRFPの注入のために電界をかけてくれた後、RFPの注入が開始されたことを示して、図8dは赤色蛍光（17）を介してヒト臍帯幹細胞内でRFPが注入されたことを示してくれて、図8eは赤色蛍光（18）を介してヒト臍帯幹細胞が第1の通路の排出口に向かって移動してことを示して、図8fは赤色蛍光（19）を介してヒト臍帯幹細胞が第1の通路から完全に排出されたことを示している。

30

【0092】

図9は、ヒト胎盤由来中間葉幹細胞の赤色蛍光タンパク質を注入する過程を撮影した写真である。

図10は、人間肺胞の基底上皮細胞（ATCC CCL-185）にプラスミドDNA（cy3）を注入して12時間培養した後に撮影した写真である。

【0093】

図11は、本発明の装置をフェムト秒レーザーを使用して、ガラスの内部（23）に形成させる装置の分解斜視図である。

40

【0094】

以上のように、実施例1～5と、図1～11を介して、本発明の装置を説明したが、これらはもっぱら説明をするためのもので、本発明の権利範囲をそれらのだけに限定するものではない。

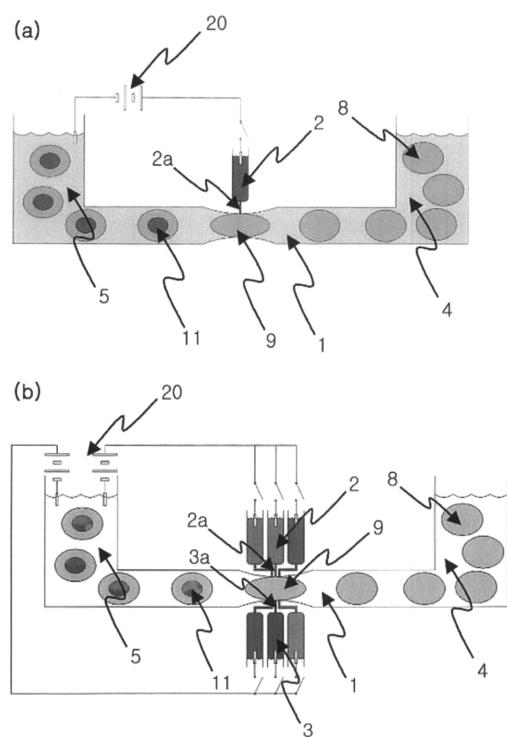
【0095】

次の特許請求の範囲に示した本発明の権利範囲を逸脱しなくとも、多くの変形と技術的特徴の組み合わせが可能であることを、この技術分野における通常の知識を有する者であれば容易に知ることができるだろう。しかし、そのような変形は、本発明の範囲外と見なされることができず、そのようなすべての変形は、以下の請求項の権利範囲に含まれること

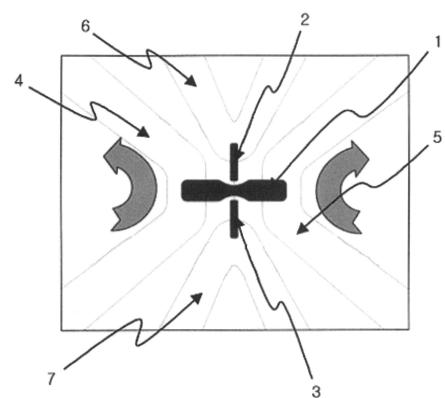
50

とを意図するものである。

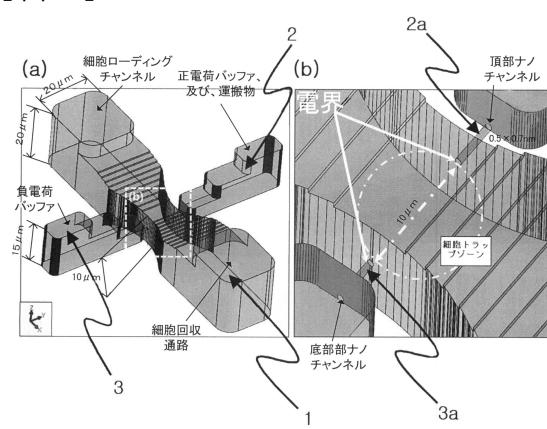
【図1】



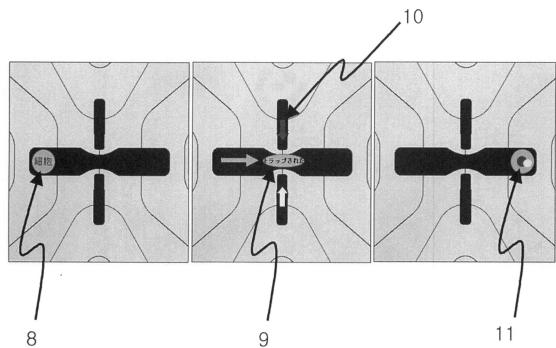
【図2】



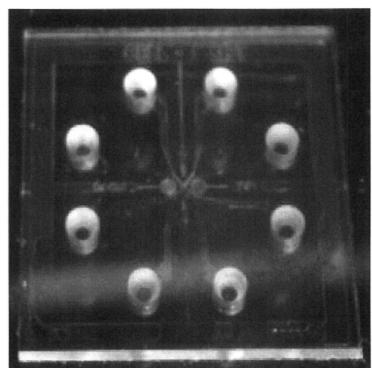
【図3】



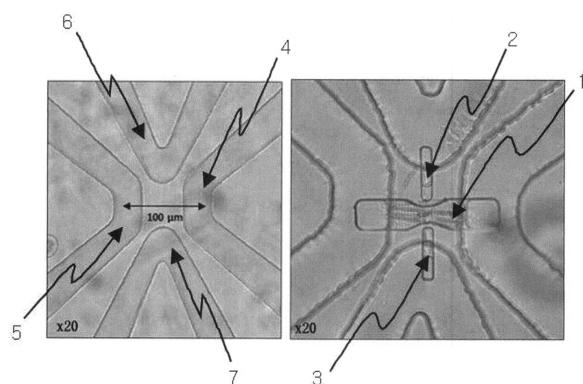
【図4】



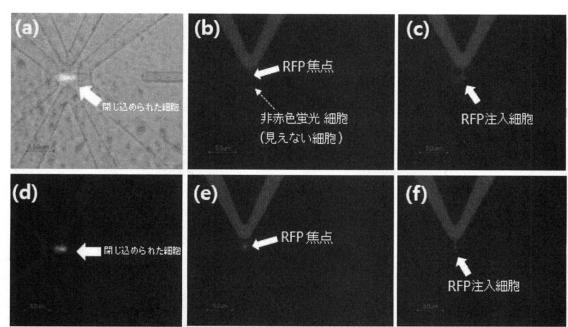
【図6】



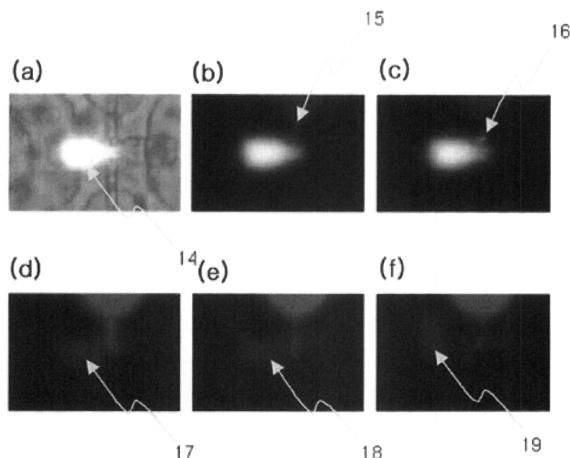
【図5】



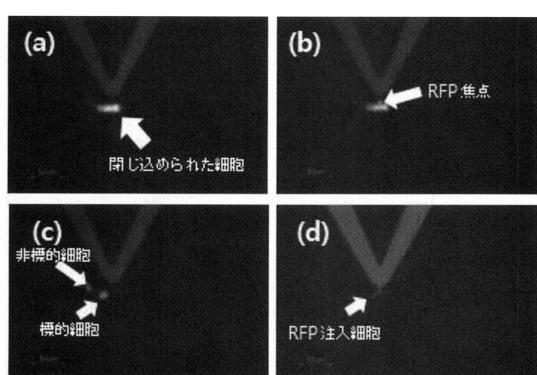
【図7】



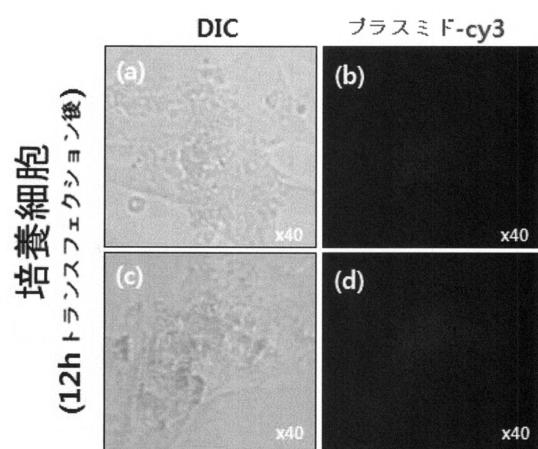
【図8】



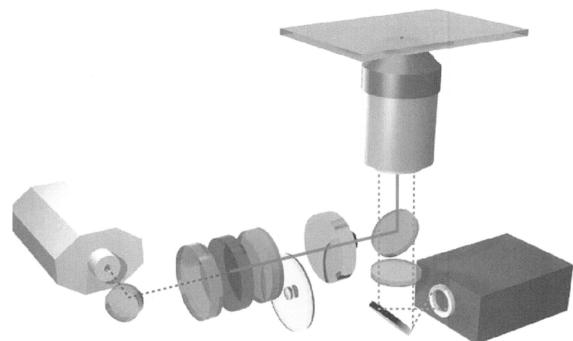
【図9】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

前置審査

(74)代理人 110000578

名古屋国際特許業務法人

(72)発明者 リー サンギュン

大韓民国 37558 ギョンサンブク - ド ポハン - シ ブク - グ フンヘ - ウツ チョゴ - リ
145 - 33 フィール ハーモニー 102

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特表2014-533936 (JP, A)

特開2005-278480 (JP, A)

米国特許第07338796 (US, B1)

特表2004-511258 (JP, A)

特開平08-322548 (JP, A)

米国特許出願公開第2005/0170510 (US, A1)

特開2011-242240 (JP, A)

特表2002-516678 (JP, A)

国際公開第2004/092369 (WO, A1)

中国特許出願公開第101928666 (CN, A)

BOUKANY, P.E. et al., Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells, nature nanotechnology, 2011年, Vol.6, pp.747-753

XIE, X. et al., Nanostraw-Electroporation System for Highly Efficient Intracellular Delivery and Transfection, ACS NANO, 2013年, Vol.7, No.5, pp.4351-4358

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M

C12N

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream II)

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)