脂質二重膜ドロップレット内へのマイクロ・ナノピペットによる
極微量噴出とその定量評価*中島 正博^{*1}, 松野 雄多^{*2}, 瀧口 陽子^{*3}
野川 晃佑^{*4}, 瀧口 金吾^{*3}, 小嶋 勝^{*2}
本間 道夫^{*3}, 福田 敏男^{*5}Evaluation of Ultra-Minimal Spout Amount
from Micro-Nano Pipettes into Phospholipid-Coated Micro-DropletMasahiro NAKAJIMA^{*6}, Yuta MATSUNO, Yohko TANAKA-TAKIGUCHI,
Kousuke NOGAWA, Kingo TAKIGUCHI, Masaru KOJIMA,
Michio HOMMA and Toshio FUKUDA^{*6} Center For Micro-nano Mechatronics, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi, 464-8603 Japan

This paper presents the evaluation of ultra-minimal spout amount from micro-nano pipettes into phospholipid-coated micro-droplets. The micro-nano pipettes can be used for various biological applications, such as single cell analysis. Conventional microinjection with pipettes has been conducted by air pressures. However, the spouting of high viscosity solutions, such as biological protein solutions, is relatively difficult due to the frictional forces between the surface of a pipette and a solution. It is also needed to evaluate the spout amount quantitatively. In this paper, the electro-osmotic phenomenon is applied to spout the high-viscosity biological protein solution. The local spouts of protein solutions, GFP and F-actin, are demonstrated experimentally. The amount of spout solution is quantitatively evaluated from the fluorescent intensity inside a phospholipid-coated micro-droplet.

Key Words: Single Cell Analysis, Artificial Cell Models, Micro-Nano Pipettes, Electro-Osmotic Phenomenon, Local Spout Control

1. 緒 論

現在, これまでの手法では得ることが困難な単一細胞内部の局所的な特性や細胞の個体差など, 単一細胞レベルの特性調査, すなわち単一細胞解析技術に関する研究が注目されている⁽¹⁾. 単一細胞を解析するためには, 任意の局所的な環境を変化させ計測する, 局所環境制御技術が有効である. 図1に示すように, ピペットなどのプローブ型デバイスは, マイクロ・ナノマニピュレーション技術により任意に位置決めできるため, 単一細胞内への試薬導入や単一細胞周辺的环境制御など, 単一細胞解析のために任意の局所環境の制御に用いることができる.

実際に, マイクロピペットによるパッチクランプ

Fig. 1 A schematic of single cell analysis by local environmental control with micro-nano pipettes.

⁽²⁾, 胚操作⁽³⁾などは, 広く用いられている. さらに近年では, ナノピペットを用いて, 空気圧を利用したプラスミド DNA⁽⁴⁾や高分子⁽⁵⁾の細胞への注入などが研究されている.

一方で, リポソームと呼ばれる脂質二重膜の小胞の内部に様々な生体試料を導入した人工細胞モデルに関して研究が盛んに行われている. これまでに, 細胞骨格であるアクチン繊維のリポソーム内でのバンドル化の観察⁽⁶⁾, 膜透過性タンパク質を含んだリポソームの生体反応観察⁽⁷⁾, セプチンによるリポソームの形態変形観察⁽⁸⁾などが報告されている. このように脂質二重膜の小胞を微小空間として用いることで, 人工細胞の構築に向けて細胞と同様の反応が観察されている. マイクロ・ナノピペットを用いて各種のタンパク質等をリポソームに追加注入するこ

* 原稿受付 2009年9月18日.

^{*1} 正員, 名古屋大学大学院工学研究科(〒464-8603 名古屋市千種区不老町).

^{*2} 名古屋大学大学院工学研究科.

^{*3} 名古屋大学大学院理学研究科.

^{*4} 正員, 名古屋大学大学院工学研究科, 日本学術振興会特別研究員 DC.

^{*5} 正員, フェロー, 名古屋大学大学院工学研究科.

E-mail: nakajima@mein.nagoya-u.ac.jp

Fig. 2 Experimental set-up of local spout using micro-nano pipette.

とができれば、人工細胞モデル構築に求められる動的な複数の生体試料の反応観察が可能となる。

これらの噴出では、空気圧が一般的に用いられてきたが、微小な流路内では、ピペット管壁表面と液体の間に働く摩擦力により噴出が阻害される。生物分野で用いられるタンパク質溶液などの生体試料は、多くが粒子状・繊維状の物質を含むことで高粘性であるため、マイクロ・ナノピペットからの溶液噴出が困難となる。また、このような極微量な噴出量を定量化することが課題となっている。

そこで我々は、電気浸透現象を利用したナノピペットからの溶液噴出⁽⁹⁾⁻⁽¹⁰⁾に着目した。電気的な力は、溶液中の個々の分子に直接働くため、ナノピペットからの溶液噴出だけでなく、高粘性な生体試料を用いた局所環境制御の実現が期待される。ただ、この噴出法を局所環境制御に応用するためには、溶液の噴出量が定量されていないことに課題があった。

そこで本稿では、まず、代表的な生体試料として、蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein)⁽¹¹⁾と、繊維状タンパク質 F アクチン⁽¹²⁾⁻⁽¹³⁾の、2種類のタンパク質溶液の電気浸透現象を利用した噴出を試みる。次に、リポソームの代わりに脂質一重膜ドロップレットに対して、ナノピペットを用いて電気浸透現象により極微量の溶液を注入する。さらに、ドロップレットの内部の蛍光強度から、ピペットの噴出量を定量的に評価する手法を提案し、実験により検証する。

2. マイクロ・ナノピペットからの溶液噴出

2・1 噴出原理 本研究では、電気浸透現象を利用して、マイクロ・ナノピペットからの極微量の噴

Fig. 3 Experimental result of spout of GFP. (a) Applied voltage: 0V (0s, Bright-field image), (b) Applied voltage: 35V (3s, Fluorescent image), (c) Applied voltage: 35V (15s, Fluorescent image))

出を行なう。以下に電気浸透現象について述べる。固体（ここではガラス）壁面と液体が接する面では、電気二重層が形成される。ここに電場を印加すると、液体中のイオンは反対符号の電極側に移動する。この際、粘性の影響によりイオンと同じ方向に液体も移動する。この現象を電気浸透現象と呼ぶ⁽¹⁴⁾。

この現象では電圧印加により分子に直接力を働かせて噴出を行なうことが可能である。そのため、従来の空気圧を利用した噴出手法に比べ、1)数十ナノメートルの直径の微細口からの噴出が可能である、2) 生体試料などの粘性の高い溶液の噴出が可能である、3) 印加電圧に依存して流速が決まるため噴出量の制御が容易などの利点がある。

2・2 実験システム 図2に溶液噴出実験のシステム概略図を示す。マイクロ・ナノピペットはマイクロマニピュレータに取り付けられており、任意の位置で噴出を行うことが可能である。マイクロピペットは電熱線ブラー(PC-10, NARISHIGE)を、ナノピペットはレーザーブラー(P-2000, Sutter)を用い、熱を加えながらガラス管を引くことにより作製する。ピペットの内径は、走査型電子顕微鏡(JSM-7000FK, JEOL)によりピペット先端の観察画像から測定する。ピペット内には正電極として金属細線電極 ($\phi \sim 0.15 \text{ mm}$) を、液槽内には負電極として銅板 (高さ $\sim 1.3 \text{ mm}$) を設置する。これらの間に直流電圧を印加することで、ピペット内の溶液は、電気浸透現象により液槽側に移動してピペット先端から噴出する。本研究では、噴出溶液は、蛍光分子を含む溶液を用いているため、水銀ランプ(USH-1030L, Olympus)を使用して励起光を照射することにより蛍光を発する。そのため、倒立型光学顕微鏡(IX-71, Olympus)を使用して、CCD カメラ (NEPTUNE100, Watec)で撮影した蛍光像を観察すること、または分光光度計(PMA-12 C10027-02, Hamamatsu

Fig. 4 Experimental results of spout of F-actin.
(a) Applied voltage: 0 V, (b) Applied voltage: 50 V.

Photonics)で蛍光強度変化を測定することにより、噴出を確認する。

3. タンパク質溶液の噴出実験

生物分野では、電解質溶液のみならず、タンパク質の分散溶液などの高粘性の溶液の局所噴出も求められるが、従来の空気圧を用いた手法では、摩擦力の影響で噴出が困難であった。本研究では、前章に記した通り、粘性の高い溶液でも噴出が可能と考えられる電気浸透現象を用いて、GFP及びFアクチンの2種類のタンパク質溶液噴出実験を行なう。

3・1 GFPの噴出実験 GFPは酵素などを必要とせず、単体で蛍光観察できるタンパク質であるため、生物学分野での実験において、様々な他のタンパク質と融合させて広く研究に用いられている。GFPは、分子量 ~ 27 kDa (励起波長 489 nm, 発光波長 508 nm) である。本実験では、GFPを25 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl 緩衝液 (Buffer A) で10倍に希釈してピペット内に注入し、噴出溶液として使用した。液槽内の溶液にも Buffer A を使用した。

直流電圧35 Vを印加したときの噴出実験の結果を図3に示す。このとき内径 ~ 1 μm のマイクロピペットを用いた。図3(a)は電圧印加前の明視野画像であり、図3(b)は電圧印加3秒後、図3(c)は電圧印加15秒後の蛍光像である。電圧印加前後の様子から、GFPの噴出が確認された。このように、電気浸透現象を利用した溶液噴出方法により、従来の空気圧では噴出困難であった数万 Da の高分子量のタンパク質溶液の噴出を確認した。

3・2 Fアクチンの噴出実験 Fアクチンは、Gアクチンと呼ばれる球形のタンパク質がフィラメント状に重合したものである。単体のGアクチンの分子量は ~ 42 kDaであるが、Fアクチンの分子量は、その重合の度合いに依存する。したがって、GFPに比べて大きな分子量を有し、またフィラメント状であるために、一般に噴出が困難であると考えられる。

本研究では、Fアクチンを蛍光観察するために、Fアクチンに特異的な蛍光修飾剤 Rhodamine

Fig. 5 Experimental set-up for the characterization of solution concentration - fluorescent intensity. (a) Design of micro-chip, (b) Schematic of experimental set-up.

Phalloidin (励起波長 542 nm, 蛍光波長 565 nm) で修飾した。これを25 mM Imidazole-HCl (pH 7.6), 5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 1 mM EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid), 1 mM DTT (Dithiothreitol) 緩衝液 (Buffer B) で0.02 g/lに希釈し、噴出溶液としてピペット内に注入して使用した。液槽内には Buffer B を満たし、GFPの噴出実験と同様に内径 ~ 1 μm のマイクロピペットを使用した。

図4に噴出実験の分光光度計での測定結果を示す。図4(a)は電圧印加前の蛍光強度分布、図4(b)は直流電圧50 V印加時の蛍光強度分布である。この溶液の蛍光波長付近の蛍光強度が電圧印加により増加している様子から、Fアクチンが噴出できていることが確認できる。

以上の結果から、GFPよりも更に分子量が大きく、粘性の高いタンパク質溶液が噴出できた。従って、同様の分子量を有する各種タンパク質溶液にも提案した噴出法が適用できると考えられる。

4. 溶液濃度による蛍光強度の定量化

単一細胞の局所環境制御や、リポソーム内へ生体試料の追加注入を行う場合、目的とする溶液を極微量で定量的に噴出させることが求められる。このため、マイクロ・ナノピペットからの溶液噴出量の定量評価を行なう必要がある。

本研究では、微小閉鎖空間として脂質膜小胞内に溶液を注入し、内部の蛍光強度から噴出された溶液量を算出するという方法を提案する。リポソームは作製プロセスが複雑、固定が困難などの問題があるため、本論文ではリポソームと同様の内部構造を有し、容易に固定された状態で作製可能な脂質一重膜ドロップレットを脂質膜小胞として用いる。本章ではまず、この定量評価のための

Fig. 6 Fluorescent intensity depended on the solution concentration inside micro-channel.

基礎実験として、マイクロ流路内での溶液濃度に対する蛍光強度の定量化を行う。

本研究では、ドロップレットの直径と同等の $\sim 200 \mu\text{m}$ の高さを有するマイクロチップ内に蛍光溶液を導入し、溶液濃度に対する蛍光強度の定量化を行った。図 5(a)にマイクロチップの設計図、図 5(b)に実験装置の概略図を示す。まず、PDMS (Polydimethylsiloxane)製のマイクロチップを作製し、直径 $\sim 200 \mu\text{m}$ 、高さ $\sim 200 \mu\text{m}$ の円柱部分の流路内に蛍光溶液を負圧により導入した。視野範囲に励起光を照射し、円柱の中央部分の $\sim 50 \mu\text{m} \times \sim 50 \mu\text{m}$ の範囲に対して、分光光度計により蛍光強度を計測した。ここで励起光は、蛍光溶液の退色を防ぐために、蛍光強度を測定する際に 1 秒間だけ照射し、分光光度計による計測時間は 50 ms とした。また、蛍光溶液には Calcein (励起波長 495 nm, 蛍光波長 520 nm) 水溶液を用い、溶液濃度としては、0.001, 0.0025, 0.0050, 0.0075, 0.010 mM に対して各々 10 回ずつ計測を行った。

本実験で得られた溶液濃度と蛍光強度の関係を図 7 に示す。このように、濃度の増加と共に蛍光強度が線形的に増加する傾向が確認された。蛍光強度 I と溶液濃度 C_D の最小二乗近似により、以下の近似式を得た。

$$I = 1.82 \times 10^6 C_D - 1.35 \times 10^2 \quad (1)$$

本式を用いることで、ドロップレット内部の蛍光強度 I_D を計測することにより、ドロップレット内部の溶液濃度 C_D を算出する。ここで、ドロップレット体積 V_D は、ドロップレットを球形として、 $V_D = 4/3\pi R_D^3$ (R_D : ドロップレットの半径) により求め、噴出した溶液の濃度 C_S の噴出量 V_S は次式により算出する。

$$V_S = V_D C_D / C_S \quad (2)$$

5. ドロップレットへの溶液注入による

噴出量の定量評価実験

本章では、実際に噴出量定量評価のため、油中に

Fig. 7 Experimental results of the fabrication of droplets with PC and insertion of pipette. (a) Water droplet coated by PC. (b) Pipette after insertion.

Fig. 8 Experimental results of insertion of pipette with DOPE. (a) Before shrinkage. (b) After shrinkage.

作製した脂質一重膜を有するドロップレットを微小閉鎖空間として利用し、溶液の注入、内部の蛍光強度測定を行う。

5・1 実験条件 図 2 に示す装置の概略図において、液槽内にリン脂質を 0.5 mM で混合したミネラルオイルを用意する。ピペット内部には、ドロップレット作製時には純水を、溶液注入時には Calcein 水溶液 (1 mM) をそれぞれ注入する。

5・2 脂質一重膜ドロップレットの作製実験 本研究では、脂質一重膜を有するドロップレットを微小閉鎖空間として利用する。まず、脂質を含むミネラルオイル中に純水を噴出することにより、脂質分子が親水基を純水側、疎水基をミネラルオイル側に向けて油液界面上に整列し脂質一重膜を形成することを利用して、脂質一重膜ドロップレットを作製する。ここで、ピペットからの噴出時間に応じて、ドロップレットのサイズを調整することができる。

本実験では、直流電圧 100 V、 ~ 3 秒間を印加して行った。また内径 $\sim 1 \mu\text{m}$ のマイクロピペットを用いた。実際に作製した脂質一重膜を有するドロップレットを図 7 (a)に示す。脂質としては、中性リン脂質の PC (Phosphatidyl Cholin) を用いた。このように、銅板電極に付着した状態で、直径 150 $\sim$ 200 μm の球状の脂質一重膜ドロップレットを作製した。

5・3 脂質一重膜ドロップレットへの溶液注入実験

次に、作製したドロップレットに対し、マイクロマニピュレータの操作によりピペットを挿入し、直流電圧 50 V を 5 秒間ずつ印加して Calcein 水溶液の注入を行った。また内径 $\sim 1 \mu\text{m}$ のマイクロピペットを用いた。各噴出の度に、暗視野で励起光を入射して分光光度計により内部の蛍光強度を測定した。ここで励起光は、蛍光溶液の退色を防ぐために、蛍光強度を測定する際に 1 秒間だけ照射し、分光光度計による計測時間は 50 ms とした。

Table 1 Experimental result of shrinkage of droplet and clog in pipette.

PC:DOPE	10:0	6:4	3:7	1:9	0:10
Shrinkage of droplet	0 % (0/5)	0 % (0/5)	20 % (1/5)	100 % (5/5)	100 % (5/5)
Clog in pipette	100 % (5/5)	60 % (3/5)	60 % (3/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)

5・3・1 脂質組成の検討 本研究では、中性リン脂質の PC 及び弱酸性リン脂質 DOPE (Dioleoyl Phosphatidyl Ethanolamine) を用いて、脂質一重膜ドロップレットを作製した。

PC を用いた脂質一重膜ドロップレットの場合、図 7(a) に示すように、ドロップレット表面は脂質塊が多数観察され、十分に均一な脂質膜が形成されていなかった。また、ピペット挿入時・電圧印加時に、脂質塊によるピペット内部で詰まりが生じ、噴出が困難になるという問題が生じた(図 7(b))。この原因としては、脂質分子は親水基と疎水基を有しており、水中では疎水基同士、油中では親水基同士で引き付けあう性質があるため、脂質分子が集合体を形成し、脂質塊が生じると考えられる。

そこで、弱酸性リン脂質 DOPE を用いて実験を行った。DOPE 分子は円錐形であるため、球状で均一な厚さの膜を形成しやすい⁽¹⁵⁾。この脂質を用いた脂質一重膜ドロップレットへのピペット挿入前後の様子を図 8(a)及び図 8(b)に示す。DOPE を 0.5 mM で混合したミネラルオイル中での脂質一重膜ドロップレットの場合、図 8(a)に示すように、PC を用いた際にみられた脂質塊やピペットの詰まりの発生はほぼ起きなかった。一方で、図 8(b)のように、ピペット挿入時にドロップレットが大きく収縮という問題が生じた。酸性リン脂質とは、中性溶液中において負電荷を持つ脂質であり、ドロップレットが大きく収縮する原因は、電荷を持つ脂質膜が静電気の影響によりピペット側へ吸引され、同時に中身の純水も吸引されることが原因であると考えられる。

そこで、本研究では、PC と DOPE の混合脂質を用い、混合比を調整して、ピペットの詰まり及びドロップレットの収縮が生じにくい条件を検討した。表 1 に、脂質の混合比とピペットの詰まり及びドロップレットの収縮の結果を示す。PC の比率が高いほど詰まりが生じやすく、DOPE の比率が高いほど収縮が生じやすい傾向であった。PC:DOPE が 6:4 付近において、脂質一重膜ドロップレットの収縮が生じず、かつ詰まりが低減されているため、以下の実験においてはこの条件にて実験を行った。

5・3・2 ピペットサイズの検討 次に、ピペッ

Fig. 9 Experimental results of injection into a droplet by a nanopipette of 50 nm inner diameter (PC:DOPE = 6:4). (a) Before spout (Bright field image) (b) 1 time spout (Dark field image) (c) 3 times spout (Dark field image) (d) 4 times spout (Dark field image)

ト先端の噴出口をナノメートルオーダの極微小なサイズにすることにより、外部からピペット内部へのミクロンサイズの脂質塊の浸入を低減し、ピペットの詰まりを低減する条件を検討した。

本研究では、内径 1 μm 、500 nm、50 nm のピペットを用いて、脂質一重膜ドロップレットに対する溶液注入・蛍光強度計測の実験を行ない、ピペットサイズの違いによる噴出量について定量化を行った。脂質組成は、5・3・1 で述べたように、詰まりも収縮も生じにくい PC:DOPE=6:4 の混合脂質の条件で行った。

各ピペットで溶液注入実験を行った結果、内径 1 μm の場合と比較すると、500 nm、50 nm の場合では詰まりの影響は少なく容易に噴出を行うことができた。図 9 には、内径 50 nm のピペットを用いた場合を示す。本図に示すように、噴出回数に応じてドロップレット内部が蛍光染色されていく様子が確認でき、脂質一重膜ドロップレットに対して蛍光溶液注入に成功した。以上から、50 ナノメートル内径の極微細なピペットを用いることにより、一重膜ドロップレット表面に凝集したミクロンサイズの脂質塊がピペット内部へ侵入することを低減することができたため、ピペット内部で詰まりが生じず、安定した噴出が可能になったと考えられる。

5・4 脂質一重膜ドロップレットへの噴出量の定量評価

実際に、ドロップレット内部に噴出させた溶液の蛍光強度の値から、(2)式を用いて噴出量を定量化する。ピペットの内径が 500 nm と 50 nm の場合の噴出回数 (5 回) と噴出溶液量を定量評価した結果を図 10(a)及び(b)に示す。500 nm のピペットでは 4 本、50 nm のピペットでは 5 本の異なるピペットに対して噴出実験を行った。ドロップレットの直径は、500 nm のピペットでは $210 \pm 9 \mu\text{m}$ 、50 nm のピペットでは $176 \pm 10 \mu\text{m}$ であった。

Fig. 10 Spout amount by multi-times spouting with nano-pipettes. (a) Inner diameter: 500 nm (4 pipettes), (b) Inner diameter: 50 nm (5 pipettes)

これらの結果から、500 nm の場合は、噴出量の増加率が噴出回数と共に減少し、噴出量のばらつきが大きく、噴出量が次第に頭打ちとなる場合がみられる。一方で、50 nm では噴出量が線形的に増加しており、安定した噴出を行うことができた。これは、50 nm の場合よりも 500 nm の方が、ピペット内部への脂質塊が侵入しやすいため、徐々にピペット内部に詰まりが生じて、噴出量がばらついたり、噴出量が頭打ちとなっているためであると考えられる。

以上の結果から、50 nm のナノピペットを用いた 1 回当たりの噴出量の平均値と標準偏差値は、 0.2 ± 0.1 pl であった。したがって、ナノピペットを用いて、脂質一重膜ドロップレットに対して、pl~fl オーダーでの溶液噴出とその定量化を行うことができた。

今後は、提案した定量化手法をより広い対象に適用するため、ピペットに親水化処理や疎水化処理を行うなどして詰まりにくくする、ピペットの材質を変えて導電性を高くし帯電を防ぎ、ドロップレットの収縮を低減するなどの改善策の検討が課題である。

6. 結 論

本稿では、脂質一重膜ドロップレットに対して、マイクロ・ナノピペットを用いて極微量溶液の噴出及び定量化を行った。はじめに、電気浸透現象を利用して、タンパク質である GFP 及び F アクチンの噴出を確認した。次にマイクロチップを用いた蛍光強度の校正結果から、ナノピペットを用いて脂質一重膜ドロップレットに対して溶液噴出を行った際のドロップレット内部の蛍光強度計測値から噴出溶液の定量化を行った。以上により、脂質一重膜ドロップ

レット内に pl~fl の極微量の溶液噴出と定量化を行う手法を確立した。

今後は、本手法をリポソームへ応用し、人工細胞モデルの構築に向けた細胞膜とタンパク質の反応などを行う方針である。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省の科研費(17076004)の助成を得た。

参 考 文 献

- (1) S. Uehara, Y. Wakamoto, I. Inoue, and K. Yasuda, "On-chip single-cell microcultivation assay for monitoring environmental effects on isolated cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 305, (2003), pp. 534-540.
- (2) F. A. Edwards, A. Connerth and B. Sakmann, "A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system", *Pflügers Arch*, Vol. 414, (1989), pp. 600-612.
- (3) S. Hochi and M. Hirabayashi, "Maintenance of Transgenes in Rats: The Contributions of Embryo Cryopreservation and Intracytoplasmic Sperm/ Spermatid Injection", *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 48, (2002), pp. 205-213.
- (4) M. Derouazi, R. Flaction, P. Girard, M. Jordan and F. M. Wurm, "Generation of Recombinant Chinese Hamster ovary Cell Lines by Microinjection", *Biotechnology Letters*, Vol. 28, (2006), pp. 373-382.
- (5) T. V. Tsulaia, N. L. Prokopishyn, A. Yao, N.D. Victor Carsrud, M. C. Carou, D. B. Brown, B. R. Davis and J. Yannariello-Brown, "Glass Needle-Mediated Microinjection of Macromolecules and Transgenes into Primary Human Mesenchymal Stem Cells", *Journal of biomedical science*, Vol. 10, (2003), pp. 328-336.
- (6) M. Hase, and K. Yoshikawa, "Structural Transition of Actin Filament in a Cell-sized Water Droplet with a Phospholipid Membrane", *Journal of Chemical Physics*, Vol. 124, (2006), p. 104903.
- (7) M. Yamazaki, "The Single GUV Method to Reveal Elementary Processes of Leakage of Internal Contents from Liposomes Induced by Antimicrobial Substances", *Adv. In Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Vol. 7 (2008), pp. 121-142.
- (8) Y. Tanaka-Takiguchi, M. Kinoshita, and K. Takiguchi, "Septin-mediated Uniform Bracing of Phospholipid Membranes", *Current Biology*, Vol. 19, (2009), pp. 140-145.
- (9) L. Ying, A. Bruckbauer, D. Zhou, J. Gorelik, A. Shevchuk, M. Lab, Y. Korchev and D. Klennerman, "The scanned nanopipette: a new tool for high resolution bioimaging and controlled deposition of biomolecules", *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 7, (2005), pp. 2859-2866.
- (10) K. Nogawa, Y. Tagawa, M. Nakajima, F. Arai, T. Shimizu, S. Kamiya, and T. Fukuda, "Development of Novel Nanopipette with a Lipid Nanotube as Nanochannel", *Journal of Robotics and Mechatronics*, Vol. 19, (2007), pp.528-534.
- (11) A. Wach, A. Brachat, C. Alberti-Segui, C. Rebischung and P. Philippsen, "Heterologous HIS3 Marker and GFP Reporter Modules for PCR-Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast*, Vol. 13, (1997), pp. 1065-1075.
- (12) Y. Tanaka-Takiguchi, T. Kakei, A. Tanimura, A. Takagi, M. Honda, H. Hotani and K. Takiguchi, "The Elongation and Contraction of Actin Bundles are Induced by Double-headed Myosins in a Motor Concentration-dependent Manner", *Journal of Molecular Biology*, Vol. 341, (2004), pp. 467-476.
- (13) I. Rayment, H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes and R. A. Milligan, "Structure of the Actin-Myosin Complex and Its Implications for Muscle Contraction", *Science*, Vol. 261, (1993), pp. 58-65.
- (14) G. H. Tang, Z. Li, J. K. Wang, Y. L. He and W. Q. Tao, "Electroosmotic Flow and Mixing in Microchannels with the Lattice Boltzmann Method", *Journal of Applied Physics*, Vol. 100, (2006), p. 094908.
- (15) K. Ohki, "Relationship between Physical Properties of Lipids Preferring Non-bilayer Membranes and Functions of Biomembranes", *Biophysics*, Vol. 44, (2004), pp. 161-165.