

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18056

研究課題名(和文) Si-On-Quartz基板をプラットフォームとした生化学分析デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of bio-nano analytical devices on Si-On-Quartz (SOQ) substrates

研究代表者

中島 義賢 (Nakajima, Yoshikata)

東洋大学・学際・融合科学研究科・准教授

研究者番号：40408993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、マイクロ流路と従来の電気泳動法を組み合わせることにより、サンプルの数、大きさ、そして、ゼータ電位の同時測定ができる電気泳動コールター法(ECM)を提案し、細胞死誘発剤を用いて細胞の生死状態の異なる細胞集団を作成し、そのECMの結果から、細胞の生死判定が可能かどうかを試みた。生存率の減少により、大きさとゼータ電位に減少傾向が見られた。その結果は、細胞集団で見るとそれらの状態の判定は可能であるが、ひとつひとつの細胞の状態を判別することは難しい。そこで、トリパンブルー染色液と併用したECMによって測定・評価した結果、ひとつひとつの生死判定に十分なゼータ電位の「差」が確認された。

研究成果の概要(英文)：By combining the electrophoresis and conventional Coulter methods, we proposed the electrophoretic Coulter method (ECM) technique that enables the simultaneous analysis of the number, size and Zeta potential () of individual specimens. We also demonstrated that the ECM can identify whether the present cell state is alive or dead for solutions of human B lymphoblast (IM-9) cells, both before and after dosing of an apoptosis inducer. However, it was difficult to identify cell states in individual cells with the present ECM technique even though size distributions and distributions in IM-9 cells were changed with the time lapse after dosing.

We demonstrated the identification of normal cells or dead cells by using cell stain buffer for ECM and their results show difference values in , which are sufficient to separate normal cells or dead cells.

研究分野：電子デバイス

キーワード：ラボオンチップ 電気泳動 電気浸透 浮遊細胞 生死判定

1. 研究開始当初の背景

ライフサイエンス・ケミストリ分野におけるマイクロ流体チップの研究・開発は近年、急速に発展し、チップ上に微小な流路や反応・混合領域、そしてセンサーを集積化した生化学分析デバイスは、僅かな血液から血球検査やDNA分析が可能になっている。更に、マイクロ粒子や生体細胞の表面特性の解明は、分析化学、薬学および医学の分野において、非常に重要な役割を担うことが知られている。これらの研究の発展により、臨床医療の現場では、迅速な治療の開始・通院負担の軽減・医療費の抑制などの目的のため、患者の傍らで検体を採取し、検査することによって直接的に検査結果が得られる、「患者の傍らでの即時検査」の実現が可能になる。しかしながら、現在のマイクロ流体チップを用いた分析の多くは、顕微鏡から得られた画像を解析し、評価している為、結果を得るのに多くの時間を必要としている。

このような背景のもと申請者はこれまでに、次のような研究を行ってきた。

1) 細胞表面に吸着した生体分子により流路内での対象サンプルの泳動速度が異なることを初めて明らかにし、酵素・蛍光染色・放射性元素などによる標識をせずに反応量を見積もることができる測定手法を提案した。

2) 検体の表面特性のパラメータとしてゼータ電位に注目し、その他、数と大きさの評価を同時にできる電気泳動コルター法を提案し、電気信号による血液診断デバイスへの基礎実験を試みた。

3) Si-On-Quartz (SOQ)基板上に作製したトランジスタの電気的特性を評価し、この基板が小信号回路用素子に優れていることを明らかにし、イオン感応性トランジスタや pH センサに应用可能であること、またこの基板は半透明であるため、蛍光染色された生体物質を識別する光プローブバイオセンシングへの応用やカーボンナノ材料との組み合わせにより生体関連物質との融合に高いポテンシャルを有していることを示した。

これらを電子デバイスの利用で電気信号により計測・評価できるようになれば、現在、画像解析が主流のマイクロ流体チップと比較して、測定の高速度化、測定精度の向上、そしてコンパクトな分析デバイスの実現が期待できる。そのためには、電気泳動による流路内でのサンプルの流れのメカニズムを詳細に把握や計測された電気信号に含まれるノイズ源の低減が必要である。

一方で高速化と方向性が異なるが、個々の細胞の表面特性評価や経時変化の計測や希少細胞の捕獲・評価は、分析化学、薬学・医学の分野において高いニーズがある。そこで、半透明の SOQ 基板上にデバイスを集積化し、光学顕微鏡や光学分析装置による光情報と組み合わせ、多機能生化学デバイスを目的とした応用を試み、電気信号 + 光情報 + 分析デバイスの組み合わせによる新規測定法な

どについても提案をしていく。

2. 研究の目的

申請者が提案してきた電気泳動コルター法は、測定対象の粒径差 1 μ m、ゼータ電位差 2mV 程度の判別が可能となっている。しかし、細胞表面に吸着する特有の微量分子や細胞の大きさの変化を高感度で検出するためには、測定精度をさらに向上させなければならない。そのために、実験とシミュレーションを比較しながら進めていき、電気信号によりモデル粒子や生体材料を用いてデバイスの分解能を確認していく。その後、SOQ 基板をプラットフォームとした新規生化学分析システムへの展開を図る。

そこで本研究では、流路内の測定対象の流れの解明をし、マラリア感染した赤血球、がん細胞などの検出を想定したモデル粒子や細胞の測定評価、そして、SOQ 基板をプラットフォームとした流路と分析デバイスを融合した新規生化学デバイスの提案の、3つの研究を段階的に行う。

3. 研究の方法

流路内の測定対象の流れの解明

実験から得られる流速 = 電気泳動速度 + 電気浸透流 + 圧力勾配流 + 拡散速度 であると考えられ、電気泳動速度の正確な導出には他の成分の抑制が課題である。特に、電気浸透流は流路に用いられる材料の帯電状態に依存する。コーティング剤の濃度の違いによる、流路の表面状態の変化を XPS 測定により、数値化へ向け、各条件下での帯電状態を既存のゼータ電位測定装置で評価し、其々の電気浸透流は、マイクロ流路の実験から得られる流速の電圧依存性より外挿して導く。流路内の流れについてシミュレーション結果と比較しながら、実験を行う。また、流路を充たしている溶液のイオン及びその濃度にも注目しながら、電気伝導への寄与について調べる。

電気信号によるモデル粒子や細胞の測定評価

アレルギー診断やマラリア感染した赤血球等の検出を目的とし、粒径差 1 μ m 以下、ゼータ電位差 1mV の分解能を目指す。サンプルに対するアパーチャー設計の最適化はシミュレーションの結果を反映させて進めていく。

SOQ 基板をプラットフォームとした流路と電子デバイスを融合した新規生化学デバイスの提案

半透明な SOQ 基板上に作成した電気泳動コルターデバイスを、光学顕微鏡と組み合わせることにより、1)電気信号による解析、2)画像診断、そして3)細胞の捕獲・評価ができるようにし、最終的には希少細胞やターゲット細胞の培養・評価へと繋げられる技術の確立を目指す。

4. 研究成果

まず始めに、電気泳動による流路内での測定対象の流れのメカニズムを詳細に把握し、アレルギー・血液診断などの分野における新規分析デバイスおよび分析手法の提案を目的とした。サンプルを計測した際に電気信号に含まれるノイズ源の低減が必要で、流路表面へのコーティング剤の成膜状態を XPS 測定により調べ、成膜済みの流路で、流速の電圧依存性を調べ、電気浸透流を外挿し、最小となる条件の確立を行った。続いて、流路のゼータ電位測定分解能が 1mV 以下であることを確認し、その条件でコーティングされたマイクロ流路を用いて、抗原抗体反応量によるゼータ電位の変化や生細胞→死細胞によるゼータ電位についても評価し、判別可能であることを確認した。

つづいて、微量な血液からアレルギー判定や希少細胞の検出・捕獲・評価が可能な分析デバイスの実現を目的とし、1)同一流路での多重分析と2)希少細胞捕獲・評価を行った。

1)に関しては、培養した末梢血循環腫瘍細胞(CTC)に、その細胞死誘発剤を用いて細胞死を誘発させることにより、異なる生存率の細胞集団を用意し、それらを測定サンプルとした。その生死判定(生存率)は従来の手法による蛍光染色・顕微鏡解析によって予め測定を行った。その測定サンプルについて、私たちが提案している分析システム(ECM)によって、ひとつひとつの細胞を分析し、ゼータ電位とサイズの測定を行った。細胞状態が正常細胞・前期アポトーシス細胞・後期アポトーシス(死)細胞へと変化していく(生存率が低下していく)につれて、ゼータ電位は 0mV 方向へと移動し、またサイズも縮小していく結果が得られた。この結果から、本分析システムによって、測定サンプルの細胞状態について、生死判定が可能であることを示した。

ただし、この結果は細胞集団の状態判定は可能であるが、個々の細胞の状態判定は困難であった。そこで、ECM と液中でマイナスに帯電するトリパンブルー染色液を併用することにより、ひとつひとつの細胞の状態評価を判定が可能であることを示した(図 1)。

加えて、同一流路での複数の異なるサンプルの評価についても可能であることを示した。その他、赤血球/白血球の判別や赤血球表面での抗原抗体反応量の見積もりが可能であることも示した。

2)の分析デバイスの機能化へ向けた取り組みに関しては、細胞の接着、増殖、細胞死、解離時の状態を『電気信号』によって判定が可能かどうかについて、細胞表面の仮足形成能力に注目した。SOQ 基板上に作成した、くし型電極上に接触している細胞の投薬有無での状態変化について、蛍光顕微鏡と合わせて調べ、今後の『電気信号』によるリアルタイム計測が実現可能であることを示した。また、Si 微細加工によって作られた微小領域にこの細胞を捕まえておくことが可能であ

ることを確認した。

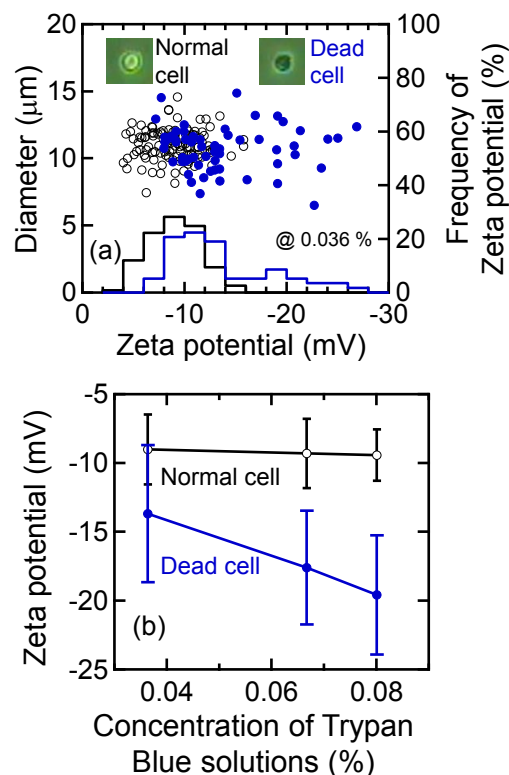


図 1 Histograms of ζ distributions in normal cells and dead cells of IM-9 cells by ECM with trypan blue stain, at the viability of 70-80 % with the apoptosis inducer in (a), and their averaged ζ values in normal cells and dead cells of IM-9 cells at different concentration of trypan blue stain in (b).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文 (査読有)] (計 3 件)

1) Y. Nakajima, T. Ukai, T. Shimizu, K. Ogata, S. Iwai, N. Takahashi, A. Aki, T. Mizuki, T. Maekawa and T. Hanajiri, "Detection and analysis of targeted biological cells by electrophoretic Coulter method," *Anal. Chem.*, 89, 12450-12457 (2017), DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03533.

2) H. Shimoshige, Y. Nakajima, H. Kobayashi, K. Yanagisawa, Y. Nagaoka, S. Shimamura, T. Mizuki, A. Inoue, T. Maekawa, "Formation of Core-Shell Nanoparticles Composed of Magnetite and Samarium Oxide in *Magnetospirillum magneticum* Strain SS-1," *PLoS ONE*, 12, e0170932 (2017), DOI: 10.1371/journal.pone.0170932.

3) S. Lettieri, A. Camisasca, M. d'Amora, A. Diaspro, T. Uchida, Y. Nakajima, K. Yanagisawa, T. Maekawa and S. Giordani, "Far-red fluorescent carbon nano-onions as a biocompatible platform for cellular imaging," *RSC Advances*, 7, 45676-45681 (2017), DOI: 10.1039/c7ra09442f.

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) Y. Nakajima, T. Ukai, T. Mizuki, T. Hanajiri, "Electrophoretic Coulter method for identification of normal cells or dead cells", 5th European Conference on MicroFluidics 2018, p45, March 1st, 2018, (Strasbourg, France) Oral presentation.
- 2) T. Mizuki, K. Hirata, T. Uchida, Y. Nakajima, T. Maekawa, "Synthesis and analysis of rare sugar functionalized graphene oxide", 2017 Annual meeting of the Society for Glycobiology, B164, p105-106, November 7th, 2017 (USA) Poster presentation.
- 3) Y. Nakajima, T. Ukai, T. Mizuki, T. Hanajiri, "Detection and analysis of targeted biological cells by electrophoretic Coulter method," ICMAT2017, O-12-4, June 23rd, 2017 (Singapore) Oral presentation.
- 4) T. Mizuki, K. Hirata, T. Uchida, Y. Nakajima, T. Maekawa, "Synthesis of rare sugar functionalized graphene oxide," ICMAT2017, M-03-4, June 20th, 2017 (Singapore) Oral presentation.
- 5) K. Hirata, T. Uchida, Y. Nakajima, T. Mizuki, "Synthesis of rare sugars containing neoglycolipids by enzyme reaction," ICMAT2017, AA-04-5, June 20th, 2017 (Singapore) Oral presentation.
- 6) Y. Nakajima, "Application of Nano/Micro Electronics to Bio-Devices," 2016 RBS International Workshop on Biocompatible Nanomaterials and Nanodevices for Bio-Medical Applications, December 15th, 2016 (Malaysia, Kuala Lumpur)
- 7) K. Hirata, T. Uchida, Y. Nakajima, T. Mizuki, "Synthesis of rare sugar conjugated glycolipids by combination of chemical reaction and enzymatic reaction", 2016 Annual meeting of the Society for Glycobiology, B188, p219, November 20th, 2016 (USA) Poster presentation.
- 8) Y. Nakajima, T. Ukai, T. Hanajiri, "Verification of the validity of electrophoretic Coulter method for the detection of targeted biological cells," International Conference on Science & Technology - Future challenges & solutions (STFCS-2016), August 9th, 2016 (India, Mysor) Invited speaker.
- 9) 下重裕一、中島義賢、柳澤圭一、小林英城、水木徹、島村繁、井上明、前川透, "Magnetospirillum magneticum RSS-1 株におけるマグネタイトと酸化サマリウムのコアシェルナノ粒子の形成," 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター
- 10) 小堺悠可、平田圭亮、内田貴司、中島義賢、水木徹, "希少糖を用いた酸化グラフェンの還元および機能性の付与," 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 29 日, 札幌コンベンションセンター

- 11) Y. Nakajima, "Multiple-functionalized and high-sensitive electrophoretic Coulter method to detect and analyze targeted biological cells," 13th International Symposium on Bioscience and Nanotechnology, November 25th, 2015 (Saitama, Japan) Invited speaker.
- 12) H. Kozakai, K. Hirata, T. Uchida, Y. Nakajima, T. Mizuki, "Single-step reduction and functionalization of graphene oxide via rare sugars," ICMAT2015 & IUMRS-ICA2015, Z9-3, July 2nd, 2015 (Singapore) Oral presentation.
- 13) T. Shimizu, T. Mizuki, T. Ukai, Y. Nakajima, T. Hanajiri, "The improvement of accuracy and precision in electrophoretic Coulter method," ICMAT2015 & IUMRS-ICA2015, T3.1-2, June 30th, 2015 (Singapore) Oral presentation.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中島 義賢 (NAKAJIMA Yoshikata)
東洋大学・学際・融合科学研究科・准教授
研究者番号：40408993

(4) 研究協力者

水木 徹 (MIZUKI Toru)
東洋大学・学際・融合科学研究科・准教授
研究者番号：80408997

鵜飼 智文 (UKAI Tomofumi)
東洋大学・バイオ・ナノエレクトロニクス
研究センター・研究助手
研究者番号：60531879

花尻 達郎 (HANAJIRI Tatsuro)
東洋大学・理工学部・教授
研究者番号：30266994