

平成21年6月4日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19360369

研究課題名（和文） 細胞情報センシングのための電気化学マイクロデバイスの構築

研究課題名（英文） Electrochemical microdevice for cell-based assays

研究代表者

鈴木 博章（SUZUKI HIROAKI）

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・教授

研究者番号：20282337

研究成果の概要：

極微量の培養液中で極少数の細胞の機能を解析するためのマイクロデバイスを開発することを目的とした。このために、電気化学的反応を利用した送液機構の集積化、培養培地をサンプリングし、なおかつ電気化学的に測定する機構を新しく構築した。構築した目的別のいくつかのマイクロデバイスを用いて、細胞の機能や応答をナノリットルスケールで解析できることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：バイオセンサー

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

DNAチップ、プロテインチップの研究はこの10年間で華々しく展開し、分子生物学等の基礎的分野に加え、創薬や医療診断などへの応用が進められている。このようなバイオチップテクノロジーの次のターゲットとして、細胞チップの研究開発が今後10年以内に飛躍的に展開するものと予想されている。特にその応用分野として、創薬スクリーニングの際の動物実験代替法や、膨大な合成化学物質群の生体・環境への影響を評価するツールとして注目されている。このような細胞チップの開発は、創薬に費やされるコストや時間を削減するばかりでなく、世界的に問題と

なっている動物実験の大幅な削減にもつながる。

2. 研究の目的

本研究では、上述のような次世代細胞センシングの基盤となる細胞チップデバイスを開発することを目的とする。特に本研究では、高感度な電気化学センシングシステムを備えた次世代の細胞チップデバイスを開発するために、(1)細胞微小環境を制御した細胞アレイ技術、(2)細胞情報の高感度検出技術、(3)オンチップ超微量送液ネットワークシステムの3つの基盤技術を開発し、これらを組み合わせ合わせた電気化学細胞チップシステムを構

築する。

3. 研究の方法

本研究で使用したデバイスの多くでは、細胞を培養したり、培地等を貯留する微小容器および液体を輸送する微小流路の形成が必要になるが、これは厚膜フォトレジスト (MicroChem 製、SU-8) で形成した微小な型に、ポリジメチルシロキサン (PDMS) プレポリマー溶液を流し込んで硬化させ、はがすことにより行った。

送液デバイス、センシングデバイスで電気化学的原理に基づくものは、基本的には共通の構造を有している。微小3電極系は、ガラス基板上にフォトリソグラフィにより形成した。一部の変則的な場合を除き、作用極と対極には白金を、参照極には銀/塩化銀を使用した。電位制御はポテンショスタットにより行った。送液機構の評価は、フルオレセイン溶液を流し、蛍光顕微鏡下で写真撮影することにより行った。

細胞は、ラット初代肝細胞、ヒト肝がん細胞 (Hep G2)、マウス繊維芽細胞を使用した。これらの細胞は、エタノール滅菌したデバイス中に播種した。初代肝細胞は、肝臓の重要な機能の一つであるアンモニア代謝能の評価に使用した。Hep G2 および繊維芽細胞は、抗がん剤などの薬剤による細胞傷害の評価に使用した。

4. 研究成果

細胞機能解析を行うために、微量な流体を移動させる機構が必要である。これを行うために、2つの方法を検討した。一つはエレクトロウエットリング、もう一つは気泡の生成消滅である。いずれの方法も、電気化学的に制御できる。エレクトロウエットリングは電極電位を変えることにより電極表面の濡れ性を制御する手法である。PDMS を用い、電極部を細くした流路構造を用いることによ

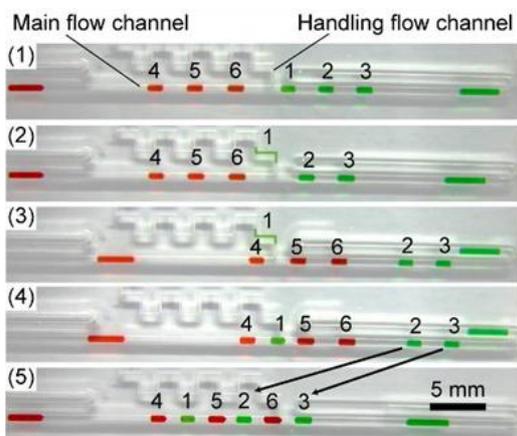


図1 T字型流路によるプラグの入れ替え操作 (Anal. Chem., **80** (2008) 6206)

り、電極電位により開閉を制御できるバルブを実現した。この研究は将来的に本研究で開発したような種々のデバイスへの適用が考えられるため、一つの独立した流れとして研究を継続した。その結果、マイクロ突起構造を電極に形成することによりエレクトロウエットリングをより効率的に起こすことができることや、pH 応答性電極を含む変則的三電極系を用いることにより、pH 応答性バルブが構築できることを示した。

このようなマイクロシステムでは、通常、連続的な流体が用いられる。しかし、細胞機能の評価を行うためには、この方法では多くの溶液量を必要とするため、好ましくない。この問題を解決するには、溶液を微小な断片 (プラグ) の形で流路中に置き、操作するのが有利である。プラグ方式では、(1)一つの流路中で多数の溶液を扱える、(2)必要とする溶液量を桁違いに少なくできる、(3)混合が迅速である、等の利点がある。多数のプラグを効率的に処理するため、メイン流路と操作用流路からなる T 字型流路を使用した。操作用流路を使用することにより、プラグの計量、分割、混合、並べ替え等の操作を行うことができる。これを用いて、複数サンプル中の酵素反応の解析が一括して行えることを示した。

また、溶液プラグを送液するために、水素気泡を生成し、その体積変化により溶液を輩出するインジェクタと、これにより形成された溶液プラグ列を順次移動させる送液システムも開発した。

細胞機能解析では pH 制御が至るところで必要になる。そこで、変則的3電極系を用いた電気化学的 pH スタットを作製した。参照極として、通常用いられる銀/塩化銀の代わりに、イリジウム酸化膜 pH 電極を使用した。また、作用極には銀/塩化銀を、対極にはイリジウムを使用した。pH 変化により引き起こされるわずかな電位変化により、作用極上で大電流が流れ、対極上では pH を元に戻す方向に変化が起こる。これを用いて pH 滴定が行えることを示し、さらにプロテアーゼ活性の測定に応用できることを示した。

微量化学物質を検出する方法として、電気化学発光がある。細胞機能解析デバイスの基礎として $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ を用い、自動的に電気化学発光によるアミノ酸の検出を行うデバイスを作製した。エレクトロウエットリングにより自動的に開くバルブ、pH 制御機構、フォトダイオードによる検出系を搭載した。pM オーダーのプロリンを検出することができた。電気化学発光は蛍光検出と異なり、バックグラウンドの影響を受けないため、高感度化に適している。これらを活用して、細胞膜中のトランスポーターの機能を調べるデバイスも作製したが、これについては現在引き続き検討を行っている。

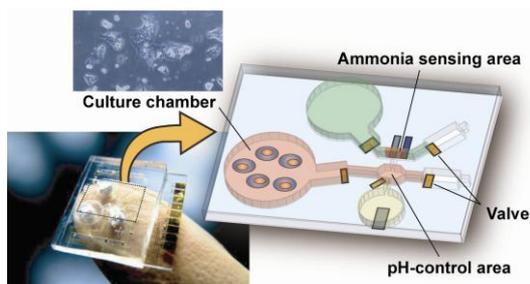


図2 チップ上で肝細胞を培養し、アンモニアの代謝を直接測定するマイクロチップ。エレクトロウェットングにより、nL オーダーの培地を一定時間ごとに抽出(Lab Chip, 9 (2009) 35)。

これらの基盤技術を組み合わせて、細胞の機能評価を行った。まず初代肝細胞を培養チャンバ ($1 \mu\text{l}$) に 1 mM のアンモニアを含む培地とともに播種した (図2)。培養チャンバから培地をサンプリングする機構にはエレクトロウェットングを用い、播種後 30 分間毎に 12 nl の培地をサンプリングした。サンプル中のアンモニアは近傍に形成したセバリングハウス型アンモニアガス電極により定量した。アンモニア濃度の変化は培養 3 時間に渡ってモニタリングでき、また培地必要量は従来の 2000 分の 1 以下であるにも関わらず従来法とほぼ一致する結果が得られた。送液、センシングをすべて電気化学的原理に基づいて構築しており、さらなる微小化、集積化も可能である。

次に、さらに幅広い用途の細胞試験に応用するために、細胞密度の調節、分析試薬の調製、添加などといった操作を全てチップ内で行えるプラグ型溶液操作を用いたチップデバイスを構築した。図3に試作デバイスの写真と構造図を示す。このデバイスでは、流路上流に設けているT字に分岐した流路によって細胞懸濁液や各種溶液を計量・希釈し、様々な条件のプラグを作製するとともに、下流に設けた複数の培養領域で細胞評価試験を行う。まず、抗がん剤であるマイトマイシンCおよびフルオロウラシルの薬効試験を行った。つまり、それぞれの薬剤濃度の異なるプラグを作製し、Hep G2 に作用させることによって、抗がん剤効果の濃度依存性を評価した。さらに、本システム内で、細胞活性の1つの指標となるグルコース代謝量を測定し、その細胞密度依存性を評価した。この測定原理には、オンチップ蛍光分析を用いた。抗がん剤、グルコース代謝のどちらにおいても、一般的な培養ディッシュと同等の結果が得られ、培地消費量を 1000 分の 1 に低減し、様々な細胞分析が可能であることが示された。

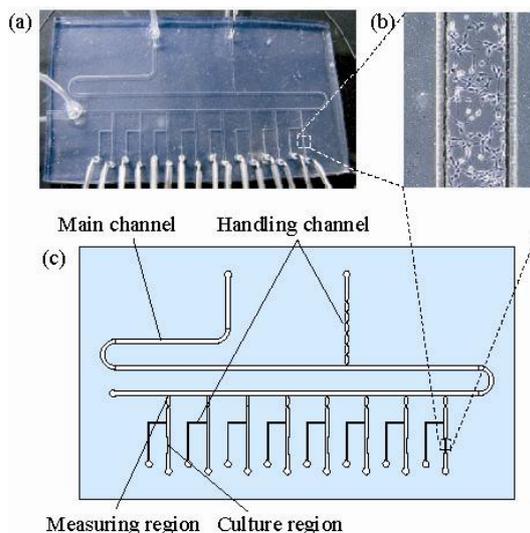


図3 プラグ型溶液操作を利用した細胞培養デバイス。8つの細胞培養マイクロ空間を備え、その上流のT字型流路部では溶液の計量・分割・混合を行い、様々な培養条件を実現できる。(a)チップ全体の写真。(b)細胞培養領域にて培養した細胞の位相差顕微鏡写真。(c)チップ全体の概略図。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

すべて査読あり。

- [1] K. Morimoto, S. Yamaguchi, J. Fukuda, and H. Suzuki, Towards microsystems for automatic acquisition of in vivo gastrointestinal information, *J. Appl. Phys.*, in press.
- [2] Y. Shimizu, A. Takashima, W. Satoh, F. Sassa, J. Fukuda, and H. Suzuki, Biochip with integrated pumps for plug-based sequential exchange of solutions, *Sens. Actuators B*, in press.
- [3] A. Kabata, K. Okamura, H. Suzuki, Y. Kishigami, M. Kikuchi, and M. Haga, Prototype micropump for insulin administration based on electrochemical bubble formation, *J. Pharm. Sci.*, in press.
- [4] W. Satoh, S. Takahashi, F. Sassa, J. Fukuda, and H. Suzuki, On-chip culturing of hepatocytes and monitoring their ammonia metabolism, *Lab Chip*, **9** (2009) 35-37.
- [5] S. Yamaguchi, K. Morimoto, J. Fukuda, and H. Suzuki, Electrowetting-based pH- and biomolecule-responsive valves and pH filters, *Biosens. Bioelectron.*, **24** (2009) 2171-2176.
- [6] F. Sassa, K. Morimoto, W. Satoh, and H. Suzuki, Electrochemical techniques for

microfluidic applications, *Electrophoresis*, **29** (2008) 1787-1800.

[7] W. Satoh, H. Hosono, H. Yokomaku, K. Morimoto, S. Upadhyay, and H. Suzuki, Integrated electrochemical analysis system with microfluidic and sensing functions, *Sensors*, **8** (2008) 1111-1127.

[8] F. Sassa, J. Fukuda, H. Suzuki, Microprocessing of liquid plugs for bio / chemical analyses, *Anal. Chem.*, **80** (2008) 6206-6213.

[9] H. Yokomaku, W. Satoh, J. Fukuda, H. Suzuki, Electrowetting on gold electrodes with microscopic three-dimensional structures for microfluidic devices, *J. Appl. Phys.*, **104** (2008) 064910.

[10] K. Morimoto, M. Toya, J. Fukuda, and H. Suzuki, Automatic electrochemical micro-pH-stat for biomicrosystems, *Anal. Chem.*, **80** (2008) 905-914.

[11] W. Satoh, H. Yokomaku, H. Hosono, N. Ohnishi, and H. Suzuki, Electrowetting-based valve for the control of the capillary flow, *J. Appl. Phys.*, **103** (2008) 034903.

[12] H. Hosono, W. Satoh, M. Toya, K. Morimoto, J. Fukuda, and H. Suzuki, Microanalysis system with automatic valve operation, pH regulation, and detection functions, *Sens. Actuators B*, **132** (2008) 614-622.

[13] H. Hosono, W. Satoh, J. Fukuda, and H. Suzuki, On-chip handling of solutions and electrochemiluminescence detection of amino acids, *Sens. Actuators B*, **122** (2007) 542-548.

[14] W. Satoh, Y. Shimizu, T. Kaneto, and H. Suzuki, On-chip microfluidic transport and bio/chemical sensing based on electrochemical bubble formation, *Sens. Actuators B*, **123** (2007) 1153-1160.

[15] N. Nashida, W. Satoh, J. Fukuda, and H. Suzuki, Electrochemical immunoassay on a microfluidic device with sequential injection and flushing functions, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007) 3167-3173.

[16] M. Hashimoto, N. Sakamoto, S. Upadhyay, J. Fukuda, and H. Suzuki, Enzyme electrode formed by evaporative concentration and its performance characterization, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007) 3154-3160.

[17] K. Morimoto, S. Upadhyay, T. Higashiyama, N. Ohgami, H. Kusakabe, J. Fukuda, and H. Suzuki, Electrochemical micro system with porous matrix packed-beds for high-throughput enzyme analysis, *Sens. Actuators B*, **124** (2007) 477-485.

[18] H. Hosono, W. Satoh, J. Fukuda, and H. Suzuki, Micro analysis system based on electrochemiluminescence detection, *Sensors and*

Materials, **19** (2007) 191-201.

[学会発表] (計 30 件)

(国内学会)

[1] 高島篤司、福田淳二、鈴木博章、化学的マイクロポンプと微小流路ネットワークによる送液プログラミングとその化学分析への応用、電気化学会第 76 回大会 (第 47 回化学センサ研究発表会)、京都大学、2009.3.30.

[2] 佐々文洋、Hind Laghzali、福田淳二、鈴木博章、極微量溶液プラグのクロメトリック分析、電気化学会第 76 回大会 (第 47 回化学センサ研究発表会)、京都大学、2009.3.30.

[3] 安達貴広、福田淳二、鈴木博章、フィードバック機能による微小銀/塩化銀参照電極電位の安定化、電気化学会第 76 回大会 (第 47 回化学センサ研究発表会)、京都大学、2009.3.30.

[4] 佐々文洋、Hind Laghzali、福田淳二、鈴木博章、マイクロ溶液プラグのクロメトリック分析、平成 21 年電気学会全国大会、北海道大学、2009.3.17.

[5] 安達貴広、福田淳二、鈴木博章、変則三電極系によるフィードバック機能を有する微小銀/塩化銀参照電極、第 25 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、沖縄コンベンションセンター、2008.10.23.

[6] 高島篤司、横幕浩臣、佐藤航、福田淳二、鈴木博章、マイクロプラグ中の電極活物質のクロメトリーによる高感度検出、第 25 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、沖縄コンベンションセンター、2008.10.23.

[7] 高島篤司、横幕浩臣、佐藤航、福田淳二、鈴木博章、微細構造上でのエレクトロウエッティングとそのマイクロフルーイディック素子への応用、第 25 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、沖縄コンベンションセンター、2008.10.22.

[8] 岡村健太郎、鈴木博章、福田淳二、田崎剛、福田始弘、三次元電極を利用した免疫センサ、化学工学会第 40 回秋季大会、東北大学、2008.9.26.

[9] 佐々文洋、福田淳二、鈴木博章、超微量液体プラグ操作による 生化学分析システムの構築、化学工学会第 40 回秋季大会、東北大学、2008.9.25.

[10] 岡村健太郎、橋本正利、鈴木博章、福田淳二、田崎剛、福田始弘、三次元マイクロピラー電極を利用したマイクロフロー免疫センサ、平成 20 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会、仙台市戦災復興記念館、2008.6.13.

[11] 山口茂輝、森本克也、福田淳二、鈴木博章、消化管内マイクロカプセル型診断デバイスのための高機能集積化生化学分析システムの構築、電気化学会第 75 回大会 (第 45 回

- 化学センサ研究発表会)、山梨大学、2008.3.31.
- [12] 佐々文洋、福田淳二、鈴木博章、バイオ／ケミカルマイクロプロセッサのための要素技術の検討、電気化学会第 75 回大会 (第 45 回化学センサ研究発表会)、山梨大学、2008.3.31.
- [13] 佐藤航、福田淳二、鈴木博章、電気化学的原理に基づく肝細胞のアンモニア代謝測定システムの構築、電気化学会第 75 回大会、山梨大学、2008.3.31.
- [14] 佐々文洋、福田淳二、鈴木博章、溶液プラグ操作による汎用的生化学分析システム、平成 20 年電気学会全国大会、福岡工業大学、2008.3.20.
- [15] 佐藤航、福田淳二、鈴木博章、電気化学センサを搭載した細胞チップデバイスの構築、化学工学会第 73 年会、静岡大学、2008.3.17.
- [16] 森本克也、山口茂輝、福田淳二、鈴木博章、生体内酵素活性測定のための高機能集積化マイクロシステム、化学工学会第 73 年会、静岡大学、2008.3.17.
- [17] 山口茂輝、森本克也、戸谷真理子、福田淳二、鈴木博章、マイクロプロテアーゼ活性測定システム、第 24 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、タワーホール船堀、2007.10.17.
- [18] 大西範幸、細野裕樹、佐藤航、森本克也、戸谷真理子、福田淳二、鈴木博章、複数機能を集積化したマイクロ電気化学発光センシングシステムの構築、第 24 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、タワーホール船堀、2007.10.16.
- [19] 山口茂輝、森本克也、戸谷真理子、福田淳二、鈴木博章、エレクトロウエットニングによる pH 応答性バルブの構築、電気化学会秋季大会 (第 44 回化学センサ研究発表会)、東京工業大学、2007.9.20.
- [20] 高島篤司、清水義文、佐藤航、福田淳二、鈴木博章、マイクロ溶液プラグによる逐次反応型マイクロバイオセンシングシステム、電気化学会秋季大会 (第 44 回化学センサ研究発表会)、東京工業大学、2007.9.20.
- [21] 横幕浩臣、佐藤航、斎藤靖明、細野裕樹、サンジェイ・アパジャー、福田淳二、鈴木博章、毛細管現象を利用した送液機構と微小化学分析チップへの応用、平成 19 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会、筑波大学、2007.7.2.
- [22] 橋本正利、岸本朋子、福田淳二、鈴木博章、西泰治、活性酸素測定用マイクロフルーイデイクスシステムの構築、平成 19 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会、筑波大学、2007.7.2.

(国際会議)

- [23] S. Yamaguchi, K. Morimoto, J. Fukuda, and

H. Suzuki, Electrochemical pH-responsive valve for automatic sampling, The 7th IEEE Conference on Sensors, Lecce, Italy, October 29, 2008.

[24] H. Suzuki, Recent Progress of electrochemical microanalysis systems, The 12th International Meeting on Chemical Sensors, Columbus, USA, July 15, 2008 (Invited).

[25] W. Satoh, S. Takahashi, F. Sassa, J. Fukuda, H. Suzuki, Electrochemical microsystem for monitoring of ammonia metabolism of hepatocytes, The 12th International Meeting on Chemical Sensors, Columbus, USA, July 15, 2008.

[26] F. Sassa, J. Fukuda, H. Suzuki, Microanalysis system based on the processing of liquid plugs, The 12th International Meeting on Chemical Sensors, Columbus, USA, July 15, 2008.

[27] H. Suzuki, Integrated electrochemical microsystems, The 7th East Asian Conference on Chemical Sensors, Singapore, December 2007 (Invited).

[28] K. Morimoto, J. Fukuda, and H. Suzuki, Micro analysis system for gastro intestinal components with an integrated micro automatic pH-stat, The 6th IEEE Conference on Sensors, Atlanta, USA, October 29, 2007.

[29] Y. Shimizu, W. Satoh, J. Fukuda, and H. Suzuki, On-chip manipulation of nanoliter liquid plugs for biosensing applications, The 6th IEEE Conference on Sensors, Atlanta, USA, October 29, 2007.

[30] W. Satoh, H. Hosono, M. Toya, K. Morimoto, J. Fukuda, and H. Suzuki, Microanalysis system based on electrochemiluminescence with automatic mixing and pH-regulation functions, Transducers' 07, Lyon, France, June 14, 2007.

[図書] (計 2 件)

[1] 鈴木博章, 「集積化バイオ・化学センシングシステム」, 先進化学センサ, 電気化学会化学センサ研究会編, ティー・アイ・シー, 2008, pp.281-286.

[2] 鈴木博章, 「センシングシステムと送液システムの複合化, 集積化」, バイオセンサ・ケミカルセンサ事典, テクノシステム, 2007, pp.809-818.

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

[1] 発明の名称: 生乳検査装置並びにこれを用いた体細胞数測定方法及び家畜症状診断方法、出願人: 株式会社クラレ、発明者: 鈴木博章、西泰治、二階堂祐子、綾野賢、岡桂子、特願 2009-75953、出願日: 2009 年 3 月

26日、国内

[2] 発明の名称：自動溶液注入デバイス、出願人：国立大学法人筑波大学、シャープ株式会社、発明者：鈴木博章、高島篤司、三枝理伸、赤木与志郎、特願 2009-79027、出願日：2009年3月27日、国内

[3] 発明の名称：培養方法及び培養装置、発明者：福田 淳二、鈴木博章、稲葉 里奈、岡村健太郎、出願人：国立大学法人筑波大学、特開、2008-295382、出願日：2007年5月31日、国内

[4] 発明の名称：送液装置及び送液制御方法、発明者：鈴木博章、出願人：理想科学工業株式会社、国立大学法人筑波大学、特開 2009-66464、出願日：2007年9月10日、国内

[5] 発明の名称：微小参照電極デバイス、出願人：国立大学法人筑波大学、発明者：鈴木博章、安達貴広、特願 2008-270073、出願日：2008年10月20日、国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木博章(SUZUKI HIROAKI)
筑波大学・大学院数理物質科学研究科・教授
20282337

(2) 研究分担者

福田 淳二(FUKUDA JUNJI)
筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師
80431675
芳賀 信(HAGA MAKOTO)
東京理科大学薬学部・教授
70110666