

平成 22 年 3 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710094  
 研究課題名 (和文) 電気化学的なナノプロセッシングに基づくバイオアクティブ界面の創出

研究課題名 (英文) Bioactive interface based on electrochemical nano-processing

## 研究代表者

梶 弘和 (KAJI HIROKAZU)  
 東北大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号：70431525

## 研究成果の概要 (和文)：

原子間力顕微鏡 (AFM) システムへの電気化学バイオリソグラフィ技術の搭載と、それによる生体分子および細胞の基板上へのパターンニングを検討した。先端を電極化した AFM プローブを作製し、乾電池をプローブ電極での電解反応の電源とすることで、容易に市販の AFM システムへの集積が可能であった。本システムにより、パターンサイズの微細化および基板表面構造の in-situ 観察を可能にした。さらに、サブセルラーレベルでの細胞伸展方向の in-situ 制御を実証した。

## 研究成果の概要 (英文)：

The electrochemical-based biolithography technique was integrated into an ordinary atomic force microscope (AFM) configuration to pattern proteins and living cells. The patterning procedure could readily be built into an AFM system using a simply fabricated electrochemical AFM probe with an AA-size dry battery. This system enabled us to decrease the pattern size and to image the electrochemically treated surface in situ. Also, in-situ directional control of cell extension was demonstrated.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：バイオチップ、バイオインターフェース、自己組織化、生体材料、細胞、リソグラフィ、パターンニング

## 1. 研究開始当初の背景

生体分子と材料表面が接するバイオインターフェースの理解と制御は、基礎生物学をはじめ、バイオテクノロジーの多くの局面で非常に重要である。生体分子と材料表面の相

互作用は、生体適合性に配慮した医用材料の表面処理など、従来からの重要な検討課題であったが、昨今の細胞組織工学やバイオチップ・デバイス工学の急速な進展を受けて、バイオインターフェース研究の重要性・学際性

は益々高まっている。特に、ポストゲノム時代のバイオインターフェースには、高次機能を有するタンパク質や細胞の機能を解析し、さらにその機能を効果的に利活用する「場」としての役割が強く求められている。その実現には、脆弱な生体分子を自在に操作し、その活性を維持したまま界面に配置固定する技術が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、微小電極における局所反応を利用して、擬似的な生理環境下でタンパク質や細胞を基板上にパターンニングする技術を「電気化学バイオリソグラフィ」と称して開発している。ヘパリンやアルブミンなどの抗血栓性分子を吸着させた表面はタンパク質非吸着性であるが、次亜臭素酸などの強力な酸化剤によってこれらの分子は表面から瞬時に脱着し、タンパク質吸着性となる。次亜臭素酸は少量の臭化物イオンを加えた生理緩衝液中で電極に酸化電位を印加することで生成できるため、ヘパリンやアルブミンで不活性化した基板表面の局所を微小電極で活性化することにより、任意の領域にタンパク質や細胞を接着させることができる。既存のパターンニング技術が細胞培養に先立って接着部位を基板上に作製するレディメイド方式であるのに対して、当技術は水溶液中で行えるマイルドなリソグラフィであるため、細胞存在下においても基板表面の改質が可能である。また、当技術に必要なものは電極と乾電池程度の電源であるため、マイクロ流路デバイスへの搭載が容易である。つまり、半閉鎖系である流路内部に必要な応じてタンパク質や細胞の接着を誘導することができる。以上のように、電気化学バイオリソグラフィ技術は、従来の生体分子のパターンニング法と比較していくつかの利点を有しているが、これまでのマイクロメートルスケールの電極（例えば先端径が  $10\ \mu\text{m}$ ）を用いて得られる典型的なパターンサイズは数十～数百  $\mu\text{m}$  の範囲であった。また、当技術による表面改質反応も分子レベルでは未解明な部分も残している。そこで本研究では、パターンサイズの微細化と表面構造の *in-situ* 観察を念頭に、市販の AFM システムへの電気化学バイオリソグラフィ技術の搭載と、それによる生体分子のパターンニングを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気化学 AFM プローブの作製

図 1 にプローブ作製の模式図を示す。PtIr コート AFM プローブ (EFM, NanoWorld) に導線をハンダ付けした後、プローブ全体に Ti 薄膜 (膜厚  $100\ \text{nm}$ ) をスパッタリングにより形成させた。次に、空気中で Ti 薄膜表面を

酸化した後に、このプローブを  $200\ \text{mM}$  3-メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン (3-MPS)/エタノール溶液に 12 時間浸漬し、3-MPS の自己組織化膜を導入した。続いて、パリレン C をプローブ表面に蒸着し絶縁膜 (膜厚  $900\ \text{nm}$ ) を形成させた。その後、マイクログラインダーを用いた機械研磨により、プローブ先端の絶縁膜を除去し電極を露出させた。

### (2) 基板の前処理

洗浄した石英基板を  $5\ \text{mg mL}^{-1}$  ポリエチレンイミン (PEI) 水溶液および  $2\ \text{mg mL}^{-1}$  ヘパリン水溶液に順に 30 分ずつ浸漬させ、基板表面に PEI/ヘパリンのポリイオンコンプレックス膜を形成させた。

### (3) AFM システム

電気化学バイオリソグラフィ技術を集積する AFM システムとしては、NanoWizard (JPK Instruments) を使用した。基板表面の観察およびパターンニングはいずれも、 $25\ \text{mM}$  KBr を含む  $0.1\ \text{M}$  リン酸バッファー中でコンタクトモードにて行った。先端に電極を造り込んだ AFM プローブと Pt プレートを経由してエポキシ樹脂でプローブホルダーに固定し、自作の溶液チャンバー上にセットした (図 2)。基板表面をパターンニングする際には、プローブ先端で次亜臭素酸を生成するために、単三乾電池のカソードおよびアノードを、プローブ電極および Pt プレートにそれぞれ接続した。

## 4. 研究成果

図 3 a に先端に電極を露出させた AFM プローブの SEM 像を示す。機械研磨によりバリが出ているものの、図 3 b のサイクリックボルタモグラム (CV) から、研磨によりプローブ先端に電極が露出していることが確認できる。CV 測定は、プローブ全体を  $25\ \text{mM}$  KBr を含む  $0.1\ \text{M}$  リン酸バッファー中に浸漬して行った。プローブ先端を研磨する前には、 $\text{Br}^-$  の酸化電流は検出されず、電流成分は容量性のものであった。これは絶縁膜であるパリレン C がプローブ全体にピンホールフリーで成膜されていることを示している。プローブを作製する過程で、パリレン C の絶縁膜とプローブ表面との密着性を向上させるために、3-MPS の自己組織化膜を導入しているが、この処理を省略した場合にはファラデー電流を抑制するために 2 倍以上のパリレン C の膜厚が必要であった。プローブ先端の研磨後には、 $1.3\ \text{V}$  以上の領域で明確な  $\text{Br}^-$  の酸化電流が観測されており、研磨により先端の絶縁膜が局所的に除去されていることがわかる。 $1.7\ \text{V}$  における酸化電流値は約  $0.6\ \text{nA}$  であり、直径  $10\ \mu\text{m}$  のディスク電極を用いた場合の約  $1/500$  であった。これより、プローブ先端の電極形状をディスク型と仮定するとその直径は約  $500\ \text{nm}$  であると見積もられた。

図4aはPEI/ヘパリン膜を修飾した石英基板のAFM像である。電極を造り込んだことによりプローブ先端が鈍っているため、通常のAFMプローブを用いた場合に比べイメージの解像度は低い。観察されたランダムな表面構造はPEI/ヘパリン膜によるものと考えられる。また、同じ領域を何度かスキャンしても得られる像に殆ど変化は認められず、コンタクトモードスキャンによる機械的な膜の剥離は起きていないことが示唆された。図4bは、図4aと同じ領域をプローブ先端で次亜臭素酸を電解生成しながらスキャンし、その直後に再度取得したAFM像である。観察された平滑な表面構造は下地の石英基板表面であると考えられ、電解生成した次亜臭素酸によりPEI/ヘパリン膜が基板から脱着したことが示唆された。図4cの蛍光顕微鏡写真は、電解処理した基板に蛍光標識したフィブロネクチンを導入したものである。フィブロネクチンの吸着領域は、スキャン領域と一致しており、プローブ先端で生成した次亜臭素酸によるPEI/ヘパリン膜の脱着を支持するものである。

図5に次亜臭素酸の電解時間と得られるパターンサイズの関係を示す。プローブ先端をAFMスキャナーで基板表面にアプローチさせてから次亜臭素酸の電解を行い、その後、蛍光標識したフィブロネクチンを導入した。図5aに示すように、フィブロネクチンの円形パターンが形成され、電解時間の増加に伴いそのサイズが拡大しているのがわかる。電解時間の平方根に対してパターン領域の直径をプロットすると(図5b)、線形的な相関が得られ、電解生成した酸化剤による基板表面の改質反応自体は速やかに進行し、酸化剤の拡散が反応の律速段階にあることが示唆された。1秒間の電解で得られたフィブロネクチンパターンの直径は2 $\mu\text{m}$ であり、これはマイクロディスク電極(直径10 $\mu\text{m}$ )を用いた場合に得られるパターンサイズと比較して1/20以下である。

図6aは、電気化学バイオリソグラフィーを搭載したAFMを用いてパターンニングしたフィブロネクチンの蛍光写真である。この基板上で細胞を培養することで、フィブロネクチンのパターン上に細胞が接着することを確認した(図6b)。さらに、基板上に接着した細胞をAFMプローブで取り除いた後、接着領域のAFM像を取得すると、細胞の焦点接着斑に対応する表面構造が確認された。

図7は、単一細胞レベルでのin-situパターンニングの一例である。予め基板上にパターンニングした単一細胞の近傍に電圧を印加したプローブをスキャンすることで、接着領域を追加した。培養を続けると、当該領域にのみ細胞の伸展が確認された。この結果から、本システムは、細胞に深刻なダメージを与え

ることなく、サブセラーレベルでの細胞伸展方向の制御が可能であることが示された。既に、マルチ細胞アレイ作製における電気化学バイオリソグラフィー技術の有用性は確認しており、本システムは、各細胞の伸展方向を制御することで、基板上にヘテロタイプの細胞ネットワークを構築するのに有用であると期待される。

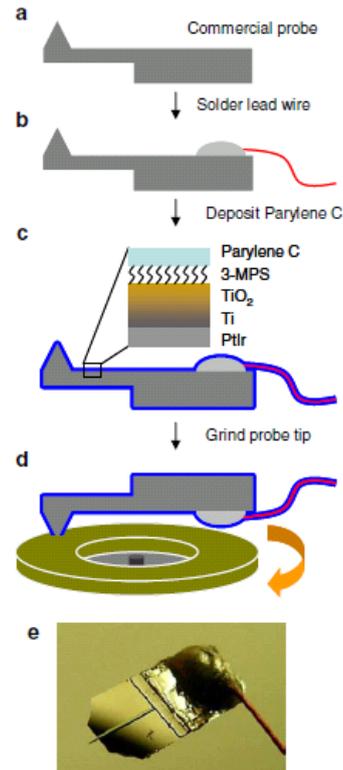


図1 電気化学AFMプローブの作製工程。

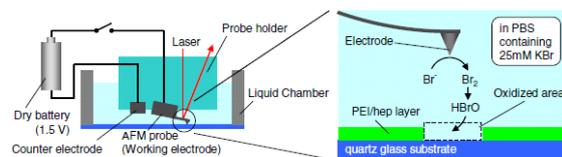


図2 電気化学バイオリソグラフィーを搭載したAFMシステムの模式図。

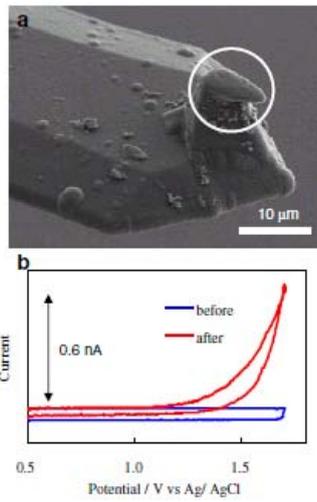


図3 プローブ先端のAFM像と電気化学的評価.

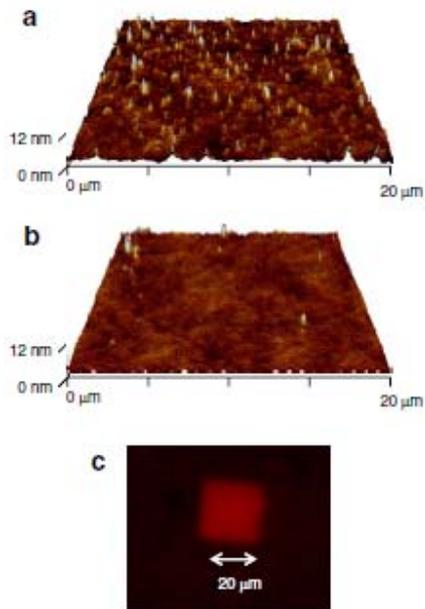


図4 電気化学的ナリソグラフィー処理前後のAFM像、および基板上に吸着したフィブロネクチンの蛍光写真.

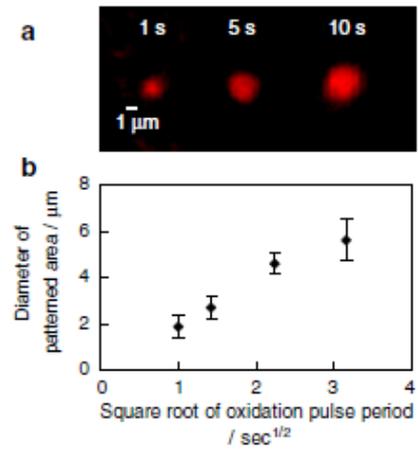


図5 電解時間とパターンサイズの関係.

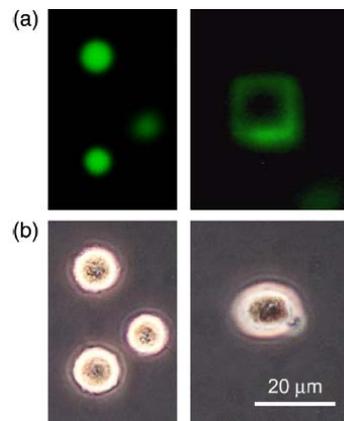


図6 フィブロネクチンおよび細胞のパターンの一例.

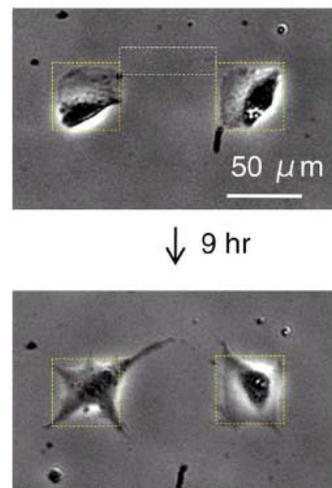


図7 細胞伸展方向のin-situ制御.

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8件)

1. Takeaki Kawashima, Takeshi Yokoi, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Transfer of two-dimensional patterns of human umbilical vein Endothelial cells into fibrin gels to facilitate vessel formation” *Chem. Commun.* 46, 2070-2072 (2010). 査読有
2. Soichiro Sekine, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Spatiotemporal subcellular biopatterning using an AFM-assisted electrochemical system” *Electrochem. Commun.* 11, 1781-1784 (2009). 査読有
3. Masahiko Hashimoto, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Selective capture of a specific cell type from mixed leucocytes in an electrode-integrated microfluidic device” *Biosens. Bioelectron.* 24, 2892-2897 (2009). 査読有
4. Hirokazu Kaji, Takeshi Yokoi, Takeaki Kawashima, Matsuhiko Nishizawa, “Controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells on detachable substrates” *Lab Chip* 9, 427-432 (2009). 査読有
5. Hirokazu Kaji, Masahiko Hashimoto, Soichiro Sekine, Takeaki Kawashima, Matsuhiko Nishizawa, “Patterning adherent cells within microchannels by combination of electrochemical biolithography technique and repulsive dielectrophoretic force” *Electrochemistry* 76, 555-558 (2008). 査読有
6. Soichiro Sekine, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Integration of an electrochemical-based biolithography technique into an AFM system” *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2711-2716 (2008). 査読有
7. Masahiko Hashimoto, Hirokazu Kaji, Maria E. Kempinen, Matsuhiko Nishizawa, “Localized immobilization of proteins onto microstructures within a preassembled

microfluidic device” *Sens. Actuator B-Chem.* 128, 545-551 (2008). 査読有

8. 梶 弘和, 川島丈明, 関根宗一郎, 西澤松彦, “In-situリソグラフィーによるバイオチップ表面の動的制御” *表面技術* 59, 371-376 (2008). 査読無

[学会発表] (計9件)

1. 梶 弘和 (受賞講演), “電気化学的手法を用いたバイオ界面プロセッシング技術の開発と応用開拓” 電気化学会第76回大会, 京都大学, 2009年3月29~31日
2. 梶 弘和 (依頼講演), “バイオインターフェースの時空間制御” 平成20年度東北大学国際高等融合領域研究所セミナー, 東北大学, 2009年1月15日
3. Hirokazu Kaji, Soichiro Sekine, Takeaki Kawashima, Matsuhiko Nishizawa, “Electrochemical-based surface patterning for biochip application” The IUMRS International Conference in Asia 2008, Nagoya, Japan, Dec. 9-13, 2008.
4. Soichiro Sekine, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Electrochemical bio-lithography at submicron scale for controlling single cell morphology” PRiME 2008 Joint International Meeting, Honolulu, Hawaii, Oct. 12-17, 2008.
5. Masahiko Hashimoto, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, “Control of cellular adhesion within microfluidic device using electrochemical biolithography and dielectrophoresis for cell-based assay” PRiME 2008 Joint International Meeting, Honolulu, Hawaii, Oct. 12-17, 2008.
6. Hirokazu Kaji, Masahiko Hashimoto, Matsuhiko Nishizawa, “Patterning adherent cells within microchannels by combination of electrochemical biolithography and dielectrophoresis” • TAS 2008, San Diego, CA, USA, Oct. 12-16, 2008, pp. 570-572.
7. 梶 弘和, 関根宗一郎, 西澤松彦, “電気化学ナノバイオリソグラフィーの開発” 電気学会センサ・マイクロマシン

部門総合研究会, 仙台, 2008年6月12,  
13日

8. Hirokazu Kaji, Soichiro Sekine, Matsuhiko Nishizawa, “Integration of electrochemical biolithography into AFM system for manipulating biological molecules” Biosensors 2008, Shanghai, China, May 14-16, 2008.
9. 関根宗一郎, 梶 弘和, 安部 隆, 西澤松彦, “電気化学ナノバイオリソグラフィによる細胞形態制御” 電気化学会第75回大会, 山梨大学, 2008年3月29~31日

[図書] (計1件)

1. 梶 弘和, 西澤松彦, “電気化学反応を用いた細胞接着技術” *細胞分離・操作技術の最前線*, 監修: 福田敏男, 新井史人 (シーエムシー出版, 2008), pp. 187-196.

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: 細胞または組織の培養制御装置とその方法

発明者: 西澤松彦, 梶 弘和, 末永智

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構

種類: 特許権

番号: 特許第4204943号

取得年月日: 2008年10月24日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶 弘和 (KAJI HIROKAZU)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 70431525

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: