

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560808

研究課題名（和文） 高度集積化多機能バイオケミカルイメージングチップの創製と組織機能解析への応用

研究課題名（英文） Development of Highly Integrated Multifunctional Biochemical Imaging Chip and Its Application to Tissue Function Analysis

研究代表者

鈴木 正康（SUZUKI MASAYASU）

富山大学・大学院理工学研究部（工学）・教授

研究者番号：70226554

研究成果の概要（和文）：蛍光センサ色素や生体由来の分子識別素子を複数回重ねてマイクロコンタクトプリンティングすることで、一つのチップ上に複数種の極微小オプティカルバイオケミカルセンサを構築すると共に、作製したオプティカルバイオケミカルセンサを用いて化学物質の2次元的な分布の経時変化を画像化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Several kinds of micro optical biochemical sensors were integrated on one chip by stamping fluorescence sensor dyes and enzymes repeatedly. By using this integrated biochemical sensors chip, planar and temporal distribution of chemical species could be successfully visualized as the changes of fluorescence intensity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

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

近年、生命科学研究におけるイメージングの重要性が急速に増している。バイオチップもDNAチップ、プロテインチップから細胞チップへとつながり、今後組織チップの時代の到来が予想される。そこでは動植物組織や器官中におけるダイナミックな挙動を、物質移動情報も含めてリアルタイムで可視化する必要がある。そのような背景から単一細胞に対応できる高い分解能（解像度）を有し、かつ多項目の計測が可能な2次元イメージング技術が強く要望されている。ところでヒ

トの目を模して作られた現在のデジタルカメラでは数十 μm 程度の大きさのホットダイオードが数百万個並んだCCDカメラに、赤、緑、青の透過フィルターが規則正しくならんだ原色フィルターを組み合わせることでカラー画像を取得している。そこで研究代表者はこのデジタルカラーカメラの構造を模した多項目同時計測が可能なケミカルイメージングセンサを、細胞レベルの分解能で創製しようと考えた。すなわち、直径10 μm 程度のバイオケミカルセンサを、一つのチップ上に2～4種類、交互に規則正しくアレイ状に数十～

数百万個並べることにより全く別の世界を見れる「バイオケミカル・アイ」を創製できると考えた。そこで本研究では、そのような蛍光型センサの集積化技術と、蛍光型センサを用いたイメージング技術の基礎について検討を行うことにした。

2. 研究の目的

一つのチップ上にマイクロコンタクトプリンティングを複数回重ねて行うことで、複数の蛍光プローブ色素や酵素をパターンニングし、複数種の極微小バイオケミカルセンサをデジタルカメラと同様に、スポット径 $10\mu\text{m}$ で、アレイ状にかつ交互に形成する。さらに従来不可能であった極低倍率での蛍光イメージングを可能にするためにユニバーサルズーム顕微鏡と高速共焦点スキャナユニットを組み合わせた測定システムを構築する。これにより $10\mu\text{m}$ レベルから mm レベルまで1つの計測デバイスで動的挙動が定量的に捉えられるバイオイメージング法を実現する。このチップは、人の目やデジタルカメラを模して、同様の構造で、ほぼ同レベルのサイズ、集積度で配置するもので、国内外で例のない「バイオケミカル・アイ」とも言えるものである。そしてこのチップは今後生命工学分野の中心課題の一つとなると考えられる動植物組織中での細胞間機能解析に極めて有力な実験ツールになることを実証する。

3. 研究の方法

(1) バイオケミカルセンサアレイの形成

マイクロコンタクトプリンティングを複数回繰り返すことで1つのチップ上に複数種のバイオケミカルセンサを形成する。また酵素センサのマイクロコンタクトプリンティングによる作製について検討する。

(2) バイオケミカルイメージング

化学センサ膜、酵素センサ膜を用いて化学物質濃度の2次元分布の経時変化を蛍光強度の変化として画像化するための、センサ膜の応答速度評価、センサ応答の明確化、画像データの処理方法等について検討する。

(3) 組織切片の細胞機能解析への応用

バイオケミカルイメージングセンサを用いて組織切片レベルでの細胞機能解析が行えることを究極の目的として、腫瘍細胞解析に有用なグルコースセンサ膜及び乳酸センサ膜、神経細胞解析に有用なアセチルコリンセンサ膜の作製、機能評価、イメージングへの応用を行い、組織切片への応用を試みる。

4. 研究成果

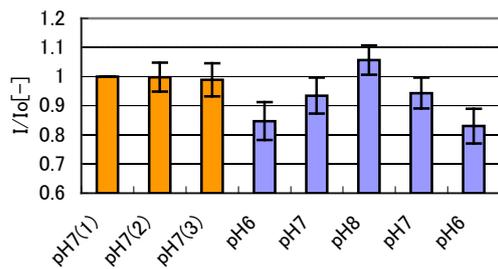
(1) バイオケミカルセンサアレイの集積化

まず研究代表者が開発に成功している同一種センサ型のマイクロスケール化学センサアレイを用いてケミカルイメージングの基礎検討を行った。pHセンサアレイはDLC（ダイヤモンド様カーボン）で被覆されたガラス上にアミノ基を導入した基板にpH応答性蛍光色素であるFITCをスポット径 $10\mu\text{m}$ でマイクロコンタクトプリンティングして作製した。酸素センサアレイは、上述の基板でアミノ基の代わりに SO_3 基を導入した基板にナフィオンに溶解させたルテニウム錯体を同様にマイクロコンタクトプリンティングして作製した。また多様な倍率での蛍光イメージングを可能にするために、ユニバーサルズーム顕微鏡（5X～400X）〔2009年度設置〕に高速共焦点スキャナユニットを装着した測定システムを新たに構築した。

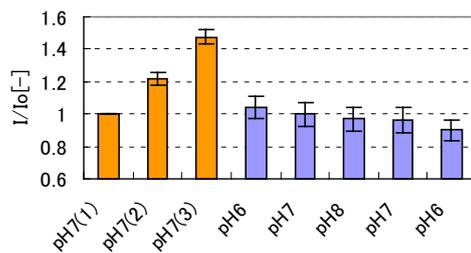
次にマイクロコンタクトプリンティングを複数回繰り返すことで一つのチップ上に複数種のバイオケミカルセンサを形成した。本研究ではpHセンサと酸素センサ、グルコースセンサと乳酸センサの集積化をそれぞれ行った。前者は $40\mu\text{m}$ ピッチで $10\mu\text{m}$ 径の酸素センサアレイをマイクロコンタクトプリンティングしたのち、 $20\mu\text{m}$ ずらしてpHセンサアレイをスタンプして作製した。後者はユーロピウムテトラサイクリンを用いた $10\mu\text{m}$ 径の過酸化水素センサアレイをマイクロコンタクトプリンティングにより $20\mu\text{m}$ ピッチで作製した後、その上に、グルコースオキシダーゼと乳酸オキシダーゼを交互にスタンプして、架橋剤のグルタルアルデヒド雰囲気下で架橋することで、グルコースセンサと乳酸センサを集積した。各センサの応答の独立性を評価したところ、pHセンサと酸素センサ、グルコースセンサと乳酸センサ、のいずれにおいても極めて近接しているにもかかわらず応答の独立性が確認できた。図1にpHセンサと酸素センサを集積した場合の結果を示す。

(2) ケミカルイメージングへの挑戦

まずケミカルイメージングの基礎的検討として、最初に特にイメージングに重点を置いて検討した。イメージングの観点からセンサ応答の迅速性は重要である。そこでまずFITCを用いたpHセンサ、ルテニウム錯体を用いた酸素センサの応答速度を評価した。その結果、pHセンサでは蛍光増加時が4.0秒、同減少時が2.0秒、酸素センサでは蛍光増加時が3.5秒、同減少時が3.0秒と、一般的な動的現象のイメージングには充分適用できることがわかった。次に実際にケミカルイメージングを行った。Y字流路を用いて、pH4.5とpH9.3の緩衝液、酸素を通気した蒸留水と5%亜硫酸ナトリウム水溶液のそれぞれ



(a) pH センサスポット



(b) 酸素センサスポット

図1. 集積化 pH、酸素センサアレイの応答特性。pH7(1), pH7(2), pH7(3) はそれぞれ酸素通気、無処理、窒素通気した pH7 のリン酸緩衝液を示す。

これらの混合時の pH や酸素濃度の分布状態のダイナミックなイメージングを行った。図2に結果の一例を示す。その結果、蛍光強度変化を指標に、混合状態のケミカルイメージングに成功した。次に pH センサと酸素センサを交互に配した集積化センサアレイを用いて同様に pH と酸素の同時イメージングを試みたところ、両センサの応答の独立性を確認できた。このように成果の得られた pH センサ膜、酸素センサ膜を用いた微小流路におけるケミカルイメージングについてさらに様々な形状の微小流路中でのケミカルイメージングも行うことが出来た。

(3) 組織イメージングの実現に向けて

最後に化学センサ膜や酵素センサ膜を用いたバイオケミカルイメージングの組織イメージングへの適用を図った。酵素センサとしては組織中の腫瘍細胞検出のためのグルコースセンサ膜及び神経細胞の機能解析に必要なアセチルコリンセンサ膜について作製・評価を行った。

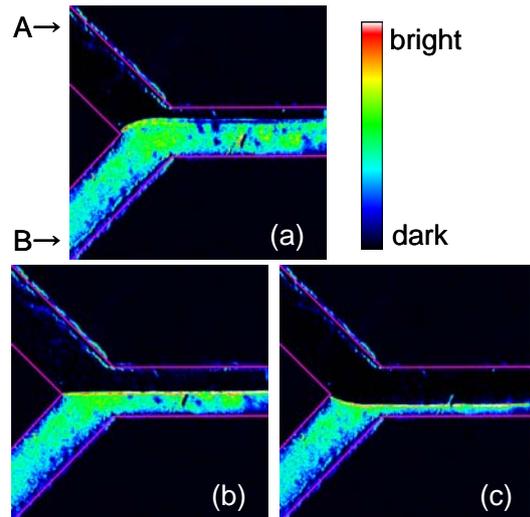


図2. Y字流路を流れる、30分間酸素通気した蒸留水(A)と5%亜硫酸ナトリウム水溶液(B)のケミカルイメージング。AとBの流速($\mu\text{l}/\text{min}$): (a) 50, 250; (b) 150, 150; (c) 250, 50.

グルコースセンサ膜はルテニウム錯体を含むナフィオンをマイクロコンタクトプリントして形成した酸素センサ膜上にグルコース酸化酵素とアルブミンの混合溶液を重ねてスタンプし、グルタルアルデヒド雰囲気下で架橋して形成した。しかしグルコース濃度の相違を蛍光強度の差異として明確にバイオケミカルイメージングすることは出来なかった。直接酵素液を塗布したところ、蛍光変化を見ることが出来たので、酵素の固定化量が充分でないことが原因と考えられた。そこでスタンプの作製方法を検討し、インク保持能の向上を図ることで、グルコースセンサによるグルコース分布のイメージングを行うことに成功した。

次にアセチルコリンセンサアレイを作製した。アセチルコリンセンサは当初予定していた pH センサへの酵素アセチルコリンエステラーゼの積層では迅速な応答が得られなかった。そこで応答の迅速化を目指して酵素を直接FITCで修飾したものをスタンプした。しかしこうして作製したセンサアレイでは酵素の失活により応答はほとんど得られなかった。そこでFITC修飾したアルブミンと酵素を混合したものをスタンプして架橋することにした。その結果、図3の検量線に示すように0.002mMのアセチルコリンが検出可能となった。

アセチルコリンセンサ膜はpH応答性蛍光色素のFITCを結合させたアルブミンを酵素アセチルコリンエステラーゼと混合してス

タンブしたのち架橋して形成した。しかし架橋後洗浄すると多くが脱離した。FITCがアルブミン表面のアミノ基に結合し、架橋に必要なアミノ基が不足していることが原因と考えられた。そこでFITC標識していないアルブミンをさらに添加して膜を形成したところ洗浄に伴う蛍光強度の低下は見られなくなった。アルブミンの代替としてアミノ基をより高密度で持つポリ-L-リジンでも行ったがほぼ同等の結果であった。これによりアセチルコリンのイメージングが可能となった。今後、開発したバイオケミカルイメージング技術の組織切片への応用を遂行していく。

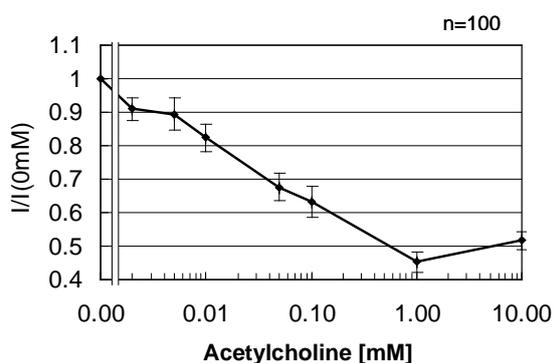


図3. アセチルコリンセンサの検量線

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1件)

① Suzuki M, Tanaka H, Iribe Y, Detection and collection system of target single cell based on pH and oxygen sensing, Journal of Robotics and Mechatronics, 22: 639-643, 2010. (査読有)

[学会発表] (計11件)

国際

① Suzuki M, Nozawa H, Iribe Y, “Visualization of planar and temporal distribution of pH and oxygen in micro flow channel”, The 14th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS2012), 2012/5, Nuremberg, Germany.

② Suzuki M, “Functional micro-well array system for single cell analysis”, 2010 International Symposium on Organic and Inorganic Electronic Materials and Related Nanotechnologies (EM-NANO 2010), 2010/6, 富山市 (招待講演)

③ Suzuki M, Minakuchi K, Nomura A, “Integrated glucose and lactate sensor array prepared by microcontact double

printing”, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science, 2009/11, 済州島, 大韓民国
国内

④ 鈴木正康 「微小領域における物質濃度分布の動的可視化技術」、医薬理工連携における共同研究・技術開発を考えるシンポジウム、2012年3月、名鉄トヤマホテル

⑤ 野澤大樹、鈴木正康 「微小流路におけるpH、酸素濃度分布の蛍光イメージング」、第24回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2011年11月、大阪府立大学

⑥ 鈴木正康 「単一細胞アレイ用バイオセンサとその応用可能性」、とやま医薬ネットワーク第1回専門部会、2011年12月、富山県新世紀産業機構

⑦ 川淵貴史、鈴木正康 「極微小アセチルコリンセンサアレイのマイクロコンタクトプリンティング」、第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2010年11月、名古屋大学

⑧ 野澤大樹、鈴木正康 「蛍光ケミカルイメージングチップ構築のための基礎的検討」、平成22年度北陸地区講演会と研究発表会 (日本化学会)、2010年11月、富山大学

⑨ 川淵貴史、鈴木正康 「蛍光標識タンパク質をマイクロコンタクトプリンティングした酵素センサアレイ」、平成22年度北陸地区講演会と研究発表会 (日本化学会)、2010年11月、富山大学

⑩ 川淵貴史、鈴木正康 「マイクロコンタクトプリンティングによる極微小アセチルコリンセンサアレイの作製」、電気化学会第77回大会、2010年3月、富山大学

⑪ 鈴木正康、皆口健太、野村明孝 「マイクロコンタクトプリンティングによる過酸化水素検出型集積化酵素センサアレイの作製」、第48回化学センサ研究発表会、2009年9月、東京農工大学

[図書] (計2件)

① 鈴木正康(2010) 「シングルセル解析の最前線」、シーエムシー出版、pp.119-126.

② 鈴木正康(2010) 「近接場光のセンシング・イメージング技術への応用ー最新のバイオ・化学・デバイス分野への応用ー」、シーエムシー出版、pp.68-75.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 正康 (SUZUKI MASAYASU)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授
研究者番号：70226554