

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04268

研究課題名(和文) ラボオンチップを電子デバイス化するための電気信号による生体反応の検出技術の確立

研究課題名(英文) Development for detection of biological reactions by electrical signals to turn lab-on-a-chip into electronic devices

研究代表者

中島 義賢 (Nakajima, Yoshikata)

大阪大学・ナノサイエンスデザイン教育研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：40408993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラボオンチップを電子デバイス化するための『電気信号』による生体反応の検出技術の確立を行うことを目的とした。

継代回数の異なるサンプル、つまり、正常細胞と老化細胞を用い、実験を行った。マイクロ流路を通過するとき得られる『電気信号』からゼータ電位を導き、正常細胞と老化細胞において有意な差が生じることが確認できた。そして、これは老化細胞の嫌氣的解糖によりグルコースの取り込み量が上昇し、そして、細胞から乳酸イオンの排出量が増えたため、細胞表面のゼータ電位に変化が生じたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化状態の違いによる細胞の選別や老化細胞を示す細胞外シグナルとして細胞表面のゼータ電位が利用できる可能性を示した。染色を必要としない、ラボオンチップの電子デバイス化のための『電気信号』としての足掛かりを示すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a technology for detecting biological reactions by "electrical signals" in order to turn the lab-on-a-chip into an electronic device.

We carried out experiments using samples with different numbers of passages, i.e., normal cells and senescent cells. The Zeta potential was derived from the "electrical signal" obtained when the cells passed through the aperture in a microchannel, and it was confirmed that there was a significant difference between normal and senescent cells. The Zeta potential of the cell surface changed because the amount of glucose uptake increased due to anaerobic glycolysis in the senescent cells, and the amount of lactate ion discharge from the cells increased.

研究分野：バイオエレクトロニクス

キーワード：ラボオンチップ 電気泳動 老化細胞 ゼータ電位

1. 研究開始当初の背景

ラボオンチップの研究・開発は近年、急速に発展していて、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、僅かな血液から血液検査や DNA 分析が可能になっている。最近では、「血液 1 滴から 1 3 種類のがんを早期発見」といった驚くべき段階へと進展している。更に、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。血管の細胞に、ある物質が反応することによりその細胞は活性化し、例えば、遊離がん細胞の一部が血管へ接着・浸潤するのを防ぐことができる。このような研究の発展により、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。もっと進んで、このような分析が電子デバイスを利用した『電気信号』により計測・評価できるようになれば、将来的に、USB メモリ大のコンパクトな分析デバイスとそれによる在宅で各々による定期検診の実現が期待できる。

このような背景のもと申請者らはこれまでに、細胞表面に吸着した生体分子により、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・放射性元素などの標識を用いずに反応量を見積ることができる測定手法の提案、対象サンプルの表面特性のパラメータとしてゼータ電位に注目し、加えて、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。そして、浮遊腫瘍細胞の生死判定が可能であることを示した。

しかし、ラボオンチップの『電気信号』によって今すぐ、個々の細胞（とくに、希少細胞）の表面特性や状態の経時変化などを評価できるのかといえ、十分な分析例や取り組みがなされていない。

2. 研究の目的

ラボオンチップの現状では、その周辺には光学顕微鏡や大型分析装置などを必要とする。アレルギー判定や血液診断などの「在宅で各々による定期検診」を目指すには、PC に接続された USB メモリ大のチップにサンプルを滴下し、それを『電気信号』によって判定ができるようにすることだと思われる。この答えの 1 つが、申請者らが提案している、電気泳動コルター法である。しかしながら、『電気信号』による判定を可能にするためには、まだまだ生体材料を用いた評価例が少ない。本研究では、細胞の経過観察可能な分析デバイスを作成し、その中で細胞の接着、増殖、細胞死、解離を起し、それぞれの細胞の状態を『電気信号（時間変化）』によって判定できるようにする。

3. 研究の方法

a) 圧力勾配流速 $\neq 0$ の条件下での電気泳動コルター法により導かれたゼータ電位の正確さの確認—マイクロチャンネル内で粒子・細胞が移動するとき、4つの流速の寄与が考えられる。実験で得る流速 = 電気泳動速 + 電気浸透流速 + 圧力勾配流速 + 拡散速、である。細胞表面状態の評価指針としてのゼータ電位はこの電気泳動速から導かれるので、これまでは、その他の流速、とりわけ電気浸透流速が無視できるほど小さくなるようにし、測定精度向上に成功している。しかし、現在主流のマイクロ流体チップはシリンジポンプによって、対象サンプルを泳動させているので、電気泳動コルター法（図 1）が圧力勾配流速 $\neq 0$ においても、ゼータ電位を見積りが可能か、不可の場合はその対策を明らかにする。これにより、現在主流のマイクロ流体チップに電気泳動コルター法を導入することが可能になる。

b) 正常細胞と老化細胞のゼータ電位による分離評価および状態変化の検出—細胞の多くでは細胞分裂回数に限界があるため、有限寿命がん細胞であればその増殖を抑制できるので病気としてのがんを防ぐことができる。一方で、細胞分裂回数の限界に達した（老化）細胞は、生体内からすぐにはなくならないため、その分泌物によって周辺細胞をがん細胞化することが知られている。本研究により、細胞の状態が分かるようになれば、分泌物による疾患の発症メカニズムやその予防法の開発に繋がるのが期待される。

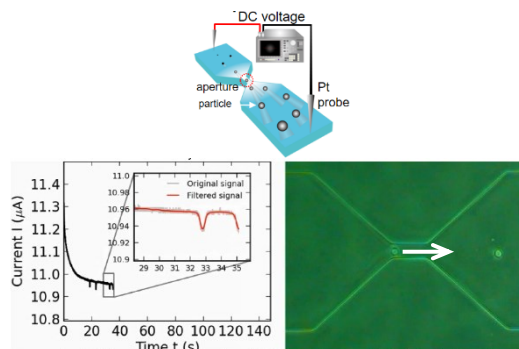


図 1 電気泳動コルター法による細胞の測定

c) くし型電極への希少細胞の仮足形成・接触を利用したインピーダンス測定—電気インピーダンス測定系とくし型電極を有するマイクロチャンネルを組合により、たとえば、細胞集合体、細胞単体、細胞内組織、などの知りたい対象が周波数を変化させることにより切り替えることができる。くし型電極上に接触している細胞が集合体か、単体か（更には生死）の判定やその割合の評価、そして投薬後などの時間変化から細胞の状態変化についても判定を行い、マイクロ流体チップの『電気信号』による判定と多機能化を試みる。

4. 研究成果

本研究では、ラボオンチップを電子デバイス化するための『電気信号』による生体反応の検出技術の確立を行うことを目的とした。

研究は、b) 細胞の老化に伴う状態変化の『電気信号』による検出から、開始した。初代培養の細胞を用い、その継代回数を経ることによる細胞の老化について調べた。

細胞の多くでは細胞分裂回数に限界があるため、老化によって、ある細胞ががん化しても、それは有限分裂回数の時に増殖を抑制できるので病気としてのがんを防ぐことができる。一方で、細胞分裂回数の限界に達した（老化）細胞は、生体内からすぐにはなくならないため、その分泌物によって周辺細胞を老化やがん化させることが知られている。

継代回数の異なるサンプル、つまり、正常細胞が多数のサンプルと老化細胞が多数存在しているサンプルを用い、実験を行った。老化細胞で過剰発現が認められる β -galactosidase 検出する SPiDER- β Gal 試薬の蛍光特性を用い、その発現に定性的な差があることを示した(図2)。

がん細胞では、グルコースの取り込み量と乳酸の生成量が、正常細胞よりかなり大きく、多くのがん細胞の株において乳酸イオン由来で細胞表面が負に帯電していることが報告されている。そこで、細胞の老化でみられる嫌気的解糖の可能性を考え、グルコースの取り込みと乳酸の生成について調べた結果、老化した細胞においてグルコースの取り込み量が上昇し、そして、細胞から乳酸イオンの排出量が増えていることの可能性を示した。

この結果から、かなり初期の正常細胞とそこから population doubling level (PDL: 細胞集団が樹立の段階から、これまでに何回倍化増幅したかを表す累積分裂回数)を6回進めた細胞を用い、それらがマイクロ流路を通過するとき得られる『電気信号』からゼータ電位を導き、比較実験・解析を行った。PDL 差が6程度の継代を経た細胞では、ゼータ電位がマイナス方向に大きくなることが確認できた(図3)。これは乳酸イオンが細胞表面のゼータ電位の変化に寄与していると考えられる。

細胞老化によるゼータ電位の変化について、より詳細に実験を進めることで、老化状態の違いによる細胞のソーティングや老化細胞を示す細胞外シグナルとして利用できる可能性を示し、染色を必要としない、ラボオンチップの電子デバイス化のための『電気信号』としての足掛かりを示すことができたと考えられる。

コロナ禍による制限などがあったため、a)とc)の細胞を用いた実験への展開を十分に行うことが出来なかったが、この間、マイクロ流路内へのくし型電極形成や、細胞放出粒子の捕獲材料候補について電子顕微鏡による材料の評価を進めた。

[雑誌論文(査読有)] (計6件)

- 1) N. Keswani, R. Singh, Y. Nakajima, T. Som, P. Das, "Accessing low-energy magnetic microstates in square artificial spin ice vertices of broken symmetry in static magnetic field," *Phys. Rev. B*, 102, 224436 (2020)
- 2) N. Keswani, Y. Nakajima, N. Chauhan, T. Ukai, H. Chakraborti, K.D. Gupta, T. Hanajiri, S. Kumar, Y. Ohno, H. Ohno, and P. Das, "Complex switching behavior of magnetostatically coupled single-domain nanomagnets probed by micro-Hall magnetometry," *Appl. Phys. Lett.*, 116, 102401 (2020)
- 3) A. Borah, S.C. Pillai, A.K. Rochani, V. Palaninathan, Y. Nakajima, T. Maekawa and D.S. Kumar, "GANT61 and curcumin-loaded PLGA nanoparticles for GLI1 and PI3K/Akt-mediated inhibition in breast adenocarcinoma," *Nanotechnology*, 31, 185102 (2020)
- 4) H. Kobayashi, H. Shimoshige, Y. Nakajima, W. Arai, H. Takami, "An aluminum shield enables the amphipod *Hirondellea gigas* to inhabit deep-sea environments," *PLoS ONE*, 14, e0206710 (2019)
- 5) M. Kumar, A.C. Poulouse, Y. Nakajima, D. Sakthikumar, V. Kumar, R. Singh, "Anomalous emission from oxygen incorporated GaN nanowires," *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 104, 187-191 (2018)
- 6) N.S.A. Aziz, Y. Nakajima, H. Sato, T. Maekawa, A.M. Hashim, "One-pot green synthesis of Ag nanoparticle-decorated reduced graphene oxide composites: effect of Ag/graphene oxide volume ratio and its demonstration as low-voltage on-chip photodetector," *J. Materials Science*, 53, 11620-11632 (2018)

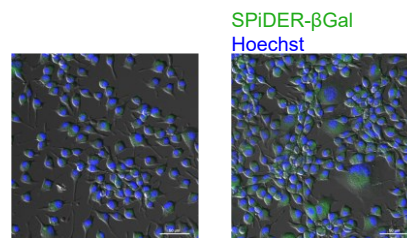


図2 正常細胞と老化細胞による β -galactosidase 検出

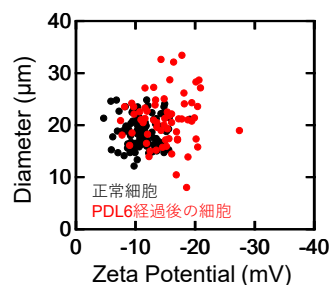


図3 マイクロ流路の電気信号による細胞のサイズとゼータ電位の解析結果

〔学会発表〕（計2件）

- 1) N.Keswani, Y. Nakajima, N. Chauhan, R. Singh, T. Som, S. Kumar, P. Das, "Controlled generation of emergent magnetic monopole like states in square artificial spin ice systems," 2019 MMM Conference, Washington, DC, USA, (2019年1月14日) Oral presentation.
- 2) Y. Nakajima, T. Ukai, T. Mizuki, T. Hanajiri, "Characterization of Biological Cell Viability by Electrophoretic Coulter Method," The 12th IEEE Int. Conf. on Nano/Molecular Medicine and Engineering (IEEE-NANOMED 2018), Hawaii, (2018年12月15日) 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

(2) 研究分担者

坂本 安 (SAKAMOTO Yasushi)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80178582

水木 徹 (MIZUKI Toru)
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：80408997

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Borah Ankita, Pillai Sindhu C, Rochani Ankit K, Palaninathan Vivekanandan, Nakajima Yoshikata, Maekawa Toru, Kumar D Sakthi	4. 巻 31
2. 論文標題 GANT61 and curcumin-loaded PLGA nanoparticles for GLI1 and PI3K/Akt-mediated inhibition in breast adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 185102 ~ 185102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6528/ab6d20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keswani N., Nakajima Y., Chauhan N., Ukai T., Chakraborti H., Gupta K. D., Hanajiri T., Kumar S., Ohno Y., Ohno H., Das P.	4. 巻 116
2. 論文標題 Complex switching behavior of magnetostatically coupled single-domain nanomagnets probed by micro-Hall magnetometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 102401 ~ 102401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5144841	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abd Aziz Nur Suhaili, Nakajima Yoshikata, Sato Haruyoshi, Maekawa Toru, Hashim Abdul Manaf	4. 巻 53
2. 論文標題 One-pot green synthesis of Ag nanoparticle-decorated reduced graphene oxide composites: effect of Ag/graphene oxide volume ratio and its demonstration as low-voltage on-chip photodetector	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Materials Science	6. 最初と最後の頁 11620 ~ 11632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10853-018-2403-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kumar Mukesh, Poullose Aby Cheruvathoor, Nakajima Yoshikata, Sakthikumar D., Kumar Vikram, Singh R.	4. 巻 104
2. 論文標題 Anomalous emission from oxygen incorporated GaN nanowires	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures	6. 最初と最後の頁 187 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physe.2018.07.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Hideki, Shimoshige Hirokazu, Nakajima Yoshikata, Arai Wataru, Takami Hideto	4. 巻 14
2. 論文標題 An aluminum shield enables the amphipod <i>Hirondellea gigas</i> to inhabit deep-sea environments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0206710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0206710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keswani Neeti, Singh Ranveer, Nakajima Yoshikata, Som Tapobrata, Das Pintu	4. 巻 102
2. 論文標題 Accessing low-energy magnetic microstates in square artificial spin ice vertices of broken symmetry in static magnetic field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Review B	6. 最初と最後の頁 224436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevB.102.224436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Y. Nakajima, T. Ukai, T. Mizuki, T. Hanajiri
2. 発表標題 Characterization of Biological Cell Viability by Electrophoretic Coulter Method
3. 学会等名 The 12th IEEE Int. Conf. on Nano/Molecular Medicine and Engineering (IEEE-NANOMED 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	坂本 安 (Sakamoto Yasushi) (80178582)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	水木 徹 (Mizuki Toru) (80408997)	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 (32663)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関