

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870323

研究課題名(和文) アフリカツメガエルの卵母細胞を利用した化学センサチップの開発

研究課題名(英文) Development of a chemical sensor chip based on *Xenopus laevis* oocytes expressing chemical receptors

研究代表者

三澤 宣雄 (Misawa, Nobuo)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号：70442530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：化学受容体を発現させた細胞と半導体作製技術の融合による化学センサチップの開発を目的として、アフリカツメガエルの卵母細胞を利用し、細胞膜電位計測のための電極付流路を作製した。複数の細胞が微小な流路内で流れによってアレイ化されると同時に各細胞への電極の自動挿入が可能なデバイスを構築し、化学受容体発現細胞を用いて化学物質の検出に成功した。また、様々な嗅覚受容体の活用を見込み、溶液への匂い物質の可溶化促進を目的として、気液混合のために流路に多孔質材料を充填した流体デバイスの作製・応用も検討した。複数の細胞のアレイ化が可能な流体デバイスと細胞膜電位計測用電極が融合したシステムが構築できた。

研究成果の概要(英文)：With the aim of developing a microfabricated chemical sensor chip combined with African clawed frog (*Xenopus laevis*) oocytes expressing chemical receptors by genetic engineering, I made a compact fluidic device integrated with microelectrodes that could measure the cells' responses to chemical stimuli. Plural *Xenopus* oocytes could be trapped one-by-one in the fluidic device along with the flow at the same time as the electrodes' automatic connection to each oocyte. The cell-based chemical sensor chip successfully detected a target chemical substance. Furthermore, for odorant detection using *Xenopus* oocytes expressing olfactory receptors, I additionally attempted to construct an odorant solubilization system based on a microfluidic device for gas-liquid mixing. The fluidic channel was filled with porous material such as filter papers. In this project, I succeeded in development of a *Xenopus* oocyte array fluidic device with microelectrodes for electrophysiological measurement.

研究分野：BioMEMS

キーワード：化学センサ アフリカツメガエル卵母細胞 化学受容体 二電極膜電位固定法 細胞アレイ

1. 研究開始当初の背景

水晶振動子や金属酸化物半導体、表面プラズモン共鳴などの応用に基づいた化学センサに比べて、微細な系での化学物質に対する特異性は生体の分子認識能力が優れている。そのため、無機材料と生体材料を融合した化学センシング技術の研究や開発が盛んであった。そこで、申請者は細胞膜にある化学受容体に着目し、嗅覚受容体を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞と電位計測可能な微小流路を組み合わせた匂いセンサを2010年に報告している。

化学受容体の発現系に用いられるアフリカツメガエルの卵母細胞は直径が約1mmと大きく、電極挿入が容易であり、受容体やイオンチャネルの研究材料として用いられてきた。そのため、複数のアフリカツメガエルの卵母細胞を並べて多点計測する装置が既に開発及び市販されていた。それらは従来の二電極膜電位固定法による測定セットアップを単純に並列化したシステムや滴定プレートを用いた自動分注型装置によるものでどちらも大掛かりな装置であった。これらの測定装置は検査・研究機関の実験室など限定された場所での使用を想定して作製されたものである。一方でそのような受容体発現細胞を化学検出素子と考え、持ち運び可能な小型の化学センサとした報告例は無かった。

2. 研究の目的

化学受容体を後天的に発現させた細胞と半導体作製技術を融合した化学センサチップの開発が目的である。宿主細胞には様々な化学受容体の発現系が構築されているアフリカツメガエルの卵母細胞を用いることで将来的には匂い分子を含む様々な化学物質のセンシングへの応用を期待している。

本研究では小型の系で複数の細胞の膜電位計測を実現するためにMEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術を用いて二電極膜電位固定法に基づいた細胞利用型化学センサチップの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 流体シミュレーションとデバイス作製を以下の手順で行った。複数の粒子や細胞のトラップを可能とする蛇行した流路を用いた細胞のアレイ化技術が報告されている。これらの流路形状を参考にアフリカツメガエルの卵母細胞をアレイ化するための流路を図1のようにデザインした。先行研究を参考に流路の幅と深さは全て1.5mmとし、細胞のトラップ領域には流路の中央部分に二本のカンチレバー状の電極が位置する構造とした。電極の先端幅は10 μm 、厚みは約50 μm とした。先行研究の結果から、電極先端間の距離は570 μm 、二電極の成す角度は流れの向きに対して左右に30 $^\circ$ 開いた位置関係に設定した。流体力学解析ソフトウェアを用いてデザインした流路における流体挙動を検証した。

流体は水とし、卵母細胞の直径を1.3mmと仮定した。

上記シミュレーション結果をもとに、アクリル樹脂を切削加工して流路を作製した。二枚のアクリル基板に流路を形成する溝と電極基板を設置する溝を設けた。シリコン基板を両面エッチングにて電極となる二本のカンチレバー状の構造を形成し、表面の酸化膜上に領域選択的にTiとAgを連続堆積した(図1右上挿入図)。電極間の短絡を防ぐためにパリレンで全体を被覆した後に電極先端および増幅器との接続部分のパリレンを除去した。作製した電極基板を二枚のアクリル製流路に組み込み、マグネットで固定した。

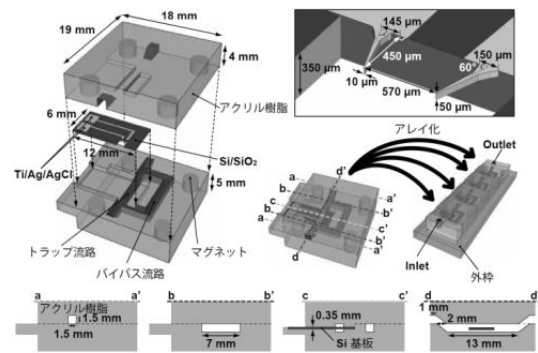


図1 設計した電極組み込み流体デバイス

6mm x 12mm x 0.35mmの電極チップを二枚の加工済みアクリル基板で挟み込んで流路を形成する。

(2) 作製した流体デバイスを用いて細胞がアレイ化されることを検証し、前述した流体シミュレーション結果との整合性を確認した。シリンジポンプを用いた送液によって細胞をデバイス内へ送り込んだ。

(3) 嗅覚受容体のモデルとして卵母細胞の内因性のK⁺チャンネルを利用し、化学刺激に対する応答試験を行った。電極に挿入された卵母細胞に対し、3MのKCl溶液20 μL を加え、二電極膜電位固定法用の増幅器を用いて細胞の応答を計測した。固定電位は-80mVとした。細胞外液を接地する電極は独立して銀/塩化銀ワイヤを用いた。

4. 研究成果

(1) 図2にInletから流入する流体の流速が20mL/minの際の流速分布のシミュレーション結果を示す。図2左は卵母細胞が未到達の状況を示しており、流れてきた卵母細胞は流速の速いトラップ流路に向かって進み、電極にてトラップされると考えられる。図2右は卵母細胞がトラップされた後を想定した結果を示している。この場合、バイパス流路方向の流れが強まったため、後続の卵母細胞はバイパス流路を通り、下流の次のユニットに向かうことが示唆された。以上のシミュレーション結果から、流体デバイスの各ユニットのトラップ領域に卵母細胞が順次アレイ化されると考えられる。

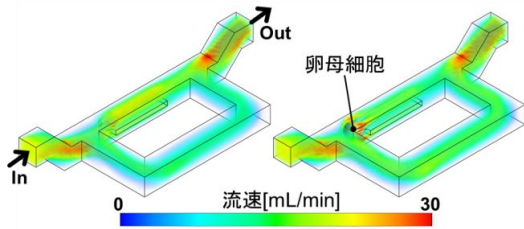


図2 流体シミュレーション結果

左：細胞トラップ前、右：細胞トラップ後

図3に作製した電極組み込み流体デバイスを示す。このデバイスでは、4個の卵母細胞がアレイ化可能である。2本の電極は二電極膜電位固定法において、一方は膜電位を測定し、他方は膜電位の変化を補正する電流を与える働きをする。

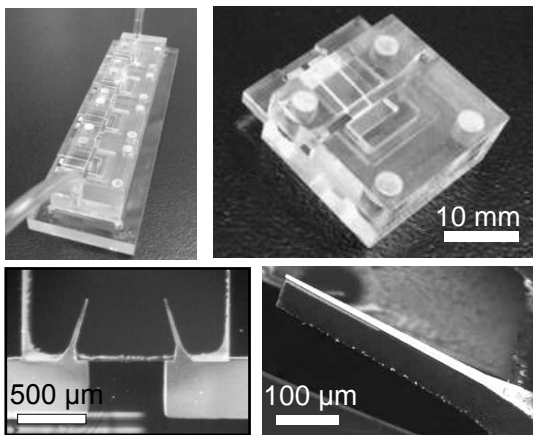


図3 完成デバイスと電極の顕微鏡観察像

左上：全体像、右上：細胞トラップ流路1ユニット、左下：二電極拡大写真、右下：電極の電子顕微鏡観察像

(2) 図4は電極がアフリカツメガエルの卵母細胞に刺入した際の顕微鏡写真である。作製した電極が卵母細胞の衝突の衝撃にも耐久性があり、問題無く刺入できることが判明した。図5に細胞トラップ領域の連続写真を示す。流体の流れは写真の左から右方向である。順番に卵母細胞がアレイ化され、連結した4つのユニット全てにおいてトラップに成功した。これらの結果は流体シミュレーションの結果と一致する。これにより、さらに多数の卵母細胞のアレイ化ができる可能性を見出した。以上から、作製したデバイスはアフリカツメガエル卵母細胞への電極挿入と同時にアレイ化が可能な流体デバイスとして機能することが実証できた。

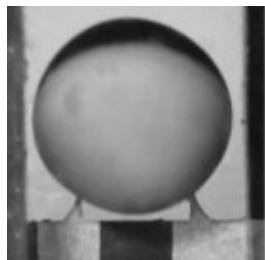


図4 流路内で電極が刺入した卵母細胞の拡大写真

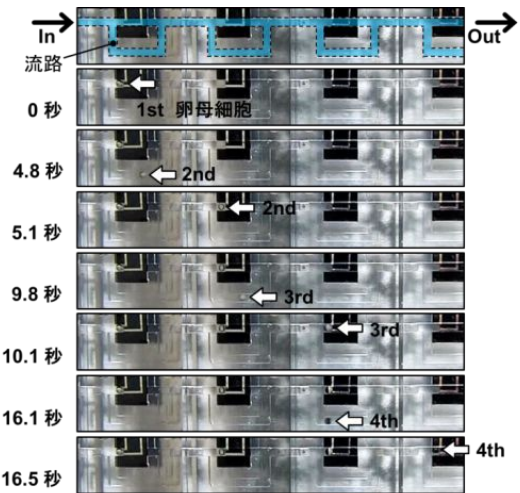


図5 アフリカツメガエル卵母細胞アレイの連続写真
矢印で示すように左から順に4個の細胞が上流からトラップされている。

(3) KCl 溶液を加えた結果、細胞外液の K^+ 濃度が上昇したことにより、アフリカツメガエル卵母細胞の内因性 K^+ チャネルが応答したとみられる電流値の変化が確認できた(図6参照：矢印のタイミングで KCl 溶液を添加)。また、加えた KCl 溶液濃度が大きい程、変化する電流値が大きいという結果が得られた。以上の結果から、作製した電極組み込みデバイスはアフリカツメガエル卵母細胞に対して電気生理学的測定が可能であり、化学センサとしての応用可能性を確認できた。

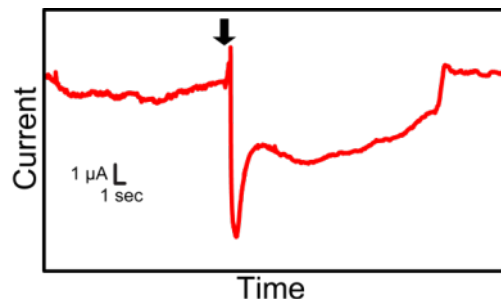


図6 KCl 溶液に対する卵母細胞の応答シグナル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nobuo Misawa, Toshinori Motegi, and Ryugo Tero, "Electroformation from patterned single-layered supported lipid bilayers for formation of giant vesicles with narrow size distribution", *Applied Physics Express*, 査読有, 7, (2014), pp.(117001-)1-3, DOI: 10.7567/APEX.7.117001

〔学会発表〕(計14件)

Nobuo Misawa, HJ Lee, Hidefumi Mitsuno, Ryohei Kanzaki, and Kazuaki Sawada, "Cell array fluidic channel integrated with electrodes for

cell-based multiple chemical sensing”, *Transducers ' 2013*, 2013年6月19日, バルセロナ(スペイン)
富田充祥、三澤宣雄、村上裕二、“アレイ化した細胞の個別利用が可能な化学センシング用電極一体型流体デバイスの作製”、*バイオ・マイクロシステム研究会*、2013年10月8日、東京大学生産技術研究所(東京都・駒場)
Mitsuyoshi Tomida, Yuji Murakami, and Nobuo Misawa, “Separable fluidic channel integrated with microelectrodes for cell-array and the electrophysiological measurement”, *The Irago Conference 2013*, 2013年10月25日, 伊良湖シーパーク&スパ(愛知県・田原市)
Nobuo Misawa, Mitsuyoshi Tomida, Hidefumi Mitsuno, Ryohei Kanzaki, and Kazuaki Sawada, “Fabrication of microelectrodes for compact two-electrode voltage clamping system”, *Bio4Apps 2013*, 2013年10月30日, 東京医科歯科大学(東京都・湯島)
Mitsuyoshi Tomida, Yuji Murakami, and Nobuo Misawa, “Frog egg-array device integrated with fluidic channel and microelectrodes for chemical sensing”, *MEMS 2014*, 2014年1月29日, サンフランシスコ(米国)
富田充祥、村上裕二、三澤宣雄、神崎亮平、“嗅覚受容体発現細胞によるワイヤレス匂いセンシングに向けた電極組み込み流体デバイスの作製”、「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2014年10月20日、くにびきメッセ(島根県・松江市)
Nobuo Misawa, and Yuu Hirose, “Fabrication of laminated paper fluidic device using a cutting plotter”, *The Irago Conference 2014*, 2014年11月6日, 産業技術総合研究所(茨城県・つくば市)
三澤宣雄、“ラミネータとカッティングマシンを用いた紙製流体デバイスの作製”、*バイオ・マイクロシステム研究会*、2014年12月2日、コンベンションルーム AP 名古屋(愛知県・名古屋市)
Nobuo Misawa, “Easy fabrication of a laminated paper-based fluidic channel”, *International Workshop on Extended-nano fluidics*, 2015年3月26日、東京大学小柴ホール(東京都・本郷)
三澤宣雄、“吸引/加圧送液を用いた紙製流体デバイスによる高速分析”、*ライフサイエンスワールド 2015*、2015年5月15日、東京ビッグサイト(東京都・江東区)
三澤宣雄、“多孔質材料(紙製)流体デバイスにおける迅速送液法”、*新技術説明会*、2015年6月25日、JST 東京本部別館ホー

ル(東京都・千代田区)
三澤宣雄、“脂質二重膜から細胞の応用へ”、*電気学会 E 部門総合研究会*、2015年7月2日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)
Nobuo Misawa, “PDMS molding using a water droplet”, *The Irago Conference 2015*, 2015年10月22日, 伊良湖シーパーク&スパ(愛知県・田原市)
Nobuo Misawa, “Fabrication of a PDMS fluidic channel using a water template”, *Bio4Apps 2015*, 2015年12月9日, 九州大学伊都キャンパス椎木講堂(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計1件)

Ryohei Kanzaki, Kei Nakatani, Takeshi Sakurai, Nobuo Misawa, and Hidefumi Mitsuno (Takamichi Nakamoto (Editor)), Jon Wiley & Sons, Inc., “Essential of Machine Olfaction and Taste (2.4 Cell-based sensors and receptor-based sensors)”, (2016), 336(pp.21-43)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 吸液誘導装置及びそれに使用する吸収誘導シート

発明者: 三澤宣雄

権利者: 国立大学法人 豊橋技術科学大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-242712

出願年月日: 平成 26 年 12 月 1 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三澤 宣雄 (MISAWA, Nobuo)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミ

ー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号: 70442530

(2) 研究協力者

光野 秀文 (MITSUNO, Hidefumi)