

「プロセスインテグレーションによる  
機能発現ナノシステムの創製」  
平成 20 年度採択研究代表者

平成 21 年度 実績報告
------------------

西澤 松彦

東北大学大学院工学研究科 教授

## 電気化学的な異種材料ナノ集積化技術の開拓とバイオデバイス応用

### § 1. 研究実施の概要

本研究課題の目的は、タンパク質や細胞の接着、有機・無機材料の析出、といった界面の組織化現象を局所に誘導する技術の開発と、それによる異種材料の融合・集積化による、(1)オンデマンド集積流路型バイオシステム、(2)ハイブリッド細胞チップ、(3)バイオ有機電子素子の開発である。H21 年度は、(1)～(3)それぞれについて以下の成果が得られた。

(1)流路型バイオシステムでは、誘電泳動力による微粒子や細胞の捕捉・回収機構の開発に取り組んだ。少数の特定種類の細胞を効率よく迅速に捕集固定できることを白血球細胞の分別捕集で実証した。抗体修飾ビーズの操作は迅速な免疫測定を可能とした。(2)ハイブリッド細胞チップについては、基板上で配向制御して培養した筋管細胞をハイドロゲルに移し取り、長期間安定に運動させることを可能とした。これは筋肉細胞による *in-vitro* アッセイの可能性を拡張する成果である。一方で、筋細胞の収縮活動やその運動効果（治療効果）を判定するための新規バイオマーカーの探索にも進展を得た。(3)バイオ有機電子素子に関しては、補酵素 NADH の酸化過電圧を大幅に低減することに成功し、全固定型グルコースアノードを作製する見通しが立った。

以上のように、順調な進捗状況にある。今後は、これまでと同様に新技術の開拓と融合を続けながら、最終的なデバイスの実用化に向けた道筋を見定めたい。

### § 2. 研究実施体制

(1)「西澤」グループ(東北大学 I)

- ① 研究分担グループ長： 西澤 松彦（東北大学、教授）
- ② 研究項目

- ・電気化学バイオリソグラフィー技術および異方性電析技術の開発と改良
- ・オンデマンドバイオ操作システムの開発
- ・細胞アッセイシステムの開発
- ・バイオ電池の開発と応用

(2)「神崎」グループ(東北大学 II)

- ① 研究分担グループ長： 神崎 展 (東北大学、准教授)
- ② 研究項目
  - ・収縮型筋管細胞のマイクロ培養システムの開発
  - ・2型糖尿病の薬剤スクリーニング系の開発
  - ・ヒト由来細胞を用いる収縮型筋細胞の作製と応用

(3)「安川」グループ(兵庫県立大学)

- ① 研究分担グループ長： 安川 智之 (兵庫県立大学、准教授)
- ② 研究項目
  - ・誘電泳動による細胞および微粒子の配列
  - ・細胞の代謝活性評価用センサの開発

### § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### (1)オンデマンド集積・流路型バイオチップシステム

##### ①細胞の捕集と選択固定 (西澤, 三宅, 長峯)

電気化学バイオリソグラフィーと誘電泳動の組み合わせによる細胞の選択的な捕集固定を、抹消血液診断を想定した実験で実証した<sup>1,2)</sup>。好中球と好酸球それぞれに対する抗体を流路内でパターンニングした後、白血球混合溶液を導入して誘電泳動で捕集した。0.1  $\mu\text{L min}^{-1}$ 以下の流速における捕集率はほぼ 100%で、少量の検体からも効率よくサンプリング可能であった。固定された好中球と好酸球の割合は、白血球混合溶液中の比率に相当する値(24 : 1)であり、ライト-ギムザ染色によって感染症の有無が診断可能であった。白血球の形態診断は目視選別によって行われてきたが、今回のプロセスによって格段に高効率化が進むと期待できる(第2次試作機に搭載予定)。

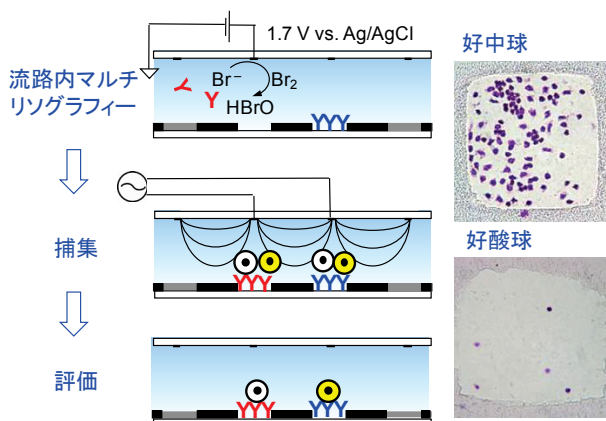


図1 選択固定操作の原理と、好中球/好酸球の写真。

## ②高感度イムノアッセイ（安川）

微小な粒子を迅速に目的位置にマニピュレートできる誘電泳動を、流路内の迅速な免疫測定法の開発に応用した<sup>9,14</sup>。マイクロ流路内に作製したマイクロ電極アレイへの交流電圧の印加によって、抗体修飾した微粒子のサイズ別分離捕集に成功し、この迅速配列技術によって約3-5分で2種類の腫瘍マーカーの同時計測を達成した。これにより、通常のウェルプレートを用いた酵素免疫測定法(ELISA)では約1-2時間要する工程を大幅に短縮できる可能性が示された。すでに、通常のELISAと同程度の測定感度を得られているが、さらにセンシング感度を高めるために、電気化学検出システムの開発も行っている<sup>10-13</sup>。

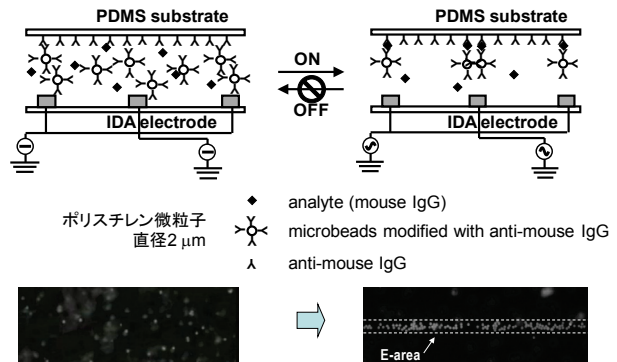


図2 誘電泳動による迅速な免疫測定。

## (2)ハイブリッド細胞チップシステム

### ① 収縮型筋細胞の作製(西澤, 神崎, 長峯)

長期間の安定した収縮運動の観察、及び評価が可能な筋細胞培養系の開発を目的とし、平面基板上で配向制御して培養した筋細胞を写し取ったハイドロゲル培養系を構築した<sup>4</sup>。基板上での培養筋細胞の配向制御は、細胞非接着性ポリマーで細胞接着領域以外を被覆することで行った。この基板上へフィブリノーゲン溶液を塗布し、ゲル化後に剥がすことで筋細胞が転写されたフィブリンゲルシートを得た(図3)。図3Cは、筋細胞を転写したゲルシートに対し1Hz、及び2Hzの矩形電圧パルス(電圧0.7 V/mm, パルス幅2 ms)を印加した時の収縮変位量の時間変化であり、パルス周波数の調節による収縮運動挙動の任意制御に成功した。配向制御された筋細胞は一斉に同じ方向に収縮するため、活発な収縮運動が実現できた。収縮運動は筋細胞パターン構造を維持したまま1週間以上持続し、従来の培養皿を用いた培養法(約2-3日で細胞構造が崩壊)と比較して長期間の維持が可能となった。今後は、微小電極アレイチップと組み合わせた筋細胞バイオアッセイデバイスを作製し、糖代謝活性等を評価する予定である。

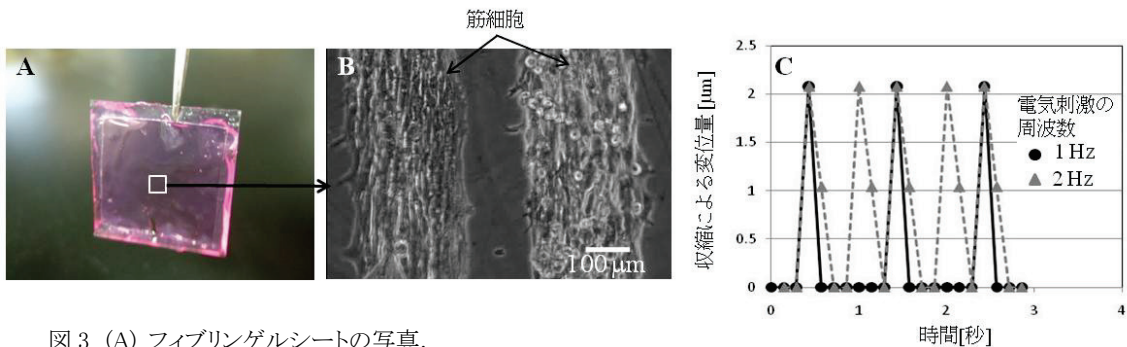


図3 (A) フィブリンゲルシートの写真,

(B) ゲルに転写した筋細胞パターンの顕微鏡写真, 及び(C) 筋細胞の収縮運動の周波数依存性.

## ② 収縮細胞筋細胞のキャラクター解析 (神崎)

電気パルス刺激 (EPS) 誘発性の収縮活動によって著しく遺伝子発現と分泌が増加する新規液性因子 (収縮筋由来分泌因子: マイオカイン: CXCL1/KC と CXCL5/LIX) を同定し、その発現調節機構について解析した (図 4A)。これらの新規マイオカインは収縮活動の開始とともに急峻に発現亢進し、その細胞内シグナル伝達系として主に JNK 経路と NFκB 経路が関与することを明らかにした<sup>5)</sup>。さらに、インスリン抵抗性の病態モデルとして、遊離脂肪酸(FFA)による筋細胞の病態応答について解析した(図 4BC)。飽和脂肪酸処理によって炎症に関与するシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現亢進が惹起されることを見いだした<sup>6)</sup>。また、筋肉の収縮活動によって誘導されるインスリン反応性 GLUT4 膜移行の亢進効果 (いわゆる運動効果) には、Tbc1d4 の持続的リン酸化が関与する可能性を示した<sup>7)</sup>。これらの研究成果をもとにして、筋細胞の収縮活動やその運動効果 (治療効果) を判定するための新規バイオマーカーとしての可能性について検討を行う予定である。

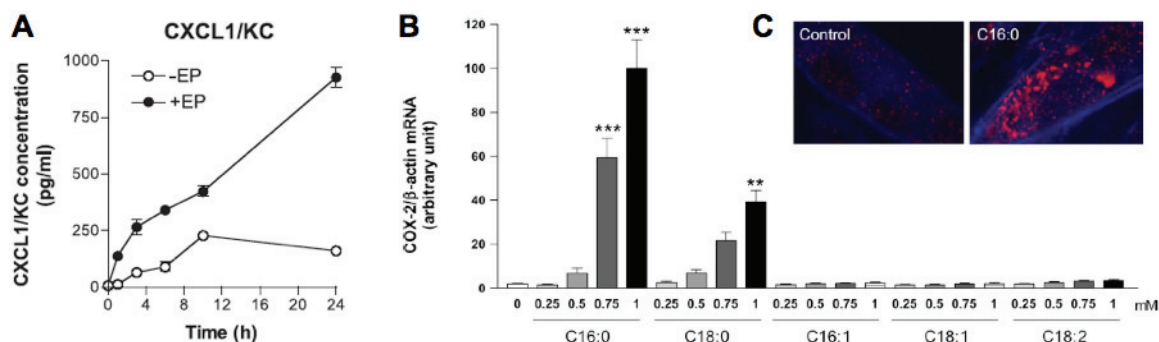


図 4 (A) EPS 誘発性収縮活動による CXCL1/KC の分泌増加. (B)飽和脂肪酸(C16:0,C18:0)による COX-2 mRNA(B)と COX-2 蛋白(C)の発現増加.

## (3) バイオ有機電子素子の開発

### ① 酵素/補酵素固定グルコースアノードの作製 (西澤, 三宅)

バイオ燃料電池の出力向上を目指し、メディエータを使わない酵素(Glucose Dehydrogenase: GDH)と補酵素(Nicotinamide Adenine Dinucleotide: NAD)のみで構成されたアノードを作製した (図 5)。GDH は、グルコース燃料の酸化と同時に  $\text{NAD}^+$  を  $\text{NADH}$  に還元する。従って、電極にて酸化エネルギーを得るには  $\text{NADH}$  を電極上で酸化する必要があるが、 $\text{NADH}$  の酸化には高い過電圧を必要とする。我々は、ケッチェンブラック電極を混酸(硫酸/硝酸/水)溶液に浸漬することで、 $\text{NADH}$  の酸化電位を負シフトさせる現象を発見し、本電極に酵素/補酵素を固定すると 0V 付近で最高  $1.1 \text{ mA/cm}^2$  の電流密度を得ることに成功した<sup>3)</sup>。これらの研究成果は、電池出力を決定する要素(電圧(トータル 0.5 V)、電流密度(数  $\text{mA/cm}^2$ ))を改善できたことを意味する。

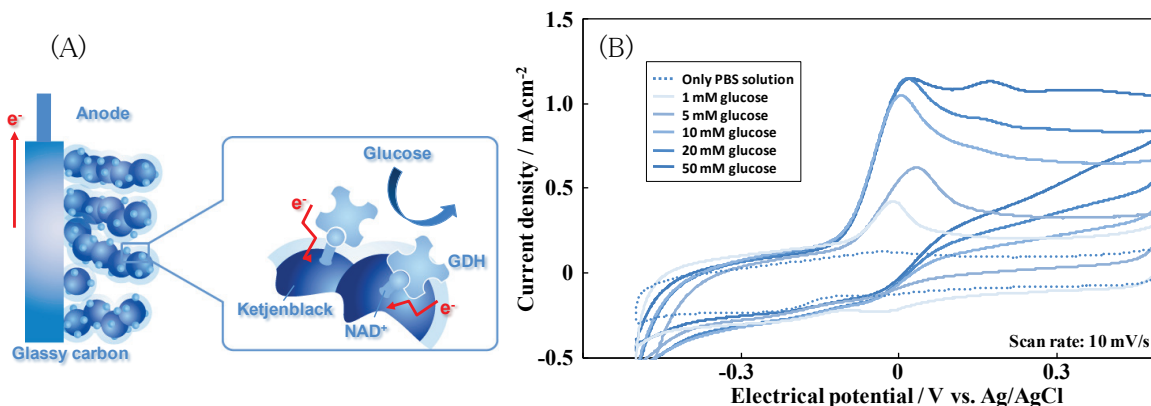


図 5 (A) GDH/NAD固定ケッチェンブラック電極によるグルコースの酸化。(B) グルコース濃度を変えて測定したサイクリックボルタモグラム。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. “Selective Capture of a Specific Cell Type from Mixed Leucocytes in an Electrode-Integrated Microfluidic Device” M. Hashimoto, H. Kaji and M. Nishizawa, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 2892-2897. (DOI: 10.1016/j.bios.2009.02.025)
2. “Spatiotemporal Subcellular Biopatterning Using an AFM-Assisted Electrochemical System” S. Sekine, H. Kaji and M. Nishizawa, *Electrochem. Commun.*, 2009, 11, 1781-1784. (DOI: 10.1016/j.elecom.2009.07.016)
3. “Biofuel Cell Anode: NAD<sup>+</sup>/Glucose Dehydrogenase-Coimmobilized Ketjenblack Electrode” T. Miyake, M. Oike, S. Yoshino, Y. Yatagawa, K. Haneda, H. Kaji and M. Nishizawa, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, 480, 123-126. (DOI: 10.1016/j.cplett.2009.08.075)
4. “Micropatterning Contractile C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes Embedded in a Fibrin Gel” K. Nagamine, T. Kawashima, T. Ishibashi, H. Kaji, M. Kanzaki and M. Nishizawa, *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 105, 1161-1167. (DOI: 10.1002/bit.22636)
5. “Transfer of Two-Dimensional Patterns of Human Umbilical Vein Endothelial Cells into Fibrin Gels to Facilitate Vessel Formation” T. Kawashima, T. Yokoi, H. Kaji and M. Nishizawa, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 2070-2072. (DOI:10.1039/b924397f)
6. “Characterization of Contraction-Inducible CXC Chemokines and Their Roles in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myocytes” T. Nedachi, H. Hatakeyama, T. Kono, M. Sato M and M. Kanzaki, *Am J Physiol Endocrinol*

- Metab*, 2009, 297, E866-878. (DOI: 10.1152/ajpendo.00104.2009)
7. “Different Impacts of Saturated and Unsaturated Fatty Acids on COX-2 Expression in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myotubes” A. Kadotani, Y. Tsuchiya, H. Hatakeyama, H. Katagiri and M. Kanzaki, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297, E1291-1303. (DOI: 10.1152/ajpendo.00293.2009)
  8. “Increased AS160 Phosphorylation, but Not TBC1D1 Phosphorylation, with Increased Post-exercise Insulin Sensitivity in Rat Skeletal Muscle” K. Funai, G. G. Schweitzer, N. Sharma, M. Kanzaki and G. D. Cartee, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297, E242-251. (DOI: 10.1152/ajpendo.00194.2009)
  9. “Highly Sensitive Detection of N1, N12-Diacetylspermine Based on Electrochemical Charge Accumulation” T. Yasukawa, S. Inadumi, R. Harada, S. Shinagawa, H. Nose and F. Mizutani, *Chem. Lett.*, 2010, 39, 88-89. (DOI: 10.1246/cl.2010.88)
  10. “Control of The Microparticle Position in The Channel Based on Dielectrophoresis” T. Yasukawa, M. Suzuki, H. Shiku and T. Matsue, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2009, 142, 400-403. (DOI: 10.1016/j.snb.2009.07.024)
  11. “Enzyme Immobilization on Poly(dimethylsiloxane) Layer for Amperometric Sensing of Glucose” T. Yasukawa, E. Maekawa and F. Mizutani, *Anal. Sci.*, 2009, 25, 1159-1162. (DOI: 10.2116/analsci.25.1159)
  12. “Cisplatin-Based DNA Sensing with Enhanced Current Response” Y. Yoshimoto, T. Yasukawa and F. Mizutani, *Analyst*, 2009, 134, 2113-2117. (DOI: 10.1039/b906734e)
  13. “酸素および過酸化水素のポリジメチルシロキサン膜透過性を利用したアンペロメトリックグルコースセンサ” 安川智之, 前川英治, 水谷文雄, *分析化学*, 2009, 55, 639-644. (DOI: 10.2116/bunsekikagaku.58.639)
  14. “Rapid and Simple Immunosensing System for Simultaneous Detection of Tumor Markers Based on Negative-Dielectrophoretic Manipulation of Microparticles” H. J. Lee, S. H. Lee, T. Yasukawa, J. R.-Azcón, F. Mizutani, K. Ino, H. Shiku and T. Matsue, *Talanta*, 2010, 81, 657-663. (DOI: 10.1016/j.talanta.2009.12.058)
  15. “Determination of the Apparent Michaelis Constant of Glucose Oxidase Immobilized on a Microelectrode with Respect to Oxygen” T. Yasukawa, K. Goto and F. Mizutani, *Electroanalysis*, in press.

#### (4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数 (国内 3件)

② CREST 研究期間累積件数 (国内 3 件)