

「細胞センサーアレイの構築及び高感度電気化学機能評価法の研究」

兵庫県立大学大学院物質理学研究科

水谷 文雄

1 研究の背景と目的

バイオセンサーは生体分子あるいは生体そのものの精緻な分子認識能力を巧みに利用し、電気信号を出力として与える化学物質の測定のためのデバイスである。これまで、血糖濃度測定用の酵素センサーを始めとして、酵素、抗体、DNAなどを分子認識に利用したバイオセンサーの研究開発が進んでおり、それぞれ基質、抗原、相補的な塩基配列を持つDNAと言った「特定の物質」の測定に利用されている。一方、細胞を分子認識エレメントとして用いると細胞を賦活させたり、失活させたりする「特定の物質群」の測定が可能となる。これにより、薬物や環境ホルモン等の高速スクリーニングが可能となること、スクリーニングに際して動物実験の頻度を大きく低下することが出来ることなど、社会に与えるインパクトは極めて大きい。一方、細胞を利用したバイオセンサーは大型のBODセンサーなどごく一部に限られ、薬剤スクリーニング等の目的に合致する「多種・少数の細胞を用いたセンサーアレイ」の開発は立ち遅れているのが現状である。

そこで本研究では、上記のセンサーアレイを作製するための基盤技術として、「三次元直交型バンドアレイ電極」を用いて1) 特定細胞を特定位置(センサーの感応部)に必要な数だけ固定化する方法を開発するとともに、2) 二段階グナル増幅法を利用した各アレイ化細胞の高感度機能評価方法の開発を行い、細胞センサーアレイの開発、実用化の基盤技術を確立する。

1) に関しては、不均一交流電場中で、微粒子-溶媒(水溶液)界面に誘起される双極子モーメントの差により生じる誘電泳動力を利用し、アレイ中に作り込んだ信号検出用電極を積極的に利用して電極上に目的とする細胞を固定化する技術(誘電泳動技術)を採用する。また、2) に関しては、レポーター遺伝子アッセイの構築のため、細胞内に発現したレポーター酵素の活性を高感度に計測する。さらに、個々のアレイ化細胞から選択的にその細胞活性を取得する方法を開発する。

2 研究方法・研究内容

本研究では、多種の細胞を目的位置に配列した細胞センサーアレイ構築の基盤技術を確立し、個々の配列化細胞からその細胞機能を高感度に計測する技術を開発する。初めの半年に、3次元直交型バンドアレイ電極を用いた「細胞センサーアレイの構築」(主に分担者である安川が担当)および「高感度電気化学計測法の開発」(主に代表者である水谷が担当)を並行して遂行し、後半で両者の融合システムを構築する。細胞センサーアレイの構築では、個々の電極の面積が 0.01 mm^2 オーダーの微小電極ウェルからなるアレイを作製し、誘電泳動を用いて目的とする電極部位に目的とする細胞を誘導・固定化する技術を開発する。高感度電気化学計測法では、電極間レドックスサイクル法や電化蓄積法等の化学増幅法を利用した加水分解酵素(アルカリ性フォスファターゼ, ALP 等)の反応生成物である4-アミノフェノールの高感度検出法を開発する。さらに、3次元直交型バンドアレイ電極に作製した微小電極ウェルに酵素を固定化し、位置選択的に酵素活性を計測できるシステムを開発する。後半では、両者の融合を積極的に遂行し、レポーターとして加水分解酵素を利用した遺伝子組換え細胞を用いた細胞アレイの構築と発現した加水分解酵素の活性を各ウェルで行う。各ウェルの細胞数および活性の連関を詳細に調査し、細胞センサーとして必要な細胞数を把握するとともに、最終目標である細胞アレイを用いた細胞センサーを構築する。

3 研究成果

3 - 1 . 誘電泳動を用いたホールアレイ内への細胞誘導と ALP 活性の電気化学的評価

微粒子を分散した溶液に外部交流電場を印加すると、微粒子は分極する。不均一電場中では図 1 に示すように、粒子と溶液の分極と電位勾配によりクーロン力が生じ電場の強い方向（正の誘電泳動）あるいは弱い方向（負の誘電泳動）に移動する力が生じる。正負のいずれの誘電泳動が起こるかは、粒子と溶液の分極率

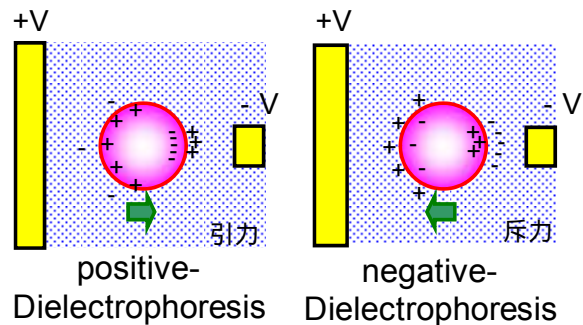


図 1 . 誘電泳動による粒子移動

の差に依存するが、実験的には溶液の誘電率、導電率、さらに交流周波数により制御できる。この粒子の移動技術は、もとより細胞の移動に利用できる。

本研究では、正の誘電泳動を用いてマイクロホールアレイ内に細胞を誘導し、細胞アレイを作製した。透明導電性材料であるインジウム - スズ酸化物 (ITO) 電極を底面とするマイクロホールアレイと上面 ITO 基板を組み込んだ流路構造を作製し、細胞懸濁液を導入した。上下基板間のマイクロ流路内に細胞懸濁液を導入し (図 2a)、上下の電極基板に交流電圧を印加すると、ホ

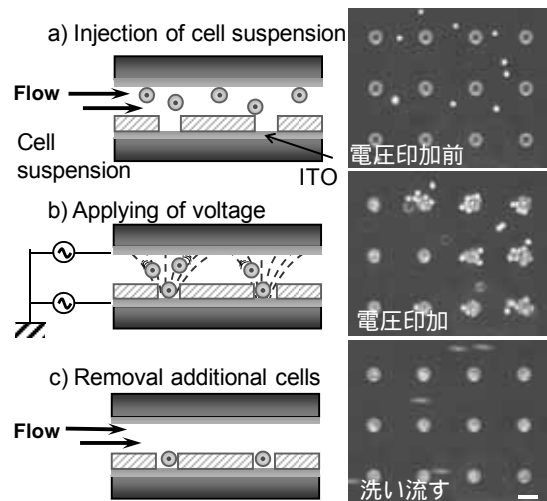


図 2 . 正の誘電泳動を用いたマイクロホールアレイ内への細胞誘導と配列化

ールアレイ部に強い電場勾配が形成され、細胞は正の誘電泳動によりホールアレイ内に集積化された (図 2b)。電圧印加を停止すると、余分な細胞は下流へ排除されて、マイクロホールに導入された細胞が残ることが確認された (図 2c)。図 3 に、正の誘電泳動によりホールアレイへと導かれた細胞の顕微鏡写真を示す。それぞれのホールに単一細胞が捕捉されている。その後、上面 ITO 基板を取り外し、細胞アレイ基板を細胞培養液に 5 時間浸漬した。細胞は接着進展し活性を保っていることがわかった。次に、ホールの直径と深さの最適化を行った。ホールの直径が 20 - 30 μm の場合、シングルホールに 1 つの細胞が捕捉された。しかし、ホール直径の増加に伴い、シングルホールに捕捉される細胞数が増加した。ホールの深さが 10 μm の場合、捕捉された細胞は溶液の導入による溶液流れにより容易に流されてホール外に除去された。深さを 25 μm にすると、流れによる捕捉細胞の除去が抑制された。しかし、アスペクト比が 1 以上のマイクロホールを作製することは困難であった。さらに、マイクロホールの形状を改良することで、アスペクト比が大きいホールの作製が可能であることがわかった。

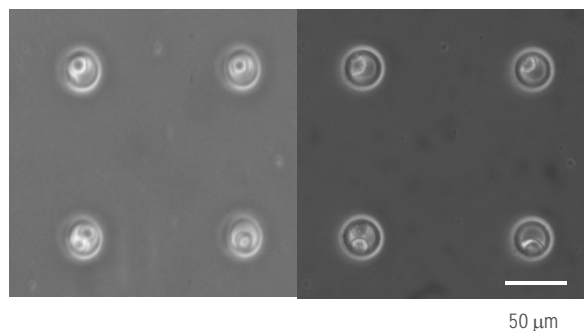


図 3 . 正の誘電泳動によりマイクロホールアレイ内に誘導された細胞。(左) 誘導直後,(右) 培養 5 時間後 .

次に、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) を固定化したポリスチレン微粒子をホール

に捕捉し、電気化学顕微鏡 (SECM) により酵素活性を評価した。ALP 修飾粒子をホールに誘導後、4.7 mM p-アミノフェニルリン酸 (pAPP) を添加し、酵素の加水分解反応により生成する p-アミノフェノール (pAP) を電気化学的に酸化した。図 4 に、ホールに捕捉された微粒子の顕微鏡写真と SECM イメージを示す。ALP を修飾した微粒子が捕捉されたホールが 3 個存在し (図 4a), その捕捉位置に対応した位置で pAP の酸化電流応答の増加が観測された (図 4b)。これは、修飾された ALP の酵素反応により生成した pAP が電極上で酸化されるためである。一方、未修飾の微粒子上や微粒子の存在しないウェル上 (図 4c) では、電流応答が検出されなかった (図 4d)。このことから、粒子表面に修飾した ALP 活性を電気化学的に測定可能であることが示された。

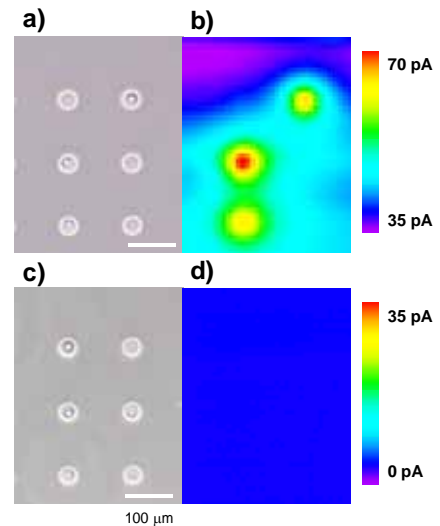


図 4. マイクロホールアレイ内に誘導された微粒子の顕微鏡写真。(a) ALP 修飾粒子, (c) 未修飾粒子. PAP の酸化に基づく SECM イメージ。(b) ALP 修飾粒子, (d) 未修飾粒子.

ALP 遊離型 HeLa 細胞および Wild type の HeLa 細胞 (ALP を遊離しない) をアレイ化し、捕捉された細胞の活性を SECM により評価した。図 5a-d に、ホールに捕捉された ALP 遊離型 HeLa 細胞および Wild type

の HeLa 細胞の顕微鏡写真と pAP の酸化に基づく SECM イメージを示す。12 ホール中 10 ホールに ALP 遊離型 HeLa 細胞が捕捉されており (図 5a), ホールに捕捉された細胞から酸化電流応答が観測された (図 5b)。ALP 遊離型 HeLa 細胞から得られた電流応答は、Wild type の HeLa 細胞の応答と比較して大きいことがわかる (図 5d)。図 5e に、ALP 遊離型 HeLa 細胞および Wild type の HeLa 細胞から得られた平均酸化電流応答を示す。ALP 遊離型 HeLa 細胞および

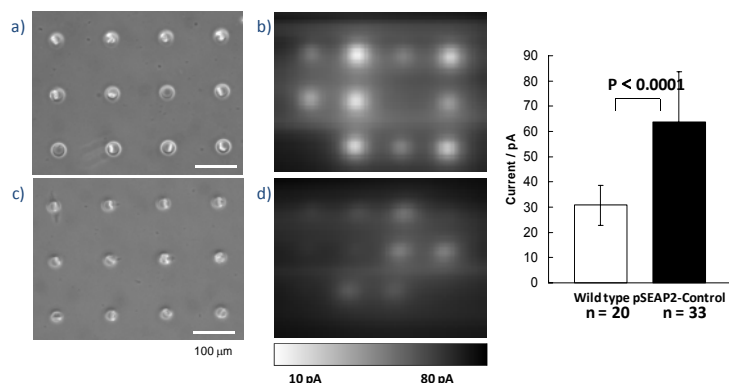


図 5. 正の誘電泳動によりマイクロホールアレイ内に誘導された (a) ALP 遊離型 HeLa 細胞および (c) Wild type の HeLa 細胞. 捕捉された (b) ALP 遊離型 HeLa 細胞および (d) Wild type の HeLa 細胞の ALP 活性イメージ。(e) ALP 遊離型 HeLa 細胞および Wild type の HeLa 細胞から得られた平均酸化電流応答.

Wild type の HeLa 細胞の平均電流は、64 および 31 pA であり、ALP 遊離型 HeLa 細胞の ALP 活性が有意に大きいことがわかった。Wild type の HeLa 細胞のわずかな電流応答は、内在性アルカリホスファターゼ活性に起因すると考えられる。ALP 活性をレポータタンパク質とした電気化学的なレポータアッセイの可能性が示唆された。

3 - 2 . 誘電泳動を用いた迅速な細胞アレイの構築

多種類の細胞を個々のホールに導入するための技術として、2 枚のバンドアレイ電極を組み合わせた「三次元直交型バンドアレイ電極」を構築した。図 6 に、3 次元直交型バン

ドアレイ電極の概念図を示す。2枚の交互くし型 (IDA) 電極を直交させて配置し、スペーサを介して組み合わせ、高さ 20 μm のマイクロ流路構造を有する直交型四重極電極デバイスを作製した (図 6A)。バンド a および b は上面基板に、バンド i および ii は下面基板に配置されている (図 6B および 6C)。この 4 電極に交流電圧を印加し、負の誘電泳動により格子点状に微粒子の海島状アレイを作製した。

微粒子懸濁液をマイクロ流路内に導入し、バンド b および ii に負の誘電泳動の作用する交流電圧 (周波数: 1.0 MHz, 電圧強度: 20 Vpp) を印加した。この際、バンド a および i は、グラウンドに接続し接地している。図 7 に、誘電泳動による微粒子アレイ形成の連続写真を示す。電圧印加前に分散していた微粒子は (図 7A-1)、電圧印加直後に格子点 b-ii および a-1 に向かって移動し (図 7A-2 および A-3)、わずか 1 秒で海島状アレイを形成した (図 7A-4)。これは、両バンド電極に、同強度、同周波数、同位相の交流電圧が印加された格子点 b-ii と両バンド電極がグラウンドに接地された格子点 a-1 では電場が形成されないためである。また、バンド ii に印加した交流電圧の周波数を 0.5 MHz にすると、微粒子は格子点 a-i に集積化した (図 7b)。これは、バンド b およびバンド ii に印加された交流電圧の周波数が異なる

ため、格子点 a-i に強い電場が形成されるためである。このように、直行型四重極電極を用いると、迅速に異なるデザインの海島状パターンを作製できることを示した。図 8 に、細胞の海島状アレイの顕微鏡写真を示す。マイクロ流路に細胞を導入して負の誘電泳動を作用させると、細胞は 1 分程度で海島状配列を形成した。

この技術を応用して、個々の格子点に異なる種類の細胞を配列化した。マイクロバンドアレイ電極上にネガティブフォトリジストを用いてホールアレイを作製し、ホール底面に

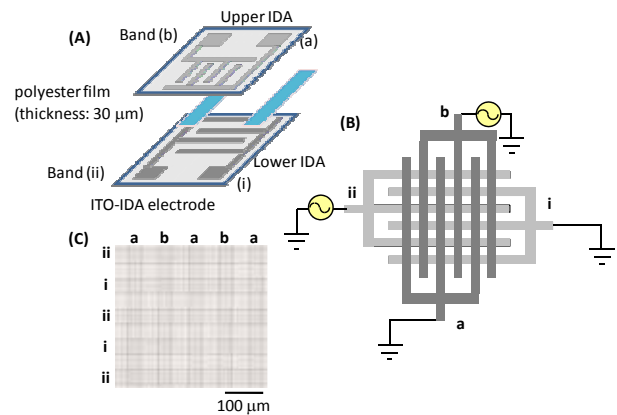


図 6. (A) 上面 IDA 電極と下面 IDA 電極を組み合わせた誘電泳動デバイス。(B) および (C) 誘電泳動デバイスの 4 電極の配置のイメージと光学顕微鏡写真。

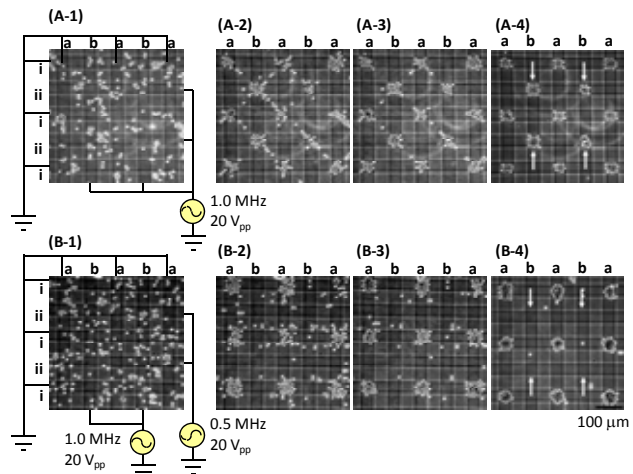


図 7. (A) 第 1 海島状パターンの連続顕微鏡写真。(A-1) 電圧印加直前, (A-2) 電圧印加後 0.33 秒, (A-3) 電圧印加後 0.66 秒, (A-4) 電圧印加後 1.0 秒。(B) 第 2 海島状パターンの連続顕微鏡写真。(B-1) 電圧印加直前, (B-2) 電圧印加後 1.0 秒, (B-3) 電圧印加後 2.0 秒, (B-4) 電圧印加後 3.0 秒。

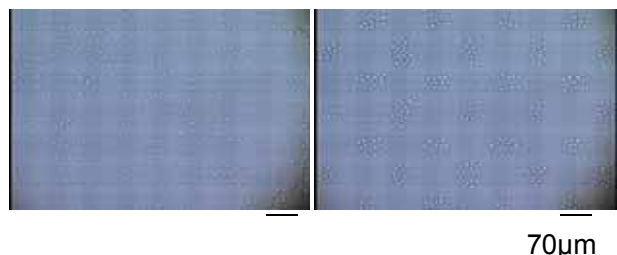


図 8. 細胞の海島状アレイの顕微鏡写真。(A) 電圧印加直前。(B) 電圧印加後 1 分。

導電性の電極部分が露出したホールアレイ電極を作製した。図9に、ホールアレイ電極とバンドアレイ電極を組み合わせた3次元直交型バンドアレイ電極を示す。ホールのサイズは、細胞を導入するために直径20-100 μmとした。新たにバンドアレイ電極を準備し、ホールアレイ電極上に組み合わせる。この際、高さ30 μm程度のスペーサを介することにより、ホールアレイ電極 - バンドアレイ電極間に細胞懸濁液を導入可能なマイクロ流路構造を作製した。この流路内に細胞を導入し誘電泳動によりマイクロホール内に細胞を誘導する。図4下にバンドアレイ電極c上の断面図を示す。細胞導入後、電極B-c間に交流電圧を印加することにより、電極B-c間のみ強い交流電場を形成させることができ、電極B-c間に存在する細胞は、正の誘電泳動によりホール内に集積化された。余分な細胞を洗い流し、異種類の細胞を導入して同じ操作を繰り返すことにより、多種類の細胞アレイを構築することができると期待される。ホール内に誘導された細胞を強固に固定化するために、細胞接着性分子(フィブリノーゲン、コラーゲン等)コーティングを利用も有用と考えられる。感光性高分子 PVA-SbQ の水溶液溶液中で光照射しながら誘電泳動を行うことにより、ゲル化させると同時に細胞を固定化する方法も開発した。

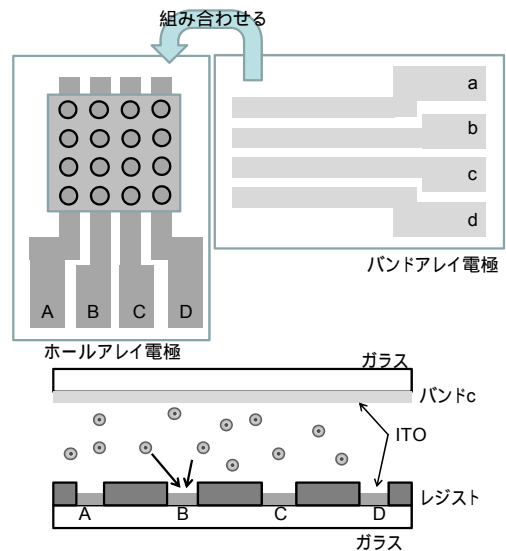


図9 .ホールアレイ電極とバンドアレイ電極を組み合わせた3次元直交型バンドアレイ電極。図左上のホールアレイ電極上に右上のバンドアレイ電極を上から重ねることにより3次元直交型バンドアレイ電極が完成する。下図は、完成させた3次元電極の断面図である。

3 - 2 . 個々のウェルに配列化された細胞の化学増幅システムによる高感度活性計測

細胞のアルカリフォスターゼ (AP) 活性を高感度に計測することを目指し、個々のウェル内に固定化された AP 活性を別々に高感度に計測する手法を開発した。図10に、酵素生成分子の電極間レドックスサイクリングおよび金属銀への変換濃縮による化学増幅法を用いた高感度 AP 活性計測の原理図を示す。AP が電極 B-c に固定化されている場合、酵素基質である 4-アミノフェニルリン酸 (pAPP) を導入すると、AP の加水分解反応により酵素反応生成物として 4-アミノフェノール (pAP) が局所的に生成される。図9に示したバンド電極 B およびバンド電極 c の電極電位を、それぞれ 0.3 V および -0.1 V に設定すると電極 B によって pAP が酸化されキノニンミン体 (QI) を生成する。この QI は、電極 B から拡散して電極 c へと到達し還元されて pAP を再生する。このように、酵素反応で生成した化学物質を 2 つの電極間で酸化還元反応させ

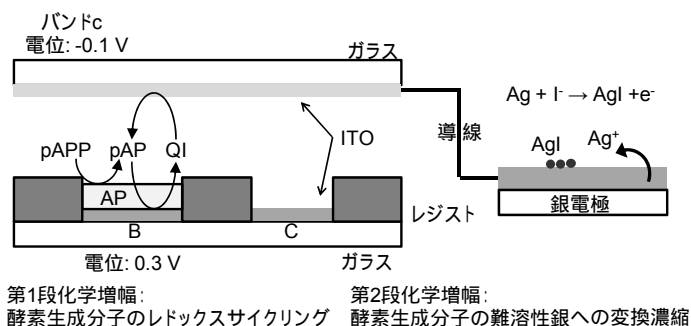


図10 .三次元直交型バンドアレイ電極の各ホールに固定化された酵素活性の2段階化学増幅システムを用いた高感度酵素活性計測法。最終目標である細胞センサーアレイを構築する場合には、誘電泳動により各ホールに細胞を誘導し、その酵素活性を上記手法で計測する。

てサイクルすることにより、電流信号を増幅することが可能となる。また、電極 B-a や電極 B-b に AP が固定化されていた場合でも、酵素反応による pAP の生成反応および電極 B による pAP の酸化反応は進行するが、バンド電極 a および b では還元反応が進行しないためシグナル増幅は起こらない。電極 C-c に AP が存在する場合には、電極 C 上で酵素反応により pAP が生成されるが電気化学的な酸化反応は進行しないためシグナル増幅は起こらない。したがって電極 B-c に固定化されている AP のみからの信号として電流信号を得ることができる。

さらに、この電流を増幅し、高感度化するために酵素生成分子の難溶性銀（ヨウ化銀；AgI）への変換濃縮による還元ストリッピング法を採用した。バンド電極 c を銀電極と接続し電池を構築した（図では、塩橋を省略している）。酵素反応および電気化学的酸化反応により生成した QI のバンド電極 c での還元反応と銀電極上での銀の酸化反応によるヨウ化銀の析出反応を組み合わせた電池を利用している。バンド電極 c 上での QI の還元反応に関する電子を、ヨウ化銀の形で銀電極表面上に蓄積・濃縮し、所定時間後に一括で迅速（数秒）に還元してシグナル増幅する。図 11 は、二段階増幅法を用いて、10 nM 以下の pAP を測定できることを示した結果である。通常の電気化学測定に比べて、定量下限濃度は 1/100 以下とすることに成功している。

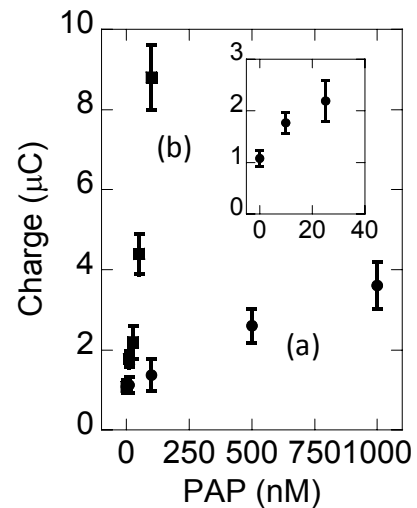


図 11．二段階増幅法とストリッピング法を用いた pAP の電気化学計測。(a) 濃縮法を用いた一段階増幅。(b) 濃縮法とレドックスサイクリングを組み合わせた二段階濃縮。

3 - 4 . センサーの構築・評価

現在、プロトタイプアレイを用いて、pNFκB-AP（アルカリフォスファターゼ）プラスミドベクターを導入した HeLa 細胞の AP 酵素活性の測定に着手しており、3 - 1、3 - 2 に記載の二つの要素技術を融合し細胞センサー構築を進めている。これらの成果により、センサーアレイの基本的なパフォーマンスを把握し、小数の細胞をベースとした高感度細胞センサーアレイ構築の基盤技術を確立することができた。

4 生活や産業への貢献および波及効果

細胞センサーアレイが開発されれば、薬剤、発ガン性物質、環境ホルモン等、ヒトを始めとする生物に影響を与える物質群の迅速、簡便な測定が可能となる。例えば、薬剤の開発に当たって、実験動物による試験が必須である一方、動物愛護の観点からこのような試験が行いにくい状況になってきているが、細胞を用いたセンサーは動物実験の代替として利用できる可能性もあり、開発の意義は極めて大きい。現在、バイオセンサーの世界市場は一兆円に達しているが、その殆どは血糖自己管理用のグルコースセンサーであり、市場性に富む新たなセンサー開発が重要なターゲットとなっている。本研究は、大きな市場が期待できる細胞センサーのプラットフォーム構築につながるものとして期待される。本研究内容は兵庫県が推進している先端医療産業に密接に関わるものであり、県の特長ある産業育成の緒が拓かれるものと期待される。

さらに、本研究の要素技術の一つである細胞の誘電泳同技術は、細胞培養、細胞融合などの効率向上のツールとしても利用可能である。また、今一つの技術の高感度電気化学計測技術は、免疫測定、DNA 診断などの測定技術として直ちに利用が可能であり、波及効果も大きい。