

技術紹介

1 バイオ LSI 計測システムの実用化に向けて

Challenge for the practical use of the LSI based bio sensing system

國方 亮太

Ryota Kunikata

商品開発センター

須田 篤史

Atsushi Suda

商品開発センター 技術マネージャー 博士(材料科学)

キーワード: バイオ LSI 計測システム、電気化学測定、バイオマーカー、多項目一括検出、
バイオイメージング

Keywords : Bio-LSI sensing system, Electrochemical measurement, Biomarker, Multi-point assay, Bio-imaging.

要旨

早期診断による予防医療やオーダーメイド医療といった高度な医療を実現するためには、バイオマーカーの多項目一括検出やイメージングを行うための多点検出技術が必要とされています。このニーズに応えるため、我々は LSI を用いたコンパクトで安価な電流検出用マイクロ電極アレイ型計測システム“バイオ LSI 計測システム”を開発しました。現在は本システムの実用化に向けて、医療・ライフサイエンス分野における有用性を実証するための様々な応用実験を行っており、そのいくつかについて紹介いたします。このような高度なセンシングを、より多くの医療従事者や研究者が手軽に行えるような社会の構築を目指すべく、今後はデータ取得速度の高速化等の更なる高機能化や、筐体デザインや測定用ソフトウェア等のブラッシュアップによる使い易さ向上を目指しております。

SUMMARY

The multi-point assay and bio-imaging are known to be important tools to realize the preventive care with early diagnosis and the tailor-made medicine. We have developed the micro electrode array typed sensing system, named “Bio-LSI sensing system”, that is compact and inexpensive by applying the LSI circuit to meet previous demands. Here, we would like to introduce some applications to demonstrate the utility in medical and life science fields. We are now concentrating our efforts on improvement of the function and usability by mounting faster data scanning, sophisticating chassis design, measuring software, more, we make healthcare workers and researchers use more advanced systems easily.

1. はじめに

現在、医療費の増大は大きな問題であり、症状が現れるはるか前段階の早期診断による予防医療、各患者の特性に合わせて治療方法を選択するオーダーメイド医療等、より新しく高度な医療の実現が切望されています。そのような医療の実現のためには、いわゆる"バイオマーカー"の精密な評価技術が不可欠です。バイオマーカーとは、近年の微量分析技術の発展により捉えることが可能となった、生理活性の微小な変化や、各人ごとの微小な差異等と関連付けられる体液・細胞中の核酸、タンパク質、糖、脂質等の化学物質のことをいいます。このバイオマーカーを高感度に検出することにより、がん等の疾病を早期に発見し、さらに患者ごとに異なるその特性を明らかにすることにより、各人に最適な治療を提供することが可能となります。

我々は、このようなバイオマーカーを高感度に検出・評価できる新しいセンシングシステム、“バイオ LSI 計測システム”の開発に取り組んでおります。バイオ LSI は、増幅回路を有する高感度なセンシング素子をチップ上に高密度に集積しており、バイオマーカーの存在に由来する電気化学的な微弱信号のイメージングを行うことが可能です。従来の電気化学的な検出を行うセンシングシステムと比較すると、バイオ LSI は大幅な感度の向上を達成できており、医療・ライフサイエンス分野における様々な評価に有効であると考えております。

本稿では最初に、バイオマーカーの一般的な検出手法について説明し、さらに予防医療・オーダーメイド医療実現のためのより高度な検出手法として、多項目検出、およびバイオイメージングについて説明します。次にこの多項目検出・バイオイメージングを行うツールとして開発したバイオ LSI について紹介し、最後にこのバイオ LSI の有効性を示すために行った応用実験のいくつかについて紹介します。

2. バイオマーカーの検出技術

バイオマーカーの検出には多くの場合、特定のバイオマーカーのみと相互作用するような分子プローブと呼ばれる化学物質が利用されます。検出器は、分子プローブと血液、尿等のサンプルとの接触時に、この特異的な相互作用が認められたか否かを評価することで、サンプル中のバイオマーカーの検出を行っています。その様な検出をおこなうシステムの代表例として、血糖値センサやイムノクロマトグラフィセンサが挙げられます。

血糖値センサの検出対象物質は、糖尿病の診断等に用いられるバイオマーカーである、血液中グルコースです。一般的には、分子プローブとしてグルコースとのみ特異的に反応するグルコースオキシダーゼ(Glucose oxidase : GOX)やグルコースデヒドロゲナーゼ(Glucose dehydrogenase : GDH)等の酵素を用い、両者の反応過程で生じるメディエータと呼ばれる小分子を電気化学的分析手法により検出することで、間接的にグルコース濃度を測定しています。

また、イムノクロマトグラフィセンサは、体液中に含まれる抗原を検出するセンサで、検出対象の抗原を抗原抗体反応により特異的に吸着することができる抗体を分子プローブとして用いています。この抗体を基板上にスポットし、サンプル溶液と接触させることで、スポット上に抗原が残ったか否か、すなわちサンプル中に検出対象である抗原が含まれているか否かを評価しています。このようなセンサは、例えば妊娠検査における尿中ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(human chorionic gonadotropin : hCG)の検出や、インフルエンザ検査における血中インフルエンザ抗原の検出等に使用されています。

3. バイオマーカーの多項目一括検出、およびイメージング技術

以上のような検出手法は、核酸、糖鎖、ペプチド、脂質等のバイオマーカーの検出にも応用され、それぞれの特徴に合わせて様々なセンシングシステムが考案されています。そしてその多くは、電極、フォトランジスタ等の単一のセンサにより、グルコース、hCG等の単一のバイオマーカーを検出するものでした。

しかし、がん等の複雑な機構によって引き起こされる疾病では、数多くの化学物質が関与しているため、その診断や治療効果確認の精度を高めるためには、複数のバイオマーカーを検出し、その出現パターンから総合的な評価を行うといった手法が必要となってきます。また、がんやアルツハイマー等、発病に至る詳細な機構が未だ明らかにされていない多くの疾病に対しては、どの化学物質がバイオマーカーとなり得るのかさえ不明な場合が多いため、これを探索するために候補となる化学物質を網羅的に評価するスクリーニング分析が必要とされてきます。さらには、単一のバイオマーカーの検出であっても、それが臓器や腫瘍等の組織内におけるどの位置に局在しているか、あるいはどのタイミングで出現するかが診断、および治療効果確認に重要な場合が多いため、これを高い空間・時間分解能で検出するためのバイオイメージング技術も必要とされています。症状が現れるはるか前段階での早期診断による予防医療や、患者ごとの個性に基づく治療効果予測によるオーダーメイド医療の実現には、これら多項目検出やバイオイメージングによる診断、および治療効果確認技術の向上が必須とされていますが、これはもはや血糖値センサやイムノクロマトグラフィセンサといった、従来の単純な単点センシングシステムでは実現できません。

現在、これら多項目検出やバイオイメージングは、より高度なセンシングシステムを用い、様々な検出方式によって実現されていますが、これらの方式は概ね次の3つに分類することができます。

第一の手法は、単一のセンサを用い、そのセンサ、またはサンプルが置かれているステージを機械的に移動させることによって、多項目の検出、あるいはイメージングを行うスキヤニング方式です。例えば、光電子増倍管を複数の反応槽上に移動させ、各反応槽から発せられる透過光、蛍光、化学発光等の光学的信号の検出を逐次的に行うマイクロプレートリーダーは、抗原抗体反応の多項目一括検出によく用いられています。さらに、スポッター等を用いて多項目の反応セルがチップ上に高密度に集積されたマイクロアレイ型のサンプルに対し、検出器やチップを走査することで、そこから発せられる光学的信号の二次元イメージを得るスキヤナも、DNA 等核酸類の多項目一括検出や、免疫染色された組織片のイメージング等によく用いられています。

光学的信号以外の信号に対するイメージング手法としては、走査型プローブ顕微鏡が挙げられます。その代表格である原子間力顕微鏡は、マイクロ～ナノレベルにまで先鋭化されたプローブをサンプルに接触させながら走査することで、それを支える片持ち梁(カンチレバー)のたわみ量から凹凸や弾力等、サンプルの物理的な性質のイメージングに用いられてきました。近年ではさらに、プローブ先端を様々なバイオマーカーで修飾することで、そのバイオマーカーとサンプルとの化学的な相互作用が検出されています。²⁾また、電極プローブを走査する走査型電気化学顕微鏡は、溶液中化学物質の電極上酸化還元反応に伴う電流を検出することで、細胞や組織片等により代謝される化学物質濃度のイメージングを行うのに使用されています。³⁾

第二の手法として、フローインジェクション方式が挙げられます。この方式では、大量の細胞や微粒子等のサンプルを、微細加工技術で作製したマイクロ流路内に高速で流し、さらにその通過点に PMT や電極等のセンサを仕込むことで、通過する各サンプルからの信号を連続して検出しています。例えばこの方式は、腫瘍組織より血管中に漏れ出し、血中を循環して転移の原因ともなりうる血中循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cells : CTC)の検出に使用されています。⁴⁾CTC は血中の主な有核細胞である白血球数千万個に対し、僅か数個程度しか存在しません。しかしフローインジェクション方式のセンシングシステムは、血液数 ml 中の全細胞を検査することにより、がん診断や治療効果の確認の指標となる CTC を精度よく検出できます。

以上の手法は、いずれも検出器、またはサンプルを移動させることで、多項目検出やイメージングを達成していますが、センサの他にもマニピュレータ等の駆動部や、シリンジ、バルブ等の送液ユニットが必要となるため、どうしてもシステム全体が大がかり、高価なものとなっていました。そこで、それら駆動部、送液ユニットを必要としない第三の手法として、二次元アレイ状に集積されたセンシング素子によって行われる、センサ集積方式が挙げられます。このタイプのセンシングシステムは、集積された複数のセンシング素子により、基板上に固定化された複数のサンプルを一括して検出するため、センサやサンプルを駆動させるためのユニット等を必要としないばかりか、検出値の並列取得によりスキヤニング方式と比較して高い時間分解能を得る事ができます。代わりに多数の高感度なセンシング素子が必要となりますが、これらは概ね、コンピュータのメモリや CPU、デジタルカメラの受光部等の製造に用いられ、既に確立されている半導体製造技術の応用によって製造されるため、安定した品質の製品を低価格で入手することが可能となっています。

センサ集積方式としてまず挙げられるのは、CCD(Charge-Coupled Device)イメージセンサにフィル

タ、レンズ等、いくつかの光学部品を組み合わせる構成される光学的検出システムです。これらはマイクロアレイの検出や、免疫染色された組織のイメージング等、上述のスキュナと同様の用途に用いられますが、スキュナと比較して感度は低いながらも時間分解能が高く、かつシステム価格が大幅に安くなっています。さらに、光学的信号以外の情報をセンシングする手法として、マイクロ電極アレイ (Microelectrode Arrays : MEA) 型センサ、電界効果トランジスタ (Field effect transistor : FET) 型センサ等があげられます。MEA 型センサは、微小電極をチップ上にアレイ状に集積したセンサであり、各電極をチップ外の電位計や電流計に接続することで、電極上の化学物質濃度変化に伴う電極電位の変化、あるいは電極を流れる電流値を検出しています。チップ外の増幅操作により高感度な電位検出を行う MEA 型センサは既に実用化されており、ラット脳スライスや神経細胞シート等より生じる活動電位変化のイメージングに使用されています。⁵⁾ また FET 型センサは、上述の MEA の各電極の直下に FET 型のアンプを組み込むことで、電極(ゲート電極)上で生じる微小な電荷密度変化を増幅して検出します。FET 素子が感知できるのは、電極から数ナノメートルの範囲の空間における電荷密度変化であるため、その狭い空間にも存在できるほど小さく、かつ高い電荷密度を有するようなプロトン、ナトリウムイオン等のイオンや、数十塩基にまで断片化された核酸等の小分子を、高感度に検出するために用いられています。⁶⁾

CCD イメージセンサを用いたセンシングが、基本的には基板上におかれたサンプルより発せられる光学的信号を、レンズを通してセンサアレイ上に結像させることによって行う撮像技術であったのに対し、MEA 型センサ、FET 型センサでは、センサアレイ上にサンプルを接触させて設置することで、そこから発せられる信号を直下のセンサにより直接的に検出しています。このようなセンサでは、レンズやミラーといった光学部品を必要とせず、またサンプルとセンサの間に焦点距離を設ける必要もないため、システムをさらにコンパクト、低価格にすることが可能になります。

4. バイオ LSI 測定システム

以上述べてきたように、多項目検出やイメージングを行うためのセンサには様々な検出方式があり、感度、時間・空間分解能、測定の手軽さなどの点で一長一短がありますが、システムのコンパクトさや価格の点で比較した場合、集積センサ型、とりわけ光学的信号以外の信号を検出する MEA 型や FET 型のセンシングシステムが有利であると言えます。そこで我々は、その中でも電流検出型の MEA 型センサに注目し、さらなる高機能化と使い勝手の向上を目指すことで、より多くの医療従事者や研究者が、高度なセンシングを手軽に行えるような社会の構築を目指してきました。

電流検出用 MEA 型センサは、溶液中の化学物質の電極上における酸化還元反応に由来する電流値を検出するセンサであり、電極上分子プローブの設計次第では、FET 型センサよりも広い範囲の化学物質を検出することが可能です。しかしながら、電流検出用 MEA 型センサは FET 型センサと比較して信号増幅回路がより複雑となるため、FET 型センサのように電極直下の狭い領域に増幅回路を組み込むことが困難でした。代わりに、各電極からの信号はチップ外にまで配線され、単一のアンプにより逐次増幅されていましたが、長い配線は外来ノイズが混入する余地を生じ、また逐次的な増幅操作は時間分解能の低下をもたらしていました。

そこで我々はこの問題点を解決すべく、半導体製造技術により増幅回路を高度に集積させた LSI を用

い、これを MEA と組み合わせる事で、各電極直下における増幅を行う新しいセンシングシステム“バイオ LSI 計測システム(以下バイオ LSD)”を開発しました。バイオ LSI は、センサ部に 250 μm ピッチ、20 \times 20 のアレイ状に集積された電極アレイを有します。各電極直下にはスイッチドキャパシタ方式による I/V 変換型の増幅回路が組み込まれており、この回路によって電極上のバイオマーカーの存在に由来する電気信号を高感度、かつ高速に取得することができます。⁷⁾

現在は、バイオ LSI の製品化に向けた試作機の開発もおこなっております(図 1)。試作機では、センサ、電位制御用の外部回路基板、安定化電源、データ集録用モジュールといった測定に必要なモジュールがすべて二十数センチ角の筐体内に収められており、一般的なスキャナ、CCD イメージセンサ等の光学的な検出機器と比較して、システム全体が非常にコンパクトになっています。また価格も、大学・企業等の若手研究者の少ない予算でも入手可能なレベルを実現しています。



図 1. バイオ LSI 計測システムの試作機

以下、バイオ LSI のバイオマーカーの多項目一括評価、およびバイオイメージングに対する有用性を示すため、これまでに行ってきた様々な応用実験のいくつかについて紹介いたします。

5. バイオ LSI の応用例 1—抗原抗体反応の多項目一括評価

第一の応用例として、バイオ LSI のアレイチップ型多項目一括検出への実用性を示した研究結果について紹介いたします。

アレイチップとは、スポッター等を用いて複数種類の分子プローブをチップ上にアレイ状に配列したものであり、これをサンプルと接触させることで、各分子プローブとサンプル中バイオマーカとの相互作用の有無を一括して検出するために用いられます。現在までに、DNA 断片をチップ上に配列した DNA アレイチップを用い、サンプル中 DNA とのハイブリダイゼーション反応の有無を、光スキャナ等を用いて一括して検出するといったことが行われてきました。最近ではさらに、抗体、レクチン等、DNA よりも扱いの難しいタンパク質を配列化したプロテインアレイの検出技術が研究されています。

一般的に、基板上分子プローブへのバイオマーカ吸着の有無を電気化学的に検出する場合、吸着したバイオマーカに、さらに電気化学活性物質を放出するよう設計された酵素等の分子を吸着させる“標識化”と呼ばれる操作が必要となります。そこで Hokuto らは、標識操作を施したプロテインチップのモデルとして、標識分子が修飾された基板を作製し、各点における電気化学活性物質放出の有無をバイオ LSI により検出することで、バイオ LSI のプロテインアレイ検出装置としての実用性を評価しました。⁸⁾

図 2 に示すように、シリコンにてライン状の凹凸パターンを有する基板を作製し、その凹部にのみ、標識分子としてよく用いられる酵素である GOX が化学的に修飾されています。この GOX 修飾基板をバイオ LSI と対向させ、各電極より検出される電流値を測定することにより、図 3 に示すように標識分子が近傍に存在する凹部直下の電極でのみ、GOX の酵素反応に由来する電流が観測されることが示されました。この結果より、GOX を標識分子として使用したプロテインチップにおいても、バイオ LSI は標的とするバイオマーカの有無を電気化学的に評価し得ることが示されました。

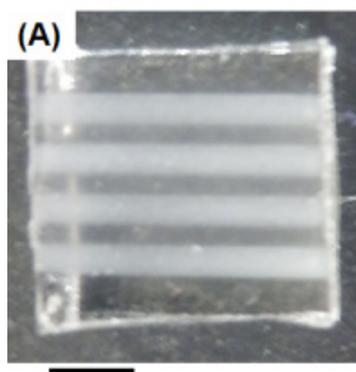


図 2. シリコンにより作製した GOX 修飾基板
凹部にのみ GOX が修飾されている

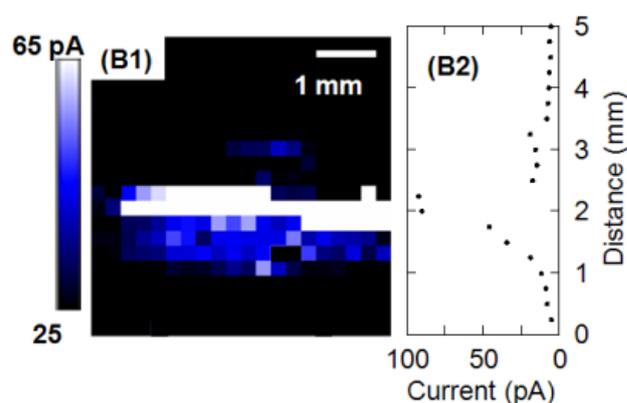


図 3. GOX 修飾基板を対向させたバイオ LSI
により検出される電流値の二次元マップ

6. バイオ LSI の応用例 2—細胞活性の多項目一括評価

アレイチップを用いた多項目一括検出は、前述の抗原、抗体や、DNA、糖鎖、ペプチド等の生体に関連した個々の化学物質のみならず、それらが組み合わさって複雑な生理活性を示すようになった細胞や細胞塊に対しても行われます。例えば創薬の分野では、アレイ状に並べた細胞塊にそれぞれ異なる種の化学物質を作用させ、各細胞塊の反応を観測することで、各化学物質の薬や毒としての作用の有無を評価するといったスクリーニング手法が考案されています。⁹⁾

DNA アレイチップやプロテインアレイチップと同様、細胞アレイチップもまた、スキャナや CCD 等の光学的な検出手段によって評価されることが多いですが、よりコンパクトで安価なバイオ LSI もまた、これらの評価を行うのに有用であると考えられます。そこで、Sen らはバイオ LSI を用いた細胞アレイチップ実現のためのデモンストレーションとして、様々な組織に分化する能力を有する幹細胞の一種である ES 細胞(Embryonic Stem Cell)の評価を行いました。¹⁰⁾

ES 細胞は、未分化の状態から筋肉、骨等の組織への分化が進行するにつれ、細胞表面に存在するアルカリフォスファターゼ(Alkaline Phosphatase : ALP)と呼ばれる酵素の量が減少していくことが知られています。細胞表面の ALP 量は、ALP と特異的に反応する p-アミノフェニルフォスフェート(p-Aminophenyl phosphate : pAPP)の反応量から間接的に測定し得るため、その値より細胞分化の進行度合いを評価するといったことが再生医療の研究等でよく行われています。Sen らもバイオ LSI を用い、マウス ES 細胞塊の ALP 量を指標とした心筋細胞への分化段階評価を試みました。

この評価では、pAPP と ALP の酵素反応により生成した p-アミノフェノール(p-Aminophenol : pAP)由来の酸化電流を検出することにより、細胞表面の ALP 量を間接的に評価できています。図 4 に、直径がより小さいサンプル群(A)と、直径がより大きく、かつ心筋としての脈動が認められる率が高いサンプル群、すなわち分化がより進行していると思われるサンプル群(B)の、pAP 由来の酸化電流値マップを示します。両者を比較した結果、細胞塊の単位表面積あたりの ALP 量は、分化がより進行していると思われる B のサンプル群の方が、より少ない傾向にあることが確認されたことから、バイオ LSI が細胞の分化段階を評価するためのツールとして有用であることが示されました。

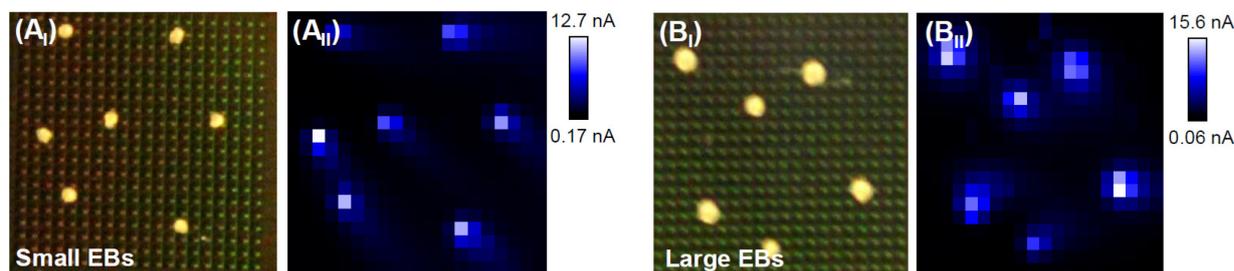


図 4. バイオ LSI 上に設置された ES 細胞塊の顕微鏡写真と電流値マップ

バイオ LSI により細胞評価を行った別の例として、神経細胞の薬剤投与に対する応答評価について紹介します。

神経細胞による情報伝達は、その過程のほとんどにおいて、細胞内外に一過的に生じる電位差(活動電位)の伝播として行われていますが、細胞と細胞の間をまたぐ際のみ、神経伝達物質と総称される種々の

化学物質の授受によって行われています。この神経伝達物質の授受は、細胞と細胞の接続部(シナプス)における複雑な機構によって制御されていますが、どのような化学物質がその制御に影響を及ぼすのかについては不明な点が多いとされています。これら化学物質が特定されれば、情報伝達の強弱を積極的に制御するための薬が開発可能になると考えられるため、複数の神経細胞にそれぞれ異なる薬剤を作用させたときの、神経伝達物質の生成量変化を一括して評価するといったスクリーニング評価が試みられています。

そこで Abe らはバイオ LSI を用い、神経細胞を様々な薬剤に暴露したときの神経伝達物質放出量の評価を試みました。¹¹⁾神経細胞のモデルとしてよく用いられる PC12 細胞塊は、高濃度の K^+ イオン溶液にさらされると、一過的な活動電位の変化を生じ、それに伴う神経伝達物質の一種であるドーパミンの放出を行うことが知られています。ドーパミンはそれ自身が電気化学活性を有するため、バイオ LSI を用いることにより電極近傍の濃度を電流値より直接的に評価できます。

図 5、図 6 に、薬剤処理した細胞塊に対して、ドーパミン由来の電流値をバイオ LSI により評価した結果を示します。図より、ドーパミンの放出を促進し、パーキンソン病の治療薬としても使用される L-DOPA で処理した細胞塊は、未処理の細胞塊と比較し電流値が高いことが確認されました。一方で、ドーパミンの放出を抑制し、精神安定剤等に使用されるレセルピンで処理した細胞塊は、低い電流値を示すことが確認されました。このように、バイオ LSI を用いれば、薬剤曝露に対して神経細胞の神経伝達物質放出能がどの様に変化するが容易に評価できます。

以上に示した例は、いずれも数個の細胞塊の評価ですが、より多くの細胞塊をアレイ上に規則的に配置し、さらに各細胞塊に対して異なる化学物質を作用させる等の方法により、容易に細胞に対する多項目一括評価システムへと発展させることが可能です。これにより、例えば再生医療の分野においては、どのような化学物質が幹細胞の分化促進、抑制に寄与するのか、また創薬の分野においては、どのような化学物質が神経細胞の働きを制御するための薬となり得るのかを、網羅的かつ簡便に調査することが可能になるものと期待できます。

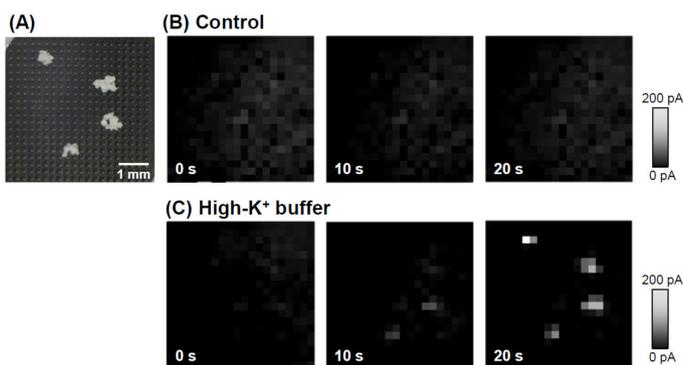


図 5. 高濃度 K^+ イオンの溶液への暴露に伴う電流値変化

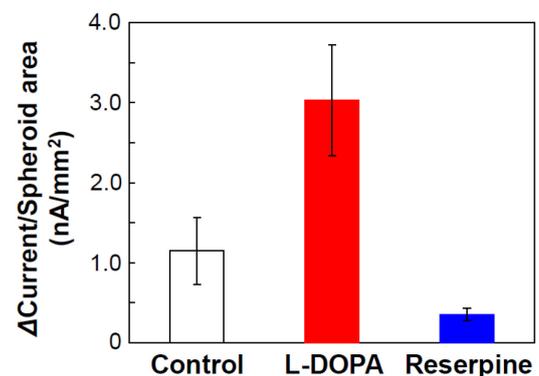


図 6. 電流値変化様々な薬剤で処理した神経細胞より測定された電流値の比較

7. バイオ LSI の応用例 3—バイオイメージング

最後に、バイオ LSI による組織片のバイオイメージングについて紹介いたします。

バイオイメージングは、細胞シートや臓器切片、時には生きたマウス丸ごとをサンプルとし、バイオマーカーのサンプル内における分布、および発生するタイミングを、スキャナやセンサアレイによる撮像により評価する技術です。バイオイメージングでは、バイオマーカーの存在をセンサが検出できるようにするための“可視化”と呼ばれる操作が必要となりますが、その一つとして免疫染色が良く用いられています。免疫染色では、検出しようとするバイオマーカーに特異的に吸着し、かつセンサが検出可能な信号を発するよう設計された標識分子を用い、これをサンプルに作用させることで、バイオマーカーを可視化しております。例えば、フルオレセイン等の蛍光色素からなる蛍光標識用分子を用いた場合、標識分子が吸着したバイオマーカーは励起光照射に対して蛍光を発するようになるため、これを PMT やフォトダイオード等で検出することで、バイオマーカーのイメージングが可能となります。

バイオ LSI を用いたイメージングにおいても、バイオマーカーの可視化は同様のコンセプトで行うことができます。例えば ALP、GOX 等の酵素を含む標識分子を用いれば、これら標識分子は溶液中基質との酵素反応により電気化学活性物質を生成するため、これを近傍の電極にて検出することでバイオマーカーのイメージングが可能になります。また、前述のドーパミン等、検出しようとするバイオマーカー自体が電気化学活性を有する場合には、標識を行わない直接的なイメージングも可能です。

スキャナや CCD イメージセンサによる光学的なイメージングに対し、バイオ LSI による電気化学的なイメージングが有する特徴の一つは、このように検出対象によっては標識操作が必要ないという点です。光学的な検出において必須となる標識分子や蛍光指示薬は、時に細胞に対して毒性を示したり、その自然な活動を妨げたりすると考えられています。また、細胞より放出される化学物質等、細胞や基板等に固定化されていない溶液中バイオマーカーに関しては、原理的に標識分子による可視化が難しい場合もあります。通常の標識操作では特異的な吸着の有無を判断するため、標識分子を検出対象と接触させた後に未吸着分のみを評価系より洗い流す操作が必要となります。しかしこの操作は、検出対象を何らかの担体に固定化し、未吸着標識分子と共に洗い流されることを防ぐ必要があるため、基本的に溶液中バイオマーカーに対しては適応されません。このため、前述の神経細胞による神経伝達物質の放出などは、光学的に直接検出することが難しいとされています。神経細胞は神経伝達物質の放出に伴い、過渡的に大量の Ca^{2+} イオンを細胞内への取り込むことが知られているため、光学的センシングシステムでは代わりに細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を蛍光指示薬等により検出することで、神経伝達物質の放出を間接的に評価しています。¹²⁾

イメージングにおいてバイオ LSI が有するもう一つの特徴は、サンプルに励起光を照射する必要が無いという点です。光学的検出法の主流である蛍光検出法においては、蛍光標識されたバイオマーカーの可視化のために、常にサンプルに励起光を照射する必要があります。しかしこの励起光照射は、有害な活性酸素やフリーラジカルを発生させ、細胞活性の変化や細胞死を引き起こす原因とも言われています。¹³⁾このため、蛍光観察における細胞の長時間のイメージングは避けられてきましたが、一方でバイオ LSI によるイメージングではこのような問題は生じません。

バイオイメージングの分野において、このような様々な利点を有するバイオ LSI の応用性を示すデモンストレーションとして、Inoue らは酵素を含むゲルスポットを細胞シート、臓器切片等の組織片サン

プルと見立て、このサンプルが有する酵素活性分布のイメージングを行いました。¹⁴⁾

酵素活性のイメージングを行うにあたり、あらかじめバイオ LSI の全電極は、西洋わさびペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase : HRP)、及びオスmium錯体を含むポリマー(HRP-Os ポリマー)にて修飾されています。HRP は過酸化水素と特異的に反応する酵素であり、オスmium錯体とともに用いると、酵素反応に伴って電気化学活性を有するオスmium酸化体を生成するため、HRP-Os ポリマーを修飾した電極は過酸化水素を電気化学的に検出するためのセンサとして機能させることができます。このバイオ LSI 上に、グルコースと特異的に反応する酵素である GOX を含むゲルをスポットし、グルコース溶液中に浸すと、ゲル内での GOX 酵素反応に伴い生じた過酸化水素が HRP-Os ポリマーの作用により近傍の電極によって検出されます。400 個のセンサ電極によって得られる GOX 酵素活性のイメージを、200 ms ごとに取得した結果、スポット上のみであった電流検出範囲が、その後過酸化水素の蓄積と拡散に伴い、徐々に外側へ広がっていく様子を観測することに成功しました。

このように、バイオ LSI は細胞シート、臓器切片といった組織片サンプルにおける酵素活性の分布を、高い空間・時間分解能をもってイメージングするのに有用なツールであることがわかります。また酵素活性のみならず、上述の免疫染色様の技術を用いれば、従来の光学的センシングシステムを用いて行われていた細胞上の抗原・抗体、糖鎖、ペプチド等のイメージングにも応用することが可能であると期待できます。

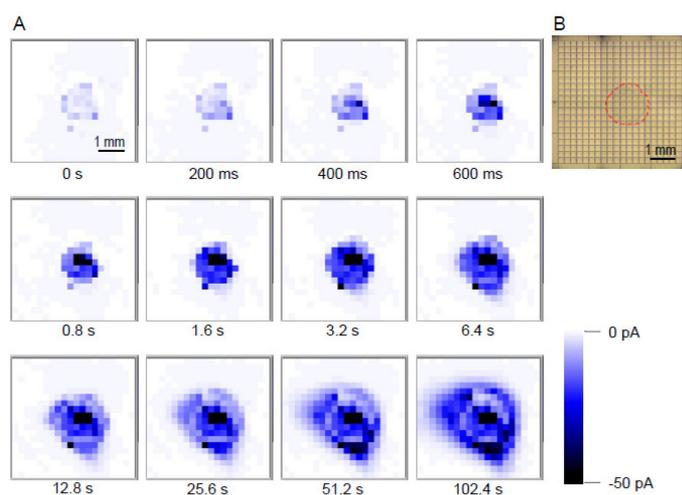


図 7. 組織片サンプルに見立てたゲルスポットが有する酵素活性のイメージング*

*Reproduced from Ref. 14 with permission from the Royal Society of Chemistry.

8. まとめ

増幅回路を高度に集積させた LSI チップと MEA を組み合わせることにより、高感度かつ高い空間・時間分解能を有する電流検出型 MEA センサ、バイオ LSI 計測システムを作製しました。さらに、本システムを用いた多項目一括検出および組織片サンプル等のバイオイメージングへの応用を示した研究結果を紹介しました。バイオ LSI 計測システムはここに示してきた応用例の他にも、細胞呼吸活性測定による細胞生死評価や、遺伝子導入による細胞のタンパク質発現量変化の評価等、様々な評価に応用されています。¹⁵⁾

従来のスキャナや CCD イメージセンサ等によって行われていたこれらの評価を、バイオ LSI はよりコンパクトで安価なシステムで実現できるのみならず、検出対象によっては標識操作を必要としない、細胞へのダメージとなる励起光照射を必要としない等、組織片サンプルのイメージング等で特に重要となる利点をも有します。これらの利点を生かした高度なセンシングを、より多くの医療従事者や研究者が手軽に行えるような社会の構築を目指すべく、今後データ取得速度の高速化等の高機能化や、筐体デザインや測定プログラム等のブラッシュアップによる使い易さ向上に努めていきたいと考えております。

[参考文献]

- 1) K. Strimbu and J. A. Tavel, *Curr. Opin. HIV AIDS* **5**, 463 (2010).
- 2) G. U. Lee, D. A. Kidwell, and R. J. Colton, *Lanbmuir* **10**, 354 (1994).
- 3) K. Nagamine, S. Onodera, Y. Torisawa, T. Yasukawa, H. Shiku, and T. Matsue, *Anal. Chem.* **77**, 4278 (2005).
- 4) Cohen S. J. et. al, *Ann Oncol.* **20**, 1223 (2009).
- 5) Liu M. G., Chen X. F., He T., Li Z., and Chen J., *Neurosci. Bull.* **28**, 409 (2012).
- 6) T. Sakata, and Y. Miyahara, *Angew. Chem. Int. Edn.* **45**, 2225 (2006).
- 7) 國方亮太、須田篤史、航空電子技報 **35**, 2 (2014).
- 8) T. Hokuto, T. Yasukawa, R. Kunikata, A. Suda, K. Y. Inoue, and T. Matsue, *Chem. Lett.* **43**, 758 (2014).
- 9) S. Yamada, E. Uchimura, T. Ueda, T. Nomura, S. Fujita, K. Matsumoto, D. P. Funeriu, M. Miyake, and J. Miyake, *Biochemi. Biophys. Res. Comm.* **363**, 926 (2007).
- 10) M. Şen, K. Ino, K. Y. Inoue, T. Arai, T. Nishijo, A. Suda, R. Kunikata, H. Shiku, and T. Matsue, *Biosens. Bioelectron.* **48**, 12 (2013).
- 11) H. Abe, K. Ino, C. Z. Li, Y. Kanno, K. Y. Inoue, A. Suda, R. Kunikata, M. Matsudaira, Y. Takahashi, H. Shiku, and T. Matsue, *Anal. Chem.* **87**, 6364 (2015).
- 12) K. Takesako, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Hirose, and M. Iino, *Anal Commun.* **34**, 391 (1997).
- 13) J. Y. Tinevez, J. Dragavon, L. Baba-Aissa, P. Roux, E. Perret, A. Canivet, V. Galy, and S. Shorte, *Methods Enzymol.* **506**, 291 (2012).
- 14) K. Y. Inoue, M. Matsudaira, R. Kubo, M. Nakano, S. Yoshida, S. Matsuzaki, A. Suda, R. Kunikata, T. Kimura, R. Tsurumi, T. Shioya, K. Ino, H. Shiku, S. Satoh, M. Esashi and T.

Matsue, Lab. Chip **12**, 3481 (2012).

- 15) M. S, K. Ino, K. Y. Inoue, A. Suda, R. Kunikata, M. Matsudaira, H. Shiku, and T. Matsue, Anal. Method **6**, 6337 (2014).