

■S2 群 (ナノ・量子・バイオ) - 7 編 (バイオナノテクノロジー)

2 章 バイオナノテクノロジー応用デバイス・システム

【本章の構成】

本章では以下について解説する.

- 2-1 バイオ分析・計測デバイス
- 2-2 細胞機能解析デバイス
- 2-3 医療応用デバイス・システム

■S2 群 - 7 編 - 2 章

2-1 バイオ分析・計測デバイス

2-1-1 DNA チップ, DNA マイクロアレイ

2-1-2 ハイスループット DNA 分析チップ

(執筆著者: 北川文彦) [2010年5月 受領]

微細加工技術により複数のチャンネルを集積化したマイクロチップ上において、電気泳動分離分析を並行して行うことで、ハイスループットな DNA 分析を実現できる。このような並列化チャンネルチップを用いる電気泳動分析は、microfabricated capillary array electrophoresis (μ CAE) と呼ばれており、現在では 384 試料の同時分析が可能となっている。

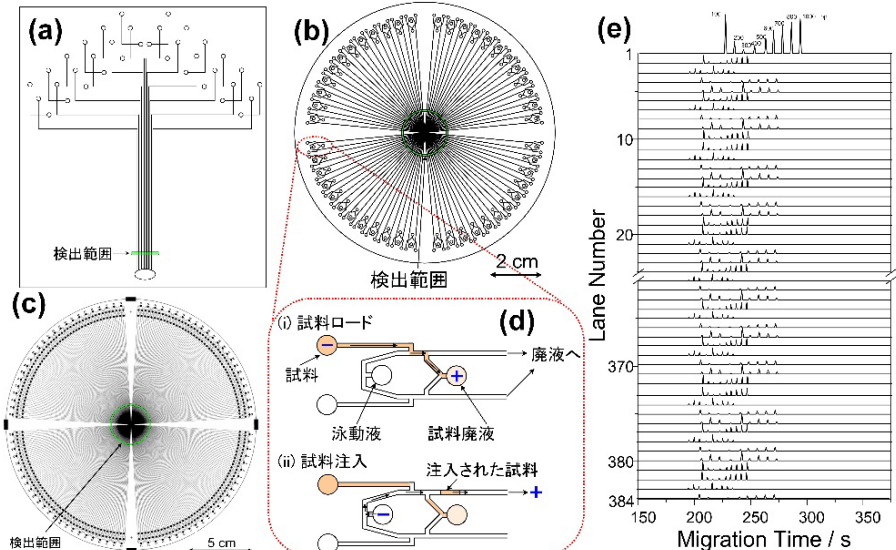


図 1-2-1 (a) 12 レーン μ CAE チップ, (b) 96 レーン μ CAE チップ, (c) 384 レーン μ CAE チップ, (d) μ CAE チップにおける試料導入, (e) 384 レーン μ CAE チップで得られる電気泳動図の概略^{1),3)}
(Copyright © 1997, 1999, 2002 American Chemical Society)

μ CAE チップを動作させる原理は、クロス型パターンのチャンネルと 4 つの溶液ポートを有するチップにおいて電気泳動分析を行うマイクロチップ電気泳動とほぼ同様である。DNA を分子ふるい効果によりサイズ分離するために、チャンネル内にはヒドロキシエチルセルロースやポリジメチルアクリルアミドゲルなどが充填される。このようなゲルを充填したクロス型チャンネルを集積化することで μ CAE チップを作製できるが、チャンネルと溶液リザーバーの配置を工夫することで、極めて高度に集積化されたデバイスが開発されている。図 1-2-1(a)~(c)にこれま

でに開発されてきた μ CAE チップの概略を示す。図 1・2・1(a)は最初に作製された μ CAE チップであり、シンプルなクロス型パターンのチャンネルを 12 レーン並べた形状となっている。この 12 レーン μ CAE チップにおいては、試料溶液を注入するためのチャンネルをチップ上部に集め、分離チャンネルをチップ中央部から下部にかけて並列化している。図 1・2・1(a)の検出範囲を電動ステージで移動させながらレーザー照射することができるため、蛍光ラベルした DNA からの蛍光を一斉に計測することが可能となっている。

図 1・2・1(b)は 96 本の分離チャンネルが集積化された μ CAE チップであり、円の外周付近で注入された試料が電気泳動により中心側へ向かう構造となっている。このため、中心部付近で回転式の共焦点レーザーを照射することで、試料の検出が可能となる。なお、試料の注入は図 1・2・1(d)に示すようなダブル T チャンネルを利用して行われる。初めに試料液リザーバーをグラウンドとし、試料液リザーバーに高電圧を印加することで、DNA 試料は 2 つの T インジェクタの間にロードされる。その後、チップ中心部に設けた液リザーバーを陽極に、泳動液リザーバーを陰極に切り替えることで、T インジェクタの間にロードした試料のみを分離チャンネル内へ注入される。この 96 レーン μ CAE チップでは、1 分当たり DNA 断片試料 60 検体を分析することができる。また、このチャンネル集積化形状を更に進展させることにより、384 レーン μ CAE チップが開発されている (図 1・2・1(c))。DNA 断片を分析すると図 1・2・1 (e) のような電気泳動図が得られ、およそ 5 分の分析時間で 384 検体を同時に分析できることが分かる。溶液の入れ替え時間などを考慮しても、1 日で 147000 検体という極めてハイスループットな分析を実現できる。

■参考文献

- 1) A.T. Woolley, G.F. Sensabaugh, and R.A. Mathies : “High-Speed DNA Genotyping Using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chips,” *Anal. Chem.*, vol.69, pp.2181-2186, Jun. 1997.
- 2) Y. Shi, P.C. Simpson, J.R. Scherer, D. Wexler, C. Skibola, M.T. Smith, and R.A. Mathies : “Radial Capillary Array Electrophoresis Microplate and Scanner for High-Performance Nucleic Acid Analysis,” *Anal. Chem.*, vol.71, pp.5354-5361, Dec. 1999.
- 3) C.A. Emrich, H. Tian, I.L. Medintz, and R.A. Mathies : “Microfabricated 384-Lane Capillary Array Electrophoresis Bioanalyzer for Ultrahigh-Throughput Genetic Analysis,” *Anal. Chem.*, vol.74, pp.5076-5083, Oct. 2002.

2-1-3 プロテインチップ

2-1-4 タンパク質分析チップ

(執筆者：佐藤記一) [2010 年 8 月 受領]

タンパク質の分析において最も多用されているのは電気泳動分析であるため、ここではチップ電気泳動について概説する。電気泳動に用いるチップは一般的のものでよく、流路形状にはあまり特徴はないが、タンパク質を分析するにあたって注意すべき点を以下に記す。

(1) 未変性タンパク質と SDS 変性タンパク質

タンパク質を生体から抽出してきたそのままの状態では分析すると、本来持っていた電荷とストークス半径に応じた電気泳動移動度を示す。一方、分子量に応じて分離する場合、従来法では界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と還元剤を用いて変性させたタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離する (SDS-PAGE)。この手法を踏襲して分離を行うにはタ

ンパク質試料をあらかじめ SDS を含む溶液中で加熱変性させる必要がある。

(2) 分離モードと泳動液

未変性タンパク質を通常のキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) で分離する場合には、中性の緩衝液を用いればよいが、分子量に応じて分離度の差を大きく出したい場合には泳動液中に高分子を添加する。最も効果が大きいのは流路内でポリアクリルアミドゲルを重合させてゲル電気泳動を行う方法¹⁾であるが、流路内にゲルを固定するため、チップの再利用が難しいという問題点がある。それに対して高分子溶液を用いる方法はより手軽であり、頻用されている。主な高分子としては、架橋を持たないポリアクリルアミド、セルロース誘導体、ポリエチレンオキシドなどが用いられている。これらは未変性タンパク質の分離にも用いられるが、泳動液に SDS を添加すれば SDS 変性タンパク質の分子量に応じた分離を実現することもできる。一般に、チップ電気泳動は泳動距離が短いため、CZE よりも高粘度の分離材を用いた手法の方が分離がよくなる傾向にある。これら以外にも等電点電気泳動²⁾、アフィニティ電気泳動などを実現した例もある³⁾。

(3) チップ素材と表面修飾

チップの素材としてはガラスが最も素性が良く、頻用されている。樹脂では PMMA が多く用いられる一方、PDMS は報告が少ない。いずれの素材でもタンパク質の流路壁面への吸着が問題となる。疎水性の高い樹脂チップを用いる場合や SDS 変性タンパク質の分離時には特に重大な問題となる。そこで流路内壁の修飾が必要となるが、大きく分けて 2 種類の方法がある。一つは物理吸着法であり、高分子を流路内壁に吸着させることにより修飾する方法⁴⁾、手軽である反面、場合によっては被覆効率が高くない場合もある。もう一つの方法は共有結合によるもので、シランカップリング剤などを用いて、ポリアクリルアミド、PEG、MPC ポリマーなどを内壁に結合させる方法である^{5)~8)}。概してこの手法の方が耐久性は高いと考えられる。これらの表面修飾を行うとタンパク質の吸着が抑制されるだけでなく、電気浸透流が大幅に押さえられるため、分離性能の向上に大きく寄与する可能性がある。

(4) 標識と検出

タンパク質は 280 nm の UV 吸収で検出可能ではあるものの、光路長の短いチップでは高感度検出は不可能であるため、検出は通常蛍光によって行われる。タンパク質の蛍光標識は共有結合型と吸着型の 2 通りに大別できる。共有結合型はタンパク質のアミノ基やカルボキシル基と結合する蛍光試薬をあらかじめタンパク質試料と反応させてから分析する手法で、FITC をはじめ様々な試薬が入手できる。

一方、吸着型としては、タンパク質の疎水部分あるいは SDS 変性タンパク質と結合したときのみ蛍光性を持つような色素を用いることにより、簡便で高感度な検出を行うものであるが、実際には SDS 電気泳動時に大量に共存する SDS ミセルとも反応してしまうために、高感度分析は難しいことが多い。これまでにタンパク質分離後に NanoOrange を反応させる方法や SYPRO Orange などと反応させながら分離した後にシース液を用いて SDS ミセルを取り除くことによりタンパク質と色素の複合体のみを検出する方法などが提案されている^{9)~11)}。

蛍光以外の検出法としては、化学発光¹²⁾や電気化学検出¹³⁾などを実現している例がある。また、将来的には質量分析計と接続した CE-MS システムにより、タンパク質の解析を行う試みも有望であろう。MALDI ターゲットへの噴霧や、エレクトロスプレーへの直接導入によりイオン化することにより、タンパク質の正確な分子量測定やフラグメント解析によるタンパク

質の同定などの応用が期待できる¹⁴⁾。

これまでは単一のモードでの分析を行うものが多かったが、最近、従来の2次元電気泳動法の代わりとなる複数の分離モードを組み合わせた分析法の開発が行われている(図1・4・1)¹⁵⁾。等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた分離能の高いシステムが開発できれば幅広い応用が期待できる。

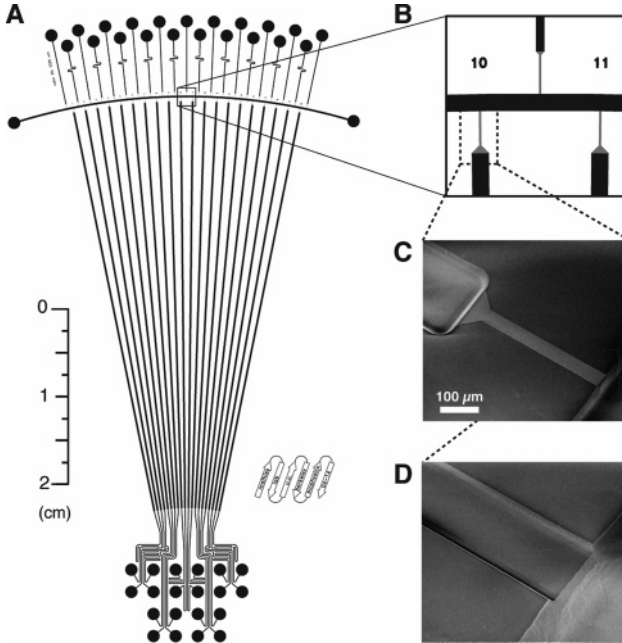


図 1・4・1 2次元電気泳動チップの一例¹⁵⁾。1段階目の等電点電気泳動を水平方向の流路で行い、2段階目の分離を上下方向に行う。

■参考文献

- 1) J. Han, A.K. Singh : J. Chromatogr. A, vol.1049, pp.205-209, 2004.
- 2) W. Tan, Z.H. Fan, C.X. Qiu, A.J. Ricco, I. Gibbons : Electrophoresis, vol.23, pp.3638-3645, 2002.
- 3) N.H.H. Heegaard, R.T. Kenedy : J. Chromatogr. A, vol.768, pp.93-103, 2002.
- 4) Y. Liu, J.C. Fanguy, J.M. Bledsoe, C.S. Henry : Anal. Chem., vol.72, pp.5939-5944, 2000.
- 5) D. Xiao, T. Van Le, M.J. Wirth : Anal. Chem., vol.76, pp.2055-2061, 2004.
- 6) S. Hu, X. Ren, M. Bachman, C.E. Sims, et al. : Anal. Chem., vol.74, pp.4117-4123, 2004.
- 7) D. Belder, A. Deege, F. Kohler, M. Ludwig : Electrophoresis, vol.23, pp.3567-3573, 2002.
- 8) J.J. Lu, S. Liu : Electrophoresis, vol.27, pp.3764-3771, 2006
- 9) Y.J. Liu, R.S. Foote, S.C. Jacobson, R.S. Ramsey, J.M. Ramsey : Anal. Chem., vol.72, pp.4608-4613, 2000.
- 10) L.J. Jin, B.C. Giordano, J.P. Landers : Anal. Chem., vol.73, pp.4994-4999, 2001.
- 11) L. Bousse, S. Mouradian, A. Minalla, H. Yee, et al. : Anal. Chem., vol.73, pp.1207-1212, 2001.
- 12) X.Y. Huang, J.C. Ren : Electrophoresis, vol.26, pp.3595-3601, 2005.
- 13) N.A. Lacher, S.M. Lunte, R.S. Martin : Anal. Chem., vol.76, pp.2482-2491, 2004.
- 14) J.S. Mellors, V. Gorbounov, R.S. Ramsey, J.M. Ramsey : Anal. Chem., vol.80, pp.6881-6887, 2008.

15) C.A. Emrich, I.L. Medintz, W.K. Chu, R.A. Mathies : Anal. Chem., vol.79, pp.7360-7366, 2007.

2-1-5 酵素機能解析チップ

(執筆者：鈴木博章) [2010年7月 受領]

酵素は優れた分子認識機能を有する生体触媒であり、バイオセンサが提案されて以来、実に様々なデバイスで使用されてきた。多くの生化学物質のセンシングでは、酵素は何らかの形で固定され、酵素の基質となる物質が検出されるが、酵素機能情報が求められる場合もある。マイクロチップの特長の一つとして、試薬の使用量が微量であることが挙げられるが、多くの場合、微量の酵素サンプルを扱うことになるため、この点において極めて有利である。

Michaelis-Menten 型酵素反応における酵素反応速度は以下の式で与えられる (図 1・5・1(a))。

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

ここで、 V_{\max} はの最大値、 $[S]$ は基質濃度、 K_m は Michaelis 定数である。 $[S]$ が十分に小さい場合、 v と $[S]$ の関係は直線関係になり、バイオセンサで基質濃度を調べる場合には、この関係が用いられる。一方、 $[S]$ が十分に大きい場合には、漸近線 ($V_{\max} = \text{一定}$) に近づく。酵素活性は単位時間内に消費された基質量あるいは生成された生成物量として表すことができる。酵素活性の測定では、酵素反応による基質濃度の変化が問題となる。したがって、十分な基質の存在下で、酵素を基質溶液と接触させた直後の初期反応速度を調べる。酵素機能解析では、しばしば定数 K_m 、 V_{\max} を求めるが、これには、 $1/v$ と $1/[S]$ の関係 (Lineweaver-Burk プロット) を用いる (図 1・5・1(b))。このプロットでは、傾きが K_m/V_{\max} 、 x 切片が $-1/K_m$ 、 y 切片が $1/V_{\max}$ の直線となるため、これらの定数を容易に求めることができる。

酵素機能解析をチップ上で行うにあたり、酵素を含む溶液と、酵素の基質溶液との混合が必要になるが、これにはしばしば Y 字型あるいは T 字型流路が用いられる。分岐した流路の一方からは基質溶液を、他方からはサンプル溶液を導入する。合流部では 2 液は層流をなして流れるが、流速によっては、低分子は溶液が流路中を流れる間に他方の溶液中に十分に拡散する。したがって、下流に何らかの基質あるいは反応生成物濃度測定用センサを形成しておき、その濃度変化を調べる。初期の研究では、電気浸透流型送液システムが多く用いられたが、阻害剤の影響も含め、acetylcholinesterase、 β -galactosidase、protein kinase A などの酵素の機能解析が行われている^{1)~3)}。また、微小流路中に形成した反応容器に、西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish Peroxidase : HRP) あるいは β -galactosidase を固定したビーズを充填し、効率的な酵素機能解析が行えることも示されている⁴⁾。このようなマイクロフルーイディックデバイス

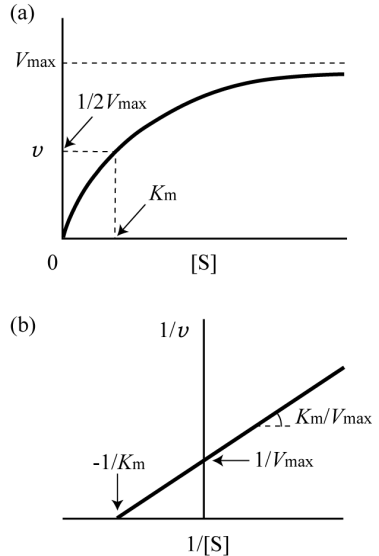


図 1・5・1 Michaelis-Menten 型酵素反応における v と $[S]$ の関係(a)と Lineweaver-Burk プロット(b)

では、検出以外の機能を導入することもできる。圧力送液により 2 つの T 字型流路の片方で洗剤により細菌を溶菌させ、放出された β -galactosidase を他方の流路で検出することが試みられている⁵⁾。

酵素機能解析のために有用なデバイスとしては、上記の電気浸透流によるもののほかに、コンパクトディスク (CD) を用い、微小流路ネットワーク中に形成したバルブを遠心力により順次開き、複数の溶液を混合するものが報告されている⁶⁾。このデバイスでは、CD の動径方向に多数の同じ微小流路を形成することができるため、多数のサンプルを一括して処理することができる。

以上の例では、送液のための高圧電源、ポンプやその他の駆動機構が必要になるが、これは携帯型システムを実現するうえでは不都合である。この問題を解決する手段として、基質をあらかじめ微小流路中に凍結乾燥して固定しておき、これを酵素を含むサンプル溶液で溶かし、酵素反応を進行させる方法も提案されている⁷⁾。

加水分解酵素の活性測定では、微量の溶液の pH を一定に維持した状態でプロトン量の増減を調べる。これを実現するために、変則的な 3 電極系を使用した電気化学的 pH スタットが提案されている⁸⁾。pH を最適値に一定に維持した状態で、ペプシン、トリプシンなどの加水分解酵素の活性測定が行えることが示されている⁸⁾。加水分解酵素に限らず、酵素反応の進行に伴い pH が変化する場合があるが、この pH スタットはこれらの酵素機能解析においても、微量サンプルの pH を一定に維持するのに有効である。

■参考文献

- 1) A.G. Hadd, D.E. Raymond, J.W. Halliwell, S.C. Jacobson, and J.M. Ramsey : "Microchip device for performing enzyme assays," *Anal. Chem.*, vol.69, pp.3407-3412.
- 2) A.G. Hadd, S.C. Jacobson, and J.M. Ramsey : "Microfluidic assays of acetylcholinesterase inhibitors," *Anal. Chem.*, vol.71, pp.5206-5212.
- 3) C.B. Cohen, E. Chin-Dixon, S. Jeong, and T.T. Nikiforov : "A microchip-based enzyme assay for protein kinase A," *Anal. Biochem.*, vol.273, pp.89-97.
- 4) G.H. Seong, J. Heo, and R.M. Crooks : "Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system," *Anal. Chem.*, vol.75, pp.3161-3167.
- 5) E.A. Schilling, A.E. Kamholtz, and P. Yager : "Cell lysis and protein extraction in a microfluidic device with detection by a fluorogenic enzyme assay," *Anal. Chem.*, vol.74, pp.1798-1804.
- 6) D.C. Duffy, H.L. Gillis, J. Lin, J. Norman F. Sheppard, and G.J. Kellogg : "Microfabricated centrifugal microfluidic systems: characterization and multiple enzymatic assays," *Anal. Chem.*, vol.71, pp.4669-4678.
- 7) K. Morimoto, S. Upadhyay, T. Higashiyama, N. Ohgami, H. Kusakabe, J. Fukuda, and H. Suzuki : "Electrochemical microsystem with porous matrix packed-beds for enzyme analysis," *Sens. Actuators B*, vol.124, pp.477-485.
- 8) K. Morimoto, M. Toya, J. Fukuda, and H. Suzuki : "Automatic electrochemical micro-pH-stat for biomicrosystems," *Anal. Chem.*, vol.80, pp.905-914.

2-1-6 糖鎖チップ

(執筆: 三浦佳子) [2015年9月 受領]

ヒトゲノムの解析が終わって久しいが、その後の生物学の発展の上では、得られるタンパク質とリガンドとの相互作用が鍵を握るようになってきている。生体リガンドの中でも糖質は細胞の表面をくまなく覆っていることから、その相互作用の解析が重要となっている。

(1) 糖鎖の多様性について

生理活性糖鎖は、糖脂質、糖タンパク質、生理活性多糖に分類される。いずれの場合も糖の骨格を持つために、オリゴ糖の構造パターンは複雑であり、多様な構造体が存在する¹⁾。糖鎖には、グルコースで考えれば、ヘミアセタールも含めて、5つの水酸基による糖の結合部位があり、それぞれに立体異性体を持つ可能性がある。また、糖の種類についても、水酸基の結合の立体特異性、水酸基以外の官能基の導入（アミノ糖、硫酸化糖、ウロン酸など）によって多様である。

(2) 糖鎖の調製、入手

糖鎖チップを作製するためには、こうした糖鎖を入手することが前提であり、これが最も苦勞の多い点である。糖鎖の入手は、有機合成、生化学合成、または生体由来物を抽出することによって得られるが、いずれの場合にもその構造に複雑さから高価である。有機合成による糖鎖チップ合成については、糖鎖のライブラリー合成、固相合成、ワンポッド合成などが進められている。有機合成は、薬品開発における化合物ライブラリーも意識されているが、基本的には、糖鎖チップにおけるプロテオーム解析を意識されているものが多い。Seebergerのグループでは、固相合成を通じた硫酸化糖ライブラリーとそのプロテオーム解析への応用について検討が行われている²⁾。Wongらのグループでは、多糖のライブラリー合成を行い、グライカンパイオチップとして展開している³⁾。天然の生理活性糖をそのままチップに利用しようとする試みもある。西村らは、糖鎖が、還元末端を持っていることを利用して、天然糖を抽出し、固定化することを試みている。糖の還元末端はヘミアセタール構造（アルデヒド）を持っており、強い求核基によって結合を形成する。これを用いて、チップを作り上げることができることを報告している⁴⁾。

(3) 糖鎖-タンパク質の相互作用の解析

糖鎖とタンパク質の相互作用は時として弱く検出することが難しい。非常に特異的な相互作用を検出することが難しい。糖-タンパク質の相互作用の検出では、古くからあるELISA法を用いたり、またはELISAで用いている抗体を糖認識タンパク質（レクチン）したりすることで、検出できることが知られている⁵⁾。光学的なまたは電気化学的な測定法では、網羅的かつ鋭敏な相互作用の解析が可能になる。特に光学的な測定法の一つである、表面プラズモン解析については、弱い相互作用、速度論解析も可能になることから、糖チップの解析にも適用されている⁶⁾。糖-タンパク質間の相互作用を考慮するならば、糖鎖の密度も大きく影響を受ける。糖鎖は密集することによって、複数ある糖認識サイトと結合を作って、相互作用が有利になっていく。そのため、糖チップにおいても、糖鎖を密集させて結合させることが重要である。

(4) 糖鎖チップの応用範囲

糖鎖チップのアプリケーションはリガンド探索にあたり、基礎生物学の解析と医薬の薬物候補のピックアップに用いられる。糖鎖チップの性能評価として、糖認識タンパク質（レクチン）を用いた試験が行われてきた。近年、こうした基礎研究の結果を受けて、実践的な生物学の分野への糖チップの適用が行われている。例えば、種々の生理活性糖質を固定化したチップを用いることで、ウイルスや毒性タンパク質が感染する動物種の解析⁷⁾、癌細胞の転移の解析などが実際に行われるようになってきている。また、糖鎖を固定化させたチップが実際に発売されるようになっていくだけでなく、マイクロ粒子を用いた光学解析手法の解析なども提案されている。

■参考文献

- 1) 川寄敏祐, 井上圭三: “糖と脂質の生物学,” 共立出版, 2001.
- 2) C. Noti, J.L. dePaz, L. Polito, and P.H. Seeberger: “Preparation and Use of Microarrays Containing Synthetic HeparinOligosaccharides for the Rapid Analysis of Heparin-Protein Interactions,” *Chemistry-A European J.*, vol.12, no.34, pp.8664-8686, 2006.
- 3) C.Y. Wu and C.H. Wong: “Automated Programmable One-Pot Synthesis of Glycans,” *Glycoscience: Biology and Medicine*, pp.45-52, 2015.
- 4) T. Murakami, A. Saito, S.I. Hino, S. Kondo, S. Kanemoto, K. Chihara, H. Sekiya, K. Tsumagari, K. Ochiai, and K. Yoshinaga: “Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation,” *Nature cell biology*, vol.11, no.10, pp.1205-1211, 2009.
- 5) I. Ryden, A. Lundblad, and P. Pahlsson: “Lectin ELISA for analysis of α 1-acid glycoprotein fucosylation in the acute phase response,” *Clinical chemistry*, vol.45, no.11, pp.2010-2012, 1999.
- 6) A.R. de Boer, C.H. Hokke, A.M. Deelder, and M. Wuhrer: “Serum antibody screening by surface plasmon resonance using a natural glycan microarray,” *Glycoconjugate journal*, vol.25, no.1, pp.75-84, 2008.
- 7) J. Stevens, O. Blixt, J.C. Paulson, and I.A. Wilson: “Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses,” *Nature Reviews Microbiology*, vol.4, no.11, pp.857-864, 2006.
- 8) C.C. Wang, Y.L. Huang, C.T. Ren, C.W. Lin, J.T. Hung, J.C. Yu, L.Y. Alice, C.Y. Wu, and C.H. Wong: “Glycan microarray of Globo H and related structures for quantitative analysis of breast cancer,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol.105, no.33, pp.11661-11666, 2008.

2-1-7 ウェアラブルバイオセンサ

(執筆者: 三林浩二) [2010年6月受領]

ISFET (Ion Selective Field Effect Transistor) や μ -TAS (Total Analysis System) に代表されるように, 半導体加工技術を用いることでデバイスの小型化が図られ, 微量生体成分の計測が可能な化学/バイオデバイスを大量かつ安価に供給できるようになった. 一方, 連続的な生体計測を考えるうえで, 小型化や微細化と同様, センサデバイスの柔軟性や装着性も重要な特性である. 例えば, 柔らかい薄膜の機能性高分子膜を基板とし, 半導体加工技術を施す Bionic-MEMS 技術により, 柔軟性に優れた化学センサ (酸素, バイオ, 導電率, 湿度など) を作製することができ, 非侵襲的な新しい生体計測が可能となる.

(1) 結膜経皮ガス計測のためのウェアラブル酸素センサ

ウェアラブル酸素センサは, 機能性高分子膜の一つであるガス透過性膜をセンサの構造部材として用いた, 薄い膜状の酸素センサである (図 1・7・1(a)). 本センサは, ガス成分の透過が可能なガス透過性膜上に半導体加工技術にて白金電極と銀電極をパターン形成され, メンブレンフィルタと金属溶着性膜を積層し, KCl 電解液を包含するように全端部を熱溶着し, 短冊形状として成形されている. 本センサは市販の酸素電極と同様に溶存酸素を 0~8.0 mg/L の範囲で定量することが可能で, 膜厚は 84 μ m と薄く, それぞれの膜が元来, 有する柔軟性を維持しており, 生体への装着性に優れた非侵襲計測用のセンサデバイスである.

ウェアラブル酸素センサの応用として瞼結膜での経皮酸素計測が挙げられる (図 1・7・1(b)). 瞼結膜の組織層は非常に薄く, 年齢に依存しない経皮計測部位である. 日本白色種兔に結膜部位に本センサを装着し, センサ出力の安定後, 20.9% (大気) \rightarrow 60% \rightarrow 95% 酸素の酸素吸引による出力の連続的なモニタリングが行った結果, 大気呼吸時において安定したセンサ出力が

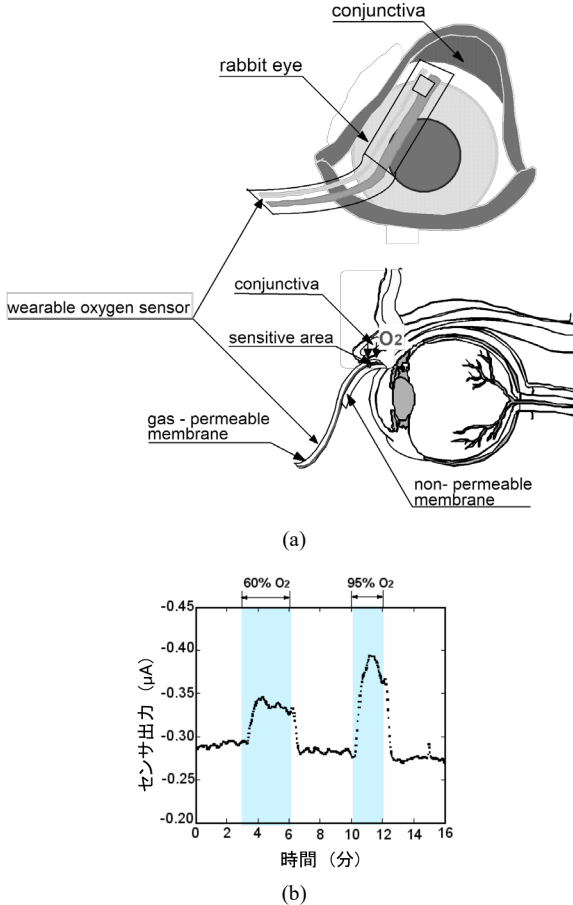


図 1-7-1 日本白色種兎での脛結膜における経皮ガス計測実験(a), 及び脛結膜での経皮酸素計測のセンサ応答例(b)²⁾

観察され、高濃度酸素の吸引と大気呼吸に戻した際において、著しい出力の増加と減少がそれぞれ確認され、結膜経皮酸素を簡便に計測することができた。薄膜で柔軟なウェアラブルセンサは眼部において有効な計測デバイスであるとともに、動脈ガスの非侵襲計測において脛結膜は、特別な処理を行うことなく、応答性に優れた経皮ガスモニタリングが可能である²⁾。

(2) 涙液グルコース計測用のソフトコンタクトレンズ型バイオセンサ

血糖値との濃度相関が報告³⁾されている涙液中グルコースの連続計測を目的とし、ソフトコンタクトレンズ型バイオセンサを高分子材料及び微細加工技術を用いて作製し、眼部における非侵襲生体計測が行った。

ソフトコンタクトレンズ型センサ (図 1・7・2)

は、柔軟な生体適合性の Polydimethyl Siloxane (PDMS) を用い、ソフトコンタクトレンズを3次元成形した後、レンズ表面に白金電極及び銀電極を直接スパッタにてパターン成膜し、銀電極を塩化処理することで銀塩化銀電極とした⁴⁾。酵素固定化では、生体適合性高分子の Poly (MPC-co-EHMA) (PMEH) とグルコース酸化酵素の混合液を電極感応部上に塗布・乾燥させることで包括固定化し、グルコース計測用のソフトコンタクトレンズ型バイオセンサとした⁵⁾。センサをアンペロメトリック計測に供したところ、涙液に含まれる

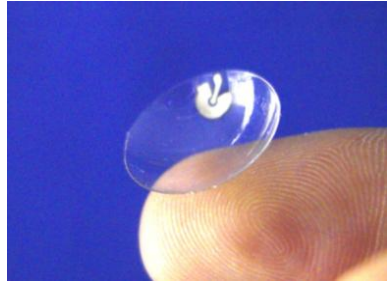


図 1・7・2 涙液グルコース計測用のソフトコンタクトレンズ型バイオセンサの概観写真⁵⁾

グルコースの濃度レベルを含む 0.03~5.00 mmol/L の範囲で定量が可能であった。更に、ウサギ眼部に本センサを装着したところ、安定した涙液グルコースのモニタリングが可能で、経口糖負荷試験において血糖値の濃度上昇に応じた涙液グルコース濃度の増加をモニタリングすることが可能であった。

以上のように、生体適合性を有する高分子技術と微細加工技術を組み合わせることで多様な形状や機能のウェアラブル生/化学センサを作製することが可能であり、フレキシブル回路技術やポリマー電池、人体通信技術を組み合わせることで今後、Body Area Network (BAN) における健康科学や医療計測の主要な計測素子となるものと考えられる。

■参考文献

- 1) H. Suzuki, A. Sugama, and N. Kojima: "Effect of anode materials on the characteristics of the miniature Clark-type oxygen electrode," *Anal. Chim. Acta*, vol.233, pp.275-281, 1990.
- 2) S. Iguchi, K. Mitsubayashi, T. Uehara, and M. Ogawa: "A wearable sensor for conjunctival oxygen monitoring," *Sensors and Actuators B*, vol.108, no.1-2, pp.733-737, 2005.
- 3) W.F. March, F.E. Smith, P. Herbrechtsmeier, A. Domschke, and C. Morris: "Clinical trial of a non-invasive ocular glucose sensor," *Diabetes* 50 (Suppl.), A125, 2001.
- 4) K. Mitsubayashi, Y. Wakabayashi, Y. Ohya, and T. Endo: "Optical-transparent and flexible glucose sensor with ITO electrode," *Biosens. Bioelectron.*, vol.19, no.1, pp.67-71, 2003.
- 5) M.K. Chu, D. Takahashi, T. Arakawa, H. Kudo, and K. Mitsubayashi: "Contact lens type biosensor fabricated using MEMS techniques on biocompatible polymers for continuous monitoring of tear glucose," the 20th Anniversary meeting of the World Congress on Biosensors (26-28 May 2010, Glasgow, UK), Abstract no.05D.6, 2010.

2-1-8 DNA センサ (電気化学方式)

(執筆: 橋本幸二) [2010年5月 受領]

(1) はじめに

バイオ計測の分野では様々なセンサが用いられているが、近年 DNA や RNA などの核酸配列の解析においてもセンサ技術が応用されはじめている。DNA や RNA 解析用のセンサをここでは DNA センサと呼ぶことにするが、DNA センサを用いると遺伝子の反応と検出を同じデバイス上で行うことができるので、操作が簡単で短時間で測定を行うことができるなどのメリッ

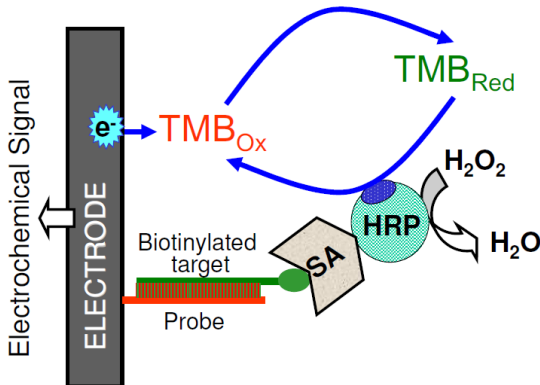
トがある。更にセンサに電気化学的な方式を採用することで、一般的な核酸配列の解析に用いられている蛍光方式の課題、具体的には価格の高い蛍光色素を使った煩雑な標識や、蛍光ムラ、蛍光色素の劣化、高感度な蛍光検出器が必要などの問題を解決できる可能性がある。電気化学的な DNA センサに繋がる基礎研究は 1960 年代後半の Dryhurst らの報告まで遡るが、実用化されたのは 2000 年代の後半になってからである。ここでは市販されている電気化学的な DNA センサを中心に紹介する。

(2) 電気化学的な遺伝子検出技術

(a) 酵素標識を利用する方法

Ghindilis らは Tetramethylbenzidine (TMB) の酵素による酸化還元反応を利用した電気化学的な遺伝子検出技術を報告している²⁾。この方法では、あらかじめターゲット核酸をビオチンで標識しておき、プローブ DNA を固定化した電極上でハイブリダイゼーション（2 本鎖形成）反応を行う。ターゲット核酸とプローブ DNA が相補的であれば、電極上にターゲット核酸が捕捉される。次に、ストレプトアビジンを結合させた Horseradish Peroxidase (HRP) を添加すると、ビオチン-アビジン結合を介して HRP が電極上に結合することになる。最後に還元型 TMB を添加すると、HRP により酸化された TMB が電極上で還元され、その際に電流が流れる。電流は HRP が存在する場合、すなわちビオチン標識したターゲット核酸が電極上に存在する場合のみ流れることから、電流の大小を指標にターゲット核酸を検出することが可能となる（図 1・8・1）。この技術を Combimatrix 社が実用化しており、デバイスに CMOS 技術を利用することで 12000 種類までのプローブ DNA に対応可能で、電流測定時間は 25 秒以内に終了する。検査では核酸増幅（ビオチン標識）やハイブリダイゼーション反応、洗浄などが必要になるため、実際の検査時間は発現解析の場合約 5 時間となっている。

Electrochemical Detection: The Basic Principle



1. Target labeling with biotin;
2. Array hybridization;
3. Post-hybridization labeling with Streptavidin-HRP conjugate;
4. Electrochemical reaction: HRP catalyzes oxidation of a substrate, TMB;
5. Electro-reduction of oxidized TMB generates a current flux.
6. The ElectroSense™ reader performs amperometric detection of this current flux.

図 1・8・1 酵素標識を利用した電気化学的な遺伝子検出法²⁾

(b) 電気化学活性物質による標識を利用する方法

Yu らは、電気化学的に活性な物質で標識したサンドイッチハイブリダイゼーションを利用する方法を報告している³⁾。あらかじめをシグナル検出用に用いた電気化学的なサンドイッチハイブリダイゼーションに基づく遺伝子検出技術を開発した。金電極上にターゲット核酸補足のプローブ DNA 固定化しておき、そこにサンプルとあらかじめフェロセンを標識した 2nd プローブ DNA を反応させる。最後に電極に電圧を印加すると、相補的な配列が存在したプローブを固定化した電極からのみフェロセン由来の酸化還元電流が流れることから、この信号を測定することで遺伝子の検出が可能になる(図 1・8・2)。最近では、フェロセンを導入したホスホアミダイトが合成可能になっており、市販の DNA シンセサイザーを使って任意のオリゴヌクレオチドにフェロセン分子を修飾することができる。また、酸化還元電位の異なるフェロセン誘導体で修飾すると、蛍光法の多重染色と同様の測定が電気化学的な手法でも可能になる。この方式を使ったデバイスが Osmetech 社から実際に市販されており、Cystic fibrosis 検査用試薬は FDA の認可を取得している。

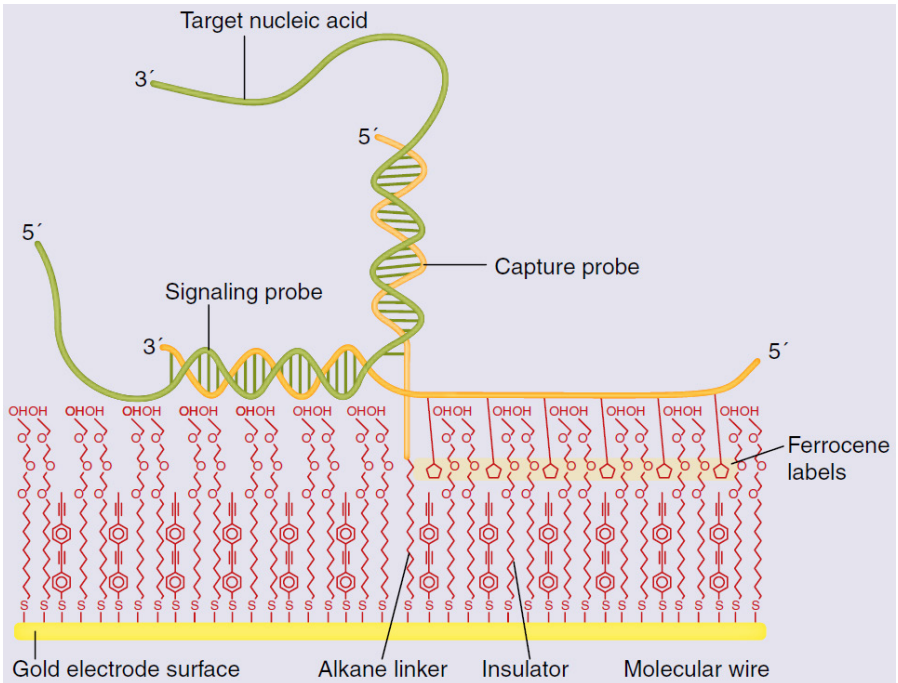


図 1・8・2 電気化学活性物質による標識を利用する方法⁴⁾

(c) 電気化学的に活性な遺伝子挿入剤を利用する方法

橋本らは標識操作を必要としない電気化学的な遺伝子検出技術を報告している⁵⁾。まず、プローブ DNA が結合した金電極上でターゲット核酸とハイブリダイゼーション反応を行う。次に形成したハイブリッド(2本鎖)部位に特異的に結合する電気化学的に活性な遺伝子挿入剤

(ヘキスト 33258) を添加する。最後に電圧を印加すると、相補的な配列が存在したプローブを固定化した電極からのみヘキスト 33258 由来の酸化電流が流れることから、この信号を測定することで特異的な遺伝子の検出が可能になる (図 1・8・3)。本手法は、煩雑なターゲット核酸の標識や、2nd プローブ DNA 準備などが不要なため、先の 2 法に比べより操作が簡便で、試薬代なども安く済む。この技術を東芝が電流検出型 DNA チップとして実用化しており、子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルス遺伝子型判定用 DNA チップでは、国産 DNA チップとしては初となる厚生労働省の薬事認可を取得している。検査に必要な時間は核酸増幅を含め約 2 時間となっている。

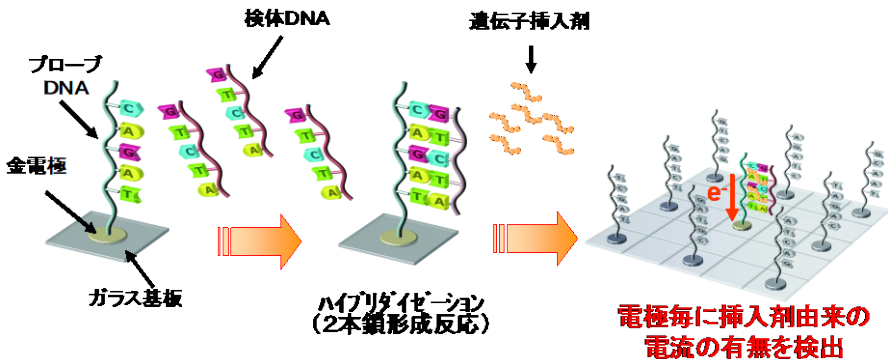


図 1・8・3 電気化学的に活性な遺伝子挿入剤を用いる方法

(d) まとめ

ここでは、電気化学的な DNA センサの基本原理を中心に紹介した。今後、遺伝子配列情報を利用した診断市場が大きく拡大すると期待されており、簡便に遺伝子を解析できる DNA センサの重要性は益々高まると思われる。

■参考文献

- 1) G. Dryhurst and P.J. Elving : “Electrochemical oxidation of adenine: Reaction products and mechanisms,” J. Electrochem. Soc., vol.115, pp.1014-1020, 1968.
- 2) A.L. Ghindilis, M.W. Smith, K.R. Schwarzkopf, K.M. Roth, K. Peyvan, S.B. Munro, M.J. Lodes, A.G. Stöver, K. Bernards, K. Dill, and A. McShea : “CombiMatrix oligonucleotide arrays: genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection,” Biosens. Bioelectron., vol.22, no.9-10, pp.1853-1860, 2007.
- 3) C.J. Yu, Y. Wan, H. Yowanto, J. Li, C. Tao, M.D. James, C.L. Tan, G.F. Blackburn, and T.J. Meade : “Electronic Detection of Single-Base Mismatches in DNA with Ferrocene-Modified Probes,” J. Am. Chem. Soc., vol.123, no.45, pp.11155-11161, 2001.
- 4) M.G. Dobson, P. Galvin, and D.E. Barton : “Emerging technologies for point-of-care genetic testing,” Expert Rev. Mol. Diagn., vol.7, no.4, pp.359-370, 2007.
- 5) K. Hashimoto, K. Ito, and Y. Ishimori : “Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye,” Anal. Chem., vol.66, pp.3830-3833, 1994.

2-1-9 においセンサ

(執筆著：中本高道) [2010年5月 受領]

(1) においセンサとは何か

においセンサとは、においの種類を識別したり、におい強度を測定するセンサである。匂いは通常複数の成分が複合されたものであり、単一素子で高い選択性を有するセンサを実現するのは容易でない。また、単一成分であったとしても通常のセンサ素子は複数の成分に反応することが多い。生物の嗅覚でも同様に、各嗅細胞の特異性は十分ではない。しかし、生物では異なる特性を有する多数の嗅細胞の応答パターンを嗅覚神経系でパターン認識している。そこで、においセンサでは、図 1・9・1 に示すように嗅細胞の代わりにセンサ素子、嗅覚神経系の代わりにパターン認識システムを用いて匂いの識別を行う。センサ素子、パターン認識システムにはそれぞれ様々な手法があり^{1),2)}、以下にそれらの手法を紹介する。

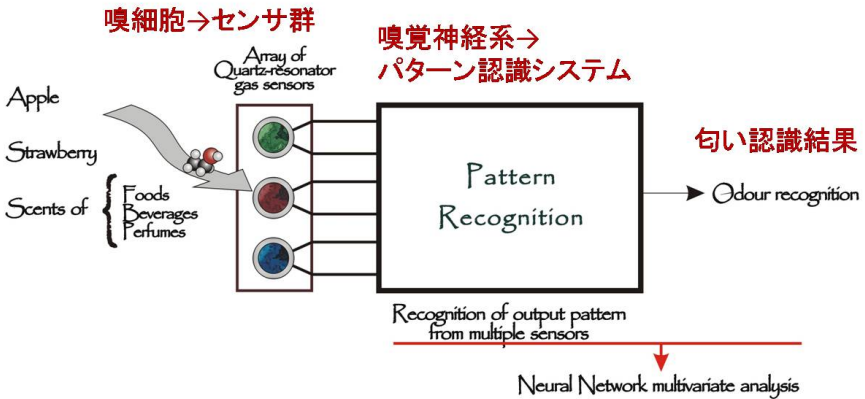


図 1・9・1 においセンサの仕組み

(2) においセンサで用いられるセンサ素子

においセンサで用いられるセンサ素子を表 1・9・1 に示す。音響素子として水晶振動子センサ、SAW (Surface Acoustic Wave) センサがあり、デバイス表面に匂いを吸着する感応膜を塗布してセンサを製作するので、センサの特性を変えるときは感応膜の種類を変える。センサ出力は周波数変化である。金属酸化物半導体は、酸化スズのような金属酸化物をヒータで高温に熱したもので抵抗変化がセンサ出力である。センサ特性を変えるには動作温度や添加する触媒金属の種類を変える。導電性高分子も抵抗変化がセンサ出力となる。電気化学センサは、酸化還元反応により流れる電流が出力となる。MOS FET ガスセンサの場合は、ゲート金属に特別な金属を用いて高温で動作させるが構造は LSI で用いられる FET と同じである。センサ出力は閾値電圧の変化である。光学式センサでは、蛍光、吸光、発光、SPR (Surface Plasmon Resonance) などの原理のものがある。更に、短時間で結果の得られるガスクロマトグラフ、質量分析器なども本来は分析機器であるがセンサ的な用いられ方をする場合がある。

(3) においセンサで用いられる情報処理法

特性の異なるセンサアレイの出力パターンは、パターン認識システムにより識別される³⁾。

表 1・9・1 においセンサで使われるセンサ素子

センサの種類	出力
水晶振動子	周波数変化
SAW デバイス	周波数変化
カンチレバー	周波数変化
酸化物半導体	抵抗変化
導電性ポリマー	抵抗変化
MOSFET	閾値電圧変化
光学式	蛍光・吸光・発光・SPR
電気化学式	電流変化
Gas Chromatography	保持時間
Mass Spectrum	質量

そのパターン認識システムには多変量解析やニューラルネットワークが用いられる。多変量解析のなかでは、線形判別分析で識別を行うのが一般的である。ニューラルネットワークも多く用いられており、BP (Back Propagation) 法で学習させた MLP (Multi-Layer Perceptron)、学習ベクトル量子化法、RBF (Radial Basis Function) などの手法がにおいセンサの匂い識別に用いられる。近年は SVM (Support Vector Machine) の使用がさかんである。いずれの場合でも、数多くの訓練用データを用いてパターン識別を行う関数を構成して、その後テストデータを入力して実際の識別を行う。ニューラルネットワークの場合には、訓練の過程に繰り返し処理が含まれ、それを学習と呼ぶ。

(4) においセンサの応用分野

においセンサの応用分野を表 1・9・2 に示す。匂いに関係する産業は多く、においセンサは大きなニーズがある。食品、飲料関係では、品質検査、製品開発で人が行う官能検査に代わって使われることが期待されている。微量の飲料の検出、賞味期限のチェック、異臭検出による食の安全の保証なども大きな応用分野である。

化粧品の分野でも品質管理、製品開発に使うことができる。シャンプー、歯磨き粉、洗剤など身近な日用品も匂いと関係が深い。環境計測としては、悪臭の検知、VOC の検出、脱臭や消臭効果の測定などがある。

電気製品としては、エアコン、空調、空気清浄機のモニタリング、電子レンジにおける調理具合のモニタリング、冷蔵庫の中においモニタなどが考えられる。更に、自動車の車室内臭の評価などもある。

医療関係では口臭センサが最も身近な用途であるが、疾患に特有の微量な成分を検出できれば、非侵襲で病気の早期発見につながる。爆発物、毒物の探知、火災報知機なども安全安心な社会を実現するのに有用であろう。

このように、においセンサのニーズは多岐にわたっている。

表 1・9・2 においセンサの応用分野

分野	具体例
食品・飲料	品質管理・製品開発 食の安全の保証（賞味期限のチェック、異臭検出）
食品包装材料	品質管理、検査
化粧品・芳香剤	品質管理、調香
シャンプー・歯磨粉・洗剤	品質管理、製品開発
脱臭・消臭	脱臭・消臭効果の測定
農業	農産物の品質管理、等級付け、出荷検査
畜産業	家畜の衛生状態の管理、作業者の作業環境管理 畜産物の品質検査
漁業	魚の腐敗臭の検査、鮮度のチェック
水道	カビ臭等水質の計測
都市ガス	ガス漏れ検査、付臭材の評価
環境計測	悪臭検査、ビルや住宅の室内空気管理（IAQ）、 VOCの検出
防災	ガス爆発探知、火災報知機、火災救助（人の検知）、 有毒ガスの検知
防衛産業	地雷・不発弾の検知
犯罪捜査	麻薬捜査
電気製品	エアコン・空調・空気清浄機のモニタ、電子レンジにおける調理具合のモニタ、冷蔵庫内のにおいモニタ
医療・健康	口臭・体臭・排泄物の臭気、病気の診断
自動車	車室内臭・呼吸診断

■参考文献

- 1) T.C. Pearce, S.S. Schiffman, H.T. Nagle, J.W. Gardner (Eds.): “Handbook of Machine Olfaction,” Wiley-VCH, 2003.
- 2) 中本, 森泉: “匂いセンシングシステム,” 信学論, J82-C-I, pp.156, 1999.
- 3) R.O. Duda, P.E. Hart, D.G. Stork: “Pattern classification,” Wiley-Interscience, 2001.

2-1-10 味覚センサ

(執筆者: 都甲 潔) [2010年5月 受領]

(1) はじめに

食は、五感を総動員して味わう。味覚を生む味は、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の五基本味である。これに広義の味の、実は味細胞では受容されない、辛味と渋味が加わる。更に匂い(臭い, 香り)を感じる嗅覚がある。焼肉のジュージューと焼ける音も食欲をそそる。聴覚

である。それに加え、視覚である。日本料理やフランス料理に代表されるように、見た目も重要である。もちろん、食品の温度やテクスチャー（舌触り、歯応え）といった温度感覚と触覚も大事である。そのうえ、その場の雰囲気も無視できない。そのとき空腹であるか、風邪気味か、楽しい気分かといった体調、心理状態もおいしさに効く。とここまで書いてきて、実は、おいしさにはこれまで培ってきた食習慣と食文化が最も重要ではないかと気づくのである。ラーメン一つとっても、醤油ラーメン、とんこつラーメン、味噌ラーメンと、生まれ育った環境での食がやはり一番おいしいではないか。

ということで、食は確かに主観そのものなのであるが、五感を数値化する装置やセンサが開発されれば、食の世界に客観的物差しを持ち込むことは必ずしも不可能はない。ここでは、味を数値化するセンサ、つまり、味覚センサの紹介をすることとしよう^り3)。

(2) 味の受容機構

味を示す物質が味細胞を覆う生体膜の受容体に結合すると、味細胞に隣接した神経線維が興奮する。図 1・10・1 に示すように、舌につながる神経（第一次ニューロン）は、まず延髄の孤束核といわれる領域に入る。孤束核からの神経（第二次ニューロン）は視床に達し、そして視床からの神経（第三次ニューロン）は大脳皮質の味覚領へつながることになる。第一次ニューロンから第三次ニューロンに至るまで、ニューロンの応答電位の様子はほとんど変化しない。つまり、味の基本味としての情報は第一次ニューロンで既に完成しており、単にこの情報が第二次、三次ニューロンを経て脳へ伝わるだけで、脳へ近づいても神経線維レベルでの情報処理は進んでいない。

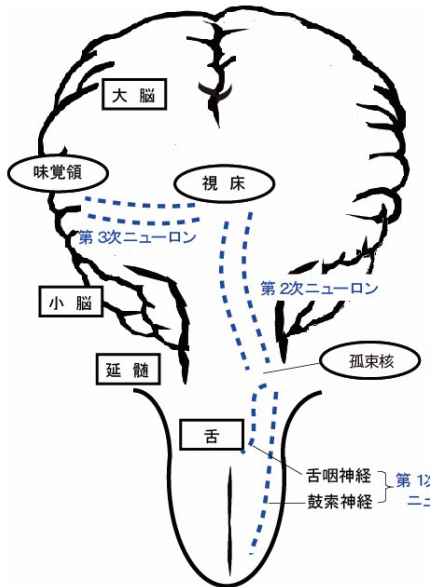


図 1・10・1 化学物質の受容から脳での味の認識まで

ちなみに、化学物質が「味」を持つわけではない。人が感じて初めて意味のある概念が「味」

なのである。ところが、上述の通り、五基本味の分類は受容体または最初の神経線維の段階で完成している。その意味では舌で受容する「化学的な味」は脳で判断される量ではなく、味神経レベルで客観的に判定できる概念なのである。味覚センサは、この化学的な味を数値化することになる。

(3) 味覚センサの原理と開発

味覚センサの原理は生体系とほとんど同じである。化学物質が受容膜と相互作用し、それが電圧に変換され、その情報がケーブルを伝ってコンピュータに行く。各受容膜は酸味によく応答、塩味に応答といった具合に、各味質に特異的に応答する。複数の膜を準備することで、味質（酸味、塩味、・・・）と味強度が判定できる。

この味覚センサの受容部であるが、脂質分子と高分子をブレンドした人工の膜を利用している。これは舌の細胞の生体膜が脂質とタンパク質からできていることに着目し、その構成成分の一つである脂質を実際に利用できる形で作り上げたものである。

図 1・10・2 に、インテリジェントセンサーテクノロジーから市販されている味覚センサ（味認識装置 TS-5000Z）を示す。



図 1・10・2 味認識装置 TS-5000Z ((株)インテリジェントセンサーテクノロジー製)

(4) 測定例

図 1・10・3 にビール、発泡酒、リキュール（発泡性）、その他醸造酒を酸味（キレ・ドライ感）と苦味（モルト感）の軸で示す。食品の味を目に見える形で示した味の地図（テイストマップ）である。昔からあるエビスのようなオールモルトタイプは、苦味が強いことが分かる。それが、アサヒスーパードライの登場により、苦味を抑え、酸味のキレとドライ感を持たせたビールが増えてきた。その後登場したリキュール（発泡性）、その他醸造酒は更に苦味が抑えられ、キレとドライ感が強い傾向にある。このように私たちは味を目で見ることができるのである。

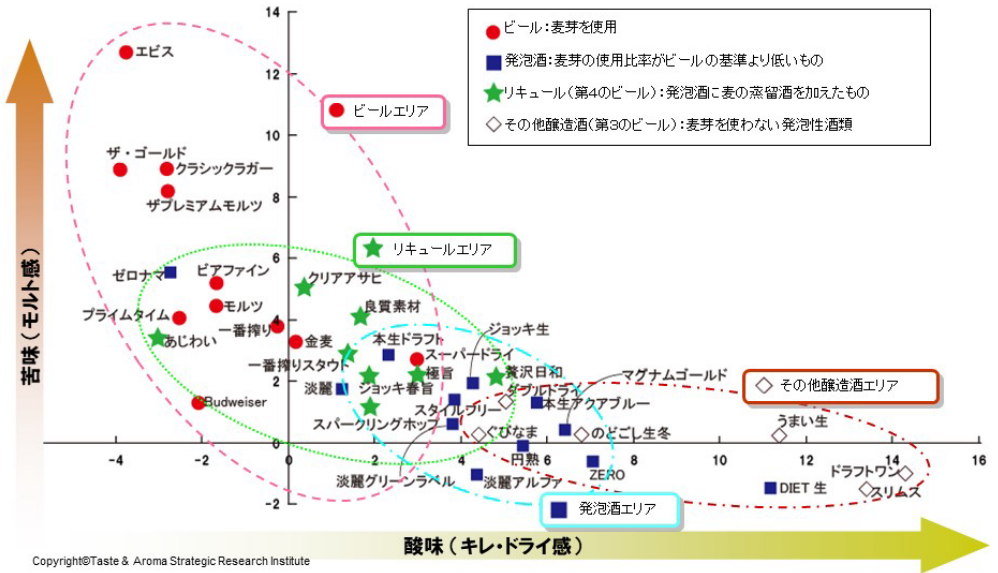


図 1-10-3 ビール、発泡酒、リキュール（発泡性）、その他醸造酒（発泡性）の味の地図（味香り戦略研究所提供）

数値はセンサ出力を人の感覚と対応させた量で、センサは人の官能を数値化できる。

このように、世界に先駆け、「味を測る」という概念が日本で提起され、生体のメカニズムに倣って味覚センサが開発された。この日本発の技術が、グローバル化した社会にあってデファクトスタンダードとなる日が近い。

■参考文献

- 1) 都甲 潔：“ハイブリッド・レシピ,” 飛鳥新社, 2009.
- 2) 都甲 潔：“感性の起源,” 中央公論新社, 2004.
- 3) K. Toko：“Biomimetic Sensor Technology,” Cambridge University Press, 2000.

2-1-11 LSPR バイオセンサ

2-1-12 バイオ燃料電池

(執筆者：三宅丈雄，西澤松彦) [2010年5月 受領]

(1) バイオ燃料電池の原理とその魅力

バイオ燃料電池は、体内の血糖、飲食物、環境中の有機物などのバイオマス燃料の化学エネルギーを、直接電気エネルギーに変換する発電デバイスであり、通常の燃料電池で用いられるPtなどの金属触媒を生体触媒（酵素もしくは微生物）で置き換えたものである。酵素を用いるバイオ燃料電池は、酵素の反応選択性によって隔膜不要であり、小型化が容易である。加えて、

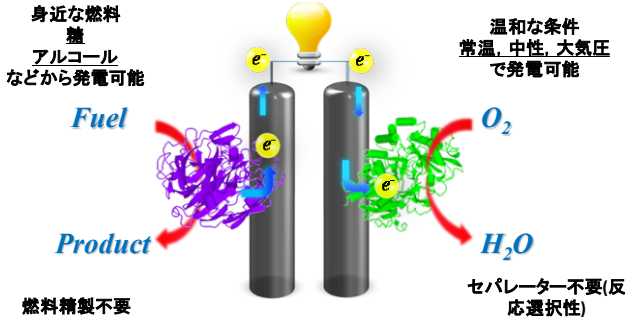


図 1・12・1 バイオ燃料電池の原理と魅力

生体由来の材料で構成できるため、高いレベルで安全を保障でき、安価に作製することができる。一方、触媒に微生物を用いるタイプは、代謝反応を様々な燃料から開始させることが可能で、また、寿命が比較的長いという特徴を有する。酵素と微生物いずれの場合も、通常の燃料電池に必須である燃料の改質や精製を省いた、シンプルなシステム構成が可能となる。これらの特徴を、最近報告された典型的な性能と合わせて表 1・12・1 にまとめた。比較対象として、直接エタノール型燃料電池 (DEFC) についても併記した。

表 1・12・1 バイオ燃料電池の特徴

		バイオ燃料電池			燃料電池	
		酵素電池 (Enzymatic Biofuel Cell)		微生物電池 Microbial Fuel Cell	直接エタノール型燃料電池 (DEFC)	
反応	触媒	酵素 ^{2,7)}	酵素 ⁸⁾	各種微生物の代謝反応 ^{1,9)}	Pt/Ru 等金属 ^{10,11)}	
	燃料極	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_6H_{10}O_6 + 2H^+ + 2e^-$	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_6H_{10}O_6 + 2H^+ + 2e^-$	(例) $Acetate^- + 4H_2O \rightarrow 2CH_3CO_2^- + 9H^+ + 8e^-$	$C_2H_5OH + 3H_2O \rightarrow 2CO_2 + 12H^+ + 12e^-$	
	空気極	$1/2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	$1/2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	$2O_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow H_2O$ (Pt)	$12H^+ + 3O_2 + 12e^- \rightarrow 6H_2O$	
燃料	種類	グルコース	フルクトース	有機物を含む水溶液	エタノール	
	安全性	無害	無害	無害	無害	
	精製	不要	不要	不要	必要	
標準電位差(電圧)		1.18 V	-	1.22 V (Ferredoxin) , 1.14 V (NAD ⁺ /NADH)	1.14 V	
温度		室温	室温	室温	室温	90 °C
発電出力		~ 1.45 mW/cm ²	~ 0.85 mW/cm ²	~ 0.68 mW/cm ²	~ 8 mW/cm ²	~ 50 mW/cm ²
隔膜		不要	不要	必要	必要	

(2) バイオ燃料電池の歴史

生体反応を利用する発電の発想は、100 年ほど前に酵母の代謝活動を利用して電気を取り出した研究が原型とされており¹⁾、それから 50 年後の米国宇宙開発に関連した研究において、酵素を電極触媒に利用した電池が世界で初めて実現された²⁾。当時の研究は、多数の総説にも記載されているように^{3)~6)}、主に化学電池やバイオセンサの作製技術を利用して行われた。その後、もともと学際領域であるバイオ燃料電池は、半導体の微細化限界による技術トレンドの転

換時期と相俟って、異分野融合研究の一つとして発展し、生体電極を作製する基盤技術の確立、電極構造の最適化、電池構成のためのパッケージング技術の進歩などによって、着々と性能向上を続けている。

(3) バイオ燃料電池の製品化の動向

バイオ燃料電池を実用化する取り組みは永らく続けられてきており、例えば、セントルイス大学のミンティア教授による AKERMIN 社では、携帯電源として酵素燃料電池の開発を進めている。しかし、依然として低出力と言わざるを得ないバイオ燃料電池によって既存の電池を置き換えることは、当分の間困難であろう。むしろ、優れた安全性(対環境及び対生体)を活かした独特の応用領域の開拓が期待される。例えば、子供向け玩具(ソニー株式会社とタカラトミー株式会社の共同)への搭載が検討され始めた(図 1・12・2)。安全性を活かす応用領域として、医療分野、特に体内埋め込みデバイスの電源も有望である。一方の微生物電池は、産業廃液や排泄物などを含む廃水環境下でも発電可能であるため、例えば「発電も行う水処理装置」といった製品が想定され、その実現に向けた取り組みが盛んである。



図 1・12・2 製品化に向かうバイオ燃料電池

(4) バイオ燃料電池の課題

バイオ燃料電池の課題の筆頭は、上記のように、ほかの化学電池や燃料電池と比べ低出力なことである。表 1・12・1 に記載したように、電池電圧に関してはほかの電池と同様の 1.2 V 付近であり、よって電流密度の増加が高出力へのカギとなる。

一般に、酵素を触媒とする電極反応は、酵素の活性中心から電極への電子伝達を伴うが、活性中心は外殻から数 mm の距離にあり、この絶縁性のギャップによって電子伝達速度、ひいては反応電流が制限される。これまで、このギャップ間に電線の役割を担うメディエータを配置させることで、電子伝達速度の改善が図られてきた。メディエータとして、幾つかの遷移金属錯体や金属ナノ微粒子の有効性が示されている。一方で、電極との電子授受を直接行える酵素、すなわちギャップ間隔の小さな酵素も存在し、バイオ燃料電池への利用が検討されている。また、最近では、遺伝子組み換え技術の進歩によって、活性中心を外殻付近に配置させた新規タンパク質の精製が可能となりはじめており、今後の発展が期待される。

出力の改善には、電極の構成材料や構造の最適化、固体表面処理技術も効果的である。とりわけ、炭素材料は資源として豊富であり、生体適合性にも優れることから永く研究されている。カーボンナノチューブのような新規の炭素材料（大きな比表面積、速い電子伝達速度・燃料拡散速度）にも期待が寄せられている。

バイオ燃料電池の耐久性も改善を要する課題である。酵素を電極触媒とする場合においては、酵素の寿命が電池の耐久性を決定する場合が多い。例えば、タンパク質は固体表面上へ吸着させると失活するため、リンカー分子などを介した固定化や、酵素表面の処理技術によって、失活を防ぐ工夫がなされている。一方の微生物触媒においては、微生物自身で膜タンパク質の生成が可能のため、酵素電池と比べると耐久性が圧倒的に長くなる。ただし、廃液や微生物からの分泌物などによって引き起こされる隔膜の性能低下や、微生物自身の代謝能の低下などによる出力の不安定性が問題となることがある。

(5) バイオ燃料電池の今後

この10年足らずで、酵素電池の出力は数 mW/cm^2 まで増加した⁷⁾。基盤技術が整いつつある本研究分野では、実用化に向けた取り組みが、今後いよいよ加速するであろう。次世代電源として、太陽光や水素を利用した発電方式に注目が集まっているが、国土の狭い我が国において太陽光の収率は低く、また水素燃料の安全性への危惧を拭い去るのは困難である。圧倒的に安全・クリーンで小型化が容易なバイオ燃料電池は、出力や寿命の改善を着々と進めながら、出番を待っている状況である。今後の展開から目が離せない。

■参考文献

- 1) M.C. Potter : Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, vol.84, pp.260, 1911.
- 2) A.T. Yahiro, S.M. Lee, and D.O. Kimble : Biochim. Biophys. Acta, vol.88, pp.375, 1964.
- 3) G.T.R. Palmore and G.M. Whitesides : ACS Symp. Series, vol.566, pp.271, 1994.
- 4) I. Willner and E. Katz : "Bioelectronics," WILEY-VCH, 2005.
- 5) 辰巳国昭：“電池革新が拓く次世代電源,” エヌ・ティー・エス, 2006.
- 6) 池田篤治：“バイオ電気化学の実際ーバイオセンサ・バイオ電池の実用展開ー,” シーエムシー, 2007.
- 7) H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, and K. Kano : Energy. Environ. Sci, vol.2, pp.133, 2009.
- 8) K. Murata, K. Kajiyi, N. Nakamura, and H. Ohno : Energy. Environ. Sci, vol.2, pp.1280, 2009.
- 9) B.E. Logan : Nature. Reviews, vol.7, pp.375, 2009.
- 10) S. Aravamudhan, A.R.A. Rahman, and A. Bhansali : Sensors and Actuators A, vol.123-124, pp.497, 2005.
- 11) W.J. Zhou, W.Z. Li, S.Q. Song, Z.H. Zhou, L.H. Jiang, G.Q. Sun, Q. Xin, K. Pouliaianities, S. Kontou, and P. Tsiakaras : J. Power. Sources, vol.131, pp.217, 2004.

■S2 群 - 7 編 - 2 章

2-2 細胞機能解析デバイス

2-2-1 細胞ハンドリング

(執筆者：一木隆範) [2010年5月受領]

近年、医療、創薬における細胞利用技術の重要性がますます増している。例えば、現在、治療が困難な疾病の新たな治療方法としてセルセラピーが期待されている。セルセラピーは狭義には幹細胞移植を指すが、広義には遺伝子治療、免疫療法、再生医学などの細胞工学を応用した治療が含まれる。また、創薬の分野では候補物質の標的細胞に対する有効性及び毒性に関するより多くの基礎データを、動物実験や臨床試験を行う前に得るための手法として、細胞を用いた薬効評価技術の高度化が注目されている。

これからの本格的な細胞利用技術の普及に向けて、安全性や信頼性を高いレベルで確立したうえで、低コストで効率良く細胞を生産する必要がある。そのためには、研究者、技術者の手作業を中心に行われている現在の細胞プロセッシング（細胞の増殖、分化誘導、評価、分離、回収、保存、輸送など一連のプロセス）において、より合理的な「細胞ハンドリング技術」を新たに構築することが必要と考えられる¹⁾。同時に、細胞は従来の工業製品とは明らかに大きく異なり、ナノバイオテクノロジーを基盤とする多岐にわたる精密細胞プロセッシング用ツールの開発を総合的に進めていく必要がある。

一般に大きな技術イノベーションには革新的なツールの発明・開発が必要であるが、細胞や生体分子を直接的な操作や分析を可能にする新たなツールとしてマイクロ流体デバイス技術が注目されている。マイクロ流体デバイスは流路の大きさが対象となる細胞と同程度であり、流路構造を目的に応じて正確に作製することで様々な機能を実現できるため、マイクロ流体デバイスを用いる細胞ハンドリング技術が多くの研究者により提案されている²⁾。

細胞分析チップにおいて、チップ内にしばしば閉鎖系として集積化されるマイクロリアクターあるいはマイクロ流路内に導入した細胞を随意の位置に輸送する、あるいは、固定する場合、チップの外から何らかの外力を細胞に印加する必要が生じる。利用可能な主な外力として、ストークス力などの流体力学的な力、電気泳動、電気浸透流、誘電電気泳動などの電気力学的な力^{3,4)}、更に超音波⁵⁾、光ピンセット⁶⁾、磁気などが挙げられる。マイクロ流路で生じる安定な層流の利用は細胞へのダメージが少ないことから、チップ上での細胞ハンドリングの最も基本となる形であり、層流による流体力学的効果だけを利用した細胞分離装置も報告されている^{7,8)}。ただし、流体の流れによる細胞のハンドリングは局所性や時間応答性において限界があり、高速動作を要求されるセルソーターデバイスでは、電気泳動⁹⁾、誘電泳動^{10,11)}や光ピンセット¹²⁾などと組み合わせた技術が多く報告されている。各々の力は、その大きさや対象となる細胞のサイズに対するスケールアップ、力場の局所性、細胞への生理学的作用などに違いがあり、それぞれの原理・特徴を踏まえて適用する必要がある。

■参考文献

- 1) (財)バイオインダストリー協会：“「iPS細胞の産業応用に向けた要素技術に関する調査」報告書,” 2009.
- 2) H. Andersson and A. van den Berg：“Microfluidic devices for cellomics,” Springer, Netherlands, 2004.
- 3) M. Washizu：“Electrostatic Manipulation of Biological Objects,” J. Electrostatics, vol.25, no.1, pp.109-123, 1990.

- 4) A.B. Fuchs et al. : “Electronic Sorting and Recovery of Single Live Cells from Microlitre Sized Samples,” Lab Chip, vol.6, no.1, pp.121-126, 2006.
- 5) K. Yasuda and T. Kamakura : “Acoustic radiation force on micrometer-size particles,” Appl. Phys. Lett., vol.71, no.13, pp.1771-1773, 1997.
- 6) A. Ashkin and J. M. Dziedzic : “Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria,” Science, vol.235, no.4795, pp.1517-1520, 1987.
- 7) J. Takagi, M. Yamada, M. Yasuda, and M. Seki : “Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches,” Lab Chip, vol.5, no.7, pp.778-784, 2005.
- 8) M. Yamada and M. Seki : “Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics,” Lab Chip, vol.5, no.11, pp.1233-1239, 2005.
- 9) K. Takahashi, A. Hattori, I. Suzuki, T. Ichiki, and K. Yasuda : “Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time microscopic image processing,” J. Nanobiotechnology, vol.2, no.1, pp.5-12, 2004.
- 10) T. Müller, G. Gradl, S. Howitz, S. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr : “A 3D-microelectrode system for handling and caging single cells and particles,” Biosens. Bioelectron, vol.14, no.3, pp.247-256, 1999.
- 11) J. Voldman, M.L. Gray, M. Toner, M.A. Schmidt : “A microfabrication-based dynamic array cytometer,” Anal. Chem., vol.74, no.16, pp.3984-3990, 2002.
- 12) M.M. Wang, et al. : “Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching,” Nat. Biotechnol, vol.23, no.1, pp.83-87, 2004.

2-2-2 細胞機能解析システム

2-2-3 細胞解析デバイス

2-2-4 細胞培養/生殖補助医療

2-2-5 神経機能解析チップ

(執筆者：神保泰彦) [2014年4月 受領]

神経系は生体の情報処理機能を担っており、情報表現とその処理に電気信号を利用している。この電気信号を計測する手法の一つにマイクロ加工技術によって作製する微小電極アレイ (MicroElectrode-Array : MEA) がある。神経細胞 (ニューロン) が発生する電気信号の実態は細胞内部と外部の間に生じる電位差であり、これを膜電位 (Membrane Potential) と呼ぶ。細胞膜上に存在するポンプ分子の選択的輸送機能によりイオンの不均一分布 (内部は K^+ イオン濃度が高く、外部は Na^+ イオン濃度が高い) が作り出され、平常時は K^+ イオンに対して高い透過性を有するチャネル分子が主要な役割を果たす結果、濃度差に基づく拡散の駆動力と釣り合う電位差が生じる。これを静止電位 (Resting Potential) と呼び、細胞外を基準として内部は $-70 \sim -80 \text{ mV}$ 程度の値となる。 Na^+ イオンに作用する拡散の駆動力は逆向きであり、その膜透過性が支配的である場合、膜電位は正の値をとることになる。生物はこの2つの状態を切り替えることにより電圧パルス (活動電位 ; Action Potential) を発生、その時系列を情報の表現と処理に利用している。神経系の場合、振幅は約 100 mV 、時間は 1 ms 程度である。

膜電位の計測はガラス微小電極 (Glass Micropipette) を用い、これを細胞内に刺入して行うのが標準的な方法である。これに対し、細胞外に設置した電極で活動電位に対応する信号記録を行う手法を細胞外計測 (Extracellular Recording) と呼ぶ。活動電位発生時に流れる電流により局所的に生じる電圧降下を検出するのがその原理であり、体積導体中の現象であるゆえに減

衰が大きい。多くの場合、振幅 100 mV の膜電位変化が 100 μ V 程度の信号として観測される。細胞外信号記録の利点は侵襲性の低さにあり、長時間の計測が可能になる。更にフォトリソグラフィを利用して多数のマイクロ電極を集積化した MEA が開発され、これを細胞培養皿として用いることにより、神経細胞集団の活動を時空間的に可視化することが可能になった。図 2・5・1 に MEA とその表面で培養されたニューロン群の写真、ガラス微小電極で記録された活動電位とそれに対応する細胞外記録信号時系列を示す。

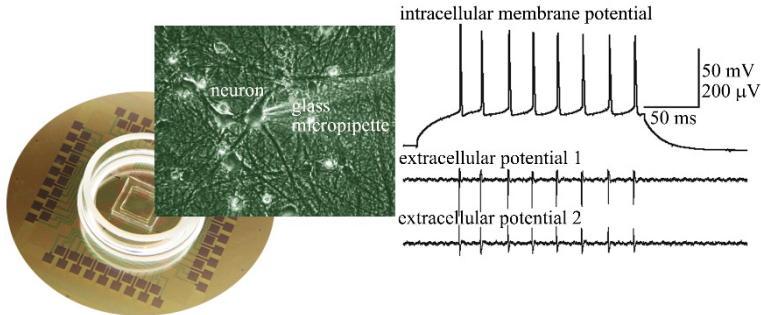


図 2・5・1 微小電極アレイ、基板上的神経細胞、神経スパイクの細胞内・細胞外記録

MEA のもう一つの特徴として、多点電気刺激機能がある。集積化されたマイクロ電極を通して電流を流すことにより、基板表面の培養神経回路に対する電気刺激が可能であり、複数の電極を組み合わせて利用することもできる。この場合も信号記録と同様、体積胴体中の導電現象であることに注意する必要がある。神経細胞の膜電位変化を誘導に寄与するのは電極から注入される電流のごく一部であり、有効な電気刺激には比較的大きな信号を要する場合が多い。観測される神経信号が 100 μ V 程度であるのに対し、印加する刺激パルス振幅は 1 V あるいはそれを越える場合もあり、大きな雑音を生じる。刺激信号印加点の近傍で最初の応答が誘起されることが予想され、その観測のためには刺激信号に付随する雑音の除去が必要になる。刺激印加時には神経信号記録系を切り離して可能な入力が発生することを防ぎ、同時に刺激信号により電極/電解液界面に注入される電荷を効率良く放出する経路を設けることにより、電気刺激と神経信号記録の両立が可能になる。

MEA は 1970 年代から米国でその開発が始まった¹⁾²⁾。その後、欧州で計測技術としての MEA とその応用研究が盛んになり、国際会議 (International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays) がドイツで隔年開催されるようになって、現在に至っている。発表件数 47 件でスタートした (1998 年) 会議が、9 回目の 2014 年には 150 件以上と拡大している。神経回路活動の解析や神経系への薬理効果の評価にとどまらず、人工視覚や再生医療への応用研究も積極的に進められており、技術的にも CMOS アレイを利用した高集積化や 3 次元構造の利用などが提案されている³⁾。

■参考文献

- 1) G. Gross : "Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface," IEEE Trans. BME, vol.26, pp.273-279, 1979.

- 2) J. Pine: "Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes," J. Neurosci. Meth., vol.2, pp.19-31, 1980.
- 3) Proc. 9th Int. Meet. Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, Germany, July 2014.

2-2-6 人エリボソーム

■S2 群 - 7 編 - 2 章

2-3 医療応用デバイス・システム

2-3-1 血液分析チップ

2-3-2 血球分離システム

2-3-3 ディスク型分析装置

(執筆者：本多信雄) [2010年6月 受領]

遠心力により試薬やサンプルなどの流体を制御することにより実現するディスク型分析システムは古くは 1970 年代頃より報告がされており¹⁾、生化学臨床検査を行うためのディスク型分析システムは既に実用化されている²⁾。

一方、免疫測定を行うディスク型分析システムは 1999 年以降その基本技術に関する報告がなされてきた^{3)~6)}。ここではディスク型免疫測定システムの一例を紹介する(図 3・3・1, 図 3・3・2)⁷⁾。図 3・3・1 に示すようにプラスチックのディスク上に形成された複数の同一形状の構造体により同時に複数項目、複数サンプルの分析を可能としている。それぞれの構造体は免疫測定を実現するために必要な機能を持った微細構造体(インレット、疎水バルブ、定量チャンバー、オーバーフローチャンバー、反応用ビーズ)から構成されている。

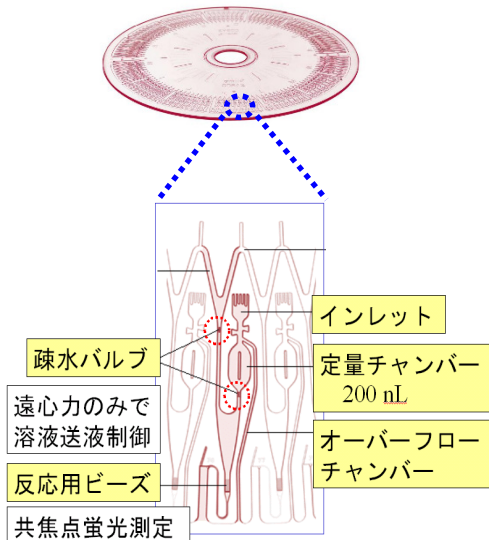


図 3・3・1 ディスク免疫測定デバイスの特徴

図 3・3・2 に示す原理に基づき、検体・試薬溶液をインレットから導入して正確に定量された溶液のみを反応領域に移動させ免疫反応を実施する。(a) インレットからサンプル溶液を導入

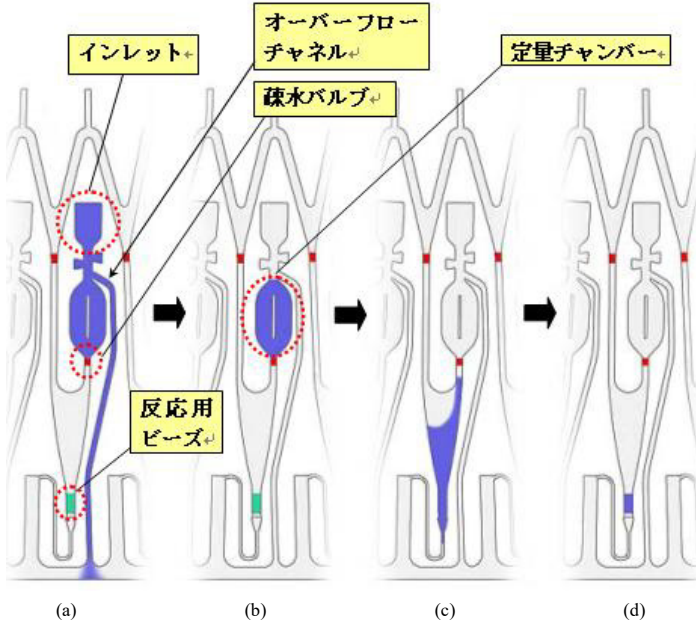


図 3・3・2 疎水バルブによる液体定量原理

する。定量チャンバー下流に存在する疎水バルブにより溶液が下流に流れ出るのを防ぎ、更に過剰に導入された溶液はオーバーフローチャンネルへ流出する (図 3・3・2(a))。 (b) 続いて定量チャンバー下流に存在する疎水バルブが解除されない程度の弱い遠心力が生じる回転数でディスクの回転を行う。これによりオーバーフローチャンネルより上流に存在する過剰量の溶液がオーバーフローチャンネルを通過して排出される。この作業後に残存する液体容量が 200 nL となるようにチャンネル構造の寸法が設計されている (図 3・3・2(b))。 (c) 次により大きい回転数でディスクを回転させ、導入された溶液により強い遠心力を印加し、200 nL に定量されたサンプルを疎水バルブを超えて反応領域へ導入させる (図 3・3・2(c))。 (d) 遠心力を制御することで、溶液を任意の流速で反応用ビーズ内に通過させ免疫反応や洗浄操作を行う (図 3・3・2(d))。免疫反応の試薬として蛍光表紙体を使用した場合、ビーズ上に形成された免疫複合体を蛍光法により検出し、測定結果を得る。

以上示した操作によりディスクの回転から生じる遠心力のみで液体の定量を高精度に実現できることから、本システムを構築するためには一般的な分析装置で使用されるシリンジポンプ、廃液用のポンプ、配管系などを必要としない。したがって、ディスク型のデバイスは、分析システムを小型・集積化するために優れたシステムと言える。また本系では、ラテックスビーズを微小空間に充填し高効率の免疫反応の固相を実現しているため、免疫反応時間を約 2 分まで短縮することに成功しており迅速分析システムの実現を可能としている。

以上述べてきたように、ディスク型デバイスを用いることで、複雑な反応手順を持つ免疫分析においても、小型・迅速・高精度な分析システムの構築が可能であることが示されている。

今後、ディスク型デバイスを用いた分析システムの実用化が期待される。

■参考文献

- 1) C.D. Scott : "A miniature fast analyzer system," Clin Chem., vol.45, pp.327A-40A, 1973.
- 2) 石沢修二 : "簡易検査における測定機器の検討-2 携帯型簡易血液化学分析システム「ピッコロ」の検討," 医学検査, vol.54, no.22, pp.1508-1512, 2005.
- 3) D.C. Duffy et al. : "Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems: Characterization and Multiple Enzymatic Assays," Anal.Chem., vol.71, pp.20, 1999.
- 4) J. Zeng, D. Banerjee, M. Deshpande J.R. Gilbert, D.C. Duffy, and G.J. Kellogg : "Design analyses of capillary burst valves in centrifugal microfluidics," Micro total analysis systems. Dordrecht: Kluwer Academic, pp.493-496, 2000.
- 5) G. Ekstrand, G. Holmquist, A.E. Orlefors, B. Hellman, A. Larsson, and P. Anderson : "Microfluidics in a rotating CD," Micro total analysis systems. Dordrecht: Kluwer Academic, pp.311-314, 2000.
- 6) M. Inganas, G. Ekstrand, J. Engstrom, A. Eckersten, H. Derand, and P. Andersson : "Quantitative bio-affinity assays at nanoliter scale, parallel analysis of crude protein mixtures," In: Ramsey JM, van den Berg A, eds. Micro total analysis systems. Dordrecht: Kluwer Academic, pp.91-92, 2001.
- 7) N. Honda, U. Lindberg, P. Andersson, S. Hoffmann, and H. Takei : "Simultaneous multiple immunoassays in a CD-shaped microfluidic device based on centrifugal force," Clinical Chemistry, vol.51, pp.1955-1961, 2005.

2-3-4 生活環境モニタリングシステム

(執筆著者：堀内 勉) [2010年5月受領]

人類の生産消費活動の活発化に伴い、これまで存在しなかった物質、あるいは量や濃度が少なくなくて問題にならなかった物質が、人間の生活環境、生物の生態系、地球環境まで大きく変えようとしている。近年、問題になった例では、NO_x (窒素酸化物)、SO_x (硫黄酸化物)、SPM (浮遊粒子状物質)、VOC (揮発性有機化合物)、花粉、黄砂、オゾン、CO₂ などによる大気汚染、工場排水からの化学物質、生活排水からの薬物、代謝物、環境ホルモン、細菌、などによる地下水や土壌の汚染などが挙げられる。また、自然環境ばかりでなく、人間が活動する室内環境、直接肌に触れる物質や材料、体内に取り込む食品などの汚染や安全性も問題となった。このような状況のなかで、安全安心で快適な生活環境を維持したいというニーズが高まり、環境をセンシング、モニタリングする技術の重要性が増している。人為的に発生する汚染物質の高濃度領域は局在している場合が多く、小型のセンサデバイスを多数配置してネットワーク接続し、常時モニタリングすることができれば、汚染の拡大防止に有効である。また、新規な環境汚染物質が次々と生み出されている現状では、いち早くそれらに対応するセンサの開発が必要になる。

環境用のセンサにおいても MEMS, NEMS 技術を利用した高感度化高機能化の研究が行われている。技術的にはバイオセンサと共通する部分が多い。センサとして高感度、高選択性、安定性、信頼性が要求されるのは当然であるが、実際の運用では、寿命、作製コスト、測定コスト、簡便な操作、即時性、クロスコンタミネーション、ネットワークとの親和性、測定廃棄物の量、メンテナンスコスト、消耗品の要不要、測定システム全体での規模・価格なども重要な側面である。

以下では、最近の研究成果を検出対象ごとに例を上げていく。

ベンゼンは石油化学工業における基礎的物質であり大量に生産され、ガソリンや排気ガス中にも含まれている身近な物質であるが、発がん性が確認された物質である。化学工場やガソリ

ンスタンドの老朽化した地下タンクからの漏洩で土壤汚染として問題となっているが、地下水を飲料水として利用しているところの多い欧米では問題はより深刻である。大気中や水中のベンゼンを非常に高感度に簡便に検出するデバイスが開発されている¹⁾。数センチ角のフローデバイス中にナノ材料を収容し、選択的にベンゼンを濃縮し紫外分光により検出している。

オゾンもその強い酸化力から工業的に殺菌、脱臭、脱色などに多用されているが、大気中のオゾンは生体影響が大きく、濃度上限の指針値が WHO により与えられている。オゾンは光化学スモッグ時の大気汚染物質であるとともにモータ、コピー機、など多くの工業製品から発生する。身近な場所でのオゾンをリトマス試験紙のように簡単に測定する技術が開発されている²⁾。

従来から問題となっている汚染ガスに対するセンサも多数研究開発されている。H₂S や SO₂ をハニカム構造のマイクロ流路でサブ ppbv レベルの高感度で検出するもの³⁾、ダイオキシンの毒性をイムノアッセイ評価するフローデバイス⁴⁾、モノリシックに作製した光カランチレバーで VOC を検出するデバイス⁵⁾、哺乳類の嗅覚レセプターと SPR (表面プラズモン共鳴測定装置) を組み合わせたにおいセンサ⁶⁾、微粒子を検出するマイクロバッチャルインパクトとマイクロコロナ放電器を組み合わせたフローデバイス⁷⁾。より一般的に多くのガス種を検出することができるようにガスクロマトグラフィの小型化も脈々と行われている⁸⁾。

水環境では、水中の微生物を捕獲し濃縮するフローデバイス⁹⁾、土壌から水中へ溶出する除草剤や殺虫剤などを検出するために、カーボンナノチューブに固定化した抗体と電界効果型トランジスタを組み合わせて、フローデバイス中で競合イムノアッセイを行うもの¹⁰⁾、シリコンのナノワイヤによる電界効果型トランジスタによるイムノアッセイで細菌の毒素を検出するセンサ¹¹⁾、水の毒性評価のために、電気浸透圧ポンプと濃度勾配形成器を集積したフローデバイスに魚の細胞株を組み込んだシステム¹²⁾、インピーダンスセンサチップ内に哺乳類由来の細胞を組み込んだ可搬型のシステム¹³⁾、水中の重金属イオンを検出するための水銀微小電極をフローセルで形成するデバイス¹⁴⁾、リモートで検出するための低電力ワイヤレスな電気化学検出システム¹⁵⁾、湖沼の富栄養化の原因物質であるリン酸を高感度に検出するコバルトの微小電極を組み込んだ使い切りがたのポリマーベースのフローデバイス¹⁶⁾、食品(牛乳)中の残留抗生物質を光導波路とイムノアッセイを組み合わせて検出するデバイス¹⁷⁾、などの開発が行われている。

■参考文献

- 1) S. Camou, A. Shimizu, T. Horiuchi, and T. Haga : "Ppt-level detection of aqueous benzene with a portable sensor based on bubbling extraction and UV Spectroscopy," Solid State Circuit Technologies, ed. J.W. Swart, pp.399-420, INTEC, 2010.
- 2) Y. Y. Maruo, K. Akaoka, and J. Nakamura : "Development and performance evaluation of ozone detection paper using azo dye orange I: Effect of pH," Sens. Actuators B, vol.143, pp.487-493, 2010.
- 3) S. Ohira and K. Toda : "Micro gas analysis system for measurement of atmospheric hydrogen sulfide and sulfur dioxide," Lab Chip, 5, pp.1374-1379, 2005.
- 4) K. Uchiyama, M. Yang, T. Sawazaki, H. Shimizu, and S. Ito : "Development of a Bio-MEMS for evaluation of dioxin toxicity by immunoassay method," Sens. Actuators B, vol.103, pp.200-205, 2004.
- 5) K. Misiakos, I. Raptis, A. Gerardino, H. Contopanagos, and M. Kitsara : "A monolithic photonic microcantilever device for in situ monitoring of volatile compounds," Lab Chip, vol.9, pp.1261-1266, 2009.
- 6) J. M. Vidic, J. Grosclaude, M.-A. Persuy, J. Aioun, R. Salesse, and E. Pajot-Augy : "Quantitative assessment of

- olfactory receptors activity in immobilized nanosomes: a novel concept for bioelectronic nose,” Lab Chip, vol.6, pp.1026-1032, 2006.
- 7) Y.-H. Kim, D. Park, J. Hwang, and Y.-J. Kim : “Integrated particle detection chip for environmental monitoring,” Lab Chip, vol.8, pp.1950-1956, 2008.
 - 8) B. Tienpont, F. David, W. Witdouck, D. Vermeersch, H. Stoeri, and P. Sandra : “Features of a micro-gas chromatograph equipped with enrichment device and microchip plasma emission detection (μ PED) for air monitoring,” Lab Chip, vol.8, pp.1819-1828, 2008.
 - 9) A.K. Balasubramanian, K.A. Soni, A. Beskok, and S.D. Pillai : “A microfluidic device for continuous capture and concentration of microorganisms from portable water,” Lab Chip, vol.7, pp.1315-1321, 2007.
 - 10) I.P.M. Wijaya, T.J. Nie, S. Gandhi, R. Boro, A. Palaniappan, G.W. Hau, I. Rodriguez, C.R. Suri, and G. Mhaisalkar : “Femtomolar detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides via competitive immunoassays using microfluidic based carbon nanotube liquid gated transistor,” Lab Chip, vol.10, pp.634-638, 2010.
 - 11) N.N. Mishra, W.C. Maki, E. Cameron, R. Nelson, P. Winterrowd, S.K. Rastogi, B. Filanoski, and G.K. Maki : “Ultra-sensitive detection of bacterial toxin with silicon nanowire transistor,” Lab Chip, vol.8, pp.868-871, 2008.
 - 12) T. Glawdel, C. Elbuken, L.E.J. Lee, and C.L. Ren : “Microfluidic system with integrated electroosmotic pumps, concentration gradient generator and fish cell line (RTgill-W1) — towards water toxicity testing,” Lab Chip, vol.9, pp.3243-3250, 2009.
 - 13) T.M. Curtis, M.W. Widder, L.M. Brennan, S.J. Schwager, W.H. van der Schalie, J. Fey, and N. Salazar : “A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water,” Lab Chip, vol.9, pp.2176-2183, 2009.
 - 14) X.-S. Zhu, C. Gao, J.-W. Choi, P.L. Bishop, and C.H. Ahn : “On-chip generated mercury microelectrode for heavy metal ion detection,” Lab Chip, vol.5, pp. 212-217, 2005.
 - 15) K.-S. Yun, J. Gil, J. Kim, H.-J. Kim, K. Kim, D. Park, M. su Kim, H. Shin, K. Lee, J. Kwak, and E. Yoon : “A miniaturized low-power wireless remote environmental monitoring system based on electrochemical analysis,” Sens. Actuators B, vol.102, pp.27-34, 2004.
 - 16) Z. Zou, J. Han, A. Jang, P.L. Bishop, and C.H. Ahn : “A disposable on-chip phosphate sensor with planar cobalt microelectrodes on polymer substrate,” Biosens. Bioelectron., vol.22, pp.1902-1907, 2007.
 - 17) G. Suárez, Y.-H. Jin, J. Auerswald, S. Berchtold, H.F. Knapp, J.-M. Diserens, Y. Leterrier, J.-A.E. Manson, and G. Voirin : “Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk,” Lab Chip, vol.9, pp.1625-1630, 2009.

2-3-5 ストレス計測評価チップ

(執筆者：脇田慎一) [2015年7月 受領]

ストレスは、外からのストレス刺激に対して生じる生体の非特異的なストレス防御反応とストレス学説で定義される¹⁾。ストレス応答は脳が重要な役割を担っており、自律神経系、内分泌系、免疫系応答の観点から、分子生物学的な応答機序が解明されつつある。

脳内でのストレスシグナル伝達物質を計測することは容易でなく、脳から血液に分泌されたストレスホルモンや神経系のストレス応答と関連する生体分子を計測評価するバイオチップが研究開発され、実証用途に一部実用化されている。紙面に限りがあるので、プロトタイプ段階や実用化に至ったストレス計測チップを中心に記述する。

(1) 自律神経系ストレス計測チップ

自律神経系応答を計測評価するデバイスとして、2005年にココロメータ、2007年には唾液アミラーゼモニターが一般医療機器として製品化された。唾液アミラーゼ活性が副交感神経系と関連がある報告に基づいて設計されたドライケミストリー式酵素センサシステムである²⁾。測定原理は、 α - β -1,4-ガラクトピラノシルマルトシドのクロロニトロフェノール (CNP) 誘導体 (Gal-G2-CNP) を含浸させた試験紙に唾液アミラーゼを作用させる酵素反応 Gal-G2-CNP \rightarrow Gal-G2 + CNP により、唾液アミラーゼ活性を遊離 CNP により黄色に呈色した試験紙を定量す

る。試験紙には酵素が含まれず、取り扱いが容易であり、1分でその場計測できる特長がある。急性ストレスなど自律神経系ストレスとの知見が蓄積されることにより、人間工学研究用途を中心に展開すると期待される。

(2) 内分泌系ストレス計測チップ

内分泌系応答を計測評価するデバイスとして、唾液中のストレスホルモンであるコルチゾール濃度を測定するマイクロ流体デバイスが高感度小型免疫測定システムとして研究・開発された。測定原理は、乾燥試薬を保持した円盤状のマイクロ流体デバイスを用いて、遠心回転により送液させて、コルチゾールと反応させる、競合法と呼ばれる免疫アッセイをマイクロ流体デバイス上で行わせ、蛍光検出により高感度定量する方法である³⁾。現状の免疫アッセイは2~3時間を要するが、本装置は、10分程度でその場計測できる特長がある。ストレス臨床研究用途から普及することが期待される。

(3) 免疫系ストレス計測チップ

免疫系応答を計測評価するデバイスとして、六反らは、免疫反応を担う白血球の遺伝子発現に着目し、1467遺伝子を特異的に認識するcDNAプローブを搭載したDNAマイクロアレイを開発した⁴⁾。網羅的なmRNAにより検査するDNAチップとして、独創的かつ先駆的な研究である。更に、全血を対象として約1800種類のオリゴDNAプローブを配列したDNAチップが開発され、2.5mLの末梢血で遺伝子発現解析サービスが開始された。機能性食品、化粧品、香料などの抗ストレス商品の客観的な評価を対象とした。世界初の先進的なカスタムDNAチップによるストレス計測法であり、健康人のストレスから肉体的・精神的疲労、更に、精神疾患までの実証研究が期待されたが、残念ながら、現在、遺伝子発現解析サービス事業は撤退した。

免疫系ストレス応答にはサイトカインであるインターロイキン6 (IL-6) が関与することが知られている。IL-6は広く免疫応答に関わっているがストレス指標としても有用である。全血中のIL-6を検出するマイクロ流体デバイスが開発され、装置とともに研究用に上市されている。測定原理は、血漿分離機能を搭載したマイクロ流体デバイス上に、高密度にタンパクを固定化したマイクロビーズなど、試薬はすべて保持され、送液は遠心力と重力を利用している。これまで数時間以上を要する微量タンパクの検出を20分以内に行えることが特長である⁴⁾。ストレスのみならず広く臨床研究用途から普及することが期待される。

■参考文献

- 1) H. Selye : "A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents," vol.138, no.3479, p.32, 1936.
- 2) M. Yamaguchi, T. Kanemori, M. Kanemaru, Y. Mizuno, and H. Yoshida : "Test-strip Type Salivary Amylase Activity Monitor and Its Evaluation," Sens. Materials, vol.15, no.5, pp.283-294, 2003.
- 3) CEATEC ニュース, vol.046, 2012. ; http://www.ceatec.com/2012/ja/news/webmagazine_detail.html?mag_vol=046&mag_type=
- 4) K. Morita, T. Saito, M. Ohta, T. Ohmor, K. Kawai, S. Teshima-Kondo, and K. Rokutan : "Expression analysis of psychological stress-associated genes in peripheral blood leukocytes," Neurosci. Lett., vol.381, no.1-2, pp.57-62, 2005.
- 5) プレスリリース, 2014. ; http://www.toray-medical.com/news/inf_140930.html

2-3-6 人工視覚

(執筆者：太田 淳) [2011年2月 受領]

網膜は視覚情報のフロントエンドとして極めて重要な役割を担っており、その網膜が何らか

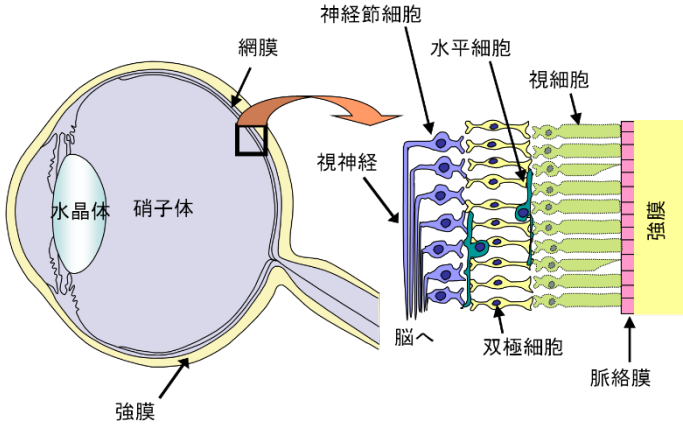


図 3・6・1 眼と網膜の構造模式図

の要因で機能不全に至れば失明に至る。図 3・6・1 に示すように網膜は層状の構造をしており、最下層部に光電変換を担う視細胞が位置している。視細胞から様々な細胞群を経て最終的に神経節細胞が出力部となり、パルス状の信号を視神経を通じて出力している。我が国における失明原因疾患のうちの上位を占める黄斑変性（加齢に伴い進行するので加齢黄斑変性と呼ばれる。略語、AMD）や網膜色素変性（略語、RP）は、前述の視細胞が機能不全となることで最終的に失明に至るもので、現状では有効な治療法は確立していない。しかしながら、これらの疾患では神経節細胞などの視細胞以外の網膜細胞がかなりの割合で残存していることが分かっている。したがって、これらの残存網膜細胞を電気刺激することで光覚を再建できる可能性があり、これが網膜刺激型と呼ばれる人工視覚の基本的な原理となっている²⁾。

図 3・6・2 に示すように刺激部位は網膜だけでなく、大脳視覚野でもよく、また視神経でもよいが、技術的な容易性の観点から現在では網膜刺激型主流である。ただし、網膜刺激は適用できる疾患が RP と AMD に限られるが、視覚野、視神経刺激ではより多くの疾患に適用が可能という利点はある。今後は脳科学の発展に伴い視覚野刺激の研究が進むものと予想される。網膜刺激型人工視覚では刺激電極アレイを網膜に埋植し、網膜に電気刺激を与えることにより光覚

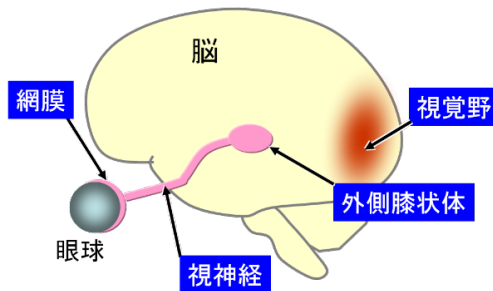


図 3・6・2 人工視覚における刺激部位

を誘起する。その場合、刺激パターンに応じた光覚パターンが認知されると期待されるが、網膜投影パターンと認知パターンとの対応関係（レチノトピー）は刺激する網膜細胞の種類にも依存し複雑である。

図 3・6・3 に人工視覚の基本構成を示す。システム全体は体外装置と体内装置から構成されている。外界からの画像情報はカメラシステムにより電気信号に変換される。この画像情報は刺激電極数に応じて信号処理（輪郭抽出や 2 値化など）され、体外に設置した 1 次コイルと体内

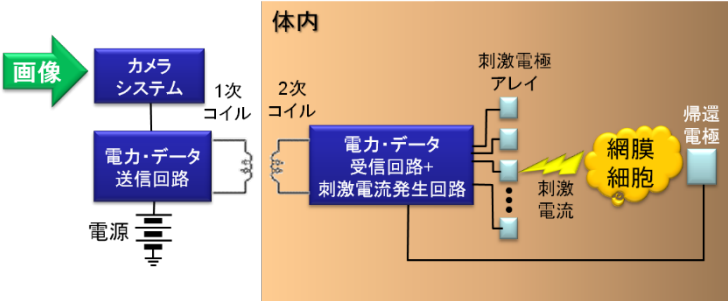


図 3・6・3 人工視覚の基本構成

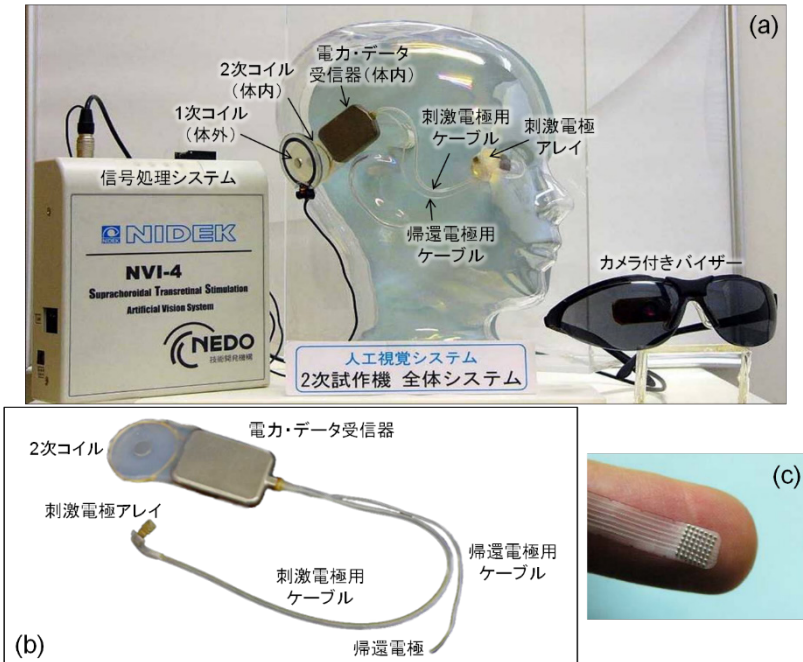


図 3・6・4 人工視覚システム。(a) 全体外観、(b) 体内埋植装置、(c) 刺激電極。
(株)ニデックのご厚意による。)

に埋植した 2 次コイルとにより伝送される。復調されたデータをもとに網膜刺激電流パルスが刺激電流生成回路にて生成され刺激が行われる。刺激電極アレイから出力された電流は帰還電極へ流れ込む。

図 3・6・4 にシステム全体の外観と刺激電極アレイデバイス及び電極アレイの外観を示す。この図では、人工内耳と同じくコイルは耳の後ろ辺りに設置されている(図 3・6・4(a))。図 3・6・4 (b) に示す 2 次コイル埋植位置としては、水晶体内や眼球表面などがあるが、コイルが動くため電力変動などへの対応が必要となる。図 3・6・4(c) に示す電極アレイは 49 個の白金バルク電極で電極アレイやケーブルなどには生体適合性があり、防水性や電気絶縁特性に優れたパリエンが包埋材料として用いられている。

刺激点数が多い場合は、以下のような考慮が必要となってくる、まずデータ通信レートが高くなり、無線伝送において電力用とデータ用で送信方式やコイルを分ける必要が生じる。近赤外光をデータ通信に用いる報告例もある。また、刺激電極数が少ない場合は刺激電流生成回路と電極を直接接続すればよいが、電極数が 100 点程度になると刺激電流回路と刺激電極アレイを直接接続することが困難となる。そのため、Multiplexer (MUX) を刺激電流発生回路と刺激電極アレイの間に挿入して、接続を切り替える必要がある。刺激電極アレイは眼内に設置するため大きさが限られており、多数の配線をアレイ基板上に引くことができないためである。更に刺激点数が多い場合には電極から MUX への配線が困難となる。この点を解決するため小型チップをフレキシブル基板上に分散配置する方式が提案されている³⁾。

網膜刺激方式は、図 3・6・5 に示すように刺激電極の設置場所により大きく 3 つに分類される。開発が一番進んでいるのが網膜上設置方式(以下「網膜上方式」)である。刺激電極アレイを網膜上に留置する。電極アレイはタグと呼ばれるピンで網膜上に固定する。網膜上方式の利点は、これまで開発された人工内耳とほぼ同じシステムを用いることができることで、そのため開発期間を短縮できる。課題は電極と網膜の密着性であり、タグによる固定方法では良

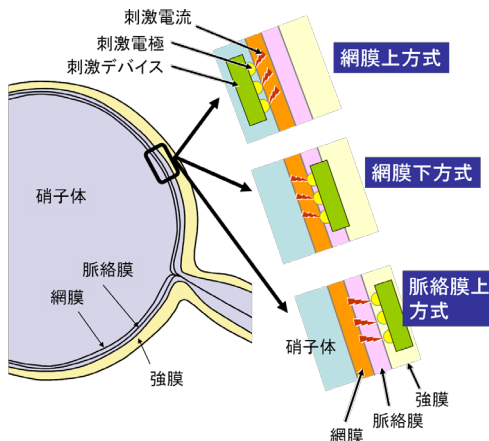


図 3・6・5 網膜刺激方式人工視覚の刺激デバイス設置位置による分類

好な密着性を確保することは困難であると言われている。また、網膜上から刺激するため、神経節細胞だけでなく、視神経を刺激する場合もあり得るため、ストローク状の光覚が出現する懸念もある。網膜上方式では、米国 Second Sight 社・南カルフォルニア大学により現在 60 極の刺激電極を RP 患者に慢性埋植した長期臨床試験が行われている⁴⁾。歩行や文字の読解などが報告されている。この場合、2 次コイルは眼球表面横に設置している。その他、ドイツ IMI 社などが網膜上方式での開発を進めている⁵⁾。3 次元集積回路デバイスを網膜上に応用する試みが東北大学グループにより行われている。3 次元集積回路技術により、チップ表面に受光素子アレイを集積化し、チップ裏面には刺激電極アレイを集積化することで、ワンチップで光電変換から刺激電流生成までを行うことが可能である⁶⁾。

網膜剥離を行い刺激電極アレイを挿入し留置する方式が網膜下方式である。視細胞に一番近く電極と網膜との密着性も良い。通常刺激電極と受光素子とを集積化したデバイス構成をとっている。電源供給を必要とする刺激電極と集積化した受光デバイスアレイが必要となる。ドイツチュービンゲン大学・Retina Implant 社のグループが 1500 個の電極・受光素子を集積化した集積回路デバイスを RP 患者に慢性埋植する臨床試験を数例実施した⁷⁾。埋植患者は歩行なども可能になるなど良好な結果が得られている。電極サイズは 50 μm 角で TiN 製である。

網膜上、網膜下いずれの方式も眼球を一部切開して刺激電極を眼球内部に挿入することになるが、脈絡膜上方式では強膜を一部切開してポケットを作りデバイスをそのポケットに入り込ませる。そのため眼球を切開する必要がなく、手術が容易で患者への負担も少ない。脈絡膜を通じて網膜細胞の刺激を行うことになるため、光覚を誘起するために必要な刺激電流値がほかの方式に比べて大きくなる。大阪大学・ニデック・奈良先端大のグループはこの脈絡膜上方式である STS (Suprachoroidal Transretinal Stimulation) 方式⁸⁾による 9 極の電極アレイを RP 患者への臨床試験を実施した。2 点弁別や文字などが認識できることが報告されており、本方式の有効性が実証されている。脈絡膜上方式はその他オーストラリアや韓国のグループも開発を進めている。

その他の方式として、マイクロカメラを眼内に埋植して、その出力データをもとに視神経刺激を行う人工視覚開発が進められている⁹⁾。また、最近研究が活発化している Optogenetics を用いた人工視覚の研究も始まっている¹⁰⁾。神経節細胞を光応答するように遺伝子改変することで、光覚を再建しようとするものである。遺伝子改変に対する安全性など課題は多いが、有望な方式であるといえる。

■参考文献

- 1) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究」平成 17 年度研究報告書、2006 年。
- 2) M.S. Humayun, J.D. Weiland, G. Chader, and E. Greenbaum(Eds.) : “Artificial Sight,” Springer, New York, NY 2007.
- 3) J. Ohta : “Artificial Retina IC in Bio-Medical CMOS ICs,” Yoo, Hoi-Jun; Hoof, Chris van(Eds.), Springer, 2011.
- 4) A.K. Ahuja, J.D. Dorn, A. Caspi, M.J. McMahon, G. Dagnelie, L. Dacruz, P. Stanga, M.S. Humayun, and R.J. Greenberg, Argus II Study Group : “Blind subjects implanted with the Argus II retinal prosthesis are able to improve performance in a spatial-motor task,” Br. J. Ophthalmol, 2010 Sep 29.
- 5) M. Ortmanns, A. Rocke, M. Gehrke, and H.-J. Tiedtke : “A 232-Channel Epiretinal Stimulator ASIC,” IEEE J. Solid-State Circuits, vol.42, no.12, pp.2946-2959, 2007.
- 6) T. Tanaka, K. Sato, K. Komiya, T. Kobayashi, T. Watanabe, T. Fukushima, H. Tomita, H. Kurino, M. Tamai, and

M. Koyanagi : “Fully Implantable Retinal Prosthesis Chip with Photodetector and Stimulus Current Generator,” IEEE International Devices Meeting (IEDM), pp.1015-1018, Dec. 2007.

- 7) E. Zrenner, K.U. Bartz-Schmidt, H. Benav, D. Besch, A. Bruckmann, V.-P. Gabel, F. Gekeler, U. Greppmaier, A. Harscher, S. Kibbel, J. Koch, A. Kusnyerik, T. Peters, K. Stingl, H. Sachs, A. Stett, P. Szurman, B. Wilhelm, and R. Wilke : “Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words,” Proc. Royal Soc. B, Nov. 3, 2010, doi: 10.1098/rspb.2010.1747.
- 8) T. Fujikado, T. Morimoto, H. Kanda, S. Kusaka, K. Nakauchi, M. Ozawa, K. Matsushita, H. Sakaguchi, Y. Ikuno, M. Kamei, and Y. Tano : “Evaluation of phosphenes elicited by extraocular stimulation in normals and by suprachoroidal-transretinal stimulation in patients with retinitis pigmentosa,” Graefes’ Arch Clin Exp Ophthalmol, vol.245, pp.1411-1419, 2007.
- 9) X. Chai, L. Li, K. Wu, C. Zhou, P. Cao, and Q. Ren : “C-Sight Visual Prostheses for the Blind,” IEEE Eng. Med. Bio. Mag., vol.27, no.5, pp.20-28, 2008.
- 10) P. Degenaar, N. Grossman, M.A. Memon, J. Burrone, M. Dawson, E. Drakakis, M. Neil, and K. Nikolic : “Optobionic vision - a new genetically enhanced light on retinal prosthesis,” J. Neural Eng. 6 (2009) 035007 (10 pp.).

2-3-7 ドラッグデリバリーシステム (DDS)

(執筆者：宮田完二郎) [2010年5月受領]

ドラッグデリバリーシステム (DDS) とは、物理的、化学的、もしくは生物学的手法を通じて生体内での薬剤の挙動を制御し、薬効の向上や副作用の低減、更には Quality of Life (QOL) の改善を目指すシステムである。薬剤の挙動とは、主に投薬後の薬剤体内分布、すなわち臓器などの各組織に薬剤が分布する割合 (時には細胞内での分布の割合) や薬効の ON/OFF のことであり、時間を考慮したうえでこれらを制御することが DDS に求められる。その一方で、薬剤ライフサイクルの延長を目的に DDS 開発が行われることもある。

DDS が求められる例として、図 3・7・1 に示される用途が挙げられる。例えば、副作用の強い抗がん剤に対してである。抗がん剤の副作用は、がん組織以外の正常組織にまで抗がん剤が分布してしまうために生じるが、DDS によりがん組織にのみ抗がん剤を輸送することができれば、もしくは DDS によりがん組織でのみ薬効を ON (正常組織では OFF) にできれば、副作用の大幅な低減が見込まれ、理想的ながん化学療法となりうる。また、核酸医薬やタンパク質製剤を用いる際、生体内での速やかな代謝によって薬効が消失すること、皮膚や細胞膜などの生

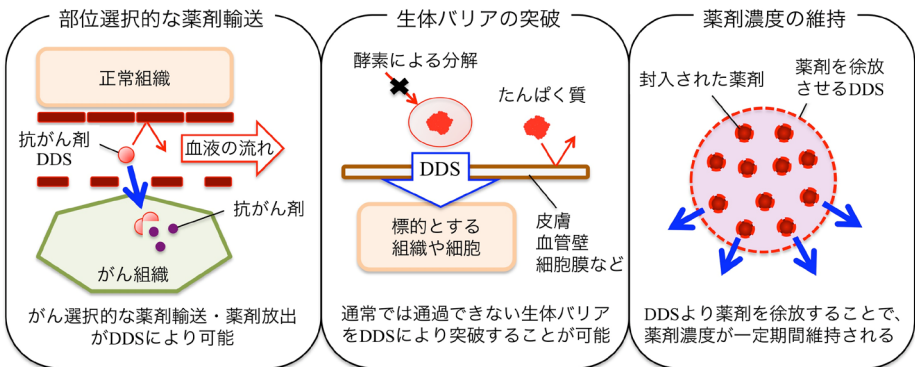


図 3・7・1 DDS が必要とされる例

体バリアを通過できないために薬効を発揮できないことが問題として挙げられる。よって、DDSにより代謝から保護し、また生体バリアを積極的に通過する機能を施せば、薬効の大幅な向上が期待できる。更に、生体内で一定期間、一定濃度を維持する必要がある薬剤の場合には、足場材料としてのDDSから薬剤を徐放することで、その濃度の調節が可能となる。

次は、どのようにして生体内での薬剤挙動を制御するか、すなわちDDSの設計指針についてである。薬剤の種類、そして標的とする疾患に応じて様々な方法が選択可能であるが、大きくは図3・7・2のようにまとめられる。これまで最も多く検討されてきたのは化学的技術に基づくDDSである。代表的な例として、生体適合性の高い水溶性高分子によるタンパク質製剤の化学修飾が挙げられる。タンパク質製剤を高分子修飾することの利点は、血中半減期の増加、代謝や免疫反応の抑制などである。用いられる生体適合性高分子としてはポリエチレングリコール(PEG)が最も一般的であり、いくつかのPEG化タンパク質製剤は臨床にて利用されている。また、有機分子の自己集合体に基づくDDSも注目を集めている。脂質二分子膜から成るリポソームに代表される中空粒子は、内水相に薬剤を封入できることからナノ-マイクロスケールの薬剤カプセルとしての応用が検討されている。一方、PEGと疎水性高分子のブロック共重合体は、薬剤が密に詰まったコアを有する自己集合体(高分子ミセル)を形成し、リポソームなどの中空粒子よりも小さいサイズ(10~100 nm)のDDSとして展開されている。これらの自己集合体を用いる利点は、そのサイズや表面構造を制御することで標的とする疾患組織選

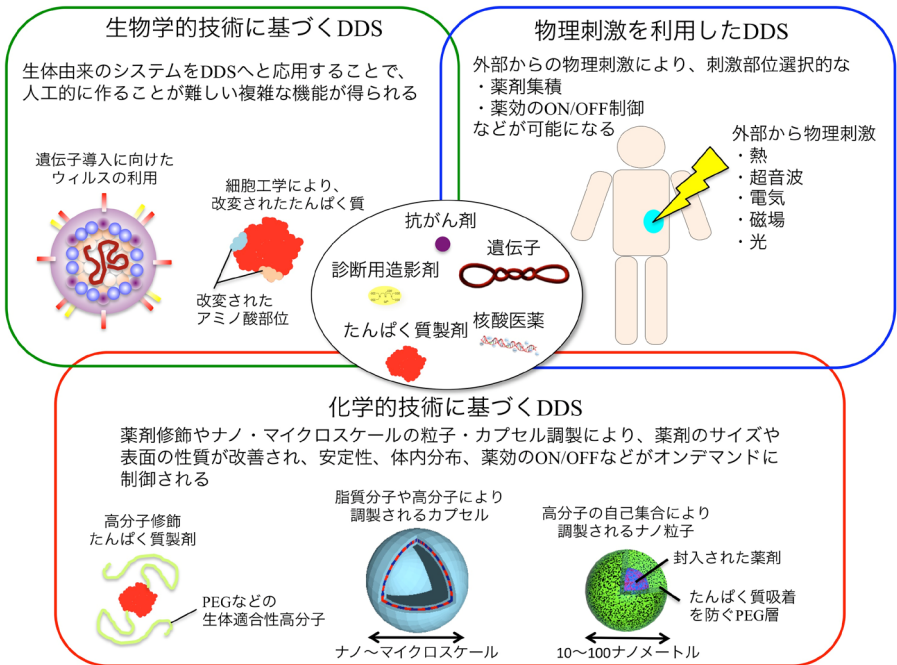


図 3・7・2 DDS の設計指針の例

的に集積させることができ、封入する薬剤に依存しない薬剤輸送が可能になることである。例えば、固形がん組織においては、血管系やリンパ系の発達ががん細胞の増殖に追いつかず、未成熟な組織として構築されている。結果としてがん組織では、粒子径が数十から百数十ナノメートルとなる物質の血管からの漏出が加速され、かつリンパ系からの排出作用が生じにくい環境が形成されている (Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果)。よって、生体成分が吸着しにくい表面構造を有する、10~100 nm 径の DDS を創出することで、がん組織に対する選択性が高まるのである。

薬剤が集積する部位や時間、ON/OFF の選択性を高めるために、物理エネルギーを外部刺激として利用する DDS も検討されている。核酸医薬は負に帯電していることから、電氣的刺激により皮膚や細胞膜などの障壁を突破することが可能となる。同様に、磁性体を DDS として組み込むことで、外部磁場により薬剤の細胞膜透過能などが改善される。一方、標的部位によっては、人工的に作ることが困難である複雑な機能が DDS に求められる。そのような場合、生物学的技術に基づき、生体由来成分を改変した DDS が適用される。遺伝子治療においては治療用遺伝子 (DNA) を細胞内の核まで運ばなければならないが、細胞膜や核膜などの大きな障壁が存在する。これらの障壁を突破する能力を備えているのがウイルスであり、これを DDS として利用することで高い遺伝子導入活性が得られるのである。しかしながら、ウイルスをそのまま用いると免疫反応が問題となることが多いため、一部のタンパク質成分に着目し、DDS 用に改良する試みも行われている。

最先端の研究現場においては、生物・医学分野における最新の知見と上述の各種分野の最新技術が統合された、一種のデバイスとして機能する DDS が開発されつつある。

2-3-8 細胞工学による再生医療

(執筆者：武田直也) [2010年5月 受領]

(1) 歴史的経緯

体から失われた組織や臓器を人工器官や装具で補綴する従来からの取り組みに対し、1970 年代に Green は、増殖能を失われたマウス胎児由来線維芽細胞上でヒト皮膚角化表皮細胞を培養して重層化扁平上皮組織を再構築するフィーダーレイヤー法を開発した¹⁾。また、Bell は、1970 年から 80 年代にかけて、コラーゲンゲル内で線維芽細胞を包埋培養すると真皮様組織や全層皮膚様組織を培養系で作製できることを報告した²⁾。このような潮流のなか、1988 年に Skalak らは、生きた細胞自体や細胞外基質などの生体物質を用いて代替組織を構築し、組織構造の補綴のみならず生体機能の維持・回復をも図るとした“Tissue Engineering (生体組織工学)”の概念を定義した³⁾。これを受けて、1993 年には材料工学者の Langer と小児消化器外科医である Vacanti により、生体組織工学による組織再生の戦略として ①細胞、②細胞増殖因子、③細胞培養用の足場材料の 3 つの要素が重要であるとの体系化がなされ⁴⁾、生体組織工学の概念が広まる契機となった (図 3・8・1)。

これら 3 要素のうち、当初の生体組織工学では足場材料の開発が精力的に行われた。前出の Langer と Vacanti は、皮膚のような薄い組織ではなく、肝臓のような厚い組織を培養系で再構築することを目指した。その手法は、生体吸収性合成高分子で足場材料を作製し、生体から単離した体細胞を細胞ソースに用いてこれを足場材料に播種して培養し、更に生体内に移植する。移植後は生体内の様々な細胞増殖因子を活用し、再生組織へと成熟されると期待される。有名

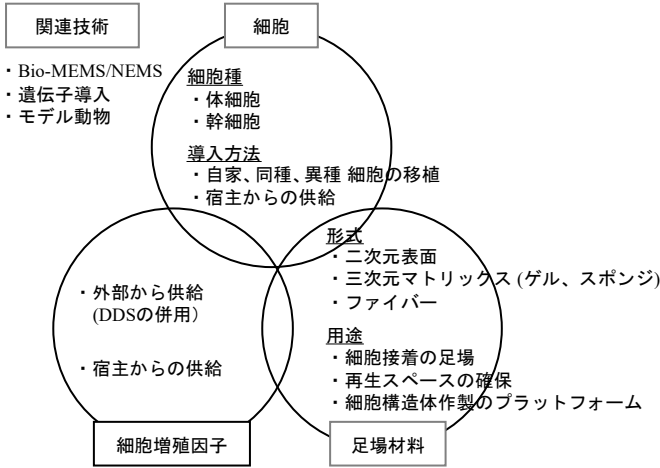


図 3・8・1 組織学で重要な 3 要素

なヒトの耳を背中に載せたネズミは、耳の形に成形したポリ乳酸の 3 次元足場に軟骨細胞を播種し背中の皮下に移植して作製されたものである⁵⁾。同様の手法は心臓や肝臓など実質臓器の組織再構築にも試みられた。しかし、体内に埋入された合成高分子やこれが分解されて生じたモノマーによる炎症反応の惹起や、足場材料の分解後に線維組織による置換が起こるなど、生体本来の細胞で満たされた組織を再構築することの困難さが認識されている。

(2) マイクロ・ナノバイオテクノロジーと組織工学

一方で、前述した Green 型再構成上皮組織のように、培養系のみで一定の細胞構造体を作製するとの取り組みも成され、自家培養表皮、自家培養軟骨、自家培養角膜上皮、ヒト重層皮膚様組織などは既に事業化されている¹⁾²⁾。しかし、フィーダーレイヤー法に見られる (i) 異種の細胞の支持、(ii) 細胞構造体を培養器材から剥離回収する際のタンパク質分解酵素による処理、を排する新たな培養系の開発は、異種由来分子による糖鎖修飾などのヒト細胞の汚染やタンパク質分解酵素による細胞構造体の損傷を回避する上で重要である。Okano は、ヒト体温に近い 32℃を境に温度変化で細胞接着性を変化させ得る培養器材を開発し、単層培養細胞を温度変化のみでシート状に回収する技術を開発した。この培養器材は、温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) をポリスチレン器材の表面に固定したものであり、PIPAAm の厚みを 20 nm に制御することで初めて細胞の接着・脱着を制御しうる。この細胞シート工学技術は、単層の自家口腔粘膜上皮細胞を用いた角膜組織再生や積層化した自家骨格筋筋芽細胞シートによる拡張心筋症治療などの移植医療に臨床応用されている⁶⁾。

厚みのある組織の作製には、組織深部の細胞の壊死を防ぐために、栄養供給と老廃物回収を担う毛細血管網の構築が重要であり、MEMS 技術も積極的に活用されている。光リソグラフィを利用した血管内皮細胞のマイクロパターニングや^{7),8)}、Vacanti らによる肝機能再生に向けた 3 次元マイクロ流体デバイスでの血管内皮細胞と肝実質細胞の共培養系の研究などが報告されている⁹⁾。後者は特に、組織構造の忠実な再現にかかわらず、機能の再構築を重視すると

の研究動向の変遷を示唆すると考えられる。細胞増殖因子の供給に関しては、Tabata らによりマイクロ粒子やシート状のハイドロゲルに bFGF をはじめとした各種増殖因子を含ませた徐放化製剤が開発され、これらを生体内に投与し血管、骨、歯周組織などを再生誘導治療する臨床研究が始まっている¹⁰⁾。

(3) 幹細胞生物学との集学化

移植医療におけるドナー問題と同様に、組織再構築において細胞ソースを如何に確保するかは重要な課題である。臨床応用を視野に入れると、自家または同種細胞が望ましいことは言うまでもない。解決策として近年特に大きな期待を集めているのが、多様な細胞への分化能と自己複製能とを兼ね備えた幹細胞の活用である。1998年に Thomson らにより樹立されたヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)¹¹⁾ や、2007年に Yamanaka が作製したヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は勿論のこと¹²⁾、成人の各種組織での存在が明らかになってきた組織幹細胞 (体性幹細胞) や骨髄、脂肪などの間葉組織に由来する間葉系幹細胞も有望視されている。組織幹細胞及び間葉系幹細胞は、自家や同種細胞を比較的採取しやすいという利点もある。

幹細胞の活用にあたっては、安定な維持に加えて特定細胞種への分化誘導制御が重要である。これまでにも、生体シグナル因子を用いた分化誘導が精力的に研究されてきている。一方、近年急速に、細胞周囲の物理的な微小環境が細胞の挙動に大きな影響を与えることが明らかにされ、人工的に作製した微小環境培養場で幹細胞の分化誘導を制御する研究が大きく注目されている。Discher らは、硬さを様々に変化させたマイクロメートルオーダー厚のコラーゲンゲル上でヒト間葉系幹細胞を培養し、生体組織の硬さと相関した硬さのゲル上で、それぞれ神経系、筋系、骨系の細胞への分化誘導が起こることを示した¹³⁾。Okano らは、円形の細胞接着ドメインをアレイ状に配したパターンニング基板をマスクレス光リソグラフィにて作製し、円形パターンの直径を 200 μm に制御することで ES 細胞を心筋細胞へと分化誘導している¹⁴⁾。

■参考文献

- 1) H. Green, et al. : "Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting," Proc. Natl. Acad. Sci., vol.76, no.11, pp.5665-5668, Nov. 1979, 事業化例: [1](株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング: <http://www.jp-te.com.jp/>, [2] Genzyme Corp.: <http://www.genzyme.com/default.asp>
- 2) E. Bell, et al. : "Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness," Science, vol.211, no.4486, pp.1051-1052, Mar. 1981, 事業化例: Organogenesis Inc., <http://www.apligrاف.com/index.html>
- 3) R. Skalak and C.F. Fox : "Tissue Engineering," in Proceedings of the Granlibakken Workshop, ed. R.Skalak and C.F.Fox, preface, Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.
- 4) R. Langer and J.P. Vacanti : "Tissue Engineering," Science, vol.260, no.5110, pp.920-926, May 1993.
- 5) Y. Cao, J.P. Vacanti, et al. : "Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear," Plast. Reconstr. Surg., vol.100, no.2, pp.297-302, Aug. 1997.
- 6) 小林 純, 岡野光夫 : "細胞シート工学のための温度応答性培養皿," ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ)の最新科学技術, 田畑泰彦(編), pp.349-353, メディカルドゥ, 2009.
- 7) A. Kobayashi, et al. : "In vitro formation of capillary networks using optical lithographic techniques," Biochem. Biophys. Res. Commun., vol.358, no.3, pp.692-697, May 2007.
- 8) K. Itoga, T. Okano, et al. : "Maskless liquid-crystal-display projection photolithography for improved design flexibility of cellular micropatterns," Biomaterials, vol.27, no.15, pp.3005-3009, May 2006.
- 9) S. Kaihara, J.P. Vacanti, et al. : "Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication," Tissue Eng., vol.6, no.2, pp.105-117, Apr. 2000.
- 10) 田畑泰彦, 他 : "第2章 生体シグナル因子の利用, 1. 細胞増殖因子," 患者までとどいている再生誘導治療, 田畑泰彦 編, pp.86-155, メディカルドゥ, 大阪, 2009.

- 11) J.A. Thomson, et al. : “Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts,” Science, vol.282, no.5391, pp.1145-1147, Nov. 1998.
- 12) K. Takahashi, S. Yamanaka, et al. : “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors,” Cell, vol.131, no.5, pp.861-872, Nov. 2007.
- 13) A.J. Engler, D.E. Discher, et al. : “Matrix elasticity directs stem cell lineage specification,” Cell, vol.126, no.4, pp.677-689, Aug. 2006.
- 14) D. Sasaki, T. Okano, et al. : “Mass preparation of size-controlled mouse embryonic stem cell aggregates and induction of cardiac differentiation by cell patterning method,” Biomaterials, vol.30, no.26, pp.4384-4389, May 2009.

2-3-9 プリンティング技術による骨の再生