

半導体化学センサを用いた細胞単層膜の薬物透過特性評価法の開発研究

—Development of cell layer permeability assay
using chemical sensor based on semiconductor—

1081028 (登録番号)

研究者代表

(東北大学大学院工学研究科・助教)

宮本浩一郎

〔研究の背景と目的〕

現在、我々の周囲には10万種を超える化学物質が存在している。これらの化学物質は工業社会にとって必要なものではあるが、その中で安全性が確認されているものはわずかである。そこで、人体に対する毒性がないか、環境ホルモンとして作用するかなどを調べる検査手法の重要性が増している。他方では、生物多様性条約(2006年 187ヶ国加盟)に基づいた生物資源探査が活発化しており、有用成分の探査を効率的に行うアッセイ系の必要性も増している。このような背景から、安全性および有用性の確認をサポートする装置・手法を提案し、実際に開発することが求められている。

化学物質が生体を与える影響を評価するにあたり、動物実験は倫理的およびコストの面で問題が多く、近年では培養細胞を用いた細胞アッセイが広く行われている。そこで、本研究では、半導体化学センサを用いて細胞単層膜の薬物透過性評価や、種々のモデル細胞株の薬物応答を評価するシステムの開発研究を行った。

半導体を用いて構成される化学種の検出を行うセンサを半導体化学センサと呼び、溶液(E)-絶縁層(I)-半導体(S)の構造を持つものが広く研究されている。良く知られているものに、IS-FET (Ion-Sensitive Field-Effect Transistor), LAPS (Light-Addressable Potentiometric Sensor), EIS 容量センサがあげられる。これらのセンサは、例えば、イオン感应性のシリコン酸化膜やシリコン窒化膜を絶縁層として使用する場合、溶液-絶縁層界面の電界効果を利用することによってサンプル溶液

の水素イオン濃度(pH)を測定することが可能である。これは、EIS構造を持つセンサでは、電界効果によって絶縁層直下に形成される空乏層容量の合成容量が変化するためであり、標識分子や色素による着色を必要としない測定を行うことが出来る。

図1に本研究で目的とする測定系を示す。EIS構造を有するセンサの表面で細胞培養と測定を行うことにより、細胞代謝に伴うpH変化、細胞の形態変化に伴うインピーダンス変化をその場観察することの出来るシステムを構成できると考えられる。

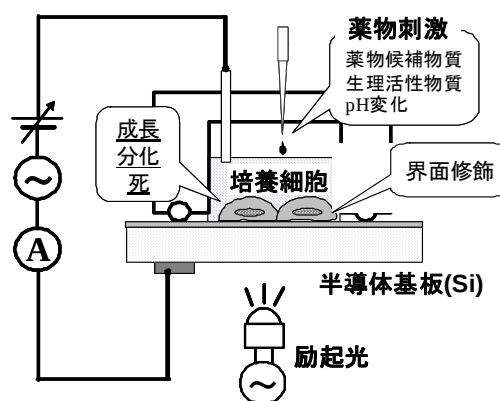


図1： 半導体化学センサを用いた細胞の薬物反応評価システム (LAPS測定を行う場合)

〔研究の内容、成果〕

1. 半導体表面の修飾による培養環境の整備

半導体化学センサを用いたアプリケーションを提案する際に、大きな障害は最初のユーザ(試用者)となる生物学・農学の研究者の、「半導体センサの上で生育された細胞」が従来の培養細胞と比較可能

かという疑念である。これは、図2に示すように、支持体の表面状態は接着タンパク質を介して細胞内に伝達され、細胞活動に大きく影響することがよく知られていることによる(T. Miller et al., Langmuir 1723, 19(2003))。この問題が解決されなければ、本研究で開発するセンサのみならず新規に提案される半導体センサが新規細胞アッセイ法として普及することは難しい。この観点から、半導体上で培養された細胞と、一般的なシャーレ上で培養された細胞を比較し、もし差異が見いだされたならばセンサ表面の修飾によって解決することができるかを検討することにした。

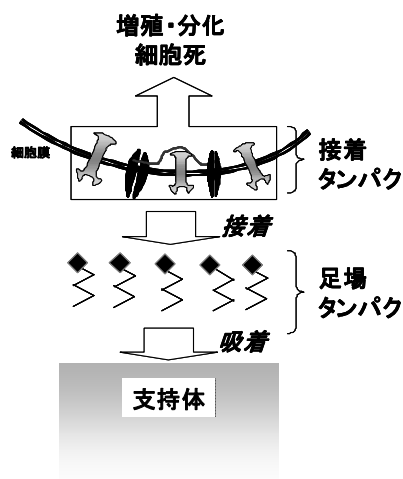


図2： 支持体表面における細胞接着の機構

前述のように、半導体化学センサは、シリコン酸化膜やシリコン窒化膜がイオン感応膜としてしばしば用いられる。そこで、モデル細胞としてMCF-7（ヒト乳がん由来細胞株）を両者の表面で培養を行った。図3に培養細胞の光学顕微鏡像を示す。24時間培養を行った場合、通常の培養状態（細胞培養用プラスチックシャーレ表面、図3a）では完全に接着して平坦なアイランドを形成する。しかしながら、シリコン酸化膜表面(図3b) およびシリコン窒化膜表面(図3c) では、培養細胞の形態は異なっており、平坦なアイランドを形成せず、凝集してドームを形成した。この結果から、プラスチックシャーレ表面と比較した場合、基板表面における細胞の接着状態

が制限されていると考えられる。

細胞の接着は、最初に足場となるタンパク質（接着因子）が培養液中から支持体表面へ吸着した後、細胞表面の接着タンパク質が足場タンパク質に結合することによって起こる（図2）。そのため、支持体表面の状態と足場タンパク質の初期吸着状態が、その後の細胞接着に大きな影響を与えると考えられる。これまでに、支持体表面を化学的に修飾することによって接着を制御する方法は各種報告されているが、煩雑なプロセスが必要とされるため、そのような表面修飾の実用性には疑問が生じる。一方で、接着能力の乏しい細胞を培養するために、プラスチックシャーレ表面を各種基質でコートしてから培養を開始する手法も知られている。本研究では、その簡便さからより実用的であると考えられる後者の手法によってセンサ表面の改質を試みた。

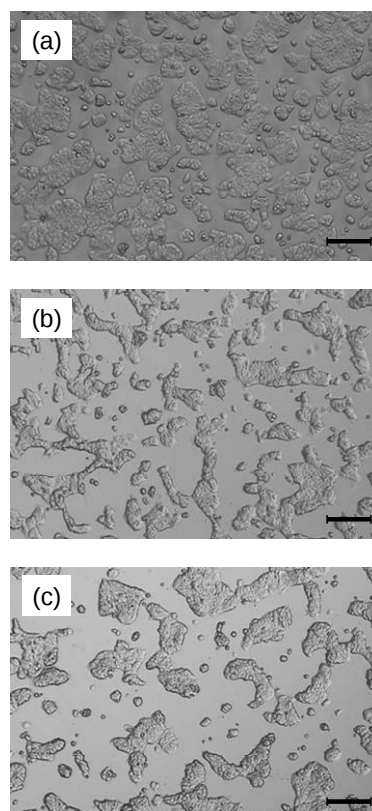


図3: 支持体による基板接着の相違 (a) プラスチックシャーレ (b) シリコン酸化膜 (c) シリコン窒化膜（図中のスケールは200μm）

接着増進を目的とした基質は、多くの種類が提案されているが、本研究では、BDセルタック（ムラサキイガイから分泌されるポリフェノールタンパク質の精製品）とPoly-L-Ornithine（オルニチン酸ポリマ；PLO）の2種類の基質による表面コートと比較した。それぞれの表面において24時間培養を行った後、光学顕微鏡によって細胞の接着状況を観察した（図4）。BDセルタックでコートされた表面では、シリコン窒化膜およびシリコン酸化膜表面において、初期清浄表面で培養を行った場合よりもさらに細胞が凝集しており、細胞の接着が阻害されている。細胞の凝集の傾向は、シリコン窒化膜表面において特に顕著に観察された（図4b）。一方、PLOでコートされた表面においては、両方の基板表面において細胞接着が改善されている可能性があるため、今後コート条件の検討を行う必要がある。

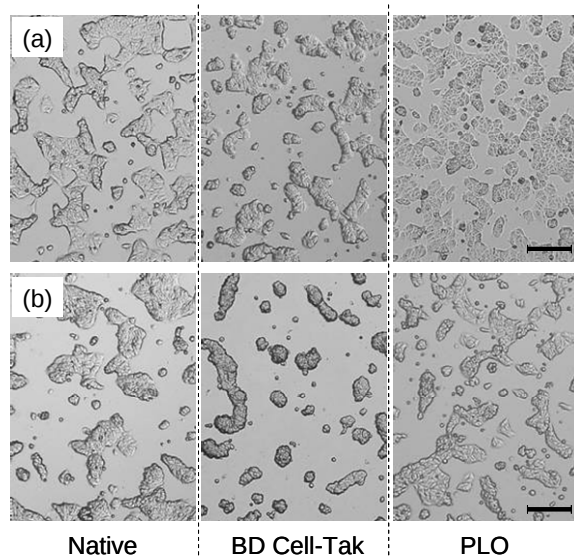


図4: 基板表面のコティングによる細胞接着の相違 (a) シリコン酸化膜 (b) シリコン窒化膜（図中のスケールは200 μ m）

本研究期間内ではプラスチックシャーレと同等の細胞接着を示す表面コートの条件を見いだすには至らなかった。しかしながら、半導体化学センサ表面においても細胞の接着は、基質による表面コートの影響をうける事が明らかになったため、さらに最適化を図る実験を進める予定である。さらに、現

在、異なる表面で培養した細胞のタンパク質を回収・定量する測定法を開発中であり、今後はより定量的な評価を行う。

2. 持ち運び型細胞測定システムの構築

動物細胞の培養は、一般的に気温35 $^{\circ}$ C, CO₂ 5%の環境で行われるが、培養細胞を生きたままその場観察するには、測定中にそうした培養環境を維持しなければならない。しかしながら、細胞培養器(CO₂インキュベータ)の中に測定系をそのまま持ち込むことは、細胞培養器からの電磁ノイズ、および培養系全体へのコンタミネーション発生の危険性が大きな問題となる。そこで、断熱機能を有するシールドボックス内に、蓄熱材と炭酸ガスパックおよび測定系を配置する機構を新規に考案した（図5）。試行錯誤によって断熱材の構造を最適化し、シールドボックス内の温度を35～37 $^{\circ}$ Cの範囲で5時間以上保持することに成功した。さらに、炭酸ガスパックを併用することによってガス雰囲気を保持することも可能であり、培養環境を維持したまま測定を行うことが可能である。

本研究で製作したシールドボックスと測定系は小型・軽量であるため、測定用ノートパソコンとあわせて持ち運びが可能である。今後は、異分野の研究者との共同研究に機動力を発揮することが期待される。

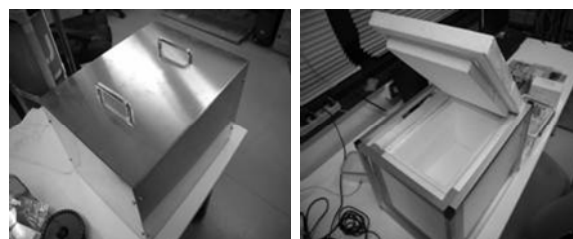


図5: 断熱機能を有する細胞測定用シールドボックス（内部に測定回路、蓄熱材、炭酸ガスパックを設置して使用する）

3. 持ち運び型化学イメージセンサの提案

前述したLAPSはEIS構造を持つ半導体化学センサの一種であり、レーザ光照射によって任意の箇所お

よび面積でサンプル溶液のイオン濃度・pHを測定できる。過去の研究では、レーザ光走査を行うことによって化学種の2次元分布を取得する、化学イメージセンサが報告されている。しかしながら、従来の化学イメージセンサは測定装置が大型であったため持ち運びが困難であり、アプリケーションを提案する上で障害となってきた。そこで、レーザ光源の代わりに市販のディスプレイモジュールを光源として使用し、持ち運び型化学イメージセンサの提案を行った。

システムの概念図を図6に示した。市販のディスプレイモジュール上に、測定箇所に応じた光点を表示して光源とした。センサから出力される光電流を記録してマッピングすることにより、従来の化学イメージセンサで測定されていたイオンの2次元分布を得ることが可能となった。かつ光点の大きさを変更することによって任意の面積の測定を行うこともできる。今後、上述の持ち運び型測定系と組み合わせることにより、培養細胞の活動をより詳細に観測することができるシステムが期待される。

また、より高速な化学イメージ測定を行うには、変調光源の周波数多重化が有効であるため、リニアLED光源を用いた「化学イメージスキャナ」の開発を行い、従来よりも高速な測定に成功した。

だけを透過するように外界と体内を隔てている。細胞層の透過性評価は、種々の化学物質の体内への侵入しやすさを表す指標となる。この細胞層の透過率を電氣的に測定するには、経上皮電気抵抗値測定が知られている。そこで、モデル細胞として知られるCaco-2細胞株をセンサ表面で培養する実験に着手した。今後は、細胞層の透過率を2次的にマッピングする化学イメージセンサアプリケーションの開発を行う。

〔成果の発表〕

- 鹿又幹裕：細胞測定用LAPSセンサシステムに関する基礎的研究，東北大学工学部電子工学科卒業論文(2008)
- 宮本浩一郎，Torsten Wagner，加納慎一郎，吉信達夫：「ディスプレイモジュールを利用した小型化学イメージセンサの開発」 第56回応用物理学関係連合講演会（30p-ZL-10）
- K. Miyamoto, Y. Kuwabara, S. Kanoh, T. Yoshinobu, T. Wagner and M. J. Schöning "Chemical image scanner based on FDM-LAPS" Sensors and Actuators B, 137 (2009) pp.533-538

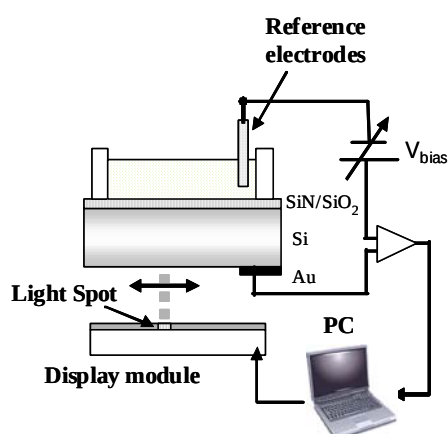


図6：小型化学イメージセンサシステム

〔今後の研究の方向、課題〕

我々の体を構成する細胞は、分子レベルでお互いに接着する機構を有しており、細胞層は有用な物質