

技術紹介

6 バイオ LSI の高機能化を目的とした 数値解析による電極上微細構造の開発

Development of Micro-structure on Electrodes by Numerical Analysis
to Improve the Function of Bio-LSI

林 泰之	Hiroyuki Hayashi	商品開発センター
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、電気化学イメージング、酵素活性、数値解析

Keywords: Bio-LSI sensing system, Electrochemical imaging, Enzyme activity, Numerical analysis

要 旨

当社は、医療・ライフサイエンス分野向けの電気化学センサであるバイオ LSI を、産学連携体制のもと開発してきました。バイオ LSI は、アレイ状多点電極直下に集積された増幅回路により、微量物質のイメージング、および多項目同時検出を、高感度、低ノイズ、高速に行うことができます。現在はチップのさらなる高機能化を目指し、化学反応や輸送現象等、チップ上で生じる様々な物理現象を数値解析により評価し、得られた知見をもとに考案した、独自のチップ上微細構造の開発に取り組んでおります。本稿ではその一例として、細胞塊の酵素活性評価における測定再現性向上を目的とした、新規電極構造の開発について紹介いたします。

SUMMARY

JAE has developed an electrochemical sensor called "Bio-LSI" for the field of medical and life science on the academic-industrial alliance. The Bio-LSI provides high-sensitive, low noise level, high-speed bio-imaging and multi-point bio-sensing by the integrated amplifier circuit under the arrayed electrodes. We have also developed a novel micro-structure on the chip for an enhancement of the performance of the Bio-LSI, based on the numerical analytical approach of some physical phenomena that occurred on the chip, such as chemical reaction and transport phenomenon. In this report, we introduce a new electrode design for improving the repeatability on evaluating enzyme activity of clumps of cells as an example of the micro-structure on the chip.

1. はじめに

当社では産学連携体制の下、LSI 技術を利用した多点電気化学センサであるバイオ LSI チップおよび計測システムの開発を行っております。バイオ LSI は、図 1 に示すようにチップ上に配列された作用極と、各作用極直下に集積された電流増幅回路を有しており、微量物質のイメージングや多項目同時検出を高感度、低ノイズ、高速に行うことが可能となります。本システムは、チップ上の細胞、細胞塊、組織片等に由来する微量物質を高感度に測定できるため、医療、創薬等の現場における生体試料の活性評価等への応用が期待できます。¹⁾

我々はこのバイオ LSI チップのさらなる高機能化を目指し、化学反応や輸送現象等、チップ上で生じる様々な物理現象を数値解析により評価、検討し、独自のチップ上微細構造の開発に取り組んでおります。本稿では、いくつかの測定例が報告されている細胞塊の酵素活性測定について、バイオ LSI を用いた測定の再現性評価、ならびに測定再現性を向上させるチップ上微細構造の開発にあたっての数値解析的アプローチについて紹介いたします。

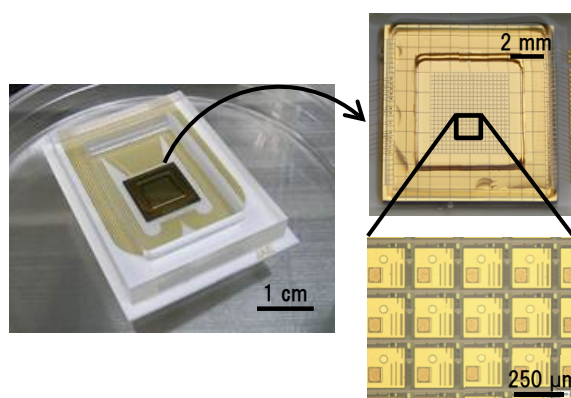


図 1. バイオ LSI チップ

2. 細胞塊の酵素活性評価における問題点

バイオ LSI を用いた細胞塊の酵素活性評価について、これまでにいくつかの報告があります。²⁻⁶⁾その代表例が、マウス ES 細胞の凝集によって形成された 胚様体 (Embryoid body : EB) の、アルカリホスファターゼ (Alkaline Phosphatase : ALP) 酵素活性の評価です。⁶⁾今回我々は、このような細胞塊の酵素活性評価において、試料投入から電圧印加までの時間のバラつき、あるいは試料投入時に生じる溶液の流れのために測定再現性が低下することに着目し、これを解決するための電極構造の開発に取り組みました。

マウス EB の細胞膜に存在する ALP は、分化の進行にともない減少することが知られており、分化進行状態を評価するための分化マーカーとして利用されてきました。ALP はアルカリ性条件下でリン酸エステル化合物の加水分解を促進するため、加水分解後の生成物が電気化学活性を有するならば、バイオ LSI によって ALP 量を間接的に評価できます。例えば、リン酸エステル化合物 p-アミノフェニルホスフェート (p-aminophenyl phosphate : PAPP) は図 2 に示すとおり、ALP 酵素活性により電気化学活性種 p-アミノフェノール (p-aminophenol : PAP) へ加水分解されるため、電極上における PAP から p-キノンイミン (p-quinone imine : PQI) への酸化反応に由来する電流を測定することで、間接的に ALP 量を評価することができます。図 3 に、バイオ LSI 電極上におけるマウス EB、および反応に参与する物質の模式図を示します。

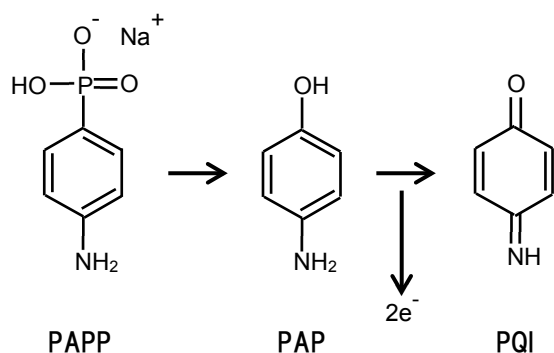


図 2. ALP 酵素反応による PAP の生成と
電極反応による PAP の酸化

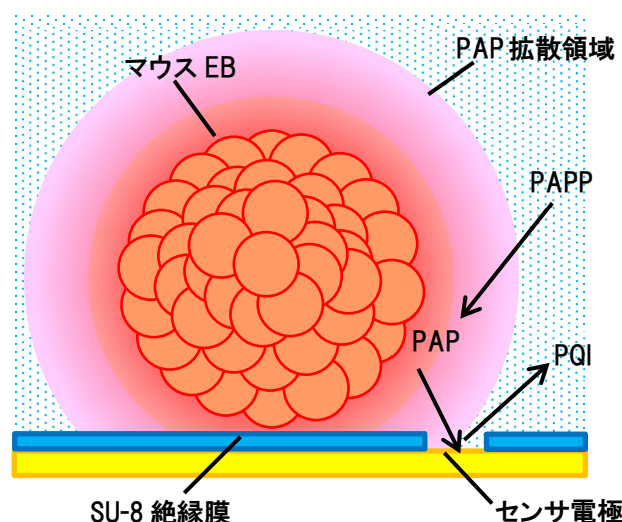


図 3. バイオ LSI 上のマウス EB および
反応に参与する物質

マウス EB の ALP 活性評価の測定手順を図 4 に示します。まず、マウス EB を 4.7 mol/m^3 の PAPP を含み、pH が 9.5 に調整されたトリス塩酸緩衝液に投入します。投入直後より細胞膜内 ALP によって PAPP が PAP へ変化する酵素反応が生じ、生成した PAP は EB 表面からセンサ電極付近まで拡散し始めます。EB 投入より時間 A 経過後に電極に電圧を印加し、PAP から PQI への酸化を行い、さらに電流値が安定する時間 B 経過後に、電流を測定します。ここで我々は、図 5 に示すように EB 投入から電圧印加までの時間 A の長さの差、あるいは EB 投入によって生じる測定液の流れや揺れは、EB 投入順序

や実験者によってバラつくため、測定再現性が低下することに注目しました。そこで経過時間 A の差や測定液の流れや揺れのバラつきが、測定再現性にどの程度影響を及ぼすか、数値解析を用いて評価しましたので、次章にその詳細を示します。

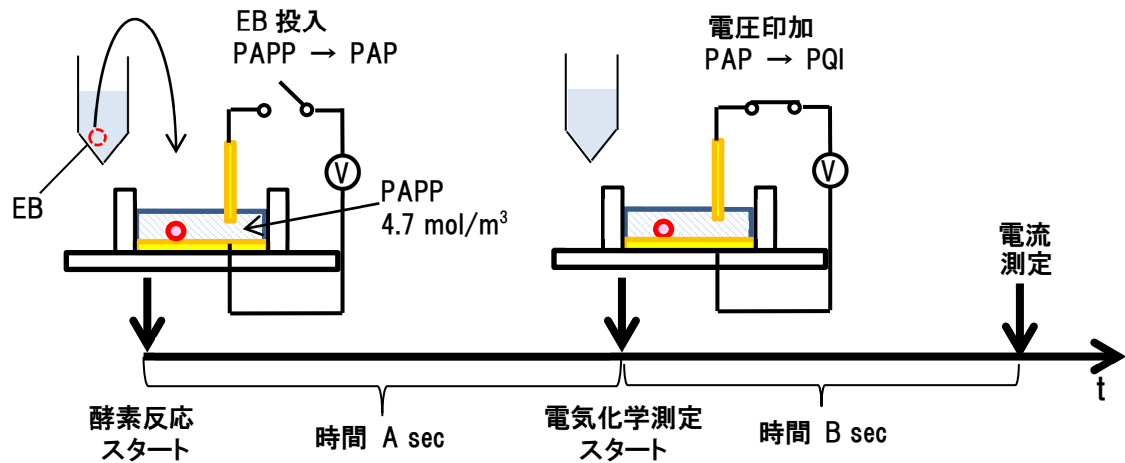


図 4. マウス EB の ALP 活性評価測定手順

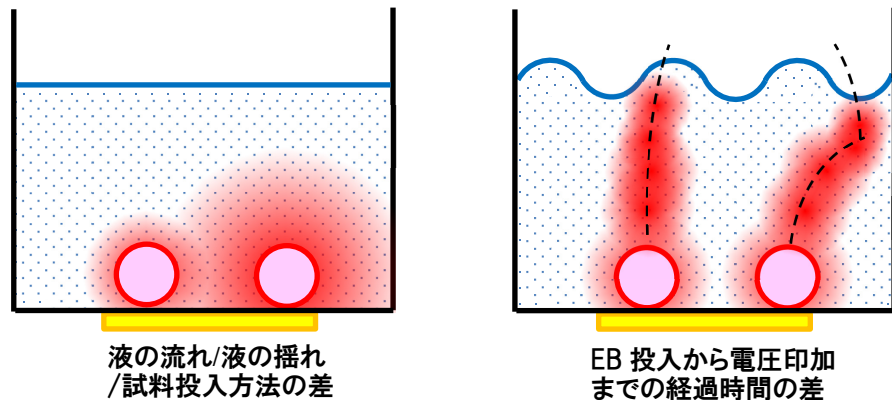


図 5. 細胞塊酵素活性評価における測定再現性の低下要因

3.測定再現性の評価

はじめに、マウス EB の酵素活性評価における、試料投入から電圧印加までの時間の差が測定再現性に及ぼす影響について、数値解析モデルを用いて検証しました。チップ上化学反応の解析モデルを図 6 に示します。解析には有限要素法の解析ソフトウェア COMSOL Multiphysics を使用しました。以下に、モデル形状、解析に使用した諸条件を紹介いたします。

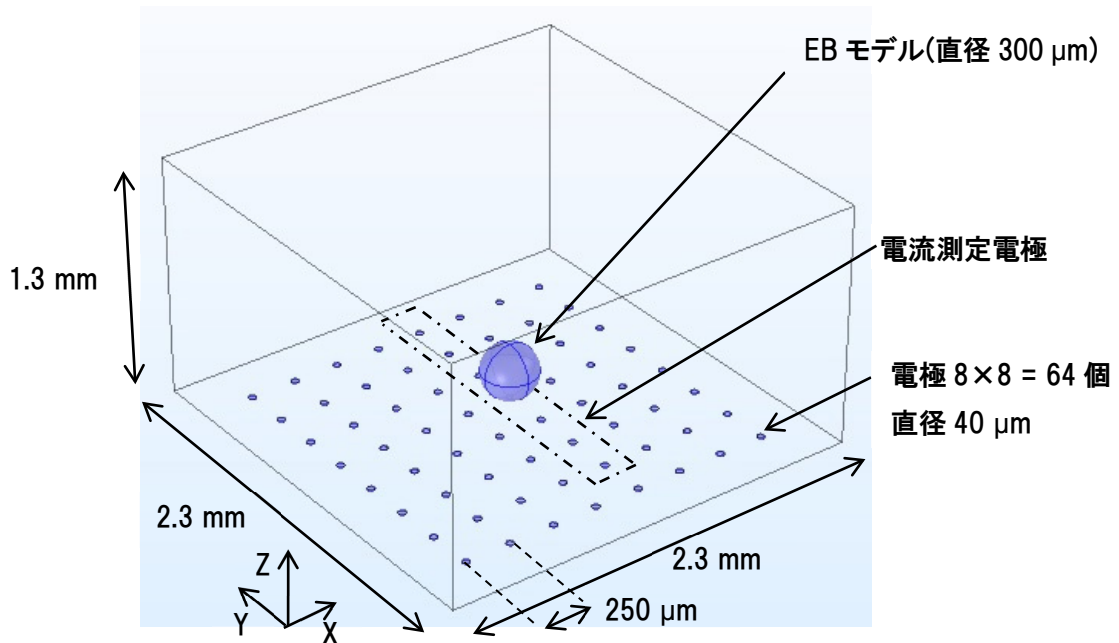


図 6. バイオ LSI 上のマウス EB 由来 PAP 濃度の数値解析モデル

図 6 に示す 2.3 mm×2.3 mm×1.3 mm の解析空間内底面に、電極ピッチ 250 μm、電極直径 40 μm の電極を 8×8=64 個配置し、x=125 μm、y=125 μm に位置する電極直上に直径 300 μm マウス EB を配置しました。図 6 のモデル形状を使用し、フィックの法則に従う解析空間内の PAPP と PAP 濃度分布、および各電極上の PAP 濃度勾配により決まる電流値を計算しました。初期条件として、解析空間全体の PAPP 濃度、PAP 濃度はそれぞれ 4.7 mol/m³、0 mol/m³としました。マウス EB 表面の境界条件は、ALP 酵素反応における反応速度 v mol/s にて、PAPP が解析空間より流出し、PAP が流入する設定としました。また、PAP 発生速度 v mol/s には、PAPP 濃度 $[S]$ mol/m³ に依存するミカエリス・メンテンの式 1 を用いました。⁷⁾

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{式 1}$$

ここで、 V_{\max} は最大反応速度 $2 \times 10^{-10} \text{ U} \div 3.33 \times 10^{-12} \text{ mol/s}$ 、 K_m はミカエリス・メンテン定数 1.7 mol/m^3 、 $[S]$ は PAPP 濃度です。⁸⁾ 電圧印加時の電極表面の境界条件には、PAP 濃度 0 mol/m^3 を設定し、電極反応による PAP の消費をモデル化しました。電流値は、各電極表面における PAP 濃度 C の電極に垂直な方向の濃度勾配 dC/dz を、式 2 に従って電流密度 $i \text{ A/m}^2$ へ変換し、電極全域にわたり面積分する

ことで算出しました。⁹⁾

$$i = nFD \frac{dc}{dz} \quad \text{式 2}$$

ここで、 n は反応関与電子数 2、 D は拡散係数 $6.47 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 F はファラデー定数 96485 C/mol です。¹⁰⁾ 電極以外の底面部の境界条件は、底面に垂直な方向には PAPP、PAP 共に拡散や対流による物質移動を禁止し、底面に平行な方向には自由な物質移動が起こる設定としました。解析空間の上面および側面の境界条件は、開放境界条件(拡散種の流出時は移流のみ計算し、流入時は境界濃度が PAPP4.7 mol/m³、PAP0 mol/m³)になっています。

以上の解析モデルを使用し、マウス EB 酵素活性評価における、試料投入から電圧印加までの時間が異なる 2 つの条件における各電極電流値を計算しました。試料投入から電圧印加までの時間をそれぞれ 3 秒(条件 1)、20 秒(条件 2)とした時の計算結果を、図 7 に示します。図 7 は、マウス EB 直下の電極位置を $y=0$ として、250 μm ピッチで存在する同列 7 電極の位置を横軸、各電極の電流値を縦軸としてプロットしたグラフです。結果より、試料投入から電圧印加までの時間により、各電極の電流値はそれぞれ大きく異なることが分かりました。このため、複数個の EB を複数回に分けて測定液に投入して同時に測定する場合等、EB 投入タイミングが制御できない状況では、測定再現性が大きく低下してしまうことが示唆されます。そこで我々は、測定再現性の向上を目指した電極構造と、その使用方法を検討しましたので、次章で紹介いたします。

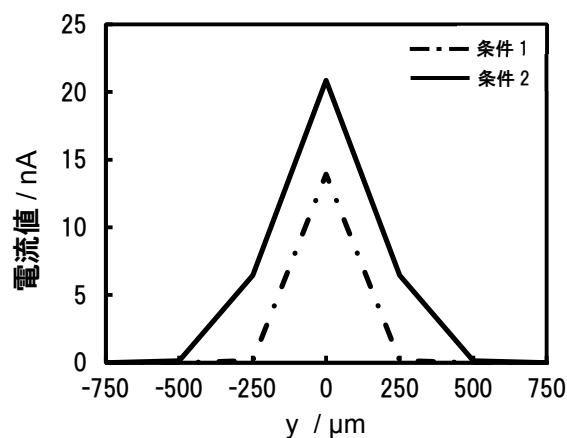


図 7. EB 投入から電圧印加までの時間を 3 秒(条件 1)、20 秒(条件 2)とした時の各電極の電流値計算結果

4.「リセット電極」による測定再現性の向上

試料投入から電極電圧印加までの時間のバラつきや、測定液の流れによる影響を無くし、測定再現性を向上させるために考案した電極構造、通称「リセット電極」の概略を図 8 に示します。リセット電極とは作用極と同極性に印加され、作用極周囲に作用極よりも大きな表面積で配置される電極であり、電解液中の広い範囲に渡って、測定対象物を測定前に反応させて消去するために使用します。以下、消去する手順をリセットと表現します。図 4 に、電極の使用方を示します。測定溶液へのマウス EB 投入から時間 A 経過後に、リセット電極および作用極に電圧を印加することで、時間 A の間に生成、拡散した PAP を消費します。このリセット操作後に全ての電極の電圧印加を中断し、改めて PAP の拡散時間を設けた後に作用極にのみ電圧を印加して電流を測定します。この方法であれば、試料投入から電圧印加までの時間が一定ではない場合でも、リセット後に電圧印加までの時間を正確に制御して測定を行うことが可能です。また、試料投入操作等による流れがあった場合でも、リセット後に液の流れが止まった状態で測定を行うことが可能です。リセット電極の測定再現性に対する効果を数値解析によって確認いたしましたので次章で紹介いたします。

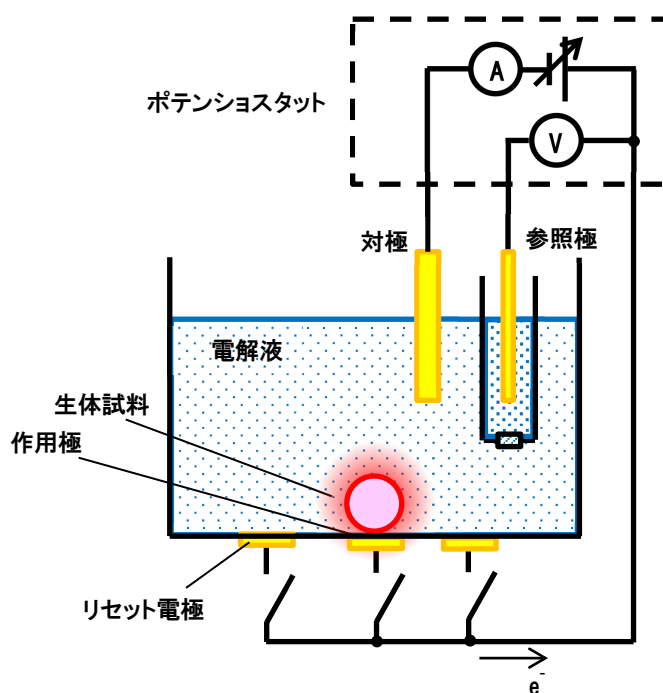


図 8. リセット電極

5. リセット電極形状の検討

まず、リセット電極として望ましい形状を示します。より効果の高いリセット電極を設計するためには作用極付近の測定対象物の消去が最も重要であると予測されることから、リセット電極は作用極に近接させて配置する必要があります。さらに測定液内全体に拡散する測定対象物をも消去し、より高い効果を得るには、測定液内に空間的に広がる電極形状が効果的であると予想されます。最もシンプルで、かつ作製も容易なリセット電極は、図 9 の(a)に示すような、チップ表面の作用極以外の部分を覆う平面状電極です。例えば直径 $40\text{ }\mu\text{m}$ の作用極に対して、同心の環状に $20\text{ }\mu\text{m}$ の隙間をあけて残りの部分をすべて電極とした構造が考えられます。また、測定液内に空間的に広がる電極構造としては、図 9 の(b)に示す 3 次元メッシュ状電極が考えられます。

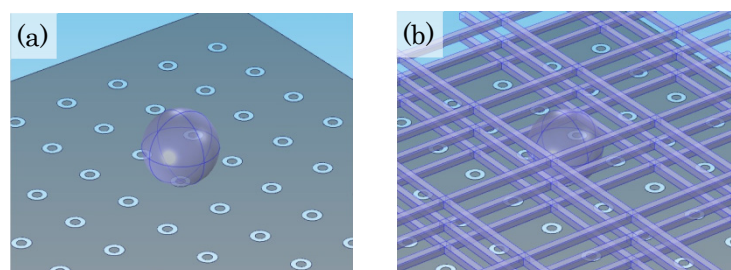


図 9. リセット電極の形状

- (a) チップ表面の作用極以外の部分を覆う平面状電極
- (b) 平面状電極と 3 次元メッシュ状電極を併用した電極

図 9 に示す 2 つの形状のリセット電極の PAP 消去効果を、図 6 の数値解析モデルを用いて検証しました。ここで 3 次元メッシュ状電極は、XY 方向に沿った 2 次元メッシュを Z 方向に $100\text{ }\mu\text{m}$ ピッチで 3 枚積層した構造としました。また、メッシュの太さは $30\text{ }\mu\text{m}$ 角、ピッチは $500\text{ }\mu\text{m}$ としました。各モデルの解析条件を図 10 に示します。リセット操作を行わない条件 1、2 では、マウス EB 投入から 3 秒、または 20 秒後に作用極に電圧印加し、電流を測定しています。リセット操作を行う条件 3、4 では、マウス EB 投入から 3 秒、または 20 秒後にリセット電極、および作用極へ電圧を 10 秒印加し、生成された PAP を消去します。印加終了後、さらに 3 秒間待機し、今度は作用極にのみ電圧を印加して電流を測定します。リセット操作を行わない条件 1、2 の間で生じる電流値の差が、追加でリセット操作を行う条件 3、4 の間で減少していれば、リセット電極の効果によって測定再現性が向上したことになります。

図 11 の(b)、(c)に、それぞれ平面状リセット電極、平面状電極と 3 次元メッシュ状電極を併用したリセット電極を含むモデル用いて行った、条件 3、4 の計算結果を示します。また比較として、図 11 の(a)にリセット電極なしのモデルを用いて行った条件 1、2 の計算結果を示します。図 11 が示すように、リセット操作を行う条件にて生じていた、試料投入から電圧印加までの時間が異なる 2 条件間における電流値の乖離が、リセット操作を行う条件にて解消されており、リセット電極が測定再現性を向上させることが分かりました。また、その効果はリセット電極の形状によって異なり、平面状電極と 3 次元メッシュ状電極を併用した構造が効果的であることが分かりました。さらに試料投入から電圧印加までの時

間が制御できない場合の他に、試料投入後の流れに対するリセット電極の効果を計算しましたので、次章に示します。

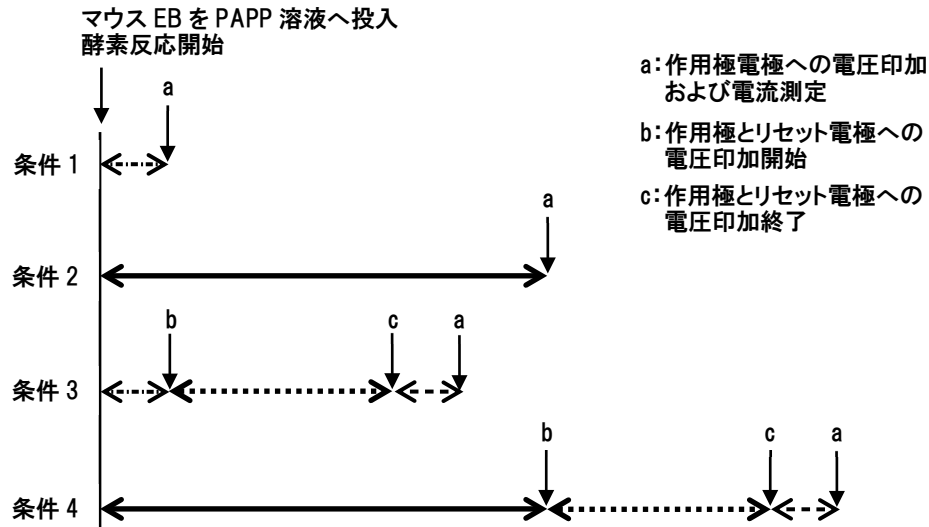


図 10. リセット操作有無の各解析条件における電圧印加、電流測定タイミング

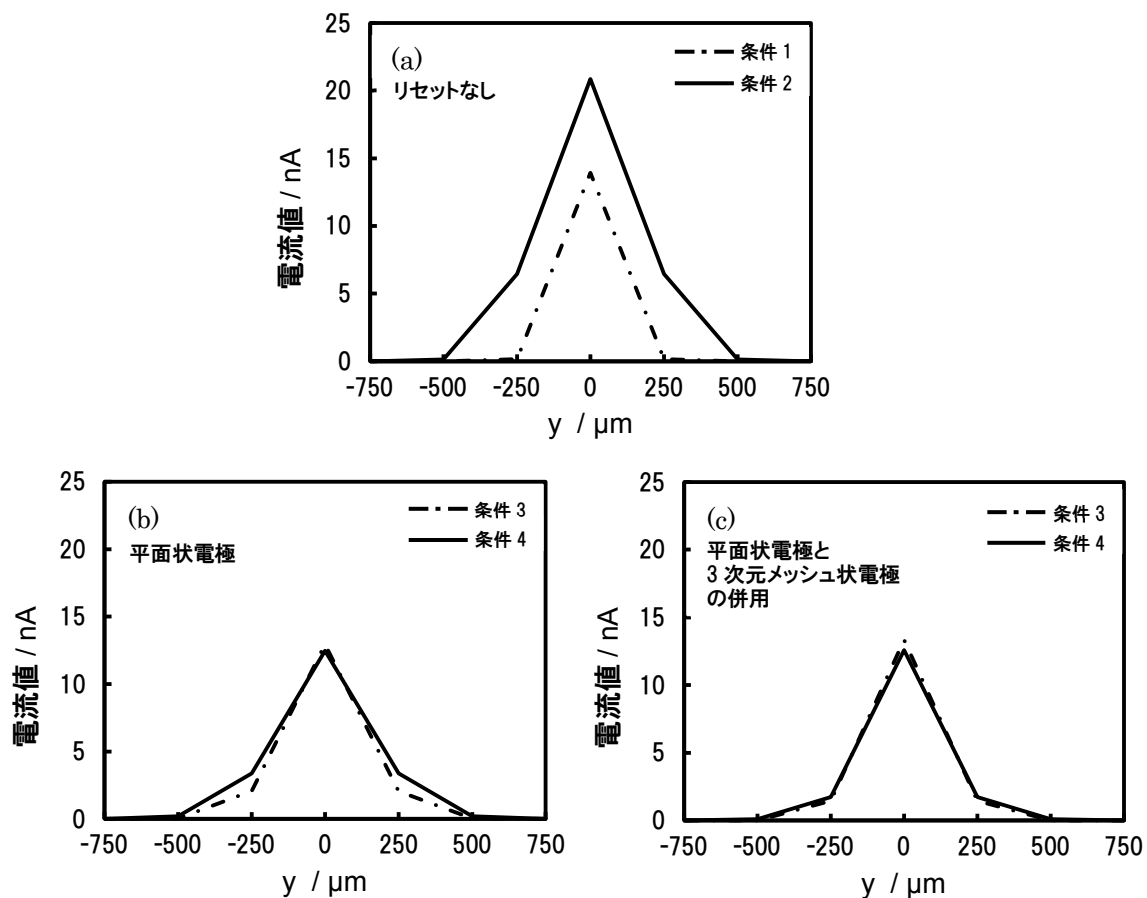


図 11. リセット操作有無の各解析条件における各電極の電流値計算結果

(a)リセットなし、(b)平面状電極、(c)平面状電極と 3 次元メッシュ状電極の併用

6. 測定液流れに対するリセット電極の効果

細胞塊の酵素活性評価において測定再現性を低下させる他の要因として、試料投入から電圧印加までの間の測定液の流れや揺れが存在します。単純な測定液の流れに対する前述のリセット電極の効果を、数値解析により検証しました。解析には、図 6 に示す解析モデルに、図 9 の(b)平面状電極と 3 次元メッシュ状電極の併用電極を追加したモデルを使用しました。各モデルの解析条件を図 12 に示します。条件 5 では、測定液内に流れがない状態で、試料投入から 10 秒後に作用極へ電圧印加し、電流を測定しています。条件 6 では、測定液内に y 軸と並行に流速 $50 \mu\text{m/s}$ の流れが存在する状態で、試料投入から 10 秒後に作用極へ電圧印加し、電流を測定しています。条件 7 では、測定液内に y 軸と並行に流速 $50 \mu\text{m/s}$ の流れが存在する状態で、試料投入から 10 秒間待機し、その後流れがない状態で 10 秒間作用極、およびリセット電極へ電圧を印加します。印加終了後、さらに 10 秒間待機し、今度は作用極にのみ電圧を印加して電流を測定します。条件 5、6、7 の計算によって得た電流値を図 13 に示します。

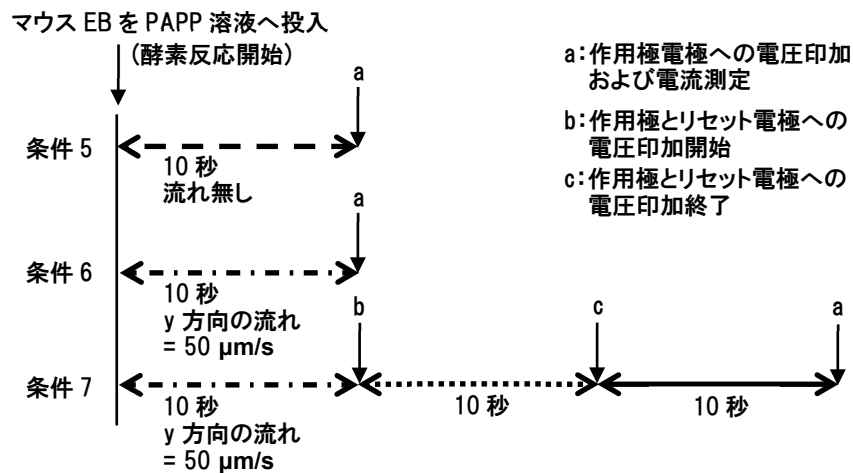


図 12. リセット操作、および流れ有無の各解析条件における電圧印加、電流測定タイミング

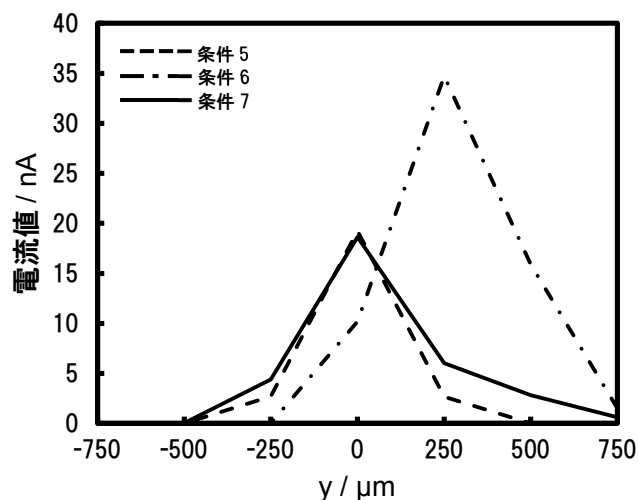


図 13. リセット操作、および流れ有無の各解析条件における各電極の電流値計算結果

図 13 ではそれぞれ、流れがない条件 5 の電流値を破線で、また、流れがある条件 6 の電流値を一点鎖線で、流れがあり、さらにリセット操作を行った条件 7 の電流値を実線で示しました。試料直下 $y=0$ の電極においては、条件 5,7 の電流値が同等の値を示していることからリセット電極の高い効果が認められるものの、流れの下流部分 $y=250, 500, 750 \mu\text{m}$ の電極においてはそれが認められず、今後リセット電極形状のさらなる改良が必要であることが分かりました。条件 5,6 および 7 の終状態における PAP 濃度の $z=0$ における 2 次元分布図と 3 次元的な等値面で表した結果を図 14 に示します。条件 5 では試料周りに球状に形成される PAP の分布は、流れのある条件 6 では完全に變形していますが、条件 7 ではリセット操作によって球状に近い形に戻されていることが分かります。

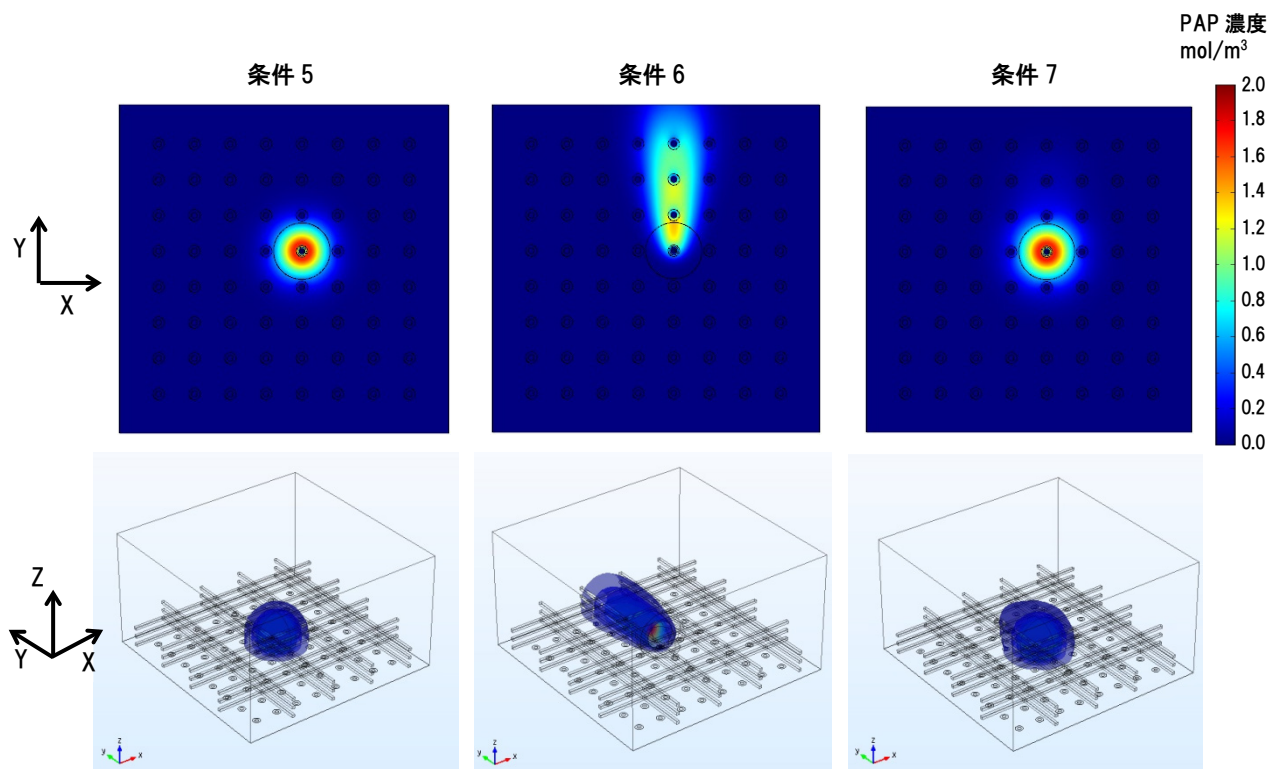


図 14. リセット操作、および流れ有無の各解析条件における PAP 濃度分布

6. まとめ

細胞塊の酵素活性評価手順における測定再現性を数値解析によって評価し、試料投入から電圧印加までの時間のバラつきや、液の流れや揺れ等による測定再現性の低下を確認し、対策のためのチップ上の独自微細構造、リセット電極の原理実証を行い、リセット電極が有効であることを見出しました。報告したリセット電極は、細胞塊の酵素活性評価のみならず、バイオ LSI による 2 次元イメージング全般に応用が可能な技術であると考えています。今後もバイオ LSI の競争力強化を目指したチップ上の微細構造等の検討を進めていく予定です。

[参考文献]

- 1) 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).
- 2) M. Şen, K. Ino, K. Y. Inoue, A. Suda, R. Kunikata, M. Matsudaira, H. Shiku and T. Matsue, Anal. Methods, **16**, 1 (2014).
- 3) H. Abe, K. Ino, C. Li, Y. Kanno, K. Y. Inoue, A. Suda, R. Kunikata, M. Matsudaira, Y. Takahashi, H. Shiku, and T. Matsue, Anal. Chem., **87**, 6364 (2015).
- 4) Y. Kanno, K. Ino, K. Y. Inoue, A. Suda, R. Kunikata, M. Matsudaira, H. Shiku, and T. Matsue, Anal. Sci., **31**, 715 (2015).
- 5) Y. Kanno, K. Ino, C. Sakamoto, K. Y. Inoue, M. Matsudaira, A. Suda, R. Kunikata, T. Ishikawa, H. Abe, H. Shiku, and T. Matsue, Biosens. Bioelectron., **77**, 709 (2016).
- 6) 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).
- 7) L. Michaelis, and M. L. Menten, Biochem Z., **49**, 333 (1913).
- 8) R. K. Morton, Biochem. J., **61**, 232 (1955).
- 9) 渡辺 正, 益田 秀樹, 金村 聖志, 渡辺 正義, 井上 晴夫, 電気化学 (丸善出版, 東京, 2001), p. 90.
- 10) S. J. Kwon, H. Yang, K. Jo and J. Kwak, Analyst, **133**, 1599 (2008).