細胞動態計測に向けたオンチップ型マイクログルコースセンサの

高性能化に関する検討

矢崎 亮^{*1} 槌谷 和義^{*2} 藤井 輝夫^{*3} 木村 啓志^{*4}

A Study on Improving an On-Chip Glucose Sensor for Cell-Based Assays

by

Ryo YAZAKI^{*1}, Kazuyoshi TSUCHIYA^{*2}, Teruo FUJII^{*3} and Hiroshi KIMURA^{*4} (Received on Mar. 31, 2016 and accepted on Jul. 7, 2016)

Abstract

In this study, we developed an on-chip glucose sensor device for cell-based assays. Glucose is the energy source of living cells, and so measurement of glucose consumption by cells is very important in cell biology. A glucose sensor integrated with a microfluidic device, which is able to measure cell kinetics continuously, has been proposed in the research field of Micro Total Analysis Systems (μ TAS). In this study, we tried to improve an on-chip glucose sensor to be integrated with microfluidic devices. In evaluating of sensor sensitivity, the flow rate dependency of the sensitivity was investigated. As a result, a stable current value was estimated to be achieved when the flow velocity exceeded 20 mm/min. An acetylcellulose layer was immobilized onto the sensor electrode for accurately measurement of the glucose concentration in the culture medium. Thus, we succeeded in obtaining a sensor with high selectivity.

Keywords: Microfluidic device, Cell-based assays, Glucose sensor, On-line measurement

1. 緒言

近年,医学や生命科学などの研究分野では,毒性試験 や薬効試験における動物実験代替法として細胞アッセイ 実験が広く行われている.特に毒性・薬効試験では,化 学物質などの外部刺激に対する細胞の応答や,増殖・分 化に伴う細胞活動の経時変化を観察することが求められ る.

従来の細胞動態計測手法として,培養皿で細胞を培養 し,その培養液を採取して解析機器で分析する方法や, 細胞に蛍光タンパク質を発現させたり蛍光染色したりし て蛍光顕微鏡で観察する方法が挙げられる.しかし,こ れらの方法は,経時的な観察に不向きであり,時間分解 能が低い.また,細胞に遺伝子発現を促したり,蛍光物 質で染色したりすることは細胞に対して侵襲的である. 詳細な細胞動態計測を実現するためには,細胞に対して 非侵襲的で,細胞動態を連続的に測定できる実験系が必 要である.

この要求を満たすために, μTAS(Micro Total Analysis Systems)の研究分野では、マイクロ流体デバイスにセン サを集積する研究が広く進められている¹⁻⁶⁾.マイクロ流 体デバイスとは、幅や高さが数十〜数百 μm の微小流路

- *3 東京大学生産技術研究所教授
- *4 工学部機械工学科准教授

や微小構造を有するもので、その利点としてサンプル量 や試薬の低減、また、様々な機能を集積化することがで きることが挙げられる.これまでに、この技術を応用し て、マイクロ流体デバイスにセンサを集積化することで、 細胞動態の連続的な測定を実現しようとする試みが進め られている.先行研究では、pH センサ¹⁾、マイクロ波セ ンサ²⁾、グルコースセンサ^{3,4)}等を集積する研究が報告さ れている.

多くの細胞は、グルコースをエネルギー源として消費 するため、グルコース消費量は、細胞の種類によらず広 く培養細胞の増殖・分化に関わる重要な指標となってい る⁷⁾.また、グルコースは糖質の一種であり、血液中や 細胞の中に単体で存在し、細胞内小器官であるミトコン ドリア内での呼吸代謝によって生命活動のエネルギー源 となる.このことから、細胞によるグルコース消費量を 計測することは、細胞の活動を知る上で重要な手段であ るといえる.

これまでに我々の研究グループでもグルコースセンサ 集積型デバイスを開発し、すでに細胞動態の測定手法を 提案している³⁾.この研究では、デバイス内で細胞を培 養しながら長期断続的な計測を実現するために、センサ を保護するための流路を設けることによって、初期感度 に比べ5割程度低下しているものの、5日間まで計測に 必要なセンサ感度を保つことに成功している.また、セ ンサの高感度化を目指して、電極形状をバンド型からく

^{*1} 工学研究科機械工学専攻修士課程

^{*2} 工学部精密工学科教授

し形にすることによって、レドックスサイクル反応によ る感度の向上を実現している.しかし、このデバイスは、 培養液中のタンパク質による電気表面や酵素膜の汚染、 物理吸着で電極に酵素を固定化しているため剥離しやす いことなどが問題点として挙げられる.さらに、培養液 中の妨害物質により、選択的なグルコースの計測が困難 である⁸⁻¹¹⁾.

これらの問題に対して、本研究では、細胞動態をオン ライン測定するために、マイクロ流体デバイス集積型グ ルコースセンサの高性能化に関する検討を実施した.具 体的には、グルコースセンサの性能を評価するためのマ イクロ流体デバイスを開発し、これを用いて酵素固定方 法、流速依存性について検討を行った.また、その結果 から得られた最適なセンサを用いて培養液のセンサ応答 の検討を行った.さらに、培養液中の妨害物質を防ぐ妨 害物質除去膜について検討を行い、センサの高性能化を 図った.本稿では上記の検討結果について報告する.

2. オンチップ型マイクログルコースセンサ

2.1 計測原理

本研究では、グルコース溶液濃度のオンライン測定を 実現するために、微小電極上にグルコース代謝酵素であ るグルコースオキシダーゼ(GOD)を固定化して得られる 三電極式電気化学バイオセンサを採用した.

本実験で使用するマイクログルコースセンサの計測原 理は下記の通りである.まず,化学反応式(1)に表され るように GOD の働きによって液中のグルコースと酸素 からグルコノラクトンと過酸化水素が生成される.

Glucose + $O_2 \xrightarrow{\text{GOD}}$ Gluconolactone + $H_2O_2 \cdots (1)$

ここで、センサ電極に 0.65 V vs. Ag/AgCl を印加する ことで過酸化水素が作用電極上で酸化され、この時に発 生する酸化還元電流値を測定することによって、グルコ ース濃度を定量的に計測することができる.



Fig.1 Configuration and measurement principle of the glucose sensor. (a) top view of the sensor electrodes, (b) cross sectional view of the working electrode.

2.2 センサの構成と作製方法

本研究で開発したオンチップ型マイクログルコースセ

ンサは Fig. 1 に示すように、白金の対極と作用電極、銀/ 塩化銀の参照電極の3つの電極で構成された.各電極の 幅は250 µm,対極と作用電極の間隔は50 µm とした.ま た,作用電極に酵素膜を固定する際に、参照電極に酵素 膜が接触しないようにするために作用電極と参照電極の 間隔は2 mm とした.

電極基板の作製手順を Fig. 2(a)に示す. 電極基板の作 製は, 超音波洗浄したガラス基板にスパッタリング装置 により中間層としてチタンを 10 nm 厚で成膜し, その後, 白金を 100 nm 厚で成膜した. この白金基板上に, 感光 性樹脂であるポジティブフォトレジスト(S1813G2, SHIPLEY)をスピンコータ(MS-A100, ミカサ)によって成 膜し, 電極形状のフォトマスクを重ねて UV 露光した. その後, 現像液 (AZ Developer, AZ Electronic Materials) を使って現像する. その後, 150 ℃の王水に浸して白金 をエッチングし, 150 ℃の熱リン酸(32187-00, 関東化学) によってチタンをエッチングして, 最終的に不要なレジ ストをアセトンで除去することで電極パターンを得た. その後, 製作した電極の参照電極部分に Ag/AgClペース ト(011464, BAS)を成膜し, 24 時間乾燥させた. 作用電 極には,後述の方法で酵素を固定化した.

本研究では、培養液中のグルコース溶液濃度のオンラ イン計測を想定して、微小流路を形成したポリジメチル シロキサン(PDMS, SILPOT 184、東レ・ダウコーニング) 製のチップとセンサを組み合わせたセンサデバイスを作 製して、マイクログルコースセンサの評価を実施した. 微小流路は、流路高さ 100 µm,流路幅 500 µm とした. 流路には、インレットとアウトレットを設け、シリコー ンチューブによってシリンジポンプと接続することでグ ルコース溶液を送液できる構造にした.

PDMS チップは, Fig. 2(b)に示すとおり, 電極基板と同様に,洗浄したガラス基板に感光性樹脂であるネガティブフォトレジスト(SU-8,日本化薬)をスピンコートによって成膜し,流路形状のフォトマスクを重ねて UV 露光した.その後,現像することによって鋳型を得た.この鋳型に PDMS を流し込み,75 ℃で2時間ベイクして固化させた PDMS を鋳型から剥離することによって流路構造が形成された PDMS チップを作製した.最後に,電極基板と PDMS チップを酸素プラズマボンディングによって貼り合わせることでセンサデバイスを完成させた (Fig. 2(c)).

3. センサの高性能化に関する検討

3.1 酵素固定方法に関する検討

オンチップ型マイクログルコースセンサの高性能化に 向けて,まず,酵素固定方法に関する検討を行った.セ ンサの電極部分に酵素を固定する方法として,物理吸着 法,架橋法,包括法などがある¹²⁾.本実験では,物理吸 着法と架橋法によるセンサ感度の比較を行った. 物理吸着法では,イオン選択性のあるナフィオン(527084, シグマアルドリッチ)を使用して作用電極上に GOD を固 定化した.まず,リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で調製した



ナフィオン溶液に 6 U/mL となるように GOD(G7141, シ グマアルドリッチ)を混合した.この混合液を電極上に滴 下し,乾燥させて酵素を固定化した.一方,架橋法では, 電極上に自己組織化させたシスタミン(C121509, シグマ アルドリッチ)とグルタルアルデヒド(17026-32, 関東化 学)を共有結合させ,その後グルタルアルデヒドと GOD を架橋することで固定化した^{13,14)}.

本実験では、物理吸着法と架橋法によって酵素をそれ ぞれ固定化したセンサの感度の比較を実施した. PBS で 調製したグルコース溶液(2~8 mM)をデバイスのインレ ットから流速 33 mm/min で送液し、印加電圧 0.65 V とし た時の応答電流値を測定した.

本実験で,酵素固定方法の異なるセンサから得られた 応答電流値を Fig. 3 に示す.また, Fig.3 のグラフから求 められたセンサ感度および分解能を Table 1 に示す.この 結果から,物理吸着法より架橋法の方が溶液濃度に対す る応答電流値および感度が高くなることが明らかとなっ た.このような結果となった理由は,物理吸着法と比し て架橋法の方が,酵素溶液の仕込み量に対して実際の酵 素固定化量が多くなっているためであると考えられる.



- Fig.3 Comparison of the output current value of the glucose sensors made by the different enzyme immobilization methods.
- Table 1 Comparison of the sensitivity of the glucose sensors

 made by the different enzyme immobilization

3.2 流速依存性に関する検討

センサデバイスを用いて細胞動態観察をする際,溶液の流速によって得られるデータに差異が生じると考えられる.本実験では,センサの流速依存性について検討した.実験条件として,電極面積 0.13 µm²,酵素量 6 U/mLのセンサデバイスを用いて検討を行った.流速を 2,20,200 mm/min にそれぞれ変化させて,PBS で調製したグルコース溶液(8 mM)を送液した.

Fig.2 Fabrication process of the sensor device. (a) fabrication procedure of the electrode substrate, (b) fabrication procedure of the PDMS chip, (c) the fabricated on-chip glucose sensor device

(Pt)

Counter Working Reference

electrode electrode electrode

(Pt)

(Ag/AgCl)

Inlet

5 mm

本実験で得られた結果を Fig. 4 に示す. このグラフは, 時間に対する応答電流値の変化を表している. グラフか ら,流速 2 mm/min の時,応答電流値が不安定になって いることがわかる. これは低流速になるとセンサの周囲 で局所的にグルコースが消費されたことによって,セン サ上の反応が安定しなくなることが原因であると考えら れる.よって,細胞動態を観察する際,流速を 20 mm/min 以上に設定することで安定した応答電流値を得られるこ とが示唆された. この結果から,以降の実験で比較的応 答電流値が安定で出力も高い流速 20 mm/min に設定して 実験を行った.



Fig.4 Change in the current value by the flow velocity.

3.3 酵素量に関する検討

GOD の反応によって生成される過酸化水素の量は,液 中のグルコース濃度だけではなく,GOD 量によっても増 加すると考えられる.本実験では,3.1 節で高感度化が 見込めた架橋法を用いて,固定化する GOD 量を変化さ せてセンサの高感度化に関する検討を実施した.

本実験では,架橋法によって仕込み量6,30,60,120 U/mLのGOD溶液を用いて酵素を固定化したセンサデバ イスを用意した.サンプル溶液は PBS で調製した Glucose(2~8 mM)を流速20 mm/minで送液し,印加電圧 は0.65 V とした.

本実験で得られた酵素量の違いによる応答電流値の変 化のグラフを Fig. 5 に示す.また,グラフから求めた感 度および分解能を Table 2 に示す.この結果から,仕込み 量 60 U/mL までは,GOD 量が増えるにつれて感度およ び分解能が高くなることがわかった.これは,固定化さ れる GOD 量が増えることで,GOD の作用によって生成 される過酸化水素の量が増加したためと考えられる.一 方,GOD の仕込み量 120 U/mL で 60 U/mL との差違が見 られなかったことについては,電極の表面積に対して, 架橋法によって固定化できる酵素量が 60 U/mL 付近で頭 打ちとなっていた可能性が考えられる.以上の結果から, GOD 仕込み量 60 U/mL の酵素溶液を用いて以降の実験 を実施した.



Fig.5 Comparison of output current value of the glucose sensors with different amount of GOD.

different amount of GOD.		
GOD	Sensitivity	Resolution
(U/mL)	(nA/mM)	(µM)
6	0.91±0.30	291.7±163.9
30	1.05 ± 0.61	204.2±169.0
60	3.93±1.98	32.0±25.5
120	4.79±2.72	38.8±39.3

Table 2 Comparison of the sensitivity of glucose sensors with

3.4 培養液に対するセンサ応答の検討

本実験では,培養液中のグルコース濃度検出に向けて, 培養液を送液した際のセンサ応答の検討を実施した. ここでは, 仕込み量 60 U/mL の GOD 溶液を用いて架橋 法によって作製したセンサを使用した.印加電圧は 0.65 V とし, いずれもグルコースを含まない PBS と Dulbeccos'Modified Eagle Medium (DMEM Glucose 不含) を送液した時の応答電流値を測定した.

本実験で得られた応答電流値のグラフを Fig. 6 に示す. この結果から, DMEM の方が PBS より応答電流値が高 いことがわかる. いずれもグルコースを含まないサンプ ル溶液にもかかわらず, 応答電流値に差が生じているこ とから, DMEM に含まれる物質が電極上で反応してしま い電流値が高くなったと考えられる. このことから, 培 養液中のグルコースを正確に計測するためには, 妨害物 質を防ぐ必要があることが示唆された.



Fig.6 Comparison of output current value of the glucose sensors by sample solutions without glucose.

3.5 妨害物質除去膜に関する検討

本実験では、培養液中に含まれる妨害物質を防ぐため に,除去膜の機能評価を行った.培養液中の妨害物質は ビタミン類や尿酸等が挙げられる.本実験では,妨害物 質除去膜としてナフィオンと酢酸セルロースを用いた. イオン選択性のあるナフィオンは静電的反発作用により, アニオン性の尿酸等の影響を取り除くことができる.ま た、酢酸セルロースは、多孔質膜により分子サイズの小 さい過酸化水素との区別化を図ることができる.本実験 で用いた酵素膜の構成を Fig.7 に示す.酵素膜は接着層, 妨害物質除去層,酵素固定化層の三層構造となっている. 接着層は妨害物質除去層を電極上に接着させる役割があ り,妨害物質除去層は,妨害物質を防ぎ GOD の作用に より生成された過酸化水素を選択的に透過させる役割を 持つ.酵素固定化層は、GODをグルタルアルデヒドによ って架橋することにより固定化させる.酵素膜の作製は, スピンコータを用いてアミノシラン(408701,信越化学), 酢酸セルロース(039-01695, 和光純薬工業), ナフィオン, グルタルアルデヒド, 仕込み量 60 U/mL GOD 溶液の順に 3000 rpm で 30 秒間回転させて平滑に成膜した. その後 24 h 冷蔵乾燥させて酵素膜を形成した^{15,16)}.

本実験では、除去膜の機能を評価するために、酢酸セ ルロース膜の有無によるセンサ応答の比較を実施した. サンプル溶液は、グルコース濃度を PBS で調製した溶液 と DMEM Glucose 不含で調製した溶液とした. グルコー スの濃度は、細胞動態計測時に用いる培養液の濃度であ る 5.6 mM と 25 mM に調製した.印加電圧は 0.65 V とし、 それぞれの条件における応答電流値を計測した.

本実験で得られた酢酸セルロース膜の有無によるセン サ応答の結果を Fig. 8 に示す. Fig. 8(a)の結果から酢酸セ ルロース膜なしの場合には、PBS グルコース溶液より、 DMEM グルコース溶液の応答電流値のベースラインが 高くなっていることがわかる.一方、Fig. 8(b)に示すと おり、酢酸セルロース膜ありの場合には、いずれの溶液 においても同様の応答電流値を示した.これは、酢酸セ ルロースの妨害物質ブロッキング効果によるものである と考えられる.以上の結果から、センサ電極上に酢酸セ ルロース膜を成膜することによって、妨害物質を防ぎ、 培養液中のグルコースのみを計測することができるセン サを確立することが可能であることが明らかとなった.



Fig. 7 Configuration of the enzyme membrane.





(b) With acetylcellulose layer



Fig. 8 Comparison of output current value of the glucose sensors. (a) without / (b) with acetylcellulose layer on the electrodes.

4. 細胞動態計測に向けたセンサ性能の考察

本研究では、オンチップ型マイクログルコースセンサ の高性能化の検討として、酵素固定化方法、酵素量、流 速依存性,妨害物質除去膜など多角的に検討を実施した. この結果、本研究で最終的に得られたセンサの性能は、 感度 0.45 µA·cm⁻²/mM,分解能 4.11 mM であった.

マイクロ流体デバイスに集積するグルコースセンサに 求められる性能は、培養細胞のグルコース濃度変化量 (*D_{cells}*, **M**)を求めることによって決定できる. グルコース センサは、この式(2)から求められるグルコース変化量以 下の分解能が細胞動態を計測時に必要な性能となる.

$$D_{cells} = \frac{GCR \cdot t \cdot N}{C_{chamber}} \cdot \cdot \cdot (2)$$

ここで, *GCR* は細胞によるグルコース代謝率 (mol/s/cells), *t* は培養液が細胞培養部を通過する時間(s), *N* は総細胞数(cells), *C_{chamber}* は容積(L)である³⁾.

動態計測の対象としてヒト肝癌由来細胞(HepG2)を例 に,検討してみる.HepG2のグルコース代謝率は4.1×10⁻¹⁶ mol/s/cells である¹⁷⁾.本研究で想定しているデバイス内 の細胞培養部の面積は,0.49 cm²,容積は19.6 μL である. 細胞密度を 2×10^5 cells/cm², 流量を 1 µL/min とすると, 総細胞数は 0.98×10^5 cells, 培養液が細胞培養部に通過す る時間は 1.18 s である. この時の, グルコース変化量は 約 2.41 mM となる.本デバイスで必要なグルコースセン サの性能は,この変化量以下の分解能が求められる.本 実験で得られた分解能は 4.11 mM なので,要求仕様を満 たすことができなかった.この問題を解決するためには, 電極形状の変更や,電極面積の増加をすることでさらな る高感度,高分解能化が必要であると言える.

5. 結言

本研究では,細胞動態計測に向けたオンチップ型グル コースセンサの検討として,センサの高性能化の検討を 行った.センサ感度の検討では,20 mm/min以上の流速 でサンプル溶液を送液することで安定した応答電流値が 得られることがわかった.また,センサ電極上に酢酸セ ルロース膜を成膜することで,培養液中に含まれる妨害 物質を防ぎ,グルコース濃度の変化のみを検出できるセ ンサを確立することができた.

今後の展開として、電極上に妨害物質除去膜を成膜し たことによってセンサ感度が低下してしまったことから、 さらなる高感度化を目指す必要がある.具体的な方法と して、電極をくし形形状にし、レドックスサイクル反応 を利用することで高感度化が見込める.また、長期間の 細胞動態のオンライン計測を実施するためにはセンサ寿 命についても検討する必要がある.最終的には、デバイ ス内で細胞を培養し、薬物投与に対する詳細な細胞の動 態変化を捉えられるセンサデバイスの確立を目指す.

謝辞

本研究は、JST-CREST、および私立大学戦略的研究基 盤形成支援事業の支援を受けて実施されたものである.

参考文献

- I. Burdallo, C. Jimenez-Jorquera : Microelectrodes for the measurement of cellular metabolism, Procedia Chemistry, 1, pp.289-292 (2009).
- M. Nikolic-Jaric, S. F. Romanuik, G. A. Ferrier, G.E. Bridges, M. Butler, K. Sunley, D. J. Thomason, M. R.Freeman : Microwave frequency sensor for detectio n of biological cells in microfluidic channels, BIOMICROFLUIDIC, 3, pp.034103-1-034103-15 (2009).
- H. Kimura, Y. Shono, N. Pereira-Rodrigues, T. Yamamoto, Y. Sakai, T. Fujii : On-chip Glucose Sensor for Online Measurement of Cell Activities, The Institute of Electrical Engineers of Japan, 130, pp.476-483 (2010).

- N. Pereira Rodrigues, Y. Sakai, T. Fujii : Cell-based microfluidic biochip for the electrochemical real-time monitoring of glucose and oxygen, Sensors and Actuators B, 132, pp.608-613 (2008).
- S. M. Grist, L. Chrostowski, K. C. Cheung : Optical Oxygen Sensors for Applications in Microfluidic Cell Culture, SENSORS, 10, pp.9286-9316 (2010).
- S. C. Chang, N. Pereira-Rodrigues, J. R. Henderson, A. Cole, F. Bedioui, C. J. McNeil : An electrochemical sensor array system for the direct, simultaneous in vitro monitoring of nitric oxide and superoxide production by cultured cells, Biosensors and Bioelectronics, 21, pp.917-922 (2005).
- 7) 長野敬:細胞のしくみ、日本実業出版社 (1998).
- 水谷文雄:酵素薄膜修飾電極のセンサーへの応用, 分析化学,48,pp.809-822 (1999).
- 9) 安川智之,前川英治,水谷文雄:酸素及び過酸化水素のポリジメチルシロキサン膜透過性を利用するアンペロメトリックグルコースセンサー,分析化学, 58, pp.639-644 (2009).
- 10) Y. Himuro, M. Takai, K. Ishihara : Poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) mediator as immobilized enzyme membrane for the fabrication of amperometric glucose sensor, Sensors and Actuators B, 136, pp.122-127 (2009).
- 11) 高井まどか,新橋里美,小川洋輝,長井政雄,石原一 彦,堀池靖治:多項目同時測定ヘルスケアチップ用 マイクログルコースセンサーの創製,高分子論文集, 61, pp.555-560 (2004).
- 12) 軽部征夫:バイオセンサ,シーエムシー出版 (1987).
- 13) 山本英毅,中西直之,槌谷和義,上辻靖智,仲町英治:圧電ポンプ駆動携帯型医療デバイスの開発,日本機械学会 情報・知能・精密機器部門講演会講演 論文集,5, pp.66-71 (2005).
- 14) 水流直文, 槌谷和義:2 電極法を用いたグルコース 計測における酵素センサの開発, 精密工学会春大会 学術講演会講演論文集, pp.587-588 (2010).
- 15) T. Matsumoto, M. Furusawa, H.Fujiwara, Y. Matsumoto, N. Ito : A micro-planar amperometric glucose sensor unsusceptible to interference species, Sensors and Actuators B, 49, pp.68-72 (1998).
- 16) D.Staneva, I. Grabchev, L. Yotova, R. Betcheva : New Glucose Oxidase-Pamam Conjugate as Fluorescent Biosensor Matrix in Acetylcellulose Membrane, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 48, pp.228-233 (2013).
- 17) 吉田知水、白樫了、高野清、C. Provin、酒井康行,藤井 輝夫:HepG2 細胞のエネルギー代謝率の定常測定、 日本機械学会熱工学カンファレンス 2007 講演論文 集,pp.391-392 (2007).