

一般セッション(ポスター講演) | 12 有機分子・バイオエレクトロニクス: 12.7 医用工学・バイオチップ

2025年3月15日(土) 9:30 ~ 11:30 血 P05 (森戸記念体育館)

**[15a-P05-1~26] 12.7 医用工学・バイオチップ**

[15a-P05-1]

Nerve-on-a-Chipデバイスを用いた感覚神経温度応答の再現

○酒井 洸児<sup>1,2</sup>、田中 雄次郎<sup>2,3</sup>、高橋 陸<sup>1,2</sup>、後藤 東一郎<sup>1,2</sup>、水野 陽介<sup>1,2</sup>、田中 あや<sup>1,2</sup> (1.NTT 物性研、2.NTT BMC、3.NTT 先デ研)

[15a-P05-2]

マイクロ流体デバイスで培養した神経細胞の高倍率イメージング

○齋藤 新<sup>1,4</sup>、山本 英明<sup>1,2,3,4</sup>、室田 白馬<sup>1,3</sup>、佐藤 茂雄<sup>1,2,3</sup>、平野 愛弓<sup>1,2,3,4</sup> (1.東北大通研、2.東北大工、3.東北大院工、4.東北大AIMR)

[15a-P05-3]

サブストレイトの違いによるリアルタイムフィードバック機構を用いた機械刺激への拍動応答の変化

○水谷 ありさ<sup>1</sup>、金指 響太郎<sup>1</sup>、長井 新<sup>1</sup>、守山 裕大<sup>1,2</sup>、三井 敏之<sup>1</sup> (1.青学大理工、2.JST さきがけ)

[15a-P05-4]

PDMSによる一次元溝構造内の線維芽細胞と心筋細胞の走化性

○桑原 宙歩<sup>1</sup>、岩間 友音<sup>1</sup>、長井 新<sup>1</sup>、守山 裕大<sup>1,2</sup>、三井 敏之<sup>1</sup> (1.青学大理工、2.JST さきがけ)

[15a-P05-5]

原子間力顕微鏡による腱組織スライスの力学測定

○熊谷 羽留<sup>1</sup>、中道 亮<sup>2</sup>、北林 ひかる<sup>2</sup>、岡嶋 孝治<sup>1</sup> (1.北大情報科学、2.岡大病院整外)

[15a-P05-6]

薄膜型マイクロ流体デバイスを用いたヒトiPS細胞由来大脳皮質神経細胞のパターン培養

○(DC)酒井原 一守<sup>1,2</sup>、山本 英明<sup>1,2,3</sup>、西村 周泰<sup>5</sup>、遠藤 壮太<sup>1,2</sup>、金野 智浩<sup>4</sup>、佐藤 茂雄<sup>1,2</sup>、正水 芳人<sup>5</sup>、平野 愛弓<sup>1,2,3</sup> (1.東北大院工、2.東北大通研、3.東北大AIMR、4.東北大院薬、5.同志社大院脳)

[15a-P05-7]

マイクロ切り紙足場による細胞牽引力の誘導と自発的三次元形状構築

○金 楊<sup>1</sup>、秋田谷 美乃<sup>2</sup>、丸山 央峰<sup>1,2</sup>、星野 隆行<sup>1,2</sup> (1.名大工、2.名大院工)

[15a-P05-8]

電気化学インピーダンス法による植物のダイレクトセンシングと機械学習による検出

○吉永 博紀<sup>1</sup>、篠田 倫太郎<sup>1</sup>、杉山 睦<sup>1,2</sup> (1.東理大 創域理工、2.東理大 総研)

[15a-P05-9]

機械学習を用いた植物の温度ストレス検知に向けた電気化学インピーダンス特性の検討

○梅本 遥介<sup>1</sup>、篠田 倫太郎<sup>1</sup>、浅野 颯太<sup>1</sup>、杉山 睦<sup>1,2</sup> (1.東理大 創域理工、2.東理大 総研)

[15a-P05-10]

多点LEDプローブ・多点皮質脳波電極シートを活用した神経活動の局所的介入と多点計測系の構築

○山田 晃大<sup>1</sup>、引間 卓弥<sup>2</sup>、奥井 歩夢<sup>1</sup>、濱高 靖浩<sup>1</sup>、西川 敦<sup>3</sup>、Loesing Alexander<sup>3</sup>、大川 宜昭<sup>2</sup>、関口 寛人<sup>1</sup> (1.豊橋技大、2.獨協医大、3.ALLOS)

[15a-P05-11]

カーボンナノチューブ電極を用いるカテコールアミン系薬剤の電気化学分析

○(B)周代佳<sup>1</sup>、門脇愛唯<sup>1</sup>、六車仁志<sup>1</sup> (1.順大医療科学)

[15a-P05-12]

腎機能マーカーを検出するためのFET型バイオセンサーの作製と評価

○(M1C)日後太一<sup>1</sup>、山名一生<sup>1</sup>、広藤裕一<sup>1</sup>、廣芝伸哉<sup>1</sup>、小池一步<sup>1</sup> (1.大工大ナノ材研センタ)

◆ 英語発表

[15a-P05-13]

Surface plasmon resonance-enhanced photoelectrochemical flexible sensor using PEDOT:PSS thin film/nanostructured Au

○(D)Charin Seesomdee<sup>1</sup>, Sachiko Jonai<sup>1</sup>, Kazunari Shinbo<sup>1</sup>, Akira Baba<sup>1</sup> (1.Niigata Univ.)

[15a-P05-14]

構造認識蛍光分子を活用した高感度遺伝子検出法へのアプローチ

○堀米晶貴<sup>1</sup>、美坂玲壮<sup>1</sup>、武井史恵<sup>1</sup> (1.防衛医大医学教育部)

[15a-P05-15]

迅速・高感度核酸同定に向けたCRISPR/Cas12固定化マイクロ流路の開発

○繁森弘基<sup>1</sup>、藤田聡史<sup>1</sup>、民谷栄一<sup>1,2</sup>、永井秀典<sup>1</sup> (1.産総研、2.阪大産研)

[15a-P05-16]

電位差測定による低分子ホルモンバイオセンサの開発

○小柳彰良<sup>1</sup>、呉海云<sup>1</sup>、遠藤英明<sup>1</sup>、張民芳<sup>2</sup>、丸山由貴<sup>3</sup>、大貫等<sup>1</sup> (1.海洋大、2.産総研、3.ライオン(株))

[15a-P05-17]

酸化カーボンナノチューブ固定化ろ紙電極による抵抗測定バイオセンサの開発

○川原健慎<sup>1</sup>、柴田恭幸<sup>1</sup>、張民芳<sup>2</sup>、呉海云<sup>1</sup>、遠藤英明<sup>1</sup>、丸山由貴<sup>3</sup>、大貫等<sup>1</sup> (1.東京海洋大、2.産総研、3.ライオン(株))

[15a-P05-18]

ox-CNTろ紙電極によるコルチゾールバイオセンサの開発

○松本歩樹<sup>1</sup>、柴田恭幸<sup>1</sup>、張民芳<sup>2</sup>、呉海云<sup>1</sup>、遠藤英明<sup>1</sup>、大貫等<sup>1</sup> (1.東京海洋大、2.産総研)

[15a-P05-19]

複数流路式表面プラズモンセンサによる生体サンプルの安定的な測定

○(M1)長房遼河<sup>1</sup>、當麻浩司<sup>1</sup> (1.芝浦工大)

[15a-P05-20]

単一細胞の誘電特性測定を目的とした周波数スイープ絶縁体ベース誘電泳動

○(B)濱野智至<sup>1</sup>、江口正徳<sup>2</sup> (1.呉高専、2.佐賀大シンクロトロン)

[15a-P05-21]

抗原抗体反応を用いたメラトニンセンサの開発 II

○岡泉飛勇<sup>1</sup>、柴田恭幸<sup>1</sup>、呉海云<sup>1</sup>、遠藤英明<sup>1</sup>、大貫等<sup>1</sup> (1.東京海洋大学)

[15a-P05-22]

LAPS用K<sup>+</sup>選択性PVC膜の中間層としてのODTS SAM○松本晏奈<sup>1</sup>、浩一郎宮本<sup>2</sup>、達夫吉信<sup>2</sup>、CarlFrederik Werner<sup>1</sup> (1.京工織大工芸、2.東北大)

[15a-P05-23]

排泄ケアが必要な方の便失禁をガスセンサで検出するためのにおい成分

○鈴木 譽久<sup>1</sup>、窪田 泰江<sup>2</sup> (1.新東工業、2.名市大)

---

[15a-P05-24]

放屁情報から生体情報を推測するためのセンサシステムの開発

○鈴木 譽久<sup>1</sup>、井伊 卓真<sup>2</sup>、田辺 茂雄<sup>2</sup>、大高 洋平<sup>2</sup> (1.新東工業、2.藤田医大)

---

[15a-P05-25]

パリレンで被覆したイオン液体ゲートグラフェン電界効果トランジスタを用いた硝酸態窒素ガスセンシング

○(M2)今泉 陵<sup>1</sup>、白石 直規<sup>2</sup>、魯 健<sup>3</sup>、木村 睦<sup>1</sup> (1.信大繊維、2.農研機構、3.産総研)

---

[15a-P05-26]

イオン電流によるマイクロミキサーの評価法の開発

○梁 逸偉<sup>1</sup>、金子 知輝<sup>1</sup>、加地 範匡<sup>1</sup> (1.九大院工)

---

## Nerve-on-a-Chip デバイスを用いた感覚神経温度応答の再現 Replication of Thermal Response in Sensory Neurons Using a Nerve-on-a-Chip Device

NTT 物性研<sup>1</sup>, NTT BMC<sup>2</sup>, NTT 先デ研<sup>3</sup>

○酒井 洸児<sup>1,2</sup>, 田中 雄次郎<sup>2,3</sup>, 高橋 陸<sup>1,2</sup>, 後藤 東一郎<sup>1,2</sup>, 水野 陽介<sup>1,2</sup>, 田中 あや<sup>1,2</sup>

NTT BRL<sup>1</sup>, NTT BMC<sup>2</sup>, NTT DTL<sup>3</sup>

○Koji Sakai<sup>1,2</sup>, Yujiro Tanaka<sup>2,3</sup>, Riku Takahashi<sup>1,2</sup>, Toichiro Goto<sup>1,2</sup>, Yosuke Mizuno<sup>1,2</sup>, Aya Tanaka<sup>1,2</sup>

E-mail: ko.sakai@ntt.com

【緒言】温度感覚は、生物が生存するために不可欠な機能であり、その基盤となる感覚神経における温度受容と信号伝達の仕組みは古くから研究されてきた。分子・細胞レベルでの温度応答メカニズムの解明には培養細胞を用いたモデルを用いた研究が適するが、実際の身体内で起きるような局所的かつ短時間での温度応答を培養系に再現するのは難しい。そこで本研究では、発熱素子、微小電極アレイ、および微小流路を統合した Nerve-on-a-Chip デバイスを作製することで、感覚神経軸索の局所的な温度応答性とその伝達過程を可視化することを目指した。

【実験・考察】身体内の感覚神経線維が温度変化にตอบสนองする過程を模倣してデバイスをデザインした(Fig.1a,b)。PDMS 製の微小流路により培養神経細胞の軸索を誘導した後、末端側に設置した発熱素子において熱を発生させ、温度変化により誘発された活動電位を微小流路内に配置した計測電極から計測した。発熱素子および計測電極は、光熱変換効率と導電性、生体適合性に優れたグラフェンフレークのスピコート薄膜を加工することで作製した。発熱素子へ波長 785 nm のレーザーを持続的に照射し、サーモカメラを用いて温度上昇を評価したところ、40 mW で 5°C 以上の上昇が見られた。温度感受性チャンネルの開口閾値が 43°C のため、37°C の培養環境下では十分に活動電位を誘発できる。実際に感覚神経細胞を培養し、持続照射レーザーの強度を徐々に増大したところ、約 40 mW を閾値として活動電位が誘発された。微小流路の各計測電極からは、時間遅れを伴って活動電位が計測され、その伝播方向が生体内と同様に軸索の伸長方向とは逆であることが確認された(Fig.1c)。さらに、秒単位の短時間の温度上昇により活動頻度の減少する現象が、刺激を印加した軸索の一部のみに観測された。以上より、本デバイスを用いて、感覚神経の局所的かつ短時間での温度応答と信号伝達の過程を培養系に再現できることが示された。

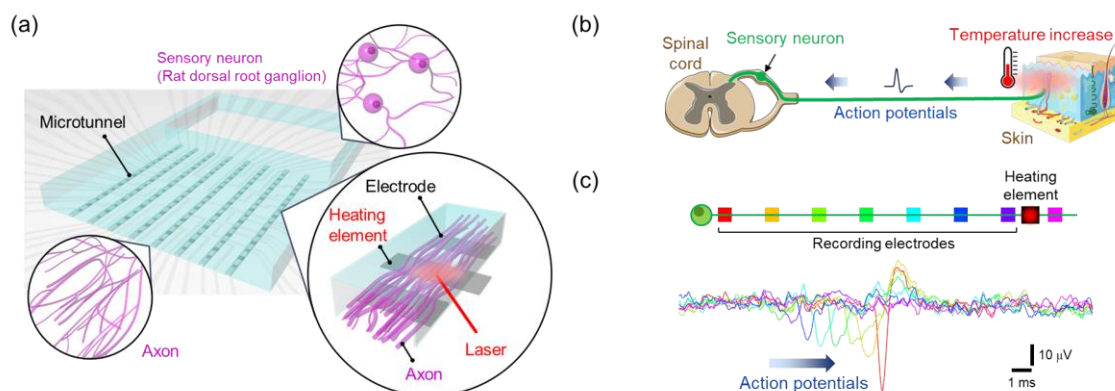


Fig.1 Schematics of Nerve-on-a-Chip device (a), sensory neural circuit for thermal sensation (b), and evoked action potential propagation by photothermal stimulation (c).

# マイクロ流体デバイスで培養した神経細胞の高倍率イメージング

## High-magnification imaging of nerve cells cultured in microfluidic devices

東北大通研<sup>1</sup>, 東北大工<sup>2</sup>, 東北大院工<sup>3</sup>, 東北大 AIMR<sup>4</sup>

○ 齋藤 新<sup>1,2</sup>, 山本 英明<sup>1-4</sup>, 室田 白馬<sup>1,3</sup>, 佐藤 茂雄<sup>1-3</sup>, 平野 愛弓<sup>1-4</sup>

RIEC<sup>1</sup>, Sch. Eng.<sup>2</sup>, Grad. Sch. Eng.<sup>3</sup>, AIMR<sup>4</sup>, Tohoku Univ.

○ A. Saito<sup>1</sup>, H. Yamamoto<sup>1-4</sup>, H. Murota<sup>1,3</sup>, S. Sato<sup>1-3</sup>, A. Hirano-Iwata<sup>1-4</sup>

E-mail: saito.arata.q4@dc.tohoku.ac.jp

**【背景・目的】** 脳における可塑性とは、シナプス結合の伝達効率や神経細胞の興奮特性が持続的に変化する性質を指し、これによって脳は学習や記憶などの機能を実装していると考えられている。シナプス可塑性の例として、スパイクタイミング依存可塑性 (Bi et al., J. Neurosci., 1998) や長期増強 (Bliss et al., J. Physiol., 1973), さらには恒常性可塑性 (Turrigiano et al., Nat. Rev. Neurosci., 2004) などが知られている。これらの多くは初代神経細胞の分散培養系で発見されてきたが、最近では、マイクロ流体デバイスで培養した神経細胞を用いて生体脳でみられる回路結合を再現し、そこで可塑性を調べた研究も報告されている (Murota et al., Adv. Mater. Technol., 2024)。これらの研究では、繰り返し刺激などに応じて起こる可塑性を自発活動や刺激応答などの活動パターンに基づいて調べてきたが、シナプスでは樹状突起スパインなどの微細構造が可塑的に変化することも知られている。そこで本研究では、初代培養細胞に緑色蛍光タンパク質 EGFP を遺伝子導入することでパターン培養された神経細胞を蛍光標識し、細胞や突起の微細構造を解析した。

**【実験方法】** ポリジメチルシロキサン製のマイクロ流路をレプリカモルディング法により作製した (Yamamoto et al., Sci. Adv., 2023)。マイクロ流路は 100  $\mu\text{m}$  四方の正方形 16 個が互いに接続された階層型モジュール構造パターンに設計した [図 1(a)]。このデバイス上に胎生 18 日ラットの大脳皮質および海馬から採取した神経細胞を播種し、培養 4 日目にアデノ随伴ウイルスを使用して EGFP を遺伝子導入した。そして、培養 14 日目に共焦点顕微鏡 (浜松ホトニクス MAICO MEMS 共焦点ユニット) を用いて形態観察を行った。

**【結果と考察】** 培養神経回路に 488 nm の励起光を照射することで、神経細胞内に発現している EGFP の蛍光を観察した [図 1(b)]。濃度  $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$  MOI の範囲でウイルス溶液を添加したところ、 $2 \times 10^5$  MOI において十分に明るい EGFP の蛍光が観察できた。EGFP は CaMKII $\alpha$  プロモーターを利用して発現しているため、正確な導入効率を見積もることは難しいが、おおよそ 76% (海馬神経細胞,  $n = 353$ ) の細胞で発現していた。マイクロ流体デバイスのウェル部やチャネル部でも神経細胞の細胞体や神経突起の形態を最大 100 倍の対物レンズを用いて高倍率でイメージングできた。

発表では、均質な領域で培養された (a) 神経細胞との形態の差や、細胞種によってみられる形態的な特徴についても報告する予定である。

本稿の内容の一部は、学術変革領域研究 (A) 「脳神経マルチセルラバイオ計算の理解とバイオ超越への挑戦」、科研費、JST-CREST、東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究の成果に基づくものである。

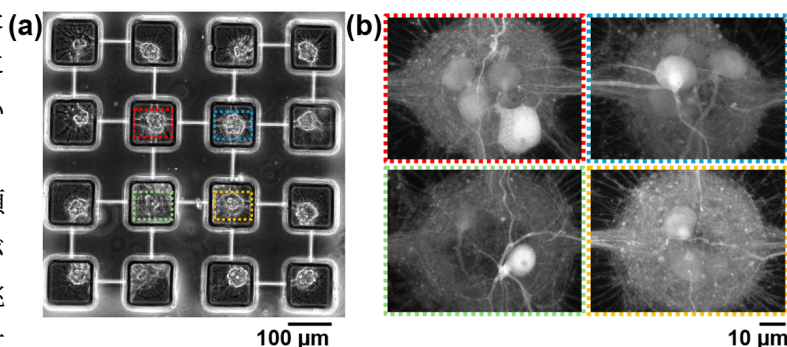


図 1: (a) モジュール構造型培養神経回路の位相差画像 (ラット大脳皮質)。 (b) 枠部分の蛍光画像 (対物レンズ 100 倍, 共焦点顕微鏡で撮影)。

サブストレイトの違いによるリアルタイムフィードバック機構を用いた  
機械刺激への拍動応答の変化

Changes in Beating Response to Mechanical Stimulation Using a Real-Time Feedback  
Mechanism Depending on Substrate Differences

青学大理工<sup>1</sup>, JST さきがけ<sup>2</sup> °(B)水谷 ありさ<sup>1</sup>,(M1)金指 響太郎<sup>1</sup>,(M2) 長井 新<sup>1</sup>,  
守山 裕大<sup>1,2</sup>, 三井 敏之<sup>1</sup>

Aogaku Univ.<sup>1</sup>, PRESTO, JST<sup>2</sup>, °Arisa Mizutani<sup>1</sup>, Kyotaro Kanazashi<sup>1</sup>, Arata Nagai<sup>1</sup>,  
Yuuta Moriyama<sup>1,2</sup>, Toshiyuki Mitsui<sup>1</sup>

E-mail: [mitsui@phys.aoyama.ac.jp](mailto:mitsui@phys.aoyama.ac.jp)

細胞培養の際には *in vivo* の状態に可能な限り近い環境を再現することが重要である。サブストレイトとして一般的に使用される材料には、ガラス、PDMS、ゲルなどであるが、これらの弾性率は大きく異なる。そして、この弾性率の違いによって細胞の分化、増殖、配向が異なることも知られている。本研究では、典型的な PDMS の弾性率である 300 kPa と、ソフトな 80 kPa のサブストレイト上に心筋細胞を播種し、機械刺激を行った際の拍動応答の変化を比較した。

本実験では転卵 5 日目のニワトリ胚を使用した。心臓を取り出して単離し、コラーゲンパターンを線形に施した PDMS 上に播種した。この際、弾性率が 300 kPa と 80 kPa の PDMS を用い、一次元系とみなせる心筋細胞の集合体を作成した。実験は、37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定されたインキュベーター内で行った。物理的的刺激は、心筋細胞特有の自律拍動をリアルタイムで観測し、次の拍動のタイミングを予測することで、刺激の位相制御を可能にするリアルタイムフィードバック機構を備えた自作の刺激装置を使用した(Fig. 1, 2)。300 kPa の PDMS 上において、 piezo 素子による probe 刺激の例を Fig. 2 に示す。次の拍動が起こる直前に刺激を与えるとのみ、応答して拍動した。本発表では、80 kPa の PDMS 上における刺激応答との違いについて報告する。

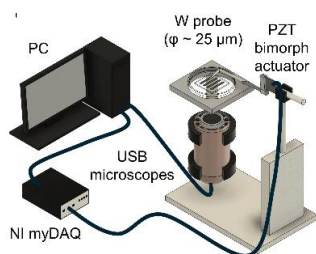


Fig. 1. Stimulation device.

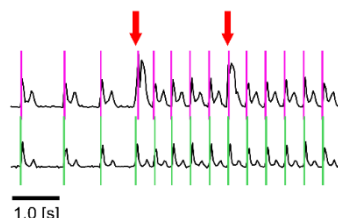


Fig. 2. Beat waveform during stimulation at  $-\pi/4$ .

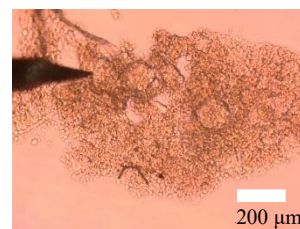


Fig. 3. 1D cell aggregate on 80 kPa substrate.

## PDMS による一次元溝構造内の線維芽細胞と心筋細胞の走化性

### Motility of Fibroblasts and Cardiomyocytes in 1D Groove Structures Fabricated by PDMS

青学大理工<sup>1</sup>, JST さきがけ<sup>2</sup> °(M1)乗原 宙歩<sup>1</sup>, (B)岩間 友音<sup>1</sup>, (M2)長井 新<sup>1</sup>

守山 裕大<sup>1,2</sup>, 三井 敏之<sup>1</sup>

Aogaku Univ.<sup>1</sup>, PRESTO, JST<sup>2</sup>, °Hiromu Kuwabara<sup>1</sup>, Tomone Iwama<sup>1</sup>, Arata Nagai<sup>1</sup>,

Yuuta Moriyama<sup>1,2</sup>, Toshiyuki Mitsui<sup>1</sup>,

E-mail: [mitsui@phys.aoyama.ac.jp](mailto:mitsui@phys.aoyama.ac.jp)

近年、培養のマテリアルの多様化により、再生医療をゴールとした三次元構造のサブストレイト上での培養が盛んに行われている。これらの構造には、発展を遂げた半導体プロセスの微細加工が応用されており、細胞の物理学的特性の解析に用いられる。例えばピラー構造上における細胞により細胞の単一細胞の応力測定に、一次元的な溝構造内における、神経細胞の培養では、その溝に沿った活動電位の伝搬の測定に役立っている。神経細胞においては、*in vivo* における一次元的に配向を、この溝内でも形成して、*in vivo* と同様な異方性のある活動電位の伝搬を示す。皮膚や心臓の線維芽細胞は、外傷治療や心臓欠陥の修復を担うなど、走化性に優れた細胞である。また、心臓組織は局所的に配向しているため、一次元的な溝構造付近では配向を示すことも予想できる。本研究では、まず線維芽細胞と心筋細胞を局所的に培養し、その後、一次元的な溝構造付近に細胞を導入・走化させ、溝内外を細胞が満たすまでのダイナミクスを観測した。この解析により、個々の細胞の3次元構造の検知や応答メカニズム、細胞間のコミュニケーションを調べる。また、溝の幅と細胞の配向との相関を明らかにすることも目的とする。

三次元培養系は、フィルムレジストを用いたフォトリソグラフィーにより、シリコンウェーハ上に鋳型を作成し、そのパターン転写として PDMS を用いた。パターンは 50 $\mu\text{m}$  から 100 $\mu\text{m}$  程度の溝構造を複数パターン作成した。そこに構造長軸方向から細胞集団を侵入させ運動を解析した。その結果、溝外部・溝底面に異なる特徴を示したためここに報告する。実験にはにわとり胚の心臓由来の線維芽細胞を用いた。

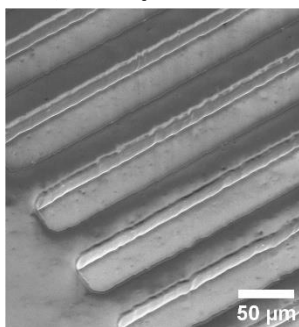


Fig. 1. SEM image of PDMS with groove

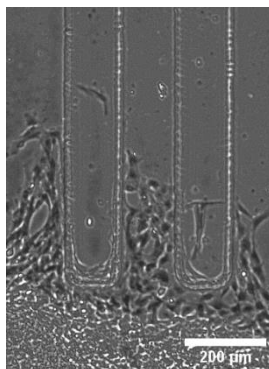


Fig. 2. Fibroblast infiltration into the grooves.

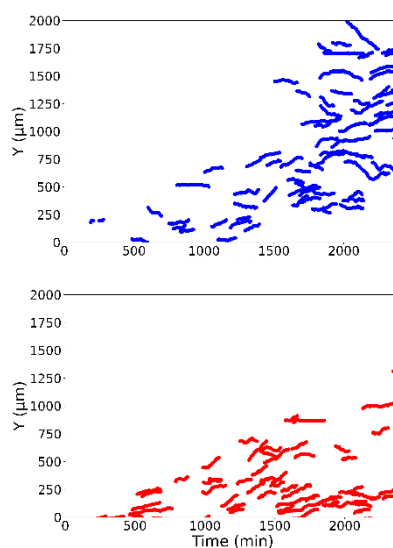


Fig. 3. Displacement in the longitudinal direction: groove bottom surface (red), external (blue).

## 原子間力顕微鏡による腱組織スライスの方学測定 Measuring Mechanical Properties of Tendon Tissue Slice Samples

### Using Atomic Force Microscopy

北大情報科学<sup>1</sup>, 岡大病院整外<sup>2</sup> ◯(M2)熊谷 羽留<sup>1</sup>, 中道 亮<sup>2</sup>, 北林 ひかる<sup>2</sup>, 岡嶋 孝治<sup>1</sup>

Grad. Sch. Info. Sci. & Tech., Hokkaido Univ.<sup>1</sup>, Orthop. Surg., Okayama Univ. Hospital<sup>2</sup>,

◯Haru Kumagai<sup>1</sup>, Ryo Nakamichi<sup>2</sup>, Hikaru Kitabayashi<sup>2</sup>, Takaharu Okajima<sup>1</sup>

E-mail: h.kumagai11@ist.hokudai.ac.jp

腱は、骨と筋肉を繋ぎ、力を伝達する線維性結合組織である。腱は腱細胞と細胞外マトリックス (ECM) から構成され、腱細胞は ECM の合成および力学的ストレスへの応答を通じて腱の剛性を調節する [1]。腱組織の形成に関与する因子やシグナル伝達経路については広く研究されているが、形成過程における力学的特性の評価は十分ではなく、特に筋・腱・骨の結合領域の力学的特性は不明な点が多い。このため、腱組織形成過程におけるマイクロスケールでの方学測定が必要である。Zhang らは、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、ラット大腿骨の皮質骨中の骨細胞を取り囲むラクナ-管状ネットワークにおける力学的特性を測定した [2]。また、筋組織においては、Peña らによって心臓組織の機械的特性が評価された [3]。また、腱組織に関しては、Marturano らによって、ニワトリ胚腱組織の発生過程において弾性率の変化があることが報告された [4]。しかし、筋・腱・骨の結合領域における方学特性は不明である。組織スライスの方学特性を適切に評価するためには未処理のサンプルが望ましいが、測定が困難な場合も多い。そのため、可能な限り化学処理を行わない条件での測定が求められる。しかし、腱周辺組織における化学処理の影響については明らかになっていない。そこで本研究では、川本法および MAS コート基板に接着したマウス胚後肢の組織切片の方学特性について、パラフォルムアルデヒド (PFA) 濃度依存性を調べた。その結果、川本法では、組織別の弾性率の大小関係が PFA 濃度に依存しなかった。MAS コート基板では、組織切片のヤング率の不均一性が失われる場合があることが分かった。当日は、胎齢による組織形成とその方学特性との関係について発表する予定である。

#### 【参考文献】

- [1] Subramanian, A. *et al.*, *Development.*, 142 (24): 4191–4204 (2015)
- [2] Zhang, S. *et al.*, *Nano Res.*, 8 (25): 3250–3260 (2015)
- [3] Peña, B. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 23(7):3700 (2022)
- [4] Marturano, J.E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 (16): 6370–6375 (2013)

## 薄膜型マイクロ流体デバイスを用いた ヒト iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞のパターン培養

Patterned culture of human iPS cell-derived cortical neurons using microfluidic devices

東北大院工<sup>1</sup> 東北大通研<sup>2</sup> 東北大 AIMR<sup>3</sup> 東北大院薬<sup>4</sup> 同志社大院脳<sup>5</sup>

酒井原一守<sup>1,2</sup>, 山本英明<sup>1-3</sup>, 西村周泰<sup>5</sup>, 遠藤壮太<sup>1,2</sup>, 金野智浩<sup>4</sup>, 佐藤茂雄<sup>1,2</sup>,

正水芳人<sup>5</sup>, 平野愛弓<sup>1-3</sup>

Grad. Sch. Eng<sup>1</sup>, RIEC<sup>2</sup>, AIMR<sup>3</sup>, and Grad. Sch. Pharm. Sci.<sup>4</sup>, Tohoku Univ.; Grad. Sch. Brain Sci., Doshisha Univ.<sup>5</sup>

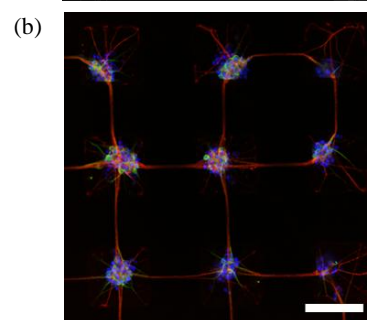
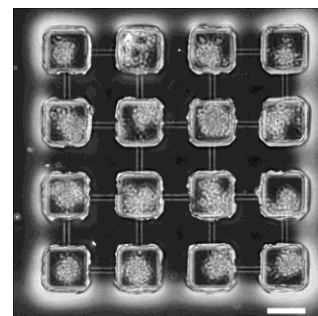
°M. Sakaibara<sup>1,2</sup>, H. Yamamoto<sup>1-3</sup>, K. Nishimura<sup>5</sup>, S. Endo<sup>1,2</sup>, T. Konno<sup>4</sup>, S. Sato<sup>1,2</sup>, Y. Masamizu<sup>5</sup>, A. Hirano-Iwata<sup>1-3</sup>

E-mail: mamoru.sakaibara.s2@dc.tohoku.ac.jp

【背景・目的】神経疾患の研究では、神経ネットワークの変性・変調や、新たな治療戦略の開発のために、*in vitro* 実験が広く用いられている。特に近年ではマイクロ流体デバイスを用いた生体模倣システムの進歩により、生態学的関連性を高めた化合物応答モデルが数多く登場し、神経変性疾患に対する理解が進められている(P. M. Holloway et al., *J. Neurosci. Res.* 2021)。また動物実験代替法や実験動物細胞との種差の壁の克服という観点から、ヒト iPS 細胞 (iPSC) 由来神経細胞を用いた研究も重要性が増している (A. Odawara et al., *Toxicol. Sci.* 2022)。しかしマイクロ流体デバイスに広く用いられるポリジメチルシロキサン (PDMS) は、ヒト神経細胞の足場基質である Laminin-511 が吸着し、PDMS 上に神経ネットワークが非特異的に成長してしまうという問題があった。そこで本研究では、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーで PDMS をコーティングすることでマイクロ流体デバイスへの Laminin の非特異吸着を抑制し、ヒト iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞のパターニング培養を行ったので、その結果を報告する。

【実験方法・結果】神経細胞パターニングのためのマイクロ流体 (a) デバイスは、先行研究を基に PDMS を用いて作製した (T. Takemuro et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* 2020)。MPC ポリマー溶液は、99.5%エタノール中に PMSi90 を 0.5wt% の濃度で混合することで調製した (Y. Xu et al., *Lab Chip* 2006)。洗浄後の PDMS フィルムを大気プラズマで 10 秒間処理した後、MPC ポリマー溶液中に 1 分間浸漬し、エタノール雰囲気下で 20 分乾燥後、70 °C で 4 時間ベークを行い、一晚減圧乾燥した。コート後の PDMS フィルムをガラス基板に貼り付け、Laminin-511 (2.4 µg/mL) を一晚コートし、ヒト大脳皮質神経前駆細胞を培養した。培養 7 日目にて MPC ポリマーによる Laminin 非接着コーティングの評価を行った (Fig. a, n = 36)。PDMS フィルム上に接着した細胞数は 1.6 個、軸索数は 3.7 本であり、コート無しのフィルムと比較して、それぞれ 95%、91% 減少した。また培養 15 日目に免疫染色を行うことで、パターニング領域内でヒト大脳皮質神経細胞が成熟した様子を観察した (Fig. b)。発表では、カルシウムイメージングによる大脳皮質神経細胞の自発活動についても報告する予定である。

本稿の内容の一部は、学術変革領域研究(A)「脳神経マルチセルラバイオ計算の理解とバイオ超越への挑戦」、科研費、JST-CREST、東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究の成果に基づくものである。



MAP2 / TAU / DAPI

Fig: (a) Cultured hiPSC-derived cortical neuron on MPC polymer-coated film. (b) Immunostaining of micropatterned hiPSC-derived cortical neurons. Scale bar = 100 µm.

# マイクロ切り紙足場による細胞牽引力の誘導と自発的三次元形状構築

Design of cell traction force driven self-folding three-dimensional micro kirigami scaffold

名大工<sup>1</sup>, 名大院工<sup>2</sup> ◯(B)金 楊<sup>1</sup>, 秋田谷 美乃<sup>2</sup>, 丸山 央峰<sup>1,2</sup>, 星野 隆行<sup>1,2</sup>

Dept. Eng., Nagoya Univ.<sup>1</sup> Grad. Eng., Nagoya Univ.<sup>2</sup> ◯Yang Jin<sup>1</sup>, Mino Akitaya<sup>2</sup>,

Hisataka Maruyama<sup>1,2</sup>, Takayuki Hoshino<sup>1,2</sup>

E-mail: hoshino.takayuki.v7@f.mail.nagoya-u.ac.jp

## 1. 序論

近年, 再生医療及び組織工学の分野において, 生体に近い三次元組織の再現が重要な課題となっている. 従来の二次元培養系では, 細胞間の複雑な相互作用や力学的環境を十分に模倣することは困難であった. 生体内での細胞の振る舞いをより正確に再現するためには, 三次元的な微小環境の構築が必要である.

本研究では, 細胞自身の牽引力を利用した新規の三次元組織構築法を提案する. 貫通穴を有する平面のマイクロ切り紙足場上で細胞を培養し, 細胞が貫通穴を閉じようとする際に生じる牽引力を利用して, 自発的な三次元変形を誘導した. 線維芽細胞が創傷修復時に組織全体の力やフィブロネクチン足場を利用してギャップを閉じる動作が報告されている<sup>1)</sup>が, 本研究ではマウス由来の骨格筋細胞 C2C12 を用い, このメカニズムを三次元形状構築に応用した.

## 2. 実験方法

貫通穴をもつマイクロ切り紙足場はフォトリソグラフィで用意したモールドと硬化済のPDMS板で未硬化PDMSをサンドイッチする方法で成形し, スクロースを犠牲層としてリフトオフすることで作製した.

細胞は貫通穴に沿って配向し, また配向方向に牽引力を発生することが予想される. そこで, マイクロ切り紙足場の設計は自発変形することを目標とし, 流滴型の貫通穴と角丸長方形の貫通穴を配置した(Fig 1).

マイクロ切り紙足場にフィブロネクチンをコートした後, C2C12 懸濁液を播種した. 10% FBS, 1% P-S を含む DMEM 増殖培地中で, マイクロ切り紙足場が培地中で自由に動けるような状態で培養した.

## 3. 結果・考察

細胞はまずマイクロ切り紙足場全体に広がった後, 貫通穴の外側から徐々に細胞が集まって膜を形成した. 貫通穴が埋まると同時に, 細胞を播種した面を内側にして丸まっていき, マイクロ切り紙足場中央ではレンズのよう

な曲率を持つ六角形の長い対角線で曲がるようなロール状の形ができた. Fig2 上部の貫通穴の膜形成が他の場所と比べて早く, 収縮力の発生に穴ごとに時差があったこと, 六角形の外側が窄まる際に外側の辺同士が押し合ったこと, 六角形に圧縮応力を与えた場合, 長い対角線で曲がるのが, 今回この形状になった要因だと考えられる.

## 4. 結論

細胞自身の収縮力から三次元形状を構築することができた. マイクロ切り紙足場の形状や貫通穴の配置を調整することで, 多様な三次元構造を設計・構築できる可能性が示唆された. 本技術は, 創薬開発や再生医療の分野において, 生体に近い環境下で細胞の機能や挙動を評価する新たなアプローチとして期待できる.



Fig.1 マイクロ切り紙足場の設計

一辺が 600  $\mu\text{m}$  で膜厚 20  $\mu\text{m}$  の六角形 PDMS シートに最大幅 100  $\mu\text{m}$ , 高さ 400  $\mu\text{m}$  の流滴型と, 幅 200  $\mu\text{m}$ , 高さ 30  $\mu\text{m}$  と幅 150  $\mu\text{m}$ , 高さ 30  $\mu\text{m}$  の角丸長方形の貫通穴を 6 つずつ配置.

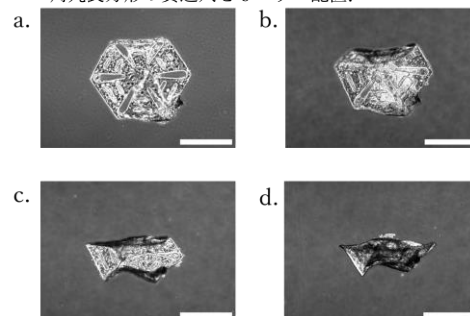


Fig.2 マイクロ切り紙足場が三次元に構築される様子  
培養開始後 a.11 日後, b.16 日後, c.19 日後  
d.21 日後の様子. スケールバーの長さは 600  $\mu\text{m}$ .

## 参考文献

- 1) Sakar, M. S. *et al.* Cellular forces and matrix assembly coordinate fibrous tissue repair. *Nat Commun* **7**, 11036 (2016).

## 電気化学インピーダンス法による植物のダイレクトセンシングと機械学習による検討

Investigation of direct plant sensing by electrochemical impedance spectroscopy and machine learning

東京理科大学 創域理工<sup>1</sup>/総研<sup>2</sup>

○吉永 博紀<sup>1</sup>, 篠田 倫太郎<sup>1</sup>, 杉山 睦<sup>1,2</sup>

1. Faculty of Science and Technology / 2. RIST, Tokyo Univ. of Science

○H. Yoshinaga<sup>1</sup>, R. Shinoda<sup>1</sup>, M. Sugiyama<sup>1,2</sup> E-mail: optoelec@rs.tus.ac.jp

**【はじめに】** 国内農業従事者の減少に伴い、農作業の自動化が急務であることから、スマート農業技術が注目されている。スマート農業技術に関して、これまで土壌水分量や気温等の栽培環境や、画像認識による植物表面の観測が行われてきた。しかし、これらの手法は植物内部の異常が表出するまでにタイムラグがあることが課題の一つとして挙げられる。また、植物の内部状態を直接観測するため、電極を植物に刺入して電気測定を行う方法なども検討されてきたが[1]、植物に対して侵襲的であることが問題となる。そこで我々は、植物の内部をタイムラグ無く非侵襲的に測定できる手法として電気化学インピーダンス法(EIS)を提案してきた。これまで、気温や照度などの外的要因が植物内部に与える影響を調査してきたが[2]、実用化に向けて更なる検討が必要である。たとえば、植物自体の水分量が内部の電気特性に与える影響に関して、リアルタイムかつ非侵襲的に測定できる手法を用いて報告された例は少ない。本研究では、EIS を用いて植物自体の水分量が内部の電気特性に与える影響に関して検討した。また、機械学習を用いた水分状態の二項分類モデルを構築し、各パラメータの重要度について検討した。

**【実験方法】** 水耕栽培で育成し、事前に水分を含ませたコマツナを 2 株用意した。片方の株(水無し)は水を抜き乾燥させ、他方の株(水有り)は湿潤状態を維持した。その後、水抜きから 3 時間間隔で EIS 測定を行った。また、図 1 に示した等価回路を用いてフィッティングを行い、各パラメータを算出した。

**【結果及び考察】** 図 2 に水抜きからの時間経過に伴う水無しコマツナの外見の変化と、水無し及び水有りコマツナの細胞外部抵抗( $R_o$ )値の推移を示す。水有りの  $R_o$  に対して、水無しの  $R_o$  は外見からでは乾燥が確認できない 3 時間の時点で大きく減少した。従って、EIS を用いることでコマツナ内部の水分状態を外見の観察よりも早く検出可能であることが示唆された。さらに得られた結果を用いて機械学習による二項分類モデルを構築し、各パラメータの重要性に関する検討を行った。詳細は当日報告する。

**【謝辞】** 本研究を遂行するにあたり、杉山研究室 宇津木みさきさん・大塚文弥さんに感謝致します。また本研究の一部は、東京都葛飾区、JA 東京スマイル葛飾営農研究会、東京理科大学農理工学際連携コースの援助を受けた。

**【参考文献】** [1] J. Fromm & S. Lautner, Plant, Cell Environ. **30** (2007) 249. [2] Our group, Jpn. J. Appl. Phys. **62** (2023) 088002.

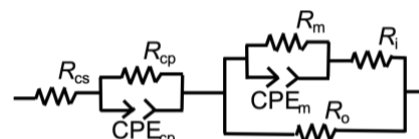


図 1. 細胞組織をモデル化した等価回路

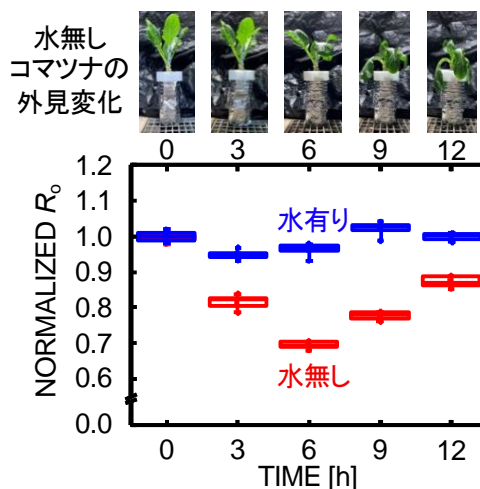


図 2. 水抜きからの時間経過に伴うコマツナの外見と  $R_o$  の推移

## 機械学習を用いた植物の温度ストレス検知に向けた 電気化学インピーダンス特性の検討

Investigation of electrochemical impedance property  
for temperature stress detection in plants using machine learning

東京理科大学 創域理工<sup>1</sup>/総研<sup>2</sup>

○梅本 遥介<sup>1</sup>, 篠田 倫太郎<sup>1</sup>, 浅野 颯太<sup>1</sup>, 杉山 睦<sup>1,2</sup>

1. Faculty of Science and Technology / 2. RIST, Tokyo Univ. of Science

○Y. Umemoto<sup>1</sup>, R. Shinoda<sup>1</sup>, S. Asano<sup>1</sup>, M. Sugiyama<sup>1,2</sup> E-mail: optoelec@rs.tus.ac.jp

**【はじめに】** 近年の農業において、作物の栽培ノウハウが長年の経験に基づいた感覚的な手法となっており、経験に依存した農業が課題となっている。この課題を解決するため、機械学習やIoTなどを活用し、植物の情報をデータ化が推進されている。この取り組みを進めるにあたり、気温や水分などの周囲環境が植物に対してどのような影響を及ぼすのかそれぞれ細分化して検討していく必要がある。そこで、気温の影響による植物のストレスに着目した。一般的に植物には生育に適した固有の温度範囲があり、不適切な温度環境下では植物の生育が阻害されることが知られている[1]。しかし、このような温度によるストレスは直接モニタリングすることが難しい。そこで、我々は植物の直接モニタリング手法として電気化学インピーダンス(EIS)測定に着目した。EIS測定は、植物内部のイオン変動を交流電気信号として測定することで、植物細胞の非破壊モニタリングが可能な測定方法である。これにより、植物の内部情報を迅速に検知し、よりリアルタイムなモニタリングの実現が期待される。本研究では、茎から観測される電気化学インピーダンス特性から、栽培環境下にて起こりうる気温変動が植物に与える影響を検討し、得られた結果より室温に対して植物が感じるストレスの程度予測を機械学習で行った。

**【実験方法】** トマトの茎表面に対して市販のパッチ型ゲル電極(MSGLT-08G, AS ONE)を貼り付け EIS測定を行った。EIS測定は交流印加電圧の振幅を1V、周波数を10Hz ~ 200kHzとした。温度条件は1時間に5℃ずつ室温を上昇させ、直射日光を避けて測定を行った。植物の各インピーダンスパラメータは、図1に示した等価回路[2]を用いてフィッティングを行うことで導出した。

**【結果及び考察】** 図2に室温を変化させた場合のトマトにおける、細胞外液の抵抗である外部抵抗( $R_o$ )の推移を示す。図2より、室温の上昇に伴う $R_o$ の減少が確認された。これは、室温の変化による温度ストレスにより細胞外液のイオンが増加したためと推測される[3]。また得られた結果より、各インピーダンスパラメータを特微量とした、室温に対して植物が感じるストレスの程度予測・定量化を機械学習で行った。機械学習には教師あり線形回帰モデルを構築し、各特微量の重要度の検討を行った。詳細は当日に報告する。

**【謝辞】** 本研究を遂行するにあたり、杉山研究室 宇津木みさきさん・大塚文弥さんに感謝致します。また本研究の一部は、東京都葛飾区、JA 東京スマイル葛飾営農研究会、東京理科大学農理工学際連携コースの援助を受けた。

**【参考文献】** [1] A. Ploeg & E. Heuvelink, J. Hortic. Sci. Biotechnol. **80** (2005) 652. [2] Our group, Theor. Exp. Plant Physiol. **34** (2022) 501. [3] Our group, Jpn. J. Appl. Phys. **62** (2023) 088002.

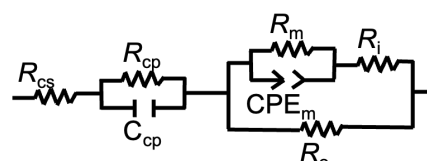


図1. フィッティングに用いた植物の細胞組織を反映した等価回路[2]

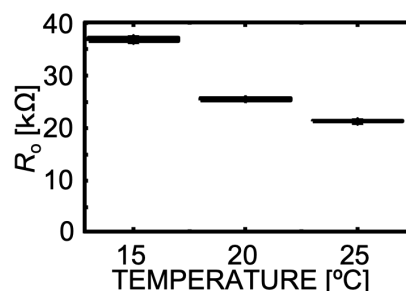


図2. 室温を変化させた場合のトマトの外部抵抗( $R_o$ )の推移

## 多点 LED プローブ・多点皮質脳波電極シートを活用した 神経活動の局所的介入と多点計測系の構築

### Development of Localized Intervention and Multi-Point Measurement System for Neural Activity Using Multi-LED Probes and ECoG Electrodes

豊橋技大<sup>1</sup>, 獨協医大<sup>2</sup>, ALLOS<sup>3</sup>

山田晃大<sup>1</sup>, 引間卓弥<sup>2</sup>, 奥井歩夢<sup>1</sup>, 濱高靖浩<sup>1</sup>, 西川敦<sup>3</sup>, A. Loesing<sup>3</sup>, 大川宜昭<sup>2</sup>, 関口寛人<sup>1</sup>

Toyohashi Tech<sup>1</sup>, Dokkyo Med. Univ.<sup>2</sup>, ALLOS<sup>3</sup>

M. Yamada<sup>1</sup>, T. Hikima<sup>2</sup>, A. Okui<sup>1</sup>, Y. Hamataka<sup>1</sup>, A. Nishikawa<sup>3</sup>, A. Loesing<sup>3</sup>, N. Ohkawa<sup>2</sup>, H. Sekiguchi<sup>1</sup>

E-mail: yamada.mitsuhiro.hk@tut.jp, sekiguchi@ee.tut.ac.jp

神経科学研究において脳機能の解明に向けて局所的な神経活動の制御とその活動計測が重要な役割を果たしている。従来の技術では、光遺伝学的手法を用いた局所的な神経活動の介入や多点脳波計測における高い空間分解能の達成には限界があった。特定部位への局所的な介入に向けて独立駆動できる多点 LED プローブが注目されている[1]。また我々のグループはマウス脳の広範囲に多点で皮質脳波(ECoG: Electrocorticography)計測できるシートデバイスを開発し、生理学的な感覚刺激に対する応答計測ができることを示してきた[2]。本研究では、多点 LED プローブ、および、多点皮質脳波電極シートを作製し、これら 2 つのデバイスを組み合わせて、局所的な神経活動の精密な制御とそれに伴う神経活動の多点計測を同時に行う計測系を構築したので報告する。

まず多点 LED プローブはプローブ長さ 6 mm の先端に 50  $\mu\text{m}$  角のマイクロ LED を 150  $\mu\text{m}$  間隔で 11 個集積するように設計し、InGaN 系 LED ウエハを用意し、半導体プロセスにより作製した。開発したマイクロ LED の外部量子効率はおおよそ 1%程度であり、光遺伝学的介入において求められる光出力 10 mW/mm<sup>2</sup>においても温度上昇を 2°C以下に抑えることができる。次に、多点皮質脳波電極シートは基材に高い生体適合性をもつ厚さ 23 $\mu\text{m}$  のパリレン C を基材とし、幅 3 mm、長さ 2 cm のパリレンシートに 64 個の 80  $\mu\text{m}$  角の Au 電極を配置するように設計した。作製した Au 電極のインピーダンス特性を評価したところ、1kHz において 0.8 M $\Omega$ であった。

Fig. 1 に動物実験の概略図を示す。本研究では、作製したデバイスを Chr2 を発現させた遺伝子改変マウスに埋め込み、計測実験を行った。LED プローブは Arduino マイコン用いて PC から制御し、マイクロ LED を駆動可能にした。また、多点皮質脳波電極シートは多点アンプに接続され、リアルタイムで多点の皮質脳波を記録できる。Fig. 2 に、これら 2 つのデバイスのマウス脳への設置図、および、作製デバイスの写真を示す。まず、皮質脳波電極シートをマウスの左脳に設置し、視覚野・聴覚野・嗅覚野・体性感覚野をカバーした。次に、マイクロ LED プローブを皮質から線条体まで刺入し、光照射を行った。光刺激は、20 Hz の駆動周波数と光照射強度 10 mW/mm<sup>2</sup> で、体性感覚野に対して 5 秒間行い、60 秒のインターバルをおいて 5 回繰り返した。Fig.3 に 1 回目および 4 回目の光刺激前後における対側 (左脳) の体性感覚野の皮質脳波のウェーブレット変換を示す。1 回目(Fig.3(a))の光刺激後には 10-25 Hz の領域における活動電位の減衰が観察されたが、4 回目(Fig.3(b))には逆にこの領域の活動電位が増加する傾向が観察された。この結果は、介入により神経活動が経験依存的に変化する様子を示している可能性がある。構築した計測系は、特定部位への介入によって引き起こされる神経活動の抑制および興奮の変化を空間的に捉え、時間的・空間的に変動する神経活動のダイナミクスを理解するためのツールとなることが示唆された。

参考文献:[1] Yasunaga, *et al.*, *Opt. Express* **30**, 40292 (2022). [2] Setogawa, *et al.*, *Mol. Brain* **16**, 38 (2023).

謝辞: 本研究の一部は、科研費(23H01465, 24K21735), キヤノン財団の支援を受けて行われた。

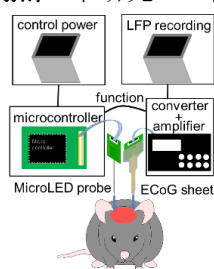


Fig.1 Experimental Animal experimental setup using the developed devices

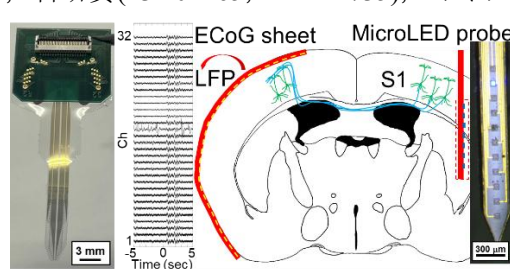


Fig.2 Installation positions of the MicroLED probe and multi-point ECoG sheet on the mouse brain, and photographs of the devices

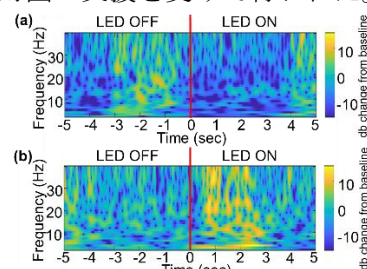


Fig.3 Wavelet transformation of LFPs in the somatosensory cortex during light stimulation: (a) first, (b) fourth stimulation

## カーボンナノチューブ電極を用いるカテコールアミン系薬剤の電気化学分析

### Electrochemical Behavior of Catecholamine Drugs with Carbon Nanotube Electrode

○(B)周代佳<sup>1</sup>、(B)門脇愛唯<sup>1</sup>、六車仁志<sup>1</sup> (1.順大)

°Yoka Shu<sup>1</sup>, Mei kadowaki<sup>1</sup>, Hitoshi Muguruma<sup>1</sup>(1.Juntendo Univ.)

E-mail: ms9222032@stud.juntendo.ac.jp

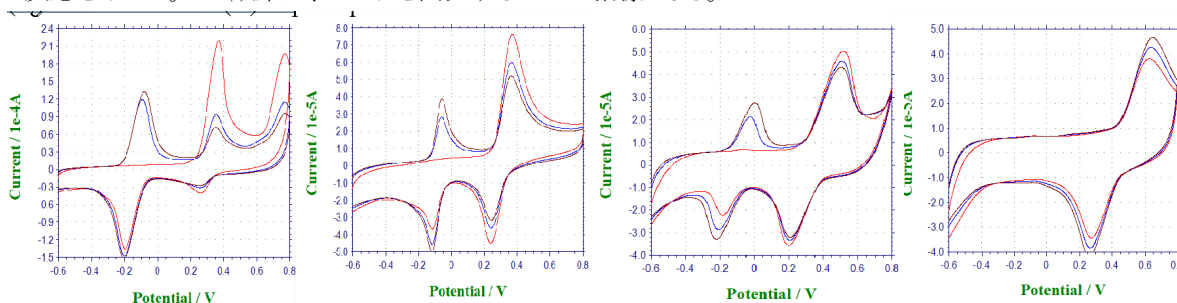
カテコールアミン系薬剤は、体内で生成されるホルモンおよび神経伝達物質であるカテコラミンに関連した薬剤である。これらの薬剤は交感神経系における重要な役割を果たし、心拍数、血圧の調整を行っている。カテコールアミン系薬剤を簡易検出することには意義がある。電気化学センサはその要件を最も満たす手法であり、さらに、カーボンナノチューブ(CNT)は優れた電極材料である。本研究ではセンサの開発を目指し、CNT電極を用いて分析を行った。

カテコールアミン系薬剤は、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン、ドブタミン、プロタノール、ドパ、メチルドパ、ドロキシドパ、ベンセラジド、デノパミン、ネオシネジンのカテコールアミンを使用した。基礎となる金電極に、CNT溶液を5 $\mu$ L滴下。さらに、保護膜としての役割を果たすCMC(カルボキシメチルセルロース)を5 $\mu$ L滴下したものを使用した上記の電極を使用し、サイクリックボルタンメトリー法(CV法)で測定を行った。

カテコールアミン類の反応はECE(電子-化学-電子)機構を示すことが分かっている。図1にpH6.0でのドブタミンとドパのCVを示す。ECE反応を示している。すなわち、Peak IIaは1回目の走査では観測されず、2回目以降に現れる。Peak Icの大きさは化合物の環化速度に依存し、環化速度が速ければPeak Icの大きさは小さくなる。図2にpH4.3でのドブタミンとドパのCVを示す。pHが小さくなるとアミンの脱プロトンが送りにくくなり環化速度が遅くなる。そのためドパでは第二反応が消失している。ドブタミンは、pH6.0に比べてPeak Icが大きくなっている。走査速度を増やすことにより、ピーク電流が走査速度に比例して大きくなった。これは電気化学反応が反応律速であることを示しており、反応解析には適している。また、走査速度が速くなるとPeak Icが鋭くなるのはECE機構による。

ベンセラジド、デノパミン、ネオシネジン、はECE反応を示さなかった。これは、これらの物質がカテコール系アミン薬剤に分類され生理的機能も類似しているが、厳密にはカテコールアミンではないためである。ベンセルジドは、ピロガロール、デノパミンはジメトシキベンゼン、ネオシネジンは、フェノールである。

カテコールアミン系薬剤のCNT電極を用いての電気化学分析を行った。狭義のカテコールアミン系薬剤はECE反応を示した。この成果は、センサを開発する上での指標となる。



## 腎機能マーカーを検出するための FET 型バイオセンサーの作製と評価



## Fabrication and Characterization of a FET-type Biosensor for the Detection of Renal Function Markers

大阪工業大学 ナノ材研センター <sup>○MIO</sup> 日後 太一, 山名 一生, 広藤 裕一, 廣芝 伸哉, 小池 一步Osaka Inst. of Tech., NMRC, <sup>°(M1C)</sup> Taichi Higo, Issei Yamana, Yuichi Hirofuji,

Nobuya Hiroshiba, Kazuto Koike

E-mail: m1m24330@st.oit.ac.jp

## はじめに

これまで我々は、腎機能マーカーであるクレアチニンを検出するための拡張ゲート (EG) FET 型バイオセンサーを作製し、eGFR の診断に適用できる可能性について報告してきた[1]。本研究では、同じく腎機能マーカーである尿素を検出するための EGFET 型バイオセンサーを作製した結果について報告する。

## 実験方法

Fig.1 に本研究で作製した EGFET 型バイオセンサーの回路構成と測定セットアップを示す。FET の接合温度や被検液の温度変化によって生ずる電圧ドリフトを抑制するため、2つの EG 電極 (ExG1, ExG2) を用いた差動回路を構成した。ExG1 には酵素の包括担体として使用する絹フィブロイン膜のみを形成し、ExG2 には酵素 (ウレアーゼ) を含む絹フィブロイン膜を形成した。これらの EG 電極と Ag/AgCl 参照電極を被検液に浸漬させた後、両 FET に 100  $\mu$ A の定電流を流して、被検液の尿素濃度を変化させた際の電極間の電圧変化量 ( $\Delta V$ ) を測定した。

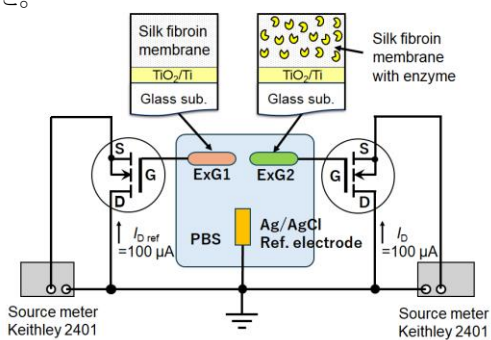


Fig.1 Circuit configuration and measurement setup of the EGFET biosensor.

## 結果と考察

Fig.2 に被検液中の尿素濃度を 0~30 mg/dL の範囲で段階的に変化させた際の  $\Delta V$  の時間応答を示す[2]。尿素濃度の増加に伴って  $\Delta V$  も増

加していることやリフレッシュの度に元の電圧レベルに戻っていることが判る。このことから、尿素の濃度変化を連続モニタリング可能であることが明らかになった。Fig.3 に血中の妨害物質であるグルコース、クレアチニン、アスコルビン酸、BSA を順に滴下し、最後に 30 mg/dL の尿素を滴下した際の  $\Delta V$  の時間応答を示す。妨害物質に対して 2mV 以内の変化量に留まっており、本センサーが尿素の検出に対して選択性に優れることも確かめられた。

本研究の一部は、公益財団法人 泉科学技術振興財団の研究助成を受けたものである。

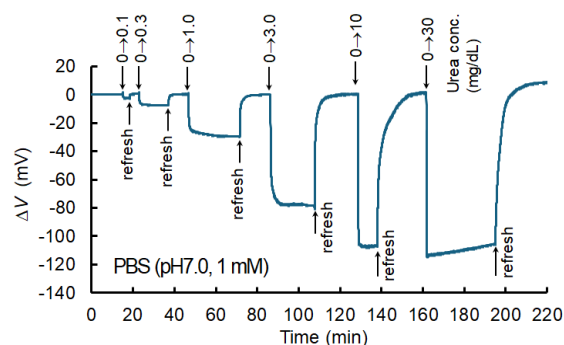


Fig.2 Response of  $\Delta V$  to changes in urea concentration.

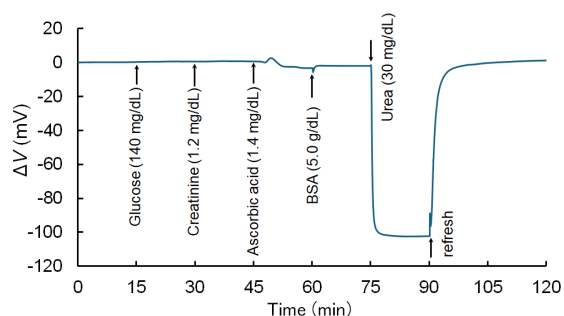


Fig.3 Response of  $\Delta V$  to the interfering substances, glucose, creatinine, ascorbic acid and BSA.

[1] Koike et al., J. Soc. Mater. Sci. Jpn, 73, 763-767 (2024).

[2] 日後ほか, 電気学会 電子材料研究会, 2024 年 11 月 29 日, 大阪工業大学.

## Surface plasmon resonance-enhanced photoelectrochemical flexible sensor using PEDOT:PSS thin film/nanostructured Au

Niigata Univ., °Charin Seesomdee, Sachiko Jonai, Kazunari Shinbo and Akira Baba\*

E-mail: ababa@eng.niigata-u.ac.jp

This study presents a flexible photoelectrochemical (PEC) glucose sensor that integrates gold nanoparticles (AuNPs) and gold (Au) nanostructures on polydimethylsiloxane (PDMS) substrates. The sensor utilizes poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate (PEDOT:PSS) [1], with a 50 nm Au layer deposited onto the substrate via vacuum evaporation, acting as a catalyst for glucose oxidation [2]. AuNPs were added to the PEDOT:PSS layer to utilize localized surface plasmon resonance (LSPR), enhancing the photoelectrochemical response. Both the PEDOT:PSS and AuNP films were formed using electrochemical deposition techniques. This work utilizes the LSPR and catalytic properties of gold as key factors to enhance glucose detection on flexible PDMS substrates, ensuring adaptability for various sensor applications. To evaluate the performance of the flexible sensor, a reference sensor was fabricated using PEDOT:PSS and AuNPs on a glass substrate. To further amplify the sensing response, an Au/PDMS grating substrate was developed to excite propagating surface plasmon resonance. The combination of PEDOT:PSS and AuNPs enabled improved electrochemical doping and increased charge density, significantly boosting the PEC sensor's performance [3]. The Au/PDMS grating substrate demonstrated a limit of detection (LOD) of 0.38 mM under light conditions, outperforming the gold-coated glass substrate in terms of sensitivity. Under white light illumination, the sensor exhibited an enhanced photocurrent, attributed to LSPR excitation, confirming its potential for efficient glucose sensing.

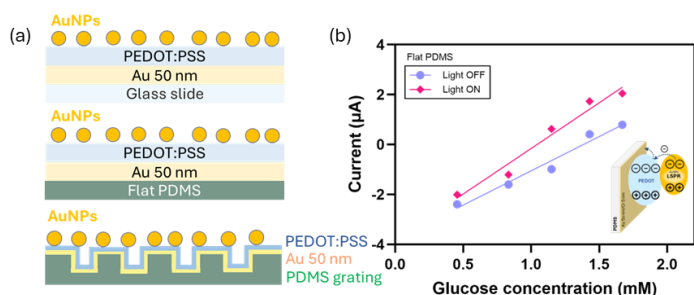


Fig. 1. Schematic diagram of PEC sensor with (top) glass slide (middle) PDMS flexible (bottom) grating PDMS substrates. (b) Calibration curve of the PEC flexible sensor with AuNPs immersed in glucose

### References

- [1] J. N. Patel, B. L. Gray, B. Kaminska, and B. D. Gates, "Flexible glucose sensor utilizing multilayer PDMS process," in *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Aug. 2008, pp. 5749–5752. doi: 10.1109/IEMBS.2008.4650520.
- [2] S. Karra, M. Wooten, W. Griffith, and W. Gorski, "Morphology of Gold Nanoparticles and Electrocatalysis of Glucose Oxidation," *Electrochim Acta*, vol. 218, pp. 8–14, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.electacta.2016.09.097.
- [3] S. Loch, S. Phetsang, Kazunari Shinbo, K. Kato and A. Baba, "Study of SPR-enhanced Photoelectrochemical Biosensor using BBL-based Polymer/AuNPs Thin Film," *IEICE Conferences Archives*, vol. IEICE-123, no. IEICE-OME-138, p. IEICE-OME, Jul. 2023.

## 構造認識蛍光分子を活用した高感度遺伝子検出法へのアプローチ

### Approach to highly sensitive gene detection using structure-recognition fluorescent molecules

防医大 ○堀米晶貴, 美坂玲壮, 武井史恵

National Defense Medical College (NDMC)

○Masaki Horigome, Reo Misaka, Fumie Takei

E-mail: ft-sakamot@ndmc.ac.jp

2,7-ジアミノナフチリジン誘導体 DANP は DNA のシトシンバルジ構造 (C-バルジ構造) に特異的に結合し、特徴的な蛍光を示す蛍光物質である。DANP は C-バルジ構造に結合するか否かで、その吸収波長が大きく長波長シフトし、それに伴い蛍光の波長も変化する (図 1)。この特徴を使って PCR のモニタリング法を考え DNA, RNA, miRNA などの検出に応用した。今回さらなる核酸の検出感度を上げることを目的として、バルジ構造だけでなく各種ミスマッチ構造、隣接塩基の配列のうち高い蛍光強度を示す配列を調べた。

DNA の中心部分を三塩基だけ変えた二本鎖 DNA (5'ATGAGTANNATGAGTA3'/3'TACTCATNNNTACTCAT5') を用意し、pH7.0 リン酸溶液中、DNA と DANP を混合して蛍光強度を測定した。DANP のみを含む pH7.0 の溶液蛍光強度を基準として、729 通りの DNA の組合せの蛍光強度を測定した。その結果、5'ACA3'/3'TCT5' の C-C ミスマッチ構造が最も強い蛍光強度を示すことがわかった (図 2)。その一方で、シトシンが 2 つ以上連続しているミスマッチ配列では、蛍光強度がほとんど増大しないため、C-C ミスマッチ構造に選択的に結合し、強い蛍光を示すことが明らかとなった。

さらに PCR のモニタリングシステムにこのミスマッチ結合の配列を用いて C-バルジ構造のプライマーを用いた時に比べ、ミスマッチ結合を用いた方が早い段階から蛍光の上昇が観測されたことから、C-C ミスマッチ配列を使うことで、高感度測定が可能であることが示唆された。

#### Fluorescent molecules that bind to the special structure of DNA

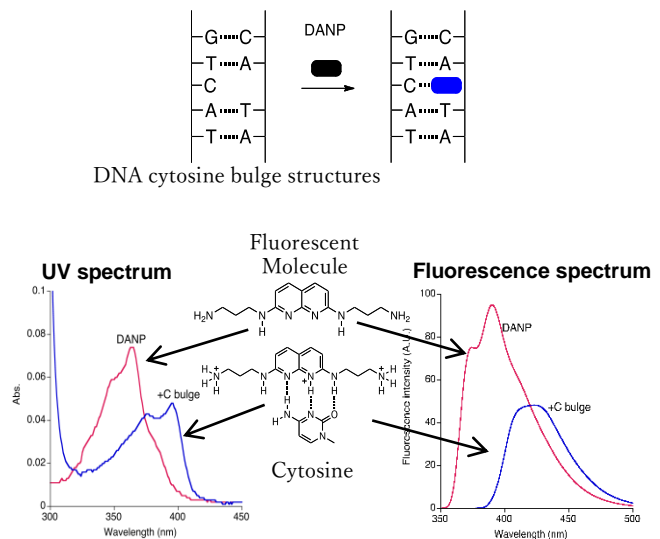


Fig1. DANP structures bound to DNA and their spectroscopic properties

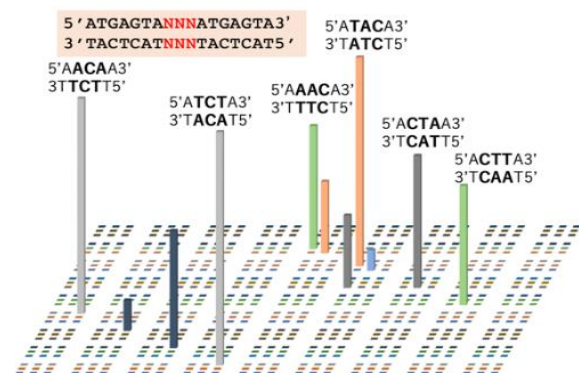


Fig2. Sequence with high fluorescent intensity

## 迅速・高感度核酸同定に向けた CRISPR/Cas12 固定化マイクロ流路の開発

### Development of CRISPR/Cas12-Immobilized Microfluidic Devices

#### Toward Rapid and Highly Sensitive Nucleic Acid Identification

産総研<sup>1</sup>, 阪大産研<sup>2</sup>, <sup>○(P)</sup> 繁森 弘基<sup>1</sup>, 藤田 聡史<sup>1</sup>, 民谷 栄一<sup>1,2</sup>, 永井 秀典<sup>1\*</sup>

AIST<sup>1</sup>, SANKEN, Osaka Univ.<sup>2</sup> <sup>○</sup>Hiroki Shigemori<sup>1</sup>, Satoshi Fujita<sup>1</sup>, Eiichi Tamiya<sup>1,2</sup> and Hidenori Nagai<sup>1,\*</sup>

E-mail: h.shigemori@aist.go.jp

**【目的】** DNA マイクロアレイは膨大な種類の核酸配列の同定やその変異解析に有用である一方、標的 DNA の一本鎖化や蛍光標識等の煩雑な操作に長時間 (3~24 時間) を要する事が課題である。

その解決策として、我々はこれまで標的 DNA を直接認識、連鎖的に信号変換する CRISPR/Cas12 機構を検出操作の簡略化ツールとして着目し、この構成分子を固定化・集積化したセンサアレイを以前報告した<sup>1),2)</sup>。そして本報では、CRISPR/Cas12 センサアレイと高速 PCR の統合に基づく核酸同定の迅速化・高感度化を目指し、高速 PCR 用マイクロ流路上へのアレイ作製法の検討と検出時間の評価、また固定化 CRISPR 分子に基づく微量 DNA 検出に向けた基礎検討を実施した。

**【核酸同定の原理】** マイクロ流路上には Cas12 酵素-crRNA 複合体と蛍光一本鎖 DNA (ssDNA) 基質が固定化されたスポットが配置されており、サンプル溶液中の標的 DNA は相補 crRNA 配列を有する Cas12 に捕捉される。連鎖的に Cas12 がヌクレアーゼ活性化し、同一スポット上の ssDNA のみを切断する。従って、蛍光減少を示したスポットから、標的 DNA 配列の同定が可能となる (Fig. 1)。

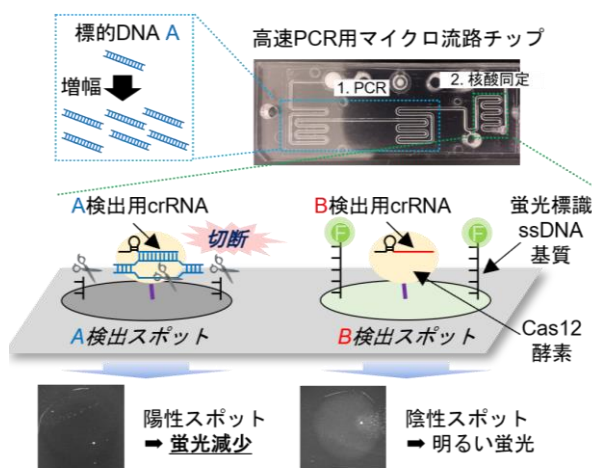


Fig. 1 CRISPR/Cas12固定化マイクロ流路に基づく核酸同定

**【研究成果】** 杏林製薬社の高速 PCR 用マイクロ流路 (GeneSoC) を基板として CRISPR/Cas12 分子をアミド結合で固定化し、PCR 増幅後と同等濃度 ( $10^{-7}$  M) の標的 DNA と反応させた。その結果、スポットの蛍光は経時的に減少し、僅か 10 分の反応でも開始時と比較して有意に蛍光減少する事が明らかになった (Fig. 2)。

また、表面に固定化した Cas12 酵素はポリメラーゼや dNTP 等を含む PCR 増幅後のサンプル溶液中でも機能する事が明らかになり、PCR 前の標的 DNA 濃度が感染症遺伝子診断の基準値レベル ( $10^{-16}$  M) であってもスポット蛍光が有意に減少した。

**【結論・展望】** 上記の研究成果及び GeneSoC の PCR 時間が高速 (15 分以内) である事から、本法を用いた 30 分以内での高感度核酸同定に向けた概念実証が達成された。今後、本法は敗血症診断や術中癌診断といった緊急性の高い微量遺伝子同定への応用展開が期待できる。

1) H. Shigemori *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2023**, *34*, 1754 || 2) H. Shigemori *et al.*, *Micromachines* **2024**, *15*, 144

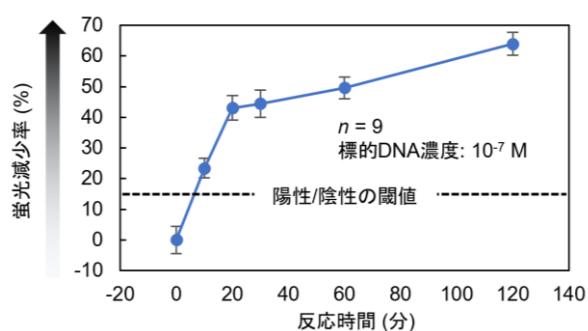


Fig. 2 標的DNAと反応したスポットの蛍光減少率の経時変化

## 電位差測定による低分子ホルモンバイオセンサの開発

### Development of Low Molecule Hormones'

### Biosensor based on Potentiometric Measurement

東京海洋大<sup>1</sup>, 産総研<sup>2</sup>, ライオン(株)<sup>3</sup>,<sup>○</sup>小柳彰良<sup>1</sup>, 柴田恭幸<sup>1</sup>, 呉海云<sup>1</sup>, 遠藤英明<sup>1</sup>,  
張民芳<sup>2</sup>, 丸山由貴<sup>3</sup>, 大貫等<sup>1</sup>

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.<sup>1</sup>, AIST<sup>2</sup>, LION Co.<sup>3</sup>

<sup>○</sup>A. Koyanagi<sup>1</sup>, T. Shibata<sup>1</sup>, M. Zhang<sup>2</sup>, H. Wu<sup>1</sup>, H. Endo<sup>1</sup>, Y. Maruyama<sup>3</sup>, H. Ohnuki<sup>1</sup>

E-mail: m234018@edu.kaiyodai.ac.jp

#### 【はじめに】

抗原抗体反応などの特異吸着を捉える手法としてこれまで Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)や Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS)が用いられてきたが、専用装置での測定や複雑な解析手法が必要となる。我々は単純な電位差計測で測定されるバイオセンサの実現を目指している。本研究では、等モルの $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 平衡状態にある溶液中でメラトニン測定を行った。あらかじめ抗体を固定化した電極表面に抗原が吸着すると、表面付近の電荷分布が変化する。この状態では静電相互作用によって電極付近における $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ の平衡状態が崩れると予想されるため、ネルンスト式で示される電極電位は抗体吸着に伴って変動する。前回の報告では、抗コルチゾール抗体を固定化した表面でのコルチゾール吸着に伴う電位変動を検知することでコルチゾールセンサを構成できることを示した。今回は、同様の原理でのメラトニンセンサ構築の可能性について報告を行う。

#### 【実験方法】

金電極の表面上に抗メラトニン抗体を固定化した試料を作製した。試料を異なる濃度のメラトニンに15分間浸漬させ、抗原抗体反応により選択的に抗メラトニン抗体にメラトニンを吸着させた。取り出して洗浄した後、等モルの $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ の溶液内に試料を浸漬した。このときの基準電極(Ag/AgCl)に対する試料の電位変化を計測した。

#### 【結果】

電位差測定によって得られたメラトニン濃度ごとの試料電位変化を Fig.2 に示す。メラトニン濃度が増大するに従い、試料電位が上昇することが確認された。また、抗体を固定化しないとき、試料電位の変化が全く見られなかった。従って、このような方法により簡易な電圧測定によるメラトニンセンサが構成できることが示された。

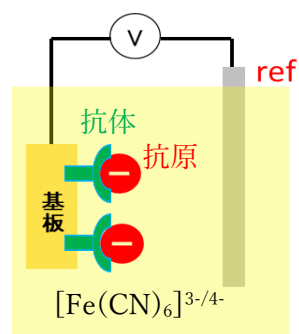


Fig.1 Principle diagram of potentiometric measurement

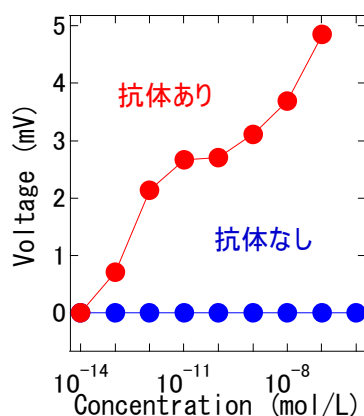


Fig.2 Results of potentiometric measurement

## 酸化カーボンナノチューブ固定化ろ紙電極による 抵抗測定バイオセンサの開発

### Development of Biosensor by Measuring the Resistance

#### of ox-CNT Immobilized Filter Paper

東京海洋大<sup>1</sup>, 産総研<sup>2</sup>, ライオン(株)<sup>3</sup>, 川原健慎<sup>1</sup>, 柴田恭幸<sup>1</sup>, 張民芳<sup>2</sup>, 吳海云<sup>1</sup>,  
遠藤英明<sup>1</sup>, 丸山由貴<sup>3</sup>, 大貫等<sup>1</sup>

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.<sup>1</sup>, AIST<sup>2</sup>, LION Co<sup>3</sup>

◦K. Kawahara<sup>1</sup>, T. Shibata<sup>1</sup>, M. Zhang<sup>2</sup>, H. Wu<sup>1</sup>, H. Endo<sup>1</sup>, Y. Maruyama<sup>3</sup>, H. Ohnuki<sup>1</sup>

E-mail: m234016@edu.kaiyodai.ac.jp

#### 【はじめに】

酸化カーボンナノチューブ(ox-CNT)は表面に COOH 基を多数有し、高い導電性があることからバイオセンサの材料として注目されている。我々は平面的な電極に比べ、ox-CNT の集積化された三次元的ファイバー構造の内部には、より多くのレセプター分子(抗体等)を担持させることが可能であり、高感度な免疫センサを構築できると考えている。本研究では ox-CNT をろ紙表面に固定化した材料を電極に使用することで、作製が容易で安価な抵抗測定バイオセンサの開発を目的としている。前回の報告では、コルチゾールを対象としたバイオセンサが開発可能であること、および抵抗上昇のメカニズムについて報告した。今回は同様の手法により、抗メラトニン抗体を固定化したメラトニンセンサを作製し、その性能をコルチゾールセンサと比較した。

#### 【実験方法】

吸引ろ過によって ox-CNT を固定化したろ紙を短冊状に切り取り、ろ紙の両端に導電性ペーストを塗り電気的接点を確保し CNT ろ紙電極とした。EDC/NHS カップリング反応を行い、COOH 基に抗コルチゾール抗体および抗メラトニン抗体を化学結合させバイオセンサとした。作製したセンサを異なる濃度のコルチゾール水溶液、メラトニン水溶液に浸漬させ、コルチゾールおよびメラトニンを吸着させた試料の電気抵抗を測定した。

#### 【実験結果】

抵抗測定で得られた各濃度の抵抗の変化率を Fig.1 および Fig.2 に示す。コルチゾール抗体、メラトニン抗体のどちらも濃度上昇とともに抵抗値の上昇が確認された。一方抗体を固定化していない試料では抵抗の上昇が小さかった。この上昇率の差は ox-CNT に固定化された抗体との

抗原抗体反応によって生じたと考えられる。Fig.1 および Fig.2 よりメラトニンの方が抵抗上昇率は高いが、コルチゾールの方が抵抗の上昇が安定していることが確認された。

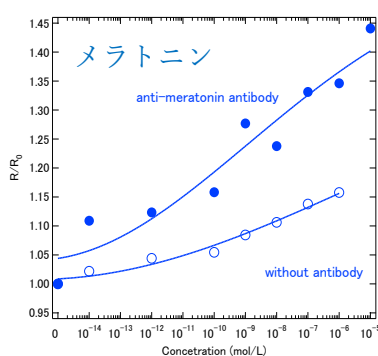


Fig.1 Experimental results of resistance change rate (melatonin)

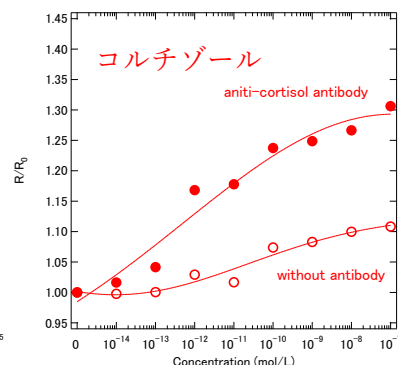


Fig.2 Experimental results of resistance change rate (cortisol)

## ox-CNT ろ紙電極によるコルチゾールバイオセンサの開発

### Development of ox-CNT Paper Based Electrode Biosensor for Detection of Cortisol

東京海洋大<sup>1</sup>, 産総研<sup>2</sup> ○松本歩樹<sup>1</sup>, 柴田恭幸<sup>1</sup>, 張民芳<sup>2</sup>, 呉海云<sup>1</sup>, 遠藤英明<sup>1</sup>, 大貫等<sup>1</sup>

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.<sup>1</sup>, AIST<sup>2</sup>

○A. Matsumoto<sup>1</sup>, T. Shibata<sup>1</sup>, M. Zhang<sup>2</sup>, H. Wu<sup>1</sup>, H. Endo<sup>1</sup>, H. Ohnuki<sup>1</sup>

E-mail: m244021@edu.kaiyodai.ac.jp

#### 【はじめに】

酸化カーボンナノチューブ(ox-CNT)はその高い導電性と、比表面積によって多くの抗体を ox-CNT 表面に固定できることから、バイオセンサの構成材料として注目されている。本研究ではろ紙上に ox-CNT を成膜した電極 (ろ紙電極) を使用し、安価で作製が容易なコルチゾールバイオセンサの実現を目指す。これまで我々は、ox-CNT 表面上の COOH 基を EDC/NHS 反応によって化学的に活性化した後、抗コルチゾール抗体を固定化してセンサを作製し、抗原抗体反応によってセンサとして利用する方法を研究してきた (Fig.1)。その結果、抗体を固定化したろ紙電極を用いることで、抗原抗体反応を電気化学インピーダンス法 (EIS 法) で検知するバイオセンサを構成可能であることが分かった。

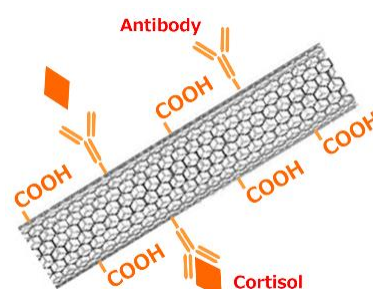


Fig.1 Configuration diagram of the electrode surface.

一方、ox-CNT 膜は三次元的な網目構造を有しており、深さ方向にも広がりのある電極構造であることから、通常の平面状の金属電極とはセンサ作製条件が大きく異なってくることが予想される。今回、抗体を固定化する時間を変化させることで EIS 法による測定感度がどのように変化するかを調べ、最も感度の高くなる抗体固定化時間を決定したので報告する。

#### 【実験方法】

ox-CNT 溶液を吸引ろ過で固定化したろ紙試料を、短冊状に切り出す。電気的接点を保護するため ox-CNT 面の一部に導電性ペーストを塗り、テフロンシート 2 枚で挟んで固定した。ox-CNT 面を EDC/NHS 試薬で活性化した後、抗コルチゾール抗体を化学結合させ、コルチゾールバイオセンサとした。このときの、抗コルチゾール抗体を固定化させる時間を 45 分、60 分、90 分、135 分で変化させてそれぞれセンサを作製した。作製したセンサは異なる濃度のコルチゾール水溶液と反応させた。反応前後で EIS 測定を行い、 $R_{ct}$  の変化率からセンサ感度を確認した。

#### 【結果】

EIS 測定で得られた抗体固定化時間による  $R_{ct}$  変化率の結果を以下に示す (Fig.2)。作製したセンサの中では抗体固定化時間が 60 分のときに最も感度が高くなり、コルチゾール溶液に浸漬させたときの変化率が 1.8 倍であった。

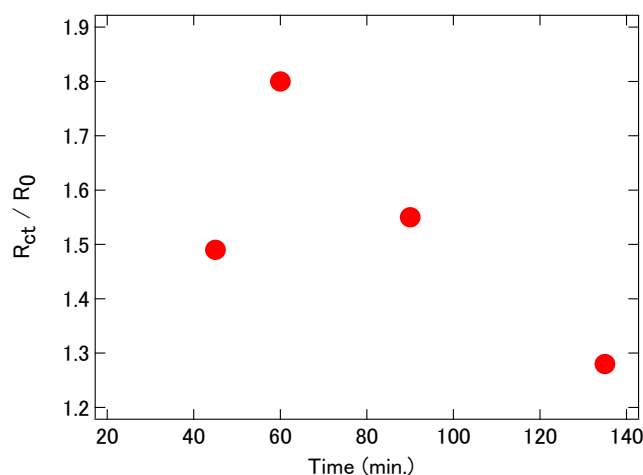


Fig.2 Dependence on immobilization period

## 複数流路式表面プラズモンセンサによる生体サンプルの安定的な測定 Stable measurement of biological samples using a multichannel surface plasmon sensor

芝浦工大 ○長房 遼河, 當麻 浩司

Shibaura Inst. of Technology

○Ryoga Nagafusa, Koji Toma

E-mail: k-toma@shibaura-it.ac.jp

### 【はじめに】

抗菌薬バンコマイシン(VCM)は治療域が狭く、高濃度では腎障害を引き起こすリスクを伴う。そのため、VCM の動態を詳細に把握することが重要であるが、従来の表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance, SPR)センサでは、生体サンプル内の夾雑物によりセンサ波形のベースラインにドリフトが発生し、VCM 測定感度が低下してしまう。そこで本研究では、生体サンプル内 VCM の高感度かつリアルタイム測定を目指し、複数の流路を同時に測定し、夾雑物によるドリフトを排除可能な 2 流路式表面プラズモンセンサの有効性を検証した。

### 【実験方法】

センサ基板の作製は、ガラス基板上に Ti (5 nm)と Au (48 nm)をこの順で成膜することで Au 基板を作製し、この基板表面に、VCM と特異結合するペプチドアプタマーを修飾した。本センサは、シリンダーレンズを介し近赤外光( $\lambda = 780$  nm)が半円筒プリズムに固定した Au 基板に集光し、SPR を励起する。反射光はシリンダーレンズを介しカメラで撮像され、Sample channel (Ch)と Reference Ch 間の SPR 角に該当する暗部の位置変化差分を解析することで、ドリフト除去及び分子測定を行った。センサ評価実験では、センサ感応部にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、VCM 溶液の順に送液し、VCM の結合を暗部の位置変化として検出した(Fig. 1)。また、生体サンプルとして human serum を採用し、PBS で希釈した human serum (20%, 40%), VCM 溶液の順に送液し、Sample Ch と Reference Ch 間の暗部の位置変化差分から夾雑物によるベースラインのドリフト除去を試みた。

### 【結果および考察】

センサ感応部に PBS を送液してベースラインを取得した後、VCM 溶液を送液したところ SPR による光吸収から VCM 濃度に応じた位置変化が得られた。希釈した human serum (20%, 40%)では、Sample Ch にドリフトが見られたが、Reference Ch との差分解析によりドリフトを除去し、VCM 溶液の送液時は VCM 濃度に応じた位置変化が得られた。一方 human serum (100%)では、ベースラインのドリフトの除去は行えたが、VCM 溶液送液時に不安定な出力が確認され、安定した結果を得ることが出来なかった。以上、本研究では、多剤試料の同時測定や生体サンプル内での VCM の安定したリアルタイム測定の可能性が示された。今後は、human serum (100%)における VCM 測定条件の最適化を検証していく。

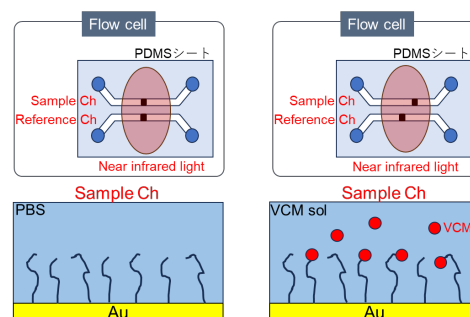


Fig. 1 Schematic illustration of the SPR sensor system

# 単一細胞の誘電特性測定を目的とした周波数スイープ 絶縁体ベース誘電泳動

## Frequency-Sweep Insulator-Based Dielectrophoresis for Measuring Dielectric Properties of Single Cells

呉高専<sup>1</sup>, 佐賀大シンクロトン<sup>2</sup> ◯濱野 智至<sup>1</sup>, 江口 正徳<sup>2</sup>

Kure Natl. Col Tech<sup>1</sup>, Saga Univ.<sup>2</sup> ◯Satoru Hamano<sup>1</sup>, Masanori Eguchi<sup>1</sup>

E-mail: S24-duys@kure.kosen-ac.jp

### 1. はじめに

誘電泳動 (DEP) とは, 不均一電界下の細胞が移動する電気現象の一つであり, 非接触で細胞の誘電特性を分析できる手段として注目されている. 誘電泳動によって, 電界の強い方向および弱い方向に細胞が移動する現象をそれぞれ「正の誘電泳動 (pDEP)」, 「負の誘電泳動 (nDEP)」と呼ぶ. これらの現象は, 細胞と溶媒の誘電特性に依存しており, 細胞はその構造や状態に応じた固有の誘電特性を持つことが知られている. この特性を利用することで本研究では, 単一細胞の誘電特性を測定することが可能な周波数スイープ絶縁体ベース誘電泳動法を提案し, 単一細胞を用いてその有用性を明らかにしたので, 報告する.

### 2. 実験方法

本実験では, Fig.1 に示す絶縁体ベース誘電泳動 (iDEP: Insulator-based dielectrophoresis) デバイスを用い, HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞株) の挙動を観察した. iDEP デバイスは, クリークギャップ形状の絶縁体厚膜 (厚み  $70\ \mu\text{m}$ ) を対向させ, その両端に四十極電極を配置した構造である. ショ糖等張液 (8.75% w/v) にリン酸緩衝生理食塩水を添加して溶液に HEK293 細胞を分散し, その分散液を iDEP デバイス上に滴下した. また, デバイス上の四十極電極には, 交流信号発生器 (NF 社 WF1968) を用いて, 印加電圧  $20\ \text{V}_{\text{pp}}$ , 周波数を  $1\ \text{kHz}$  から  $1\ \text{MHz}$  まで毎秒  $1110\ \text{Hz}$  で線形に周波数スイープさせて交流電圧を印加し, その時の細胞の挙動をデジタル顕微鏡 (KEYENCE 社 VW-9000) で観察した.

### 3. 結果と考察

観察結果を Fig.2 に示す. HEK293 細胞は周波数スイープ開始後 80 秒まで絶縁体間隔が広い, つまり電界の弱い方向に移動し, それ以降

は電界の強い方向に移動した. 以上のことから溶液中の HEK293 細胞には, 周波数  $1\ \text{kHz}$  から  $89.8\ \text{kHz}$  までは負の誘電泳動力が,  $89.8\ \text{kHz}$  から  $256.3\ \text{kHz}$  では正の誘電泳動力が発生していることがわかった.

### 4. おわりに

本研究では, iDEP デバイスと周波数スイープを組み合わせた単一細胞誘電特性測定法を提案した. 提案手法は, 単一細胞の誘電特性を高速に測定することが可能である.

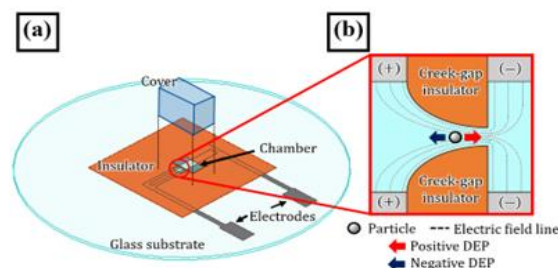


Fig1. Illustrations of iDEP creek-gap device.

(a) The isometric view of entire device.

(b) The enlarged top view of the chamber.

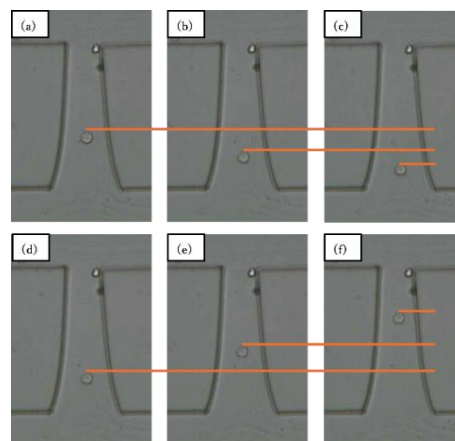


Fig2. The behavior of HEK293 cell undergoing frequency-sweep DEP

(a)  $t = 0\ \text{s}, f = 1\ \text{kHz}$ . (b)  $t = 40\ \text{s}, f = 45.4\ \text{kHz}$ .

(c)  $t = 80\ \text{s}, f = 89.8\ \text{kHz}$ . (d)  $t = 130\ \text{s}, f = 145.3\ \text{kHz}$ .

(e)  $t = 180\ \text{s}, f = 200.8\ \text{kHz}$ . (f)  $t = 230\ \text{s}, f = 256.3\ \text{kHz}$ .

## 抗原抗体反応を用いたメラトニンセンサの開発 II

### Development of Melatonin Biosensor Using Antigen-antibody Reaction II

東京海洋大学

○岡泉飛勇, 柴田恭幸, 呉海云, 遠藤英明, 大貫等

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.

°H. Okaizumi, T. Shibata, H. Wu, H. Endo, H. Ohnuki

E-mail: m234012@edu.kaiyodai.ac.jp

【はじめに】我々は、睡眠サイクルを司るホルモンであるメラトニンを簡易的かつ高感度に検出できるセンサの開発を目指している。体液中のメラトニン濃度は1日を周期として変化し、そのサイクルは睡眠障害、糖尿病、がんなどによって乱れることが知られている。メラトニンの日常的な計測によりその変化を捉えれば、これらの疾患の早期発見やその進行のモニタリングをすることができるからである。この目的のため、我々は採取が容易な唾液に存在するメラトニン濃度 ( $10^{-12}$  mol/L  $\sim$   $10^{-10}$  mol/L) を検知するセンサの開発を行っている。しかし、従来の簡易計測法であるサイクリックボルタンメトリー法では検出が困難な低濃度領域にあることが問題となっている。前回の報告では、メラトニンの抗原抗体反応を電気化学インピーダンス法で検出することで (Fig. 1)、非常に低濃度領域 ( $10^{-14}$  mol/L  $\sim$   $10^{-10}$  mol/L) のメラトニン検出が可能であることを示した。一方、唾液中にはメラトニン以外の物質も数多く含まれているため、センサの選択性も重要なファクターである。そのため今回の報告では、選択性に関する実験を行い、夾雑物質への対応を検討した。

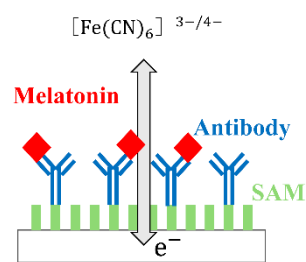


Fig.1 Schematic picture of electrode surface

【実験方法】作用極上に自己組織化単分子膜 (SAM) の成膜を行い、抗メラトニン抗体を化学結合させてメラトニンセンサとした。EIS 法による抗原抗体反応の評価では、反応量が多いと電極とレドックスプローブの電荷の受け渡しに伴う電荷移動抵抗 ( $R_{ct}$ ) の増加し、 $R_{ct}$  の増加を信号として検出することができる (Fig.1)。作製したセンサを測定対象の試料液体に浸漬し、反応後の試料を EIS 測定により  $R_{ct}$  の変化率をシグナルとした。選択性の検証実験としては、メラトニンと同様に唾液中に含まれる低分子ホルモンであるコルチゾールに対する応答を調べた。濃度の異なるコルチゾール溶液に浸漬してセンサの  $R_{ct}$  変化率を計測し、メラトニンへの浸漬結果と比較した。どちらの物質も唾液中に存在する最高濃度まで調べた。

【結果】作製した試料の濃度依存性を Fig.2 に示す。コルチゾールに浸漬した試料では、メラトニンに浸漬した試料と比較すると、 $R_{ct}$  の増加は見られない。このふるまいの違いは、コルチゾールがセンサ表面に固定化された抗メラトニン抗体と抗原抗体反応しないためであろうと考えられる。この結果より、センサには選択性があることが分かる。

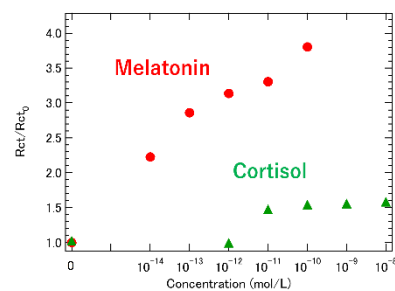


Fig.2 Concentration dependence of  $R_{ct}/R_{ct0}$

## LAPS 用 K<sup>+</sup> 選択性 PVC 膜の中間層としての ODTS SAM

### ODTS SAM as intermediate layer for K<sup>+</sup> selective PVC membranes for light-addressable potentiometric sensors

京工織大・電気電子<sup>1</sup>、東北大・工<sup>2</sup>・医工<sup>3</sup>

○(M1) 松本 晏奈<sup>1</sup>, 宮本 浩一郎<sup>2</sup>, 吉信 達夫<sup>3</sup>, Carl Frederik Werner<sup>1</sup>  
 Kyoto Inst. Tech. Electronics<sup>1</sup>, Tohoku Univ. Engineering<sup>2</sup>, Biomedical Engineering<sup>3</sup>  
 ○A. Matsumoto<sup>1</sup>, K. Miyamoto<sup>2</sup>, T. Yoshinobu<sup>3</sup>, C. F. Werner<sup>1</sup>

E-mail: werner@kit.ac.jp

[緒言] 昨今では、化学センサの重要性が大きくなっていることから、分析機器とは異なり迅速、連続あるいはその場での計測や分子認識機能が優れたセンサ材料の開発に重点が置かれてきた。我々は前回、化学イメージングセンサである LAPS (Light-addressable potentiometric sensor) の界面測定部にカリウムイオノフォアであるバリノマイシンを有したカリウムイオン感応 PVC 膜を作製することによるカリウムイオン検出を試みた。LAPS は半導体層に光を照射した際の照射範囲を測定範囲としており、複数点での計測によりイオン濃度分布の可視化などを可能にしている。絶縁体の界面に吸着した測定対象イオンの活性に依存する光電流信号を励起することでイオン検出を行う[1]。本研究では、LAPS の界面測定部に ODTS (Octadecyltrichlorosilane) と呼ばれる自己組織化単分子膜を作成し、その上部にカリウムイオン感応 PVC 膜を固定することによる検出精度向上を検討した。

[実験内容・結果] LAPS 測定表面である Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> にピラニア洗浄を施してシラノール基を形成した後、ODTS-SAM 膜を気相蒸着させた。Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> は親水性であるが ODTS 作製部分はより PVC 膜に近い疎水性であることを確認した (Fig. 1)。ODTS により表面電位が変化したことが遷移領域の変化により確認でき (Fig. 2)、イオン濃度に依存する I/V 曲線の変曲点電圧のシフト量により感度を算出したところ PVC 膜のみの場合より優れた 54.3mV/pK の感度が得られた (Fig. 3)。この結果より ODTS を Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>、PVC 膜間に作製することがカリウムイオン選択性の向上に寄与していると考えられる。

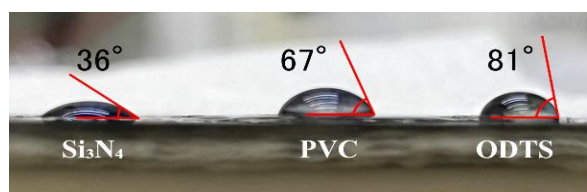


Fig. 1 : Contact angle of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, PVC, ODTS

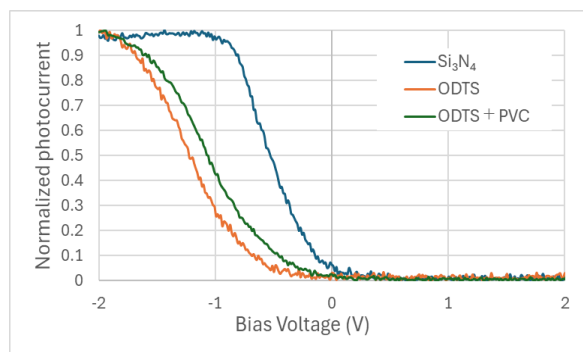


Fig. 2 : Normalized I/V curves at pH8 for Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, ODTS, PVC

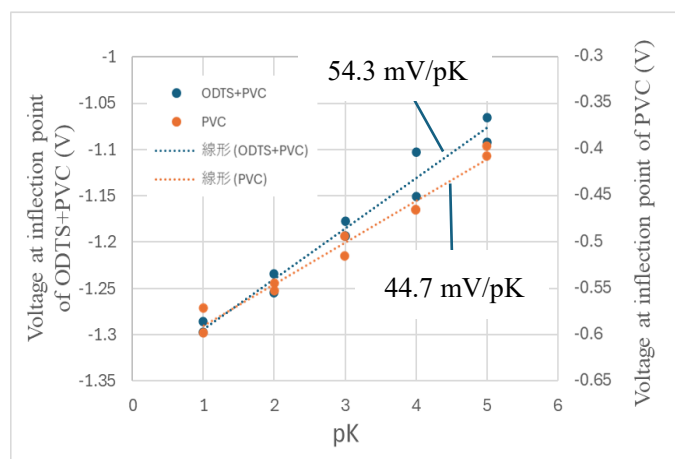


Fig. 3 : K<sup>+</sup> ion sensitivity of PVC membrane with and without intermediate ODTS layer

#### [参考文献]

[1] T. Yoshinobu, S. Krause, K. Miyamoto, C. F. Werner, A. Poghossian, T. Wagner, M. J. Schöning, Label-Free Biosensing : Advanced Materials, Devices and Applications, Springer, Cham, 2018, 103-132

本研究は科研 23K23368 の助成を受けて行われた。

# 排泄ケアが必要な方の便失禁をガスセンサで検出するためのにおい成分 Odor Components for Detecting Fecal Incontinence in People who Need Continence

## Care with a Gas Sensor

新東工業<sup>1</sup>, 名古屋市立大学<sup>2</sup> ○鈴木 誉久<sup>1</sup>, 窪田 泰江<sup>2</sup>

SINTOKOGIO, LTD.<sup>1</sup>, Nagoya City Univ.<sup>2</sup>, °Yoshihisa Suzuki<sup>1</sup>, Yasue Kubota<sup>2</sup>

E-mail: yoshi-suzuki@sinto.co.jp

日本における2023年の65歳以上の高齢化率は29.1%であり、そのうち75歳以上人口は16%を超え、その割合は増加している。後期高齢者の増加とともに、今後、身体機能の低下や病気などによって支援を必要とする高齢者が増加し、介護や看護をはじめ様々な分野で深刻な問題が発生することが推測される。その一つに排泄ケアがあり、介護する側、介護される側共通の重要課題である。排泄機能が低下すると、おむつ交換作業、清拭作業、清掃作業、におい発生など、様々な問題を引き起こす。特に水様便は、水分を多く含み、角質層を損傷させるタンパク質分解酵素や脂肪分解酵素を多く含むため、放置すると、皮膚炎、褥瘡、感染症が発症する可能性が高まり、また、寝具への汚染被害が拡大して清掃や交換などの作業も増大する。私たちは、これまで要介護高齢者の便失禁を検知する手法に関して報告してきた。一方、排泄ケアが必要な方は、高齢者のみならず、新生児、乳幼児、重度身体障がい者など全年齢に存在し、その方々も排便後の早期ケアが重要となる。便失禁をガスセンサで検知するうえで、便のにおい成分の特徴を把握することは検知性能を向上するために重要である。今回、新生児から壮年までの排泄ケアが必要な方を対象とし、便のにおい成分の特徴からガスセンサで便失禁を検出する手法を検討した。

まず排泄ケア後の廃棄オムツを回収して速やかに一次サンプリングバッグの中に入れて放置し、その後一次サンプリングバッグ内に充満したガスを成分分析用サンプリングバッグに採取する。採取したサンプリングバッグのガスは、まず液体酸素で冷却した捕集管を通して捕集し、その捕集管をヒーターで加熱して脱着したガスをガスクロマトグラフ（装置：島津製作所 GC-2014、検出器：FPD）で分析した。

Fig.1 は、硫化水素濃度の年代依存性を示す。1歳未満の群では離乳食を喫食していたため、離乳食以降の全年齢層で、硫化水素が発生していることが分かる。本結果は、離乳食以降の排便をガスセンサで検知する場合、硫化水素に反応するガスセンサを選定すると同じ条件で使用できることを示唆する。

なお、回収したオムツを使用した方の年齢は、倫理審査委員会の承認を得たうえでご家族の同意が得られた方のみを対象として確認した。

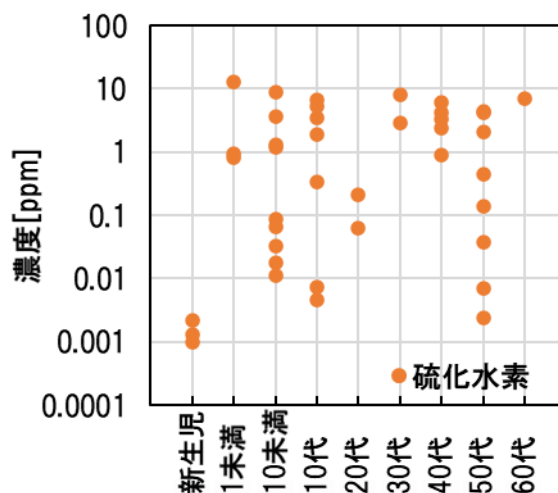


Fig.1 硫化水素濃度の年代依存性

## 放屁情報から生体情報を推測するためのセンサシステムの開発

### Development of a Sensor system for Estimating Biological Conditions from Flatus Information

新東工業<sup>1</sup>, 藤田医科大学<sup>2</sup> ○鈴木 誉久<sup>1</sup>, 井伊 卓真<sup>2</sup>, 田辺 茂雄<sup>2</sup>, 大高 洋平<sup>2</sup>  
 SINTOKOGIO, LTD.<sup>1</sup>, Fujita Health Univ.<sup>2</sup>, °Yoshihisa Suzuki<sup>1</sup>, Takuma Ii<sup>2</sup>, Shigeo Tanabe<sup>2</sup>,  
 Yohei Otaka<sup>2</sup>  
 E-mail: yoshi-suzuki@sinto.co.jp

日本における2023年の65歳以上の高齢化率は29.1%であり、そのうち75歳以上人口は16%を超え、その割合は増加している。後期高齢者の増加とともに、今後、身体機能の低下や病気などによって支援を必要とする高齢者が増加し、介護や看護をはじめ様々な分野で深刻な問題が発生することが推測される。その一つに排泄ケアがあり、介護する側、介護される側共通の重要課題である。これまで要介護高齢者の便失禁を検知する手法に関して報告してきた。一方便失禁には放屁が伴うことがある。放屁は腸内ガスが放出されたガスであるが、腸内ガスに含まれる成分には、腸内細菌が生成し疾病との相関がある成分がある[1,2]。便失禁を検知するセンサで放屁を分析し生体状況を推測することができれば、簡易的に継続して体調を管理することができる。今回、放屁成分を分析するガスセンサを検討した。

ガスセンサとして、放屁に多く含まれる成分に主に反応する、CO<sub>2</sub>センサ（光音響分光方式）、O<sub>2</sub>センサ（電気化学方式）、H<sub>2</sub>センサ（電気化学方式）を選定した。応答特性と干渉特性は、サンプリングバッグの中にセンサを設置し、バッグ内を脱気後、単一成分の基準ガス、混合成分ガス（N<sub>2</sub>ベース）を200cc注入して測定した。Fig.1に単一ガス（主に反応する成分）による応答特性を一例として示す。線形的に反応していることが分かる。干渉特性に関しては、H<sub>2</sub>センサはCO<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>による影響はなく、O<sub>2</sub>センサはH<sub>2</sub>の影響を受けるがCO<sub>2</sub>の影響はなく、CO<sub>2</sub>センサはO<sub>2</sub>の影響を受けるがH<sub>2</sub>の影響はなかった。そして濃度依存特性から、各ガスの濃度に換算できることを確認した。

[1] Yuta Fujiki 他 「Hydrogen gas and the gut microbiota are potential biomarkers for the development of experimental colitis in mice」 Gut Microbiome, Vol. 5, 2024, e3

[2] Kyle J Berean 他 「The safety and sensitivity of a telemetric capsule to monitor gastrointestinal hydrogen production in vivo in healthy subjects: a pilot trial comparison to concurrent breath analysis」 Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 48(6), pp646-654 (2018)

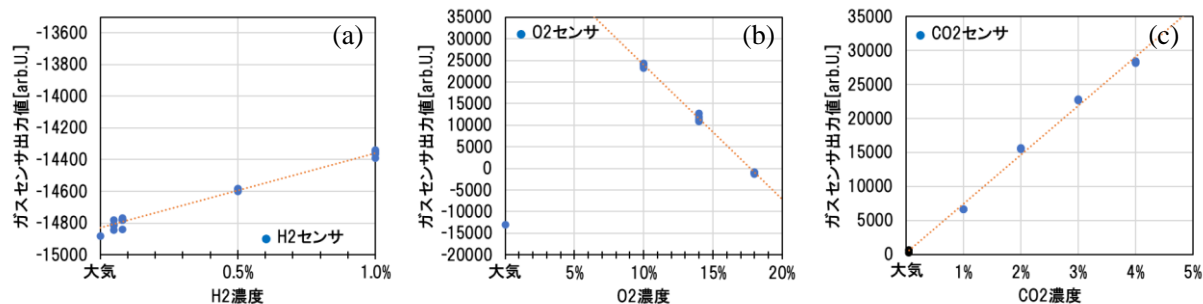


Fig.1 ガスセンサ出力の単一ガス濃度依存性 ((a)H<sub>2</sub>センサ, (b)O<sub>2</sub>センサ, (c)CO<sub>2</sub>センサ)

# パリレンで被覆した イオン液体ゲートグラフェン電界効果トランジスタを用いた 硝酸態窒素ガスセンシング

## Nitrate-Nitrogen Gas Sensing Using Ionic Liquid-Gated Graphene Field-Effect Transistors Coated with Parylene.

信大繊維<sup>1</sup>, 農研機構<sup>2</sup>, 産総研<sup>3</sup>, (M2)今泉陵<sup>1</sup>, 白石直規<sup>2</sup>, 魯健<sup>3</sup>, 木村睦<sup>1</sup>

Faculty of Textile Science and Technology Shinshu Univ<sup>1</sup>, National Agriculture and Food Research Organization (NARO)<sup>2</sup>, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)<sup>3</sup>,  
E-mail: 23fs403f@shinshu-u.ac.jp

### 1. 序論

グラフェンは、シリコンに比べて高いキャリア移動度を有し、その表面に生じる変化に対して敏感に抵抗の変化を示す。グラフェン電界効果トランジスタ (GFET) は、印可された電界に対し両極性の伝導特性を示し<sup>1</sup>、ゲート電圧 ( $V_G$ ) の変化に伴い、ピーク電圧を中心として正負方向に対称的に電流が増大する。この特性を利用することで、グラフェン表面への分子吸着をピーク電圧のシフトを通じて高感度に追跡することが可能だ。さらにイオン液体を組み合わせたイオン液体ゲート GFET (ILGFET) では、イオン液体が電気二重層を形成して絶縁層として機能し、低電圧での駆動が可能であると報告されている<sup>2</sup>。

また Poly-(chloro-p-xylylene) (以後パリレン C) はフェニル環に結合した Cl 原子の極性により高極性なガス分子への分子間力バリア性を持つと分かっていることから防湿性があると予想された<sup>3</sup>。かつ化学気相成長法 (CVD 法) を用いることで液体表面に成膜できることが知られている。

我々の研究では ILGFET を用いて土壌水中に含まれる硝酸態窒素濃度をセンシングすることを目的として、異種ガスへの ILGFET の応答に対して有機高分子を複合した際の影響を報告する。

### 2. 実験内容

Fig. 1 に実験に用いた GFET チップの構造を我々の既報論文<sup>4</sup> から示す。イオン液体は [PMIM][BF<sub>4</sub>] を用いた。ILGFET を 30 × 30 × 20 cm のチャンバー内に設置し、水もしくは硝酸態窒素標準液を蒸発させた。計測は市販されているソースメータにより  $V_G$  を -1V ~ 1V で掃引し、ソースドレイン間電流 ( $I_{ds}$ ) 値の変化を計測した。有機高分子膜は CVD 法により、0.5 g のパリレン C を蒸着した。

### 3. 結果

ILGFET チップの鳥観図を Fig. 2 に示した。IL 成膜は金属チップ面積の半分になるようにした。IL だけでは 4 時間後には滲んだ (a) のに対して膜厚 320 nm のパリレン C を成膜した (b) は 24 時間後でも全てのチャンネルで形状を保っている様子が観察できた。

純粋な水蒸気や硝酸を混ぜた水蒸気への曝露によるトランスファーカーブのピーク変化を Fig. 3 に示した。IL のみのものではトランスファーカーブに変化がみられたが、パリレン C で被覆したものでは変化がほとんど見られなかった。硝酸を混ぜた水蒸気に対しても曝露させたが、同じく IL のみで見られていたピーク変化がほとん

ど見られなかった。

### 4. 結論

ILGFET へのパリレン C 成膜はガス透過量を減少させ応答がみられなくなることが分かった。発表ではパリレン C に他の高分子を混ぜることで、ガスセンシングの選択性向上について議論したい。

### 5. 参考文献

- (1) Novoselov, K. S. et al., *Science* **2004**, 306 (5696), 666-669.
- (2) Inaba, A.; Yoo, K.; Takei, Y.; Matsumoto, K.; Shimoyama, I., *Sensors and Actuators B-Chemical* **2014**, 195, 15-21.
- (3) Yeh, Y.; James, W.; Yasuda, H., *JOURNAL OF POLYMER SCIENCE PART B-POLYMER PHYSICS* **1990**, 28 (4), 545-568,
- (4) Lu, J.; Shiraishi, N.; Imaizumi, R.; Zhang, L.; Kimura, M., *Sensors* **2024**, 24 (19), 6376.

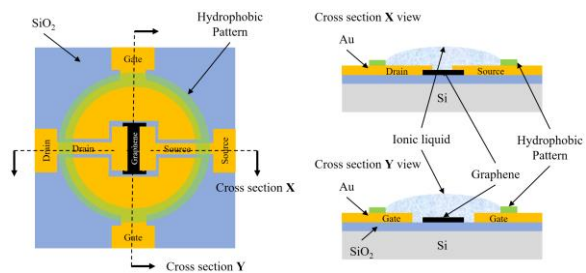


Fig. 1 Top view (a) and cross-sectional view (b) of the ILGFET. The channel size is  $W: 50 \mu\text{m} \times L: 10 \mu\text{m}$ . In this study, a chip without a hydrophobic pattern was used.

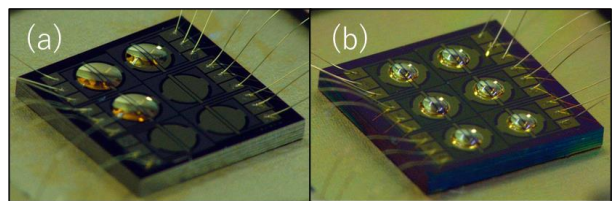


Fig. 2 (a) IL-FET image 4 hours after IL deposition only, and (b) IL-FET image 24 hours after IL + Parylene C deposition

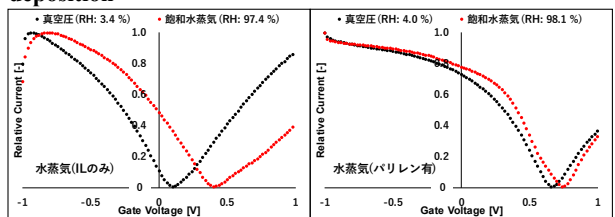


Fig. 3 Transfer curves before (black) and after (red) exposure to pure water vapor.

## イオン電流によるマイクロミキサーの評価法の開発

### Development of Ionic Current-Based Method for Micromixer Characterization

九大工<sup>○</sup>梁逸偉, 金子知輝, 加地範匡

Kyushu Univ.,<sup>○</sup>lat Wai Leong, Tomoki Kaneko, Noritada Kaji

E-mail: leong@cstf.kyushu-u.ac.jp

脂質ナノ粒子 (LNP) を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS) において、10 nm 単位での粒子径制御は次世代ナノメディシン開発における重要な課題である。マイクロミキサーは微細流体技術を用いた混合手法として、ナノスケールのバイオメディカル工学分野の発展に大きく貢献している。より精密な混合制御による LNP の粒径制御を実現するため、混合効率の評価手法の確立が不可欠である。従来、エタノール相と水相の混合の初期段階における過程は顕微鏡観察等により評価されてきたが、操作が煩雑である課題があった。本研究では、イオン電流測定による高精度なマイクロミキサーの混合挙動のモニタリング手法を提案し、LNP 製造における粒径制御の精度向上を目指した。イオン電流は微細流路内における局所的なイオン輸送特性を反映し、特に水相入口から初期混合領域までの高抵抗領域における混合挙動を直接評価することが可能である (Figure 1)。

実験部分では、Y 字型、iLiNP 型<sup>(1)</sup>などのマイクロ流路 (Figure 1) を使い、2 台のシリンジポンプによりエタノール相と水相の流速を制御した。水相の入口と流路出口に Pt 電極を配置し、混合過程におけるイオン電流を測定した。水相とエタノール相の流速比、印加電圧、および総流速が混合効率に与える影響を評価し、イオン電流の安定性と作製した LNP 粒径分布の相関を検討した。さらに、マルチフィジックスシミュレーションを用いてイオン電流と混合状態の相関解析を行った。本研究で確立したイオン電流評価法は、金属ナノ粒子合成等、様々な混合プロセスへの応用が期待される汎用的な評価手法である。

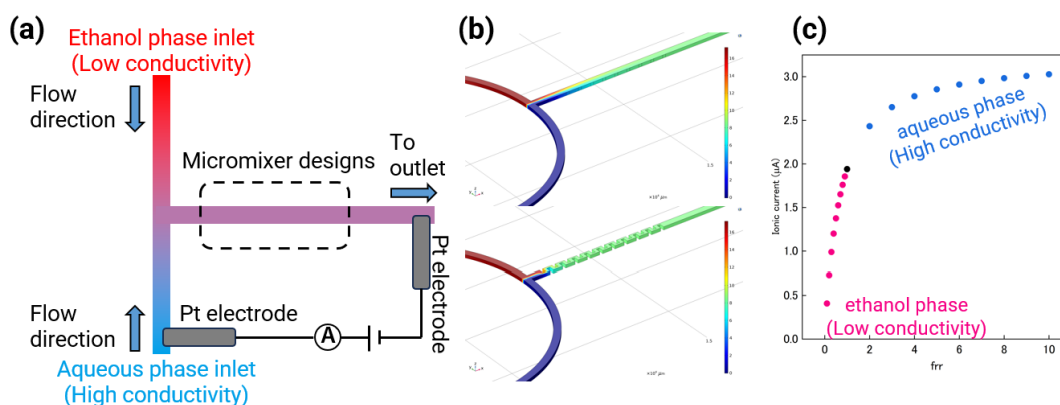


Figure 1. Schematic illustration of ionic current measurements. (a) System overview showing ionic current measurements between the aqueous phase inlet and outlet for monitoring micromixer stability and LNP synthesis performance. (b) Mixing behavior under various microchannel designs simulated using computational fluid dynamics. (c) Simulation results showing the relationship between flow rate ratio (FRR, ratio of aqueous to ethanol phase) and ionic current.

参考文献: (1) *ACS Omega* 2018, 3, 5, 5044–5051