

平成 29 年度 博士論文

昆虫嗅覚受容体発現細胞と FET を融合した  
高機能バイオハイブリッド匂いセンサシステム

指導教員 神崎 亮平 教授

東京大学大学院

工学系研究科 先端学際工学専攻

学籍番号 37157158

照月 大悟

# 目次

## 第1章：序論

- 1.1 本研究の背景
  - 1.1.1 社会的背景
  - 1.1.2 技術的背景
- 1.2 生物機能の利用
- 1.3 高機能な匂いセンサシステムの構築
  - 1.3.1 センサ細胞の匂い応答の電気信号による検出
    - 1.3.1.1 昆虫嗅覚受容体を利用した匂いセンサ
    - 1.3.1.2 電気信号検出の着想に至った経緯
    - 1.3.1.3 電気信号検出インターフェース
  - 1.3.2 気中の匂い物質の溶解技術
    - 1.3.2.1 気中の匂い物質検出の難点と重要性
    - 1.3.2.2 気液界面制御による溶解技術
  - 1.3.3 電気信号検出と匂い物質溶解技術の関係
- 1.4 本研究の目的
- 1.5 本論文の構成

## 第2章：センサ細胞の応答原理と蛍光計測

- 2.1 センサ細胞
  - 2.1.1 昆虫嗅覚受容体
  - 2.1.2 Sf21 細胞
  - 2.1.3 センサ細胞の検出原理
  - 2.1.4 センサ細胞の匂い検出性能

## 2.2 センサ細胞の蛍光計測

### 2.2.1 匂い物質の作成

### 2.2.2 蛍光応答測定系と測定手順

### 2.2.3 蛍光強度変化量解析

## 2.3 まとめ

# 第3章：電気信号による匂い応答検出デバイスの開発

## 3.1 既存の細胞応答検出デバイス

### 3.1.1 BioCMOS テスター

### 3.1.2 BioCMOS テスターによる応答計測

#### 3.1.2.1 実験条件

#### 3.1.2.2 実験結果と考察

## 3.2 センサ細胞の匂い応答検出に特化したデバイスの設計

### 3.2.1 設計方針

### 3.2.2 FET の設計

### 3.2.3 伸長ゲート電極の設計

### 3.2.4 電極表面の設計

### 3.2.5 チャンバーの構築

## 3.3 デバイスの洗浄性検討と洗剤選択

## 3.4 デバイスに対するセンサ細胞の適合性

### 3.4.1 アルミニウム材料の細胞への影響検討

### 3.4.2 電極材料上での蛍光計測

### 3.4.3 HEK293T 細胞との細胞成長比較

### 3.4.4 電極材料上での細胞直径の検討

3.5 考察

3.6 まとめ

## 第4章：電気信号による匂い応答検出

4.1 設計したデバイスによるセンサ細胞の匂い応答検出

4.1.1 実験条件

4.1.2 実験結果

4.2 デバイスの再使用性の検討

4.3 測定環境の改善

4.4 センサの高感度化

4.5 PMOS デバイスによる検出

4.6 センサの安定性検討

4.6.1 センサの偽応答問題

4.6.2 センサの偽応答問題への対策

4.7 Odor-Sensitive Field Effect Transistor (OSFET)

4.8 実験結果の BCT 測定へのフィードバック

4.9 NMOS と PMOS の同時計測

4.10 考察

4.10.1 電極サイズの影響

4.10.2 検出された信号変化方向の違い

4.10.3 同時計測時のドレイン電流の乱れと対策

4.11 まとめ

## 第5章：細胞-デバイス界面の観察と分析

- 5.1 細胞-デバイス界面観察の意義
- 5.2 細胞-デバイス界面観察の先行研究
  - 5.2.1 Focal adhesion
  - 5.2.2 細胞-デバイス界面観察
- 5.3 Sf21 細胞の接着状態観察
  - 5.3.1 Sf21 細胞-デバイス界面の重要性
  - 5.3.2 界面観察方法の選択
  - 5.3.3 顕微鏡試験片の固定
  - 5.3.4 クロスセクションポリッシャ (Cross Section Polisher)
- 5.4 電極上のセンサ細胞の観察結果
- 5.5 Sf21 細胞-デバイス界面の Cleft 分析
  - 5.5.1 画像処理方法
  - 5.5.2 断面試料観察結果
  - 5.5.3 Cleft 距離測定結果
- 5.6 考察
  - 5.6.1 センサ細胞-デバイス間の cleft 距離
  - 5.6.2 神経細胞と電気デバイスの信号検出モデル
    - 5.6.2.1 Hodgkin-Huxley equation
    - 5.6.2.2 Point-contact model
    - 5.6.2.3 先行研究における細胞-デバイス間結合状態
  - 5.6.3 センサ細胞と電気デバイスの信号検出モデル
    - 5.6.3.1 キャパシティブカップリングモデル
    - 5.6.3.2 モデル構築の制約

5.6.3.3 キャパシティブカップリングの意義

5.7 まとめ

## 第6章：気中の匂い物質の高効率な溶解技術の開発

6.1 目的

6.2 ウルトラファインバブルを用いた溶解技術

6.2.1 ファインバブルの歴史

6.2.2 ウルトラファインバブルの特徴

6.3 気中の匂い物質の溶解

6.3.1 ウルトラファインバブルの生成と観察

6.3.2 溶解する匂い物質と分析

6.3.3 実験装置

6.4 実験結果

6.4.1 溶解効率の比較

6.4.2 低濃度気体からの溶解能力検討

6.4.3 溶解サンプルを用いたセンサ細胞の応答測定

6.4.4 ナノサイトによる溶解サンプルの測定

6.5 溶解サンプルの匂い物質保持性

6.6 昆虫嗅覚受容体とウルトラファインバブルの相互作用

6.7 溶解サンプルを用いた電気計測

6.7.1 実験条件

6.7.2 実験結果と考察

6.8 まとめ

## 第7章：結論

7.1 本研究のまとめ

7.2 本研究の貢献

## Appendix

A1. 気体 1-octen-3-ol の ppm 単位への変換

A2. Abbreviations

A3. Copyright permissions

参考文献

研究業績

謝辞

# 第 1 章：序論

## 1.1 本研究の背景

### 1.1.1 社会的背景

バイオテクノロジーを用いた健康、医療、安全・安心、農業・食品等に関する諸問題の解決と産業振興を目指す「バイオエコノミー」の Vision や戦略が欧米を中心に発表されている [OECD, 2009]. 例えば英国では、自然界の生物が持たない人工的な遺伝子の導入や生産性向上を目指した設計を行う、合成バイオの実用化を加速し、2030 年までの合成生物学のロードマップを作成して産学官を挙げたバイオエコノミーへの取り組みを推進している。米国でもバイオマスの利用を通じてバイオエコノミーに取り組んでおり、2030 年の世界市場規模は 200 兆円と予測されている [日本バイオ産業人会議, 2016].

日本では、健康・医療、ものづくり、農林水産業・食糧など幅広い分野において、2030 年に想定されるバイオテクノロジーの経済効果は 40 兆円と見積もられている。また、スマートセルインダストリーとも呼ばれる、優れた微生物・培養細胞・植物・昆虫など用いた新しいものづくり技術の実用化に向けた取り組みが、経済産業省を中心に企業・大学を巻き込んで進められている [経済産業省商務情報政策局, 2016]. この潮流において、日本が合成バイオを基盤としたビジネスチャンスの創出と国際的イニシアチブの獲得が強く期待される。

バイオテクノロジーに対する期待とその技術の急速な進展の中で、生物機能を引き出し、それを直接利用することによってこれまで解決できなかった課題に対応することが可能となってきた。この潮流において、バイオテクノロジーの中でも、昆虫テクノロジーに関わる市場・技術の 10 年後のあるべき姿、Vision を社会と共有すべく、昆虫テクノロジー・ロードマップが提案されている (図 1.1 [光野 et al., 2017]).

## 1.1.2 技術的背景

ロードマップの中で示された、直近の昆虫テクノロジーに期待される技術の1つとして、センシング技術が挙げられる。2020年頃までを目処とした場合、「環境情報の高感度・高選択・リアルタイム計測」と、「気中の物質検出技術・生体情報の高感度、高選択」の構築が必要となり、具体的な検出対象として「匂い」が想定される。ロードマップの該当箇所を記述したものを図1.2に示す。

例えば、日本が迎える超高齢化社会や在宅医療患者の増加に備え、医療費抑制を図る呼気や尿の匂いを用いた簡易的な病気診断システムが求められる。東京オリンピック開催決定に伴う、空港など公共機関における爆発物・麻薬検査等のセキュリティ分野においては使役犬の作業を補う匂い物質の検出システムが必要となる。また、浄水場や飲料水に含まれるカビ臭を短時間で簡易に検出するシステムなども、水道事業者を中心にニーズがある。ガスセンサの世界市場は2023年に12億9760万ドルに拡大することが見込まれており [リサーチステーション合同会社, 2017]、匂いセンサの市場も拡大することが予想されるこのように、環境中の多様な匂い物質を高感度にリアルタイムで検出する技術に対して、社会からのニーズは非常に大きい。

匂い検出の幅広いニーズについて記述したが、それに答える匂いセンシング技術の開発には検討すべき課題が多く残る。これまでに水晶振動子や金属酸化物半導体など、工学技術に基づく匂いセンサの開発が進められ、その一部は実用化されつつある。しかし、センサの検出感度、選択性、検出速度、検出可能な匂い物質の種類、サイズ、コストなど改善すべき点は多い [Arshak et al., 2004]。これら工学技術に基づく匂いセンサの課題を解決するため、生物の嗅覚機能を直接利用した匂いバイオセンサ開発が進展している。

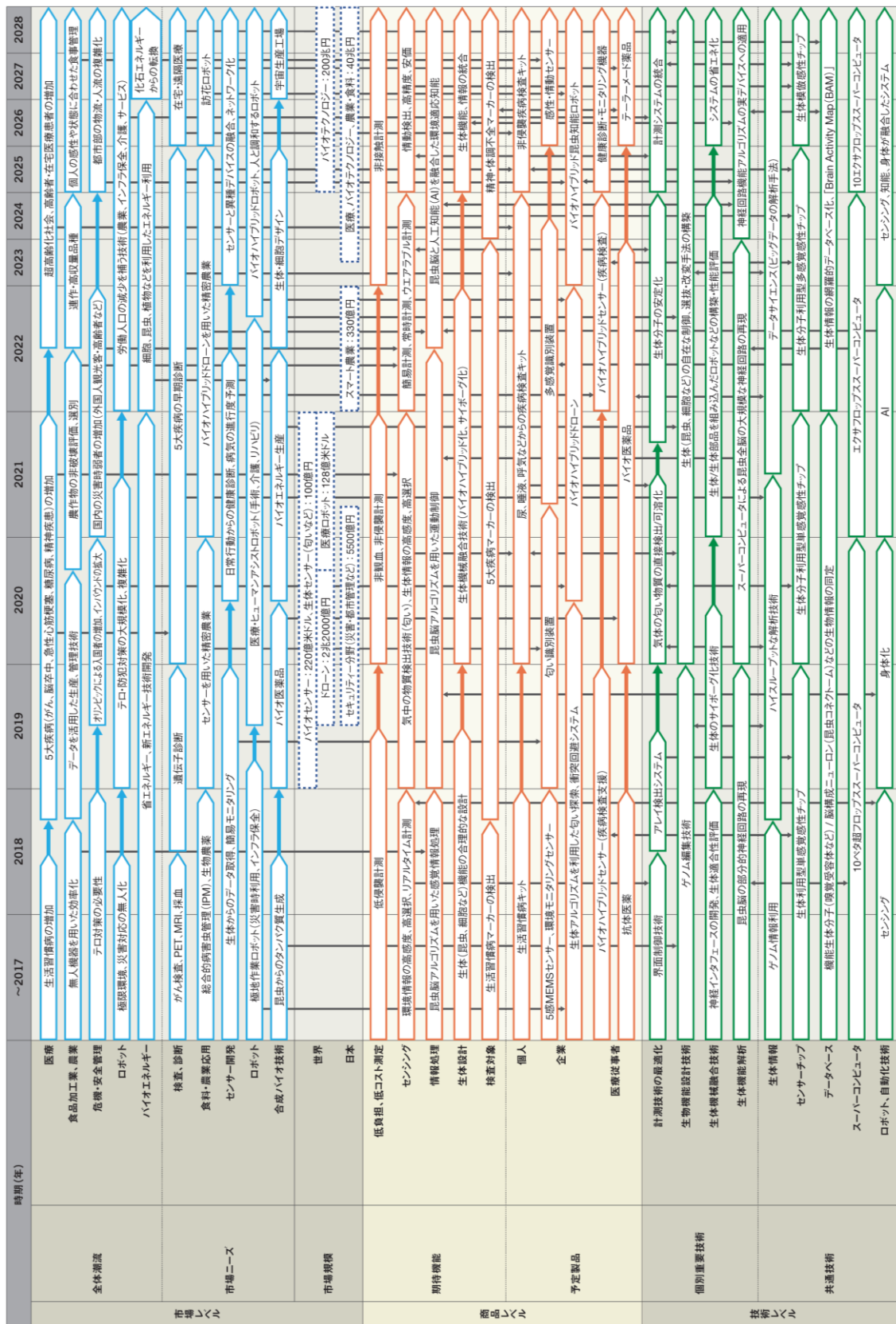


図 1.1 昆虫テックノロジー・ロードマップ [光野 et al., 2017]



図 1.2 ロードマップのセンシングに関わる箇所の拡大図

## 1.2 生物機能の利用

生物の中では、犬の嗅覚が優れることはよく知られた事実あり、その機能利用は12000年前の狩猟に始まり、現在は薬品や爆発物の検出などに広がっている [Furton and Myers, 2001]. 一方で昆虫も、触角などの嗅覚器官に備える嗅覚受容細胞に発現した嗅覚受容体を利用して、環境中に存在する微量な匂い物質を高感度かつ選択的、リアルタイムに検出することが可能である [光野 et al., 2015]. 昆虫が持つ高性能な嗅覚の例について表 1.1 に示す. 例えば、蚊やハエは人の汗や糞臭、腐敗臭を検出する. ミツバチは学習によって爆発物に含まれる 2,4-ジニトロトルエンに反応するようになる. ナガヒラタタマムシは火災で燃えた木に卵を産み付ける習性があり、数 10 キロ先にでもその匂いを検出することができると考えられている.

生物の嗅覚受容体を利用した匂いセンシング技術開発では、昆虫自体をセンサとして利用する方法もあるが、受容体タンパク質を生体と同じ機能を維持したまま再構築し、嗅覚受容体を匂い検出素子として利用する方法が考えられる. 後者の発想のもと、昆虫嗅覚受容体に着目し、昆虫の培養細胞に再構築することで、匂い物質に対する嗅覚受容体の応答を蛍光強度変化量として可視化できる細胞、すなわち「センサ細胞」の構築が進展してきた [Mitsuno et al., 2015]. 工学技術に基づく匂いセンサと、昆虫の嗅覚機能を利用した匂いセンサの比較を表 1.2 に示す.

表 1.1 昆虫の種類と反応する匂い物質例 [光野 et al., 2015 を参考に一部修正]

昆虫種 (学名)	反応する匂い物質の例	参考文献
<b>ハマダラカ</b> ( <i>Anopheles gambiae</i> )	<b>ヒトの汗, 糞臭 等</b> インドール、2-メチルフェノール、4-メチルフェノール	Hallem et al., 2004 Carey et al., 2010
<b>キイロショウジョウバエ</b> ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	<b>腐敗臭, 爆発物, 麻薬 等</b> ジオスミン、アンモニア、アミン、シクロヘキサノン、無水酢酸	Hallem et al., 2006 Marshall et al., 2010 Stensmyr et al., 2012
<b>セイヨウミツバチ</b> ( <i>Apis mellifera</i> )	<b>爆発物 等</b> 2,4-ジニトロトルエン (50-80 ppt)	Bromenshenk et al., 2003
<b>オオタバコガコマユバチ</b> ( <i>Microplitis croceipes</i> )	<b>爆発物 等</b> 2,4-ジニトロトルエン、3,4-ジニトロトルエン、シクロヘキサノン、メチルベンゾエート、ブトレッシン	Olson et al., 2003
<b>タバコスズメガ</b> ( <i>Manduca sexta</i> )	<b>爆発物 等</b> シクロヘキサノン、2-ヘキサノン	Daly et al., 2007
<b>ナガヒラタタマムシ</b> ( <i>Melanophila acuminata</i> )	<b>火災 等</b> 2-メトキシフェノール (数 ppb)	Schütz et al., 1999
<b>モンシテムシ</b> ( <i>Nicrophorus vespilloides</i> )	<b>腐敗臭 等</b> メタンチオール、メチルチオアセテート、ジメチルスルフィド、ジメチルトリスルフィド (癌の匂い)	Kalinová et al., 2009
<b>トコジラミ</b> ( <i>Cimex lectularius</i> )	<b>腐敗臭, 糞臭 等</b> アンモニア、インドール、ジメチルトリスルフィド (癌の匂い)	Harraca et al., 2010

表 1.2 既存の匂いセンサと昆虫嗅覚受容体を利用した匂いセンサの比較  
 [光野 et al., 2015 を参考に一部修正]

	センサ種類	計測素子	検出範囲・検出限界	計測素子の数	その他の特徴
工学技術	半導体センサ	金属酸化物半導体	ppb~ppm (匂い物質による)	6~数10種類	応答が速い 繰り返し再現性が高い 実績がある
	水晶振動子センサ	水晶振動子(QCM)	ppb~ppm (匂い物質による)	6~数10種類	被覆材料の種類多い 外乱に弱い
昆虫嗅覚受容体を利用した技術	卵母細胞を用いたセンサ	昆虫の嗅覚受容体	数10 ppb (匂い溶解液)	昆虫の嗅覚受容体の種類による(現在, 100種以上が同定済)	応答が速い 携帯性がある ロバスト性・安定性が低い
	昆虫培養細胞を用いたセンサ	昆虫の嗅覚受容体	数10 ppb (匂い溶解液)	昆虫の嗅覚受容体の種類による(現在, 100種以上が同定済)	応答が速い 携帯性がある 蛍光による可視化 長期間の計測が可能

## 1.3 高機能な匂いセンサシステムの構築

### 1.3.1 センサ細胞の匂い応答の電気信号による検出

#### 1.3.1.1 昆虫嗅覚受容体を利用した匂いセンサ

昆虫嗅覚受容体は哺乳類とは異なり、非選択的に陽イオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  etc.)を透過するイオンチャネル型受容体として機能し、匂い物質の結合から数 10 ミリ秒もの速さで陽イオンを透過する [Sato et al., 2008]. これらの機能を再構築したセンサ細胞は、高性能な匂いセンサのセンサ素子開発にとって非常に有望である. センサ細胞の応答は、導入した受容体によって引き起こされた陽イオンの流入として検出され、数 10 ppb の高感度性を持つ.

遺伝子工学的に昆虫嗅覚受容体を発現させた各種細胞によって、匂い物質を選択的かつ高感度に検出可能な匂いセンサの構築が進められてきた. 昆虫嗅覚受容体を発現させたアフリカツメガエル (*Xenopus laevis* oocyte)の卵母細胞と 2 電極膜電位固定法を用いて、卵母細胞の電流応答を計測する小型の匂いセンサチップを作成し、ロボットに組み込むことに成功した研究がある [Misawa et al., 2010]. 卵母細胞をセンサ素子とする匂いセンサの有効性が確認された一方で、卵母細胞は細胞の個体差が大きく、安定的な可能な時間は半日程度に限定され、培養に厳密な温度制御を必要とする課題が残された. 卵母細胞の課題を解決するため、昆虫嗅覚受容体を発現させたヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*)の卵巣由来の培養細胞である、Sf21 細胞 [Vaughn, et al., 1977]をセンサ素子とする研究が進められた. 昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 細胞にカルシウム感受性蛍光タンパク質を導入し、蛍光顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法によって、匂い物質の可視化と蛍光パターンニングによる匂い物質の識別に成功している [Mitsuno et al., 2015, Termtanasombat et al., 2016]. この細胞は「センサ細胞」と呼称されている. 卵母細胞とセンサ細胞を用いた匂いセンサの概要を図 1.3 (a), (b)に示す.

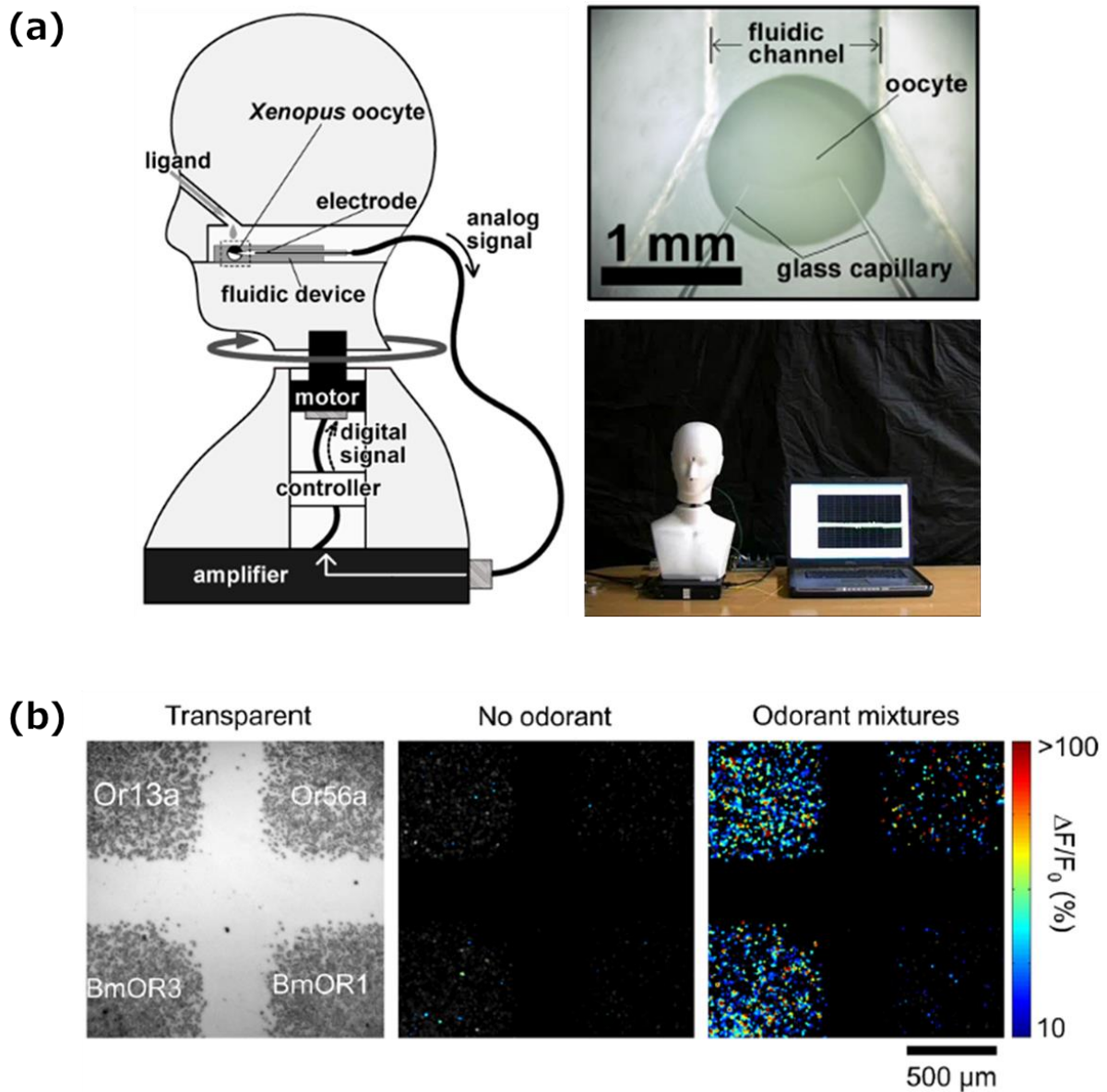


図 1.3 (a) 昆虫嗅覚受容体を発現したアフリカツメガエルの卵母細胞を利用した匂いセンサチップとロボット [Misawa et al., 2010] . (b) 昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 細胞（センサ細胞）の蛍光パターンニングによる匂い識別技術 [Termtanasombat et al., 2016]. (図 1.3 (a), (b)の copyright permissions は Appendix A3 に記載した.)

### 1.3.1.2 電気信号検出の着想に至った経緯

現在の Sf21 細胞をセンサ素子とした匂い応答検出は、カルシウム感受性蛍光タンパク質と蛍光顕微鏡を用いたカルシウムイメージングによって行われている。この検出方法では、陽イオンの流入を一度蛍光に変換する間接的な応答検出となる。また、カルシウムイメージングの検出対象は  $\text{Ca}^{2+}$  のみであることから、現在の手法では昆虫嗅覚受容体が本来持つ高感度性やリアルタイム性を十分に活用しきれない。加えて、大型の蛍光顕微鏡が必要であり、実用化の際にはセンサシステム全体の小型化が必要となる。

上記の課題を解決するためには、大型の装置を必要とせず、昆虫嗅覚受容体の応答を効率的に検出するインターフェースの開発が極めて重要となる。その際の検出対象として、昆虫嗅覚受容体を介して流入する陽イオン、つまり電気信号による応答検出が考えられる。昆虫嗅覚受容体の応答を、カルシウムイメージングによらず直接電気信号として検出できれば、蛍光インジケータの性能に依存せず、蛍光計測を超える感度を得ることが期待できる。また、匂いセンサの実用化の際には、半導体集積技術に基づくセンサのアレイ化や、情報処理、通信部など匂いセンサ部以外の周辺回路との接続が想定される。匂い応答の電氣的な検出が可能になれば、より小型で高機能なセンサシステムの実現にも有用である。

### 1.3.1.3 電気信号検出インターフェース

1970年代に P. Bergveld (University of Twente)によって、金属酸化物半導体電界効果トランジスタ (Metal-oxide-semiconductor field-effect transistor: MOSFET)のゲート電極をイオンの変化に鋭敏なイオン感応膜に置き換えた、イオン感応性電界効果トランジスタ (Ion-Sensitive Field Effect Transistor: ISFET)が開発された [Bergveld, 1970]. ISFETの構造の模式図を図 1.4 に示す. ISFET は水素イオン濃度 (pH)の検出に始まり、近年では CMOS 集積技術の発展とも相まって DNA シーケンサとして実用化されており [Rothberg et al., 2010], FET デバイスのバイオ分野への利用は急速な進展を遂げている.

FET デバイスによって細胞の応答検出を行った研究は、1990 年代に Max Planck Institutes (独) の P. Fromherz のグループから始まった [Fromherz et al., 1991]. ラット由来の神経細胞やヒト由来の HEK293 細胞を FET のゲート上に播種し、細胞のアクションポテンシャルを FET によって検出することに成功している (図 1.5) [Voelker and Fromherz, 2005, Brittinger and Fromherz, 2005].

このような背景のもと、センサ細胞に発現した昆虫嗅覚受容体を介して流入する陽イオンは、FET によって電気信号として検出することが可能であると想定された. 本研究では、センサ細胞の匂い応答検出を目的とした FET デバイスを設計し、電気信号による応答検出を試みた.

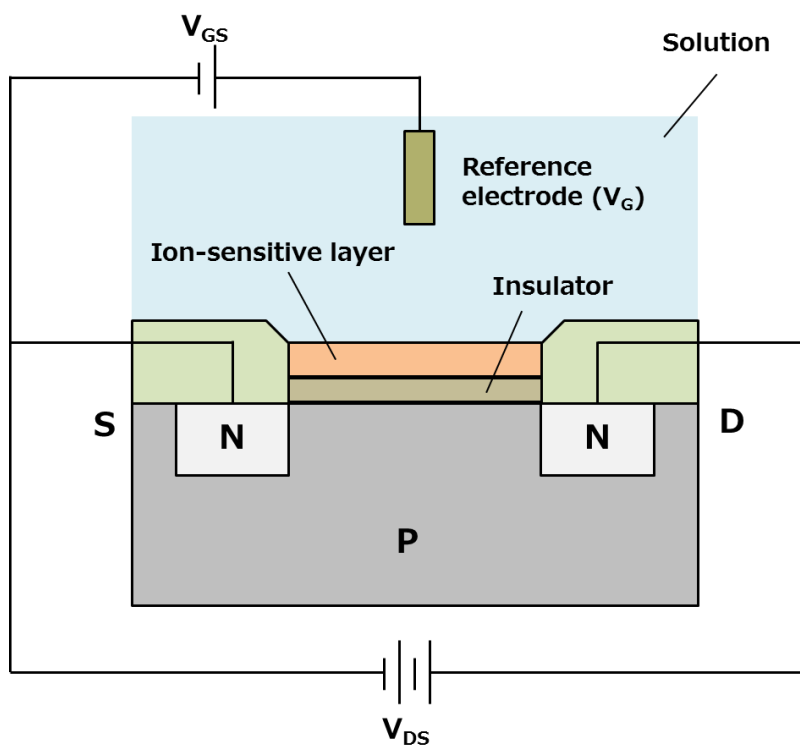


図 1.4 ISFET の構造の模式図

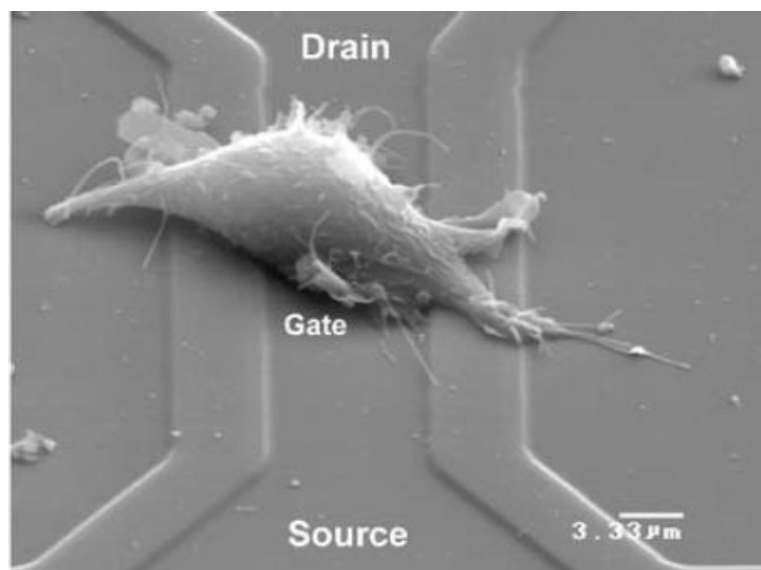


図 1.5 ヒト由来の HEK293 細胞 [Brittinger and Fromherz, 2005]. (図 1.5 の copyright permission は Appendix A3 に記載した.)

## 1.3.2 気中の匂い物質の溶解技術

### 1.3.2.1 気中の匂い物質検出の難点と重要性

匂い物質は通常環境中に揮発した状態で漂っており，哺乳類，昆虫ともにその匂い分子を検出している．一方で，既に構築されているカルシウムイメージングによるセンサ細胞の応答検出，そして本研究で取り組む電気信号による応答検出のいずれにおいても，センサ細胞への刺激は匂い物質を一度溶液中に溶解して行う必要があり，揮発した匂い物質の検出を行うことはできない．これは，嗅覚受容体を利用した匂いセンサの場合，嗅覚受容体は通常液中のみで機能するためである．

昆虫は如何にしてフェロモン等の気中に漂う匂い物質を検出しているのだろうか．昆虫の毛状感覚子の内部は感覚子リンパと呼ばれる液で満たされている．その液中には，気相の匂い分子を結合する匂い結合タンパク質 (odorant binding protein: OBP)が高濃度で存在し，嗅覚受容体を発現した嗅覚受容細胞に匂い分子を効率的に輸送している [Sachse and Krieger, 2011]．昆虫触角にある毛状感覚子の構造の模式図を図 1.6 に示す．過去に，OBP を機能的な状態で大量精製する手法を確立して OBP 溶液にセンサ細胞を浸漬し，匂い物質の気中からの直接供給が試みられた [三觜 et al., 2012]．しかし，気中の難水溶性の匂い物質を，センサ細胞が十分に検出可能な濃度 ( $1 \mu\text{M}$  以上) に短時間で (数十秒–1 分程度) で溶解する技術の構築には至っていない．

より実用的な匂いセンサとして環境中に漂う匂い物質の検出を行うためには，高効率な匂い物質の溶解技術の構築が必要となる．図 1.1 のロードマップでは，呼気中の匂い物質検出や食品などから直接匂い検出を可能にするための基盤技術として，2020 年頃を目途に開発が期待される [光野 et al., 2017]．匂い物質の高効率な溶解手法の構築は，電気信号による匂いセンサシステムをより実用的に運用するためにも重要な基盤技術となる．

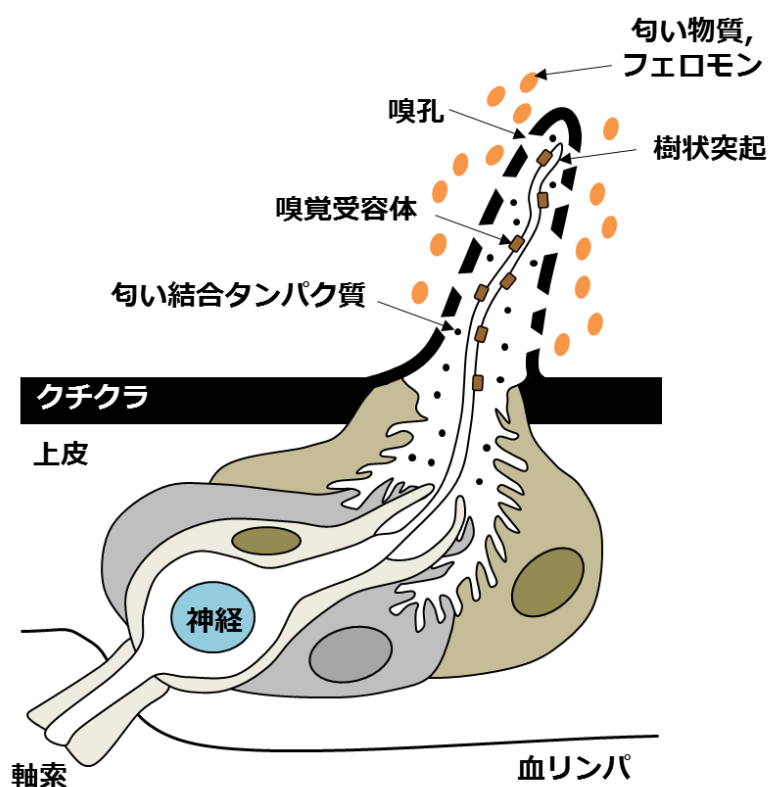


図 1.6 昆虫の毛状感覚子の構造模式図

### 1.3.2.2 気液界面制御による溶解技術

近年、ファインバブルと呼ばれる直径 100  $\mu\text{m}$  以下の微小なバブルによって、気液界面を増大し、攪拌などを必要としない、高効率な気体の溶解手法が有機合成の分野から提案されている [Mase et al., 2010]. この手法では、攪拌のみの場合や通常のバブルリングと比較して、水中の酸素濃度を短時間で増大させることに成功している. 本研究では、ファインバブルの中でも、直径 1  $\mu\text{m}$  以下のウルトラファインバブル (Ultrafine bubble: UFB)に注目した. 本研究では、ウルトラファインバブル含む液体ミストを、揮発した匂い物質が存在する空間に噴霧することで、難水溶性の有機化合物を液中に溶解させる技術の構築を目指す.

### 1.3.3 電気信号検出と匂い物質溶解技術の関係

本研究で提案する匂いセンサシステムは、既に構築されたセンサ細胞の匂い応答を FET によって電氣的に検出するインターフェースと、ウルトラファインバブルを用いた匂い物質の溶解技術で構成される。これらの技術は、昆虫触角で行われている匂い分子の受容メカニズムを、生物機能を引き出して工学技術と融合することで達成するものである。昆虫触角の匂い分子の受容メカニズムと本研究で構築する技術の対応を図 1.7 (a), (b)に示す。ウルトラファインバブルによる溶解技術は、昆虫触角の表面における気中の匂い分子の可溶化を担い、センサ細胞の応答を FET によって電氣的に検出するインターフェースが、昆虫嗅覚受容体から脳へのシグナル伝達に対応する。

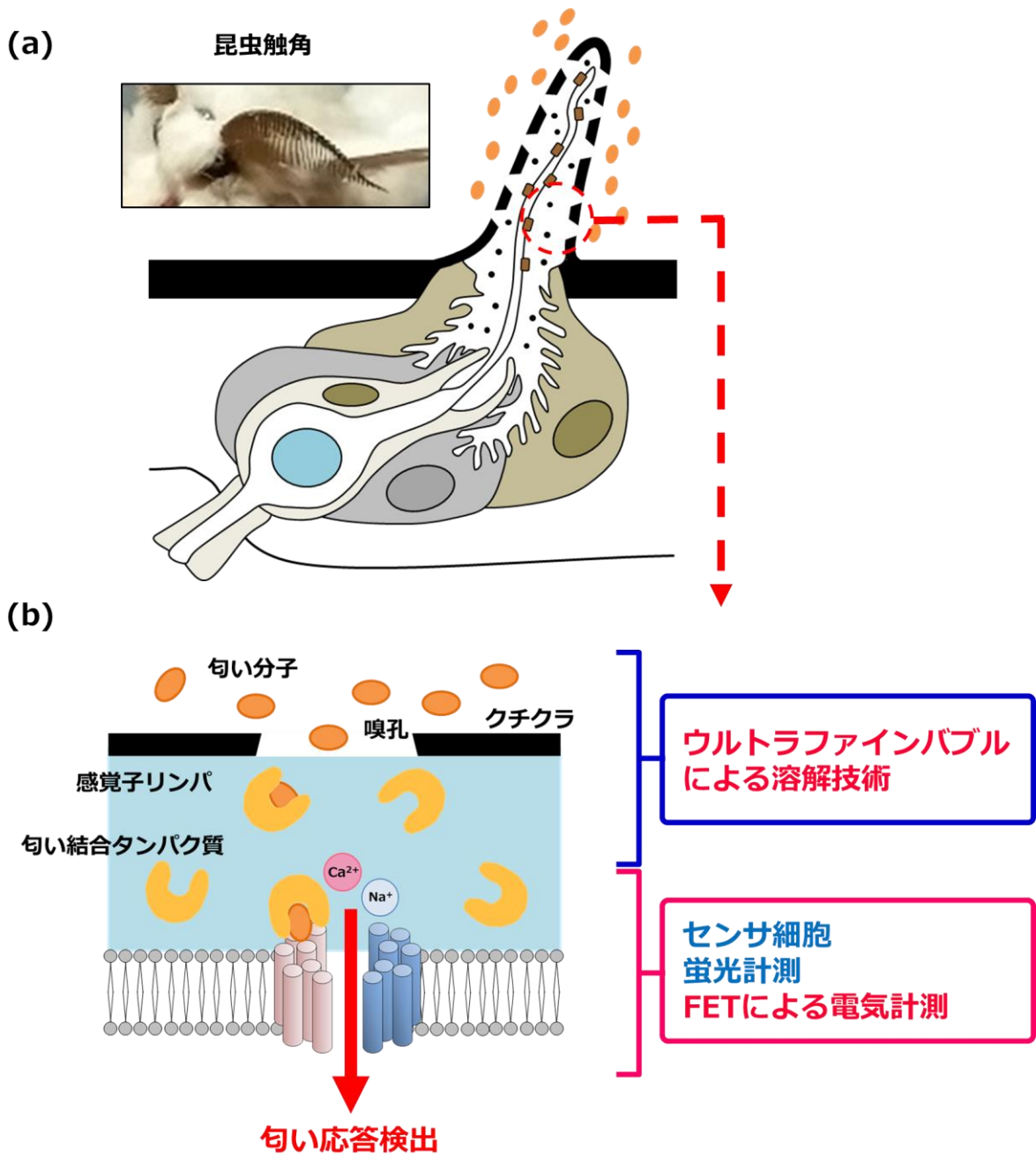


図 1.7 電気信号検出と匂い物質の溶解手法の関係 (a) 一般的な昆虫触角の組織概要図. (b) 昆虫触角の匂い分子受容メカニズム (図(a) 赤点線内) と本研究によって構築する技術の対応.

## 1.4 本研究の目的

本研究で重要な目的は2点ある。まず1点目は、遺伝子工学的に昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 細胞，すなわち「センサ細胞」の匂い応答を，FET を用いて電氣的に検出するインターフェースを構築し，応答検出を達成することである。2点目は、ウルトラファインバブルによる難水溶性有機化合物の溶解手法の有効性を検証することで、気中の匂い物質が溶解可能な技術を構築することである。

1点目の目的の達成には、センサ細胞の応答検出に適した FET デバイスの設計と測定系の構築により、匂い応答の電氣的検出を行う必要がある。また、センサ細胞からの効率的な電気信号検出には、デバイス上のセンサ細胞の接着状態と、細胞-デバイス間の適切な電氣的結合状態を検討する必要がある。センサ感度の数値目標としては、水道水の水源で発生するカビ臭（ジオスミン）の年間最高変動値が数 100 ppt-1 ppb とされており [伊藤, 2015]、M（モラー）単位に変換すると最大値はおおよそ 1 nM となるため、この 1 nM を目標数値として電気信号による検出インターフェースの構築を行う。

現在構築されているセンサ細胞の蛍光計測では、液中に溶解した匂い物質を検出している。そこで、2点目の目的の達成には、ウルトラファインバブルを用いた難水溶性有機化合物の液中への溶解速度と溶解量を評価し、溶解サンプルを用いたセンサ細胞の応答計測を実施する必要がある。溶解技術の数値目標として、半導体ガスセンサや電気化学式ガスセンサの検出限界が 1 ppm 前後となっているため [伊藤, 2008]、1 ppm の揮発した匂い物質から、センサ細胞に供給可能な濃度まで溶解することを目標値とした。

これらの実施により、センサ細胞の匂い応答の電気信号による検出と気中の匂い物質の溶解を可能とし、昆虫の優れた嗅覚機能と工学技術を融合した高機能バイオハイブリッド匂いセンサシステムを構築することが可能となる。

## 1.5 本論文の構成

本論文は全7章で構成される。第1章は、研究背景について述べ、電気信号に基づくセンサ細胞の匂い応答検出と気中の匂い物質の溶解技術の重要性について論じ、研究目的とその数値目標について記載した。第2章では、匂い検出素子となるセンサ細胞の応答原理と蛍光計測についてまとめ、電気信号測定と溶解技術の検証に向けた予備実験について記載した。第3章では、既存の汎用バイオセンシングシステムを用いたセンサ細胞の応答検出とその課題について論じ、センサ細胞の匂い応答検出を目的としたデバイス開発と測定系の構築について記載した。第4章では、設計したデバイスを用いた電気信号による匂い応答の検出結果と、既存のバイオセンシングシステムとの比較について記載した。また、匂いセンサシステムとして **Odor-Sensitive Field Effect Transistor (OSFET, オスフェット)** という概念を提唱した。第5章では、匂い応答検出に重要な影響を与える、細胞-デバイス界面の観察と分析結果について論じ、センサ細胞の応答検出モデルの考察について記載した。第6章では、ウルトラファインバブルを用いた難水溶性有機化合物の溶解技術の有効性検証と、溶解サンプルを用いたセンサ細胞の蛍光、電気計測結果について記載した。第7章では、本論文の結果・考察のまとめと貢献について記載した。本研究のフローチャートを図1.8に示す。

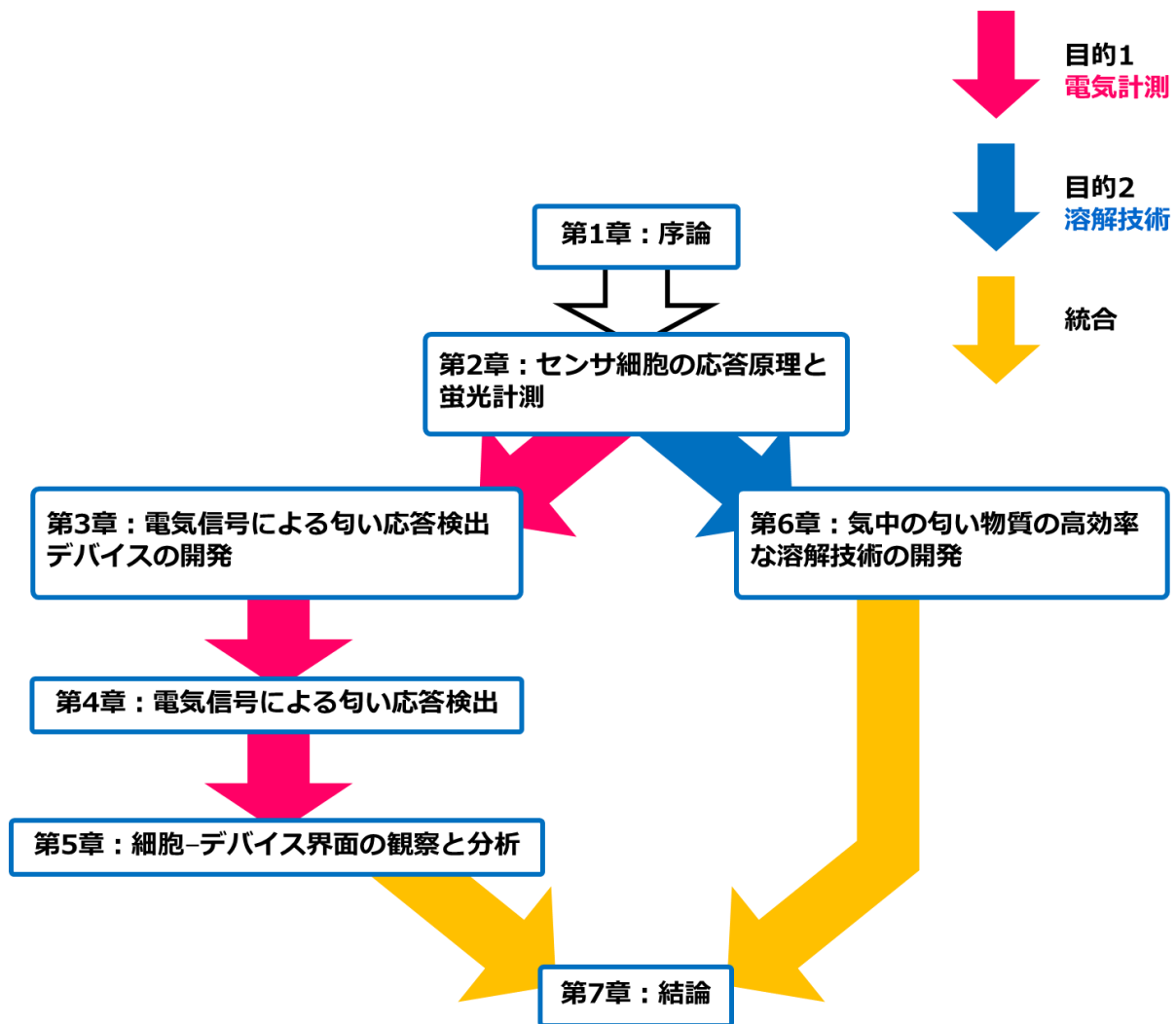


図 1.8 本研究のフローチャート

## 第2章：センサ細胞の応答原理と蛍光計測

本章では、匂い物質の検出素子となる、遺伝子工学的に昆虫嗅覚受容体を発現させた昆虫細胞、すなわち「センサ細胞」の基本性能と応答原理、そして蛍光計測方法について述べる。センサ細胞とは、昆虫培養細胞に昆虫嗅覚受容体を導入することで、特定の匂い物質を選択的かつ高感度に検出し、嗅覚受容体由来の応答を蛍光強度変化量として視覚的に識別可能にした細胞である。

### 2.1 センサ細胞

#### 2.1.1 昆虫嗅覚受容体

昆虫嗅覚受容体は、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR)である哺乳類の嗅覚受容体とは異なり、共受容体 (Olfactory receptor co-receptor: Orco)とともに複合体を形成し、リガンド作動性のイオンチャネル型受容体として機能する [Sato et al., 2008]. イオンチャネル型受容体の特徴として、受容体そのものが匂い受容から細胞内への陽イオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.)の流入を担っている。そのため、受容体が匂い物質 (リガンド) を受容してから、数 10 ミリ秒もの速さで陽イオンの流入が発生する。よって、シグナル伝達系を活性化した後にイオン流入を引き起こす複雑な伝達機構を持ち、一般には異種細胞での発現が困難な哺乳類の GPCR と比較し、昆虫嗅覚受容体は受容体の機能を培養細胞に再構築し易いという利点がある [光野 et al., 2015]. また、昆虫嗅覚受容体は、キイロショウジョウバエ、カイコガ、ハマダラカ等の多様な昆虫種から 100 種類以上が同定されている [Glatz and Bailey-Hill, 2011]. University of Konstanz (独) の DoOR (Database of Odorant Responses)に代表されるように、キイロショウジョウバエでは、既に嗅覚受容体とそれらが応答する匂い物質、応答の強弱 (応答スペクトル) がデータベース化されており [Galizia et al., 2010], 所望の情報を容易に検索する環境が構築

されている。このように、昆虫嗅覚受容体は、応答速度、豊富な受容体の種類、応答スペクトルの多様性という観点から、匂い検出素子に有用な機能を有している。

### 2.1.2 Sf21 細胞

本研究では、昆虫培養細胞として、ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) の卵巣由来の培養細胞である Sf21 細胞を用いた [Vaughn, et al., 1977]。実体顕微鏡によって観察した、プラスチックディッシュ上に播種された Sf21 細胞の写真を図 2.1 に示す。Sf21 細胞の直径は約 15  $\mu\text{m}$  であり、Sf21 細胞のクローン分離株である Sf9 とほぼ同程度の大きさである [Rahioui et al., 2007]。Sf21 細胞は、以下に述べる匂い応答検出素子の構築に有用な特徴を持つ。HEK293 細胞などの哺乳類の培養細胞では分裂回数が限られているのに対し、昆虫培養細胞は無限分裂が可能である。よって、遺伝子工学的に遺伝子をゲノム DNA 中に導入すれば、恒常的に嗅覚受容体発現した細胞 (安定発現系統) として使用可能であり、センサ細胞を半永久的に維持できる。また、哺乳類由来の培養細胞は、CO<sub>2</sub> の供給と 37°C に温度を維持した条件下での培養が必要であるが、Sf21 細胞は CO<sub>2</sub> の供給が不要で、かつ室温周辺の広範囲な温度条件下 (18–29°C) での培養が可能である。組換えタンパク質発現を目的とした場合、Sf9 細胞を用いることが一般的であるが、Sf21 細胞はタンパク質の過剰発現が可能である。これらの特徴は、卵母細胞などをセンサ素子としたバイオセンサの課題であった寿命の短さを克服し、室温で使用可能な実用的な匂いセンサ素子として使用できる [Mitsuno et al., 2015]。

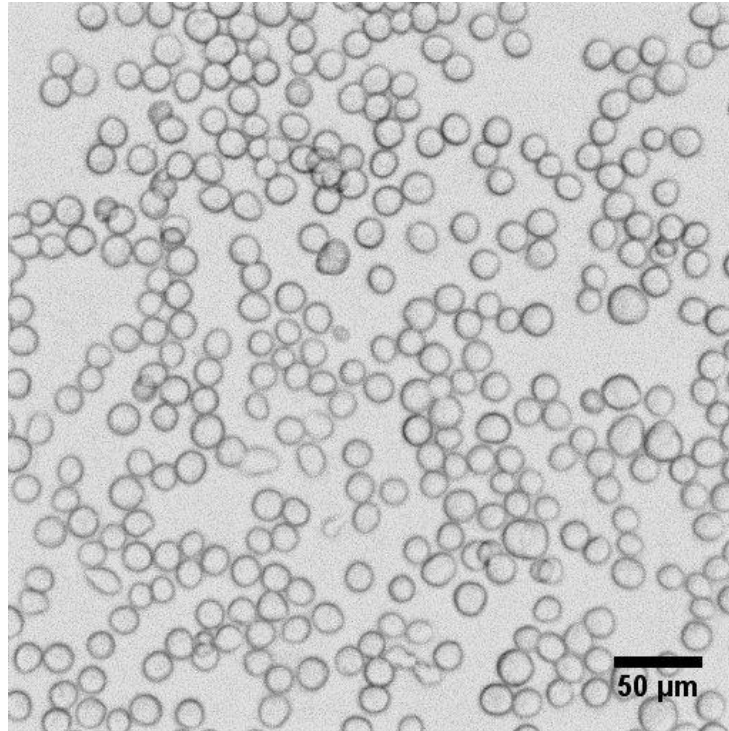


図 2.1 プラスチックディッシュ上に播種した Sf21 細胞の明視野写真

### 2.1.3 センサ細胞の検出原理

昆虫嗅覚受容体はイオンチャネル型受容体として機能し、特定の匂い物質と選択的に結合した際、細胞外から細胞内へ陽イオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.) を流入させる。流入するイオンの種類は使用するアッセイバッファ溶液の組成に依存するが、例えば  $\text{K}^+$  は細胞内の方が濃度が高いため、主に  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  が支配的となる。Sf21 細胞は、Sf9 細胞と同様に [Kiely et al., 2007], 嗅覚受容体を発現させて蛍光イメージングによる応答の可視化が可能である。この特徴を利用し、Sf21 細胞にカルシウム感受性蛍光タンパク質 (GCaMP3 or GCaMP6s) [Tian et al., 2009, Chen et al., 2013] を導入して細胞内に流入するカルシウムイオンの検出を可能とした [Mitsuno et al., 2015, Termtanasombat et al., 2016].

本研究に用いるセンサ細胞は、昆虫嗅覚受容体 (OR), 共受容体 (Orco) に加えて GCaMP6s を発現させたものを使用した (図 2.2)。細胞内に導入された GCaMP6s は、

昆虫嗅覚受容体が匂い物質に応答した際に流入したカルシウムイオンと結合し，細胞全体の蛍光強度を増加させる．この蛍光強度変化を蛍光顕微鏡によって計測することで，匂い物質の存在と濃度を視覚的・数値的情報として検出可能である．昆虫嗅覚受容体を対象臭に合わせて入れ替えることで，異なる匂い物質も同様に検出可能となる．

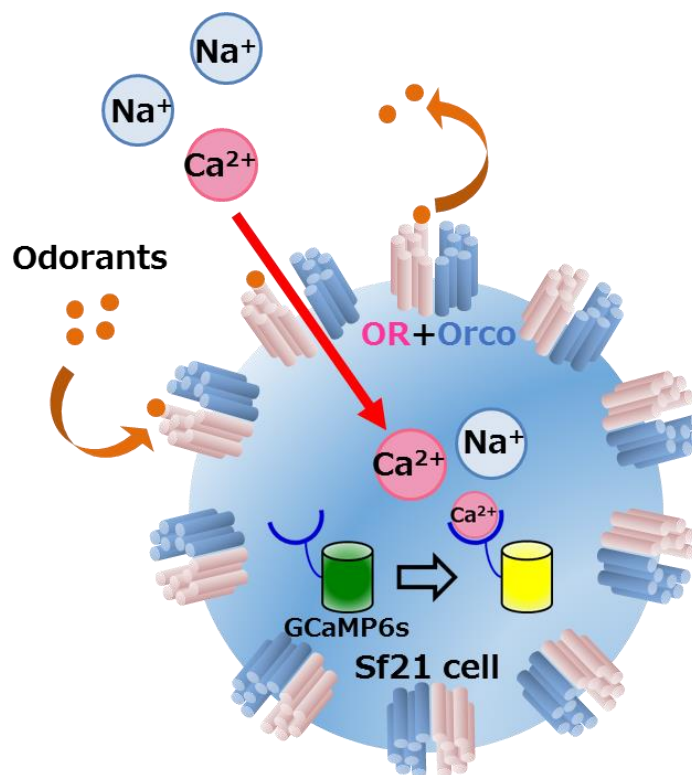


図 2.2 センサ細胞の蛍光応答の模式図

## 2.1.4 センサ細胞の匂い検出性能

センサ細胞は、匂い物質を蛍光強度変化量として可視化・数値化可能なセンサ素子として機能する。本研究で使用する細胞系統は、カイコガ (*Bombyx mori*)の性フェロモン受容体である BmOR3 と、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)の一般臭受容体である Or13a を導入したセンサ細胞を使用する。以下、BmOR3 発現系統、Or13a 発現系統とそれぞれ記載する。

BmOR3 は、メスのカイコガが放出する性フェロモン成分の 1 つである Bombykal ((E,Z)-10,12-hexadecadienal)に特異的に応答する [Nakagawa et al., 2005]。蛍光顕微鏡を用いて Bombykal に対する BmOR3 発現系統の蛍光応答を取得し、受容体の選択性と濃度依存的応答が評価された。結果として、BmOR3 発現系統は Bombykal に特異的に蛍光強度変化を示した [Mitsuno et al., 2015]。また、Or13a 発現系統でも同様の評価が行われ、1-octen-3-ol (キノコ臭, カビ臭) に対する蛍光強度変化が取得された [Termtanasombat et al., 2016]。BmOR3 発現系統と Or13a 発現系統では、300 nM の匂い濃度で蛍光上昇が検出されており、この結果からセンサ細胞は数 10 ppb レベルの検出感度を持つことが確認されている [Mitsuno et al., 2015, Termtanasombat et al., 2016]。

センサ細胞は、 $-80^{\circ}\text{C}$  以下の超低温で凍結保存することにより、昆虫嗅覚受容体を発現した細胞系統を長期間保存可能である。BmOR3 発現系統では、6 か月間凍結保存した後に蛍光計測を実施した結果、凍結後にも凍結前と同程度の蛍光強度変化量を示すことが確認されている [Mitsuno et al., 2015]。

## 2.2 センサ細胞の蛍光計測

### 2.2.1 匂い物質の作成

本研究では、匂い物質として、カイコガの 2 種類の性フェロモン受容体である BmOR3 と BmOR1 が、それぞれ選択的に応答するフェロモンの Bombykal と Bombykol ((E,Z)-10,12-hexadecadien-1-ol) [Sakurai et al., 2004], キイロショウジョウバエの一般臭受容体である Or13a が強く応答する 1-octen-3-ol を使用する。センサ細胞の蛍光計測では、匂い物質を液中に溶解して刺激する必要がある。上記の匂い物質は難水溶性であるため、有機溶媒(ジメチルスルホキシド)によって溶解したサンプルを作成した。各匂い物質を、1%以下のジメチルスルホキシド (DMSO: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を含むアッセイバッファ溶液 (140 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 4.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 11.26 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.32 mM MgSO<sub>4</sub>, 9.4 mM D-glucose, 5 mM HEPES, pH 7.2) に溶解して濃度調整を行い、細胞へ刺激した。

### 2.2.2 蛍光応答測定系と測定手順

センサ細胞の蛍光応答測定系と測定手順を以下に示す。センサ細胞を直径 12 mm のカバーガラス (CS-12R: Warner Instruments, LLC, Hamden, CT, USA)に播種して 30 分程度静置した後、カバーガラスを円形カバーガラス用開放型バスチャンバー (RC-48LP: Warner Instruments, LLC, Hamden, CT, USA)に挿入した。溶液の灌流、匂い物質の刺激には、ペリスタルティックチューブポンプ (MP-2010: Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)に接続した内径 1 mm-外径 3 mm のシリコンチューブを、アクリル製の自作ホルダーによってチャンバーの inlet と outlet にそれぞれ設置した。蛍光計測システムの応答検出部の写真を図 2.3 に示す。灌流条件は、流量：約 1.5 ml/min, チャンバー内液量：約 200  $\mu$ l, 匂い刺激時間を 15 秒としてセンサ細胞への刺激を行った。

顕微鏡は、20倍の水浸対物レンズ (UMPlanFI 20x/0.50 W: Olympus, Tokyo, Japan)を備えた正立蛍光顕微鏡 (BX51WI: Olympus, Tokyo, Japan)を用いた。細胞の蛍光強度変化の計測には、EM-CCD カメラ (DU-897E: Andor Technology PLC, Belfast, UK)を使用した。カメラの操作は AndoriQ (Andor Technology PLC, Belfast, UK)を用いて 512 x 512 pixel の画像を取得した。顕微鏡のフィルタには、GFP 用の蛍光フィルターセット (U-MGFPHQ: Olympus, Tokyo, Japan)を使用した。光源には 100 W ハロゲンランプ (TH4-100, Olympus, Japan)を用い、蛍光観察時の露光時間は 500 ミリ秒に設定した。撮影は 1 秒ごとに行った。

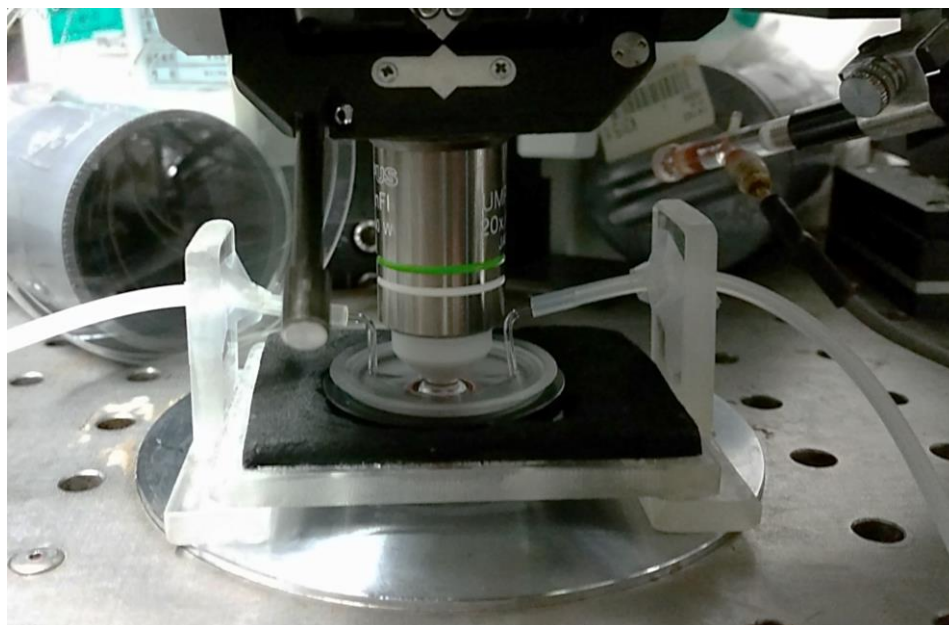


図 2.3 蛍光計測システムの応答検出部

### 2.2.3 蛍光強度変化量解析

センサ細胞の蛍光計測は、効率的な蛍光強度変化量の検出のため、MATLAB を用いた円のハフ変換 (circular Hough transform) [Atherton and Kerbyson 1999, Yuen et al., 1990] によって細胞の形状のみに ROI (Region of Interest) を設定して算出した。センサ細胞の蛍光強度変化量は以下の式によって定義した。

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_t - F_0}{F_0} \quad (2-1)$$

この時、 $F_t$  は時間  $t$  のときの蛍光強度、 $F_0$  はベースラインの蛍光強度 20 秒の平均値を示す。上式で蛍光強度変化グラフを描いた後、ピーク時の蛍光強度 20 秒の平均値と、蛍光変化前のベースラインの蛍光強度 20 秒の平均値の差を、各刺激における蛍光変化値と定義した。BmOR3 発現系統の Bombykal に対する濃度依存的蛍光強度変化と、Or13a 発現系統の 1-octen-3-ol に対する応答の計測結果を図 2.4 に示す。

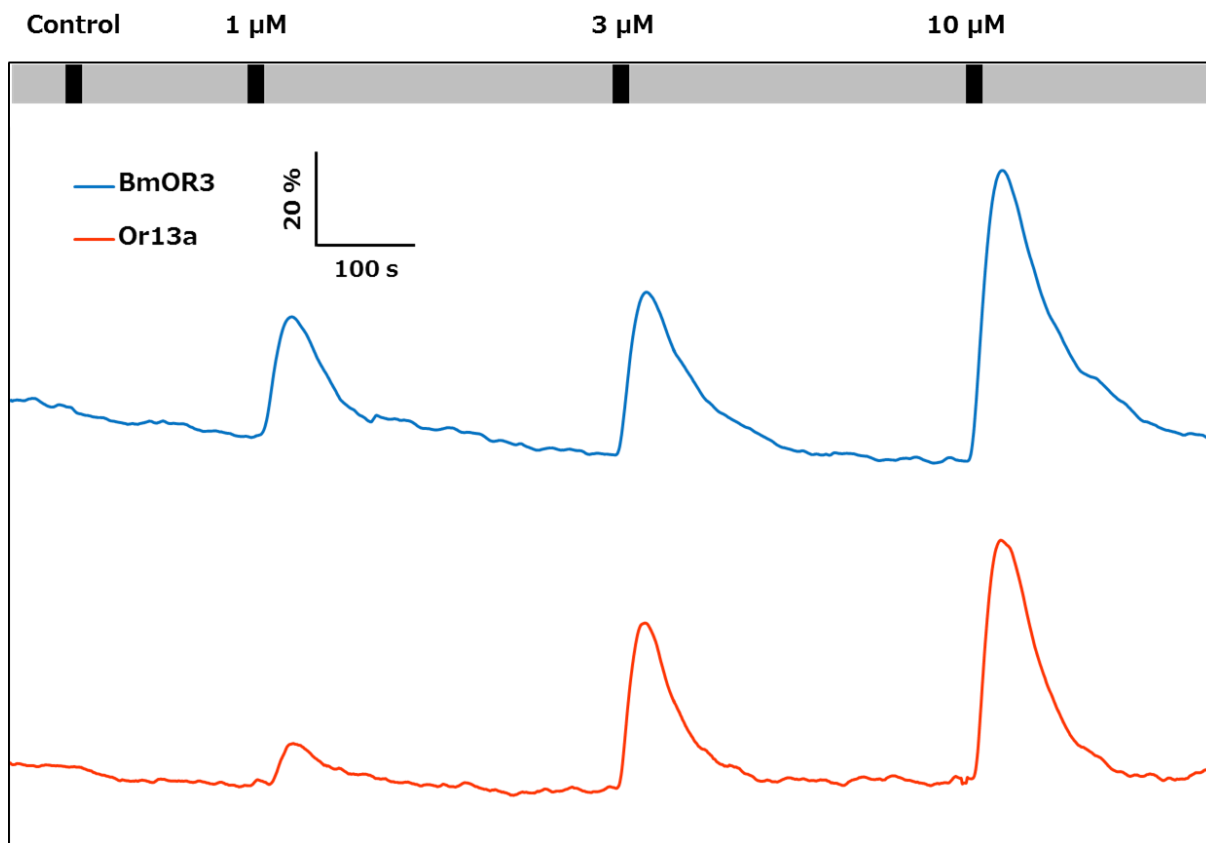


図 2.4 BmOR3 発現系統の Bombykal に対する濃度依存的蛍光強度変化と Or13a 発現系統の 1-octen-3-ol に対する濃度依存的蛍光強度変化

## 2.3 まとめ

本章では、遺伝子工学的に昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 昆虫培養細胞，すなわち「センサ細胞」の基本性能，応答原理，そして蛍光計測方法について記述した．以降の章では，本章で述べたセンサ細胞を用いて，第 3 章の既存のバイオセンシングシステムを用いた応答検出，第 4 章の本研究で設計した FET デバイスを用いた応答検出，第 5 章のセンサ細胞-デバイス間の観察・分析，第 6 章の難水溶性の匂い物質溶解サンプルを用いた蛍光計測と議論を展開する．

## 第3章：電気信号による匂い応答検出デバイスの開発

### 3.1 既存の細胞応答検出デバイス

#### 3.1.1 BioCMOS テスター

本研究ではまず、市販されているバイオセンシングシステムである BioCMOS テスター (BCT1: BioCMOS Co., Ltd., Tokyo, Japan, 以下 BCT と表記)を用いてセンサ細胞の匂い応答検出を試みた。BCT は、半導体集積回路を用いたバイオセンサであり、特定の用途に限定されない汎用的なバイオ反応解析システムとして開発された [Nakazato, 2009]。応答検出部は差し込み式のチップになっており、1 cm 角の中に 64 x 64 のセンサアレイを備えて多点での生体応答計測に対応し、装置本体にディスプレイを備えるためスタンドアロンな計測が可能である。BCT の外観を図 3.1 に示す。

BCT の電極は、検出方法や電極サイズに種々のバリエーションが存在するが、本研究で用いたものは、検出部が金電極で構成され、電極サイズが  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ 、ポリイミド膜によって電極間のピッチが  $60 \mu\text{m}$  に設定された、電極表面の電圧の変化を検出する測定チップである。



図 3.1 BioCMOS テスター

### 3.1.2 BioCMOS テスターによる応答計測

#### 3.1.2.1 実験条件

BmOR3 発現システムを BCT の電極上に播種し、電気信号による応答検出を試みた。細胞は継代 1–3 日のものを使用し、センサアレイ上に細胞が重ならないようモノレイヤーになる細胞量を播種した。ペリスタルティックポンプ (MP-2010: Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)によって 1% 以下の DMSO を含有するアッセイバッファ溶液を流量約 160  $\mu\text{l}/\text{min}$  で灌流しながら、1% DMSO 含有アッセイバッファ溶液  $\Rightarrow$  30  $\mu\text{M}$  Bombykol  $\Rightarrow$  30  $\mu\text{M}$  Bombykal  $\Rightarrow$  100  $\mu\text{M}$  Bombykal を用いて順番に刺激を行った。1% DMSO 含有アッセイバッファ溶液による刺激は、機械的刺激のネガティブコントロールであり、30  $\mu\text{M}$  Bombykol は BmOR3 発現システムが応答しないフェロモンであるため、嗅覚受容体の選択性の確認が可能となる。

#### 3.1.2.2 実験結果と考察

BCT による BmOR3 発現システムの測定結果を図 3.2 に示す。上記の条件で実験を行った結果、30  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  の Bombykal いずれの濃度でも BCT によってセンサ細胞の応答を検出するには至らなかった。この原因について考察する。BCT は汎用的なバイオセンシングシステムとして開発され、高密度 CMOS 集積アレイを生かした、DNA 検出、バクテリア/ウイルスのカウントを主なターゲットとしてきた [Niitsu et al., 2015]。これらの用途においては、電極サイズは小さくなるほど有利である。一方で、Sf21 細胞の直径はおよそ 15  $\mu\text{m}$  であり、BCT の電極サイズが 20 x 20  $\mu\text{m}^2$  であることから、1つの電極に対して1つの細胞が入ることが想定される。実際に BmOR3 発現システムをセンサアレイ上に播種し、蛍光顕微鏡で観察した結果を図 3.3 に示す。蛍光画像より、409.6 x 409.6  $\mu\text{m}^2$  の視野内に 575 点の電極が存在し、上面から観察してセンサ細胞が接着していると想定される電極数は 111 点であった(電極への接着率:19.3%)。

画像より、センサ細胞は電極のみならずアレイを構築するポリイミド膜上にも多数接着することが確認された。また、上面からの観察では電極上に接着しているに見える細胞でも、実際にはポリイミドの壁に接着し、電極からは浮き上がっていることが想定され、応答が検出できる電極数はさらに少ないことが予想される。細胞の播種量を増やした場合には、電極位置が同定できなくなるという問題も発生した。アレイ型電極の場合は、多点計測が可能な反面、細胞が接着していない電極は溶液のノイズの影響を受けるため、被覆率が低下するほど信号損失が増大することが想定される。また、細胞がポリイミド膜に接着して電極からの距離が離れるほど、検出可能な信号強度は低下し、結果として応答検出は困難になると予想された。

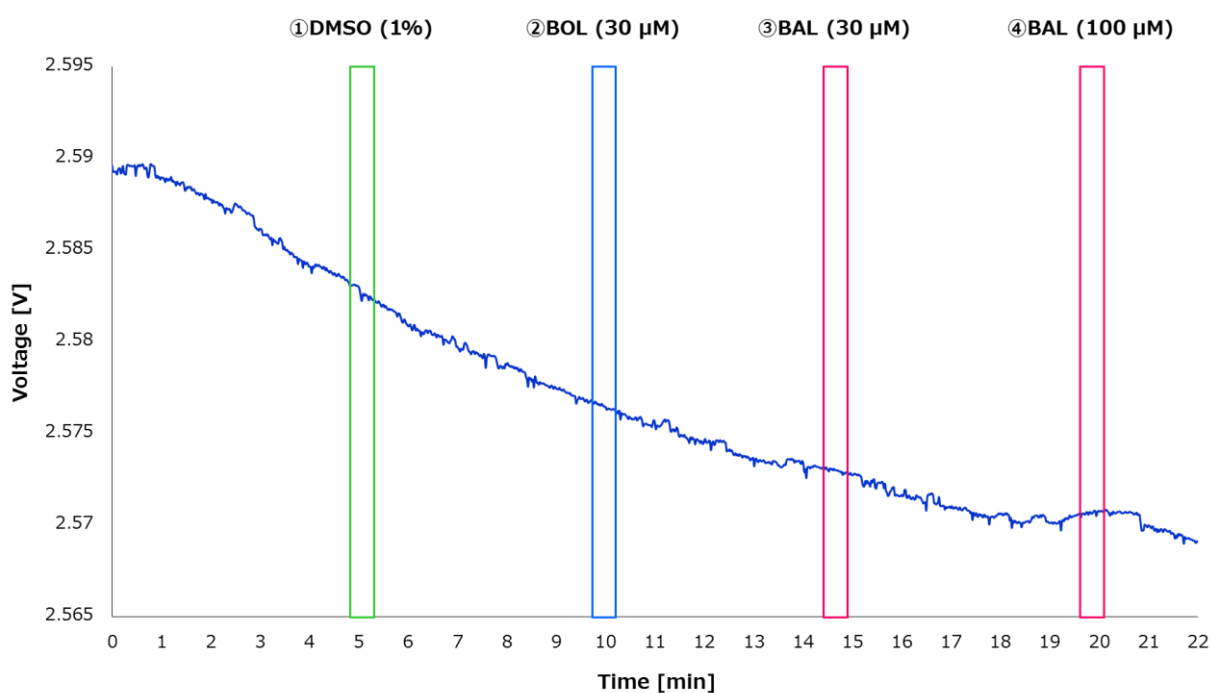


図 3.2 BCT を用いた BmOR3 発現系統の匂い応答測定結果

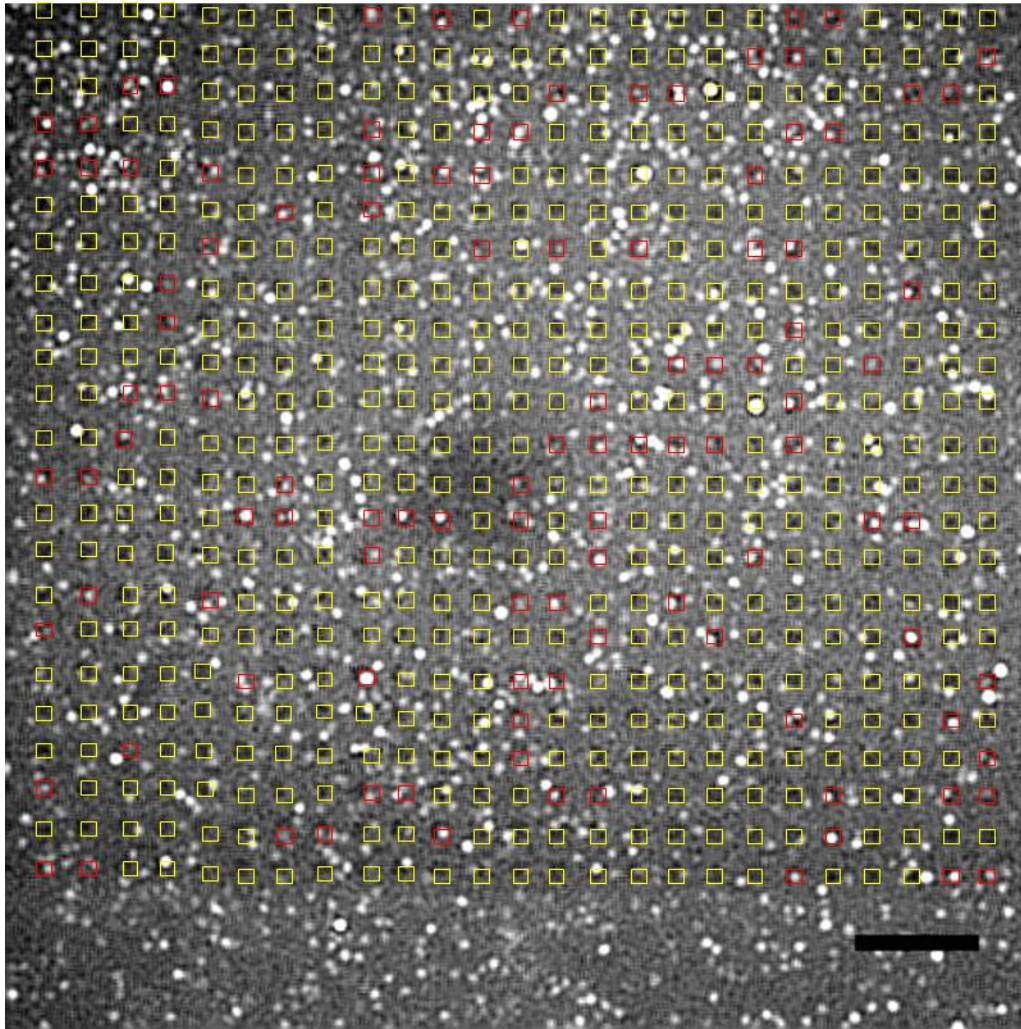


図 3.3 BmOR3 発現系統を播種した BCT チップの蛍光写真. 赤枠：細胞が接着していると思われる電極. 黄色枠：細胞がないと思われる電極. 水面の影響を受けているため電極のピッチは一定間隔に観察されていない. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$

## 3.2 センサ細胞の匂い応答検出に特化したデバイスの設計

### 3.2.1 設計方針

本章では、BCT の構造と測定結果を考慮し、センサ細胞の匂い応答検出を目的としたデバイスの設計を実施した。設計方針は以下の通りである。

- (1) センサ細胞の微小な匂い応答を電氣的に検出できること。
- (2) センサ細胞を検出部に播種しやすく、細胞とデバイスの電氣的結合状態を検討できる構造であること。

(1)について説明する。過去の FET を用いた細胞応答の測定では、細胞のアクションポテンシャルを主な検出対象としている [Fromherz, 2003]。しかし、センサ細胞に使用される Sf21 細胞は、神経軸索が未分化の卵巣由来の細胞であるためアクションポテンシャルは発生しない。本研究では、先行研究で検出された総合的な応答ではなく、昆虫嗅覚受容体の微小な信号を検出する必要がある。FET を利用したバイオセンサでは、電位検出型と電流検出型が存在する。一般的に電位検出型バイオセンサは感度が十分でなく、用途を選ぶ必要があり、電流検出型の方が感度に優れているとされている [新津, 中里, 2017]。そこで本研究では、センサ細胞の微小な匂い応答を検出するため、ドレイン電流を直接検出する電流検出型バイオセンサの設計を実施した。

(2)について説明する。BCT は 4096 点のアレイ計測が可能なシステムであるが、図 3.3 に示した様に、センサ細胞を BCT の  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  の電極上にマニュアルで播種することは極めて困難であった。また、BCT による応答検出を行った際、上面から観察したとき細胞が接着しているように見られた電極からも信号は検出されなかった。これは、センサ細胞と電極の接着状態、そして適切な電氣的結合状態が把握できていないためと考えられる。これらの課題を検討するには、高密度に集積した電極は不要で

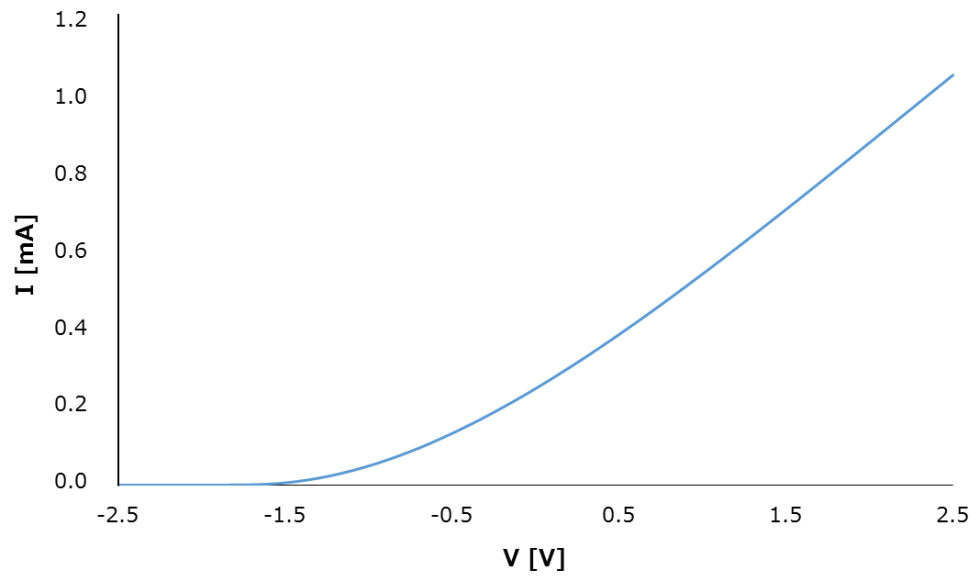
あり、最も単純な単一の FET かつ、自然接着によっても確実に細胞が播種できる電極サイズが望ましい。よって本研究では、細胞の接着した電極位置と応答を対応できる単一の FET で、電極部に細胞が播種しやすい 1 辺が  $50\ \mu\text{m}$  と  $100\ \mu\text{m}$  の電極を設計した。広い電極の場合、BCT では困難な複数のセンサ細胞からの応答検出が可能であり、信号強度を向上させることも期待できる。

### 3.2.2 FET の設計

本研究では、センサ細胞の匂い応答検出に適した FET インターフェースを設計する必要がある。しかし、昆虫嗅覚受容体の応答を FET によって検出した事例はなく、どのような FET のゲートサイズが応答検出に適切であるかは不明であった。そこで、異なるゲートサイズを持つ FET を複数設計し、適切なゲートサイズを選択した。まず、CMOS ファウンドリサービス（フェニテックセミコンダクター株式会社）のデザインルール  $0.6\ \mu\text{m}$  に基づき、N チャネル型 MOSFET (NMOS) の設計を実施した。NMOS のゲート幅と長さは、それぞれ  $5\ \mu\text{m}$  と  $2\ \mu\text{m}$  とした。NMOS に加えて、細胞応答の検出方法を拡張するため、P チャネル型 MOSFET (PMOS) デバイスについても設計した。NMOS と同程度のドレイン電流が流せるように、PMOS のゲート幅は NMOS の 2 倍の  $10\ \mu\text{m}$  とした。

半導体パラメータアナライザ (B1500A: Keysight Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて、各デバイスの特性解析を行った結果を図 3.4 に示す。NMOS はドレイン電圧:  $2.5\ \text{V}$ , ソース電圧  $-2.5\ \text{V}$ , バックゲート電圧:  $-2.5\ \text{V}$ , ゲート電圧を  $-2.5\ \text{V}$ - $2.5\ \text{V}$  の範囲で変化させて動作させた。PMOS はソース電圧:  $2.5\ \text{V}$ , ドレイン電圧  $-2.5\ \text{V}$ , バックゲート電圧:  $2.5\ \text{V}$ , ゲート電圧を  $-2.5\ \text{V}$ - $2.5\ \text{V}$  の範囲で変化させて動作させた。

(a)



(b)

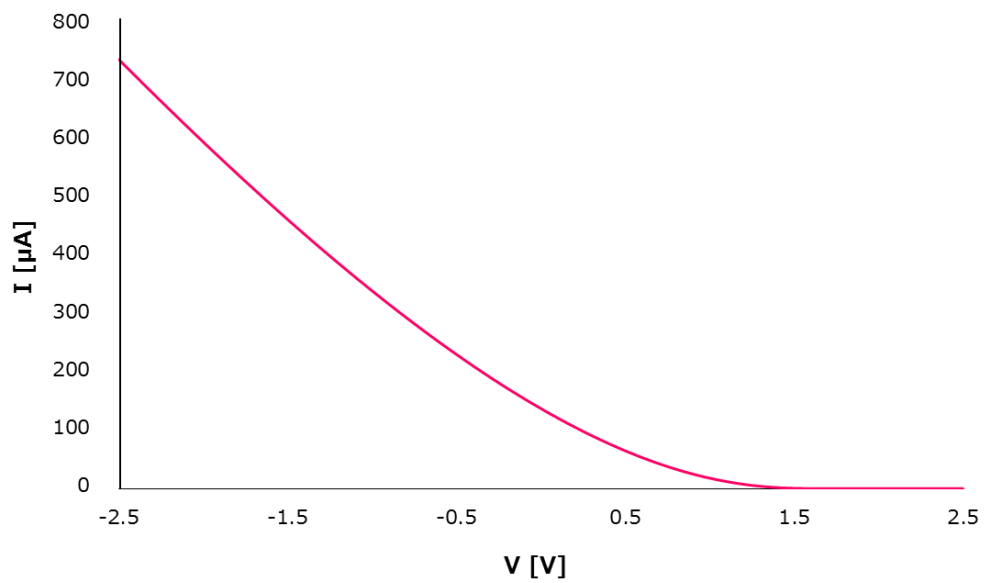


図 3.4 設計したデバイスの特性解析. (a) NMOS の  $I_d$ - $V_g$  曲線. (b) PMOS の  $I_d$ - $V_g$  曲線.

### 3.2.3 伸長ゲート電極の設計

3.2.1 で挙げた条件を満たす匂い応答検出デバイスの設計において、細胞応答の検出を担う電極の設計は極めて重要な位置を占める。先行研究では、数  $10\ \mu\text{m}$  から数  $100\ \mu\text{m}$  の比較的大きいサイズの FET ゲートに、直接細胞を播種して応答を計測したものがある [Sakata et al., 2008, Schaffhauser et al., 2012]。この設計では、配線抵抗などの影響を受けずに応答が検出できる。しかし、ポストプロセスによってゲート部分を露出させる必要がある。また、デバイスの洗浄を考える場合は、FET ゲートを直接洗浄することはデバイスへのダメージが増大する可能性がある。そこで本研究では、同一チップ上で FET ゲートと電極部を配線で接続した、伸長ゲート電極 (Extended-gate electrode) を設計に採用した。伸長ゲート電極によって電極サイズの自由度が向上し、本研究では複数のセンサ細胞を播種可能な電極として  $100 \times 100\ \mu\text{m}^2$  の電極を測定に使用した。

### 3.2.4 電極表面の設計

先行研究の CMOS 集積回路ベースのバイオセンサでは、ポストプロセスによって金を蒸着もしくはメッキして電極を形成している [Nakazato et al., 2009]. しかし、金は液中で分極を起こして固液界面の電位が不安定になり（電位ドリフトと呼ばれる現象）、生体分子の存在に基づく電位変化の検出精度が劣化することが報告されている [Miyahara et al., 2014]. そこで本研究では、CMOS ファウンドリサービス由来のアルミニウム電極上に、アルミニウムの酸化物である  $\text{Al}_2\text{O}_3$ （アルミナ：周波数 1 MHz, 純度 96% のとき, 誘電率  $\epsilon = 9.6$  [井本, 古橋, 1994]) をスパッタリングすることで、分極を低減して電極表面の安定化を図った. 大気中のアルミニウムは、表面に 1–10 nm 程度の  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜が自然酸化膜として形成される [Sumika Chemical Analysis Service Ltd., TN033]. よって、スパッタリングによる  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜の形成には特別な前処理を必要とせず、膜形成や密着性が良好であると考えられる. Dektak による測定から、スパッタリングによって形成された  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜厚さは 40–80 nm であった. 一方で、アルミニウムには神経毒性が報告されているが、この点については第 3 章の 3.4 で詳細に検討する. 以上の設計方針に基づいて作成した伸長ゲート型 FET のデバイス写真を図 3.5 に示す. また、ボンディングを含むデバイス全体の写真を図 3.6 に示す.

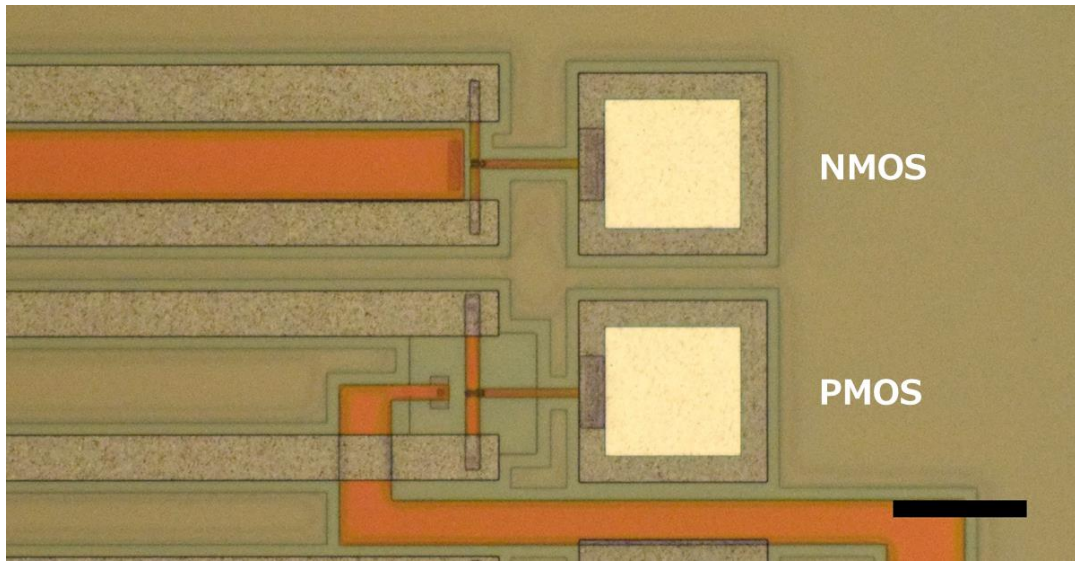


図 3.5 設計した伸長ゲート型 NMOS, PMOS 写真. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$

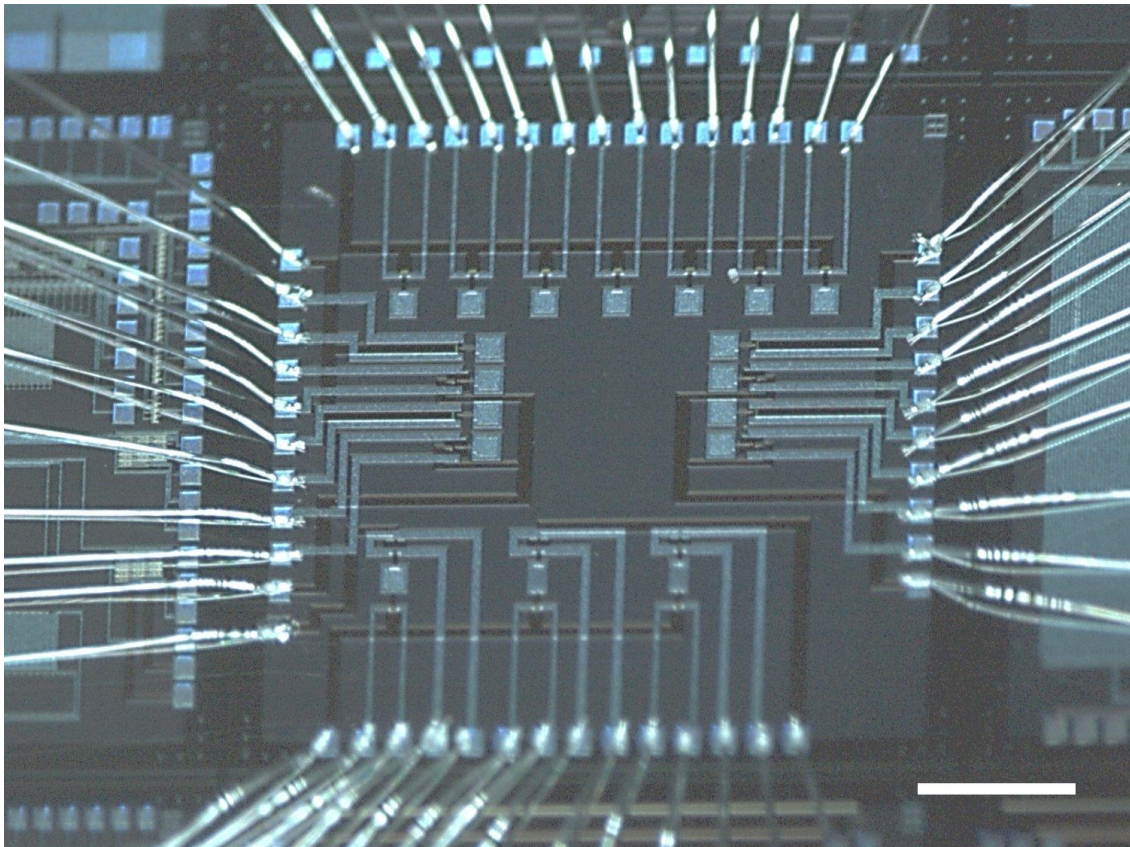


図 3.6 ワイヤーボンディングを含むデバイスチップ全体写真. Scale bar: 1 mm

### 3.2.5 チャンバーの構築

応答測定時には、センサ細胞を含む懸濁液を検出部に設置する必要がある一方で、FET チップと PCB 基板を接続するワイヤーボンディングを保護する必要がある。本研究では、PDMS stamp によって検出部のみを開口し、ボンディング部はエポキシ樹脂のチャンバーを構築した。チャンバーの構築手順を図 3.7 に示す。まず、金型にポリジメチルシロキサン (PDMS: SILPOT 184: Dow Corning Toray Co., Ltd., Japan) を流し込み、逆ピラミッド型の PDMS block を作成した。PDMS の硬化には、60°C のホットプレートで 1 時間加熱した。PDMS の硬化後、ピンセットを用いて作成した PDMS block をデバイス上に設置した。PDMS block とチップの間に気泡やゴミがないことを確認し、生体適合性のあるエポキシ樹脂 (EPOTEK 302-3M: Epoxy Technology Inc., Billerica, MA, USA) をアクリル円筒と PDMS block の間に流し込んだ。その後、65°C のホットプレートで 3 時間加熱し、エポキシ樹脂を硬化させた後に PDMS block を除去した。PDMS とエポキシ樹脂は、どちらも主剤と硬化剤の 2 液を混合する方式であるが、攪拌の際には気泡が混入しやすいため、自転・公転ミキサーのあわとり練太郎 (AR-100: THINKY CORPORATION, Tokyo, Japan) を用いて攪拌と脱泡を実施した。手動による攪拌よりも、ミキサーによって攪拌した方が硬化時間を低減し、気泡の混入を抑制することができる。

このようにチップ上にチャンバーを構築することで、検出部以外を保護することはもちろん、ペリスタルティックポンプとの接続により、灌流を行いながら複数回の匂い刺激が可能となる。

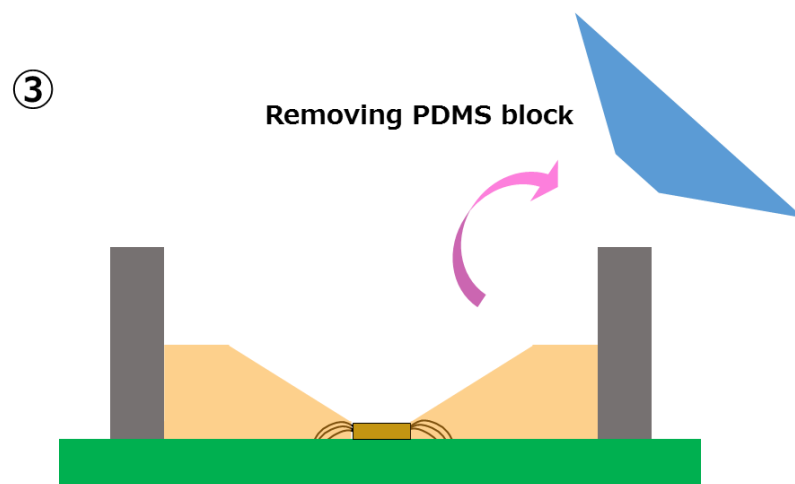
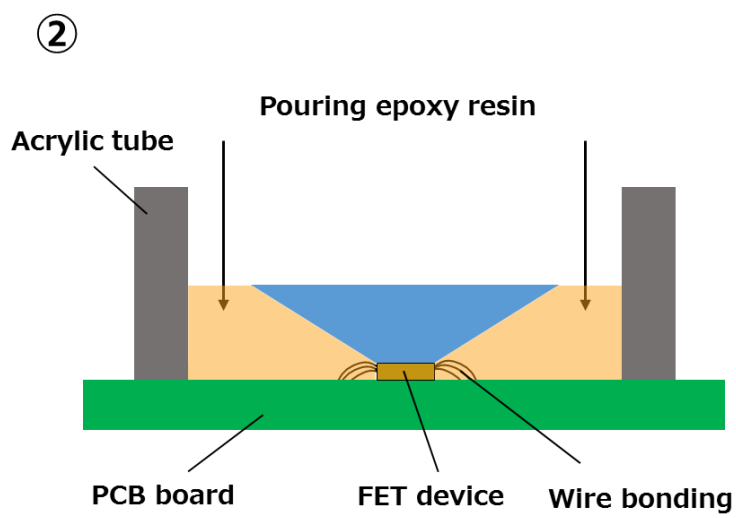
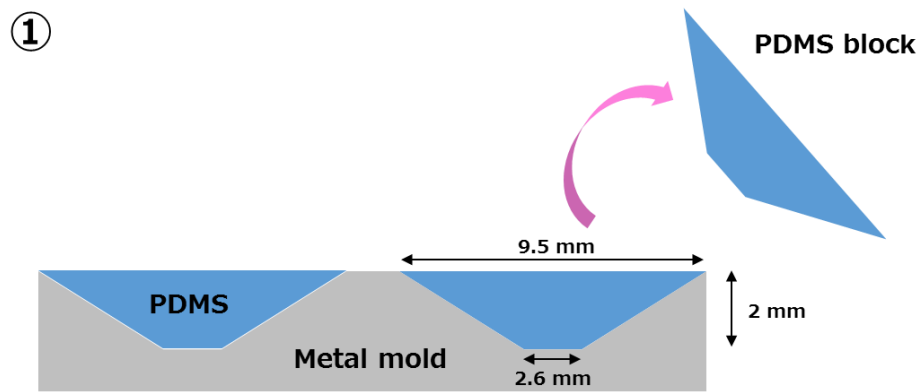


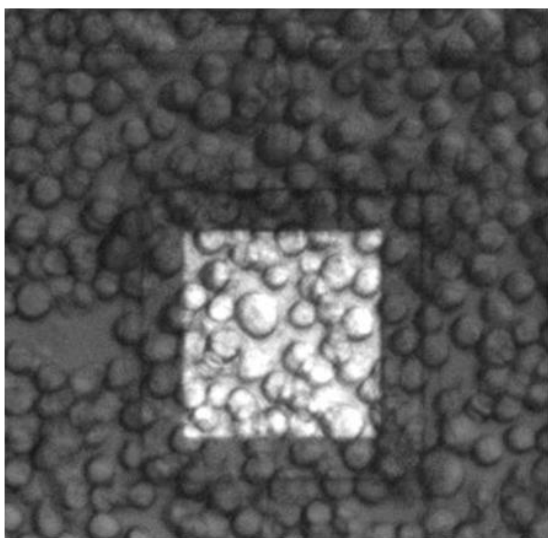
図 3.7 FET チップ上へのエポキシチャンバー構築手順

### 3.3 デバイスの洗浄性検討と洗剤選択

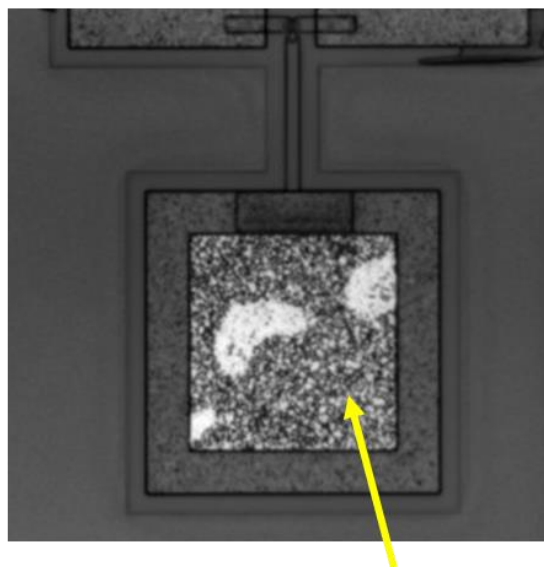
実際の運用を想定すると、検出デバイスは使い捨てとして設計することが考えられるが、実験段階においては繰り返し使用できることが望ましい。そこで本研究では、細胞播種後のデバイスの洗浄性について検討した。細胞が播種された電極部は、接着した細胞の脂質二重膜の影響によって脂分が残り、蒸留水や milliQ (18 M $\Omega$ cm の超純水 : Merck, Germany の装置に由来する.) では細胞片を除去することが困難であることが確認された。そこで、脂分を除去可能な洗剤を検討し、脂肪や蛋白汚染の洗浄に優れた商用のアルカリ洗剤 (ホワイト 7-AL (pH: 11.2  $\pm$  0.5) : ユーアイ化成株式会社, 兵庫県, 日本) を、milliQ で 2% に希釈した溶液で洗浄を試みた。その結果、チャンバー内に洗剤を含む溶液を入れ、複数回ピペッティングすることで、播種された細胞を全て除去できることが確認された。

しかし、アルカリ洗剤は洗浄力に優れる一方、pH が高いため、アルミニウムもしくは Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> をスパッタリングした電極の腐食を引き起こすことが確認された (図 3.8)。そこで、洗剤を中性洗剤 (コンタミノン N (pH: 7.0) : Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) に変更し、milliQ で 2% に希釈した溶液で洗浄したところ、アルミニウムをベースとする電極の腐食を抑制できることが確認された。洗剤を使用した後は milliQ で洗剤を十分洗い流し、ブローによってデバイスを乾燥させることで、再度電極上に新しい細胞が播種できる。

(a)



(b)



腐食の発生したAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>電極

図 3.8 (a) Sf21 細胞を播種した Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極. (b) アルカリ洗剤 (ホワイト 7-AL ) を用いて洗浄した後の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極.

## 3.4 デバイスに対するセンサ細胞の適合性

### 3.4.1 アルミニウム材料の細胞への影響検討

MOSFET や微小電極アレイ (Multi electrode array: MEA)を用いた細胞応答測定においては、電極表面の電位の安定化のみならず、細胞を接着する電極表面の生体適合性 (biocompatibility)が安定した測定のために重要となる。例えば、金 (Au), 白金 (Pt), 白金黒 (Pt-Black), 窒化チタン (TiN)などの生体適合性のある材料を用いて、電極表面にコーティングを施したデバイスが設計されている [Nakazato, 2009, Heer et al., 2004, Frey et al., 2010, Multi Channel System, 2010].

本研究のデバイスは、デバイス設計の信頼性向上と製造コスト低減のため、CMOS ファウンドリサービス (フェニテックセミコンダクター株式会社) の 0.6  $\mu\text{m}$  デザインルールに基づいて設計・試作されている。CMOS ファウンドリによる設計では、電極材料の選択肢が基本的にアルミニウムに限定される [Graham, 2011, Heer et al., 2004]. アルミニウムは神経毒性が報告されているため [Graham et al., 2009, Graham et al., 2011, Heer et al., 2004], ポストプロセスによって生体適合性材料のコーティングを実施する必要がある。しかし、ポストプロセスによる生体適合性処理は、デバイスの実用化の観点からは、処理装置の導入や独自の製造ラインの立ち上げ、プロセスコストなど時間的・費用的コストを増大させる可能性がある。また、処理方法によっては、部分的なアルミニウムの露出も想定される。

デバイスの実用化に向けては、高い設計信頼性を持ち、かつコスト低減が可能な商用の CMOS ファウンドリの利用が望ましいが、アルミニウムベースの電極材料を使用したときの細胞活性を評価する必要がある。アルミニウムの生体に対する毒性評価の研究は、様々な対象・実験方法で実施されてきた。しかし、先行研究の実験条件はバイオセンサの文脈に直接適用できるものは少なく、本研究に合わせた評価必要となる。

### 3.4.2 電極材料上での蛍光計測

センサ細胞が電極材料上でセンサ素子として機能することを確認するため、電極材料をスパッタリングした  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  の Si チップを用意し、その上に細胞を播種して蛍光計測を行った。作成した試験チップは、本研究で電極材料として用いる  $\text{Al}_2\text{O}_3$  と、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  をスパッタする前の状態であるアルミニウム、Si のみの 3 種である。これらの試験片を 12 mm カバーガラス上に設置して細胞を播種した。Si チップについては、アルミニウムと  $\text{Al}_2\text{O}_3$  の上に播種された細胞がカバーガラスの場合よりも高い位置にくるため、チップを設置したことによる高さ変化を検討するために実施した。また、コントロールとして、先行研究と同様に 12 mm カバーガラス上に細胞を播種して蛍光計測を行った。

各基板上での BmOR3 系統の典型的な濃度依存的応答の蛍光計測結果を図 3.9 (a) に示す。また、各基板上で  $10 \mu\text{M}$  Bombykal による刺激を行う前後の疑似カラー画像を図 3.9 (b) に示す。刺激後の画像は、 $10 \mu\text{M}$  Bombykal に対して 5% 以上の蛍光上昇を示した細胞を示している。1, 3,  $10 \mu\text{M}$  Bombykal によって刺激を行った結果、全ての基板上で過去の細胞応答に対応する濃度依存的応答が検出された。疑似カラー画像より、アルミニウムベース材料上の細胞であっても、異常な蛍光上昇を示した個体に影響されて全体の蛍光輝度が上昇しているのではなく、視野内全体で蛍光強度変化を示していることがわかる。

アルミニウムベース材料上の細胞応答割合を評価するため、アルミニウム上に播種された BmOR3 発現系統の濃度依存応答の平均値と  $\text{Al}_2\text{O}_3$  基板、シリコン基板、12 mm カバーガラス上の応答の比較を行った (図 3.10 (a)–(c))。同様に、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  基板上の BmOR3 系統の濃度依存的蛍光上昇の平均値と、シリコン基板、12 mm カバーガラス上の応答の比較を実施した (図 3.10 (d), (e))。結果、アルミニウム上の細胞は他の基板上の細胞と同程度の蛍光上昇値を示し、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  基板上の細胞もシリコン基板、12 mm カバー

ガラス上と同程度の蛍光上昇値を示した。次に、各基板上的 BmOR3 系統で 5%以上の蛍光応答を示した細胞応答割合を図 3.10 (f)に示す。まず、細胞への影響が懸念されるアルミニウム上の細胞応答割合を計算すると、80%以上の細胞が Bombykal に応答して蛍光上昇を示すことを確認した。また、その割合は Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Si, 12 mm カバーガラス上での応答と有意差は見られなかった。既に OSFET の電極として使用している Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>の場合も、Si, 12 mm カバーガラス上と同様の細胞応答割合を得た。

以上の結果より、センサ細胞はアルミニウムベースの電極材料上でも、カバーガラス上と同様に使用できることを確認した。

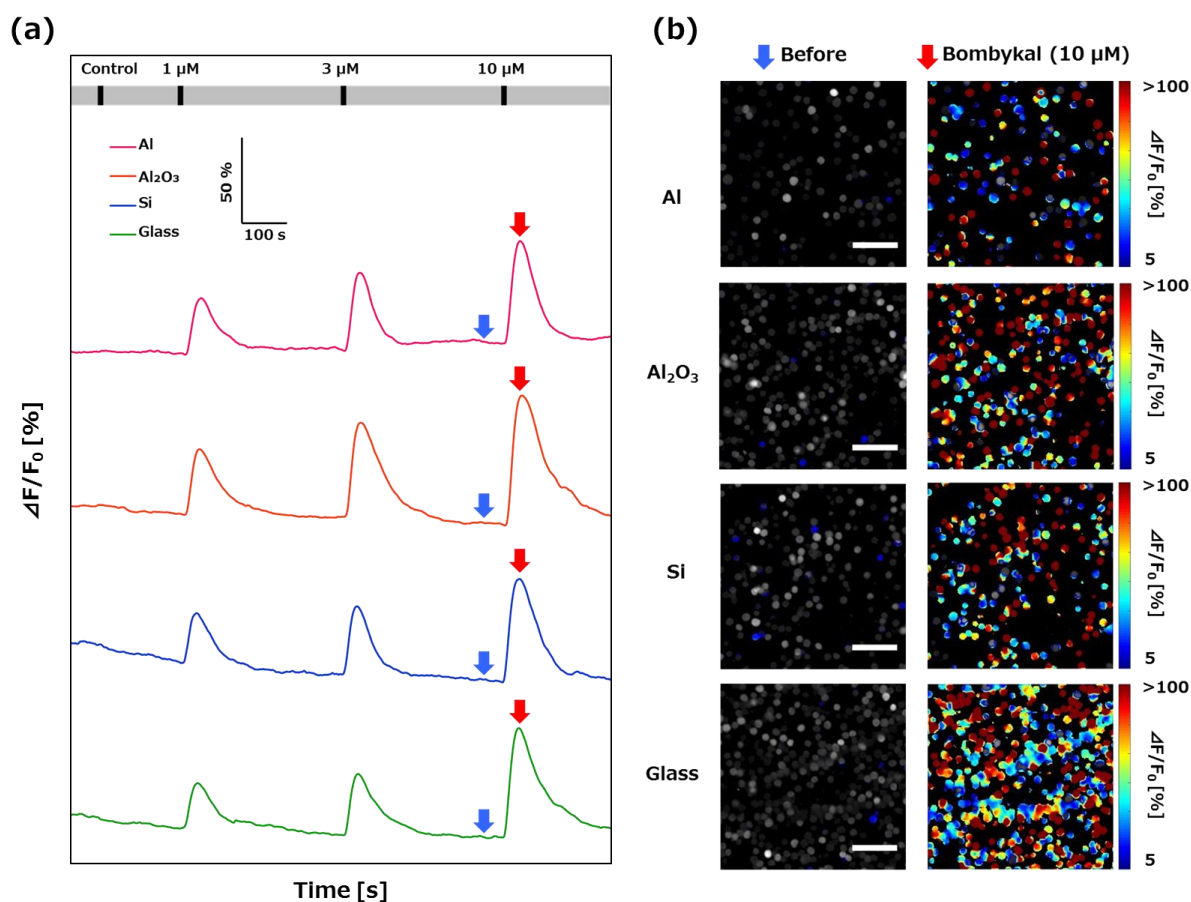


図 3.9 (a) 各基板上での BmOR3 発現系統の典型的な濃度依存的応答の蛍光計測結果. 各基板上に播種された BmOR3 発現系統の個数は, Al: 165 個,  $Al_2O_3$ : 363 個, Si: 268 個, 12 mm Cover glass: 336 個. (a)の上部にある長い灰色のバーは 0.1% DMSO 含有のアッセイバッファ溶液の灌流を示し, 短い黒いバーは, 各濃度の匂い物質がチャンバー内を流れる 15 秒間を示す.

(b) 各基板上の匂い刺激前と 10  $\mu M$  Bombykal による刺激後に 5%以上の蛍光上昇を示した細胞の疑似カラー画像. 青矢印は匂い刺激前の状態を示し, 赤矢印は蛍光強度変化のピークを示す. (a)の青矢印と赤矢印は, (b)の疑似カラー画像の匂い刺激前後に対応する. All scale bars: 100  $\mu m$ .

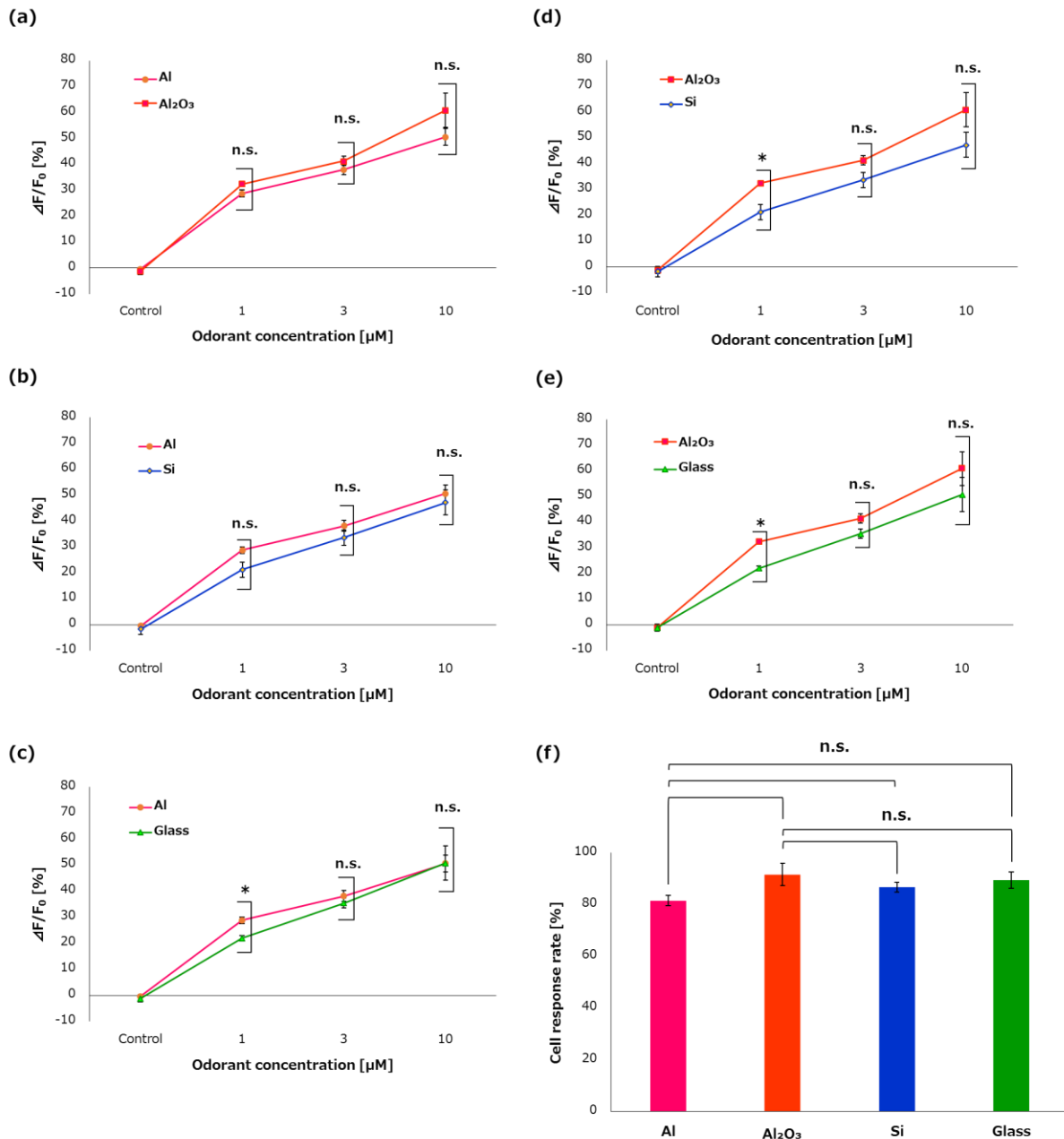


図 3.10 (a) アルミニウム上に播種された BmOR3 発現系統の濃度依存応答の平均値と Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 基板の比較, (b) シリコン基板, (c) 12 mm カバーガラス上の比較. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 基板上の BmOR3 系統の濃度依存的蛍光上昇の平均値と, (d) シリコン基板, (e) 12 mm カバーガラス上の比較. Data represent means  $\pm$  SEMs of fluorescence intensity changes in all cells (N = 3 individual tests, Welch's t-test: n.s. = not significant, \*p < 0.05). (f) 各基板上に播種された BmOR3 発現系統の 10  $\mu\text{M}$  の Bombykal による刺激を与えた後, 5%以上蛍光強度変化を示した細胞割合の比較. Data represent means  $\pm$  SEMs of fluorescence intensity changes of BmOR3 cells (N = 3 individual tests, Welch's t-test: n.s. = not significant).

### 3.4.3 HEK293T 細胞との細胞成長比較

アルミニウムが生体に及ぼす影響は、主に病気（例えばアルツハイマー病）との関連について様々な議論がなされてきた [Kawahara et al., 2001]. しかし、電気デバイスを用いた細胞応答計測に適用可能な、アルミニウム基板上での細胞活性に関する報告はほとんどない. そこで、Sf21 細胞のアルミニウム基板上での細胞活性を評価するため、先行研究の細胞応答測定に用いられた HEK293 細胞との比較を行うことでその影響の評価を試みた. 本研究では、SV40 LargeT 抗原を発現する派生株である HEK293T 細胞と Sf21 細胞のアルミニウム基板上での成長を比較した. コントロールとして、HEK293T 細胞と Sf21 細胞をプラスチックディッシュにも播種し、観察を実施した. 各基板上の Sf21 細胞と HEK293T 細胞の細胞成長を図 3.11, 図 3.12 に示す. また、それぞれの細胞面積の経時変化を図 3.13 に示す.

Sf21 細胞は、細胞播種 0 日（播種 2 時間後）から 3 日目まで、アルミニウム上とプラスチックディッシュ上で同程度の成長面積が観察された. トリパンブルーで染色された細胞も観察されなかった. 一方で、HEK293T 細胞では、アルミニウム上の細胞は時間が経過しても成長が遅く、トリパンブルーで染色された細胞が観察された. 本研究では、Sf21 細胞と HEK293T 細胞は異なる pH で培養を行った（Sf21 細胞 : pH 7.8, HEK293T 細胞 : pH 6.4). 本研究では、比較の際に互いの pH の違いは考慮していない.

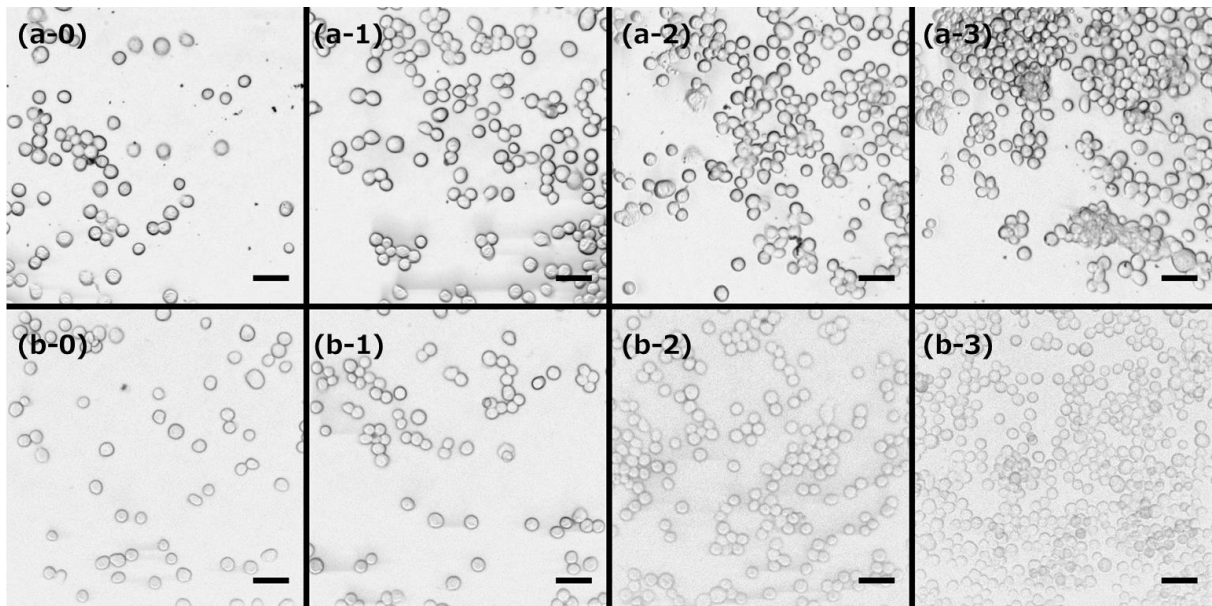


図 3.11 各種基板上での 0-3 日後までの Sf21 細胞の経時変化観察. (a-0)–(a-3) アルミニウム基板上の Sf21 細胞. (b-0)–(b-3) プラスチックディッシュの Sf21 細胞. アルミニウム基板, プラスチックディッシュどちらも各サンプルでトリパンブルーを添加した写真である. All scale bars: 50  $\mu$ m

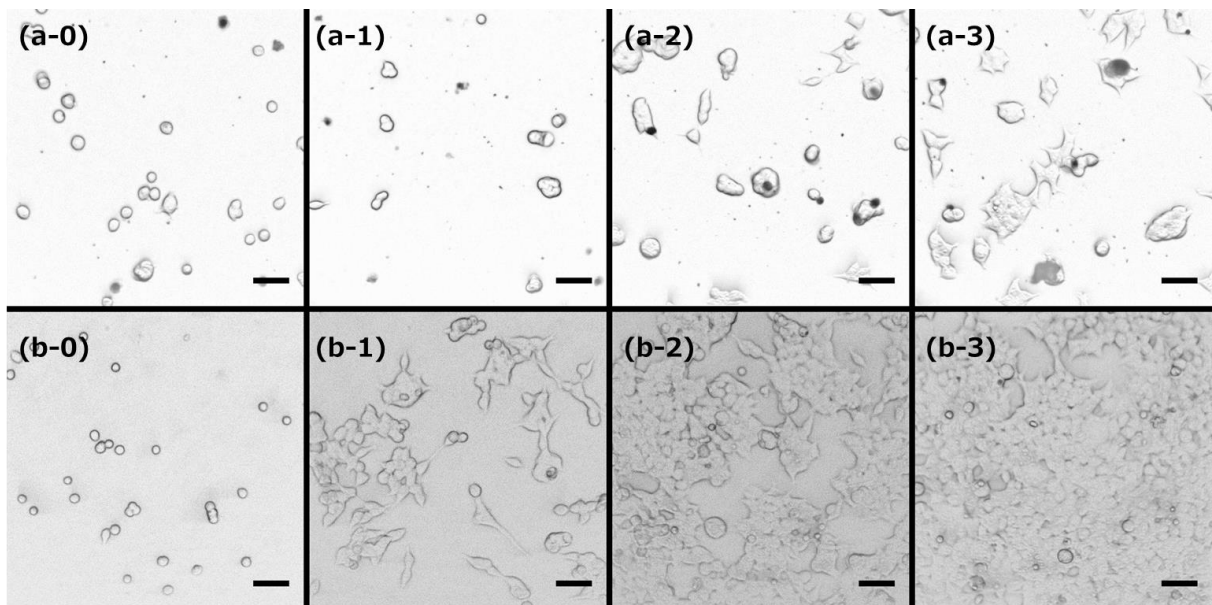


図 3.12 各種基板上での 0-3 日後までの HEK293T 細胞の経時変化観察. (a-0)–(a-3) アルミニウム基板上の HEK293T 細胞. (b-0)–(b-3) プラスチックディッシュの HEK293T 細胞. アルミニウム基板, プラスチックディッシュどちらも各サンプルでトリパンブルーを添加した写真である. All scale bars: 50  $\mu$ m

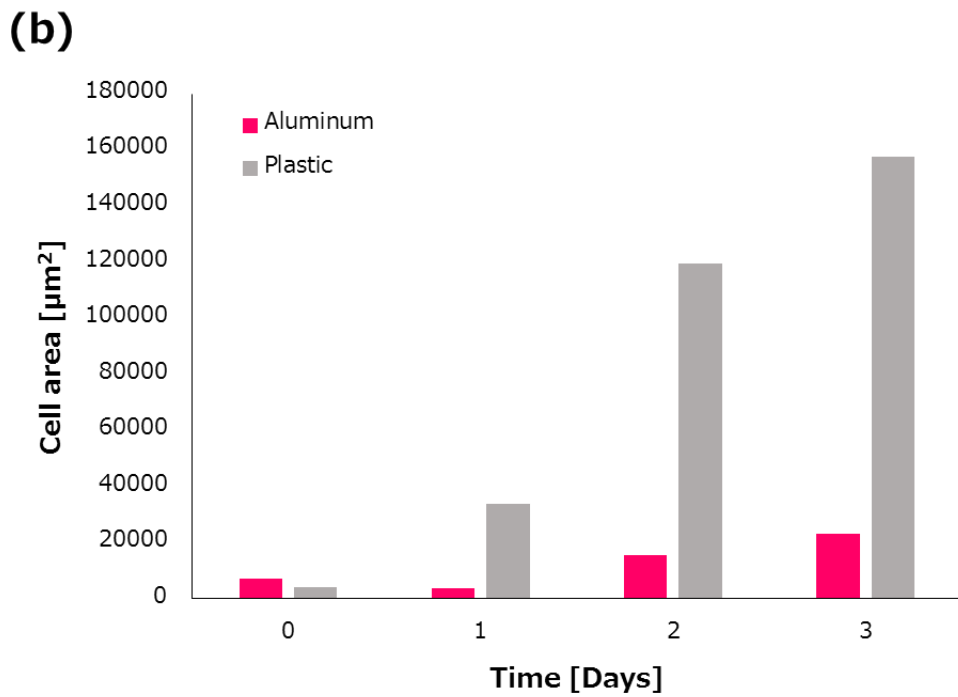
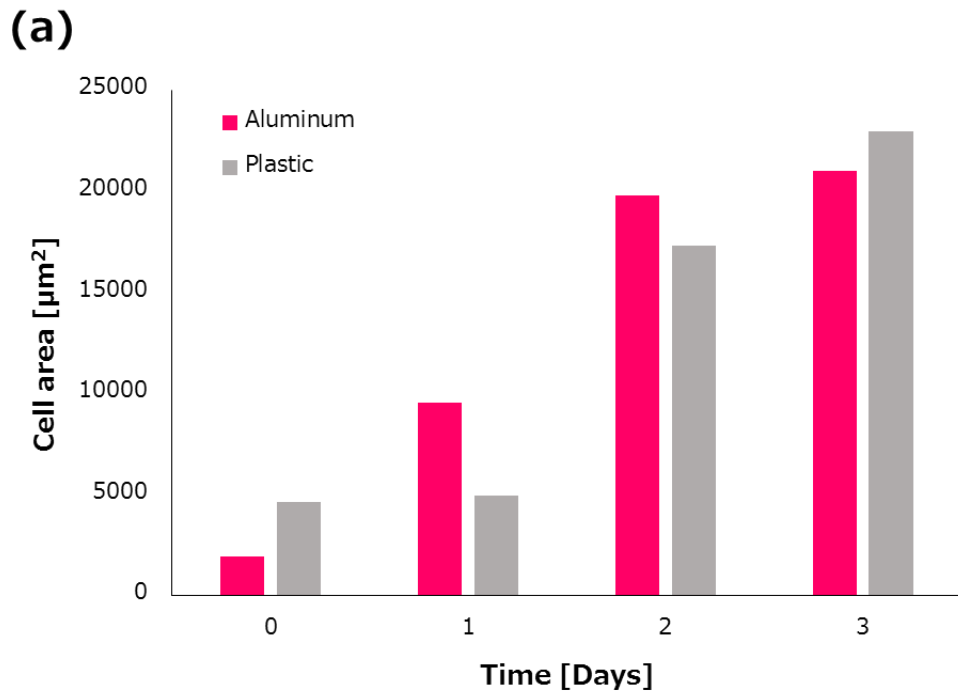


図 3.13 各種基板上における Sf21 細胞と HEK293T 細胞の増加面積の経時変化観察. (a) Sf21 細胞. Sf21 細胞では明視野画像の右上 1/4 ( $204.8 \times 204.8 \mu\text{m}^2$ ) を MATLAB で抽出して測定した. (b) HEK293T 細胞.

### 3.4.4 電極材料上での細胞直径の検討

アルミニウム材料の細胞に対する影響評価として、細胞形状の観点から検討を行った。アルミニウムをスパッタリングした Si 基板上に播種した Sf21 細胞と、プラスチックディッシュ上に播種した Sf21 細胞の直径を、ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて比較した。各種基板上的細胞は、播種 2 日後のものを計測した。アルミニウム基板上の 164 個の細胞とプラスチックディッシュ上の 190 個の細胞を比較した結果、両者に有意差がないことを確認した (図 3.14)。細胞直径はどちらもおよそ 15  $\mu\text{m}$  であった。

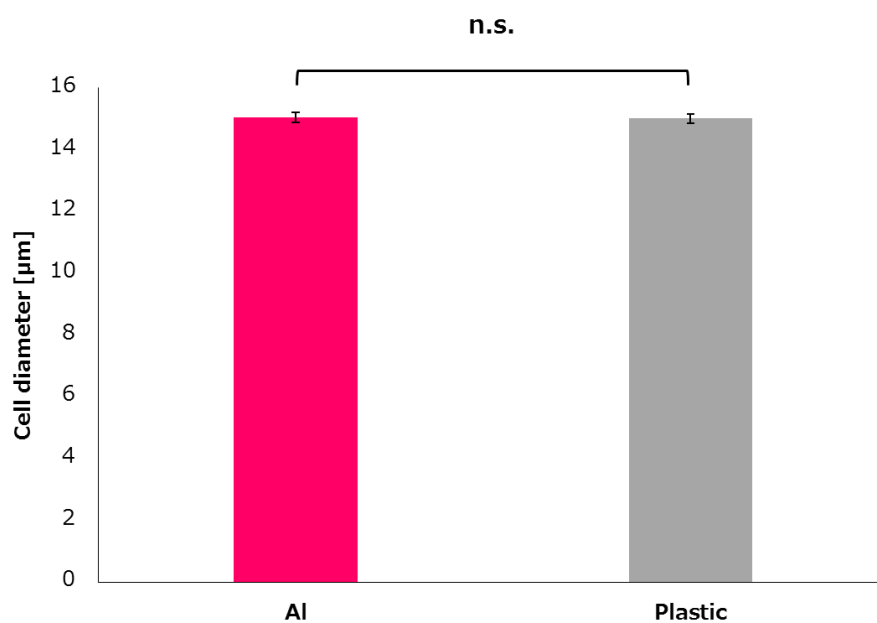


図 3.14 アルミニウム基板とプラスチックディッシュ上の Sf21 細胞の直径比較. Data represent the means  $\pm$  SEM of the cell diameters of cells of them (N = 164 in case of the cells on the aluminum-sputtered substrate and N = 190 for the cells on the plastic cell culture dish, Welch's t-test: n.s. = not significant).

### 3.5 考察

既存の汎用バイオセンシングシステムである BCT を用いた実験結果を受け、センサ細胞の匂い応答検出に特化したデバイスの設計を実施した。半導体パラメータアナライザによる測定から、設計したデバイスは NMOS, PMOS とともに良好な FET 特性を示すことを確認した。本章では、デバイス上へのチャンバーの設置や洗浄性を検討し、デバイスの保護と繰り返し使用可能なデバイスを構築したため、実験効率の向上が期待できる。本章で行った設計は、センサ細胞の応答検出を行う際、BCT を含む既存のバイオセンシングシステムの改良や、新しいデバイス開発の設計指針を与えると考えられる。

アルミニウムベース材料上の蛍光計測において、 $1 \mu\text{M}$  の刺激の際、アルミニウムと  $\text{Al}_2\text{O}_3$  上の細胞は、 $12 \text{ mm}$  カバーガラスよりも大きな蛍光強度を示した。この原因として基板の反射の影響が考えられるが、少なくともアルミニウムベース材料はセンサ細胞の蛍光強度変化を減衰させないことが示された。アルミニウム上のセンサ細胞の直径比較において、Sf9 細胞の直径が  $15 \mu\text{m}$  程度という報告があるため [Rahioui et al., 2007], 本研究の結果は先行研究と比較しても同程度のサイズであると考えられる。よって、Sf21 細胞はアルミニウム基板上でも収縮や肥大化、細胞形状の破壊を起こさないことが示唆された。アルミニウムベース材料上での蛍光計測と細胞接着状態の観察より、Sf21 細胞に基づくセンサ細胞は、アルミニウムによる毒性に耐える特異な性質を持ち、商用の CMOS ファウンドリを直接適用した高信頼性かつ低コストなセンサシステムの構築に有用である。

### 3.6 まとめ

本章では、センサ細胞の匂い応答を電氣的に検出可能なデバイス開発と測定系の構築を行った。また、CMOS ファウンドリのアルミニウムベース電極材料上で、センサ細胞が機能するかについて評価を実施した。既存の汎用バイオセンシングシステムである BCT を用いた実験では、匂い応答の検出に至らなかった。そこで本章では、センサ細胞の微小な匂い応答を電氣的に検出可能であり、細胞播種が容易なデバイスの設計を行った。本デバイスでは、電極を広く設計することで電子顕微鏡によるセンサ細胞-デバイス間の接着状態が検討可能であり、電氣的結合状態の解明にも有用である。また、電極上に播種された複数のセンサ細胞からの応答検出も期待できる。

アルミニウムベース材料上に播種されたセンサ細胞の性能を確認し、濃度依存応答カーブ、蛍光強度変化量、細胞応答割合は、過去に計測に使用されたカバーガラス上と同程度であることを確認した。一方で、HEK293T 細胞はアルミニウム上では成長が阻害されることが示唆された。本結果は、商用の CMOS ファウンドリのセンサ細胞への適用を可能とし、高信頼で低コストな匂いセンサシステムの構築に寄与することが期待される。

## 第4章：電気信号による匂い応答検出

### 4.1 設計したデバイスによるセンサ細胞の匂い応答検出

本章では、設計した伸長ゲート型 FET デバイスを用いて、カイコガの性フェロモンの1つである Bombykal に応答する BmOR3 発現系統と、1-octen-3-ol に応答する Or13a 発現系統のセンサ細胞の匂い応答を、電気信号として検出することを目的とした。

#### 4.1.1 実験条件

電気計測においても蛍光計測の場合と同様に、DMSO に溶解して希釈した匂い物質サンプルを作成した。BmOR3 発現系統を刺激する匂い物質には、Bombykal と Bombykol を使用し、1% 以下の濃度で DMSO を含有するアッセイバッファ溶液に溶解して濃度調整を実施した。Or13a 発現系統では、Bombykal と 1-octen-3-ol を使用した。測定溶液には、1% 以下の濃度で DMSO を含有するアッセイバッファ溶液を用いた。ペリスタルティックポンプ (MP-2010, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 1% 以下の DMSO を含有するアッセイバッファ溶液を流量約 140  $\mu\text{l}/\text{min}$  で灌流し、各匂い物質の刺激時間は約 120 秒とした。液中で FET を動作させて測定するため、参照電極 (RE-1B: ALS Co., Ltd, Tokyo, Japan) によってゲート電圧を印加し、高精度に長時間測定が可能であるプレシジョンソース/メジャーユニット (B2902A: Keysight Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて測定を行った。匂い応答検出系の模式図を図 4.1 に示す。

センサ細胞の応答は微小な電気信号であることが予想され、センサ細胞の応答のみによって FET の閾値を超えることは困難である。そこで本研究では、デバイスにバイアス電圧を印加し、常に FET が ON 状態になるよう動作させている。NMOS はドレイン電圧：2.5 V、ソース電圧：-2.5 V、ゲート電圧：0 V、バックゲート電圧：0 V で動作させた。NMOS では、通常はソース電圧とバックゲート電圧には同じ電圧を印加す

る。しかし、ソース電圧に合わせてバックゲートに  $-2.5\text{ V}$  を印加すると、ゲート電極には事実上  $2.5\text{ V}$  が印加された状態になる。ゲート電極がアルミニウムをベースとした材料で形成されているため、 $2.5\text{ V}$  の電圧差によって電極は容易に電気分解してバブルを発生させることが確認された。この問題を回避するため、本研究ではゲートとバックゲートに同じ電圧を印加した。本研究ではドレイン電流の変化を測定しているため、バックゲートとソース間で PN 接合ダイオードが形成されることによって発生する大きなリーク電流の影響は回避できる。

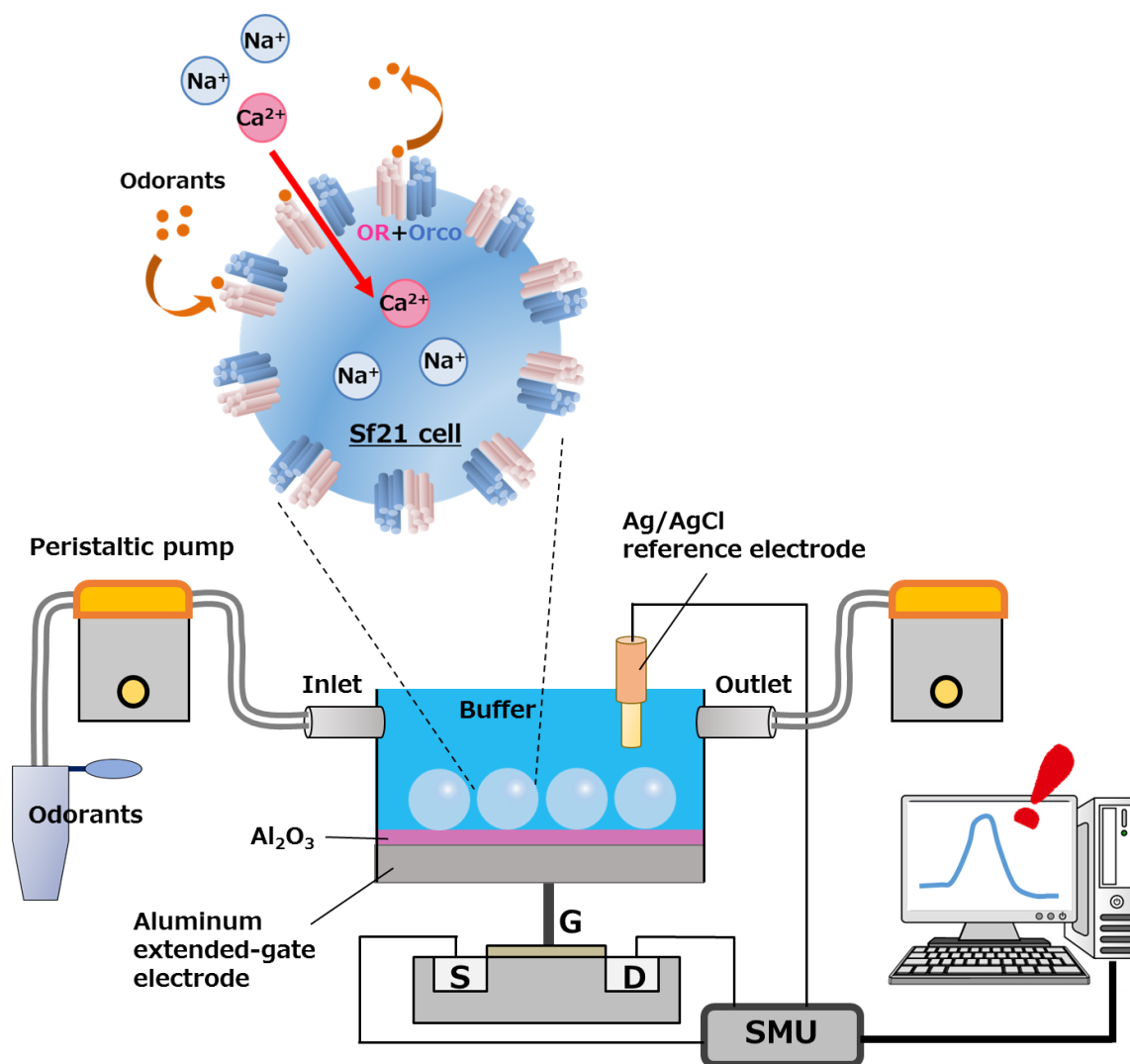


図 4.1 匂い応答検出系模式図

### 4.1.2 実験結果

BmOR3 発現系統では、アッセイバッファ溶液 (DMSO, <1%, コントロール) ⇒ 30  $\mu$ M Bombykol ⇒ 30  $\mu$ M Bombykal の順番に匂い刺激を実施した。結果、30  $\mu$ M Bombykal の刺激でのみドレイン電流上昇の上昇を検出した (図 4.2 (a))。Or13a 発現系統では、アッセイバッファ溶液 (DMSO, <1%, コントロール) ⇒ 30  $\mu$ M Bombykal ⇒ 30  $\mu$ M 1-octen-3-ol の順番に匂い刺激を実施した。その結果、Bombykal では変化がなく、1-octen-3-ol の刺激の際にドレイン電流上昇の上昇を検出した (図 4.2 (b))。

次に、BmOR3 発現系統の、Bombykol と Bombykal に対する選択性の応答検出の選択性について検討した。結果として、BmOR3 発現系統に対する Bombykal の刺激では、Bombykol と比較してドレイン電流の上昇値に有意差があることが示された (図 4.3)。

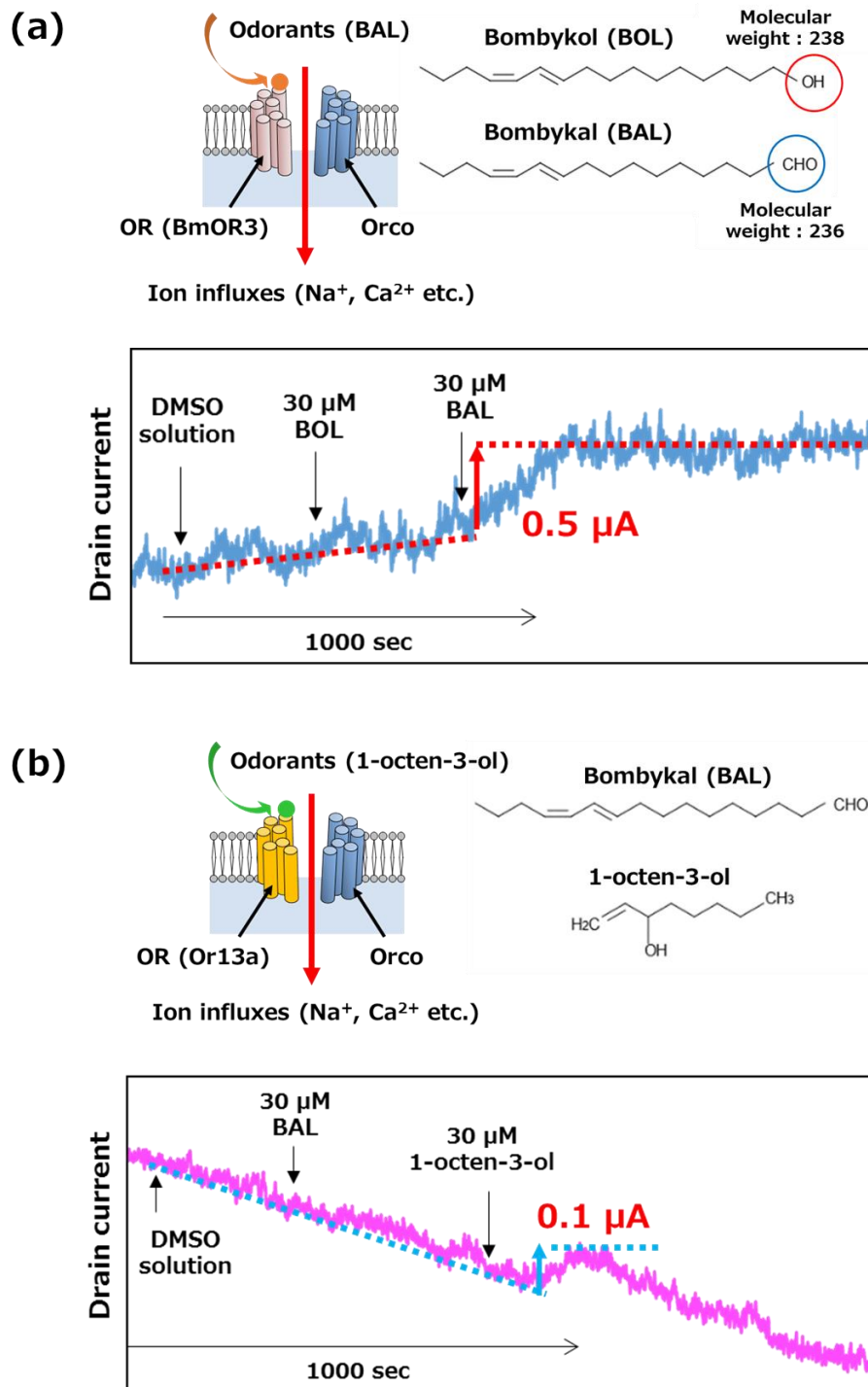


図 4.2 OSFET による BmOR3 発現系統と Or13a 発現系統のドレイン電流変化. (a) BmOR3 発現系統 : DMSO (<1%)アッセイバッファ溶液  $\Rightarrow$  30  $\mu\text{M}$  Bombykol  $\Rightarrow$  30  $\mu\text{M}$  Bombykal. (b) Or13a 発現系統 DMSO (<1%)アッセイバッファ溶液  $\Rightarrow$  30  $\mu\text{M}$  Bombykal  $\Rightarrow$  30  $\mu\text{M}$  1-octen-3-ol. 1 秒間の移動平均フィルターによる処理を行った.

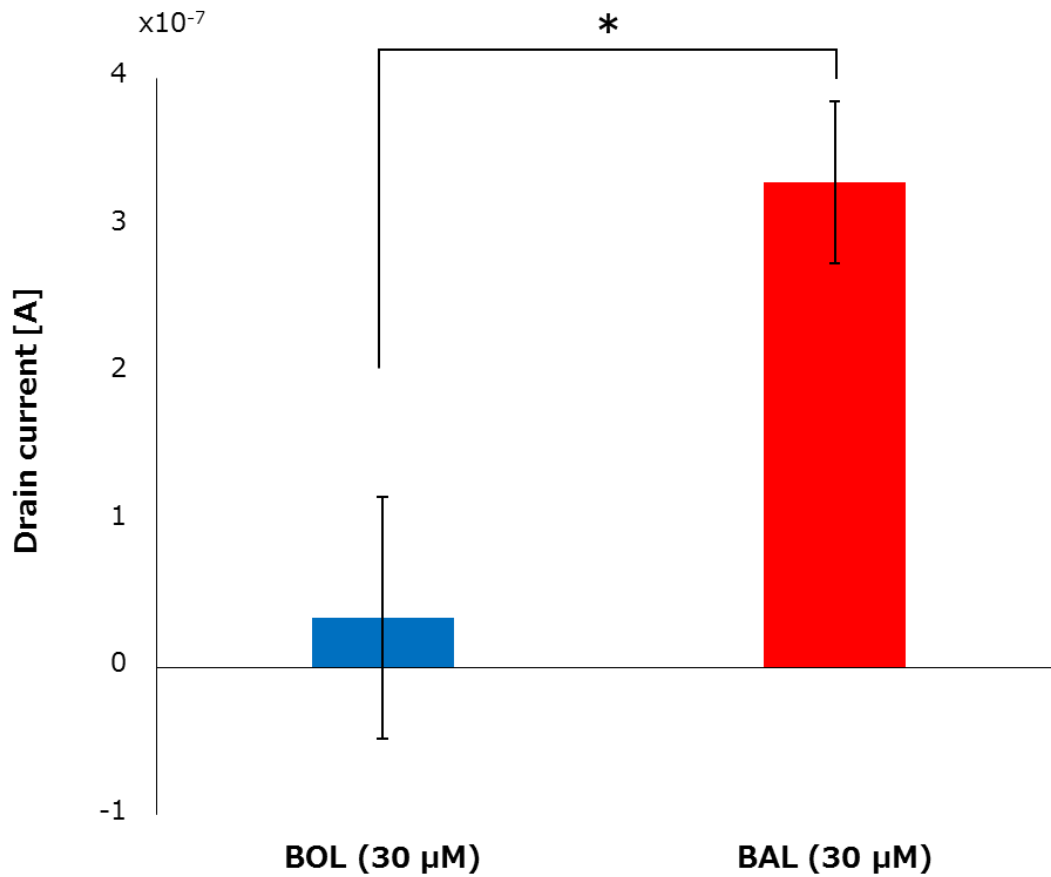


図 4.3 BmOR3 発現系統の匂い物質の選択性. 各ドレイン電流の変化は DMSO 含有アッセイバッファ溶液による信号変化の平均値を引いたものを示す. Data represent mean  $\pm$  SEM of OSFET drain-current changes (N = 4 individual tests, Welch's t-test, \*P < 0.05).

## 4.2 デバイスの再使用性の検討

第3章において、市販の洗剤を用いてデバイス上の細胞を容易に洗浄できることを確認した。洗浄したデバイスを用いて、再度匂い応答が検出可能であるかの検討を行った。一度匂い応答を検出した電極を洗浄し、4回目の匂い応答を検出することに成功した(図4.4)。この結果より、洗浄したデバイスを用いて複数回匂い応答を検出可能であり、本研究のデバイスは再使用性があることを確認した。

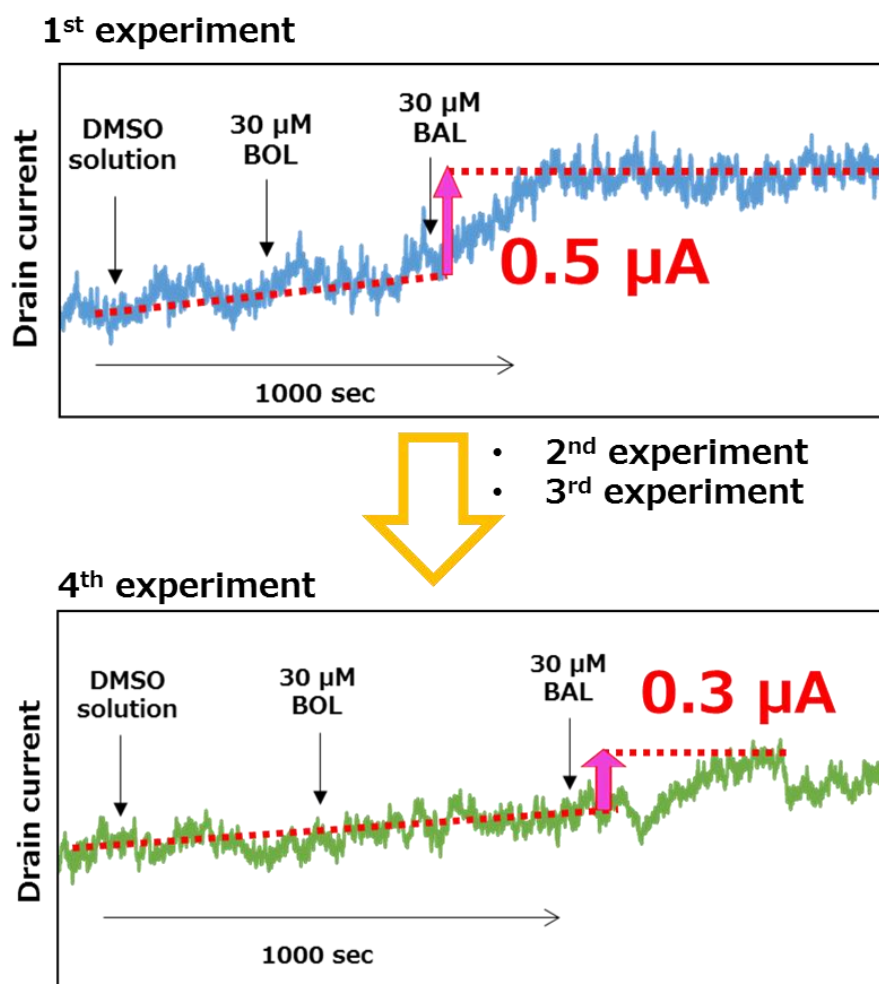


図 4.4 洗浄したデバイスを用いた BmOR3 発現システムの応答再現性。同じ電極を用いた4回の検出結果を示す。移動平均フィルター処理を実施した。

### 4.3 測定環境の改善

本研究のデバイスにより，センサ細胞の匂い応答を電気信号によって検出することに成功した．一方でセンサ感度の向上のためには，測定環境を改善してノイズを低減する必要がある．そこで本研究では，外部からの電氣的ノイズと振動の低減を図った．まず，電氣的ノイズの低減のため，測定系の周囲にシールドカーテンを用いたファラデーケージを設置した．次に，デバイスを卓上型空気ばね式除振装置 (AET-0405 NC: MEIRITZ SEIKI CO., LTD., Kanagawa, Japan)の上に設置して振動を低減した．

本研究のデバイスでは，細胞の播種はフタのないオープンチャンバーに行っている．そのため，灌流と匂い物質の刺激の影響による水面の上下を可能な限り抑える必要がある．そこで，匂い物質の刺激を行うポンプに，ペリスタ・バイオミニポンプ (AC-2120: ATTO CORPORATION, Tokyo, Japan)を使用することで，液面への影響の抑制を図った．また，本ポンプは低流量から高流量まで安定した送液が可能であるため，流量についても検討を行った．構築した環境を図 4.5 に示す．ファラデーケージの効果を検討するため，ファラデーケージあり/なしの場合の，FET のドレイン電流のノイズレベルを比較したものを図 4.6 に示す．改善した環境では，対策のない場合と比較して，ドレイン電流のノイズレベルは半分以下に低減されることが確認された．

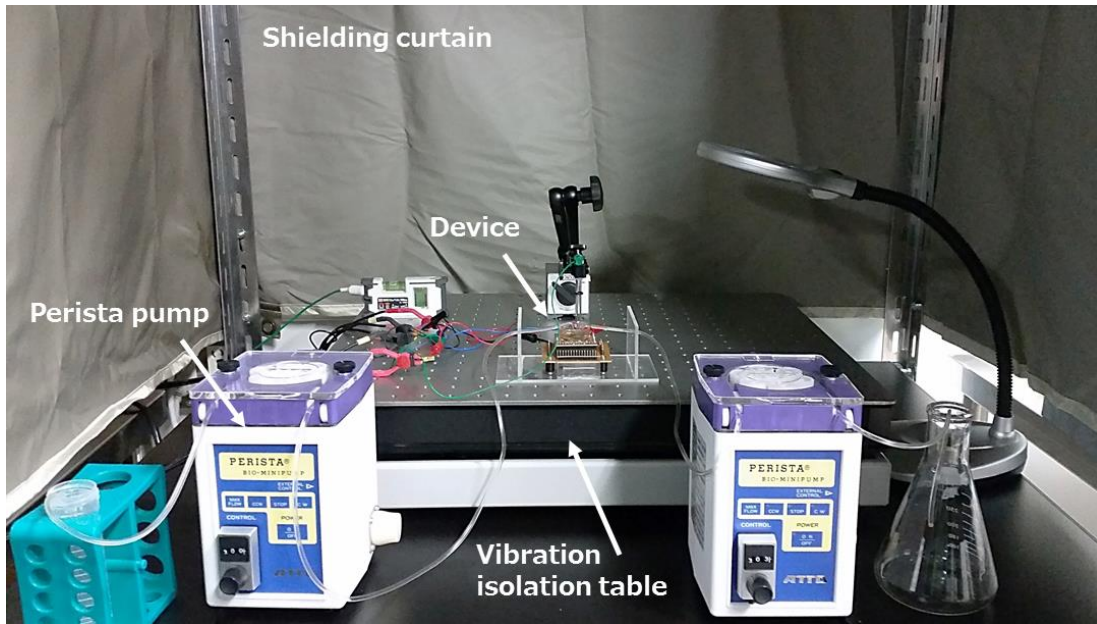


図 4.5 ノイズ低減を図った匂い応答検出環境

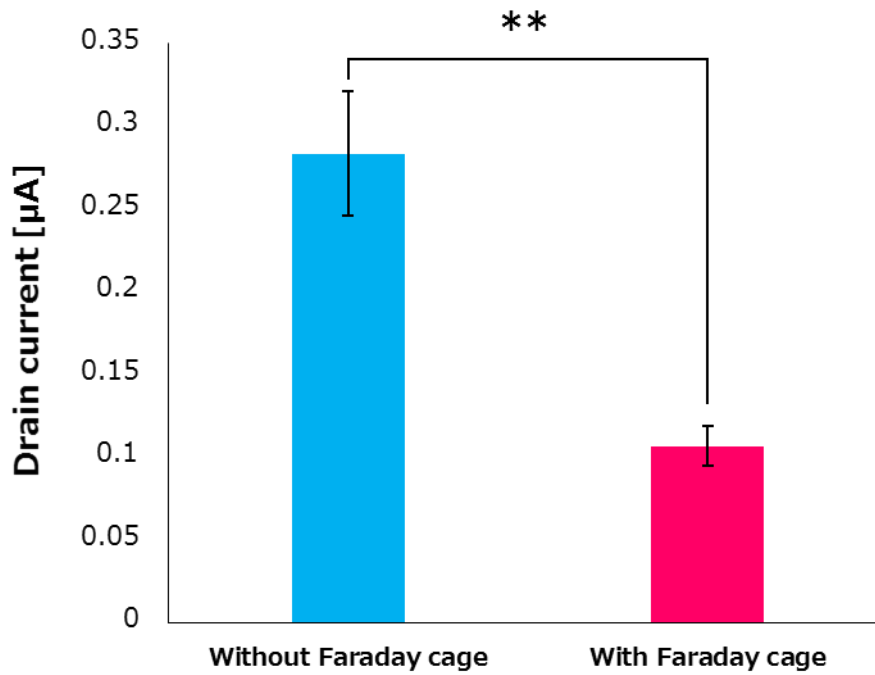


図 4.6 ファラデーケージあり/なしのドレイン電流のノイズレベル比較  
Data represent mean  $\pm$  SEM of drain-current noise levels (N = 3 individual tests, Welch's t-test,  $**P < 0.01$ ).

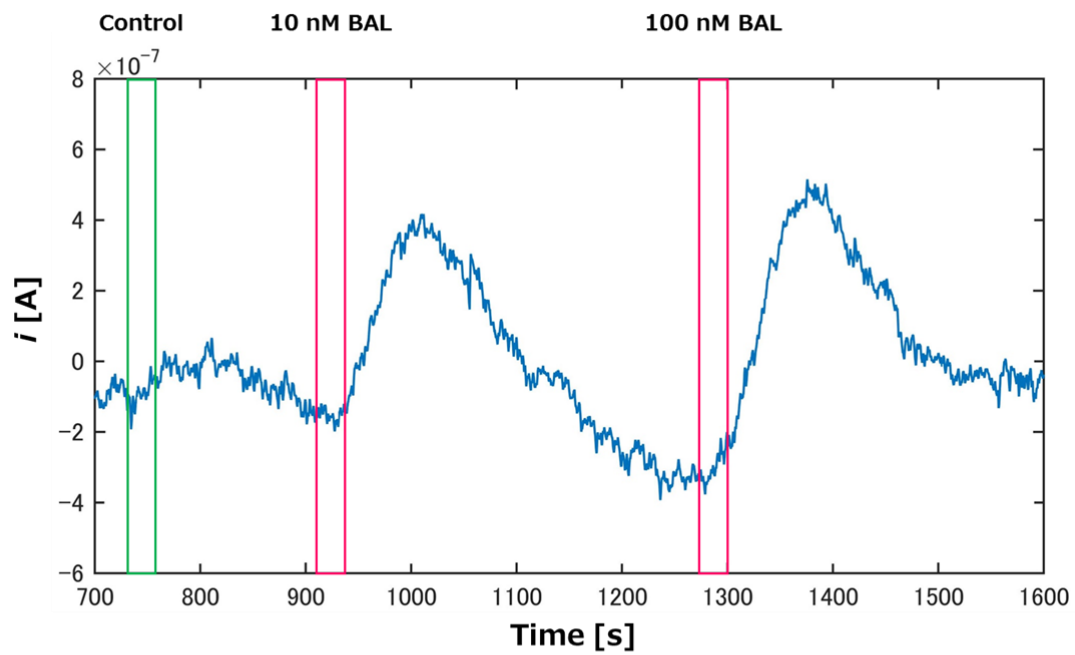
## 4.4 センサの高感度化

ファラデーケージと除振台によってノイズを低減し、高精度ペリスタポンプによって、より安定した匂い刺激が可能となった。この結果をもとに、**BmOR3** 発現システムを用いて、より低濃度における匂い物質検出を実施した。ペリスタ・バイオミニポンプによって、アッセイバッファ溶液 (DMSO, <1%, コントロール) ⇒ 10 nM Bombykal ⇒ 100 nM Bombykal の刺激を行った。流量は約 1500  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 匂い刺激時間は各 25 秒で実施した。結果として、**BmOR3** 発現システムはコントロール刺激には応答せず、10 nM と 100 nM の Bombykal 刺激によってドレイン電流の上昇が検出された (図 4.7 (a))。

コントロール実験として、細胞を播種しない状態で、アッセイバッファ溶液 (DMSO, <1%, コントロール) ⇒ 10 nM Bombykal の刺激を 3 回行った (図 4.7 (b))。細胞がない場合では、コントロール溶液と匂い物質のいずれもドレイン電流の上昇は検出されなかった。これまで蛍光測定による **BmOR3** 発現システムの検出限界は 300 nM であり、実験結果は 10 nM の濃度で検出されているため、設計したデバイスによって蛍光計測を超える感度が得られることを示唆している。

本実験では、ドレイン電流のドリフト成分を除去するため、1 秒間の移動平均フィルターで処理した後に **MATLAB** に実装されているデータの線形トレンドの除去を行う関数 `detrend` を使用した。この関数を用いて、処理を行うデータから平均もしくは最小二乗の意味における最適な近似線を差し引くことで、データ内の変動に注目することができる。トレンド除去を行ったデータの平均は 0 に極めて近いものとなる。本研究では、トレンド除去を行ったドレイン電流の値を y 軸に表示する際、変動値分を表示していることを明確化するため  $i$  と表記した。データ以降の電気計測のデータ処理でも同様の処理を行った。

(a)



(b)

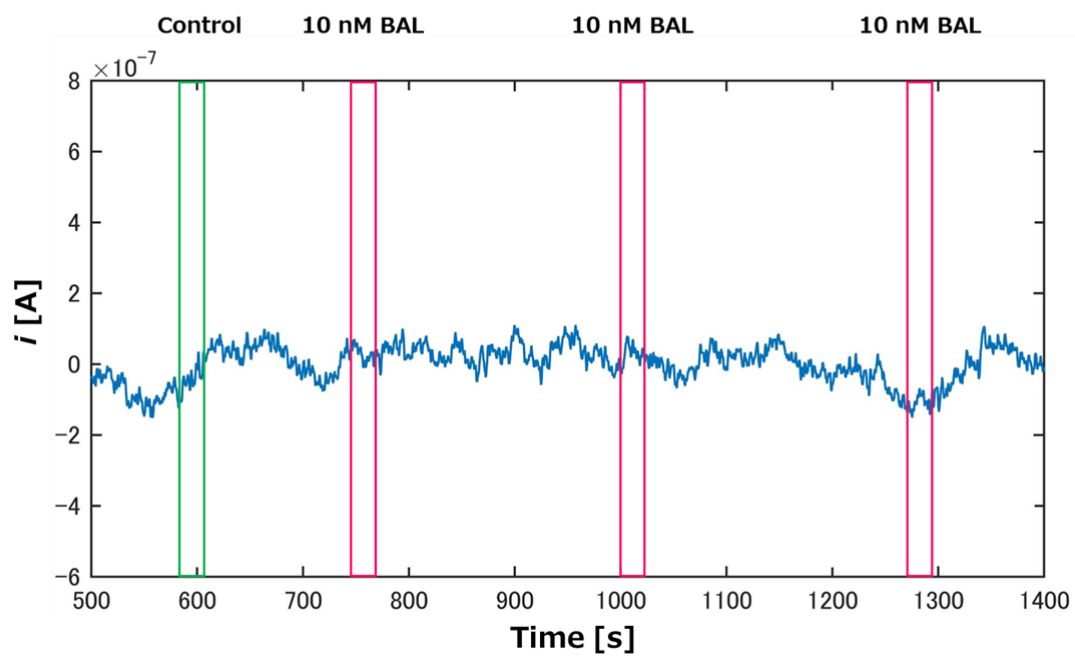


図 4.7 (a) BmOR3 発現システムを用いた低濃度匂い物質による応答検出.

(b) 細胞を播種しない状態でのドレイン電流変化.

## 4.5 PMOS デバイスによる検出

本研究では、NMOS-FET デバイスを用いたセンサ細胞の匂い応答検出に取り組み、ドレイン電流の上昇を検出した。この結果は、電極の表面に正電荷が増加していることを示唆している。この点を検討するため、NMOS とは極性が逆である PMOS デバイスを用いた検出を試みた。電極上に BmOR3 発現系統（細胞数： $117 \times 10^4$  cells/ml）を 200  $\mu$ l 播種し、ペリスタ・バイオミニポンプによって、アッセイバッファ溶液（DMSO, <1%, コントロール） $\Rightarrow$  10  $\mu$ M Bombykal  $\Rightarrow$  30  $\mu$ M Bombykal  $\Rightarrow$  10  $\mu$ M Bombykal の順に匂い刺激を行った。流量は約 1500  $\mu$ l/min, 匂い刺激時間は各 25 秒で実施した。PMOS はソース電圧：2.5 V, ドレイン電圧：-2.5 V, ゲート電圧：0 V, バックゲート電圧：2.5 V で動作させた。

結果として、1 回目の 10  $\mu$ M では応答が明確ではなかったが、30  $\mu$ M Bombykal と 2 回目の 10  $\mu$ M Bombykal の刺激ではドレイン電流の減少が検出された（図 4.8）。また、10  $\mu$ M と 30  $\mu$ M の刺激では濃度の高いほど電流値の減少が大きく、濃度依存的な応答が検出された。これらの結果は、昆虫嗅覚受容体の匂い応答によってセンサ細胞内に陽イオンが流入して内部の正電荷が上昇し、FET のチャネルが変調されることをサポートするデータである。

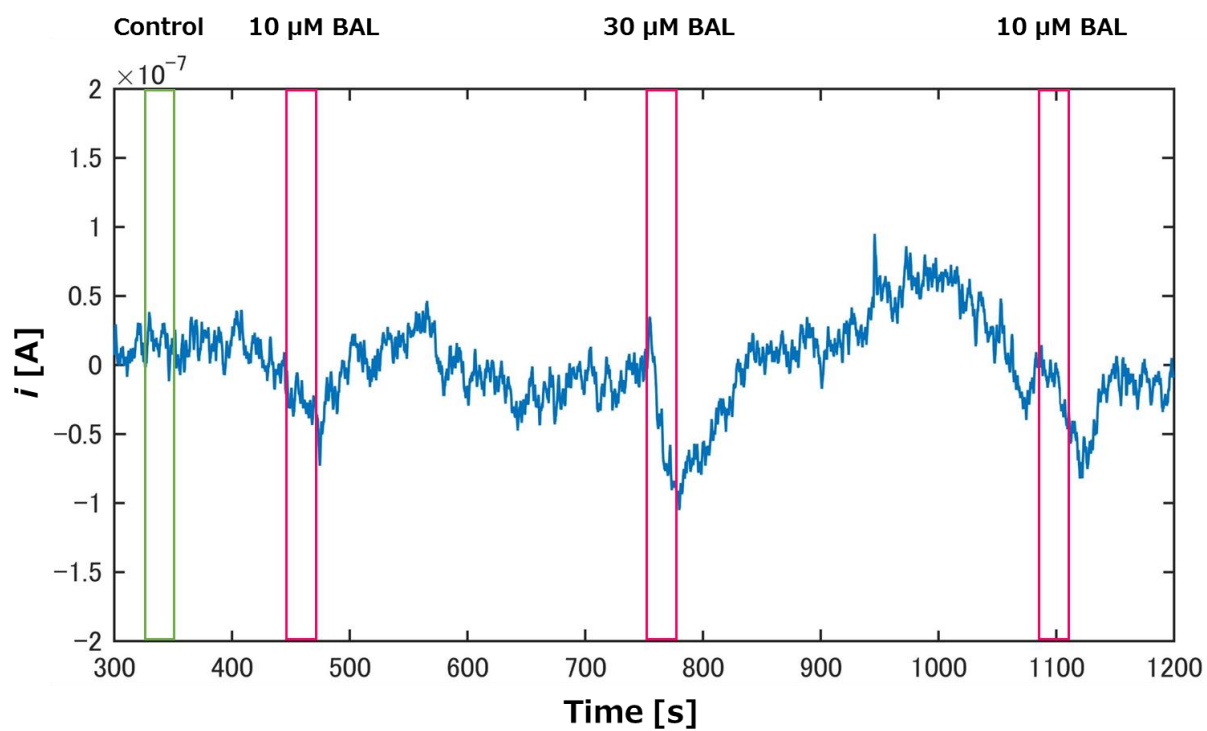


図 4.8 PMOS デバイスを用いた BmOR3 発現系統の匂い応答検出.

## 4.6 センサの安定性検討

### 4.6.1 センサの偽応答問題

細胞を利用したハイブリッド型匂いセンサの開発において、ターゲットとする匂い物質を選択的に検出するためには、センサの安定性を向上させることが重要な観点となる。しかし、本研究で設計した伸長ゲート型 FET デバイスでは、細胞が播種されていない電極へ匂い物質の刺激を行った際、電極が偽応答するという問題が発生した。特に、匂い濃度が 10–100  $\mu\text{M}$  と比較的高濃度で刺激した場合には、大きな偽応答が検出された。また、BCT を用いた測定では、作成日の異なるアッセイバッファ溶液による刺激と、匂い物質の刺激どちらの場合でも、細胞を播種していない電極が偽応答することが確認され、その電位の変化方向は正方向、負方向どちらの場合も存在することが判明した。このような偽応答の発生は、本研究で提案するセンサの実用化の障壁となる。偽応答の原因として、匂い物質を含む刺激溶液がイオン化しており、溶液に接する電極表面のイオン感応膜 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) が非選択的に応答することが予想された。

### 4.6.2 センサの偽応答問題への対策

この対策として、電極上にセンサ細胞を隙間なく播種することで電極の溶液に対する露出を防ぎ、細胞の応答のみを検出する方法を検討した。まず、電極を細胞で被覆することによる偽応答抑制効果を検討するため、昆虫嗅覚受容体を発現させず、GCaMP6s 遺伝子のみを導入した GCaMP6s 系統を電極上に隙間なく播種して匂い刺激を行った。電極上の GCaMP6s 系統（細胞数： $503 \times 10^4$  cells/ml）に、アッセイバッファ溶液 (DMSO: 0.1%, コントロール)  $\Rightarrow$  100  $\mu\text{M}$  1-octen-3-ol (3 回) の刺激を行った。その結果、GCaMP6s 系統に対する 3 回の 100  $\mu\text{M}$  1-octen-3-ol の刺激のいずれの場合も、明確なドレイン電流の変化は検出されなかった (図 4.9 (a))。

次に、電極を細胞で完全に被覆した状態で、センサ細胞の匂い応答検出を試みた。高密度に細胞を播種することで、センサ細胞が電極上に複層で接着した状態を作り出した。電極上の Or13a 発現系統（細胞数： $413 \times 10^4$  cells /ml）に、アッセイバッファ溶液（DMSO: 0.1%, コントロール） $\Rightarrow$  10  $\mu$ M 1-octen-3-ol  $\Rightarrow$  100  $\mu$ M 1-octen-3-ol の順番に匂い刺激を行った。その結果、コントロール刺激ではドレイン電流は変化せず、10  $\mu$ M と 100  $\mu$ M 1-octen-3-ol の刺激の際、ドレイン電流の変化が検出された。さらに、10  $\mu$ M と 100  $\mu$ M の刺激では、濃度が高いほど電流値の増加が大きい濃度依存的なドレイン電流の上昇が確認された。以上の結果より、細胞で電極を被覆することは、偽応答の発生を防ぎ、細胞の応答検出が可能であることが示された。本実験では、GCaMP6s 系統と Or13a 発現系統のいずれも NMOS デバイスの Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> をスパッタリングした電極を使用し、流量：約 1500  $\mu$ l/min, 匂い刺激時間：各 25 秒, チャンバー内の細胞懸濁液量：300–350  $\mu$ l で実施した。BCT の場合は、ポリイミド膜の厚さ（約 3  $\mu$ m）が影響し、細胞で電極を完全に被覆する対策を取ることは困難であった。

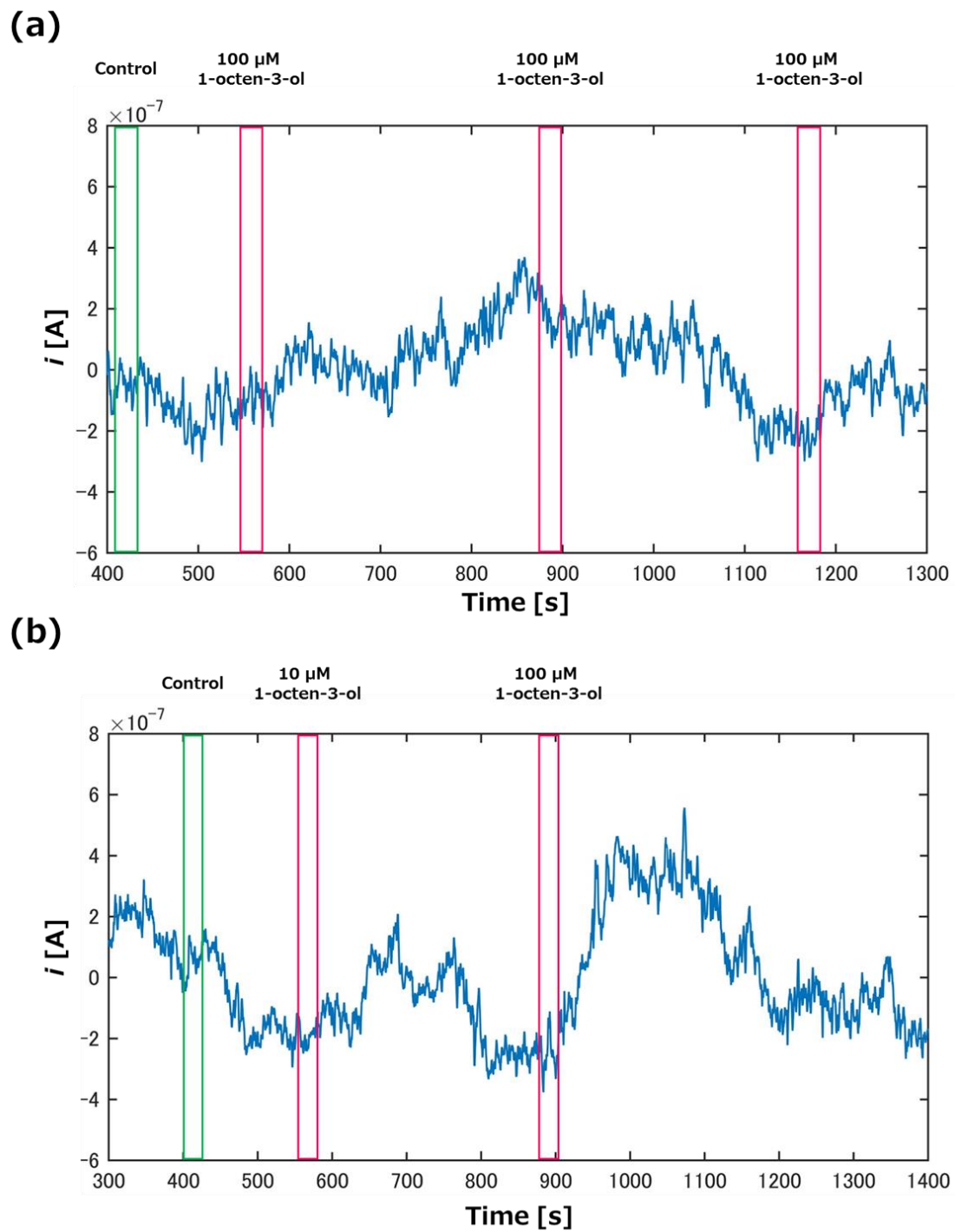


図 4.9 (a) GCaMP6s 系統に対する  $100 \mu\text{M}$  1-octen-3-ol の刺激を行ったときのドレイン電流の変化. (b) Or13a 発現系統に対する  $10 \mu\text{M}$  と  $100 \mu\text{M}$  1-octen-3-ol の刺激を行ったときのドレイン電流の変化.

## 4.7 Odor-Sensitive Field Effect Transistor (OSFET)

これまでの実験結果を踏まえ、本研究では新しい匂いセンサシステムとして Odor-Sensitive Field Effect Transistor (OSFET, オスフェット)という概念を提唱する。OSFETとは、センサ細胞と FET を電氣的に結合した検出部を持ち、この検出部で細胞内の電荷の変化を検出して、FET により電流に置換するデバイスである。OSFET の特徴として、伸長ゲート電極上にセンサ細胞を隙間なく播種して電極の溶液に対する露出を防ぎ、電極の非選択的な匂い物質への応答を抑制しつつ、センサ細胞の匂い応答を FET のドレイン電流変化として高感度かつ選択的に検出可能なことが挙げられる。また、センサ細胞は市販の洗剤によって容易に除去可能で、再度新しい細胞を播種できる。本研究では、センサ細胞と伸長ゲート型 FET を一体と見て、1つの匂いセンサと捉えたものを OSFET と定義した。伸長ゲート電極と FET は同一チップ上に設計されることを想定している。OSFET の概念図を図 4.10 に示す。

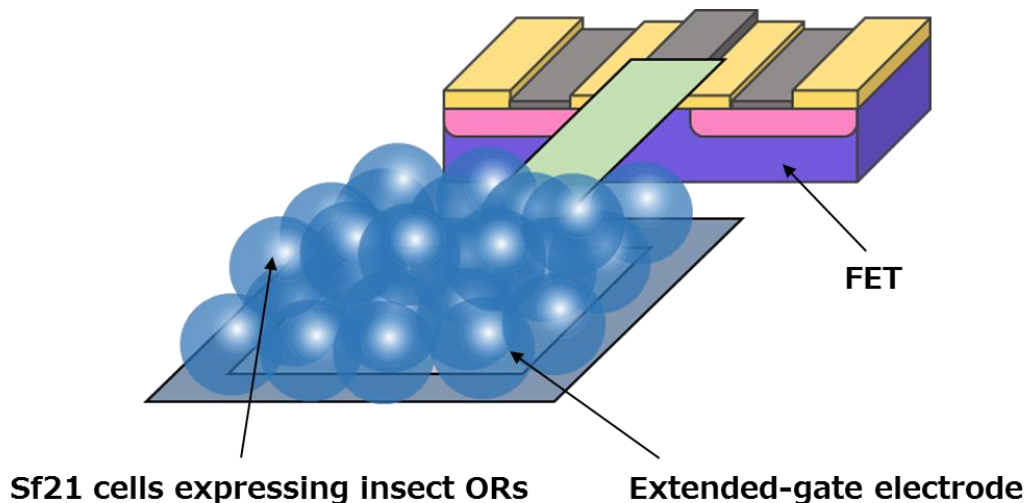


図 4.10 Odor-Sensitive Field Effect Transistor (OSFET, オスフェット)の概念図

## 4.8 実験結果の BCT 測定へのフィードバック

本論文では、第 3 章において、既存のバイオセンシングシステムである BCT を用いた実験について言及した。当初は、BmOR3 発現システムを BCT のアレイ電極上に播種して Bombykal による匂い刺激を行ったが、BCT によってセンサ細胞の応答を検出するには至らなかった。この原因として、BCT の電極を構成するポリイミド膜上にセンサ細胞が接着し、電極部に適切に接着しないこと、細胞が接着していない電極がアッセイバッファ溶液からのノイズを受けることによって信号強度が劣化することが想定された。現在の BCT には、細胞が接着した電極を選択して測定するセレクトアスィッチの様な機能は備えられていないため、4096 点全ての電極が何らかの影響を検出する。そこで、本研究で設計したデバイスの構造とその応答検出結果を BCT の測定にフィードバックし、再度応答検出を試みた [Nagata et al, 2018].

本研究の結果をフィードバックした BCT では、センサ細胞を電極上に確実に接着させるため、BCT 電極上のポリイミド膜を除去して電極を露出させた。また、BCT は通常電極に金電極を用いるが、電極表面への Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜の形成を容易にするためアルミニウムで電極を作成し、O<sub>2</sub> プラズマ処理を行うことで、数 nm の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜を形成した。これらの改良により、BCT の電極サイズは 20 x 20 μm<sup>2</sup> から 32 x 32 μm<sup>2</sup> に増加し、センサ細胞は Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜の形成された電極上への接着が容易になった (図 4.11 (a)). 改良した BCT の電極上に、Or13a 発現システムを播種して 30 μM 1-octen-3-ol に対する応答を測定した結果を図 4.11 (b)に示す。その結果、BCT による測定では、Or13a 発現システムの応答はゲート電位の減少として検出された [Nagata et al, 2018]. この実験では、BCT は蛍光顕微鏡下に設置され、BCT のチャンバー上部から Or13a 発現システムの GCaMP6s の蛍光強度変化を電気信号と同時に測定した。電気・蛍光同時測定により、ゲート電位の減少とほぼ同じタイミングで、蛍光強度の増加が検出された。

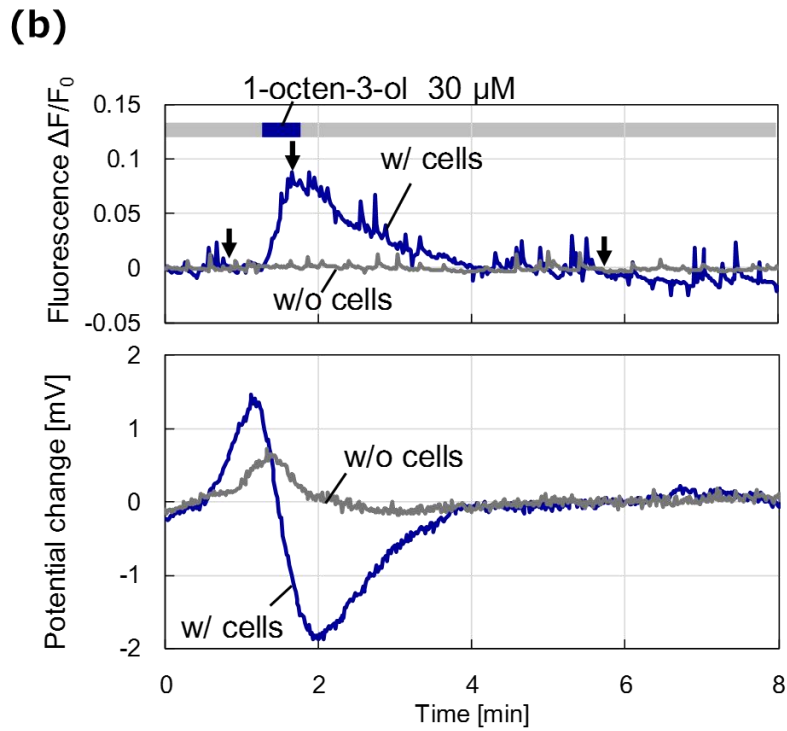
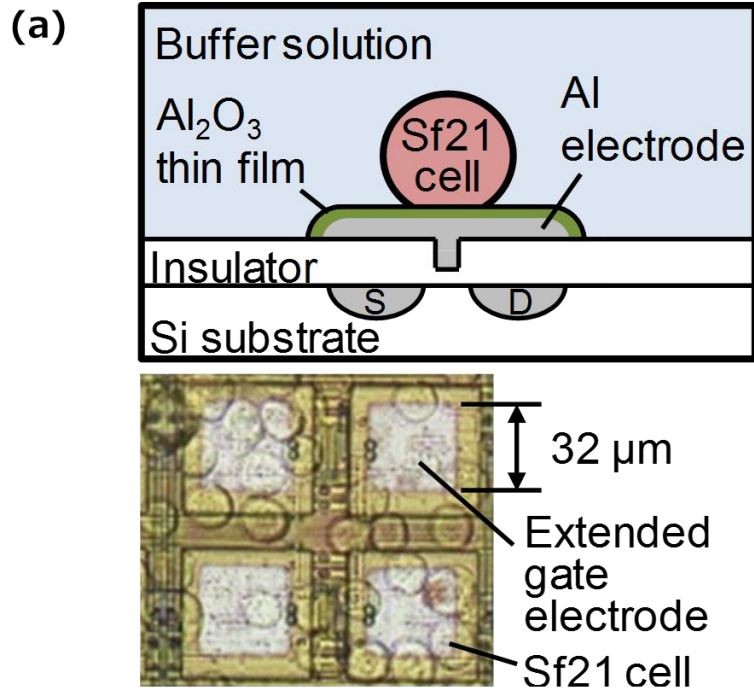


図 4.11 OSFET による電気計測結果をフィードバックした後の BCT によるセンサ細胞の電気・蛍光同時計測 [Nagata et al, 2018] (a) ポリイミド膜を除去し、 $\text{O}_2$  プラズマによってアルミニウム上に  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜を形成した BCT 電極部とセンサ細胞の模式図と写真. (b)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜を持つ BCT 電極を用いた Or13a 発現系統の電気・蛍光同時計測結果. 64 x 64 の電極の電圧値の平均を表す.

## 4.9 NMOS と PMOS の同時計測

本章では、NMOS と PMOS を独立に測定し、センサ細胞の匂い応答をそれぞれドレイン電流の増加と減少として検出した。OSFET がセンサ細胞内の電荷の変化を検出しているならば、共通の伸長ゲート電極を持つ NMOS と PMOS を同時に測定すれば、NMOS ではドレイン電流の増加、PMOS ではドレイン電流の減少が検出されることが予想できる。この仮説のもと、共通の  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  の伸長ゲート電極を持つ FET デバイスを作製し（図 4.12 (a)）、計測を試みた。計測にはソースメジャーユニット (B2902A) を 2 台使用し、2 つの FET のドレイン電流の変化を測定した。しかしながら、2 つの FET のドレイン電流を同時に測定するとドレイン電流が安定せず、センサ細胞の応答検出には至らなかった。また、電極を共有しない 2 つの NMOS と、伸長ゲート電極を共有しない独立した NMOS と PMOS の同時測定（図 4.12 (b)）についても検討したが、いずれの場合もドレイン電流が安定せず、場合によってはゲート電極が破損するという問題が発生した。

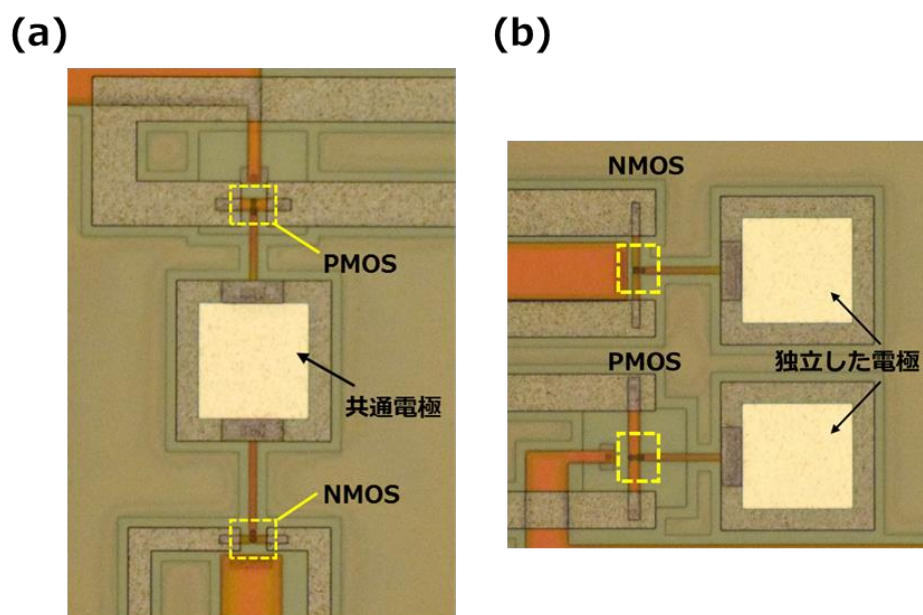


図 4.12 (a) 共通の伸長ゲート電極を持つ NMOS, PMOS-FET デバイス写真.  
(b) 独立した伸長ゲート電極を持つ NMOS, PMOS-FET デバイス写真.

## 4.10 考察

### 4.10.1 電極サイズの影響

本研究で設計したデバイスの測定結果に基づいた改良により、改良前には応答検出に至らなかった BCT を用いて、匂い刺激時の電位変化を検出した。本研究のデバイスと BCT は、いずれも細胞 1 つ 1 つを正確に電極上に播種するシステムを備えていない。BCT 上へのセンサ細胞のアライメント状態から、センサ細胞の応答検出の際には、懸濁液から沈降する細胞の自然接着のみでアライメントが可能な電極サイズ ( $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  以上) が適切であることが示唆された。この結果は、 $15 \mu\text{m}$  程度の直径であるセンサ細胞の応答検出に適した電極構造は、CMOS 集積回路技術によって電極を極力小さくして高密度アレイ化を目指す現在のバイオセンサの潮流とは必ずしも一致しない。単純に既存のセンサシステムに測定を依存するのではなく、センサ細胞の特徴を理解し、適切な電極構造、そしてセンサシステムを構築する必要があると言える。

### 4.10.2 検出された信号変化方向の違い

本研究で設計したデバイスは、FET のドレイン電流の変化を検出し、NMOS-FET を用いた応答検出の際にはドレイン電流の増加として信号が検出された。一方、BCT は電位検出型バイオセンサとして機能し、匂い応答検出の際には電極表面の電圧減少として信号が検出された。本研究のデバイスは、ソースとドレインに直接測定器を接続してドレイン電流の測定を行うため、ゲート電圧が増加した場合はドレイン電流の上昇が検出される。BCT は、検出部の FET の後段に、信号増幅や安定化を行うための回路が接続されている。しかし、出力信号は、ゲート電位が増加する場合は出力も増加するように設計されている。2 つのデバイスがセンサ細胞の同じ変化を検出している場合は、同様の信号変化方向が観察されると予想される。この理由として、BCT の場合は、匂い応答によって増加する細胞内の電荷の影響を検出するのではなく、細胞

外の電荷を引き込むことで、電極表面の負電荷が増加したことが検出したことが想定される。

#### 4.10.3 同時計測時のドレイン電流の乱れと対策

2 つの FET を同時計測した際に発生したドレイン電流の乱れと今後の対策について考察する。ドレイン電流が不安定になった原因として、FET を ON 状態にして測定を行うため、バイアス電圧を印加しながら NMOS を駆動したことが、各ドレイン電流を不安定にしたことが考えられる。本研究の NMOS 測定では、エンハンスメント型（ノーマリオフ型）FET を常に ON 状態で駆動しつつゲート電極からのバブル発生を防ぐために、ドレイン電圧：2.5 V、ソース電圧：-2.5 V、ゲート電圧：0 V、バックゲート電圧：0 V で動作させた。この駆動方式の場合、バックゲート電圧がソース電圧よりも高いため、バックゲート-ソース間に PN 接合ダイオードが形成されて大きなリーク電流が発生する。この時バックゲートとソース間のリーク電流が、共通グラウンド等を介して各 FET のドレイン電流に影響したことが想定された。

本研究のデバイスは全てバルクウェハに形成されているため、各 FET のリーク電流が区別されず、共通グラウンドを介して 2 台のソースメジャーユニットのドレイン電流測定を不安定にしたと考えられる。リーク電流の対策として、FET デバイスを SOI (Silicon-on-Insulator) ウェハ上に構築し、メサ絶縁によって各 FET を完全に独立させて測定を行うことが考えられる。SOI ウェハは、Si 層の中間に絶縁膜 ( $\text{SiO}_2$ ) を形成したサンドイッチ構造のシリコンウェハである。SOI 基板上に形成された FET は、深堀エッチング (Deep reactive ion etching: DRIE) によって島 (メサ) 式に絶縁することが可能であり、リーク電流の発生は防げずともデバイス間のリーク電流を区別して計測できる。SOI 基板を用いてメサ絶縁を行った場合の、想定される FET の断面図を図 4.13 に示す。

本研究の測定ではデバイス上にある溶液の影響で意図しない電圧差によるデバイス破損が発生し、リーク電流の影響により2つのFETの同時計測には至らなかった。今後の提言として、SOI 基板上的デバイスをポストプロセスのメサ絶縁することで各デバイスのリーク電流を区別し、測定基板を最適化することでNMOS と PMOS 同時計測、そして複数の FET のアレイ計測による応答検出を行うことが考えられる。エンハンスメント型ではなく、デプレッション型（ノーマリオン型）NMOS-FET を使用した場合には、ゲート付近にN形の不純物が拡散されているためゲート電圧が0Vでもドレイン電流が流れる。よって、バイアス電圧を印加せずとも応答測定ができると考えられる。しかし、デプレッション型 FET は常に ON 状態を保つスイッチとなるため、通常は需要が少なく、商用の CMOS ファウンドリによって設計することは困難である。

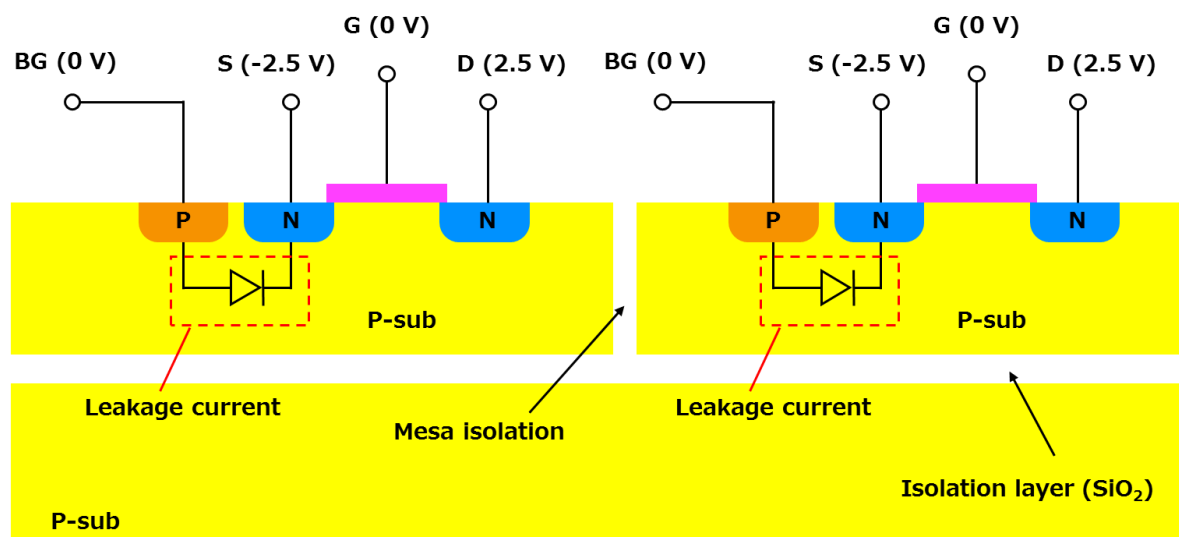


図 4.13 SOI 基板を用いてメサ絶縁を施した場合の 2 つの NMOS-FET の断面図。図は NMOS-FET が 2 つ並んだ状態を表す。

## 4.11 まとめ

本章では、BCTを用いたセンサ細胞の匂い応答検出結果を受け、汎用的な検出系ではなく、センサ細胞の匂い応答検出に特化したデバイスの設計を実施した。その結果、BmOR3 発現系統と Or13a 発現系統からの匂い応答を電氣的に検出し、電気信号による検出インターフェースの構築に成功した。この結果は過去の蛍光計測による選択性と一致する。また、測定系を改善することで、蛍光計測を超える感度を得られることが示唆された。第1章の研究目的の中で、水源中のカビ臭（ジオスミン）検出を例に取り、電気検出インターフェースでは1 nMを数値目標とした。本研究の実験より、カイコガのフェロモンである Bombykal を10 nMで検出できることが示唆された。現時点では1 nMの濃度の検出には至っていないが、実験条件の検討により、更なる高感度を目指すことが可能であると考えられる。

生体材料を利用した匂いセンサでは、センサの安定性向上が実用化の推進につながる。しかし、電極自体が匂い物質に反応して偽応答を発生するという問題が確認された。本研究で提案したセンサシステムの場合、電極全体を細胞で被覆することにより、匂い物質からのノイズを低減して細胞の応答を検出できることが示された。この検出方法は、センサの安定性向上に寄与し、本研究以外の生体材料とFETを利用したハイブリッド型センサにも応用が期待できる。本章では、上記の結果を踏まえ、匂いセンサシステムとしてOSFET (Odor-Sensitive Field Effect Transistor)という新しい概念を提唱した。また、OSFETの応答検出結果とデバイス構造をBCTにフィードバックすることで、当初は応答検出に至らなかったBCTにおいても、匂い応答が可能となった。

## 第 5 章 細胞-デバイス界面の観察と分析

### 5.1 細胞-デバイス界面観察の意義

生体細胞からの電気信号を、電気デバイスによって検出するシステムでは、細胞とデバイス界面の状態を正しく把握し、最適な界面を作り出すことが、信号検出モデルの構築、効率的な信号検出など、最適なセンサシステムの構築に重要な役割を果たす。しかし、昆虫培養細胞と電気デバイスの界面を観察した先行事例は存在せず、センサ細胞と FET の電氣的結合状態は不明であった。改良前の BCT で応答検出が困難であった理由として、細胞とデバイスを適切にカップリングさせないまま実験を行ったことが考えられる。そこで本章では、本研究で設計した細胞が電極上に確実に接着する単一電極を持つデバイスの特徴を利用し、適切なカップリングの検討に向けた Sf21 細胞-デバイス界面の観察・分析を行った。

### 5.2 細胞-デバイス界面観察の先行研究

#### 5.2.1 Focal adhesion (接着斑)

生体内において、細胞は extracellular matrix (細胞外マトリックス) と呼ばれるコラーゲンゲルの様な繊維ネットワークに取り囲まれている。細胞接着はいくつかの種類に分類されるが、細胞と細胞外マトリックスをつなぐ場合には、focal adhesion (接着斑) によって細胞内のアクチンフィラメント (球状タンパク質のアクチン分子が重合して形成する直径約 8 nm の繊維) と細胞外マトリックスを結合することが知られている [川端, 新宮, 2011]。Focal adhesion は、電子顕微鏡を用いた観察により、線維芽細胞の基底側細胞膜が基質に密着している部位として報告された [Geiger et al., 2001]。これらの結合では、インテグリンファミリーの膜貫通接着タンパク質が、細胞と細胞外マトリックス間の接合を行う部位を形成する。インテグリンの細胞質ドメイン (タ

ンパク質におけるドメイン：他のタンパク質内にも共通して存在する機能・構造の単位) はタリンに結合し，タリンはビンキュリンに結合している．ビンキュリンは  $\alpha$ -アクチニン ( $\alpha$ -actinin)とパキシリン (paxillin)に結合し， $\alpha$ -アクチニンがアクチン (actin)と結合している [Alberts et al., 1994]. Focal adhesion kinase (FAK)はインテグリンのターンオーバー (代謝回転) を制御していると言われている [榎本, 2008]. これらの結合から想定される focal adhesion の模式図を図 5.1 に示す.

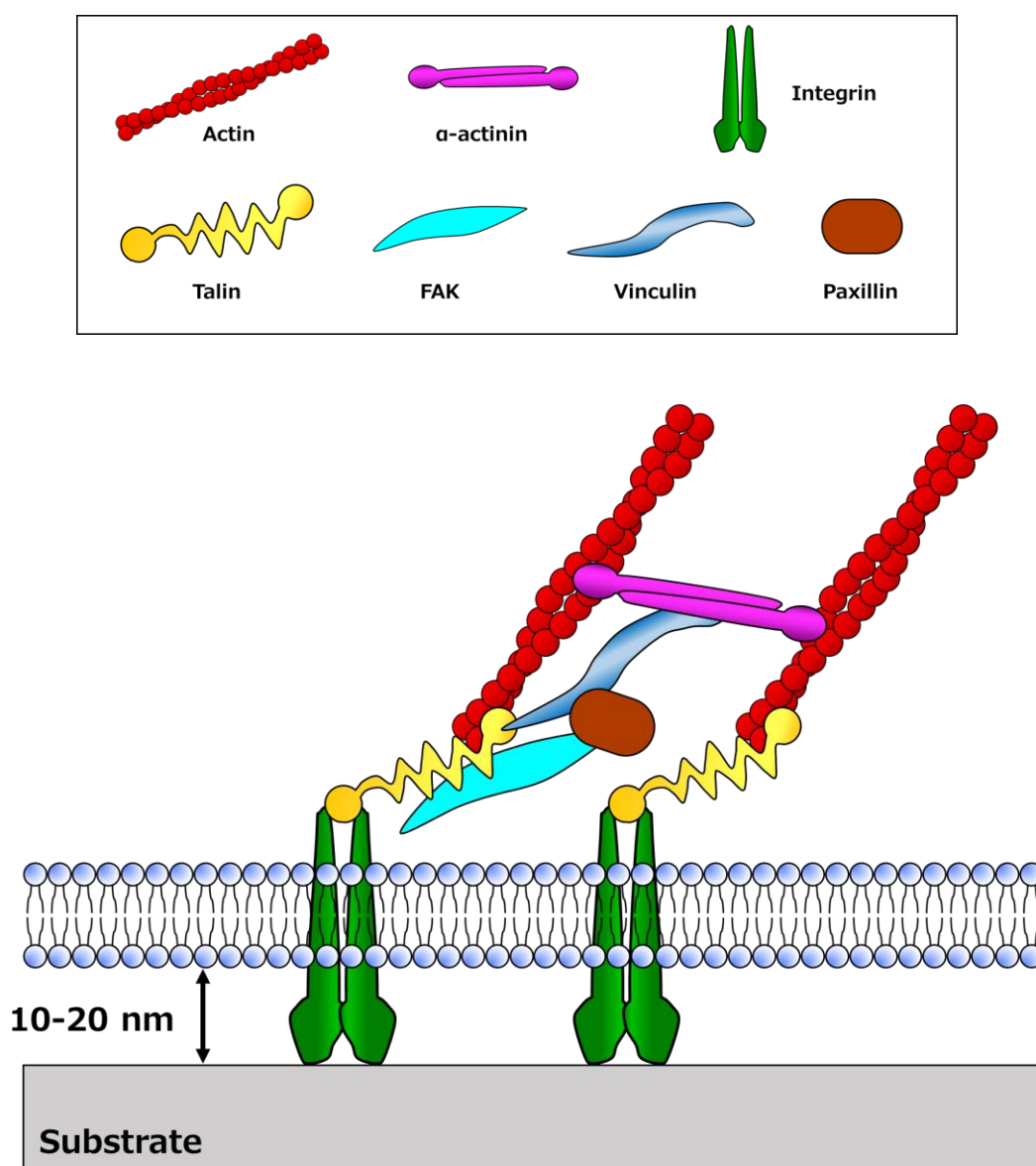


図 5.1 Focal adhesion の構成要素と基板上での接着状態の模式図

これまで、様々な細胞 (fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells, platelet etc.)が focal adhesion によって平面基板との結合することが知られている [Burrige et al., 1988]. 先行研究では、細胞膜と基板間で 10–20 nm の距離で接着している部分が focal adhesion と報告されている [Chen and Singer, 1982]. この距離のことを論文等では “Cleft” と呼称する.

### 5.2.2 細胞–デバイス界面観察

細胞–デバイス界面の観察は、FET 等の電気デバイスを用いた細胞応答の計測手法の進展とともに、様々な細胞や測定手法を用いて実施されてきた. HEK293 細胞や神経細胞とデバイス界面を対象に、光学的手法である fluorescence interference-contrast (FLIC) microscopy や、電子顕微鏡による観察が行われている [Braun and Fromherz, 1998, Wrobel et al., 2008]. FLIC は垂直方向の解像度に優れ、電子顕微鏡、特に透過電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM)は断面試料の 2 次元観察に優れている.

過去の細胞–デバイス界面観察を総合すると、10–100 nm 程度の cleft が観察されている. また、HEK293 細胞の例では、細胞接着部の 5–20%が 10 nm 以下の cleft になっており、この部位を focal adhesion と考察している [Wrobel et al., 2008]. その他、3 次元構造 (Spine-shaped electrodes)により、平面電極と比較して細胞と電極の接着強化を図った研究がある [Hai et al., 2009]. 先行研究で観察された細胞–デバイス界面の写真を図 5.2 に示す.

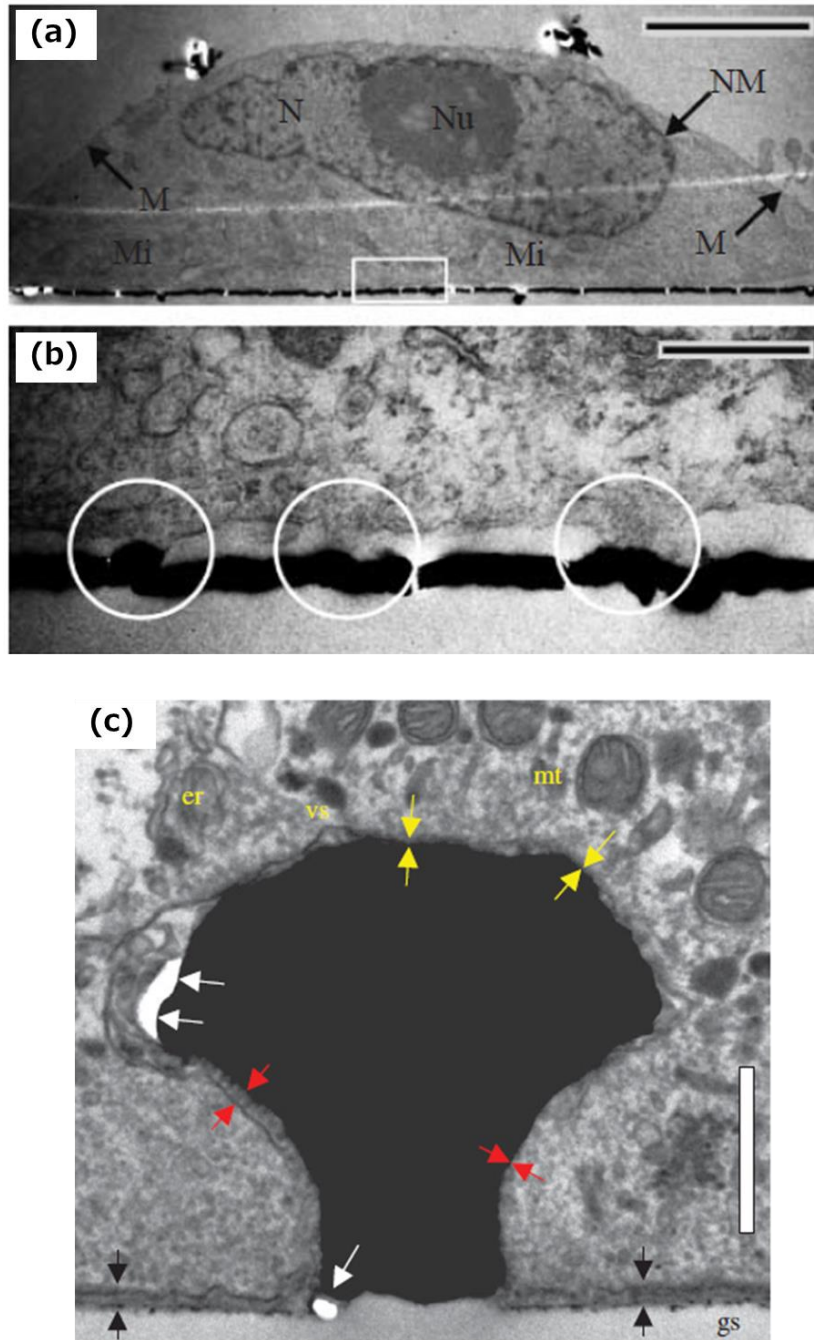


図 5.2 先行研究におけるデバイス上の細胞断面写真

(a) PLL コート基材上で 4 日間培養した HEK293 細胞の TEM 写真と, (b) 白枠内の拡大図 [Wrobel et al., 2008]. (c) *Aplysia* (アメフラシ) の神経細胞で覆われた突起状金電極 [Hai et al., 2009]. Scale bars: (a) 5  $\mu\text{m}$ , (b) 1  $\mu\text{m}$ , (c) 500 nm. (図 5.2 (a)–(c)の copyright permissions は Appendix A3 に記載した.)

## 5.3 Sf21 細胞の接着状態観察

### 5.3.1 Sf21 細胞-デバイス界面の重要性

既に先行研究では、複数の手法を用いて細胞-デバイス界面の観察が行われてきた。しかし、本研究でセンサ素子として用いる Sf21 細胞は昆虫培養細胞であり、HEK293 細胞や神経細胞とはその由来や形状が大きく異なっているため、過去の情報をそのまま適用することは困難である。また、Sf21 細胞はバキュロウイルスストックの増殖や組換えタンパク質の生産に用いられる場合が多く、金属や金属酸化物との界面はもとより、基板に接着した状態を電子顕微鏡によって観察した例でさえほとんど報告されていなかった。したがって、Sf21 細胞のデバイス上での接着状態や接着界面を観察することは、電気信号の検出モデル構築や Sf21 細胞の形態を生物学的に理解する観点からも有意義である。

### 5.3.2 界面観察方法の選択

細胞-デバイス界面の観察には、電子顕微鏡を中心として様々な観察方法が考えられる。近年では、通常の SEM, TEM に加え、細胞を生きたまま観察する手法の開発も進展している。例えば、生体試料を直接電子顕微鏡に挿入するために、ウェット SEM カプセル (QX-capsule: El-Mul Technologies, Ltd., Israel)が開発されている。また、イオン液体を利用した技術にも注目が集まっている。イオン液体の特徴として、蒸気圧が実質的に 0 であり、真空中でも蒸発せず、高イオン伝導度を持つことが知られている [Nishikawa, 2013]。イオン液体の特徴を利用し、生体試料にイオン液体を含浸させて SEM 観察を行う技術が、大阪大学の桑畑らのグループによって始められた [Kuwabata et al, 2006]。この技術を用いて、ヒトの肺上皮細胞である A549 細胞の SEM 観察が行われた [Ishigaki et al., 2011]。その他、細胞等を前処理することなく、液中でそのまま観察が可能な大気圧電子顕微鏡 (Atmospheric Scanning Electron Microscope:

ASEM)が開発されており、ASEM の分解能は 8 nm であることが報告されている [Nishiyama et al., 2010].

上記の技術は細胞を生きたまま直接観察する技術として非常に魅力的である。しかし、ウェット SEM カプセルを用いた場合、40–100 nm であり、先行研究で示された値を観察するには分解能が乏しい。イオン液体を用いた SEM 観察と ASEM は、表面観察を主な対象としており、本研究で必要となる細胞–デバイス間の観察に適用することは困難である。そこで本研究では、高精度な細胞–デバイス断面試料を作成し、高分解能 (0.5–4.0 nm)を持つ走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM)によって、デバイス上に接着した Sf21 細胞とデバイス界面の観察・分析を行い、接着状態の解明を試みた。

### 5.3.3 顕微鏡試験片の固定

デバイス上に接着した細胞とその境界を SEM によって観察するには、生物試料を適切に処理し、処理過程の形態変化を防いで細胞や組織を安定化する必要がある。鳥瞰図用と断面観察用の試料作成行程をまとめたものを表 5.1, 5.2 にそれぞれ示す。1 次固定の固定時間には、グルタルアルデヒド (TAAB 社) を使用して 3 時間程度で固定する。オスミウムによる 2 次固定は、脂質系の固定とコントラスト増強のために実施する。断面観察においては、エポキシ樹脂の観察試料への浸透を促進するため、プロピレンオキサイド置換 (Nisshin EM Co., Ltd.)を行う。

表 5.1 SEM 鳥瞰写真用資料作成工程

手順	工程	処理方法
1	一時化学固定	2.5%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (0.2 M)
2	洗浄	リン酸緩衝液
3	二次固定	2%オスミウム
4	脱水	エタノール脱水 (50%⇒70%⇒90%⇒100% 各10分)
5	乾燥	臨界点乾燥
6	導電処理	Ptコート (10 nm)

表 5.2 断面観察用資料作成工程

手順	工程	処理方法
1	一時化学固定	2.5%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (0.2 M)
2	洗浄	リン酸緩衝液
3	二次固定	2%オスミウム
4	脱水・置換	エタノール脱水 (鳥瞰図用試料と同様 各10分) プロピレンオキシド置換
5	樹脂包埋	エポキシ樹脂 (EPON812) 包埋 (主剤：硬化剤=1:1)
6	断面作成	クロスセクションポリッシャ (CP) 加工
7	導電処理	Cコート (10 nm)

### 5.3.4 クロスセクションポリッシャ (Cross Section Polisher)

細胞-デバイス界面の微細構造を SEM によって観察するには、高い面精度を持つ試験片の作成が不可欠である。本研究で対象とする細胞-デバイス界面観察においては、柔らかい材料（細胞）と固い材料（デバイス）の複合試験片を、アーチファクトを極力抑えて作成することが必要である。先行研究では、マイクロトームや集束イオンビーム (Focused ion beam: FIB)によって細胞-デバイス界面の断面試験片を作成していた [Wrobel et al., 2008, Greve et al., 2007]。しかし、マイクロトームは物理的な刃によって薄片を作成するため、デバイスを加工する際に刃こぼれを起こす。FIB による加工は、通常の FIB の加工範囲が数 10  $\mu\text{m}$  程度に限られており [Takahashi et al., 2006]、広範囲の加工には時間的・費用的に不向きである。

そこで本研究では、クロスセクションポリッシャ (CP: JEOL Ltd., Akishima, Tokyo, Japan)によって細胞-デバイス界面の観察試験片を作成した。CP は、熟練を要せず、ブロードなイオンビームによって 500  $\mu\text{m}$  以上の広領域を、高精度に加工することができる [Takahashi et al., 2006]。CP の主な構成要素は、Ar イオン銃、Ar イオンビーム、遮蔽板、そして観察試料である。CP による加工の模式図を図 5.3 に示す。CP により、TEM 観察用の薄片を作成せずとも、SEM による観察で TEM-like な観察が可能となる。SEM 観察には、JSM-7800F (JEOL, Akishima, Tokyo, Japan) を加速電圧 5 kV で使用した。本 SEM の空間解像度は、加速電圧が 15 kV のとき 0.8 nm、1 kV のとき 1.2 nm であるため、1-10 nm 程度の cleft でも観察が可能である。

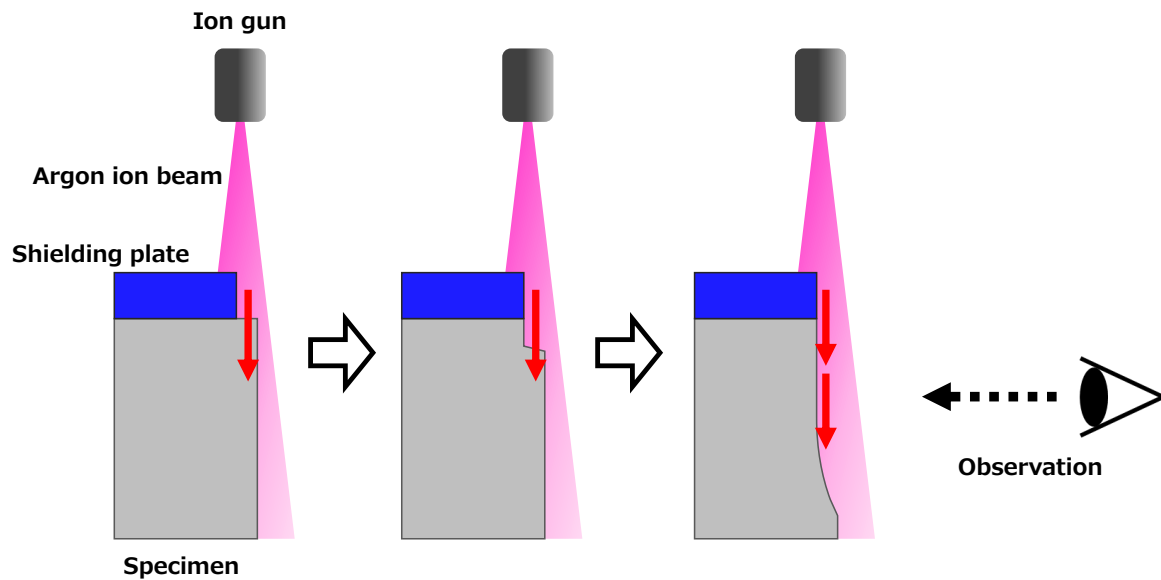


図 5.3 クロスセクションポリッシャによる加工の模式図

イオン銃から放出された Ar イオンは、観察試料内部に進入して試料の構成原子をはじき出す。試料の直上にスパッタリングされにくい材質の遮蔽板を設置して、観察位置に遮蔽板の端部を置くことで、遮蔽板から突き出した部分のみがスパッタリングされ、遮蔽板端面位置に観察断面が形成される。

## 5.4 電極上のセンサ細胞の観察結果

電極上のセンサ細胞の接着状態を知るために、SEM によって細胞の鳥瞰的写真と上面からの観察を実施した。BmOR3 発現系統を、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  をスパッタリングした伸長ゲート電極と、アルミニウムのみ伸長ゲート電極それぞれに播種して観察を行った。本研究では、昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 細胞を使用しているため、SEM 観察においても昆虫嗅覚受容体発現細胞である BmOR3 発現系統を使用した。観察した各電極上の BmOR3 発現系統の写真を図 5.4 に示す。

図 5.4 (a), (b) より、BmOR3 発現系統は、細胞毒性の懸念されるアルミニウムベース電極上に形状変化などを起こさず密着していることが確認された。図 5.4 (c) より、アルミニウム電極上に接着した BmOR3 発現系統は、電極の外側にある  $\text{SiO}_2$  絶縁膜上に移動するような挙動は示していないことがわかる。

図 5.4 (d) からわかるように、Sf21 細胞は細胞の一部で他の細胞と接着し、デバイスから浮いた状態になる。第 3 章で言及した、BCT の電極上に細胞が適切に接着していない可能性については、本写真のように、隣接する細胞やポリイミドのわずかな段差によって接着が遮られていることが原因になると考えられる。また、図 5.4 (d) の BmOR3 発現系統表面上に多数存在する繊維の様な部位は、微絨毛 (Microvilli, マイクロビライ) であると考えられる [Lange, 2011]。浮遊性細胞であるリンパ球には微絨毛が存在することが知られており [Majstoravich et al., 2004]、半浮遊性の細胞である Sf21 細胞にも同じように存在すると考えられる。

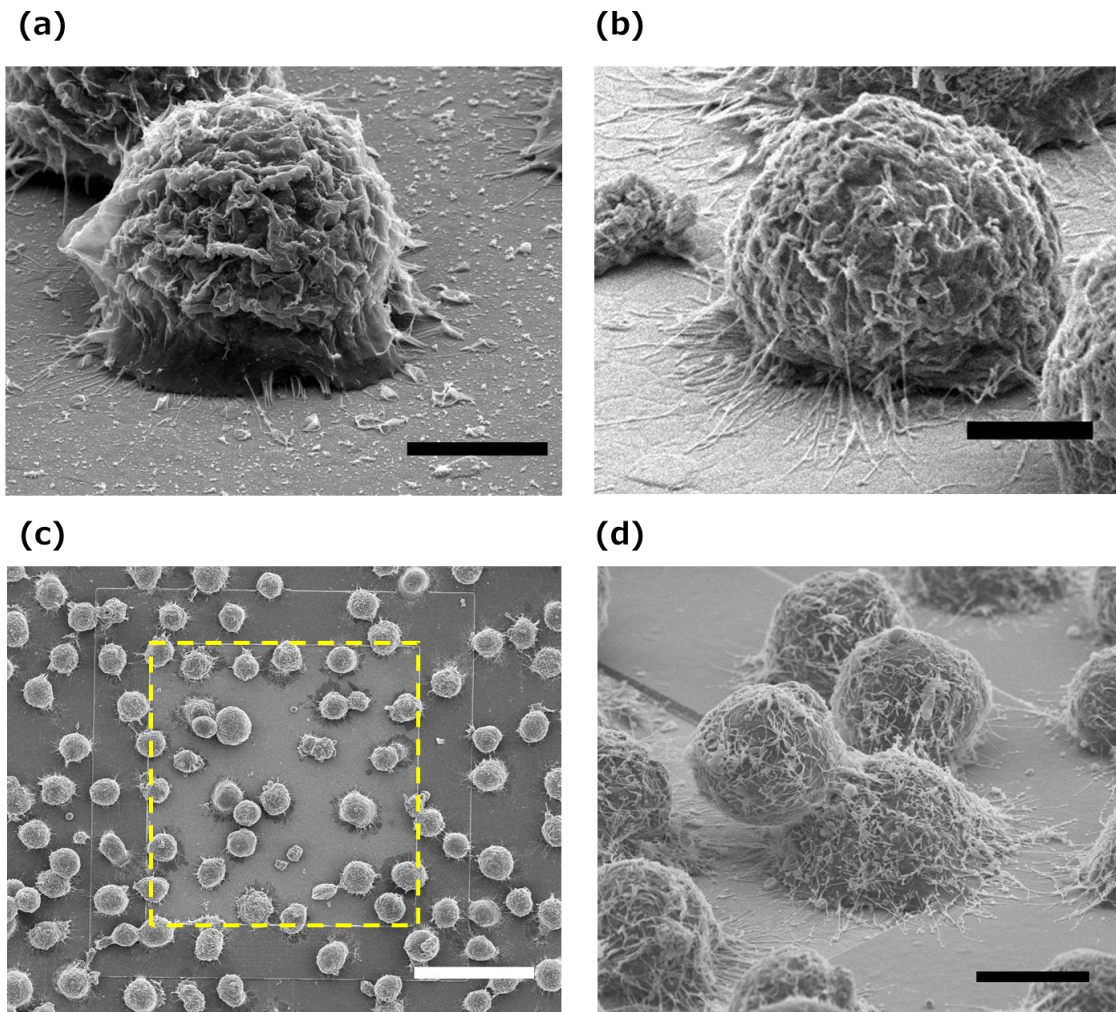


図 5.4 各伸長ゲート電極上の BmOR3 発現系統の鳥瞰 SEM 写真と上面 SEM 写真.

(a) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 伸長ゲート電極上と, (b) アルミニウム伸長ゲート電極上の BmOR3 発現系統の鳥瞰 SEM 写真. (c) アルミニウム伸長ゲート電極上の BmOR3 発現系統の上面 SEM 写真. 黄色枠内が電極部. 電極の外側は SiO<sub>2</sub> 絶縁膜で覆われている. (d) アルミニウム伸長ゲート電極上の重なりあった BmOR3 発現系統の鳥瞰 SEM 写真. Scale bars: (a) 5  $\mu$ m, (b) 5  $\mu$ m, (c) 50  $\mu$ m, and (d) 10  $\mu$ m.

## 5.5 Sf21 細胞-デバイス界面の Cleft 分析

### 5.5.1 画像処理方法

CPによって作成した断面観察資料から、細胞-デバイス界面の cleft を定量的に分析するため、本研究ではフィルタによって画像処理を行った後、ImageJ のプロットプロファイルを用いた画像処理によってその距離を定量した。

画像処理の手順として、ImageJ のバンドパスフィルタによるフィルタ処理の後、smooth コマンドと sharpen コマンドを 3 回ずつ繰り返してノイズの低減を行った。プロットプロファイルによって得られた輝度のピークや広がり、実際の大きさに対応しない場合がある。そのため、本研究では半値幅 (Full width at half maximum: FWHM) によって cleft を定量した。FWHM の導出は、得られたプロファイルの最大輝度値の半分の値に線を引き、その線とプロファイルの交点の値を求めることによって得られる。先行研究では、細胞膜間の距離やナノ粒子の測定に FWHM が用いられている [Cardenes et al., 2017, de Jonge et al., 2010]。FWHM の導出に用いるプロファイルの内挿には、MATLAB に実装されている区分的 3 次エルミート内挿多項式 (Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomial: PCHIP) を用いた [Fritsch and Carlson, 1980]。PCHIP を用いることで、プロファイル描画時のオーバーシュートや振動を低減することができる。

## 5.5.2 断面試料観察結果

CPで加工した細胞-デバイス界面の模式図を図5.5(a)に示す。本手法によって、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 上に接着したBmOR3発現系統を、細胞内構造が維持されたまま観察可能であることを確認した(図5.5(b))。本研究では、CPのブロードなイオンビームにより、1つの電極上に接着した2つのBmOR3発現系統の観察に成功した(以下Cell A, Bとする)。BmOR3発現系統と $\text{Al}_2\text{O}_3$ 伸長ゲート電極の断面写真を図5.5(c)に、黄色枠内のcleft部の拡大図を図5.5(d)に示す。図5.5(d)より、CPによる加工では細胞膜と $\text{Al}_2\text{O}_3$ 膜、その境界の微細構造が明瞭に維持されていることを確認した。

## 5.5.3 Cleft 距離測定結果

BmOR3系統と $\text{Al}_2\text{O}_3$ 膜のcleft距離測定結果について記述する。Cleft距離を測定するため、ImageJのプロットプロファイルを使用し、細胞-デバイス間の輝度減少を求めた。Cell AにおけるFWHMのプロットの例を図5.6(a)に示す。本研究では、ImageJのプロファイル幅は1 pixel (=1.86 nm)に設定した。

各細胞のcleft距離のヒストグラムを図5.6(b),(c)に示す。ヒストグラム導出のため、Cell Aでは100点、Cell Bでは87点のプロファイルを、ImageJのマクロによって10 pixelsごとに等間隔で導出した。測定結果として、Cell Aでは全体の32%が5 nm以下、53%が10 nm以下のcleft距離で $\text{Al}_2\text{O}_3$ 膜と接着していることが確認された。Cell Bでは、Cell Aと比較すると細胞-デバイス間のcleftは広いが、測定部位の過半数が15 nm以下の距離で $\text{Al}_2\text{O}_3$ 膜と接着していた。各細胞の接着距離をまとめたものを表5.3に示す。2つの細胞のcleft距離の平均値は $10.3 \pm 0.5$  nmであった。

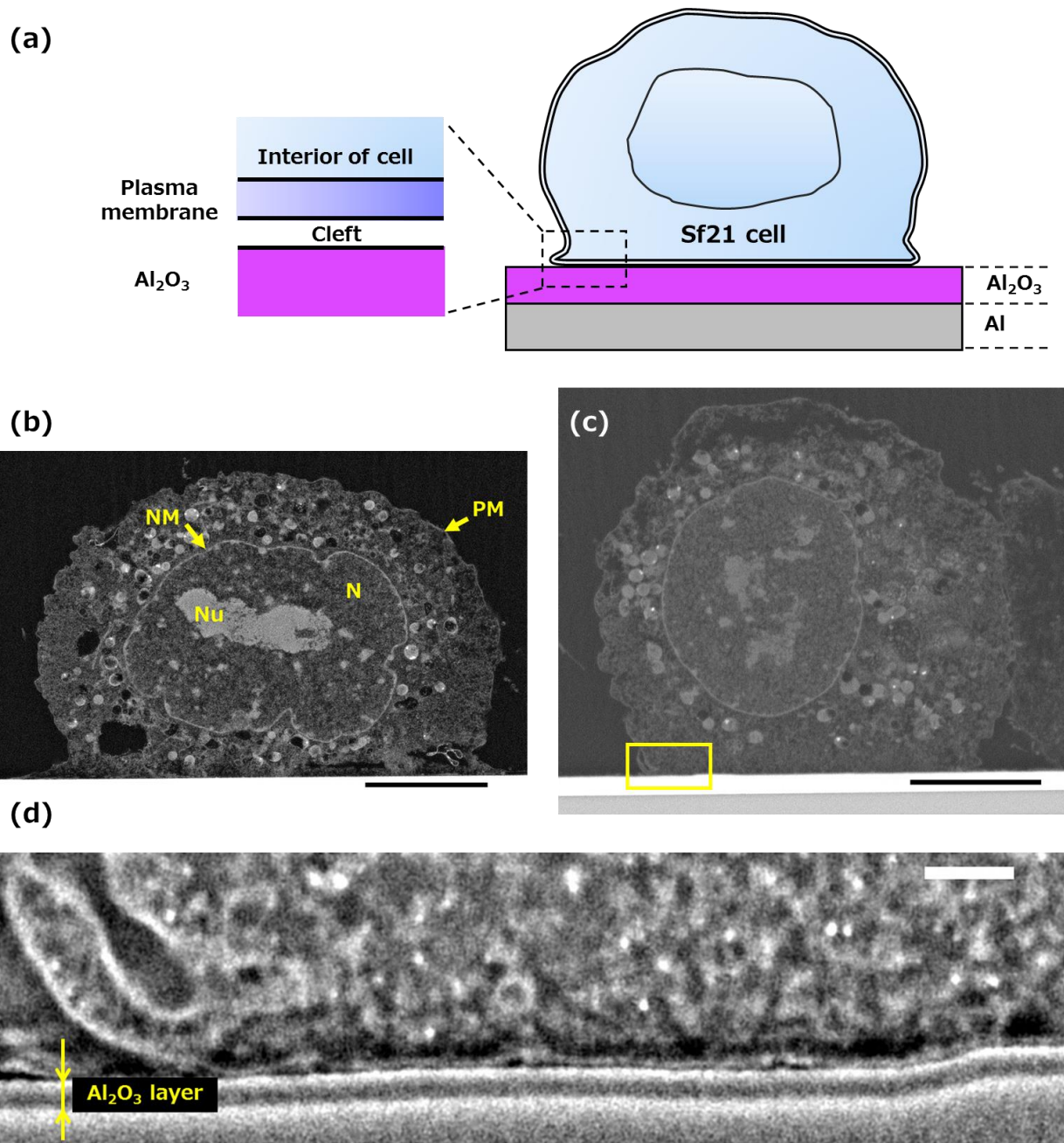


図 5.5 (a) CP による  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜上の Sf21 細胞断面の模式図. (b)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜上の BmOR3 発現系統の細胞内構造. 細胞内構造は Sf9 細胞を参照した [Tao et al., 2013, Huang et al., 2011]. 細胞膜(PM), 核(N), 核小体(Nu), 核膜(NM). (c)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜上の BmOR3 発現系統の全体断面 SEM 写真. (d) (c)黄色枠内の拡大 SEM 写真.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜の厚さは 3 点の平均でおよそ 63 nm. Scale bars: (b) 5  $\mu\text{m}$ , (c) 5  $\mu\text{m}$ , (d) 200 nm.

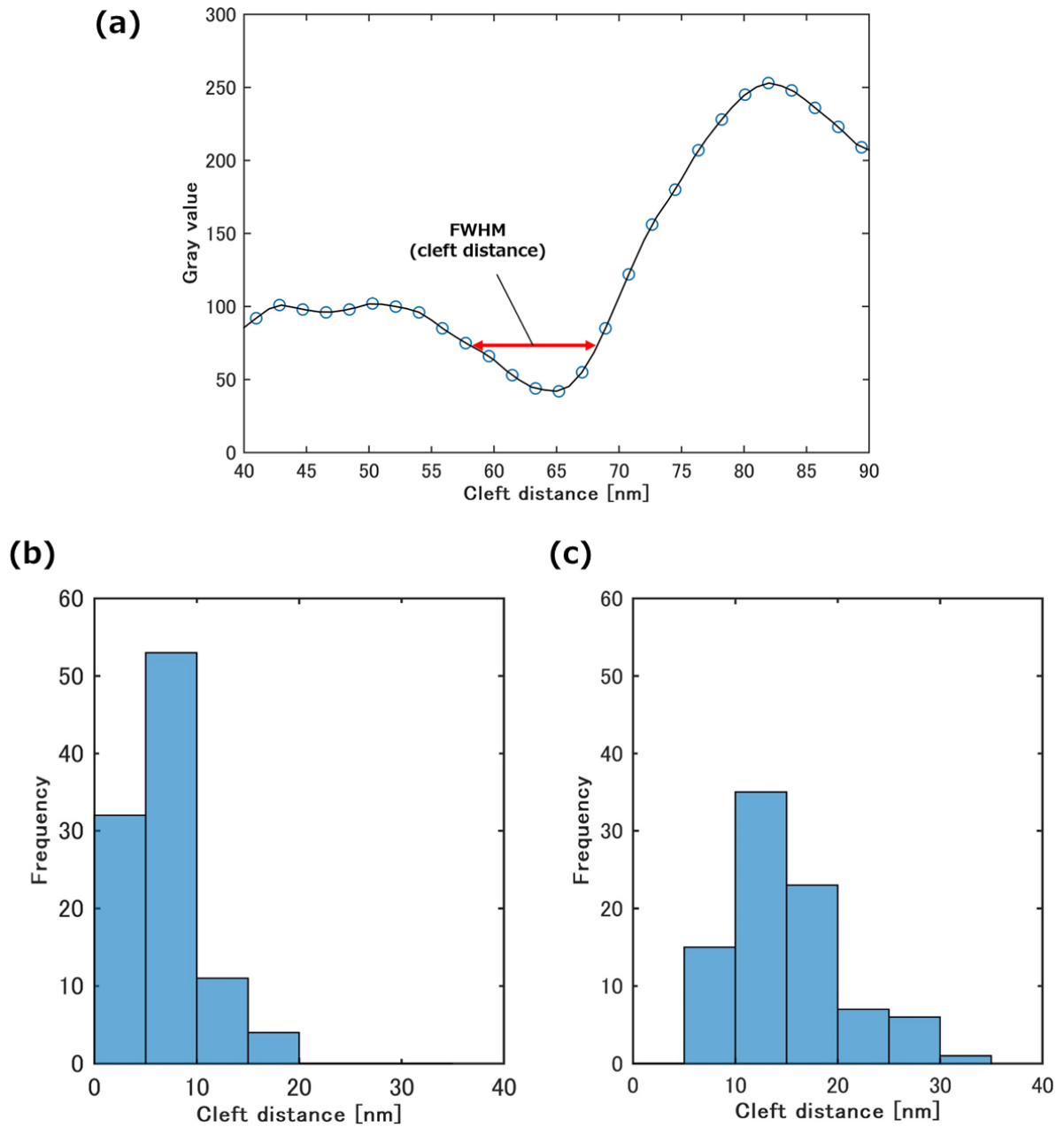


図 5.6 (a) 図 X (d)の BmOR3 発現系統と  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜間の cleft 距離と FWHM 値の代表例. (b) Cell A の cleft 距離のヒストグラムと, (c) Cell B のヒストグラム. (Number of analyzed points of Cell A was  $N = 100$  and Cell B was  $N = 87$ ).

**表 5.3** 同一の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 伸長ゲート電極上に接着した 2 つの BmOR3 発現系統と Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜間の cleft 距離の割合とそれらの平均値 (Number of analyzed points were n = 100 of Cell A and n=87 of Cell B, respectively).

Cells	d≤5 nm	d≤10 nm	d≤15 nm	d>15 nm	Average cleft distance [nm]
Cell A	32.0%	53.0%	11.0%	4.0%	6.2 ± 0.4
Cell B	–	17.2%	40.2%	42.5%	14.9 ± 0.6
Cell A & B	17.1%	36.4%	24.1%	22.5%	10.3 ± 0.5

## 5.6 考察

### 5.6.1 センサ細胞-デバイス間の cleft 距離

先行研究では、細胞とデバイス間の cleft 距離は 10–100 nm 程度と報告され、HEK293 細胞の例では、10 nm 以下の距離で接着した部位を focal adhesion と考察している [Wrobel et al., 2008]. 一方本研究の観察では、BmOR3 発現系統と Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜の平均 cleft 距離は  $10.3 \pm 0.5$  nm であった. 先行研究で観察された HEK293 細胞-デバイス間の模式図と、本研究の観察結果に基づく昆虫細胞-デバイス界面の模式図を図 5.7 に示す. この結果は、Sf21 細胞は基板との接着の際に focal adhesion とは異なるメカニズムで接着していることを示唆している. 電極に細胞が密着するほど検出できる信号強度が増加するため、3次元構造を持つ電極で接着強化を図った研究がある [Hai et al., 2009]. しかし、Sf21 細胞の場合は、平面電極に対しても良好な密着性を得られることが示唆された. Sf21 細胞は、電気デバイスを用いた細胞応答測定を行う場合に有用な特徴を持っていると考えられる.

CP による断面試料作成において、図 5.5 (d)の接着した細胞膜の直上部分に黒い領域が散見された. この領域は、顕微鏡試料作成時のエラーである可能性が考えられるが、細胞膜は Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 膜に密着しており、画像からの膜の存在が明確に確認できる. よって、細胞-デバイス界面の観察を行う本研究の結果に影響を与えるものではないと判断した.

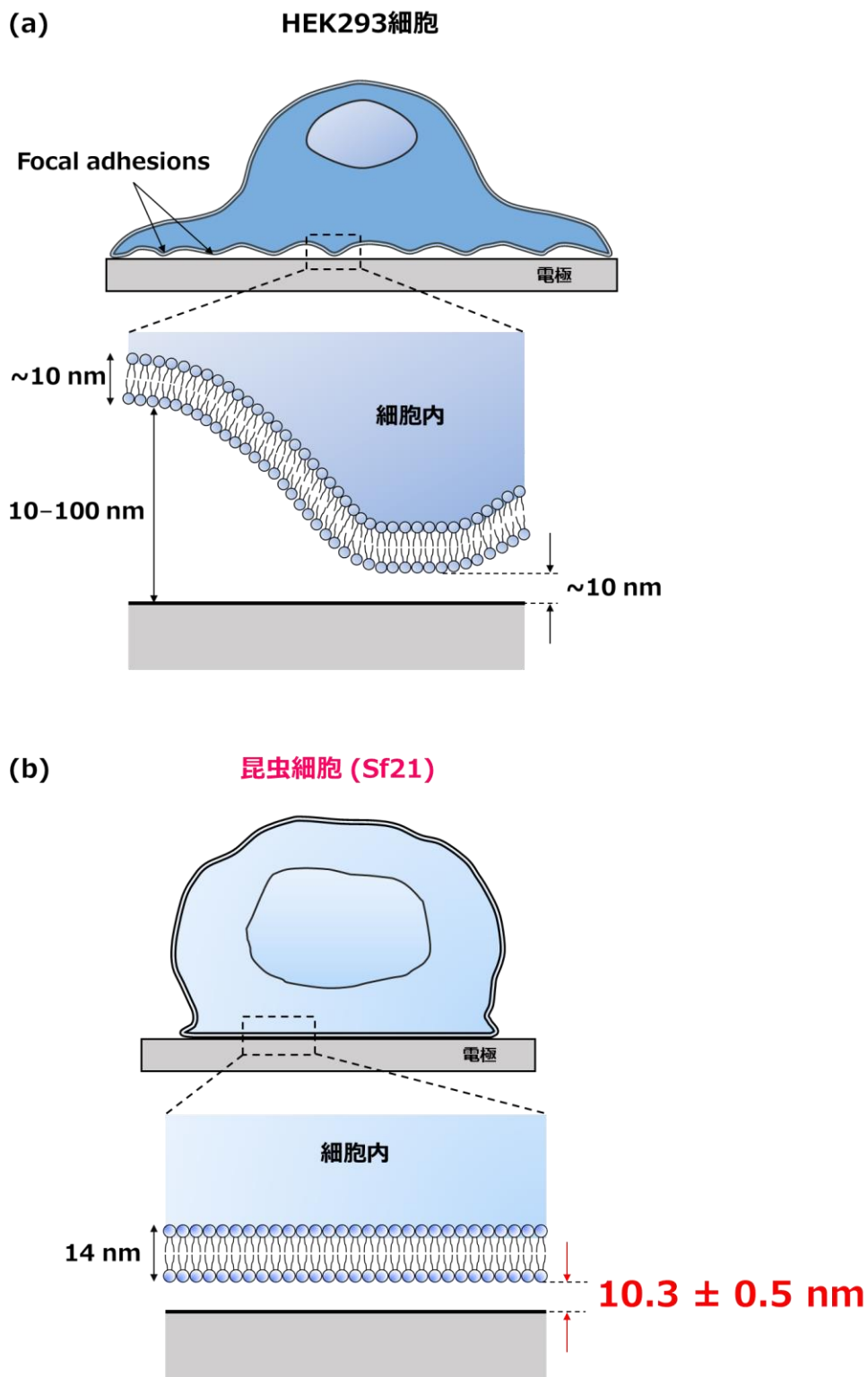


図 5.7 (a) 先行研究で示された細胞-デバイス界面の模式図. 典型的な細胞膜厚さは  $10 \mu\text{m}$ . (b) 本研究の電極上に接着した BmOR3 発現系統の観察結果に基づいた, 昆虫細胞-デバイス界面の模式図. BmOR3 発現系統の膜厚さは 3 点の FWHM 値の平均より  $14 \text{ nm}$ .

## 5.6.2 神経細胞と電気デバイスの信号検出モデル

### 5.6.2.1 Hodgkin-Huxley equation

センサ細胞からの電気信号を FET によって検出する際の検出モデル構築に向け、まず A. L. Hodgkin と A. F. Huxley によって構築された、細胞膜の並列等価回路モデルを考察する。細胞膜にはイオンチャネルと呼ばれるタンパク質が存在し、このチャネルは特定のイオンのみを選択的に通す。Hodgkin と Huxley は、ヤリイカ (*Loligo squid*) の巨大神経軸索の活動電位の記録を行い、電位依存性コンダクタンスを含む細胞の parallel conductance model (並列等価回路モデル) を提案した (図 5.8)。これは、ナトリウムチャネルとカリウムチャネルに相当する内部抵抗 (コンダクタンス) と、一定値を取るリークコンダクタンスを含むモデルである。このモデルを基に、Hodgkin と Huxley は Hodgkin-Huxley equation (ホジキン・ハクスレー方程式) を導出した [Hodgkin and Huxley, 1952]。Hodgkin-Huxley equation は以下の微分方程式で記述される、

$$I_M = C_M \frac{dV_M}{dt} + g_{Na}(V_M - E_{Na}) + g_K(V_M - E_K) + g_l(V_M - E_l) \quad (5-1)$$

$$g_{Na} = m^3 h G_{Na}, \quad g_K = n^4 G_K \quad (5-2)$$

ここで、 $I_M$  は細胞膜を流れる電流、 $V_M$  は細胞外電位を基準とした細胞内電位 (膜電位)、 $C_M$  は細胞膜の膜容量、 $g_{Na}, g_K, g_l$  はそれぞれ  $Na^+$ ,  $K^+$ , リーク電流のコンダクタンスである。 $Na^+$  と  $K^+$  のコンダクタンス  $g_{Na}, g_K$  は可変値をとり、リークコンダクタンスの  $g_l$  は一定値をとる。 $E_{Na}, E_K, E_l$  は  $Na^+, K^+$ , リーク電流の平衡電位 (細胞と周辺のイオン濃度差によって発生する電位) である [宮川, 井上, 2013]。また、 $m, h$  は  $Na$  チャネルの開閉状態を表す変数であり、 $n$  は  $K$  チャネルの開閉状態を表す変数である。 $G_{Na}, G_K$  は各チャネルのコンダクタンスの最大値を表す定数である。

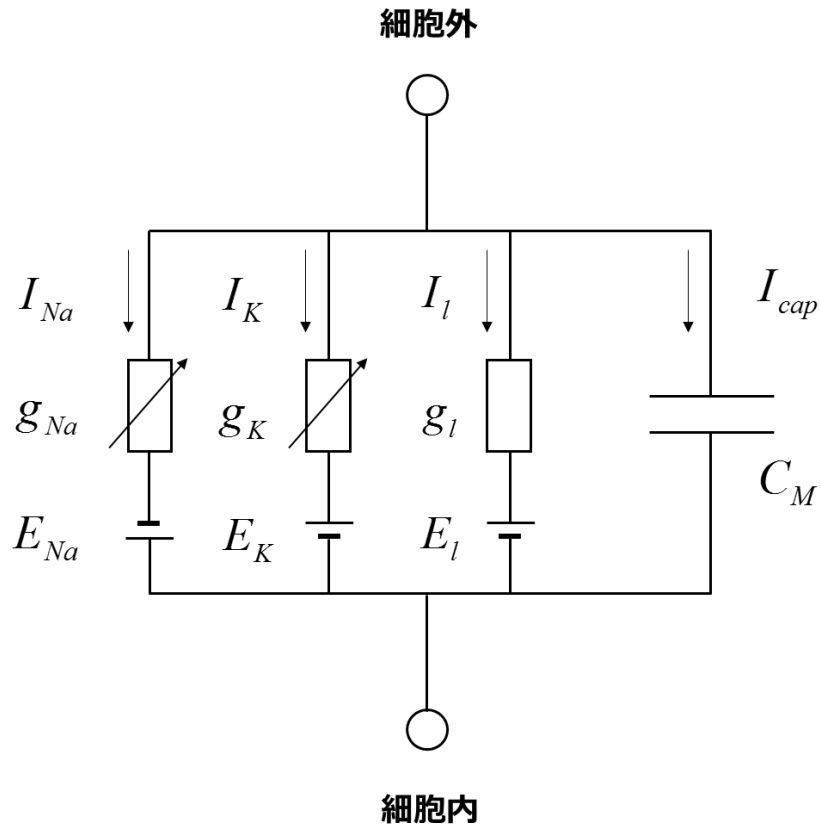


図 5.8 電位依存性コンダクタンスを含む膜の並列等価回路モデル

### 5.6.2.2 Point-contact model

次に、先行研究で示された神経細胞-デバイス結合モデルを考察する。Max Planck 研究所（独）の P. Fromherz のグループでは、神経細胞のアクションポテンシャルを FET で検出する場合のモデルを構築した [Fromherz, 2003]。このモデルでは、Hodgkin-Huxley 型モデルに基づいた、Hodgkin-Huxley elements を含む Point-contact model として構築された。Point-contact model の等価回路モデルを図 5.9 に示す。この等価回路モデルでは、細胞内部の抵抗は考慮されていない。細胞-デバイス間の cleft が一定の距離（例えば 10–100 nm）を持つ場合、cleft はイオン化した液体で満たされる。本モデルは、細胞外と細胞内の電圧を表す 2 本の方程式で記述される。まず細胞外電圧  $V_j$  について述べる。溶液で満たされた導電性のある cleft の global Ohmic conductance は  $G_j$

で表され、接着部の細胞膜容量と FET デバイスの SiO<sub>2</sub> の global capacitance はそれぞれ  $C_{JM}$ ,  $C_S$  で表される。接着部と非接着部の膜の global specific ion conductance はそれぞれ  $G_{JM}^i, G_{FM}^i$ , 平衡電位は  $V_0^i$  (図 5.9 では電池記号に相当) と表される。このとき  $i$  はイオンの種類を表す。溶液の電位, 細胞内電位, 溶液とデバイス間の電位をそれぞれは  $V_E, V_M, V_S$  とする。接着部の細胞膜面積  $A_{JM}$  に関する細胞の特定部位のパラメータを  $c_S = \frac{C_S}{A_{JM}}, c_{JM} = \frac{C_{JM}}{A_{JM}}, g_{JM}^i = \frac{G_{JM}^i}{A_{JM}}, g_J = \frac{G_J}{A_{JM}}$  と定義したとき, キルヒホッフの法則より, 接着部の細胞外電圧  $V_J$  は以下の微分方程式で記述される。

$$g_J(V_J - V_E) = c_S \left( \frac{dV_S}{dt} - \frac{dV_J}{dt} \right) + c_{JM} \left( \frac{dV_M}{dt} - \frac{dV_J}{dt} \right) + \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_J - V_0^i) \quad (5-3)$$

非接着部の細胞膜面積  $A_{FM}$  に関する細胞の特定部位のパラメータを

$$c_{FM} = \frac{C_{FM}}{A_{FM}}, g_{FM}^i = \frac{G_{FM}^i}{A_{FM}} \text{ と定義したとき, アクションポテンシャルの測定時には細胞}$$

に電流  $I_{inj}$  を注入していることを考慮し, キルヒホッフの法則より細胞内電圧  $V_M$  は以下の微分方程式で記述される。

$$I_{inj} = A_{FM} \left[ c_M \left( \frac{dV_M}{dt} - \frac{dV_E}{dt} \right) + \sum_i g_{FM}^i (V_M - V_E - V_0^i) \right] + A_{JM} \left[ c_M \left( \frac{dV_M}{dt} - \frac{dV_J}{dt} \right) + \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_J - V_0^i) \right] \quad (5-4)$$

上記の方程式は, 適切な近似を行うことで以下の様に記述できる。  $V_E = 0$  とし, デ

バイスの容量性電流は小さく  $g_J V_J \gg c_S \left( \frac{dV_S}{dt} - \frac{dV_J}{dt} \right)$ , 細胞内の電圧と比較して細胞

膜を横切る電圧は小さく  $V_M - V_J \approx V_M$  と仮定すると, (5-3)は以下の様に記述される [Garrido, 2013].

$$g_J V_J = C_{JM} \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_{JM}^i (V_M - V_0^i) \quad (5-5)$$

$V_E = 0$  とし, 接着部の細胞面積が非接着部より十分小さく  $\frac{A_{JM}}{A_{FM}} \ll 1$  と仮定したと

き, (5-4)は以下の様に記述される [Garrido, 2013].

$$\frac{I_{inj}}{A_{FM}} = c_M \frac{dV_M}{dt} + \sum_i g_{FM}^i (V_M - V_0^i) \quad (5-6)$$

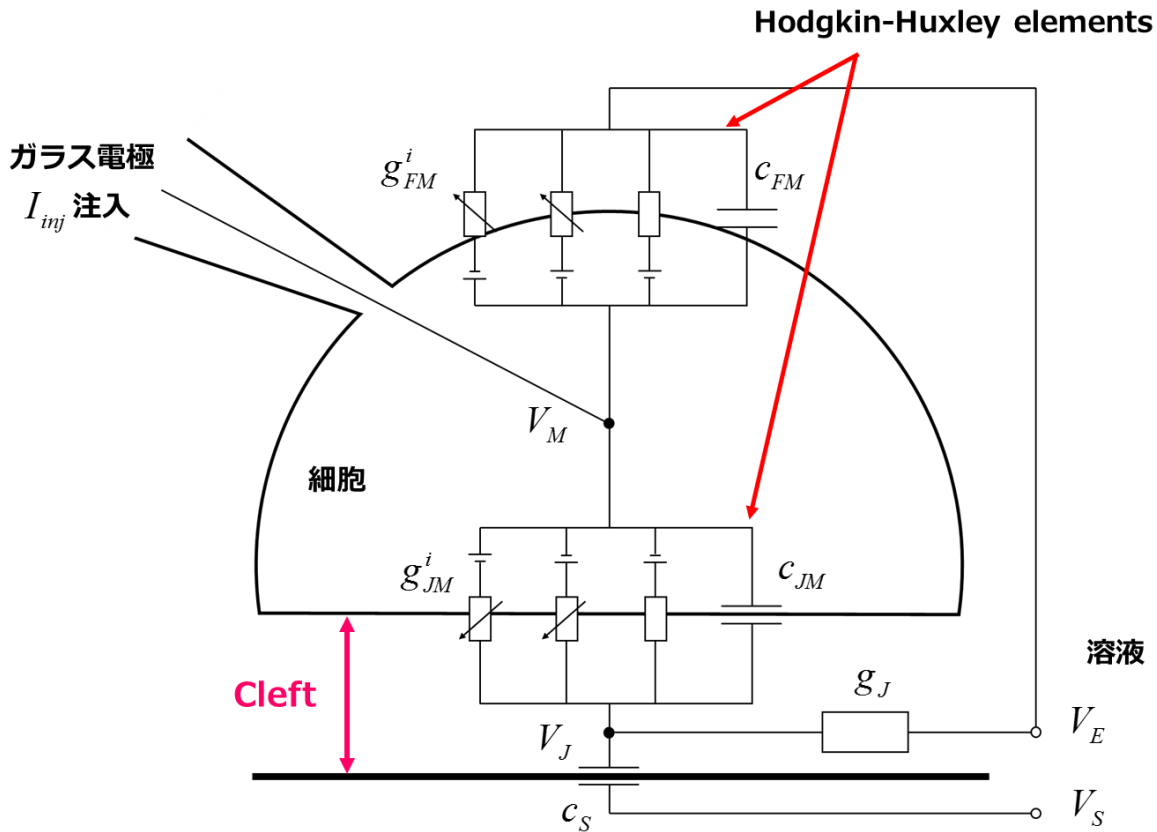


図 5.9 Point-contact model における細胞と FET の等価回路

### 5.6.2.3 先行研究における細胞-デバイス間結合状態

先行研究では、種々の細胞のアクションポテンシャルを測定した結果から、細胞種によって細胞-デバイス間の結合状態が異なり、同一種でも細胞の部位によって細胞-デバイス間の結合状態が変化することが調べられている。例えば、leech neuron (ドイツ蛭, *Hirudo medicinalis*) 由来の Retzius neuron (レチウス神経細胞) を FET 上に接着し、アクションポテンシャルの測定とシミュレーションによる細胞-デバイス間のカップリング状態の検討が行われた [Jenkner and Fromherz, 1997, Schätzthauer and Fromherz, 1998]。Jenkner and Fromherz では、Retzius neuron の細胞体 (cell body) が FET の直上に接着した場合の測定を行い、細胞-デバイスがキャパシティブカップリングであると想定した場合のシミュレーション結果と同様の信号が検出された。キャパシ

ティブカップリングの場合，cleft 内のイオン流は無視されるため，(5-5)より以下の式で記述できる．

$$V_J = C_{JM} \frac{dV_M}{dt} \frac{1}{g_J} \quad (5-7)$$

Schätzthauer and Fromherz では，Retzius neuron の軸索切片 (axon stump)を FET の上に接着した測定が行われた．このとき，cleft 内のイオン流の影響を無視した純粋なキャパシティブカップリングを想定してシミュレーションを行われたが，シミュレーション結果は実際の FET による計測で得られた波形と形状が逆であった．よって，leech neuron の軸索切片では純粋なキャパシティブカップリングは測定結果と一致しないことが述べられている．

HEK293 細胞の場合には，FLIC を用いた光学的観察により cleft が 50 nm 存在し，cleft 内の抵抗 (40  $\Omega\text{cm}$ )と周辺の溶液の抵抗 (74  $\Omega\text{cm}$ )が近い値を取っていたため，cleft 内が溶液で満たされていると結論付けられた [Fromherz, 2003]．これらの結果は，FET によって検出される信号が細胞種や接着部位によって変化することを示している．Leech neuron の細胞体の場合は，キャパシティブカップリングでシミュレーションした結果と適合する信号が検出されているため細胞とデバイスが密着している可能性があるが，界面を直接観察した結果は示されておらず，推定された cleft 距離は 32 nm であった [Jenkner and Fromherz, 1997]．

## 5.6.3 センサ細胞と電気デバイスの信号検出モデル

### 5.6.3.1 キャパシティブカップリングモデル

最後に、センサ細胞-デバイスの電氣的結合モデルについて考察する。本研究の結果より、センサ細胞と  $\text{Al}_2\text{O}_3$  電極界面の cleft 平均値は  $10.3 \pm 0.5 \text{ nm}$  であった。この結果を考慮すると、センサ細胞の接着では cleft 内のイオン電流を無視した、細胞膜とデバイスの純粋なキャパシティブカップリングによる信号検出モデルが想定される。本研究の N チャンネル型 OSFET の測定結果では、センサ細胞が特定の匂い物質に応答した際、ドレイン電流の増加が検出された。この結果は、電荷の増加したセンサ細胞の影響によって、FET のチャンネルが増大し、結果としてソースドレイン電流が変調されたためと考えられる。想定されるセンサ細胞と FET の等価回路を図 5.10 に示す。昆虫嗅覚受容体は匂い物質の受容により、細胞外から細胞内に陽イオンを透過するため電流が発生するため、これを  $I_{OR}$  とする。昆虫嗅覚受容体のチャンネルのコンダクタンスを  $g_{OR}$ 、細胞内外のイオン濃度差による起電力を  $V_{OR}$  とすると、キルヒホッフの法則より以下の式で記述できる。

$$\begin{aligned} I_{OR} &= c_{FM} \left( \frac{dV_M}{dt} - \frac{dV_E}{dt} \right) + g_{OR} (V_M - V_{OR} - V_E) \\ &= c_{JM} \left( \frac{dV_M}{dt} - \frac{dV_J}{dt} \right) + g_{JM} (V_M - V_J) \\ &= c_S \left( \frac{dV_J}{dt} - \frac{dV_S}{dt} \right) + g_J (V_J - V_E) \end{aligned} \quad (5-8)$$

センサ細胞の場合は、参照電極によって溶液に  $0 \text{ V}$  を印加しているため  $V_E = 0$  となり、観察結果より細胞-デバイス界面のコンダクタンスが非常に小さいと考えられる

ため  $g_J \approx 0$  とすると、イオンチャンネルに発生した電流とデバイスの電圧変化は以下の式で記述できる。

$$I_{OR} = c_{FM} \frac{dV_M}{dt} + g_{OR} (V_M - V_{OR}) = c_S \left( \frac{dV_J}{dt} - \frac{dV_S}{dt} \right) \quad (5-9)$$

今回のモデル検討では、細胞-デバイス界面のコンダクタンスを  $g_J \approx 0$  として立式を行ったが、接着状態に応じて  $g_J$  を完全に無視せず、フィッティングパラメータとして考慮することも可能であると考えられる。

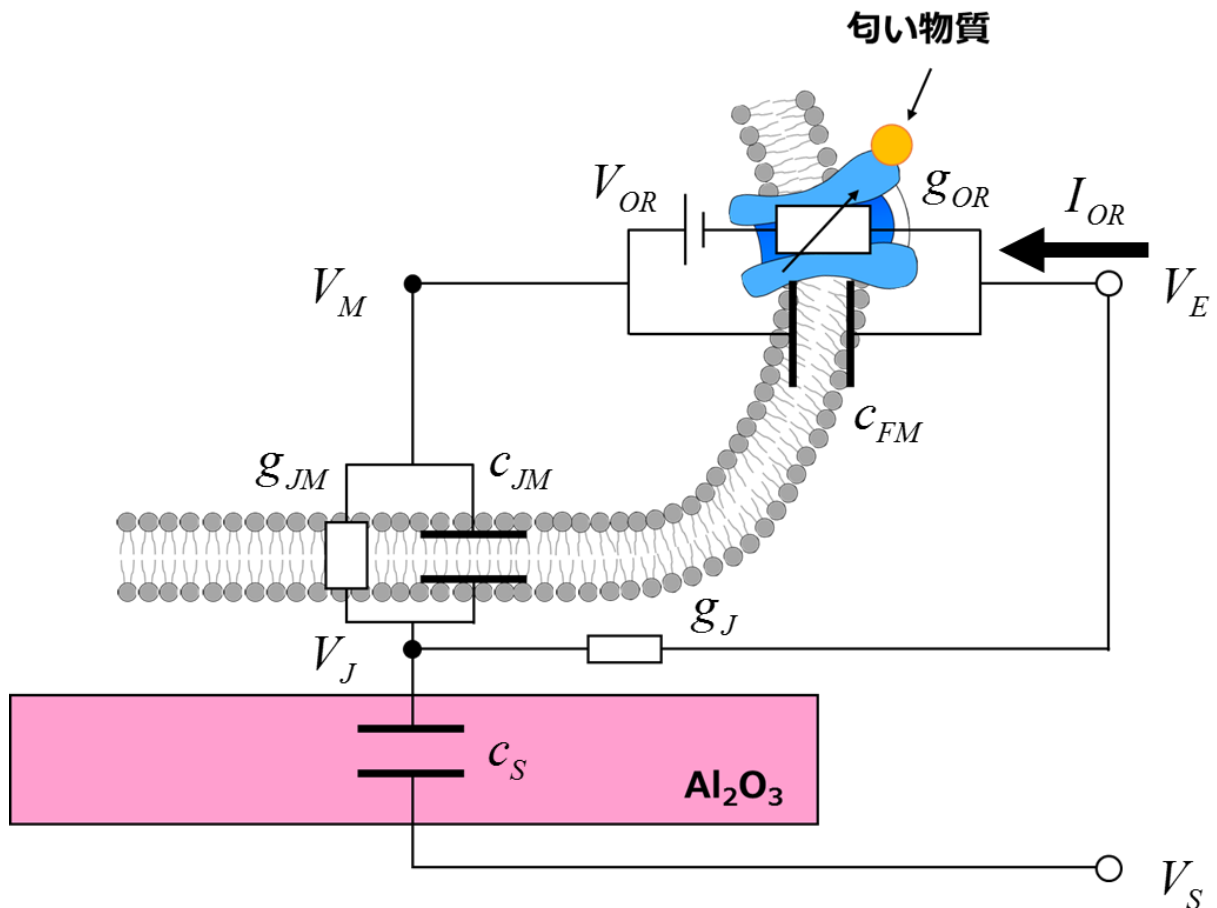


図 5.10 センサ細胞と FET の等価回路

### 5.6.3.2 モデル構築の制約

本研究の電気信号検出結果とセンサ細胞-デバイス間の観察・分析に基づき、細胞-デバイス結合モデルの構築が進められた一方、これらの結果のみで数値シミュレーションが可能なモデルを構築することは困難である。その理由を以下に述べる。まず、Sf21 細胞に発現した昆虫嗅覚受容体で発生する電流値が不明であることが挙げられる。先行研究では、HEK293T 細胞の細胞膜にショウジョウバエの Or47a 受容体と Or83b 受容体 (Olfactory co-receptor, Orco と改名された) を発現させ、アウトサイド-アウト法パッチクランプによって発生する電流量を測定した結果、300  $\mu\text{M}$  の匂い物質の刺激によって 1 つの嗅覚受容体から 1.6 pA の電流が計測された [Sato et al., 2008]。しかし、Sf21 細胞に発現した昆虫嗅覚受容体で発生する電流は測定されていない。また、昆虫嗅覚受容体は非選択的に陽イオンを流入するため、流入する各イオンの数を見積もることが困難である。OSFET は昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 細胞をセンサ素子として用いており、センサ細胞の測定の場合は  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  を陽イオンとして含むアッセイバッファ溶液を使用し、細胞内の方が濃度の高い  $\text{K}^+$  を除いた 3 種のイオンの流入が想定される。

その他の理由として、Sf21 細胞に昆虫嗅覚受容体の発現数を見積もることと、細胞膜上に発現した受容体の分布状況を知ることが困難であることが挙げられる。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis* oocyte) の卵母細胞に、昆虫の化学受容体であるイオノトロピック受容体 (IR84a) と蛍光タンパク質を発現させ、全反射顕微鏡を用いてその分布状況を検討した研究 [Abuin et al., 2010] があるため、将来的にはこの手法を元に昆虫嗅覚受容体の発現数と分布の見積もりを行うことが考えられる。

### 5.6.3.3 キャパシティブカップリングの意義

本研究の観察・分析により、センサ細胞-デバイス間の距離は先行研究と比較して明確に短く、その結合はキャパシティブカップリングであることが示唆された。細胞とデバイスがキャパシティブカップリングで結合する意義について考察する。先行研究において、神経細胞への電荷の注入・取り出しを行うときには、金属電極よりも酸化イリジウム ( $\text{IrO}_2$ )がよいことを示した論文がある [Robblee et al., 1983]。これは、絶縁物を用いることで、毒性のある電気化学反応物質を生成せず、測定対象への影響を低減したキャパシティブカップリングで測定するプローブとして使用できるためである。また、最小の直径が  $1 \mu\text{m}$  の穴を持つ、ざる型の神経プローブを作成し、切断した末梢神経の軸索を、ざる穴を通して結合させて刺激と計測を行うデバイスが作成されている [Akin et al., 1994]。この事例では、ざる穴の周囲に刺激と計測を行う酸化イリジウム電極が用いられた。また、cleft 距離は、電気デバイスによる細胞の応答計測において最も重要なパラメータであり [Wrobel et al., 2008]、その距離は可能な限り短いことが、電氣的カップリングを高め効率的な信号を検出につながるということが述べられている [Greve et al., 2007]。

以上より、細胞とデバイス間の結合キャパシティブカップリングであることは、電極が検出対象へ与える影響を低減し、信号検出感度の向上に寄与することが期待できる。センサ細胞の場合には、匂い応答を効率的に検出することで匂いセンサの高感度化につながると考えられる。先行研究では、細胞の応答を電気信号として検出する際に、ISFET を用いて細胞とイオン感応膜の間にある溶液のイオン濃度変化を検出した [Lau et al., 2015]。しかし、本研究のセンサ細胞-デバイス結合観察・分析により、センサ細胞はデバイスと密着するため、イオン感応膜を持たない電極においてもセンサ細胞の匂い応答を検出できる可能性が示唆された。この結果より、OSFET とは、イオン感応膜を匂い感応性を持つ細胞に置き換えたデバイスと考えることができる。

## 5.7 まとめ

本章では、クロスセクションポリッシャを用いて、センサ細胞と  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜をスパッタリングした電極の界面観察試料を作成し、画像処理によってセンサ細胞-デバイス間距離を推定した。本研究におけるセンサ細胞-デバイス間の cleft 分析に関する重要な発見として、当初の予想を超え、Sf21 細胞と  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜間の平均 cleft 距離は過去に FLIC や TEM で測定された値と比較して明確に狭いことが確認された。この結果は、Sf21 細胞が focal adhesion とは異なるメカニズムで接着している可能性を示唆し、センサ細胞-デバイス間の結合がキャパシティブカップリングによるものであることをサポートする情報を与えるものである。先行研究の信号検出モデルでは、細胞種や接着部位によって検出される信号が変化することが示されている。Sf21 細胞の FET による計測は過去に例がないため、本研究の観察・分析結果は Sf21 細胞に最適なモデル構築に貢献するものである。

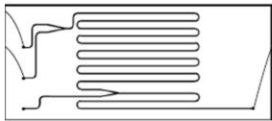
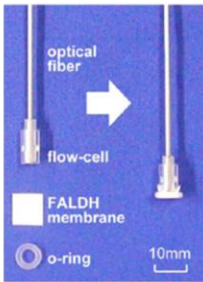
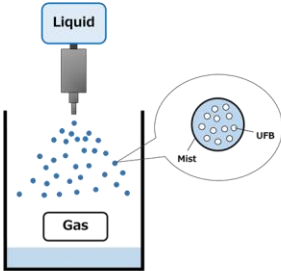
本研究の結果は、センサ細胞の応答検出の場合、ISFET のイオン感応膜上のイオン変化の検出ではなく、細胞内の電荷の増加を検出していることを示唆している。この場合、デバイスは必ずしもイオン感応膜を備える ISFET ではなく、金属電極によっても応答検出が可能である。本研究の結果のみでは、完全な応答検出モデルの構築に必要なパラメータが不足するため、将来的にはパッチクランプ等の技術を用いて必要なパラメータを取得することが求められる。

## 第 6 章 気中の匂い物質の高効率な溶解技術の開発

### 6.1 目的

気中の匂い物質の検出は実用的な匂いセンサの開発に重要な役割を果たす。しかし、その開発は技術的困難さから確立した手法の構築には至っていない。気中の匂い物質の溶解手法として、生物学からのアプローチとしては、匂い結合タンパク質 (odorant-binding protein: OBP)を用いて、センサ細胞を OBP 溶液に浸すことで気中の匂い物質の直接検出が試みられた [三觜 et al., 2012]。工学的アプローチからは、気液交換チップ、ガス透過膜などの手法が提案されている [Kobayashi et al., 2004, Kudo et al., 2010]。一方で、微小なバブルによって気液界面を制御し、機械的な攪拌を必要としない高効率な溶解技術が有機合成分野から提案されている [Mase et al., 2010]。そこで本章では、ウルトラファインバブルを用いることで、難水溶性有機化合物を液中へ高効率に溶解する技術の有効性検証を行うことを目的とした。先行研究の溶解技術の概要と利点、不得意な用途について表 6.1 に示す(表 6.1 内部の図の copyright permission は Appendix A3 に記載した.)。

表 6.1 気中の匂い物質溶解技術と本手法の比較

	気液交換チップ [Kobayashi et al., 2004]	ガス透過膜 [Kudo et al., 2010]	ウルトラファインバブル 提案手法
システム外観	 [Kobayashi et al., 2004 を修正して使用]		
利点	携帯性	携帯性 検出系と一体型のシステム	理論的にあらゆる気体を溶解可能。 短時間で高濃度の溶解が可能。
不得意な点・課題	可溶性の気体への適応が中心。	分子量の大きい匂い物質は透過膜を通過できない可能性がある。	装置内の気体量の安定化が必要。

## 6.2 ウルトラファインバブルを用いた溶解技術

### 6.2.1 ファインバブルの歴史

1990年代末頃から、広島でマイクロバブルが牡蠣養殖の促進に効果を発揮することが話題になった。2004年頃にはマイクロバブルより小さい泡であるナノバブルがマスコミでも報道されるようになった。2015年にファインバブル学会連合が設立され、ファインバブルの国際標準化等が実施された。この際、日本で過去に使用されていた「マイクロバブル」や「ナノバブル」という名称は、「ファインバブル（ウルトラファインバブル）」として名称の統合が行われた [寺坂 et al., 2016]。

### 6.2.2 ウルトラファインバブルの特徴

ファインバブルは、直径によってマイクロバブルとウルトラファインバブルに分類される (図 6.1)。マイクロバブルは直径 1–100  $\mu\text{m}$  の目視可能な気泡であり、液中に存在するマイクロバブル群は白濁して観察される。一方、直径 1  $\mu\text{m}$  以下の目視できないバブルをウルトラファインバブルと呼ぶ。水中でのウルトラファインバブルは 100 nm 程度を示す場合が多く、可視光線の回折限界波長 (380 nm) を下回るため、水中では透明である。ウルトラファインバブルは水中では主にブラウン運動によって移動し、気泡の上昇速度は通常のバブルと比較して十分遅く、長期間液中に存在することができる。また、気泡が電荷を帯びる、気泡内部が超高压状態になるといった特徴がある。これらの特性を生かし、食品分野、化粧品、薬品、医療、半導体や植物育成等、幅広い分野での応用が盛んに検討されている。例えば、2017年に株式会社東芝から、ウルトラファインバブルによって洗浄力を向上させた洗濯乾燥機「ZABOON (ザブーン)」が発売されるなど、ウルトラファインバブルの利用は我々の生活に密着したものとなりつつある。

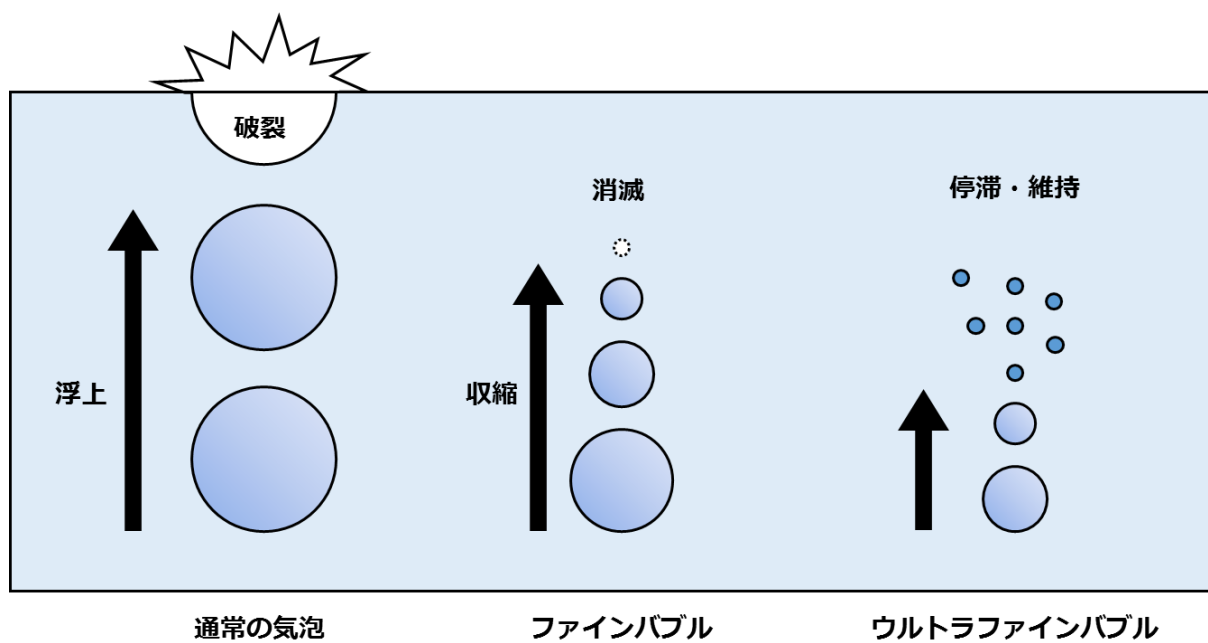


図 6.1 通常の気泡とウルトラファインバブルの相違

## 6.3 気中の匂い物質の溶解

### 6.3.1 ウルトラファインバブルの生成と観察

本研究では、気体の匂い物質を高効率で溶解させる技術として、超音波スプレーノズルによりウルトラファインバブルを発生させる手法を採用した。超音波スプレーノズル (Atomizer, Sonaer inc., USA, 以下アトマイザーと表記) によって蒸留水のみストを噴霧したとき, そのみストには直径 100–200 nm のウルトラファインバブルが含まれていることが確認されている。生成したウルトラファインバブルは, ナノサイト (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) によって測定することができる。ナノサイトは, 散乱光とブラウン運動の特性を利用して懸濁液中の粒子の粒度分布を測定する装置であり, 粒子径 10–2000 nm のあらゆる種類のナノ粒子を迅速かつ正確に測定可能である。



図 6.2 超音波スプレーノズル (アトマイザー)

### 6.3.2 溶解する匂い物質と分析

本研究では、溶解対象の匂い物質として難水溶性の有機化合物である 1-octen-3-ol (Assay: >98%, Sigma-Aldrich, Japan)を用いた。先行研究では、1-octen-3-ol に強く応答する、キイロショウジョウバエの嗅覚受容体である Or13a を発現させたセンサ細胞が構築されている [Termtanasombat et al., 2016]。また、1-octen-3-ol は人の体臭にも含まれることや、肝臓がんのバイオマーカーとなる可能性が示されている [Takken and Knols, 1999, Xue et al., 2008]。そこで、センサ細胞の蛍光計測による溶解サンプルの検証が可能である点と、実用的な難水溶性匂い物質であることから、本研究では 1-octen-3-ol を主な溶解対象に選定した。1-octen-3-ol の溶解濃度を決定するため、メタノールに溶解して作成した 1-octen-3-ol の検量線 (図 6.3) に基づき、ガスクロマトグラフ (GC-2010: Shimadzu, Kyoto, Japan)によって気体と液体の両方の状態の 1-octen-3-ol を分析した。

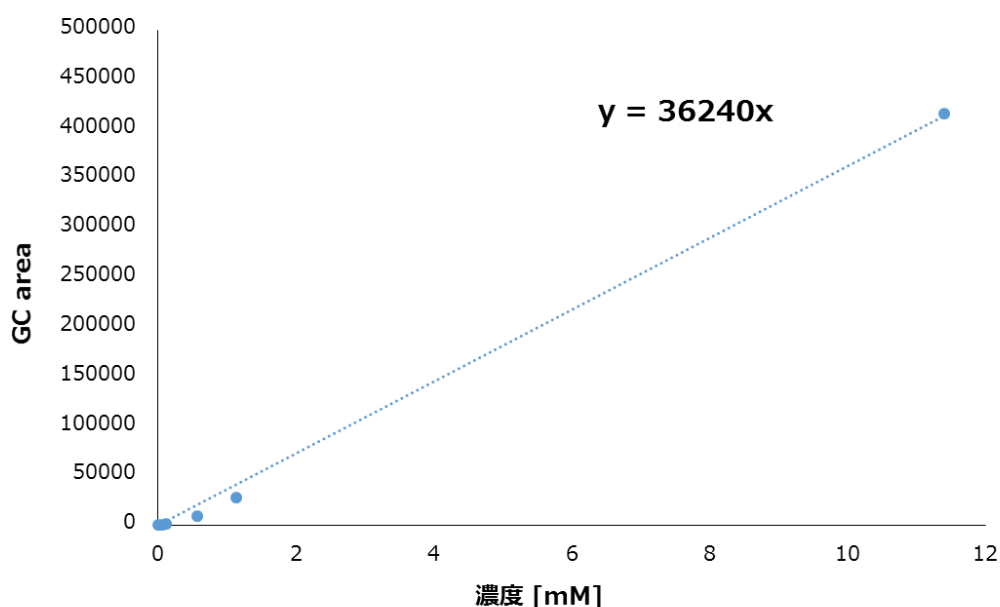


図 6.3 メタノールに液体の 1-octen-3-ol を溶解して作成した 1-octen-3-ol の検量線

### 6.3.3 実験装置

実験装置の構成について説明する．本研究で使用する装置は主に，液体ミストを噴霧するアトマイザー，アトマイザーに蒸留水を送るセラミックポンプ (CPA-2: AS ONE Corporation, Osaka, Japan)，500 ml ビーカー，ビーカー上面に設置したテフロン製のフタで構成される．500 ml ビーカーの底には蒸留水 50 ml を入れ，セラミックポンプによって循環させてアトマイザーに送り，同時にアトマイザーを起動することで蒸留水を噴霧して液体ミストを発生させた．アトマイザーから噴霧された液体ミストは，揮発してビーカー内に存在する気体の 1-octen-3-ol と混合し，ビーカー底の蒸留水に溶解する．実験装置の模式図を図 6.4 に示す．

効率的な匂い物質の溶解と溶解サンプル回収には，ビーカー内に気体の匂い物質が均一に充満し，匂い物質の溶解した蒸留水にも濃度勾配がないことが望ましい．そこで，温度フィードバック付きホットマグネットスターラー (C-MAG HS10 digital: IKA Staufen, Germany) を使用して 30°C に加温し，500 ml ビーカー内とビーカー-水槽間の攪拌子をそれぞれ回転することで，気体 1-octen-3-ol と溶解した 1-octen-3-ol の均質化を図った．また，アトマイザーと蒸留水液面までの距離が長い方が，液体ミストと気化した 1-octen-3-ol の混合効率が増加することが想定されたため，ビーカー内に設置できる液体 1-octen-3-ol を入れる小型のガラス容器を設計した (図 6.5)．

当初は，液体の 1-octen-3-ol を 100°C のホットプレートで加熱して，5 ml/min に制御した Air バルーンによって気化した 1-octen-3-ol をビーカーに送る方法を試みた．

しかし，気体を送るチューブ内で冷却された気体 1-octen-3-ol が，チューブ出口で液化してビーカー底の蒸留水に液滴として混入するという問題が発生した．ガスボンベ等が無く，直接気体を供給できない匂い物質で実験を行う場合は，本装置の様な自然気化によって気体を発生させる装置が望ましいと考えられる．

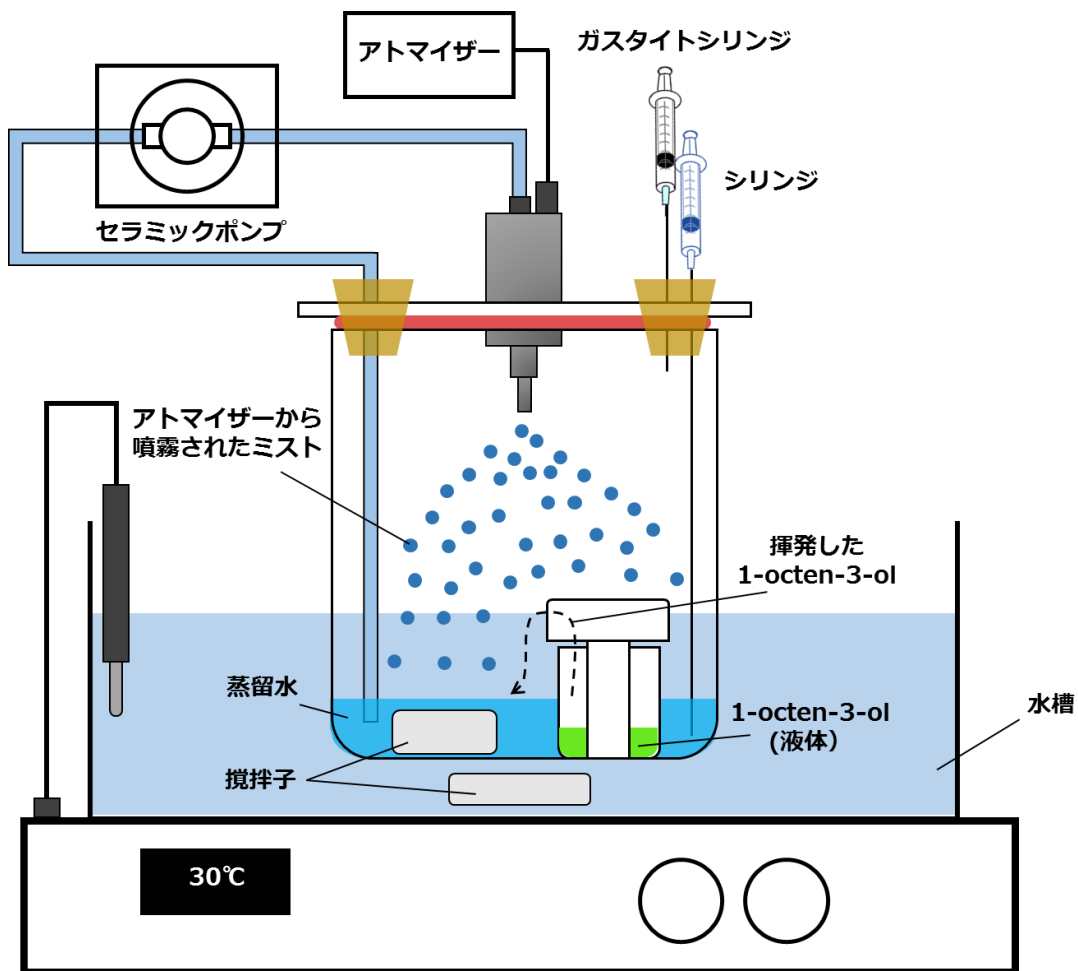


図 6.4 アトマイザーによる難水溶性有機化合物の溶解装置概略図



器具使用時の構成      下側液体入れ      上側フタ

図 6.5 小型ガラス容器写真

## 6.4 実験結果

### 6.4.1 溶解効率の比較

本手法の効果を評価するため、提案手法と気液暴露によって 1-octen-3-ol を溶解した場合の溶解濃度、溶解時間の比較を実施した。本実験では、液体の 1-octen-3-ol をビーカー内に設置し、ビーカー内に気体の 1-octen-3-ol が充満するまで 15–60 分静置した。静置後にガスタイトシリンジ (1002 LTN: Hamilton Company, USA) でビーカー内の気体を 1 mL 採取して GC 分析を行い、1-octen-3-ol が揮発していることを確認した後に実験を開始した。短時間での溶解効率について検討するため、実験開始後 1–5 分では 1 分毎にサンプリングを行い、その後は 10 分毎に 30 分までサンプリングを実施した。1 回のサンプリング毎に、シリンジを用いて約 200  $\mu$ l の溶解サンプルを GC バイアルに回収した。本研究の提案手法と気液暴露の場合の、それぞれの 1-octen-3-ol 溶解量の経時変化を図 6.6 に示す。

GC 分析の結果、提案手法では実験開始後 1 分から溶解した 1-octen-3-ol が検出され、30 分後まで濃度が増加し続けた。実験は室温 23°C で 3 回実施してデータのバラつきを検討した。提案手法では、実験開始 1 分後で  $39.0 \pm 6.9 \mu\text{M}$ 、30 分後に  $242.6 \pm 40.3 \mu\text{M}$  の 1-octen-3-ol が溶解した。一方気液暴露では、実験開始 5 分後まで 1-octen-3-ol は GC で検出されず、検出が確認された 10 分後以降も、実験終了までの濃度増加量は小さいことが確認された。この時室温は 26°C であった。以上より、本手法は気液暴露と比べて溶解量・溶解速度に明確な差があることを確認した。実験前後のビーカー内の気体 1-octen-3-ol 量を図 6.7 に示す。実験前は  $10.2 \pm 0.3 \text{ ppm}$ 、実験後は  $5.4 \pm 0.4 \text{ ppm}$  の気体 1-octen-3-ol が存在した。本実験では、気体の 1-octen-3-ol を充満させる際にビーカー内の蒸留水に 1-octen-3-ol が溶解してしまうことを防ぐため、ガスタイトシリンジで気体 1-octen-3-ol の存在を確認して後にシリンジを用いてビーカー内に蒸留水を挿入した。

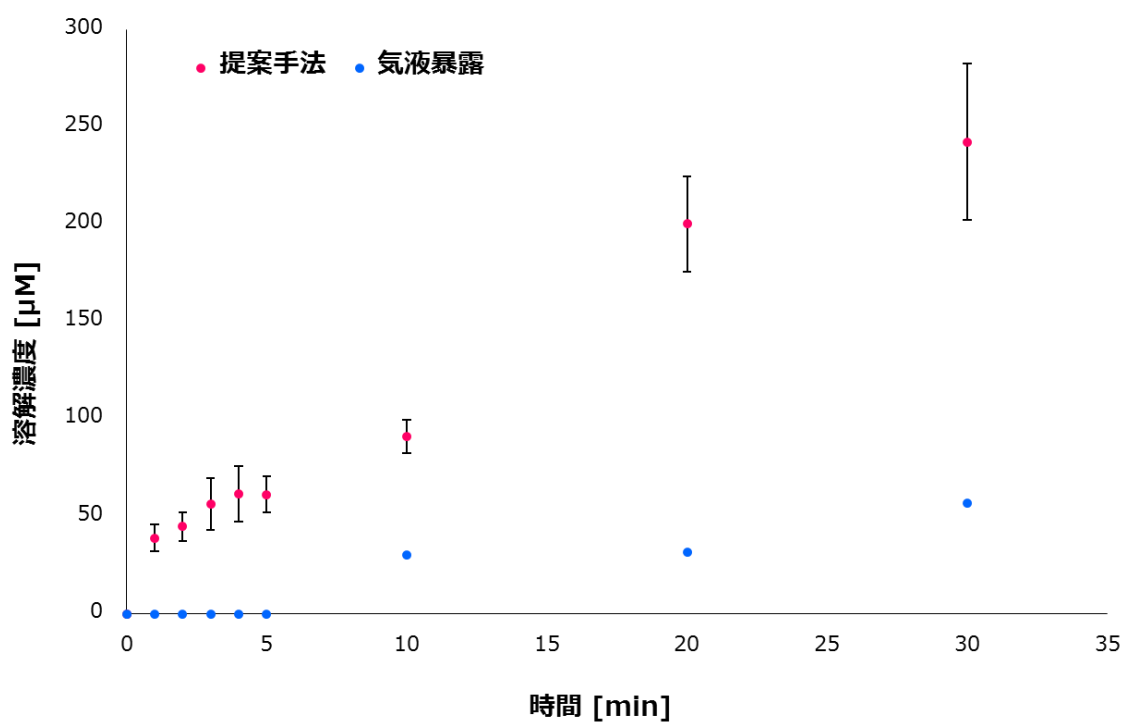


図 6.6 アトマイザーによる液体ミストを噴霧した場合（提案手法）と気液暴露の 1-octen-3-ol 溶解量の経時変化. Data represent means  $\pm$  SEM of amount of dissolution (N = 3 individual tests)

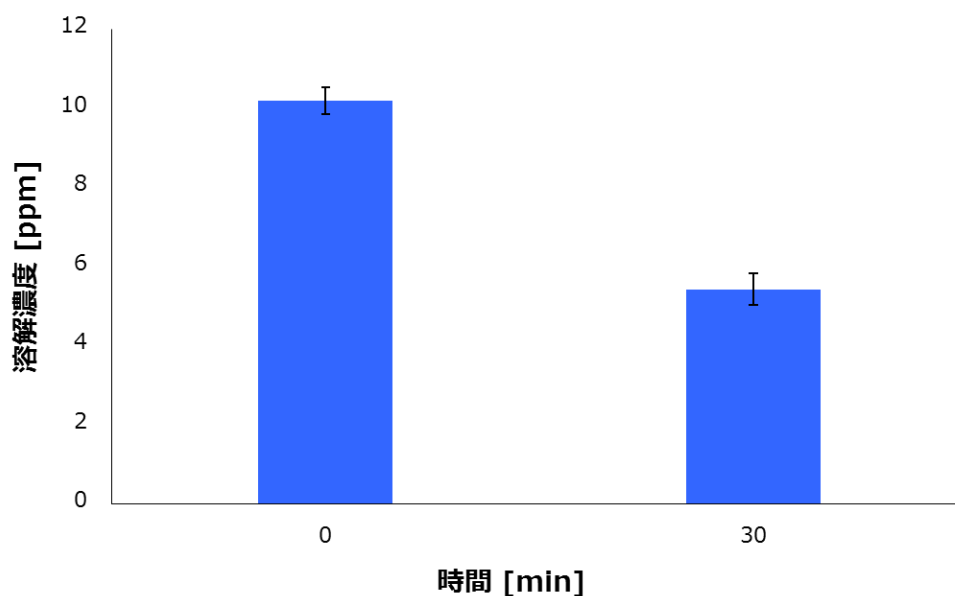


図 6.7 アトマイザーによる液体ミストを噴霧した場合（提案手法）の実験前後の 500 ml ビーカー内気体 1-octen-3-ol 量. Data represent means  $\pm$  SEM of amount of gas 1-octen-3-ol (N = 3 individual tests)

## 6.4.2 低濃度気体からの溶解能力検討

6.4.1 の実験では、ビーカー内に十分気体の 1-octen-3-ol が揮発した状態で実験を行った。この実験では手法の有効性を確認したが、実用を想定した場合にはより低濃度の気体が存在する条件での溶解能力を評価する必要がある。そこで、ビーカー内に揮発した 1-octen-3-ol 濃度を低下させた条件で溶解実験を実施した。本実験では、低濃度の気体 1-octen-3-ol を発生させるため、1  $\mu$ l の液体 1-octen-3-ol を 999  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、ボルテックスによって攪拌したものを小型ガラス容器に入れた。ガスタイトシリンジと GC による分析から、実験前のビーカー内の気体 1-octen-3-ol は 2.6 ppm であり (図 6.8)、6.4.1 の実験と比較して約 1/5 の濃度から実験を開始した。実験後には 0.9 ppm まで減少した。

提案手法を用いて溶解を行った結果、実験開始 4 分後から 7.6  $\mu$ M の 1-octen-3-ol が溶解したことを確認した。30 分後には 30.0  $\mu$ M まで濃度が増加した (図 6.9)。この結果より、本手法を用いることで、気体濃度が低下しても液中への溶解が可能であることが示された。また、1-octen-3-ol の検出が可能な Or13a 発現系統の検出限界は 0.3  $\mu$ M であるため、匂い物質の揮発量が減少した条件においても、センサ細胞の蛍光計測に適用可能な溶解サンプルが作成された。

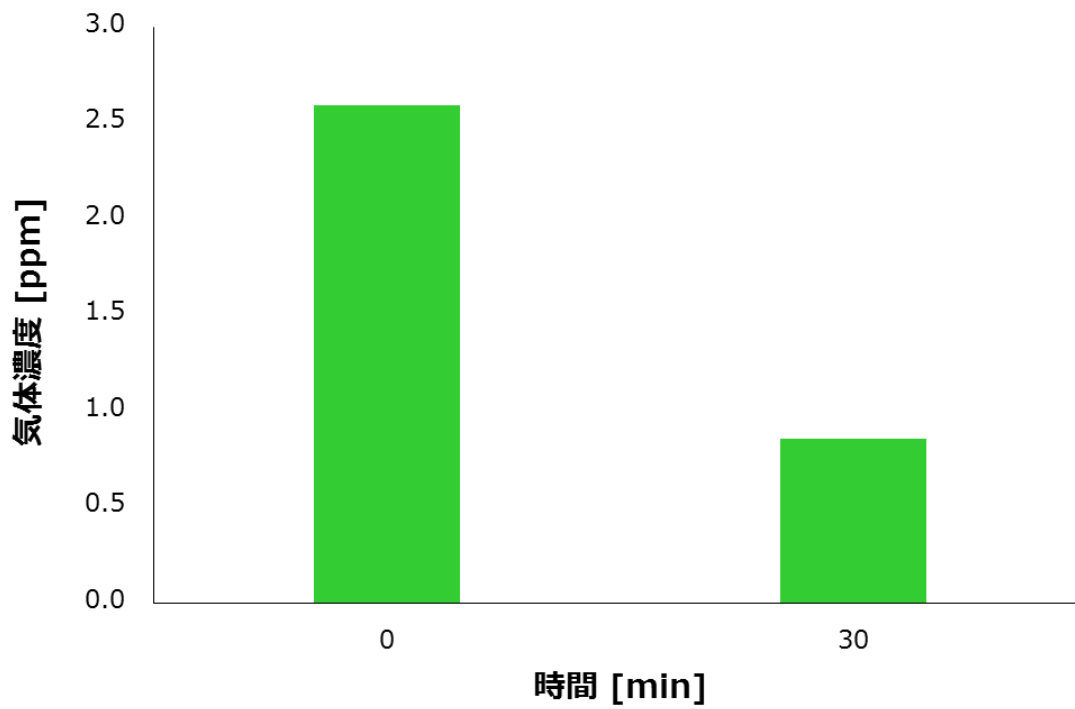


図 6.8 低濃度の液体 1-octen-3-ol を揮発させた場合の実験前後のビーカー内気体 1-octen-3-ol 量

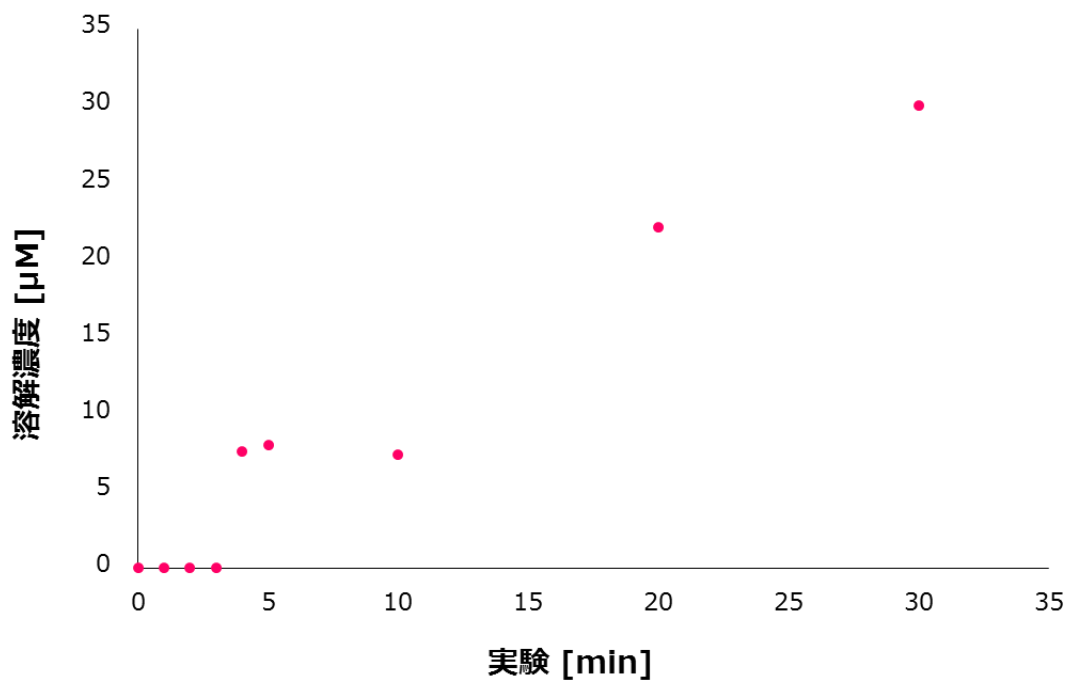


図 6.9 低濃度の気体 1-octen-3-ol から提案手法によって溶解させたときの 1-octen-3-ol 溶解量の経時変化

### 6.4.3 溶解サンプルを用いたセンサ細胞の応答測定

気体の 1-octen-3-ol を溶解したサンプルの、センサ細胞への適用性を検討するため、Or13a 発現細胞を用いた蛍光計測を実施した。先行研究の DMSO による匂い物質の溶解サンプルでは、蛍光計測の際は 1%以下の DMSO を含むアッセイバッファ溶液を灌流し、コントロール刺激にも用いる。一方本研究のアトマイザーによる溶解サンプルでは、DMSO を含まないアッセイバッファ溶液を灌流とコントロール刺激に使用した。匂い物質の濃度は 1, 3, 10, 30  $\mu\text{M}$  に調製して刺激した。匂い刺激は各 15 秒で行った。

DMSO を用いて溶解したサンプルと本研究の手法で溶解したサンプルを用いて、それぞれ濃度依存的蛍光強度変化を測定して比較を実施した。サンプル作成 6 日後の溶解サンプルと DMSO サンプルの典型的な濃度依存応答のグラフを図 6.10 に示す。図 6.10 より、溶解サンプルを用いた場合でも、低濃度から高濃度に至るまで DMSO サンプルと同様のドーズレスポンスカーブを描くことが確認された。次に、アトマイザーによる溶解から 11 日経過した溶解サンプルを用いて、Or13a 発現系統の濃度依存応答の平均値を測定した。サンプルの濃度調整は、11 日経過した溶解サンプルを GC によって濃度測定し、1-octen-3-ol の検量線に基づいてセンサ細胞に適切な濃度に調整した。11 日経過した溶解サンプルを用いた場合、Or13a 発現系統は濃度依存的蛍光強度変化を示し、DMSO による溶解サンプルの濃度依存的蛍光強度変化と比較してもその平均値に有意差は見られなかった (図 6.11)。

以上の結果から、本手法によって気体の匂い物質を溶解したサンプルは、センサ細胞に対して異常な影響を与えず、過去に実績のある DMSO サンプルと同程度の濃度依存的蛍光強度変化を取得できることを確認した。

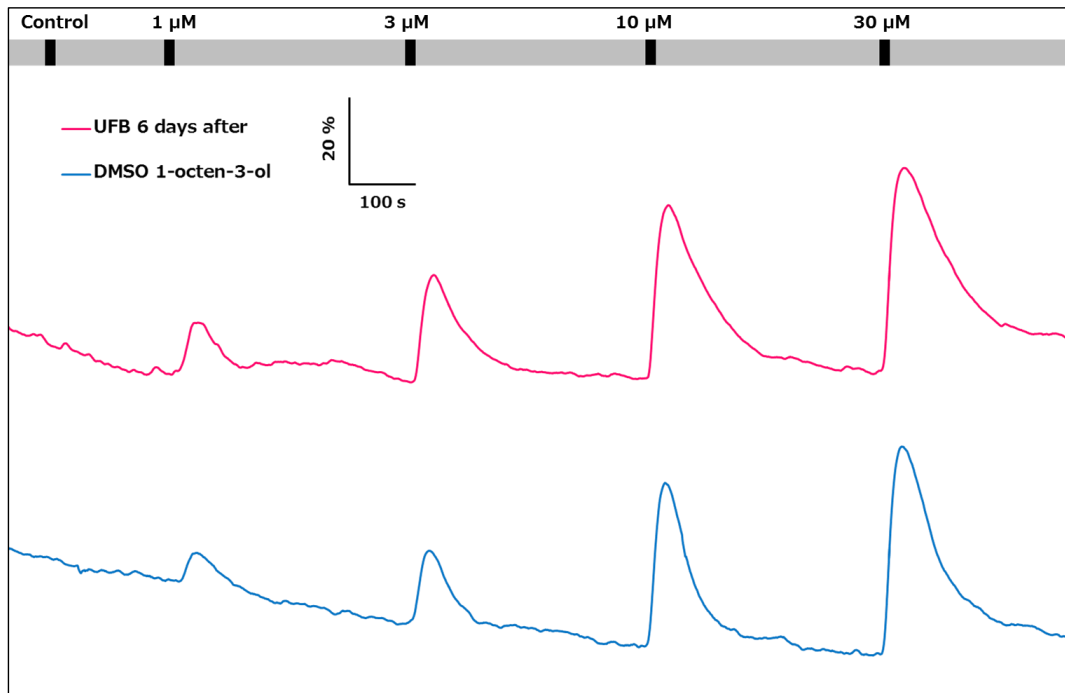


図 6.10 アトマイザーによる溶解サンプル（6 日後）と DMSO 溶解サンプルの典型的な濃度依存応答グラフ

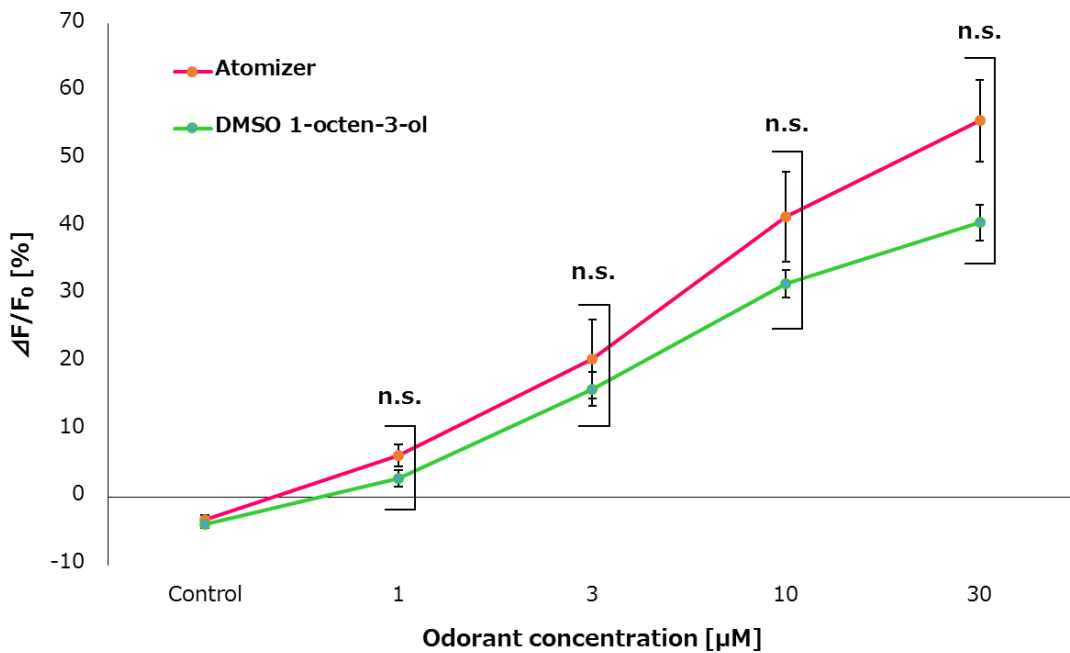


図 6.11 アトマイザーによる溶解サンプル（11 日後）を用いた Or13a 発現系統の濃度依存的蛍光強度変化と DMSO による溶解サンプルの濃度依存的蛍光強度変化の比較。Data represent means  $\pm$  SEM of fluorescence intensity changes of Or13a cells (N = 3 individual tests, Welch's t-test: n.s. = not significant).

#### 6.4.4 ナノサイトによる溶解サンプルの測定

ウルトラファインバブルは目視できないため、溶解サンプルに含まれていることを確認するためにはナノサイト (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)を用いた測定を行う必要がある。アトマイザーによって生成されたウルトラファインバブルが、サンプル内でどのような状態で存在しているかについて、溶解サンプル作成 11 日後のサンプルを用いて評価した。

ナノサイトによる測定の結果、アトマイザーによる噴霧を行った 11 日後のサンプルには、平均粒子径：172.6 nm,  $9.32 \times 10^8 \pm 0.15 \times 10^8$  particles/ml の粒子が存在することが示された。一方、気液暴露によるサンプルでは、 $1.49 \times 10^8 \pm 0.14 \times 10^8$  particles/ml の粒子が存在することが示された。アトマイザーによる噴霧を行ったサンプルと、気液暴露によるサンプルのナノサイトによる測定結果を図 6.12 に示す。また、ナノサイトによって撮影された、アトマイザーによる噴霧を行ったサンプルの粒子写真を図 6.13 に示す。

ナノサイトによる測定の課題として、ナノサイトは粒子サイズと分布を測定することが可能であるが、粒子の種類や由来を判定することはできない。よって、コントロールとの比較が重要となる。本研究では、気液暴露のサンプルをアトマイザーに対するコントロールとして評価した。2つのサンプル間で粒子数がおおよそ1桁異なっており、この差がウルトラファインバブルの存在を示唆していると考えられる。また、アトマイザーによる噴霧を行ったサンプルでは、粒子サイズ分布のピークが1つであるが、気液暴露のサンプルでは複数のピークが見られ、ウルトラファインバブル以外の粒子が存在していると想定される。

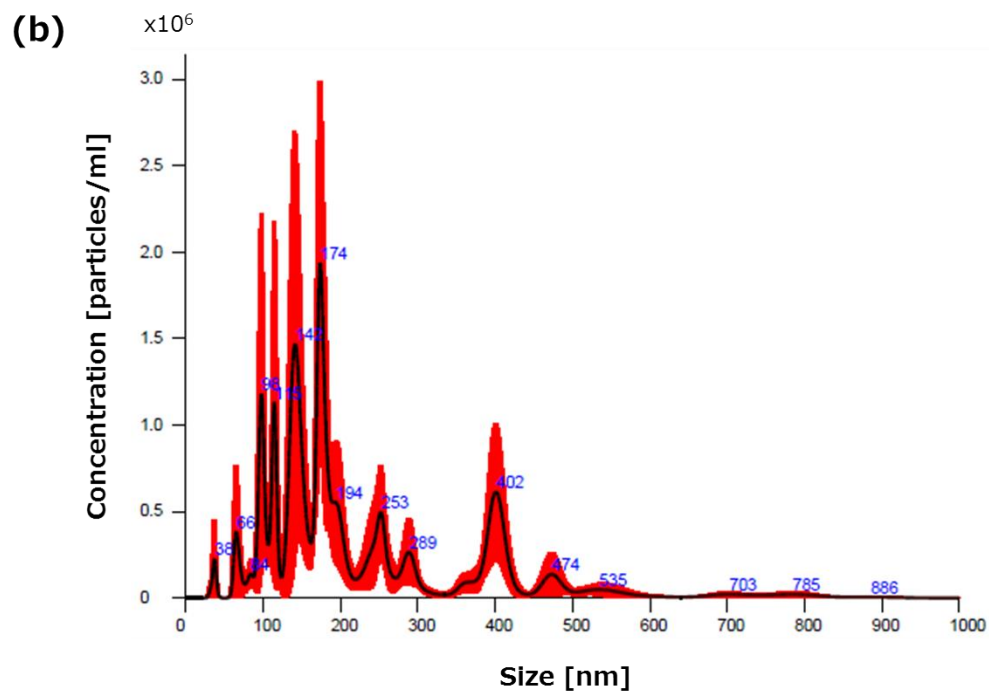
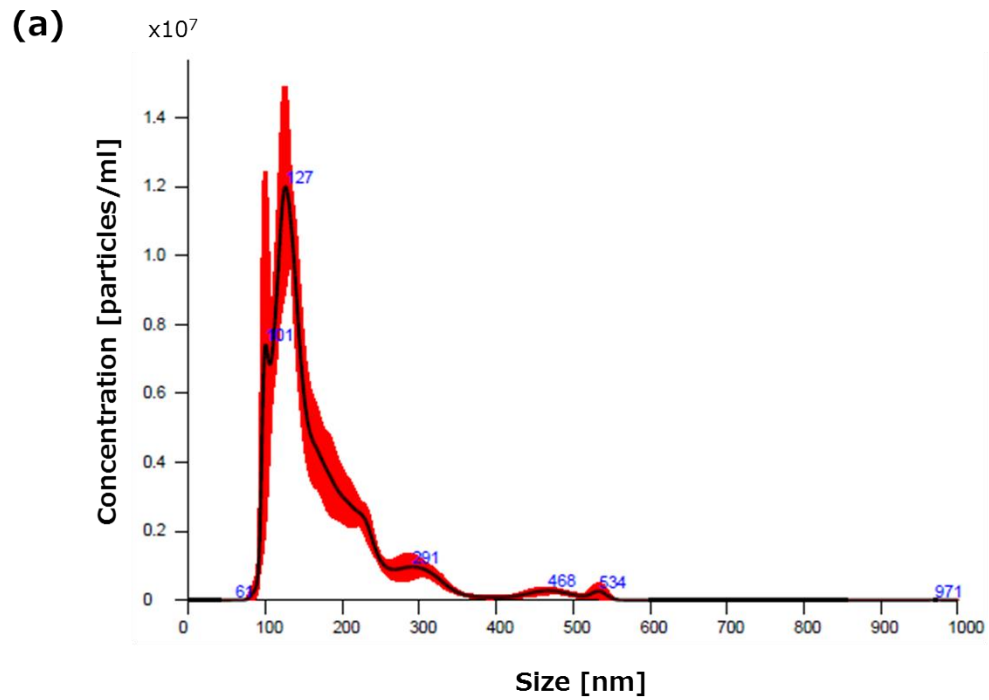


図 6.12 (a) ナノサイトによって測定したアトマイザー噴霧サンプルの 11 日後のサンプル内の粒子サイズと濃度分布. (b) 気液暴露サンプルの 11 日後のサンプル内の粒子サイズと濃度分布.



図 6.13 ナノサイトによって撮影された 11 日後の溶解サンプル内粒子の様子

## 6.5 溶解サンプルの匂い物質保持性

本研究の溶解手法によって液中に溶解した 1-octen-3-ol の、液中における保持期間の検討を実施した。2017 年 5 月にアトマイザーを 30 分噴霧することで作成した 1-octen-3-ol の溶解サンプルを、4°C に設定したクロマトチャンバーに保存し、2 か月後と 6 か月間後に GC 分析を行った (図 6.14)。その結果、溶解した 1-octen-3-ol は、2 か月後に約 13%、6 か月後に約 33%濃度が減少したが、半年後にも液中に保持されていることが確認された。

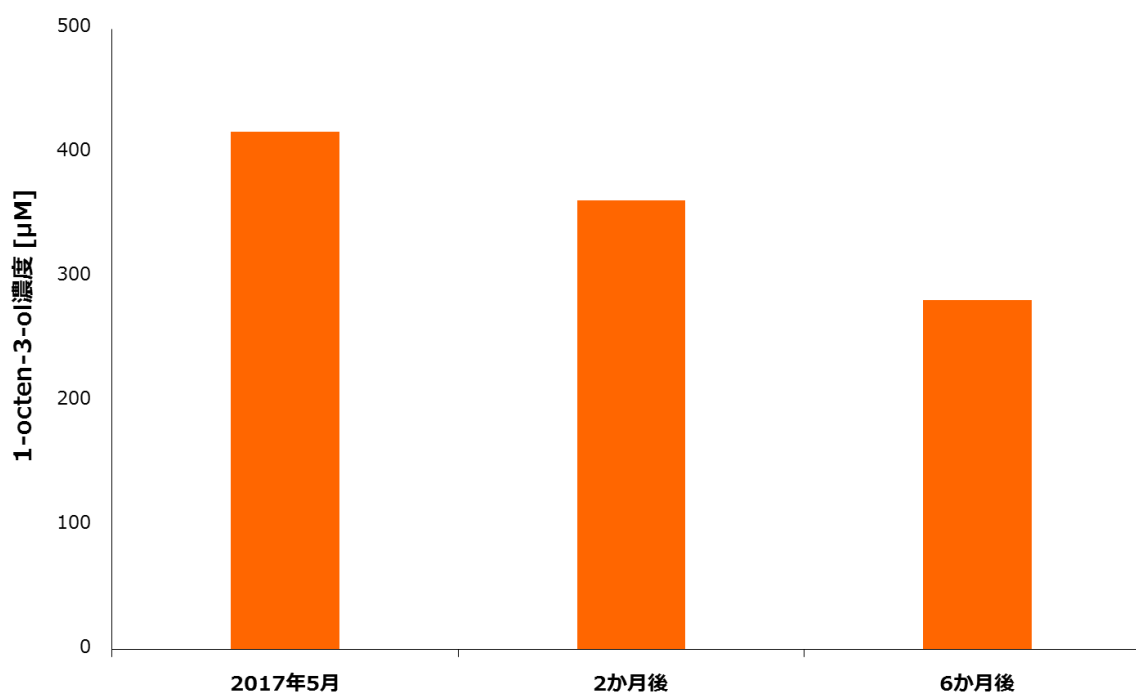


図 6.14 ウルトラファインバブルによって蒸留水中に溶解した 1-octen-3-ol の経時変化

## 6.6 昆虫嗅覚受容体とウルトラファインバブルの相互作用

ウルトラファインバブルによって溶解した匂い物質が、昆虫嗅覚受容体にどのように作用するかについて考察する。アトマイザーから噴霧された液体ミストが気化した 1-octen-3-ol を通過する際、ウルトラファインバブルの表面に 1-octen-3-ol がトラップされ、ビーカー底の蒸留水中に溶解する。ウルトラファインバブル表面の 1-octen-3-ol が液中に連続的に溶解し、昆虫嗅覚受容体に到達することでセンサ細胞の匂い応答が起こることが予想される (図 6.15)。ナノサイトによる測定から、ウルトラファインバブルは直径が 170 nm 程度あるため、バブルそのものが昆虫嗅覚受容体に直接作用するとは考えにくい。昆虫嗅覚受容体との反応、もしくは揮発によって溶存した 1-octen-3-ol が消費されても、ウルトラファインバブル表面から連続的に 1-octen-3-ol が溶解するため、時間経過によっても匂い物質の濃度は維持されることが想定される。

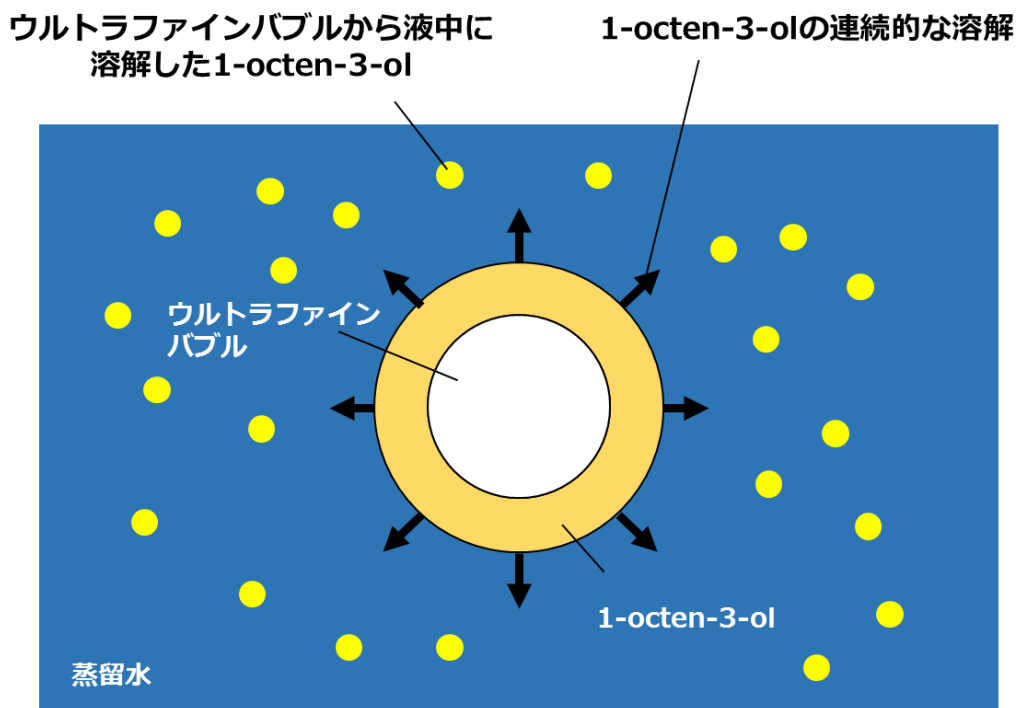


図 6.15 液中のウルトラファインバブルと 1-octen-3-ol の状態予想模式図

## 6.7 溶解サンプルを用いた電気計測

### 6.7.1 実験条件

最後に、本研究の溶解手法によって作成したサンプルを用いた電気計測結果について述べる。GC 測定と検量線を元に、溶解サンプルから 30  $\mu$ M 1-octen-3-ol の刺激液を作成し、OSFET 上に播種した Or13a 発現系統への刺激を行った。OSFET は NMOS を使用し、ペリスタ・バイオミニポンプによって、アッセイバッファ溶液 (DMSO を含まないコントロール)  $\Rightarrow$  30  $\mu$ M 1-octen-3-ol (溶解サンプル)  $\Rightarrow$  30  $\mu$ M 1-octen-3-ol (DMSO サンプル)  $\Rightarrow$  30  $\mu$ M 1-octen-3-ol (DMSO サンプル) の順に刺激を行った。流量は約 1500  $\mu$ l/min, 匂い刺激時間は各 25 秒で実施した。実験中は DMSO を含まないアッセイバッファ溶液を灌流した。

### 6.7.2 実験結果と考察

溶解サンプルを用いた電気計測の結果を図 6.16 に示す。図より、溶解サンプルで刺激した直後に急激にドレイン電流が減少し、その後増加した後、再度減少したことがわかる。DMSO によって溶解した 1-octen-3-ol で刺激した際には、2 回ともドレイン電流の減少はなく、第 4 章と同様にドレイン電流の増加が検出された。この原因として、マイクロバブルの表面は水中で負に帯電することが知られており [寺坂 et al., 2016], 匂い物質が到達した直後の電流値の減少は、溶解サンプルに含まれる表面が負に帯電したウルトラファインバブルの影響によるものと考えられる。今後は、アトマイザーによってウルトラファインバブルを含有する水サンプルを作成し、コントロール刺激にも溶解サンプルを用いることで溶解サンプルの OSFET への適用をより詳細に検討する必要がある。

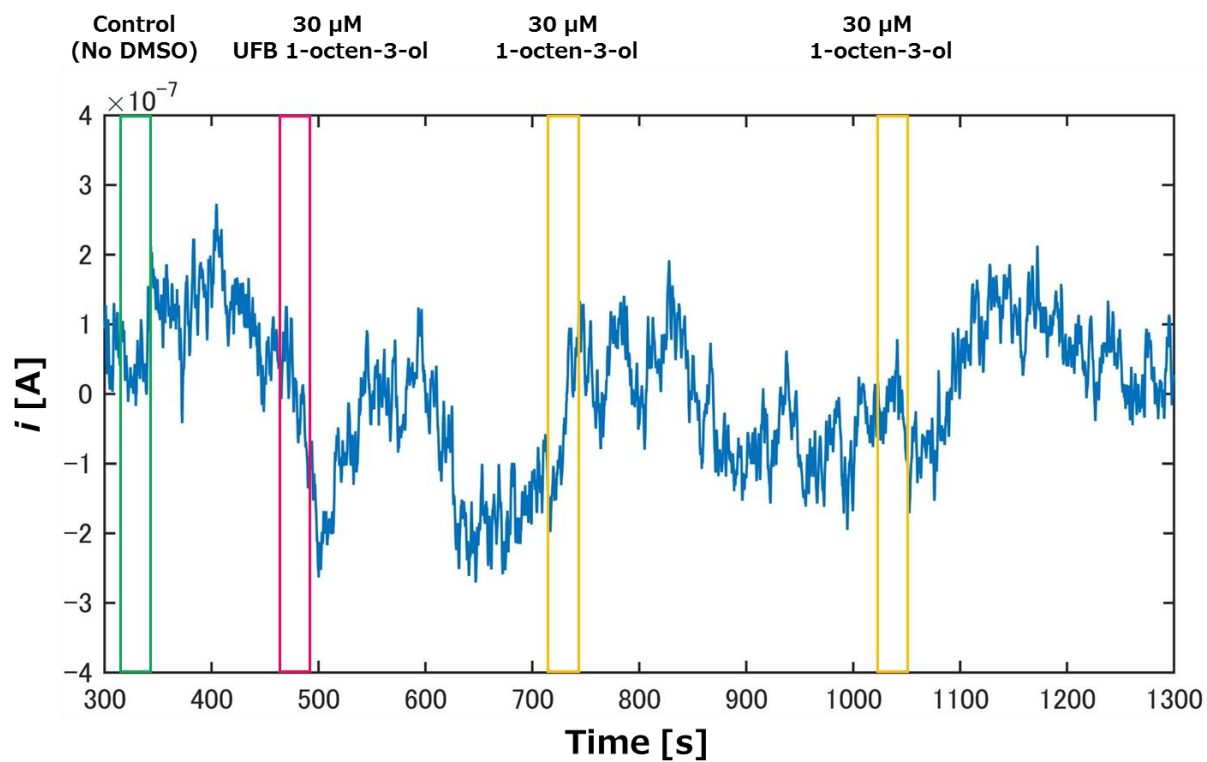


図 6.16 溶解技術によって作成した 1-octen-3-ol サンプルと DMSO 1-octen-3-ol を用いた電気計測結果.

## 6.8 まとめ

本章では、揮発した難水溶性有機化合物（匂い物質など）を高効率に液中へ溶解する手法の有効性検証に成功し、センサ細胞を用いた匂い物質の蛍光計測に適用できることを実証した。第1章の研究目的の中で、溶解技術の数値目標として1 ppmの気体からセンサ細胞に刺激可能な濃度まで溶解することを挙げた。実験の結果、2.6 ppmの気体 1-octen-3-ol から Or13a 発現系統によって検出可能な濃度 (7.6  $\mu$ M)まで、短時間 (4分) で溶解可能であることが示された。本研究では1 ppm以下の濃度からの溶解は検討していないが、本研究の結果より、今後1 ppm以下の気体 1-octen-3-ol から溶解させることは十分可能であると考えられる。

溶解サンプルの電気計測への適用については、負に帯電したウルトラファインバブル表面が、ドレイン電流の減少を引き起こすことが示唆された。今後は、ウルトラファインバブルのみを含有するコントロール溶液を作成して比較を行うことで、検出される応答をより詳細に検討する必要がある。

本章では、提案手法が気中の匂い物質を検出可能な匂いバイオセンサの基盤技術となり得ることを示した。本手法を 1-octen-3-ol 以外の難水溶性有機化合物の溶解や食品や人の皮膚など実サンプルを匂い源とした条件への適用することで、手法の適用範囲を拡大することが考えられる。また、吸引ファンと組み合わせて気中の匂い物質を高効率に捕集・濃縮する技術への展開が期待される。

## 第7章：結論

### 7.1 本研究のまとめ

本研究は、遺伝子工学的に昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 昆虫培養細胞，すなわち「センサ細胞」の匂い応答を FET によって電氣的に検出するインターフェースの設計と応答検出，そしてウルトラファインバブルを用いた難水溶性有機化合物の溶解技術の確立を行うことで，これまでに構築されていなかった高機能バイオハイブリッド匂いセンサシステムを提案したものである。

第1章ではバイオエコノミーやスマートセルインダストリーなど，世界のバイオテクノロジーの潮流について言及し，生物の中でも特に昆虫の機能を引き出した昆虫テクノロジーへの期待について述べた．昆虫テクノロジーの利用によって，これまで困難であった匂いの検出が可能になり，昆虫嗅覚受容体を発現させた昆虫培養細胞である「センサ細胞」を用いて，匂い物質を高感度かつ選択的に検出する匂いセンサ素子が構築された．一方で，現在行われているセンサ細胞の計測は蛍光計測であり，昆虫嗅覚受容体の持つ性能を十分に生かしきれておらず，効率的な応答検出インターフェースの設計が必要となる．また，匂い物質は通常環境中に揮発した状態で漂っているため，匂いセンサの実用化においては，気中の匂い物質の検出技術が求められる．

そこで本研究では，以下の2点を研究目的とした．1点目は，遺伝子工学的に昆虫嗅覚受容体を発現した Sf21 細胞，すなわち「センサ細胞」の匂い応答を，FET を用いて電氣的に検出するインターフェースを構築し，応答検出を達成することである．2点目は，ウルトラファインバブルによる難水溶性有機化合物の溶解手法の有効性を検証することで，気中の匂い物質が溶解可能な技術を構築することである．これらを達成することで，昆虫の嗅覚機能と工学技術を融合した高機能バイオハイブリッド匂いセンサシステムを構築することが可能となる．

第2章では、匂い検出素子となるセンサ細胞の応答原理・特徴、蛍光計測方法についてまとめ、本研究に用いる **BmOR3** 発現系統と **Or13a** 発現系統の典型的な濃度依存的蛍光強度変化を取得し、電気信号による匂い応答検出と気中の匂い物質の溶解技術評価に向けた予備実験を実施した。

第3章では、センサ細胞の匂い応答を電氣的に検出可能なデバイス開発と測定系の構築について記載した。既存の汎用バイオセンシングシステムである **BCT** を用いた実験では、匂い応答の検出に至らなかった。そこで本研究では、以下の条件を満たすセンサ細胞の匂い応答検出に特化したデバイスの設計を行った。

- (1) センサ細胞の微小な匂い応答を電氣的に検出できること。
- (2) センサ細胞を検出部に播種しやすく、細胞とデバイスの電氣的結合状態を検討できる構造であること。

(1)については、センサ細胞に使用される **Sf21** 細胞はアクションポテンシャルを発生せず、昆虫嗅覚受容体の微小な信号を検出する必要があるため、感度の高いドレイン電流を直接検出する電流検出型バイオセンサの設計を実施した。(2)については、最も単純な単一の **FET** かつ、自然接着によっても確実に細胞が播種できる電極サイズのデバイス設計を行った。これにより、電子顕微鏡によるセンサ細胞-デバイス界面を観察可能にし、複数のセンサ細胞からの応答検出が期待できる。

また、細胞からの応答を、電気デバイスを用いて検出するシステムにおいては、デバイス表面の生体適合性が重要となる。しかし、商用の **CMOS** ファウンドリベースのデバイスの場合、電極材料は細胞毒性の報告されるアルミニウムに限定される。先行研究では、電極表面に生体適合性のある材料をコーティングしているが、このようなプロセスは時間的・費用的コストが発生する。本研究では、デバイス設計の信頼性向上とコスト低減のため、**CMOS** ファウンドリのアルミニウムベース材料の電極を使用

している。そこで、アルミニウムベース材料上（アルミニウム,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ）で、センサ細胞がセンサ素子として機能するかについて評価を実施した。結果として、アルミニウムベース材料上に播種されたセンサ細胞の濃度依存応答カーブ、蛍光強度変化量、細胞応答割合はカバーガラス上と同程度であることが確認された。一方で、HEK293T 細胞はアルミニウム上では成長が阻害されることが示唆された。本結果より、Sf21 細胞に基づくセンサ細胞は、商用の CMOS ファウンドリを直接適用することが可能となり、高信頼性かつ低コストな匂いセンサシステムの構築に寄与することが期待される。

第4章では、第3章で設計したデバイスを用いた、センサ細胞の匂い応答の電気信号による検出結果について記載した。実験の結果、BmOR3 発現系統と Or13a 発現系統からの匂い応答を電氣的に検出し、電気信号による検出インターフェースの構築に成功した。電気信号によるセンサ細胞の匂い選択性は、過去の蛍光計測による結果と一致した。また、ノイズを低減する測定系を構築し、電気計測によって蛍光計測を超える感度を得られることが示唆された。応答検出の際、電極自体が匂い物質に非選択的に応答して偽応答を発生するという問題が確認されたため、電極全体を細胞で被覆する測定により、ノイズを低減しつつセンサ細胞の応答を検出できることが示された。以上の結果より、センサ細胞と伸長ゲート型 FET を 1 つの匂いセンサシステムとしてとらえた、OSFET (Odor-Sensitive Field Effect Transistor) という新しい概念を提唱した。また、本研究で設計したデバイスの測定結果を反映することで、当初は応答検出に至らなかった BCT によって匂い応答の検出が可能となった

第5章では、センサ細胞からの電気信号検出において重要なパラメータである、細胞-デバイス界面の観察・分析結果について論じた。接着状態の Sf21 細胞の電子顕微鏡写真はこれまでほとんど報告がなかったが、本研究の SEM による鳥瞰的観察により、電極上にセンサ細胞が形状変化を生じずに接着していることが確認された。また、

クロスセクションポリッシャを用いることで、細胞-デバイス界面の微小構造を維持したまま断面観察試験片を作成し、その観察に初めて成功した。SEM 写真の解析より、Sf21 細胞と Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極界面の距離 (cleft)は、 $10.3 \pm 0.5$  nm であることが確認された。この結果は、先行研究で報告された各種細胞の cleft 距離より明確に短いものであり、Sf21 細胞は他の細胞で報告されている focal adhesion とは異なるメカニズムで電極上に接着していることが示唆された。電気信号による応答検出では、cleft 距離が短いことが効率的な信号検出に望ましい。センサ細胞は電気デバイスによる検出に適した細胞であり、センサ細胞とデバイスの電氣的モデルは、キャパシティブカップリングであることが示唆された。この結果は、センサ細胞の応答検出の場合、デバイスはイオン感応膜を備えた ISFET ではなく、金属電極によっても応答検出が可能であることを示唆している。

第 6 章では、ウルトラファインバブルを用いた気中の難水溶性有機化合物の溶解技術の構築について記載した。超音波ノズルから噴射したウルトラファインバブルを含有する液体ミストによって、難水溶性の匂い物質である 1-octen-3-ol を、装置の動作後 1 分で GC による検出が可能な濃度まで蒸留水中に溶解できることが示された。一方で、気液暴露による溶解では短時間で液中に溶解することは困難であることが示され、本手法の有効性を確認した。ウルトラファインバブルによる溶解サンプルを用いた Or13a 発現系統の蛍光強度変化量は、DMSO によって溶解した場合と同程度であることが確認された。また、ウルトラファインバブルによって可溶化された匂い物質は、サンプル作成から 6 か月経過した後にも液中に保持されていた。今後は、さらに低濃度の気体からの溶解が期待できる。また、食品や人の皮膚など実サンプルを用いた実験や、ファンと組み合わせて高効率に匂い物質を捕集する技術へと展開することが想定される。

## 7.2 本研究の貢献

本研究は、匂いセンサ開発における諸問題の中でも極めて重要な位置を占める、多様な匂いターゲットを高感度かつ選択的に検出する可能な匂いセンサの開発と、気中の匂い物質の溶解技術の2点を課題として取り組んだ。1点目の解決策として、遺伝子工学的に昆虫嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞の匂い応答を、FETによって電気的に検出するバイオハイブリッド匂いセンサを提案している。また、昆虫嗅覚受容体利用センサは、嗅覚受容体が通常は液中のみで機能するため、気中の匂い物質検出に適用可能な技術が必要となる。そこで、ウルトラファインバブルを含む液体ミストを噴霧することによって、気中の難水溶性有機化合物を高効率で溶解する手法を提案している。

本研究では、伸長ゲート型電極を持つ FET を設計して電気信号検出インターフェースを構築し、匂い物質をポンプで灌流することでセンサ細胞を刺激して、構築した匂いセンサの感度と選択性を実証した。また、センサ細胞-デバイス界面の観察・分析により、センサ細胞とデバイスの適切な電気的結合を実験的に示し、それを裏付ける測定結果を得た。合わせて、センサ細胞の応答検出モデルの考察を行った。難水溶性有機化合物の溶解技術については、ウルトラファインバブルを含む液体ミストを噴霧することによって、揮発した難水溶性の有機化合物である 1-octen-3-ol を短時間かつ高濃度に蒸留水中へ溶解できることを確認し、手法の有効性を実証した。本研究は、工学、生物学、化学を含む、生体材料を利用したバイオハイブリット型匂いセンサの研究に貢献した。さらに、学術的観点のみならず、疾病に関わる匂い物質やセキュリティ分野における危険物質の検出、食品や飲料水に含まれるカビ臭の検出など幅広い産業分野への応用が想定される。本研究は、昆虫の持つ機能を引き出して工学技術と融合することで、高機能バイオハイブリッド匂いセンサシステムの構築に貢献した。

## Appendix

### A1. 気体 1-octen-3-ol の ppm 単位への変換

本研究では、ガスタイトシリンジによって取得したビーカー内の気体 1-octen-3-ol 濃度は ppm 単位に変換して記載した。以下に、気体の 1-octen-3-ol 濃度を GC area から ppm 単位に変換する計算過程を示す。

1) 本研究の検量線作成および溶液分析時には、ガスタイトシリンジによって 1  $\mu$ L の気体を GC-MS にインジェクションしていたので、横軸 x mM は、

$$x \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \times 1 \mu\text{L} = x \text{ nmol}$$

2) 1-octen-3-ol の検量線が  $y = 36240x$  と求められた。例えば、GC area が 39617 の時、検量線より、

$$x = \frac{39617}{36240} = 1.09 \text{ nmol} \quad (1 \text{ で nmol を単位を変換したため})$$

3) 気体は標準状態 (0°C, 1 気圧) で 22.4 L/mol であるため、1.09 nmol の気体 1-octen-3-ol (気体) は、

$$22.4 \frac{\text{L}}{\text{mol}} \times 1.09 \text{ nmol} = 24.4 \text{ nL}$$

4) 24.4 nL は 1 mL の気体をインジェクションした時に含まれる体積であるため、

$$24.4 \frac{\text{nL}}{\text{mL}} = 24.4 \text{ ppm}$$

上記の計算では、温度の前提条件が 0°C になっているため、実際は  $PV = nRT$  に温度を代入して 22.4 L/mol にかわる値を求める必要がある。計算例を以下に示す。

$$PV = nRT$$

$$nR = \frac{PV}{T}$$

nR=一定より,

$$\frac{P_1V_1}{T_1} = \frac{P_2V_2}{T_2}$$

圧力一定より,

$$V_2 = \frac{PT_2}{T_1}$$

30°C のモル体積 L/mol は,

$$22.4 \text{ L/mol} \times \frac{(273 + 30)}{273} = 24.9 \text{ L/mol}$$

気体 (30°C, 1 気圧) のとき 24.9 L/mol であるため, 1.09 nmol の気体 1-octen-3-ol は,

$$24.9 \frac{\text{L}}{\text{mol}} \times 1.09 \text{ nmol} = 27.1 \text{ nL}$$

よって, 27.1 ppm と求められる.

## A2. Abbreviations

BCT: BioCMOS BioCMOS テスター

CMOS: Complementary metal-oxide-semiconductor 相補型金属酸化膜半導体

CP: Cross Section Polisher クロスセクションポリッシャ

DMEM: Dubecco's Modified Eagle's Medium ダルベッコ改変イーグル培地

DMSO: Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド

HEPES: N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)

ISFET: Ion-Sensitive Field Effect Transistor イオン感応性電界効果トランジスタ

MOSFET: metal-oxide-semiconductor field-effect transistor 金属酸化物半導体電界効果トランジスタ

OBP: Odorant binding protein 匂い結合タンパク質

PBS: Phosphate-buffered saline リン酸緩衝生理食塩水

SEM: Scanning electron microscopy 走査型電子顕微鏡

TEM: Transmission electron microscopy 透過型電子顕微鏡

UFB: Ultrafine bubble ウルトラファインバブル

### A3. Copyright permissions

本研究に各論文誌から引用した図の Copyright permissions について, Copyright Clearance Center's RightsLink® service を通して取得したものを以下に記載する.

1. License Number: 4261870273769  
License date: Jan 04, 2018  
Licensed Content Publisher: Springer Nature  
Licensed Content Publication: Journal of Chemical Ecology  
Licensed Content Title: Cell-Based Odorant Sensor Array for Odor Discrimination Based on Insect Odorant Receptors  
Licensed Content Author: Maneerat Termtanasombat, Hidefumi Mitsuno, Nobuo Misawa, Shinya Yamahira, Takeshi Sakurai, Satoshi Yamaguchi, Teruyuki Nagamune, Ryohei Kanzaki  
Type of Use: Thesis/Dissertation  
⇒図 1.3 (b)
2. License Number: 4261871419113  
License date: Jan 04, 2018  
Licensed Content Publisher: Springer Nature  
Licensed Content Publication: Applied Physics A: Materials Science & Processing  
Licensed Content Title: Field-effect transistor with recombinant potassium channels: fast and slow response by electrical and chemical interactions  
Licensed Content Author: M. Brittinger, P. Fromherz  
Type of Use: Thesis/Dissertation  
⇒図 1.5
3. License Number: 4262840487122  
License date: Jan 05, 2018  
Licensed Content Publisher: The Royal Society  
Licensed Content Publication: Interface  
Licensed Content Title: Transmission electron microscopy study of the cell-sensor interface  
Licensed Content Author: Günter Wrobel, Matthias Höller, Sven Ingebrandt, Sabine Dieluweit, Frank Sommerhage, Hans Peter Bochem, Andreas Offenhäusser

Type of Use: Thesis/Dissertation

⇒図 5.2 (a), (b)

4. License Number: 4262840063319

License date: Jan 05, 2018

Licensed Content Publisher: The Royal Society

Licensed Content Publication: Interface

Licensed Content Title: Spine-shaped gold protrusions improve the adherence and electrical coupling of neurons with the surface of micro-electronic devices

Licensed Content Author: Aviad Hai, Ada Dormann, Joseph Shappir, Shlomo Yitzchaik, Carmen Bartic, Gustaaf Borghs, J. P. M. Langedijk, Micha E. Spira

Type of Use: Thesis/Dissertation

⇒図 5.2 (b)

5. License Number: 4266851454194

License date: Jan 13, 2018

Licensed Content Publisher: Elsevier

Licensed Content Publication: Biosensors and Bioelectronics

Licensed Content Title: Biochemical gas sensor (bio-sniffer) for ultrahigh-sensitive gaseous formaldehyde monitoring

Licensed Content Author: Hiroyuki Kudo, Yuki Suzuki, Tomoko Gessei, Daishi Takahashi, Takahiro Arakawa, Kohji Mitsubayashi

Type of Use: Thesis/Dissertation

⇒表 6.1

また、図 1.3 (a)の *PNAS* より引用した図は、Requesting Permission における以下の記載に基づき使用した。

Anyone may, without requesting permission, use original figures or tables published in *PNAS* for noncommercial and educational use (i.e., in a review article, in a book that is not for sale), provided that the full journal reference is cited and, for articles published in volumes 90–105 (1993–2008), "Copyright (copyright year) National Academy of Sciences." Commercial reuse of figures and tables (i.e., in promotional materials, in a textbook for sale) requires permission from *PNAS*.

<http://www.pnas.org/site/aboutpnas/rightperm.xhtml>

## 参考文献

- 1 OECD, “The Bioeconomy to 2030: designing a policy agenda.” Internet: <https://www.oecd.org/futures/long-termtechnologicalsocietalchallenges/42837897.pdf>, 2009 [Oct. 14, 2017].
- 2 日本バイオ産業人会議, “進化を続けるバイオ産業の社会貢献ビジョン～新たな基幹産業の創出と地球規模の課題解決に向けて～.” Internet: [http://www.jba.or.jp/jabex/pdf/2016/JABEX\\_vision\(160509\).pdf](http://www.jba.or.jp/jabex/pdf/2016/JABEX_vision(160509).pdf), March, 2016 [Oct. 14, 2017].
- 3 経済産業省商務情報政策局, “スマートセルインダストリー（生物による物質生産）の可能性.” Internet: [http://www.meti.go.jp/committee/sankoushin/shojo/bio/pdf/003\\_08\\_00.pdf](http://www.meti.go.jp/committee/sankoushin/shojo/bio/pdf/003_08_00.pdf), March, 2016 [Oct. 14, 2017].
- 4 光野秀文, 櫻井健志, 照月大悟, 安藤規泰, 並木重宏, 加沢知毅, 神崎亮平, “テクノロジー・ロードマップ 2018–2027 <全産業編>.” 第6章 昆虫テクノロジー, 日経 BP 社, 2017.
- 5 リサーチステーション合同会社, “ガスセンサの世界市場：技術・ガスタイプ別, 用途別, 2023年予測.” Internet: [http://researchstation.jp/report/MAM/7/Gas\\_Sensor\\_2023\\_MAM702.html](http://researchstation.jp/report/MAM/7/Gas_Sensor_2023_MAM702.html), 2017年8月 [Jan, 24, 2018].
- 6 K. Arshak, E. Moore, G.M. Lyons, J. Harris, and S. Clifford, “A review of gas sensors employed in electronic nose applications,” *Sensor Review*, vol. 24, pp. 181–198, 2004.
- 7 K. G. Furton and L. J. Myers, “The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives,” *Talanta*, vol. 54, pp. 487–500, 2001.
- 8 光野秀文, 櫻井健志, 岩松琢磨, 神崎亮平, “培養細胞の蛍光計測を応用した匂いセンサ”, in *感覚デバイス開発*, NTS, 2015, pp. 174–181.
- 9 光野秀文, 櫻井健志, 神崎亮平, “昆虫に学ぶ匂いバイオセンサ.” *昆虫科学読本*, 東海大学出版部, 第18章, pp. 259–277, 2015.
- 10 H. Mitsuno, T. Sakurai, S. Namiki, H. Mitsuhashi, and R. Kanzaki, “Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 65, pp. 287–294, 2015.
- 11 E. A. Hallem, A. N. Fox, L. J. Zwiebel, and J. R. Carlson, “Olfaction: mosquito receptor for human-sweat odorant,” *Nature*, vol. 427, pp. 212–213, 2004.
- 12 A. F. Carey, G. Wang, C-Y. Su, L. J. Zwiebel, and J. R. Carlson, “Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*,” *Nature*, vol. 464, pp. 66–71, 2010
- 13 E. A. Hallem and J. R. Carlson, “Coding of odors by a receptor repertoire,” *Cell*, vol. 125, pp. 143–160, 2006.

- 14 B. Marshall, C. G. Warr and M. de Bruyne, "Detection of volatile indicators of illicit substances by the olfactory receptors of *Drosophila melanogaster*," *Chemical Senses*, vol. 35, pp. 613–625, 2010.
- 15 M. C. Stensmyr, H. K.M. Dweck, A. Farhan, I. Ibba, A. Strutz, L. Mukunda, J. Linz, V. Grabe, K. Steck, S. Lavista-Llanos, D. Wicher, S. Sachse, M. Knaden, P. G. Becher, Y. Seki, and B. S. Hansson, "A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*," *Cell*, vol. 151, pp. 1345–1357, 2012.
- 16 J. J. Bromenshenk, C. B. Henderson, and G. C. Smith, "Biological Systems, paper II Appendix S," in *Alternatives for landmine detection*, RAND Corporation, MR1608, pp. 273–283, 2003.
- 17 D. M. Olson, G. C. Rains, T. Meiners, K. Takasu, M. Tertuliano, J. H. Tumlinson, F. L. Wäckers, and W. J. Lewis "Parasitic wasps learn and report diverse chemicals with unique conditionable behaviors," *Chemical Senses*, vol. 28, pp. 545–549, 2003.
- 18 K. C. Daly, L. A. Carrell, and E. Mwilaria, "Detection versus perception: physiological and behavioral analysis of olfactory sensitivity in the moth (*Manduca sexta*)," *Behavioral Neuroscience*, vol. 121, pp. 794–807, 2007.
- 19 S. Schütz, B. Weissbecker, H. E. Hummel, K-H. Apel, H. Schmitz, and H. Bleckmann, "Insect antenna as a smoke detector," *Nature*, vol. 398, pp. 298–299, 1999.
- 20 B. Kalinová, H. Podskalská, J. Růžička, and M. Hoskovec, "Irresistible bouquet of death-how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: *Nicrophorus*) attracted by carcasses," *Naturwissenschaften*, vol. 96, pp. 889–899, 2009.
- 21 V. Harraca, R. Ignell, C. Löfstedt, and C. Ryne, "Characterization of the antennal olfactory system of the bed bug (*Cimex lectularius*)," *Chemical Senses*, vol. 35, pp. 195–204, 2010.
- 22 K. Sato, M. Pellegrino, T. Nakagawa, T. Nakagawa, L. B. Vosshall, and K. Touhara, "Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels," *Nature*, vol. 452, pp. 1002–1006, 2008.
- 23 N. Misawa, H. Mitsuno, R. Kanzaki, and S. Takeuchi, "Highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 15340–15344, 2010.
- 24 J. L. Vaughn, R. H. Goodwin, G. J. Tompkins, and P. McCawley, "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae)," *In Vitro*, vol. 13, pp. 213–217, 1977.
- 25 M. Termtanasombat, H. Mitsuno, N. Misawa, S. Yamahira, T. Sakurai, S. Yamaguchi, T. Nagamune, and R. Kanzaki, "Cell-Based Odorant Sensor Array for Odor Discrimination Based on Insect Odorant Receptors," *Journal of Chemical Ecology*, vol. 42, pp. 716–724, 2016.
- 26 P. Bergveld, "Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 17, pp. 70–71, 1970.

- 27 J. M. Rothberg, W. Hinz, T. M. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey, J. H. Leamon, K. Johnson, M. J. Milgrew, M. Edwards, J. Hoon, J. F. Simons, D. Marran, J. W. Myers, J. F. Davidson, A. Branting, J. R. Nobile, B. P. Puc, D. Light, T. A. Clark, M. Huber, J. T. Branciforte, I. B. Stoner, S. E. Cawley, M. Lyons, Y. Fu, N. Homer, M. Sedova, X. Miao, B. Reed, J. Sabina, E. Feierstein, M. Schorn, M. Alanjary, E. Dimalanta, D. Dressman, R. Kasinskas, T. Sokolsky, J. A. Fidanza, E. Namsaraev, K. J. McKernan, A. Williams, G. T. Roth, and J. Bustillo, “An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing,” *Nature*, vol. 475, pp. 348–352, 2010.
- 28 P. Fromherz, A. Offenhausser, T. Vetter, and J. Weis, “A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor,” *Science*, vol. 252, pp. 1290–1293, 1991.
- 29 M. Voelker and P. Fromherz, “Signal transmission from individual mammalian nerve cell to field-effect transistor,” *Small*, vol. 1, pp. 206–210, 2005.
- 30 M. Brittinger and P. Fromherz, “Field-effect transistor with recombinant potassium channels: fast and slow response by electrical and chemical interactions,” *Applied Physics A*, vol. 81, pp. 439–447, 2005.
- 31 S. Sachse and J. Krieger, “Olfaction in insects: The primary processes of odor recognition and coding,” *e-Neuroforum*, 2: pp. 49–60, 2011.
- 32 三觜裕之, 櫻井健志, 藤井毅, 光野秀文, 石川幸男, 神崎亮平, “ショウジョウバエ匂い結合タンパク質を利用した気中匂い分子の高効率可溶化技術の開発,” 日本味と匂学会第46回大会, 大阪, 2012.
- 33 N. Mase, T. Mizumoria, and Y. Tatemoto, “Aerobic copper/TEMPO-catalyzed oxidation of primary alcohols to aldehydes using a microbubble strategy to increase gas concentration in liquid phase reactions,” *Chemical Communications*, vol. 47, pp. 2086–2088, 2010.
- 34 伊藤裕之, “水道水源の藻類の変遷と水道の対応.” Internet: <http://www.recwet.t.u-tokyo.ac.jp/symposium/materials/20150310/itoh1.pdf>, 神戸市水道局水質試験所, 2015 [Jan, 24, 2018].
- 35 伊藤元昭, “五感センサ (5) : においの活用は宝の山.” Internet: <http://techon.nikkeibp.co.jp/article/NEWS/20081120/161529/?SS=imgview&FD=1269976005>, 日経エレクトロニクス, 2008 [Jan, 24, 2018].
- 36 R. Glatz and K. Bailey-Hill, “Mimicking nature’s noses: From receptor deorphaning to olfactory biosensing,” *Progress in Neurobiology*, vol. 93, pp. 270–296, 2011.
- 37 C. G. Galizia, D. Munch, M. Strauch, A. Nissler, and S. Ma, “Integrating Heterogeneous Odor Response Data into a Common Response Model: A DoOR to the Complete Olfactome,” *Chemical Senses*, vol. 35, pp. 551–563, 2010.

- 38 I. Rahioui, C. Laugier, S. Balmand, P. Da Silva, Y. Rahbe, and F. Gressent “Toxicity, binding and internalization of the pea-A1b entomotoxin in Sf9 cells,” *Biochimie*, vol., 89, pp. 1539–1543, 2007.
- 39 A. Kiely, A. Authier, A. V. Kralicek, C. G. Warr, and R. D. Newcomb, “Functional analysis of a *Drosophila melanogaster* olfactory receptor expressed in Sf9 cells,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 159 pp. 189–194, 2007.
- 40 L. Tian, S. A. Hires, T. Mao, D. Huber, M. E. Chiappe, S. H. Chalasani, L. Petreanu, J. Akerboom, S. A. McKinney, E. R. Schreiter, C. I. Bargmann, V. Jayaraman, K. Svoboda, and L. L. Looger, “Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators,” *Nature methods*, vol. 6, pp. 875–881, 2009.
- 41 T-W. Chen, T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, and D. S. Kim, “Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity,” *Nature*, vol. 499, pp. 295–300, 2013.
- 42 T. Nakagawa, T. Sakurai, T. Nishioka, and K. Touhara, “Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors,” *Science*, vol. 307, pp. 1638–1642, 2005.
- 43 T. Sakurai, T. Nakagawa, H. Mitsuno, H. Mori, Y. Endo, S. Tanoue, Y. Yasukochi, K. Touhara, and T. Nishioka, “Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, pp. 16653–16658, 2004.
- 44 T. J. Atherton and D. J. Kerbyson, “Size invariant circle detection,” *Image and Vision Computing*, vol. 17, pp. 795–80, 1999.
- 45 H. K. Yuen, J. Princen, J. Illingworth, and J. Kittler, “Comparative study of Hough transform methods for circle finding,” *Image and Vision Computing*, vol. 8, pp. 71–77, 1990.
- 46 K. Nakazato, “An integrated ISFET sensor array,” *Sensors*, vol. 9, pp. 8831–8851, 2009.
- 47 K. Niitsu, S. Ota, K. Gamo, H. Kondo, M. Hori, and K. Nakazato, "Development of microelectrode arrays using electroless plating for CMOS-Based direct counting of bacterial and heLa cells," *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, vol. 9, pp. 607–619, 2015.
- 48 P. Fromherz, “Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells, and Brain” in *Nanoelectronics and Information Technology* (ed. R. Waser), Wiley, Ch. 32, pp. 781–810, 2003.
- 49 新津葵一, 中里和郎, “CMOS 技術を用いたバイオセンサ集積回路,” *電気学会論文誌E*, vol. 137, pp. 291–295, 2017.
- 50 T. Sakata, I. Makino, S. Kita, and Y. Miyahara, “Electrical detection of ovum membrane charges using biotransistor,” *Microelectronic Engineering*, 85, pp. 1337–1340, 2008.

- 51 D. F. Schaffhauser, M. Patti, T. Goda, Y. Miyahara, I. C. Forster, and P. S. Dittrich, “An integrated field-effect microdevice for monitoring membrane transport in *Xenopus laevis* oocytes via lateral proton diffusion,” *PLOS ONE*, vol. 7, e39238, 2012.
- 52 Y. Miyahara, A. Matsumoto, T. Goda, Y. Maeda, and C. Kataoka, “Electrode chip for detecting biological molecule, and method for detecting biological molecule” US patent 20140124383A1.
- 53 井本晃, 古橋和雅, “セラミック基板材料,” *サーキットテクノロジー*, vol. 9, pp. 531–540, 1994.
- 54 Sumika Chemical Analysis Service Ltd., “Oxide thickness determination by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS),” *Technical News*, TN033.
- 55 F. Heer, W. Franks, A. Blau, S. Taschini, C. Ziegler, A. Hierlemann and H. Baltes, “CMOS microelectrode array for the monitoring of electrogenic cells,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 358–366, 2004.
- 56 U. Frey, J. Sedivy, F. Heer, R. Pedron, M. Ballini, J. Mueller, D. Bakkum, S. Hafizovic, F. D. Faraci, F. Greve, K-U. Kirstein, and A. Hierlemann, “Switch-matrix-based high-density microelectrode array in CMOS technology,” *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, vol. 45, pp. 467–482, 2010.
- 57 Multi Channel Systems, “Microelectrode Array (MEA) User Manual,” MCS GmbH, Reutlingen, Germany, 2005.
- 58 H. D. Graham, C. R. Bowen, J. Robbins, and J. Taylor, “Formation of a porous alumina electrode as a low-cost CMOS neuronal interface,” *Sensors and Actuators B*, vol. 138, pp. 296–303, 2009.
- 59 H. D. Graham, J. Robbins, C. R. Bowen, and J. Taylor, “Commercialisation of CMOS Integrated Circuit Technology in Multi-Electrode Arrays for Neuroscience and Cell-Based Biosensors,” *Sensors*, vol. 11, pp. 4943–4971, 2011.
- 60 M. Kawahara, M. Kato, and Y. Kuroda, “Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of  $\beta$ -amyloid protein,” *Brain Research Bulletin*, vol. 55, pp. 211–217, 2001.
- 61 S. Nagata, N. Kameshiro, D. Terutsuki, H. Mitsuno, T. Sakurai, K. Niitsu, K. Nakazato, R. Kanzaki, and M. Ando, “A sensor array chip for parallel electrical detection of odorant response of cells expressing odorant receptors,” in *Proc. 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2018)*, Belfast, UK, 21-25 January 2018.
- 62 川端和重, 新宮弘子, “細胞の形と細胞骨格,” サイエンス社, 2011.
- 63 B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada, “Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, pp. 793–805, 2001.
- 64 B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, 訳 : 中村桂子, 藤山秋佐夫, 松原謙一, “細胞の分子生物学 第3版,” Newton Press, 1995.

- 65 榎本篤, “細胞運動におけるアクチン細胞骨格と膜輸送の協調,” *生化学*, vol. 80, pp. 233–240, 2008.
- 66 K. Burridge, K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, and C. Turner, “FOCAL ADHESIONS: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton,” *Annual Review of Cell Biology*, vol. 4, pp. 487–525, 1988.
- 67 W. T. Chen and S. J. Singer, “Immunoelectron microscopic studies of the sites of cell-substratum and cell-cell contacts in cultured fibroblasts,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 95, pp. 205–222, 1982.
- 68 D. Braun and P. Fromherz, “Fluorescence interferometry of neuronal cell adhesion on microstructured silicon,” *Physical Review Letters*, vol. 81, pp. 5241–5244, 1998.
- 69 G. Wrobel, M. Holler, S. Ingebrandt, S. Dieluweit, F. Sommerhage, H. P. Bochem, and A. Offenhausser, “Transmission electron microscopy study of the cell–sensor interface,” *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 5, pp. 213–222, 2008.
- 70 A. Hai, A. Dormann, J. Shappir, S. Yitzchaik, C. Bartic, G. Borghs, J. P. Langedijk, and M. E. Spira, “Spine-shaped gold protrusions improve the adherence and electrical coupling of neurons with the surface of micro-electronic devices,” *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 6, pp. 1153–1165, 2009.
- 71 K. Nishikawa, “General remarks on ionic liquids, which are applicable under vacuum,” *Journal of the Vacuum Society of Japan*, vol. 56, pp. 43–46, 2013.
- 72 S. Kuwabata, A. Kongkanand, D. Oyamatsu, and T. Torimoto, “Observation of ionic liquid by scanning electron microscope,” *Chemistry Letters*, vol. 35, pp. 600–601, 2006.
- 73 Y. Ishigaki, Y. Nakamura, T. Takehara, T. Kurihara, H. Koga, T. Takegami, H. Nakagawa, N. Nemoto, N. Tomosugi, S. Kuwabata, and S. Miyazawa, “Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of cells during the epithelial–mesenchymal transition,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 74, pp. 1024–1031, 2011.
- 74 H. Nishiyama, M. Suga, T. Ogura, Y. Maruyama, M. Koizumi, K. Mio, S. Kitamura, and C. Sato, “Atmospheric scanning electron microscope observes cells and tissues in open medium through silicon nitride film,” *Journal of Structural Biology*, vol. 169, pp. 438–449, 2010.
- 75 F. Greve, S. Frerker, A. G. Bittermann, C. Burkhardt, A. Hierlemann, and H. Hall, “Molecular design and characterization of the neuron-microelectrode array interface,” *Biomaterials*, vol. 28, pp. 5246–5258, 2007.
- 76 H. Takahashi, A. Sato, M. Takakura, N. Mori, J. Boerder, W. Knoll, and J. Critchell, “A new method of surface preparation for high spatial resolution EPMA/SEM with an argon ion beam,” *Microchimica Acta*, vol. 155, pp. 295–300, 2006.
- 77 K. Lange, “Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 226, pp. 896–927, 2011.

- 78 S. Majstoravich, J. Zhang, S. Nicholson-Dykstra, S. Linder, W. Friedrich, K. A. Siminovich, and H. N. Higgs “Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology,” *Blood*, vol. 104, pp. 1396–1403, 2004.
- 79 R. Cardenes, C. Zhang, O. Klementieva, S. Werner, P. Guttmann, C. Pratsch, J. Cladera, and B. H. Bijmens, “3D membrane segmentation and quantification of intact thick cells using cryo soft X-ray transmission microscopy: A pilot study,” *PLOS ONE*, vol. 12, e0174324, 2017.
- 80 N. de Jonge, N. Poirier-Demers, H. Demers, D. B. Peckys, and D. Drouin, “Nanometer-resolution electron microscopy through micrometers-thick water layers,” *Ultramicroscopy*, vol. 110, pp. 1114–1119, 2010.
- 81 F. N. Fritsch and R. E. Carlson, “Monotone piecewise cubic interpolation,” *SIAM Journal on Numerical Analysis*, vol. 17, 238–246, 1980.
- 82 X. Y. Tao, J. Y. Choi, W. J. Kim, J. H. Lee, Q. Liu, S. E. Kim, S. B. An, S. H. Lee, S. D. Woo, B. R. Jin, and Y. H. Je, “The Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus ORF78 is essential for budded virus production and general occlusion body formation,” *Journal of Virology*, vol. 87, pp. 8441–8450, 2013.
- 83 J. F. Huang, M. Tian, C. J. Lv, H. Y. Li, R. u. H. Muhammad, and G. H. Zhong, “Preliminary studies on induction of apoptosis by abamectin in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line,” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 100, pp. 256–263, 2011.
- 84 A. L. Hodgkin and A. F. Huxley “A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve,” *Journal of Physiology*, vol. 117, pp. 500–544, 1952.
- 85 宮川博義, 井上雅司, “ニューロンの生物物理 第2版,” 丸善出版, 2013.
- 86 J. A. Garrido, “Biosensors and Bioelectronics (WS13/14): Cell-transistor electronic interface,” TUM Lecture slides, 2013.
- 87 M. Jenkner and P. Fromherz, “Bistability of membrane conductance in cell adhesion observed in a neuron transistor,” *Physical Review Letters* vol. 79, pp. 4705–4708, 1997.
- 88 R. Schätzthauer and P. Fromherz, “Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 10, pp. 1956–1962, 1998.
- 89 L. Abuin, B. Bargeton, M. H. Ulbrich, E. Y. Isacoff, S. Kellenberger, and R. Benton, “Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors,” *Neuron*, vol. 69, pp. 44–60, 2010.
- 90 L. S. Robblee, J. L. Lefko, and, S. B. Brummer “Activated Ir: An electrode suitable for reversible charge injection in saline solution” *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 130, pp. 731-733, 1983.

- 91 T. Akin, K. Najafi, R. H. Smoke, and R. M. Bradley “A micromachined silicon sieve electrode for nerve regeneration applications,” *IEEE transactions on biomedical engineering*, vol. 41, pp. 305–313, 1994.
- 92 H. C. Lau, I. K. Lee, P. W. Ko, H. W. Lee, J. S. Huh, W. J. Cho, and J. O. Lim, “Non-invasive screening for Alzheimer’s disease by sensing salivary sugar using *Drosophila* cells expressing gustatory receptor (Gr5a) immobilized on an extended gate ion-sensitive field-effect transistor (EG-ISFET) biosensor,” *PLOS ONE*, vol. 10, e0117810, 2015.
- 93 J. Kobayashi, Y. Mori, K. Okamoto, R. Akiyama, M. Ueno, T. Kitamori, and S. Kobayashi, “A microfluidic device for conducting gas-liquid-solid hydrogenation reactions,” *Science*, vol. 304, pp. 1305–1308, 2004.
- 94 H. Kudo, Y. Suzuki, T. Gessei, D. Takahashi, T. Arakawa, K. Mitsubayashi, “Biochemical gas sensor (bio-sniffer) for ultrahigh-sensitive gaseous formaldehyde monitoring,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 854–858, 2010.
- 95 寺坂宏一, 氷室昭三, 安藤景太, 秦隆志, “ファインバブル入門,” 日刊工業新聞社, 2016.
- 96 W. Takken and B. G. J. Knols, “Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes,” *Annual Review of Entomology*, vol. 44, pp. 131–157, 1999.
- 97 R. Xue, L. Dong, S. Zhang, C. Deng, T. Liu, J. Wang, and X. Shen “Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry,” *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 22, pp. 1181–1186, 2008.

## 研究業績

### 査読付学術雑誌

[1] **Daigo Terutsuki**, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Yuki Okamoto, Agnès Tixier-Mita, Hiroshi Toshiyoshi, Yoshio Mita, and Ryohei Kanzaki, “Increasing cell-device adherence using cultured insect cells for receptor-based biosensors”, *Royal Society Open Science*, 2018 (Accepted).

### 学術雑誌等又は商業誌

[2] 光野秀文, 櫻井健志, **照月大悟**, 安藤規泰, 並木重宏, 加沢知毅, 神崎亮平, “テクノロジー・ロードマップ 2018-2027 <全産業編>.” 第6章 昆虫テクノロジー, 日経BP社, 2017.

### 査読付国際会議

[3] **Daigo Terutsuki**, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Yuki Okamoto, Agnès Tixier-Mita, Hiroshi Toshiyoshi, Yoshio Mita, and Ryohei Kanzaki, “Cell-sensor interface analysis of a bio-hybrid electric odorant sensor,” in *28th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2018)*, Miami, Florida, USA, 12-15 June 2018 (Submitted).

[4] Sanato Nagata, Norifumi Kameshiro, **Daigo Terutsuki**, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Kiichi Niitsu, Kazuo Nakazato, Ryohei Kanzaki, and Masahiko Ando, “A sensor array chip for parallel electrical detection of odorant response of cells expressing odorant receptors,” in *Proc. 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2018)*, Belfast, UK, 21-25 January 2018.

[5] **Daigo Terutsuki**, Hidefumi Mitsuno, Yuki Okamoto, Takeshi Sakurai, Agnes Tixier-Mita, Hiroshi Toshiyoshi, Yoshio Mita, and Ryohei Kanzaki, "Odor-sensitive field effect transistor (OSFET) based on insect cells expressing insect odorant receptors," in *Proc. 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017)*, Las Vegas, NV, USA, pp. 394–397, 22-26 January 2017.

### 国内学会・シンポジウム等

[6] **照月大悟**, “昆虫嗅覚受容体を用いた細胞-FET ハイブリッド匂いセンサの開発”, 2017 国立大学フェスタ, 微細加工・微細構造解析プラットフォーム公開セミナー, 東京, 2017 年 11 月. (招待講演)

[7] **照月大悟**, “Extended-gate ISFET と昆虫嗅覚受容体発現細胞を融合した匂いバイオセンサ”, VDEC デザイナーズフォーラム, 福岡, 2017 年 9 月.

[8] **照月大悟**, 光野秀文, 岡本有貴, 櫻井健志, テイクシェ三田アニエス, 年吉洋, 三田吉郎, 神崎亮平, “An ISFET-based bio-hybrid odorant sensor using insect cells expressing insect odorant receptors”, 第 17 回 東京大学生命科学シンポジウム (BIO UT), 東京, 2017 年 4 月.

## 特許

- [9] **照月大悟**, 神崎亮平, 光野秀文, 櫻井健志, 間瀬暢之, 佐藤浩平, “難水溶性有機化合物の溶解システム, 難水溶性有機化合物の溶解方法, 及び匂い検出システム” (東京大学権利承継済み, 2018年2月9日出願予定)
- [10] 安藤正彦, 亀代典史, 奥村忠嗣, 永田真斗, 神崎亮平, **照月大悟**, 光野秀文, 櫻井健志, “人工嗅覚センシングシステムおよびその製造方法,” 特願 2018-7089, 2018年1月19日.
- [11] **照月大悟**, 神崎亮平, 光野秀文, 櫻井健志, テイクシェ三田アニエス, 三田吉郎, 岡本有貴, 年吉洋, “匂いセンサ,” PCT 出願 PCT/JP2018/001284, 出願日 2018年1月17日.
- [12] **照月大悟**, 神崎亮平, 光野秀文, 櫻井健志, テイクシェ三田アニエス, 三田吉郎, 岡本有貴, 年吉洋, “匂いセンサ,” 特願 2017-080896, 出願日 2017年4月14日.

## 受賞等

- [13] VDEC デザインアワード嘱望賞, VDEC デザイナーズフォーラム, 福岡, 2017.
- [14] IEEE MEMS Student Travel Grant, \$500, Transducer Research Foundation, USA, 2017.

## 研究助成金

- [15] **照月大悟** (研究代表者), 公益財団法人 立石科学技術振興財団 研究助成(C), “昆虫嗅覚受容体を発現する培養細胞と電界効果トランジスタを融合した匂いセンサの開発” 2016年4月–2018年3月.

## その他

- [16] **照月大悟** (学生幹事代表), 山口貴大, 岸田亮, 眞下達, VDEC デザイナーズフォーラム 2017, Ph.D.企画セッション, 「シン・ハカセ: ゲンジツ対ハカセ.」
- [17] **照月大悟**, “東京大学大学院 工学系研究科 先端学際工学専攻 ケンブリッジ大学クレアホール 夏季 Visiting Students 研修報告”, Internet: [http://www.ais.rcast.u-tokyo.ac.jp/educationresearch/studyabroadprogramforstudents/2016\\_terutsuki.html](http://www.ais.rcast.u-tokyo.ac.jp/educationresearch/studyabroadprogramforstudents/2016_terutsuki.html), 2016年度.

## 謝辞

本研究の実施にあたり、多くの方々から多大なご支援をいただきました。東京大学先端科学技術研究センター所長/教授の神崎亮平先生には、これまで自分が実施したことのない生物学、MEMS、化学を含む学際的な研究テーマをいただき、博士課程として新しい研究分野に挑む機会と環境をいただきました。

本論文の副査をお願い致しました、先端科学技術研究センター教授の年吉洋先生、同准教授のティクシェ三田アニエス先生、工学系研究科電気系工学専攻准教授の三田吉郎先生に心よりお礼申し上げます。年吉先生には MEMS 2017 や投稿論文作成の際、大所高所から効果的な研究のアピール方法、論文構成などをご指導いただきました。アニエス先生には、FET による細胞計測を研究開始時からご指導いただきました。三田先生からは、FET の回路設計、プロセス、センサ細胞の測定結果など細部に渡ってご指導いただきました。

先端科学技術研究センター助教の光野秀文先生には、入学前から研究テーマについてディスカッションいただき、生物学に関する実験や論文投稿を含む様々な技術・知識をいただきました。先端科学技術研究センター特任講師の櫻井健志先生には、副査に加え、生物学に関する様々な知識と論文作成についてご指導いただきました。

三田研究室博士課程の岡本有貴さんには、FET の CAD 設計からクリーンルームでのプロセス、計測に渡るまで、3 年間様々なサポートをいただきました。また、三田研究室博士課程の宇佐美尚人さん、修了生の森功博士を始め TeamMEMS の皆様にお礼申し上げます。駒場からお邪魔していましたが、三田研と本郷でもとても楽しく過ごすことができました。

日立東大ラボの安藤正彦博士、永田真斗様、亀代典史様には BCT を用いた実験において様々なご助言をいただきました。日立ケンブリッジ研究所 (HCL) 副所長の渡辺康一博士には、HCL 滞在時、また帰国後のディスカッションにおいて、多くの情報や

アイデアをいただきました。HCL 所長の Dr David Williams, 主任研究員の Dr Jörg Wunderlich, 研究員の Dr Pierre Roy にお礼申し上げます。HCL 滞在時には、各専門分野の紹介や、新しいバイオセンサ開発に向けたディスカッションをいただきました。名古屋大学大学院工学研究科電子情報システム専攻教授の中里和郎先生と、同講師の新津葵一先生からは、BioCMOS テスターを用いたセンサ細胞の応答検出に関する議論をいただきました。

静岡大学化学バイオ工学専攻教授の間瀬暢之先生には、ウルトラファインバブルを用いた難水溶性有機化合物の溶解技術構築に向け、理論的背景から実験設備の提供までご協力を賜りました。また、間瀬研究室助教の佐藤浩平先生には、実験の難点を超える様々なアイデアをいただきました。間瀬研究室修了生の仁科裕樹さん、修士学生の飯尾卓也さんには深夜に及ぶ実験に何度もご協力いただきました。

神奈川県立産業技術総合研究所 (KISTEC)の三澤宣雄博士には、PDMS 流路の作成や研究方針についてご助言いただきました。

神崎研究室博士課程の塩田裕介君とは、同期入学、また遺伝子班のメンバーとして共に研究室生活を送ることができました。技術補佐員の黒田枝里さんには、常日頃の Sf21 細胞の維持管理、さらに HEK293T 細胞を用いた実験において様々なサポートをいただきました。修了生の Pang さん (Maneerat Termtanasombat), 学術支援専門員の二木佐和子さんには、Sf21 細胞を用いた蛍光計測の際、実験条件検討などご助言いただきました。

本研究は、立石科学技術振興財団 2016 年度助成により支援いただきました。