

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域
「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ
素子・システムの創製」

研究課題
「ナノケミカルプローブの創製とバイオ・医療計測」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年 3月

研究代表者:鈴木孝治
(慶應義塾大学大学院理工学研究科教授)

1 研究実施の概要

人体は約60兆個の細胞で構成され、それらの個々の細胞がそれぞれの役割を担い生体のホメオスタシスを維持している。代謝のようにほとんど全ての細胞が行う活動もあれば、リガンドの発現や、サイトカインの産生など、特定の機能を担う細胞のみが行う活動もある。極言すれば、細胞の活動は遺伝子の数だけあると言える。そして、それらのいずれかの活動が低下し、または、増強されるとホメオスタシスが乱れ疾患を誘導する。したがって、一つ一つの生細胞の活動を詳細に知ることは、疾患の予測、疾患の原因の解明、創薬、疾患の治療方法の探索につながる。

本研究では、生細胞内外物質の動態解析を可能とするボトムアップ型の分子・ナノ材料設計から新たな機能を発現するナノケミカルプローブを創製し、これをバイオ計測と医療計測に展開することをねらいとした。研究の目標は、「単一細胞レベルの動態解析」の基盤分析技術開発とし、蛍光プローブ、光・電気化学プローブ、質量分析プローブという3種類の新規のケミカルプローブを創製し利用する分析法を提案、確立することを目指した。その主な研究内容は図1に示すように、細胞の形状、および動態を観察する「細胞のリアルタイム測定システムの開発」と、細胞の外的刺激に対する応答および物質の放出を観察する「細胞応答観察システムの開発」に分けて研究を進めた。

細胞のリアルタイム測定システムの開発では、新規ナノプローブによる蛍光、近接場光・電気化学・原子間力の同時測定からの通常の顕微鏡では得られないナノレベル分解能での細胞の観察を実現した。一方、細胞応答観察システムでは、質量分析プローブ (MS プローブ) を用いた MPI 法開発によるタンパク質の質量分析測定および、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法と質量分析 (MS) 法とを融合し、さらにマイクロ流体デバイスを組み合わせたナノドットプレート SPR-MS 分析システムを開発して、新たなタンパク質分析法を創製した。

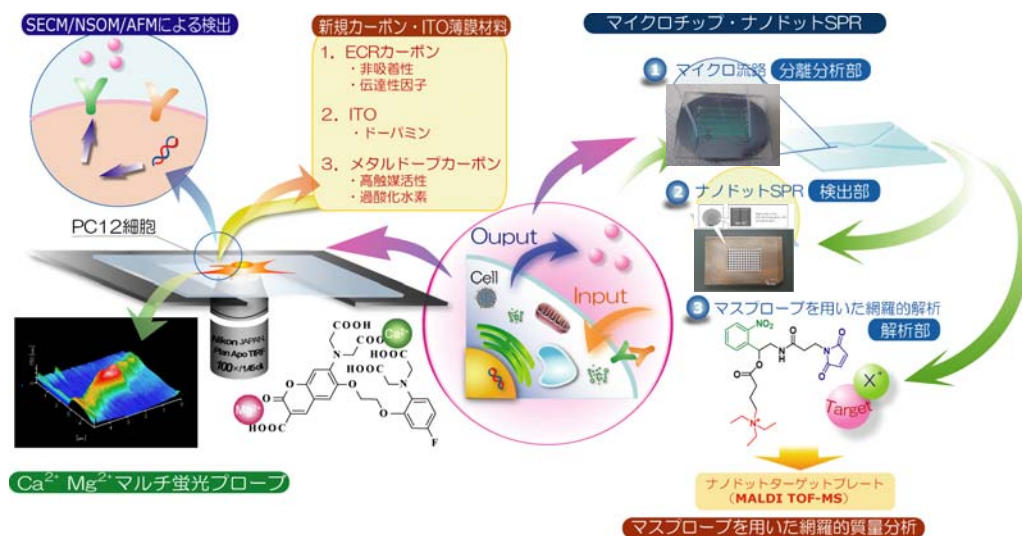
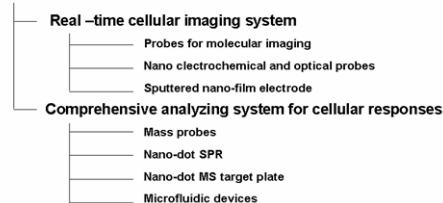


図1 ナノケミカルプローブを創製による「単一細胞レベルの動態解析」の基盤分析技術開発(蛍光プローブ、光・電気化学プローブ、質量分析プローブなどの新規のケミカルプローブを創製し利用する分析法を提案、細胞の形状、動態を観察する「細胞のリアルタイム測定システムの開発」と、細胞の外的刺激に対する応答および物質の放出を観察する「細胞応答観察システムの開発」に分けて研究を展開)

Total cell analysis



1)リアルタイム測定システム

細胞レベルの診断・病理・生理学の解明のためには、細胞レベルでの時間的、空間的な現象を統合的に測定する必要がある。本プロジェクトでは、後述の新しい細胞内・細胞外の多成分・多項目情報をリアルタイムに測定可能とする技術を開発し、「単一細胞レベルの動態解析」の基盤分析技術開発および細胞レベルでの病理診断(細胞ドック)への展開を目指してきた。

細胞外(細胞間隙)に輸送される生理活性物質の挙動、ならびに細胞のモルフォロジーをイメージングすることは細胞間シグナル伝達を理解する上で重要である。

しかしながら、単一細胞レベルにおいての神経伝達物質とイオンの相関性などは多く報告されているが、それらの細胞局所部位での相関性のリアルタイム同時計測は困難とされている。この問題を解決するため我々は、細胞内の多成分同時イメージングとしては、新しく「マルチ蛍光プローブ」の概念を提案し、複数物質を同時に測定可能なセンサープローブを開発するとともに、局所領域での電気化学・光学・形状が同時イメージング可能な走査型電気化学・近接場光学・原子間力顕微鏡(SECM/NSOM/AFM)の開発、および細胞への適応を目標として研究を行ってきた。マルチ蛍光プローブを用いた細胞内の複数物質(カルシウム・マグネシウム)の同時イメージングは、図2に示すような分子構造をもち、それぞれのイオンに対し吸収スペクトルの最大吸光波長がそれぞれブルーシフトおよびレッドシフトと異なる応答を示すプローブである KCM-1 をデザイン、合成し、これを用い、PC12 細胞のミトコンドリアを刺激した際のカルシウム換算値、マグネシウム換算値の変化とその際の細胞のイオンの変化量の二次元イメージを実現した。加えて、PC12細胞のミトコンドリア内に存在するマグネシウムイオンを観察できる蛍光プローブ KMG-301 開発により、パーキンソン病誘引物質の1つと考えられている MPP を細胞に導入するとミトコンドリア内マグネシウムイオンが減少することを検証できた。

一方、光ファイバーを母材とする光ファイバーナノプローブを開発した。このプローブは図3の測定概念図に示すように一本のプローブで電気化学・近接場光学・原子間力測定が可能なマルチプローブである。したがって、同時に一つのプローブ走査で 3 モードの化学的・物理的イメージング情報を3次元画像として取得することができ、細胞内外の物質間相互作用ならびに形状情報などの相関性をリアルタイムに測定することが可能となる。実際、このプローブを用いて神経細胞上のカテコールアミンやイオンのリリースに関与するといわれるバリコシティの検出が可能であった。これは通常の光学顕微鏡では観察困難なレベルの分解能であることから、本 SECM/NSOM/AFM システムがバイオサンプルに対しても有用であることを示している。また本マルチプローブにおいて、電極で測定可能な物質を増やすために電極の高機能化が必要であり、後述する電子サイクロトロン(ECR)スパッタ法を用いてナノカーボン膜電極や、RFスパッタ装置により、金属ナノ微粒子カーボンナノ電極、アモルファス ITO 電極を新しく開発し、これまで電極で安定に観測できなかった核酸誘導体検出や補酵素類の安定な測定が可能となった。これらの新規電極材料と上述のプローブを組合せることで、細胞外に放出された多くの光学活性/電気化学

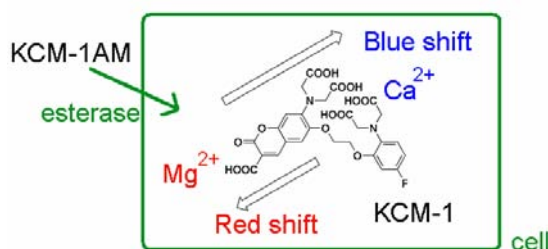


図2 カルシウム・マグネシウムマルチ蛍光プローブ KCM-1

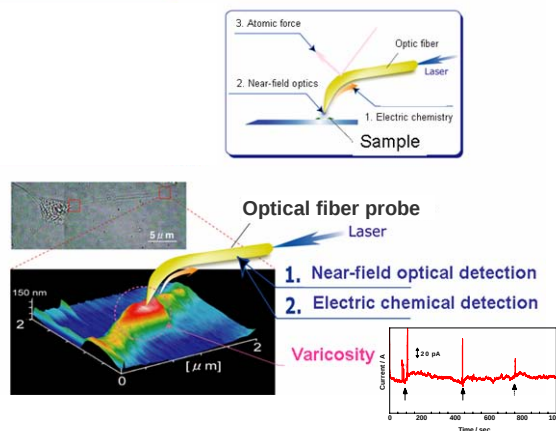


図3 マルチモードナノプローブ走査型顕微鏡システムによる細胞イメージング(赤のスパイク応答は、ナノプローブを用いた細胞のドーパミン検出例)

活性物質種を細胞近傍でリアルタイムに捉えることができるようになった。例として、アモルファス ITO 薄膜をスパッタしたマルチプローブを用い神経細胞からドーパミンを検出した様子を図3に示す。このように、新規電極材料からのナノプローブとそれを利用したマルチモード顕微鏡システムは、従来の顕微鏡では不可能であったナノオーダーの細胞観察を実現する基盤技術を確立した。

2) 細胞応答観察システム

細胞はレセプターやリガンドを介して、細胞外からの刺激に応答し、また、細胞同士で相互作用し、その結果、生体内の全ての細胞でホメオスタシスを維持している。生命現象をも解明するためには、レセプターとリガンドの特異的応答についての解析が重要である。本プロジェクトでは、後述のナノプローブならびにデバイスを組み合わせることにより、細胞応答観察システムの樹立を行ってきた。その例のひとつとして、特にナノドット SPR と MS ターゲットプレート、マイクロ流体デバイスを組み合わせて行ったレセプターリガンドの特異的応答の網羅的観察を目的とした新たな SPR-MS デバイスをナノドットプレートの創製によって実現することができた。

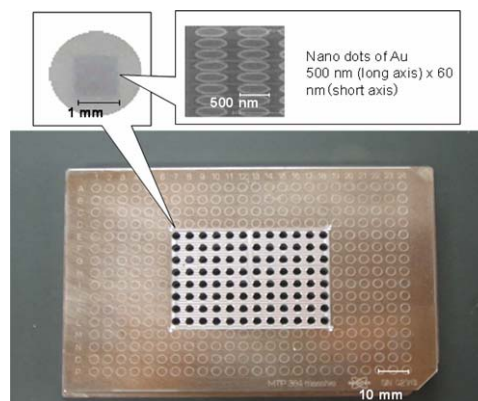


図4 SPR-MS 用微細加工基板

このナノドットプレート SPR-MS では微細加工技術を用いることによって、SPR と MS を一枚の基板上で行うことができるようにし、タンパク質間の相互作用の有無を解析し、さらに、同定をサンプルの移動をすることなく、簡単な操作で網羅的に行うことができる画期的なシステムである。SPR は標識することなく分子間の相互作用を観察することができる方法であり、また MS はタンパク質の同定に近年では一般に用いられる。SPR-MS は微細加工を施した基板を用いるとを特徴とする。この基板は図4に示すように、標準的なマイクロプレートサイズ ((80 mm x 123 mm)) であり、貫通した複数の穴の上に、微細加工を施したガラス板がついたものである。このガラスには、金のナノドット (長軸 500 nm、短軸 120 nm) が付されている。金に固定した物質と、アナライトの相互作用の有無を、吸収スペクトルのシフトで知ることができるが、全体として、マイクロプレートの形状をしていることから、スペクトルを一般的なプレートリーダーで一気に測定することができる。また、この基板は直接 MALDI-MS に搭載することができ、相互作用した物質を特定することができる。このようなナノドットプレート SPR-MS は図5のように用いることで、網羅的解析に用いることができる。すなわち、対象となる細胞の DNA ライブラリーを発現し、それらを上述の基板に固定する。そこに、試料を接触させ、プレートリーダーにて、吸光度のシフトを観察する。吸光度のシフトが起きているウェルについてナノドットプレート MALDI-MS 測定を行えば、それぞれ、どのような物質が相互作用しているかが同定できる。またこの SPR-MS は、前処理のために後述のマイクロ流体デバイスを設けることにより、一連の操作を自動化し、タンパク質の網羅的解析に応用可能である。

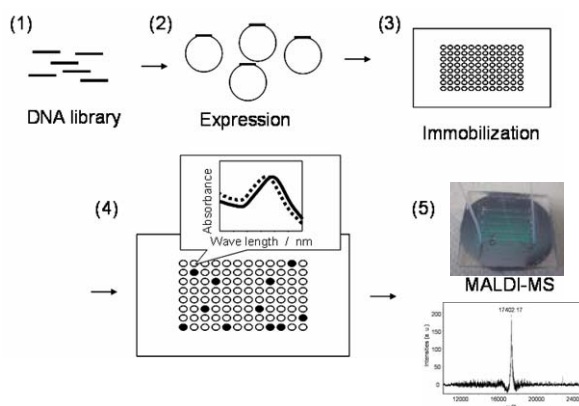


図5 ナノドットプレート SPR-MS を用いた網羅的解析の模式図 (5の下図は、SPR-MS で検出された IL-1 β マススペクトルの例)

以上、細胞内外をナノプローブでマイクロメーター以下の分解能で詳細に観察できる技術開発および新たな質量分析ベースの細胞内タンパク質の分析技術開発は、今後の「単一細胞レベルの動態解析」の分析技術開発は当初目標を達成し、細胞レベルでの病理診断 (細胞ドック) への有用な分析技術として発展する基盤技術を提供するものである。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究では機能創造分子の設計、合成技術の実績を背景に、我が国のナノテクノロジー関連、バイオ関連重点分野に寄与する研究として、新たにナノケミカルプローブと題する新規の化学センシングプローブを創製し、これをバイオ計測と医療計測に展開することをねらいとした。

また本研究は異分野間の融合に基づき、産・官・学を視野にいたした研究を行うことをコンセプトとした。したがって単に研究代表者の従来の専門領域である化学だけでなく、物理、化学、薬学、生物、情報科学を集約したチーム集団として、独創的な基礎研究を進める。本研究で展開しようとする異分野集合型研究は我が国の大学レベルの研究室にはほとんどない。さらにレベルの高い産・官・学のグループ体制での研究を進め、応用研究を見据えた研究を推進する。産官との協力としては電気化学・バイオセンシングにおいて世界的にハイレベルな研究をしている産総研の丹羽修副部門長および NTT の岩崎弦主任研究員、神奈川県産業技術センター電子技術部で研究を展開している伊藤健研究員に、ナノデバイス加工の分野で協力を得て研究を進めた。

研究当初は大別して3種の新規バイオセンシングプローブおよび関連新技術創製研究を連携して研究してきた。内容は、(1) 生体細胞内のダイナミックな挙動を測定するための蛍光ナノセルイメージングプローブ創製とニューラルネットワークスペクトル応答解析による多成分同時イメージング技術の開発；(2) ピコグラムレベルの瞬時超高感度計測を実現する新たなナノバイオプローブとしてのアダクティブプローブの創製とこれを用いた免疫細胞の遺伝子レベルでの解析技術の開発、およびアダクティブプローブの発展系であるマスプローブの創製とこれを用いた DNA・タンパク質の網羅的解析技術の開発；(3) 超微小光・ナノ電極プローブ創製とナノセンサーアレイによる多成分同時医療計測および高分解能バイオイメージング技術の開発である。

しかしながら、中間報告(平成 17 年)での指摘を受け、以上の研究内容についての変更はないものの、チーム内での最終戦略目標を「単一細胞レベルの動態解析」の基盤分析技術開発および細胞レベルでの病理診断(細胞ドック)への展開に定めた。

この“細胞ドック”に向けた主な研究内容は、細胞の形状、および動態を観察する「細胞のリアルタイム測定システムの開発」と、細胞の外的刺激に対する応答および物質の放出を観察する「細胞応答観察システム」の開発との2つの構成からなる研究開発を基に進められ、「単一細胞レベルの動態解析」技術の確立を目指した。以下が目標と概要である。

1) 細胞のリアルタイム測定システムの開発

主な担当者[慶應義塾大学:丸山健一、小松広和、萩原将文、産総研:丹羽修、加藤大、ほか]

細胞レベルの診断・病理・生理学の解明のためには、細胞レベルでの時間的、空間的な現象を統合的に測定する必要がある。ここでは、新しい細胞内・細胞外の多成分・多項目同時イメージング技術を開発し、それを統合することで単一細胞の内外の現象を統合的に判断できる測定デバイスとシステムを構築した。

2) 細胞応答観察システム(Cell response analysis)の開発

主な担当者[慶應義塾大学:本田亜希、NTT:岩崎弦、神奈川県産業技術センター:伊藤健、ほか]

細胞は外的刺激に応答し(インプット)、物質の放出(アウトプット)を行う。様々な細胞は、それぞれのインプットとアウトプットの一連の応答を有し、生命体とはこれらの集合体であるとも言える。本研究ではインプットとアウトプットの一連の応答を総合的に観察するシステムの確立を目標とする。すなわち、マイクロ流体デバイス上で、細胞に様々な物質を投与し(インプット)、それぞれの物質に対して細胞が放出するイオンから蛋白までの一連の物質(アウトプット)の観察を網羅的に行う。アウトプット観察は、具体的には、細胞が放出する様々な物質の識別と、それらの物質と他のレセプターとの間の相互作用の強さの測定を SPR と MS により分析できるシステムを構築した。

この構想に向けた具体的な研究テーマとチーム構成は、図6のようにまとめられる。

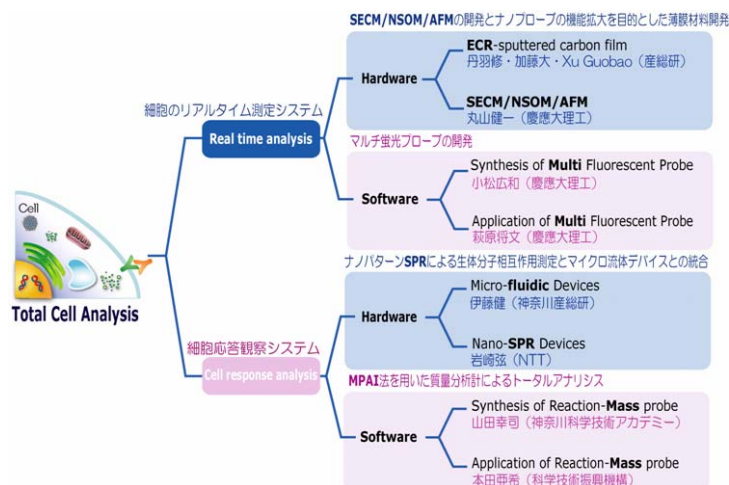


図6 研究のテーマと進行上のチーム構成

上記における個々の基礎研究、とりわけ新規プローブ、新規材料、新規分析方法は、バイオセンシング研究をリードする分析基盤創成研究であり、以下に概要を述べる。

1) 細胞のリアルタイム測定システムの開発

[慶應義塾大学: 丸山健一、小松広和、萩原将文、産総研: 丹羽修、加藤大、ほか]

細胞レベルの診断・病理・生理学の解明のためには、細胞レベル、あるいは細胞の局所レベルでの時間的、空間的な現象をリアルタイムで統合的に測定する必要がある。ここでは、創製したプローブを用いて、細胞内・細胞外の多成分・多項目同時イメージング技術を開発し、それを図7に示すように統合することで単一細胞の内外の現象を統合的に判断できる測定デバイスを構築し、細胞レベルの病理診断(細胞ドック)に役立つ技術開発の展開を目指した。

1-1) マルチ蛍光プローブの開発:

細胞内の多成分同時イメージングを可能とする「マルチ蛍光プローブ」の概念を提案し、複数物質を同時に測定可能なナノプローブを開発し、それを用いた細胞内の複数物質(カルシウム・マグネシウム)の同時イメージングを実現した。複数指示薬のスペクトルの重なり、毒性、代謝の違いなどの既存のイメージングの問題を解決する新しい方法であり、また、細胞内の複数の物質の状況を調べることで、細胞内のシグナルがより詳細に理解でき、細胞内の物質の生理学・病理診断を可能にすると考えられる。

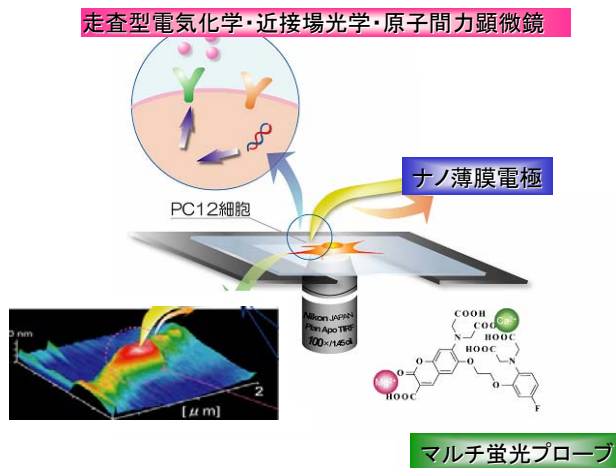


図7 細胞のリアルタイム測定システム

従来より、蛍光プローブを用いた蛍光イメージングは、細胞の高感度、高速な空間、時間的な解析を行うことができることから、生物学、薬学の分野で広く用いられてきた。優れた蛍光プローブの開発は蛍光イメージングの進歩において非常に重要であるが、現在までにカルシウム蛍光プローブ Fura-2, Fluo-3, マグネシウム蛍光プローブ KMG-20, KMG-104(当チームの開発)、一酸化窒素蛍光プローブ DAF など、高い選択性を有する蛍光プローブが開発されており、これらの蛍光プローブを用いた特定の物質の観測が盛んに行われてきた。しかしながら、生体のシグナル伝達というものは、多数の物質のやりとりからなり、それを解明するためには複数物質を同時に検出する方法が必要である。複数の蛍光プローブを細胞に導入することで複数物質を測定することは行われ始めているが、侵襲性(毒性)が大きくなること、複数プローブの蛍光の重なりが生じること、蛍光プローブごとに局在、代謝、光分解の速度が異なることによって、定量的な判定を難しくする。

そこで、新しいアプローチとして「単分子マルチセンサー(プローブ)による複数物質同時定量」を提案した。単分子マルチセンサーは複数物質を異なる応答で認識し、それを測定することができる分子センサーであり、複数のセンサーの有する機能を一つの分子で果たすことができる。ここでは、細胞内でもっとも変化量が大きく、セカンドメッセンジャーとして働くカルシウム、および細胞内でもっとも存在量が大きく補酵素として働くマグネシウムに焦点をあてて、カルシウム・マグネシウムマルチ蛍光プローブの開発を目的とする。

最初のカルシウム・マグネシウムマルチ蛍光プローブ KCM-1 は、蛍光団としてクマリン、クマリンのドナーサイトにカルシウム選択性の配位サイトとして、BAPTA (bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid)アクセプターサイトにマグネシウム選択的配位サイトとしてチャージドベータジケトン構造を持つように設計した。その結果、ドナーサイトでカルシウムイオン、アクセプターサイトでマグネシウムイオンを選択的に補足し、ICT(分子内電荷移動)応答メカニズムにより、吸収スペクトルの最大吸光波長がそれぞれブルーシフトおよびレッドシフトと異なる応答を示した。

実際のカルシウムおよびマグネシウムを共存させた溶液の中に KCM-1 を導入したところ、図8に示すようなカルシウム・マグネシウムの同時イメージングが実現した。

マルチ蛍光プローブ KCM-1 を用いた細胞内複数物質検出は世界で初めての例であり、細胞内の複数物質同時検出法の進歩によって複数物質動態系からなるシグナル伝達の理解が深まっていくと考えられる。

(新たな目標からの展開)

カルシウム蛍光プローブに比較して、マグネシウム蛍光プローブには優れたものがなかつ

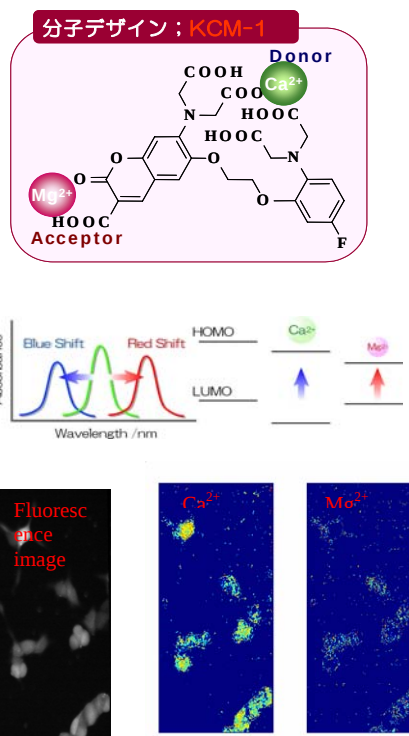


図8. KCM-1 の構造とスペクトルシフトと細胞内 Mg および Ca 同時イメージング

表1 マグネシウム蛍光プローブの特性

Name	Abs/nm	Em/nm	KdMg/mM	KdCa/mM	KdCa/KdMg	Response
Mag-fura2	330	491	1.9	0.025	0.013	shift
Mag-indo1	330	417	2.7	0.035	0.013	shift
Mag-fura5	332	482	2.3	0.028	0.012	shift
Magnesium Green	506	531	1.0	0.006	0.006	increase
① Magnesium Orange	550	575	3.9	ND	ND	increase
Mag-fura Red	427	631	2.5	ND	ND	shift
Mag-fluo4	493	517	4.7	0.022	0.005	increase
Mag-Rhod2	549	578	ND	0.070	ND	increase
Mag-X-rhod1	578	602	10.7	0.045	0.004	increase
KMG-20	428	490	10	33.3	3.3	shift
② KMG-27	426	486	9.8	33.0	3.4	shift
2'CF	477	508	15.8	ND	ND	shift
KMG-101	492	515	100	150	1.5	increase
③ KMG-103	515	534	1.8	6.3	3.5	increase
KMG-104	504	523	2.1	7.5	3.6	increase

マグネシウム蛍光プローブの特性を比較した。
NDは決定されていない/報告に値が存在しないことを意味する。

た。そのため、当研究グループは、マグネシウム蛍光プローブに関して世界最高のものを数種創製した。蛍光プローブの特性のまとめを表1に示す。このマグネシウムうち、①は既存の蛍光プローブ、②は当グループ開発の蛍光スペクトロシフト形プローブ、および③は蛍光増光形プローブであり、③に属するKMG-104は世界最良のマグネシウム蛍光プローブである。また、細胞内ミトコンドリア中のマグネシウムを計測できるKMG-301を開発した。このマグネシウム蛍光プローブの応用から、細胞内のミトコンドリアはマグネシウムを貯蔵していることが明らかになった。さらに、パーキンソン病誘引物質とされているMPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) を細胞内に導入すると、ミトコンドリア中のマグネシウムは減少することが確認された(図9)。このように、本研究から生まれた新たな蛍光プローブは、今後の細胞関連マグネシウム測定の主要センシング分子になる。

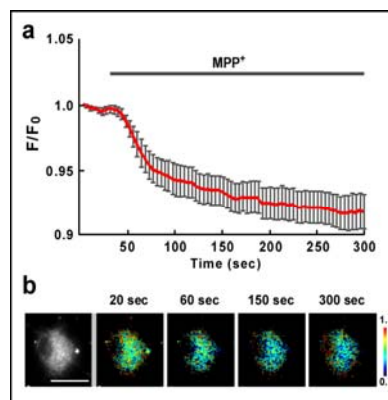


図9 KMG-301 によるミトコンドリア Mg イメージング(赤のグラフは、パーキンソン病誘引物質とされているMPP+を細胞内に入れた場合)

1-2) マルチモード走査型顕微鏡の創製とナノプローブの機能拡大を目的とした材料開発:

細胞外からの測定技術としては、近接場光(NSOM)・電気化学(SECM)・原子間力(AFM)を一つのプローブで同時に測定できるマルチモード走査型顕微鏡の創製を目指した。この走査型顕微鏡は、蛍光顕微鏡では見えない1マイクロメートル以下のナノメートルレベルの生細胞外形や内部物質(神経軸のバリコシティなどの細い部分)の光・電気化学・原子間力同時イメージングを可能にするものである。こうしたバイオ用途のナノメートル分解能の顕微鏡システムが切望されている。電極としての電気化学(SECM)モードで測定可能な物質を増やすために、電極材料そのものの高機能化が必要であり、ECR スパッタナノカーボン膜電極や、金属ナノ微粒子分散カーボン電極を新しく開発し、これまで電極で観測できなかった核酸誘導体の測定に成功した。細胞外に放出された光学活性/電気化学活性物質を細胞近傍でリアルタイムに捉えることができ、その測定により細胞内物質の放出現象の理解が深まり、病理診断を可能にする。また、細胞モルフォロジーならびに細胞間隙に輸送される生理活性物質をイメージングすることは細胞間シグナルを知る上で重要である。このような生体細胞を電気化学的にイメージングする顕微鏡としてSECMがある。SECMは溶液中に介在させたメディエータのレドックス応答をモニタリングすることにより形状像、導電体・絶縁体の識別、局所領域でのレドックス分子の定量が可能である。本研究においては、まずナノプローブの鍵となる光ファイバーナノ電極を開発した。このプローブは、従来の金属ワイヤマイクロ電極をベースとしたプローブとは異なり、図10の測定概念図に示すように一本のプローブで電気化学・近接場光学・原子間力観察が可能なSPM マルチプローブとして完成させた。したがって、1 スキャンにより3 モードの化学的・物理的測定[近接場光(NSOM)・電気化学(SECM)・原子間力(AFM)を一つのプローブで同時に測定]ができる。まず、走査型顕微鏡システムの鍵となるナノプローブは、光ファイバーを利用し、導電性の金を蒸着後、絶縁物のポリマーを電着することにより、光学と電気化学センシングを組み合わせた世界初の多機能ナノプローブを作製した。このナノプローブ利用して生体反応のイメージ情報を取得することができ、細胞内外の物質間相互作用ならびに形状情報などの相関性をリアルタイムに測定することが可能となる。図10には走査型顕微鏡システムの鍵となるナノプローブのSEM写真を示す。光ファイバープローブ先端までポリマーコーティングされ、電極まで選択的に絶縁化されていることがわかる。特にその先端開口部はFIB(フォーカスドイオンビームエッチング)加工により開口させ100 nm以下での制御を行っており、高い水平分解能の高い蛍光・偏光観察が可能なプローブとなっている。

このマルチモード (SECM/NSOM/AFM) 走査型顕微鏡システムを用いて、PC12 細胞の形状観察を行った。その結果を図 11 に示す。PC12 細胞の軸索部分は、通常の顕微鏡では詳細に見ることはできないが、開発した顕微鏡システムでは3つのモード (SECM/NSOM/AFM) での観察が実現可能であった。分解能は 100nm 程度であり、3モード同時観察では世界最高能の分解能を実現した。

一方、現在用いられている SECM のモードとしては、レドックス種を用いた形状のイメージングや白金探針を用いた酸素、過酸化水素のイメージングなどに限定されている。細胞関連のより多くの生体分子をイメージングするためには、(1) 高い選択性の付与や (2) 電位範囲の拡大による測定対象分子の増加 (3) 高い触媒作用の実現による高感度化などが可能な材料開発が必要不可欠である。SECM の探針を修飾可能な材料としては3次元構造上に作製できる平坦な薄膜材料が理想だからである。そこでスパッタ法を用いた薄膜電極を着想した。結果的には現在までに画期的な3つの薄膜 (アモルファス ITO 薄膜、ECR ナノカーボン薄膜、金属ナノ粒子分散カーボン薄膜) 電極の創製に成功した。特に、酸素不足雰囲気で作製した ITO 薄膜電極ではドーパミンのみの応答が得られる画期的なものであり、代謝物の DOPAC、妨害物質である L-アスコルビン酸、尿酸の応答は殆ど観測されなかった。薄膜が正に帯電し、それにリン酸イオンが吸着してナノバリアを形成するため、アニオン性の分子と静電的な反発により高い選択性が実現されたものと予想され、ナフィオン膜のようなアニオン性の膜を用いる必要が無いことから、SECM などの微細な電極に利用でき、細胞応答のような速い応答の測定に向く。図 12 に PC-12 からドーパミン放出の観察結果を示す。インターバルなドーパミン放出がスパイク状に観測された。この電極以外で、このような観察は困難であり、有用性が確認された。

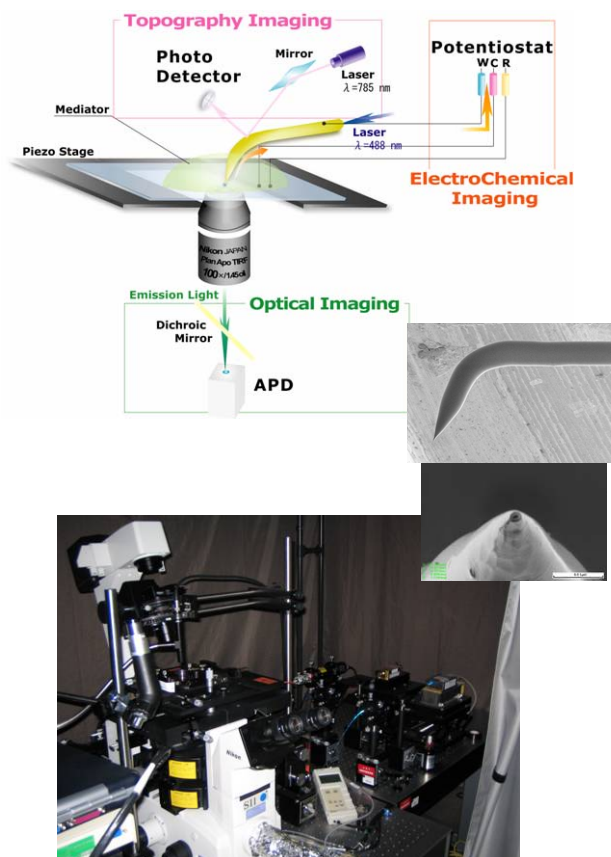


図 10 細胞のリアルタイム測定システム
マルチモード (SECM/NSOM/AFM) 走査型顕微鏡システム (それぞれ、中央: ナノプローブと先端部の SEM 写真、下: システム全体の写真)

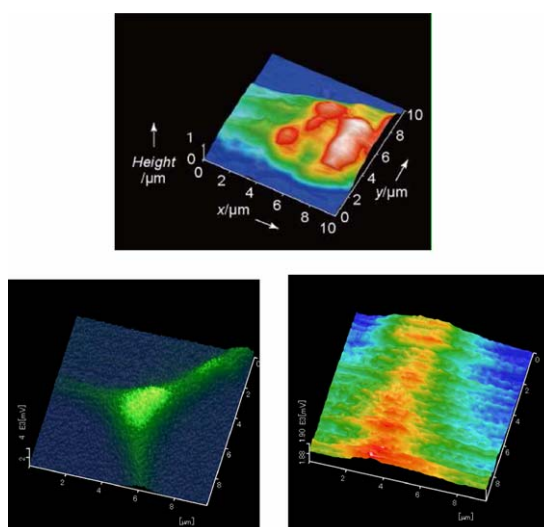


図 11 細胞のリアルタイム測定システムによる PC12 細胞軸索のイメージング
(それぞれ、上: AFM モード、左下: NSOM モード、右下: SECM モードのイメージング像)

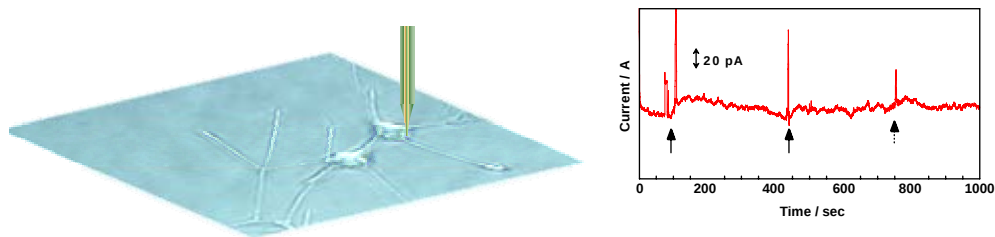


図 12 細胞のリアルタイム測定システムによる PC-12 からのドーパミン放出の観察軸索
(右の赤のグラフは、その応答)

(新たな目標からの展開)

従来の金属やカーボン電極では測定困難な酸化電位の高い生体分子の検出や濃度分布のイメージングが可能な材料として、ECR スパッタ法によりナノカーボン膜を開発した。この膜は、 sp^2 と sp^3 結合の混合した構造で、ナノレベルでの平坦性が良く ($Ra=0.7\text{Å}$)、数 nm の極薄膜も形成可能なためプローブ電極用薄膜として最適な材料である。また、ボロンドープダイヤモンド膜に準じる極めて広い電位窓と低ノイズを有する。膜はカーボンナノチューブを高密度に並べたような構造で、通常のグラファイトと異なり丸く閉じた構造が観測されているが、これは sp^2 と sp^3 結合の混合した構造に由来している。 sp^2 と sp^3 の比は作製条件で制御することができる。また、表面酸素濃度が低く、酸化されにくい特性を持つため、ダイヤモンド電極を超える画期的な材料である。図 13 右図に示すように、この膜電極の応用例として通常の GC 電極では測定が困難であった4種類全てのヌクレオチド (GMP, ANP, TMP, CMP) の酸化電位の決定に成功した。さらに、本薄膜では電極酸化後の分子が吸着して電極応答が低下する減少が抑えられることをビスフェノール A や NADH で実証し、高い生体適合性と安定性を有するプローブ開発の可能性を示した。また、図 13 左図に示すように、DNA のミスマッチ検出に、差分測定により成功し、SNP のダイレクト電気化学検出を可能とする画期的な方法を創製した。

一方、カーボンと金属を共スパッタすると、過酸化水素や糖に対し電極触媒活性の強く安定な金属ナノ粒子が分散したカーボン膜が得られることを見だし、新たなナノ粒子担持カーボン薄膜が創製された。上記の ECR カーボン膜やナノ金属微粒子カーボン膜は、形状を選ばず、基本的にはどのような形にもできるため、SECM 用のナノプローブの作製を試みている。この発展は、細胞の高感度イメージングと選択的なセンシングを可能にする。これらの創製された電極膜材料の応用範囲は広く、さまざまな電気化学応用を展開できる。

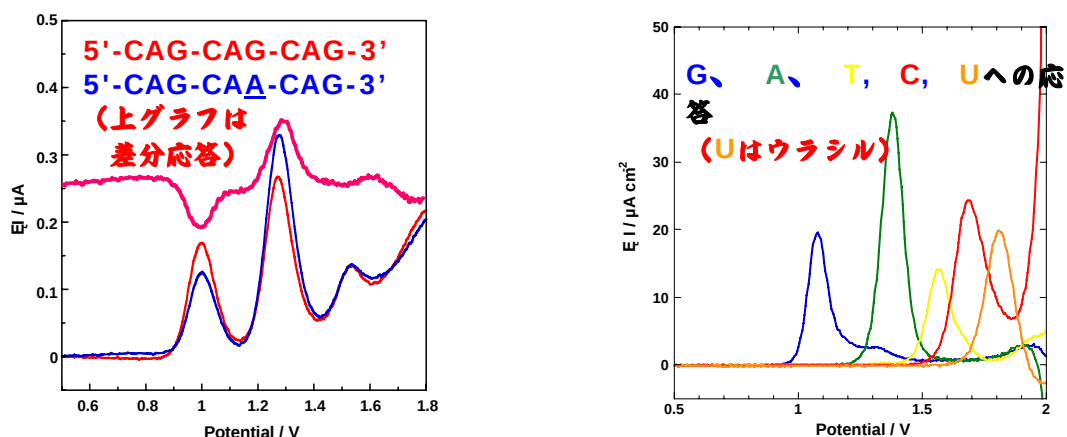


図 13 ECR スパッタ (Electron cyclotron sputtering) カーボン薄膜電極によるヌクレオチドの測定
(右はそれぞれの核酸に対する応答、左は DNA ミスマッチ検出への応用例)

2) 細胞応答観察システムの開発

[慶應義塾大学: 本田亜希、NTT: 岩崎弦、
神奈川県産業技術センター: 伊藤健、ほか]

細胞は外的刺激に応答し(インプット)、物質の放出(アウトプット)を行う。さまざまな細胞は、それぞれのインプットとアウトプットの一連の応答を有し、生命体とはこれらの集合体であるとも言える。本研究ではインプットとアウトプットの一連の応答を総合的に観察するシステムの確立を目標とする。この観察法は、前記の内容にあるリアルタイム・直接観察法ではなく、外界からの応答の結果を観察し、細胞のトータルアナリシスに役立てようとするものである。

本研究では、図 14 に示すように、マイクロ流体デバイス上で、細胞に様々な物質を投与し(インプット)、それぞれの物質に対して細胞が放出するイオンから蛋白までの一連の物質(アウトプット)の観察を網羅的に解析できるシステム開発を目指した。アウトプット観察とは、具体的には、細胞が放出する様々な物質の識別と、それらの物質と他のレセプターとの間の相互作用の強さの測定を行うことである。インプット→アウトプット物質観察はマイクロ流体デバイスを用いることで細胞から放出される微量物質の抽出・分離などのハンドリングが可能となる。この場合、デバイスであるナノ構造体(ナノドットセンサーなど)を内部に包括でき、さらにプローブの付加などと言った試料調製を一括して行うことができる。本研究で用いるマイクロ流体デバイスはポリマー樹脂を使い、安価で精度良くさまざまなパターンを生産が可能な作製法も開発した。

細胞への刺激はマイクロ流体デバイスを通して行い、放出された微量物質(タンパクや DNA など)物質との相互作用は、ナノドット SPR によって測定する。ナノドット SPR センサーを用いれば、レセプターとリガンドの相互作用を極微量のサンプルから観察することができ、それらの結合の強さを求めることができる。

また、定量にはマスプローブを新たに開発して用い、タンパク質や金属イオン、その他の低分子化合物を質量分析計によって同時検出、さらには定量を目的とした。なお、高分子量のタンパク質や DNA を定量する際には、その感度をあげるために、新たに開発したマスプローブとナノドットターゲットプレートを用いた。このナノドットプレートの融合は、1つのナノドットプレート SPR-MS 基板開発として結実し、新たなタンパク質検出の方法を創製した。

2-1) ナノパターンSPRによる生体分子相互作用測定とマイクロ流体デバイスの統合

細胞は化学物質による外部刺激に対して、化学物質を放出して他の細胞にシグナルを送り外部に作用を及ぼす。このようなシグナルのネットワークを生きた細胞でトレースすることは、遺伝情報に基づくバイオインフォマティクス的方法と同等に生命機構の解明と医療分野での応用に必要不可欠である。細胞は空間的・時間的にシグナル応答を変えるために、このシグナルネットワークの状態を測定するにはセンサーを含む一連のデバイスによって、サンプル近傍で高スループットに検出する必要がある。

これを実現するため、本研究ではセンサー部位にナノドット SPR センサーの作製と、分離等を行う部位としてマイクロ流体デバイス作製技術の開発を行い、これらを集積した、一連の測定デバイス(ナノドットプレート SPR-MS)を作製することを目指した。

測定部位に相当する SPR センサーとしては、ナノドット基板を用いた新しい局在表面プラズモン共鳴(Local Surface Plasmon Resonance, SPR)測定方法を提案し、モデル系での測定に成功した。

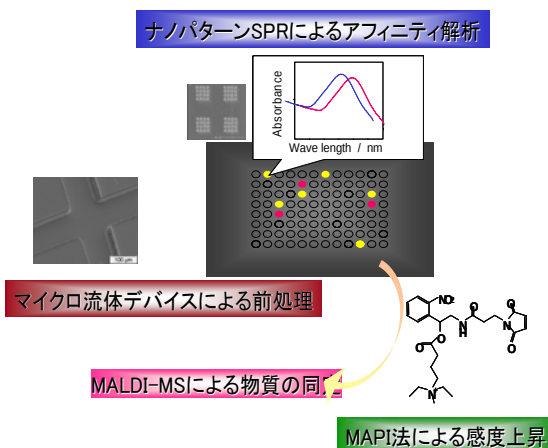


図 14 細胞応答観察システム

ペプチド・DNA・神経伝達物質など、細胞によって多様なシグナル分子を測定する必要がある、わずかな構造の違いを極微量サンプルで見分ける必要がある。さらに、シグナルを受け取る分子との反応速度(相互作用の強さ)を測定する必要がある。これらの測定には生体分子相互作用を無標識で測できる利点のある表面プラズモン共鳴(SPR)法がある。しかしながら、従来用いられている SPR センサーは、バルクプリズムを用いる大型装置で用いられるものであり、この方法では、例えば、シグナル分子をサンプリング後、即時に測定したいという目的には不向きである。また、近年提案されている、金や銀のナノサイズパターンを用いる LSPR 測定法は、高スループット測定や、小規模の測定には適しているものの、測定法が複雑になる点と感度の点に欠点がある。

そこで、本研究では、図 15 に示すようなナノサイズの金パターンによるSPR効果とマイクロサイズの光の回折効果とを組み合わせた原理によるシグナル分子のトレース用のセンサーを新たに開発した。また、この効果を実現するナノドットSPR基板を作製した。さまざまな基板のパターン形状を検討した結果、図 15 に示す多数ナノサイズ楕円によるホットスポット(金薄膜淵部の近接部分)がより大きな LSPR 応答を取得することに最良であることが分かった。

一方、上記 LSPR センサーを集積するマイクロ流体デバイスの作製については、新たに低コストな作製方法の検討を行った。微小空間を用いた化学・生化学分析は化学操作の基本単位である反応、分離、抽出、検出などと組み合わせ、省資源、省サンプル、短時間での測定を実現している。しかしながら、現在開発が進んでいるのは、半導体等の加工技術の応用が容易で、かつ耐薬品性の高いガラス、シリコン基板が主である。しかし、本研究のように、細胞ドックとしての応用を考えたときには、細胞を育成するための高い酸素透過性が必要であり、従来のシリコン・ガラスを用いたデバイスでは困難であった。ポリマーを利用すると上記の問題を克服でき、なおかつ低コストで大量に供給が可能であることから同時・大量診断技術への展開が計りやすい。そこで、ポリマーを用いたマイクロ流体デバイスの開発が行われるようになり、微細加工により作製された母型にメッキを行い、金型を作製し、それをポリマー基板に押しつけて転写する(インプリント)技術や、その金型を利用した射出成形などが大量生産に利用されてきた。また、簡便なデバイス作製手法として、厚膜のレジストをパターンニングして母型を作製し、エラストマーに転写してマイクロ流体デバイスを作製する技術がある。そこで、ロール to ロールプロセスを利用でき、多品種少量生産に向けたマイクロ流体デバイスの作製手法を2種類開発した。

具体的には、一つ目は材料として、感光性シート(または、フィルムレジスト、ドライフィルムとも呼ぶ)を流路構造体、および基板との接着層として利用する技術、二つ目は感光性シートを母型とし、メッキを行うことで金型を作製する技術である。後者の応用例として、最終的に図 16 の SPR-MS 基板用のマイクロ流体デバイスを開発することができた。

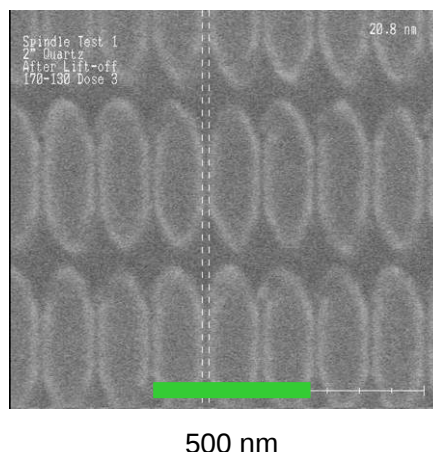


図 15 ナノドットSPR基板
(楕円部分が金薄膜)

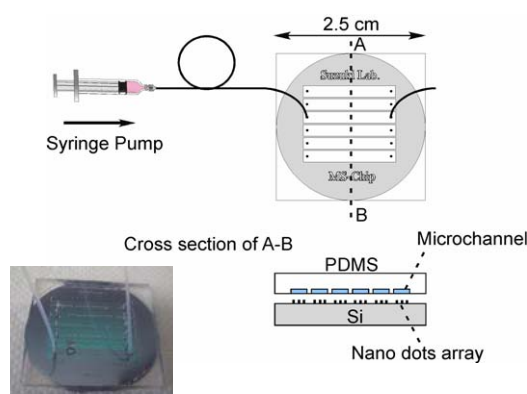


図 16 ナノドットSPR基板用流路デバイス(左が写真)

2-2) MPAI 法を用いた質量分析計によるトータルアナリシス

質量分析計は非常に網羅的な測定ができ、様々な微量物質の検出および定量測定に有効である。しかしながら、分子によっては、質量分析に不可欠なイオン化が効率的になされず、感度が不十分で定量性が低いなどの問題がある。また、分子量の大きなタンパク質は、分子量の決定はブロードで小さなピークでなんとかできたとしても、混合物での測定や、定量は困難である。本研究では、さまざまな分子を測定するためのマスプローブをデザインし、これらを用いて非常に簡単に効率的に分子をイオン化する MPAI (Mass Probe Aided Ionization) 法を提案した。MPAI 法により、タンパク質を質量解析にて、同時にかつ網羅的に定量する分析法開発を目指した。

タンパク質量量用マスプローブは、光による切出しが可能な「おもり」を試料に付加し、切り出された単純な「おもり」の数を、質量分析計で数えることで、網羅的かつ定量的解析を行えるようにするマスプローブである。マスプローブ分子の例を図 17 に示す。これまでにさまざまな分子量のおもりを持つマスプローブのデザインと合成方法の確立を行い、実際には KMP-166, KMP-174, KMP-188, KMP-194, KMP-222 の5種類のプローブの合成を行った。図 17 に示すマスプローブでは特定の分子量をもつ標識部位と、UV 照射により切断される光開裂部位、標識部位が高い感度で質量分析計にて測定されるためのイオン化部位と、試料との結合部位を有する。具体的な測定例としては、KMP-174 と KMP-188 を使い、ビーズに固定化したタンパク質の定量を行い、直線性のある検量線と良好な定量結果を得られることを実証した。

加えて、マスプローブをより効果的に用いるための、MALDI 用高感度ターゲットプレートの開発を行った。MPAI 法は ESI MS (Electrospray Mass Spectrometer) や MALDI MS (Matrix Assisted-Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer) に有効に用いられるが、MALDI MS はとりわけハイスループットな測定に適しているにも関わらず、その再現性が低く、感度が十分でないなどの問題点がある。我々は新たに熱酸化シリコンウェハーにナノサイズ加工を施した新規ナノドットターゲットプレートの開発を行った。このターゲットプレートには、大きさが 30 nm サイズの金属のドットが 60 から 120 nm 間隔で付されている。特に測定の再現性を保つことが困難である DNA 分子を用い評価をしたところ、この新規ターゲットプレートを用いることで、再現性が飛躍的に向上した。現段階ではドットの幅が大体 500 nm 以下であればこのような効果が観察されること、また、金属としては、プラチナ、金、チタンなどが用いられることがわかった。このナノドットターゲットプレートとタンパク質量用マスプローブを併用すると、タンパク質を MALDI MS により、マトリクスなし (Matrix free) のイオン化測定を実現できた。

さらに、図 18 に示す SPR-MS 基板用でも同様のタンパク質 MALDI MS 測定が可能であり、最終的にマイクロ流路デバイスを開発することができた。

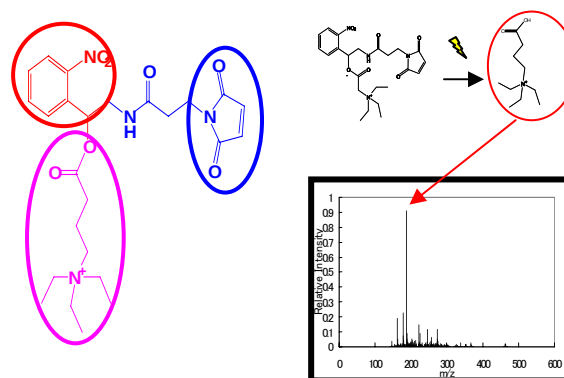


図 17 タンパク質分析用マスプローブ (特定の分子量をもつ標識部位 (青部)、UV 照射により切断される光開裂部位 (赤部)、および標識部位が高い感度で質量分析計にて測定されるためのイオン化部位 (桃色部)、を有する

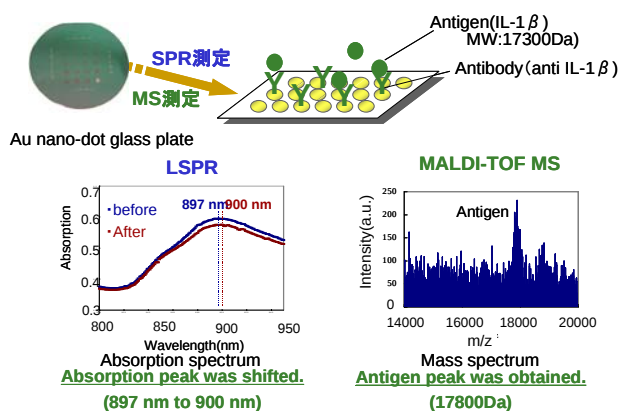


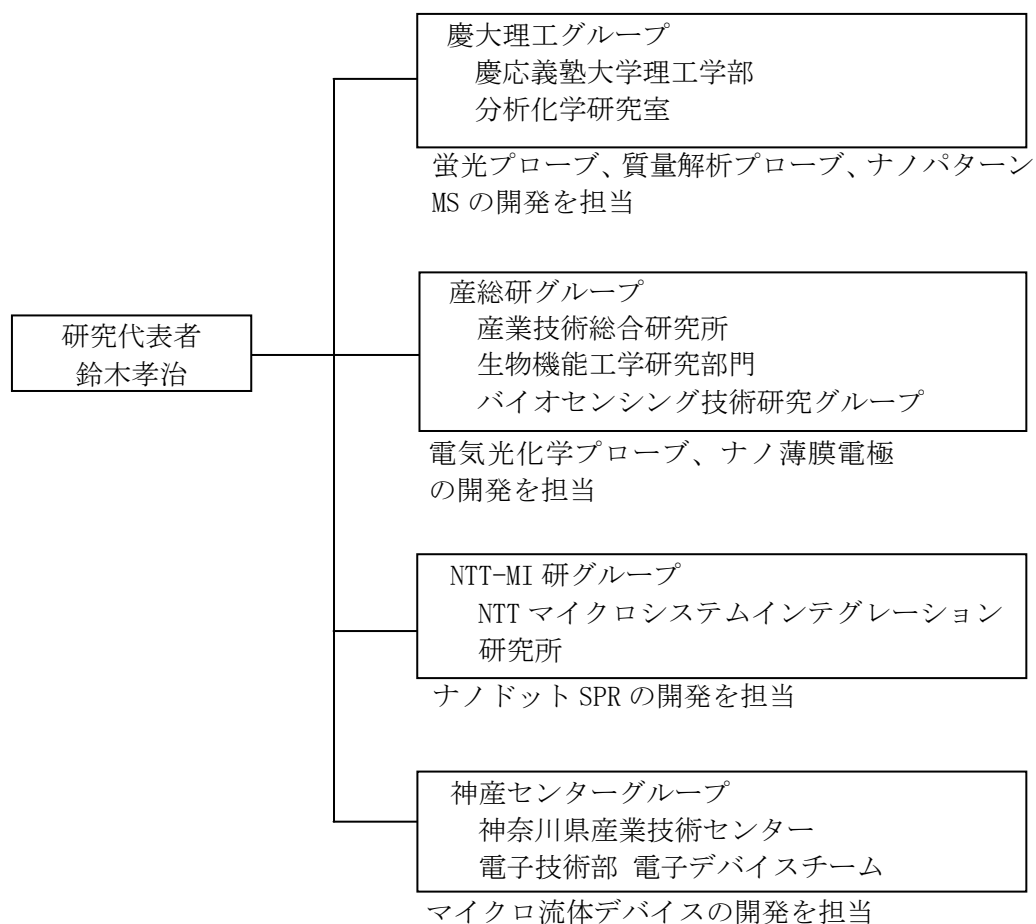
図 18 ナノドット SPR-MS 基板による抗原タンパク質の測定例

以上により、当初目的の新規バイオセンシングプローブおよび関連新技術創製研究は達成され、それらは以下の「単一細胞レベルの動態解析」の基盤分析技術が誕生した。

1. 新規光プローブ/マルチイメージングプローブ
→細胞内マグネシウム・カルシウム蛍光プローブ用を開発
2. 細胞観察プローブ
→ナノ分解能イメージングのための走査型マルチモード (SECM/NSOM/AFM) 顕微鏡システムを開発
3. ナノプローブ電極用新規ナノ材料創製
→ECR ナノカーボン薄膜/アモルファス ITO ナノ薄膜新材料を開発
4. MS プローブの開発
→数種の新規タンパク質検出プローブを開発
5. ナノドットセンサーデバイスの開発
→ナノドット SPR および MS 基板、さらに LSPR-MS 基板プレートを開発

(2)実施体制

研究機関別のグループ構成を以下に示す。



3 研究実施内容及び成果

3.1 慶大理工グループ

3.1.1 蛍光プローブ(細胞内イオンの動態解析用プローブ開発)

(1)研究実施内容及び成果

蛍光プローブを用いた蛍光イメージングは細胞の高感度、高速な空間、時間的な解析を行うことができることから、生物学、薬学の分野で広く用いられてきた。

優れた蛍光プローブの開発は蛍光イメージングの進歩において非常に重要であるが、現在までにカルシウム蛍光プローブ Fura-2, Fluo-3, マグネシウム蛍光プローブ KMG-20, 104(当チーム), 一酸化窒素蛍光プローブ DAF など、高い選択性を有する蛍光プローブが開発されており、これらの蛍光プローブを用いた特定の物質の観測が盛んに行われてきた。しかしながら、生体のシグナル伝達というものは、多数の物質のやりとりからなり、それを解明するためには複数物質を同時に検出する方法が必要である。複数の蛍光プローブを細胞に導入することで複数物質を測定することは行われ始めているが、侵襲性(毒性)が大きくなること、複数のプローブの蛍光の重なりが生じること、蛍光プローブごとに局在、代謝、光分解の速度が異なることによって、定量的な判定を難しくする。

そこで、我々は一つの新しいアプローチ、「単分子マルチセンサー(プローブ)による複数物質同時定量」を提案し、細胞に応用するとともに、さらなる解析のために、局所センシング用プローブを提案した。

単分子マルチセンサーは複数物質を異なる応答で認識し、それを測定することができる分子センサーであり、複数のセンサーの有する機能を一つの分子で果たすことができる。ここでは、細胞内でもっとも変化量が大きく、セカンドメッセンジャーとして働くカルシウム、および細胞内でもっとも存在量が大きく補酵素として働くマグネシウムに焦点をあてて、カルシウム・マグネシウムマルチ蛍光プローブの開発を目的とする。

最初のカルシウム・マグネシウムマルチ蛍光プローブ KCM-1 は、図 19 に示すように蛍光団としてクマリン、クマリンのドナーサイトにカルシウム選択性の配位サイトとして、BAPTA (O,O'-bis(2-aminophenyl)

ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid) アクセプターサイトにマグネシウム選択的配位サイトとしてチャージドベータジケトン構造を持つように設計した。それぞれ、ドナーサイトでカルシウムイオン、アクセプターサイトでマグネシウムイオンを選択的に補足し、ICT(分子内電荷移動)応答メカニズムにより、吸収スペクトルの最大吸光波長がそれぞれブルーシフトおよびレッドシフトと異なる応答を示す。

また、BAPTA 部位にはフッ素(F)を導入することで、細胞内で有効な範囲のカルシウムアフィニティを有してマグネシウムに応答しないように設計した。最終的には、ベンゾキノンを出発物質とし、BAPTA 誘導体中間体を経て KCM-1 の合成に成功した。

KCM-1 は図 20 に示すように、細胞内条件のバッファ(pH7.2 HEPES, 130mM KCl, 20mM NaCl)中で、カルシウム濃度の増大に伴い、吸収スペクトルでの45nm のブルーシフト、蛍光スペクトルでの5nm のブルーシフトを示す。一方、マグネシウム濃度の増大に伴って、吸収スペクトルでの21nm

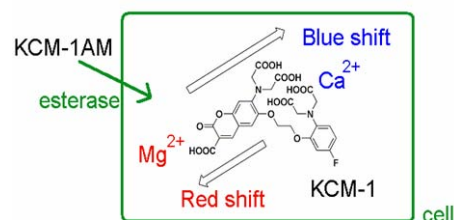


図 19 KCM-1 の分子構造と応答機構

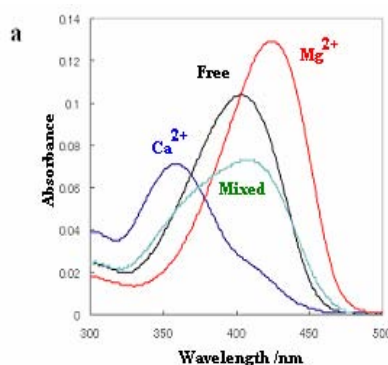


図 20 KCM-1の応答

のレッドシフト、蛍光スペクトルでの5nm のレッドシフトを示した。これらの応答特性は、当初の分子設計の概念に適合するものであった。また、カルシウムに対するKdは16 μ M、マグネシウムに対するKdは26mMであり、それぞれ細胞内の濃度レベル(Ca^{2+} 0.1~10 μ M、 Mg^{2+} 1~10 mM)に適するものである。

実際のカルシウムおよびマグネシウムを共存させた溶液の中で、KCM-1 はそれぞれ低濃度の時には独立した応答の振る舞いを示し、細胞内のカルシウム・マグネシウムの濃度範囲よりもかなり高濃度の状態ではそれぞれのイオンが競合するような応答の振る舞いを示した。この応答の振る舞いは、一方のイオンの結合がもう片方のイオンに対する結合を電子的吸引効果によって抑制する(アロステリック効果)ためである。それらの化学平衡論的な理論からの考察により、カルシウムとマグネシウムを同時に定量する数式を導き出し、蛍光イメージングの際に蛍光プローブの局在、代謝、分解などの影響を受けない蛍光比の形に解くことが可能であり、カルシウム・マグネシウムの値を高精度に同時に検出可能であることを実証した。実際に、細胞膜透過型のアセトキシメチルエステル体であるKCM-1AMを合成し、蛍光顕微鏡下で励起三波長切り替えによる画像取得を行い、それを蛍光画像のピクセル毎に計算することで、細胞のカルシウム・マグネシウムの同時イメージングを行った。ミトコンドリア脱共役剤FCCPによってミトコンドリアを刺激した際のカルシウム換算値、マグネシウム換算値の変化とその際のを図21に示した。FCCPの刺激によって、ミトコンドリア内部に存在するカルシウムおよびマグネシウムの両方が放出されていると考えられ、ミトコンドリアは細胞内のマグネシウムストアであるという知見を確認した。また、カルシウム応答はマグネシウム応答より速く起こる傾向があり、ミトコンドリアの膜を通したそれらの輸送が異なるメカニズムを有することを提案する結果であった。

また、さらにミトコンドリア内のイオン動態をイメージングするため、ミトコンドリアに局在化するマグネシウムプローブであるKMG-301のデザイン、合成を行った。図22に示す構造のKMG-301は、従来ミトコンドリアに局在することが知られるローダミンの骨格とチャージドベータジケトン骨格を有し、PET型のオン/オフ応答で、マグネシウムに応答し、最大で蛍光が12.6倍に増加する。KMG-301をエステル化したKMG-301AMを用いてPC12内に導入し、KMG-301がミトコンドリアのマトリクスに局在することを確認した。細胞質に局在する従来のマグネシウムプローブKMG-104とミトコンドリアに局在するKMG-301を用いて、二波長励起で、マグネシウムの動態をすることができ、これを用いPC12細胞がFCCPに応答し、マグネシウムがミトコンドリアから細胞質に放出される様子を確認することにも成功した。

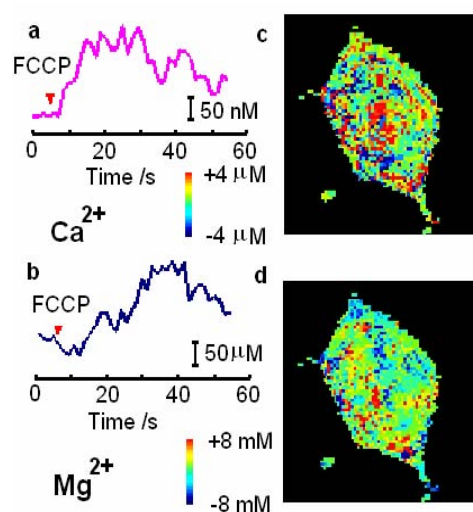


図21 KCM-1を用いた細胞イメージング

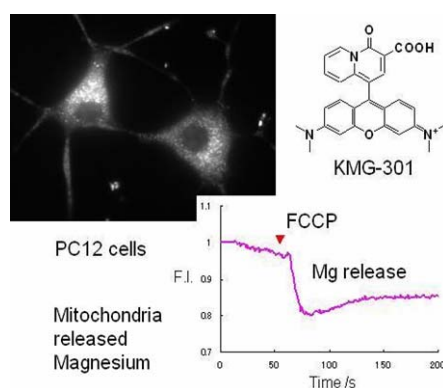


図22 KMG-301の分子構造と応答

(2)研究成果の今後期待される効果

生体のシグナル伝達は、多数の物質のやりとりからなり、それを解明するためには複数物質を同時に検出する方法が必要であり、単分子マルチセンサーならびに局所センシング用プローブは

細胞イメージングのために非常に重要である。特に細胞内マグネシウムの存在は知られるものの、その働きについてはよく知られておらず、本プローブを用いた解析が期待される。

3.1.2 質量解析プローブ(細胞内物質の網羅的解析用プローブ開発)

1) 質量分析プローブの開発

質量分析計は分子をイオン化して検出する。イオン化の方法は様々あり、装置によって異なるが、1980年代末に相次いで実用化され、ノーベル賞の受賞の対象になったエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)¹⁾⁻⁴⁾マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)⁵⁾⁻⁷⁾が生命科学の分野ではよく用いられる。これらはソフトなイオン化で、DNA やタンパク質などのような生体分子を壊すことなく検出することができる。なかでも ESI-MS は液体クロマトグラフィーと組み合わせることができ、数千にも上る分子の同定を可能として、生体分子の同定に進歩をもたらした。

一方、質量分析計ではイオン化した分子以外は検出されないため、多様な分子の検出、特に定量に用いるためには、現状ではいくつか問題点がある。すなわち、1) 試料分子の特性によりイオン化効率が異なる。2) 試料分子の環境によりイオン化効率が異なる。3) 試料により測定条件が異なる。ことが挙げられる(13) - (18)。これらを克服するために我々は質量分析のためのケミカルプローブである「マスプローブ」の開発を行い、マスプローブを用いたイオン化法「MPAI 法 (Mass-Probe Aided Ionization)」を提案している。マスプローブは測定したい多様な物質が効率よく観察されるよう、これらの物質を特異的に一価イオン分子にする。また、多様な物質を、質量分析計の設定を変えずに測定することを可能にするため、検出される m/z の範囲が極端に異ならずに検出される様に調整する役割も有する。以下に様々な分子に合わせて設計したマスプローブを紹介する。

1. 1) 低分子化合物測定のためのマスプローブ

低分子化合物を測定するためのマスプローブを図 23 に示す。それぞれのマスプローブはイオン性官能基としての 4 級アンモニウム基と、測定対象物質との結合部位を有しており、官能基に特異的にイオン化を行う。測定対象物質との結合部位は、様々な官能基に自在に付け替えることが可能であるため、幅広い物質に適用することができる。これらのプローブは、ベンゼン環とアルキル基を持っているため、適度な脂溶性があり、極性溶媒だけでなく非極性溶媒にも溶解する。合成した質量分析用 MS プローブの特性を、誘導体化の前後で ESI-MS を用いて評価し、各質量分析用 MS プローブの有用性の検討を行ったところ、KAP-CA01 によるカルボン酸化合物の誘導体化の例として、胆汁酸の成分の一つであるコール酸単独および KAP-CA01 でラベル化した後のマスペクトルを図 24 に示す。コール酸単独では、分子イオンピークは観察されず、 Na^+ が付加したピーク ($m/z = 431.0399$) が観察されたが、強度は低く、ノイズレベルの感度しか観察されなかった。一方、KAP-CA01 でラベル化すると、誘導体化合物の分子イオンピーク ($m/z = 713.0755$) が明瞭に観察され、その強度はコール酸単独の時と比較して大幅に増加し、ピコモルオーダーの微量サンプルでも検

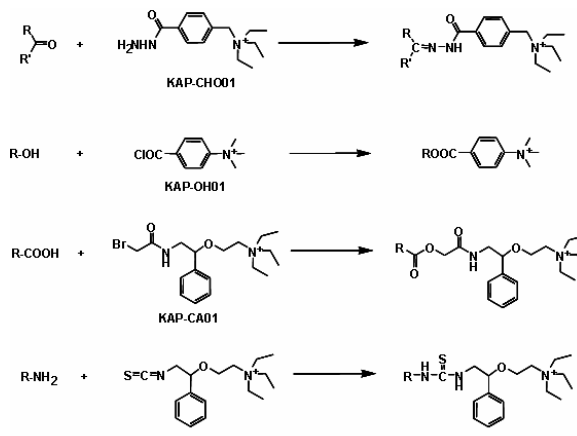


図 23 低分子化合物測定のためのマスプローブ

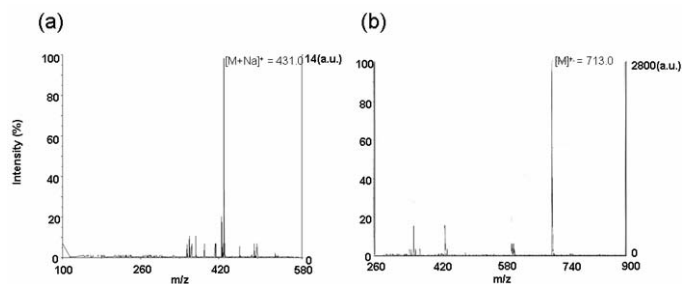


図 24 マスプローブを用いたコール酸測定

出することが可能となった。

さらに、図 25 のような核酸の誘導体化に用いるラベル化試薬として KAP-NB シリーズ(KAP-NB01, KAP-NB02)を作製した。これらはそれぞれシトシン塩基、グアニン塩基と特異的に反応し、それらの塩基を有する核酸分子の MS 測定の感度を向上する。

1. 2) 質量分析用 MS プローブを用いた酸化ストレスマーカーの検出

上述した核酸分子用の誘導体

化試薬である KAP-NB シリーズは酸化ストレスのマーカーである酸化損傷 DNA の定量測定に有効に用いることができる。DNA は酸化ストレスにより切断、欠失、修飾などを受け、その一部は尿中に排出されることから、8-ヒドロキシデオキシグアニンに代表される損傷DNAが酸化ストレスのマーカーとしてのように測定される。これらの量を測定すると生活習慣病との相関を示すことより、近年、測定の需要が高まっている。

KAP-NB02 と 8-OHdG は 45℃で 60 分間反応し、ESI-MS で測定を行ったところ、図 26 に示すように目的のピークを得ることができた。内部標準としてベンジルトリエチルアンモニウムを用いて測定を行ったところ nM レベルの検出が可能であり、KAP-NB シリーズを用いない場合と比較し約 10 倍感度は上昇した。これらを用いて尿等における核酸関連物質の感度を選択的に向上することができ有用性が期待される。

1. 3) 切断部位をもつMSプローブ

質量分析装置は混合物の測定ができ、また微量な試料の測定が可能であることから、生体試料の同時定量に用いられることが期待される。これまでに示したマスプローブは低分子化合物の検出には適しているが、タンパク質やDNAなどの巨大分子はイオン化をしただけでは、上記目的は達成できない。なぜなら、通常タンパク質やDNAを質量分析で測定しようとする、多価イオンピークとして検出され、同定するためには多価イオンピークから、もとのタンパク質の分子量を計算することが必要となるからである。単一タンパク質の同定という目的であれば、それでよいが、多様な生体物質と同じ条件で、しかも感度よく定量的に測定しようとする、多価イオンのままでは不都合である。

そこで我々は DNA やタンパク質等の生体試料の同時定量を質量分析で行うために、切断部位を持つプローブを作製した。これらのプローブは紫外線の照射により切断される光開裂部位と、試料に特異的にラベル化するための

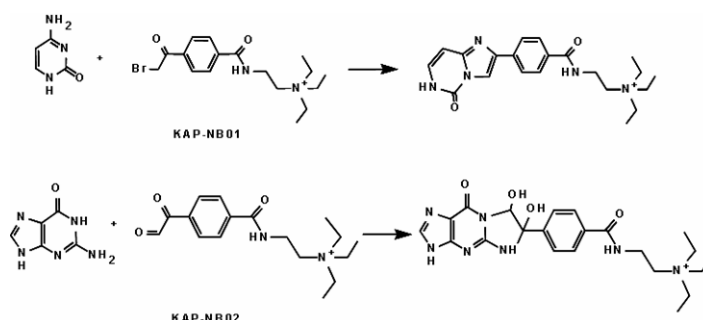


図 25 核酸分子測定用マスプローブ

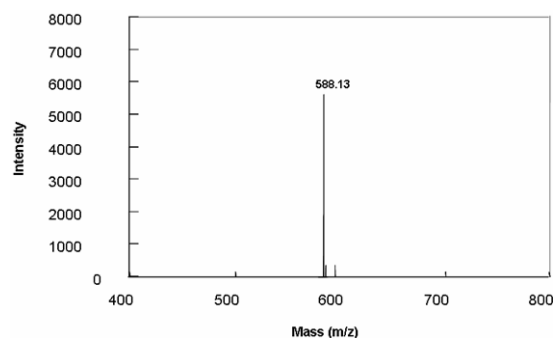


図 26 マスプローブを用いた8-OHdG の検出

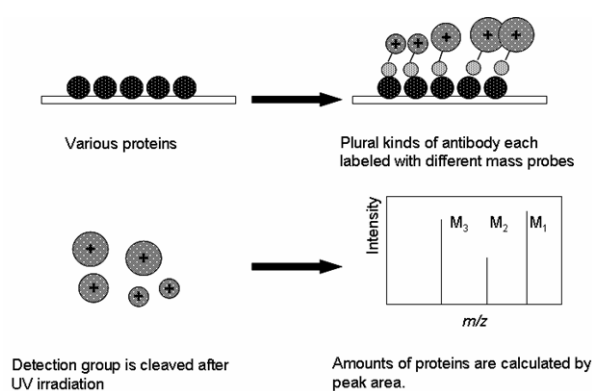


図 27 切断部位をもつ MS-プローブを用いたタンパク質測定概念図

結合部位、それに質量分析装置にて観測される検出部位よりなる。検出部位の分子量を様々に変えることで、同時に複数の試料の測定が可能である。このようなプローブを用いて図 27 のようにタンパク質を網羅的に同時定量することが可能となる。すなわち、あらかじめリガンドとなるタンパク質を種類ごとに異なる分子量の検出部位を有するプローブでそれぞれラベル化しておき、これを固定した試料と相互作用した後に UV 照射により検出部位のみを切り出し、質量分析装置で測定することにより、試料中に含まれる各タンパク質の量を知ることができる。このような方法を用いれば検出部位の分子量をラベル化剤として用いれば、バリエーションを無数に増やすことができ網羅的定量が可能となる。切断部位をもつマスプローブである KMP シリーズの一例である KMP-174 のデザインと、これを UV にて切断したときのマスペクトルを図 28 に示す。あらかじめ予想される 174 の分子量に、一価のピークとして検出され、高い定量性も得ることができる。さらには、図 29 に示すように、バリエーションとして様々な切断部位を持つマスプローブを合成した。さらに、KMP-174 ならびに KMP-188 でラベル化した抗体を用いて、鶏卵白リゾチームおよびオバルブミンを測定した結果を図 30 に示す。

2) ナノターゲットプレート

DNA の質量解析は MALDI MS により可能であるが、その再現性、感度等が低く、利用は一部のみに留まっている。質量分析を用いれば、短時間に、塩基長のみでなく、分子量情報を得られるため、一塩基多型の解析や、DNA の塩基配列の解析に有用であり、DNA の質量解析における再現性の向上が望まれる。今回報告する方法によれば、新規ターゲットプレートを通常のターゲットプレートの代わりに用いるのみで、特別の操作なく、簡単に再現性が向上する。新規基板は図 31(a-c)に示すように、約 30nm の白金の金属のドットを SiO₂ 上に 60、90 または 120 nm 間隔が施されている。これらのターゲットプレートと、市販のターゲットプレート (massive, Bruker Daltonics) を用いて、DNA のマスペクトルの取得の再現性の比較を行った。比較のための DNA 試料は、3 種類の異なる分子量 (MW: 4893, 5816 and 6713) の DNA の混合物を 5 pmol/l で用いた。マトリックスとして 3 ヒドロキシピコリン酸を 10 mg/ml で用いた。マスペクトル取得の成功率はそれぞれのウェル中を 6ヶ所を照射して、平均を求めた。その結果、

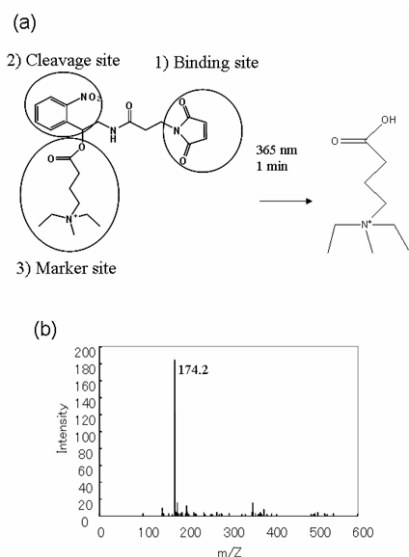


図 28 KMP-174 のデザインと切断部位のマスペクトル

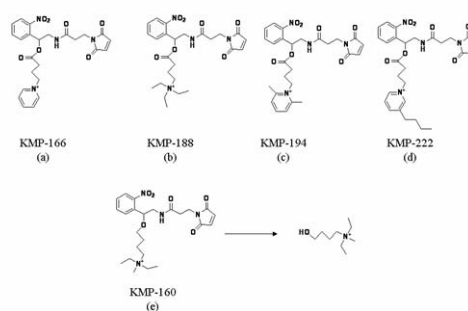


図 29 切断部位をもつマスプローブのバリエーション

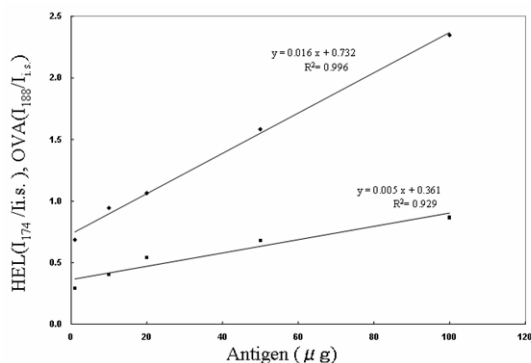


図 30 マスプローブを用いたタンパク質の測定

ナノドットターゲットプレートを用いた場合その再現性は 84% (60 nm), 77% (90 nm) and 68% (120 nm) であり、一方、市販のターゲットプレートを用いた場合は 13.9%であった。また、ナノドットターゲットプレートを用いた場合は S/N 比並びに分解能が上昇しており、これらが成功率の向上につながったと考えられる。図 31(d-g)に示す SEM 像より、微細加工を施したターゲットプレート上では、そうでないターゲットプレートと比較し、より明確な針状結晶構造をとっており、このことが再現性の向上をもたらしていると考えられる。

3) マスプローブを用いたソフトレーザー脱離イオン化法

上述のマスプローブはさらにソフトレーザー脱離イオン化法に応用される。通常ソフトレーザー脱離イオン化法による測定は、イオン化を促進するために、マトリクス分子を必要とする。しかし上述のプロブはソフトレーザー脱離イオン化法で切断部位が切断され、さらに、マトリクスを用いることなく検出することができ、新たなイオン化方法として期待される。すなわち、ターゲットプレート上に切断部位を有するマスプローブでラベル化した試料を塗布し、マトリクスなどを用いることなく、そのまま MALDI TOF 装置に導入すれば、切断部位のみが検出される。図 32 に KMP-174' をターゲットプレート上で測定した例を示す。抗体を KMP-174' でラベル化し、マトリクスを用いることなくソフトレーザー脱離法で測定したところ、切断部位のみが定量的に検出されることも確認した。本方法は新たなイオン化法として、大きく期待される。

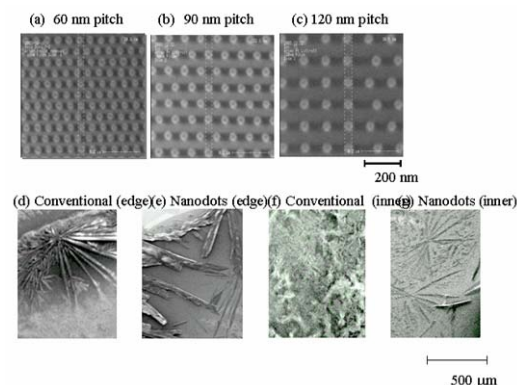


図 31 ナノドットターゲットプレートの SEM 像

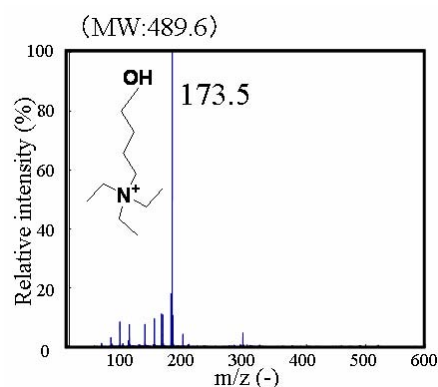


図 32 ソフトレーザー脱離法によるマスプローブの検出

(2)研究成果の今後期待される効果

質量解析は短時間に測定が可能で非常にすぐれた解析法であるが、イオン化効率が低いなどの問題があり、いまだ検出される分子は限定されるため、現時点では主に基礎研究に用いられている。本研究により、低分子化合物、DNA、タンパク質といった生体分子のイオン化効率を高めることが可能となり、より広い対象物を簡単な手法で感度よく検出できるようになった。マスプローブを用いることによって特に生体分子の質量解析が医療分野などにも用いられることが期待される。

3. 2 産総研グループ

3.2.1 電気光化学プローブ(細胞外形状、細胞内物質の観察法開発)

(1)研究実施内容及び成果

本研究は、産総研グループ、慶應大学グループの共同で行った。

単一細胞レベルにおいての神経伝達物質とイオンの相関性などは多く報告されているが、それらの細胞局所部位での相関性のリアルタイム同時計測は困難とされている。この問題を解決するため我々は、局所領域での電気化学・光学・形状が同時イメージング可能な走査型電気化学・近接

場光学・原子間力顕微鏡 (SECM/NSOM/AFM) の開発、および細胞への適応を目標として研究を行ってきた。この装置系を作製するため、SECM/NSOM/AFM に搭載可能な nm オーダーの電極径を有する光ファイバー型ナノ電極の開発を行った。電極作製工程を図 33 に示す。まず、光ファイバー先端(図 33-A)をフッ酸緩衝溶液による浸すことで選択的エッチングを行い先鋭化した後(図 33-B)、次に導通を保持するため金をスパッタした(図 33-C)。その後、このプローブにアクリル系ポリマーを電着し(図 33-D)、乾燥した際のポリマーの体積収縮を用いてプローブ先端のみを微小電極化した。(図 33-E)

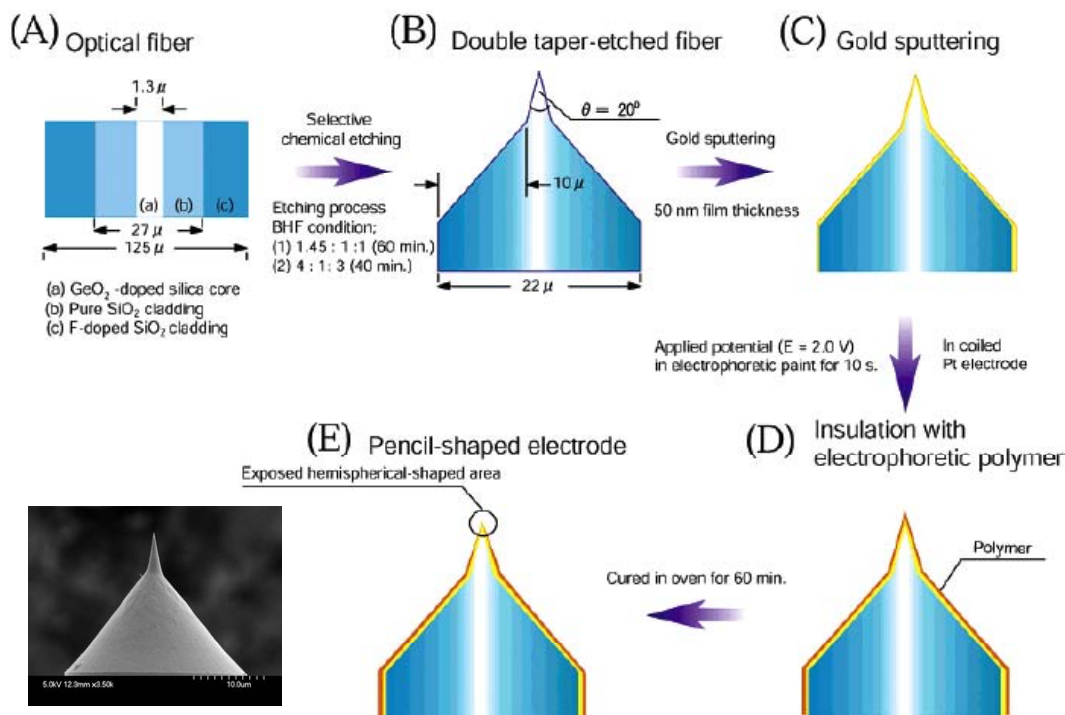


図 33 プローブ作製工程(左下は SEM 写真)

作製した微小電極の電極径はサイクリックボルタンメトリー(CV)により算出した。

$$i_T = 2 \pi n F D C r$$

D : 拡散係数 ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$: $6.5 \times 10^{-6} / \text{cm}^2$) F : ファラデー定数 r : 電極半径

微小電極の先端から取得したサイクリックボルタモグラムはシグモイダル形状であり、 10^{-10} A オーダーの電流値を有することから半径約 100 nm の電極であることが確認された。このプローブの特性評価として埋め込み形くし型電極(金幅 25 $\mu \text{ m}$ 、ガラス幅 35 $\mu \text{ m}$)の電気化学・光学同時ラインスキャンを行った。電気化学応答では Au 上においてポジティブフィードバックに起因する 42% の電流値上昇と、ガラス上においてネガティブフィードバックに起因する 36% の電流値減少が確認された。また、光学応答では Au 上での遮光とガラス上での透過が確認され、電気化学応答と対応したデータの取得を達成した。

この光ファイバー型ナノ電極を用いて形状イメージングを行うため、プローブをベント化して光てこフィードバックの系を導入した。これにより AFM タッピングモードによる形状取得可能な SECM/NSOM/AFM 用ベントプローブを作製した。一般的に報告されているハイブリッド型プローブの分解能は $\mu \text{ m}$ オーダーであるのに対し、このプローブは電気化学、近接場光学、形状におい

それぞれ 500 nm 以下の水平分解能を有し、細胞の局所レベルでのイメージングが可能であることが確認された。このベントプローブを用いて神経細胞のモデルとして用いられるラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞の軸索イメージングを行った。まず軸索先端の形状イメージングを AFM タッピングモードにて行った(図 34-a-1)。その結果、一般的な光学顕微鏡では確認が困難なオーダーである幅 800 nm、高さ 150 nm のバリコシティと思われる構造体を確認した。バリコシティは細胞膜上のカテコールアミン類のリリースに関与している部位であり、今後この部位でのさらなる解析を検討している。次に吸着の影響を考慮し生細胞 PC12 の SECM/NSOM による Constant height での同時イメージングを行った。つまり、SECM ではメディエータ中にてネガティブフィードバックモードを用いることで、電気化学応答に由来する形状を、また、NSOM では Ca^{2+} を選択的に補足する蛍光色素(Fluo-4) をラベル化した生細胞 PC12 をイルミネーションモードにて近接場光学応答を取得した。この結果、NSOM イルミネーションモードによる蛍光強度増大(図 34-b-1)と SECM ネガティブフィードバックモードによる電流値減少(図 34-b-2)が軸索部位において対応した。さらに、軸索レベルにて蛍光強度に分布があることが確認された。この分布のオーダーはさきほどのバリコシティのオーダー(約 800 nm)と同じであるため、この Constant height SECM/NSOM モードにおいてもバリコシティオーダーでの解析が可能であることが示唆された。これにより SECM/NSOM/AFM が一般的に困難とされる軸索レベルでの 3 モードバイオイメーキングに適応可能であることが示された。今後、刺激を加えた際のバリコシティでの蛍光ラベル化イオンの近接場光学応答やカテコールアミン類の直接検出を行う予定である。

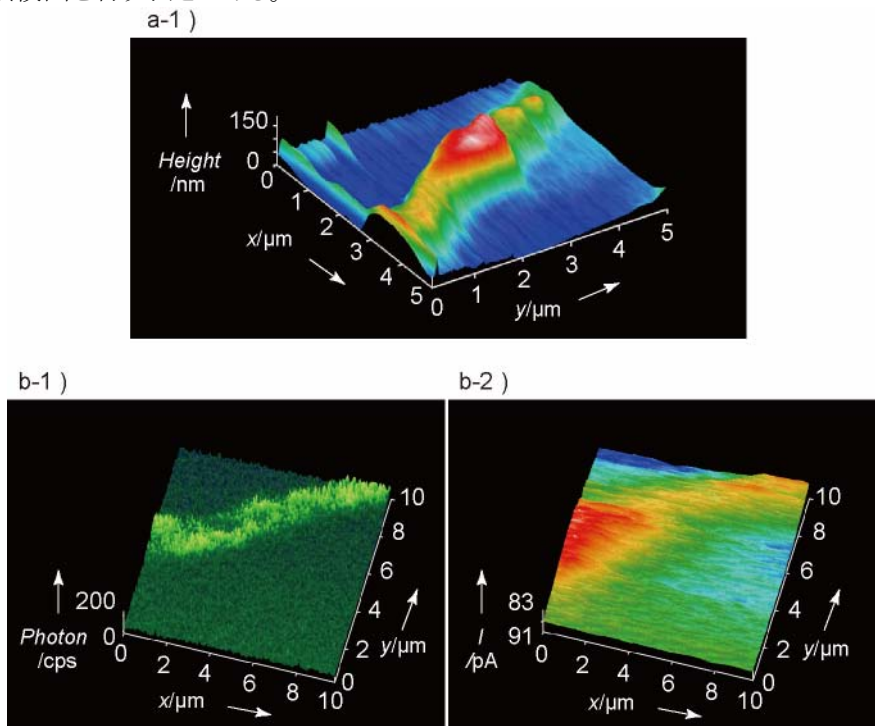


図 34 SECM/NSOM/AFM による生細胞 PC12 イメージング
(a-1)形状像 (b-1)光学像 (b-2)電気化学像

(2)研究成果の今後期待される効果

SECM/NSOM/AFM は細胞の内外の形状、動態、応答を局所レベルで観察することが可能なリアルタイム測定システムであり、今後様々な細胞の局所レベルでの神経伝達物質やイオンの挙動の相関性を取得することが可能であると考えられる。

3.2.2 ナノ薄膜電極(細胞内活性物質の選択的検出用電極開発)

(1)研究実施内容及び成果

1)電子サイクロトロン共鳴スパッタ法によるナノカーボン薄膜電極

本研究は、産総研グループを中心に ECR ナノカーボン膜は、慶應大学グループと共同で、酸化インジウム-酸化スズ(Indium Tin Oxide: ITO) 薄膜電極と金属ナノ微粒子分散カーボン薄膜は、NTT-MI 研グループと共同で行った。上記カーボン系、ITO 系薄膜電極の組成やナノオーダーの構造を制御し、生体分子検出に適した新規電気化学プローブ用材料の研究を行った。まず、本チームと NTT アフティ社の協力により電子サイクロトロン共鳴 (Electron cyclotron resonance; ECR) スパッタ法を用いたナノカーボン薄膜を開発した (以下、ECR ナノカーボン薄膜)。得られた膜は、 sp^2 と sp^3 結合のナノ結晶からなる薄膜であり、 sp^2 と sp^3 の結合比は、製膜時の加速電圧の条件で容易に制御することが出来た。その構造は、図 35 に示したように、屈曲し丸く閉じた構造をであり、グラファイトやダイヤモンドの構造とは大きく異なっていた。しかしながら、図 36 に示すように、ダイヤモンド並の硬さと電位窓を有し、かつ無ドープでもグラファイト並に高い導電性を示すという両方のメリットを併せ持つ全く新規なカーボン材料である。さらに、その表面はダイヤモンド電極と異なって極めて平面性が高いため (平均荒さ: $R_a=0.07$ nm)、これを電気化学センサー用電極として用いた場合、生体分子の吸着による表面汚染が起こりにくく、かつノイズとなる充電電流が極めて小さいといった特徴を示すことから、超高感度な電気化学バイオセンサーの構築が可能である。

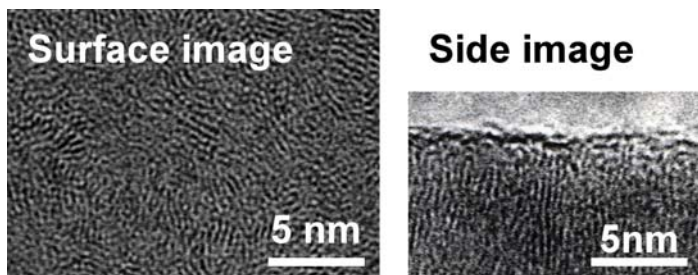


図 35 開発した ECR スパッタナノカーボン薄膜電極 TEM 写真

そこで ECR ナノカーボン電極表面の組成と電気

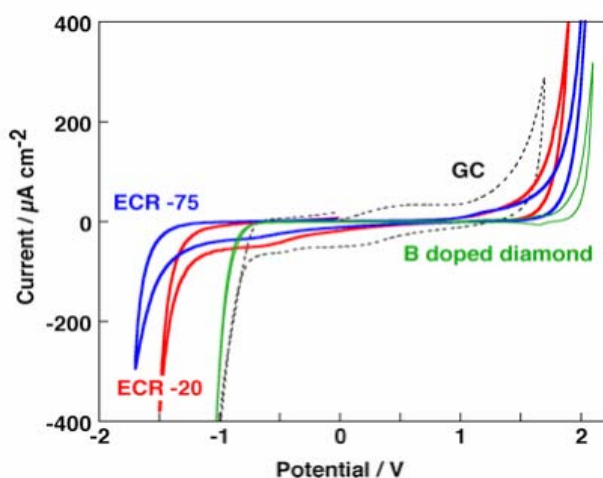


図 36 電位窓の比較

やドーパミンなどの電子移動が遅いことが分かった。また、細胞分泌物質の例として酸化電位の高いヒスタミンを計測したところダイヤモンド電極を凌駕する検出限界が得られ、生体分子計測に関して高い感度を得られることを確認した。更に、酸化電位が高く吸着性の高いオリグヌクレオチド、ビスフェノール A、補酵素である NAD(P)H などの生体分子を計測すると市販のグラッシーカーボン電極では、反応生成物の電極表面への不可逆的な吸着により急速に電流値が低下し再現性良い測定が困難なのに対して、ECR ナノカーボン薄膜では、NADH などの低分子では、殆ど電極特性の低下が見られず、極めて安定に定量できることを実証した (図 38)。これは、膜が極めて平坦なことや、酸素濃度が低い為に電極表面と測定対象分子との間の相互作用が弱く、かつ表面が化学反応に対してより不活性なため反応生成物である NAD^+ が電極上に吸着しにくいためであり、その結果、NADH の連続測定に対して再現性の高い結果が得られた。この結果を踏まえて ECR ナノカーボン薄膜電極上にデヒドロゲナーゼを含む酵素を固定化し、神経抑制物質である γ -アミノ酪酸

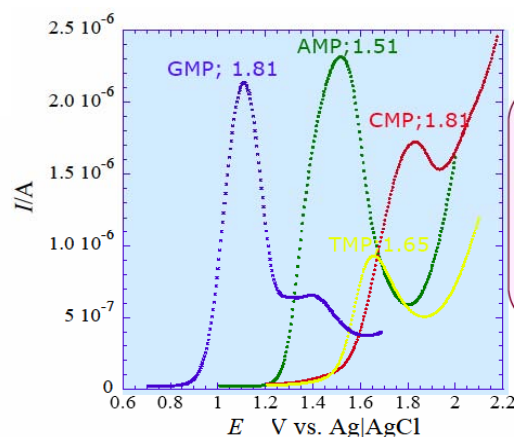


図 37 ECR ナノカーボン膜によるヌクレオチド (GMP、AMP、TMP、CMP) の電流応答

化学特性の関係を調べたところ、 sp^3 結合が多いカーボン膜では、電極表面の酸素濃度が極めて低く Fe^{2+}/Fe^{3+}

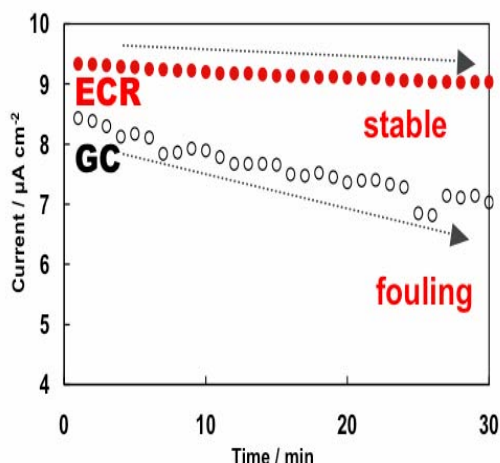


図 38 ECR カーボン膜による NADH の電流応答

グラウンドノイズが極めて低いため、より低濃度のオリゴヌクレオチドにおいても再現性の高い結果が得られた。

以上の結果から、ECR ナノカーボン電極を用いることで、オリゴヌクレオチド中の全塩基を定量することが可能であり、その結果、二つのオリゴヌクレオチド試料間の一塩基の差異を非標識に識別できることを明らかにした。

2) ナノサイズの金属微粒子を埋め込んだカーボン電極

走査型電気化学顕微鏡の探針に用いる微小電極として、上記の ECR ナノカーボン電極は、電位窓が広く、ノイズが小さいため測定分子種の拡大や高感度化が期待できる。その反面、カーボン材料は金属系の電極と比較して触媒活性が低い。例えば、バイオセンサーで良く用いられる白金やパラジウム電極の様に、過酸化水素を比較的低い電位で電気化学的に酸化するのは難しい。カーボン膜の安定性と高い触媒活性を兼ね備えた電極材料の形成法として、カーボンと金属を RF スパッタ法により共スパッタすると、触媒活性の強く且つ安定な金属ナノ粒子が分散したカーボン膜が得られることを見いだした。

この方法では、白金、パラジウム、イリジウム、銅、ニッケル等様々な金属のナノ微粒子を共スパッタ法によりカーボン膜中に分散させることが可能なが分かった。図 39 に、白金(左図)、パラジウム(右図)ナノ微粒子を分散したカーボン薄膜電極の

TEM 写真を示す。それぞれのナノ微粒子のサイズは比較的揃っており、白金で 2.5 nm、パラジウムで 4.0 nm の平均粒径のものが得られた。金属ナノ粒子をカーボン薄膜に分散させる方法として、白金を含む錯体高分子を熱分解して作製する方法や、ボロンドープダイヤモンド膜上に電気化学的に銅やニッケルを析出させる方法が報告されている。これらの方法が膜形成に 2～3 ステップの工程が必要であるのに対して、共スパッタ法を用いる本法では、常温に近い温度で一段階での膜形成が可能である。また、共スパッタ法を用いると、金属ナノ粒子は、カーボン膜に一部が埋め込まれた構造を取るため、メッキ法によりカーボンやダイヤモンド膜上に金属微粒子を形成する場合と比較し、機械的に安定である

金属ナノ微粒子埋め込みカーボン薄膜電極は、バルクの金属電極に比べ、優れた電気化学特性を示した。例えば、2.9 %の白金ナノ粒子分散カーボン薄膜電極の過酸化水素への応答をハイドロダイナミックボルタンメトリ (HDV) 法により行ったところ、白金バルク電極に比較し、約 10 倍の高い電極活性が得られた。この様な大きな電極活性は、パラジウムやイリジウムのナノ微粒子を分散し

(GABA) の検出を検討したところ、市販のカーボン電極を凌駕する検出限界が得られ (30 nM)、高感度および連続測定に対する高安定性が得られることを実証した。

さらに、ECR ナノカーボン電極を用いた核酸塩基の電気化学測定では、図 37 に示すように通常の GC 電極では計測が困難であるチミン (T)、シトシン (C) も安定に酸化でき、DNA の全構成塩基 (G、A、T、C) を同時に非標識に、かつ安定に酸化定量することができた。

さらに、オリゴヌクレオチドにおける電気化学測定では、GC 電極では表面へのオリゴヌクレオチドの吸着が激しく再現性の高い繰返し測定結果が得られなかったのに対して、ECR ナノカーボン電極では電極表面への吸着が弱く、なおかつバック

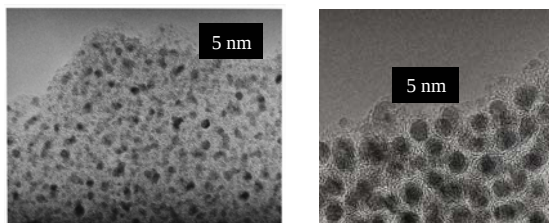


図 39 白金(左、6.5%)、パラジウム(右、7.8%)ナノ微粒子分散カーボン薄膜の TEM 写真

たカーボン膜でも同様に得られた。

また、金属ナノ微粒子分散カーボン膜では、金属バルク電極に比べ高い安定性が得られた。図 40 にグルコース酸化酵素で修飾した白金ナノ微粒子分散カーボン膜(Pt content:6.5 %)と白金電極の10 μ Mグルコースに対する応答性の比較を示す。白金含有率が6.5 %であるのに係わらず、電流値は、白金電極の約1/3の値が得られ、バイオセンサー化しても高い電極活性を有している。また、白金電極のベースラインが次第に減少して行くのに対して、極めて安定したベースラインが得られ、金属表面が安定であることが分かった。その特性を高速液体クロマトグラフィーの検出器に応用し、神経伝達分子のアセチルコリンの検出限界が1桁以上向上する結果を得た。更に本技術は、銅やニッケルに応用すると糖類を極めて高感度に測定できる。XPS 測定により、ナノ微粒子表面の水酸化物が高い電極触媒活性に寄与していることが分かった。以上示してきた ECR ナノカーボンやナノ金属微粒子カーボン膜はガラス探針上にも形成可能なため、SECM 法などへ応用すると多くの生体分子の高感度、高選択的なセンシングが可能になり、測定対象を大きく拡大できると予想される。

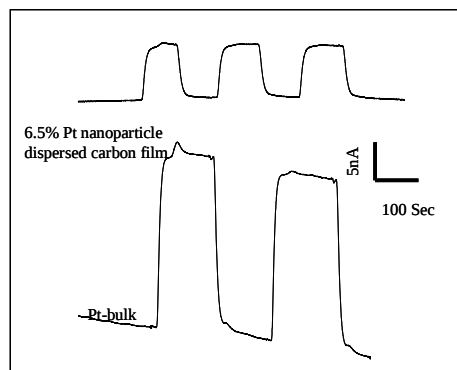


図 40 グルコース酸化酵素修飾白金ナノ微粒子分散カーボン膜電極と白金電極のグルコースに対する連続応答の比較

3) 選択応答性を有する ITO 電極

一方、炭素電極の代わりに ITO 薄膜電極を使い、その製膜条件を検討したところ、ドーパミンの酸化に対して、ドーパミンの代謝物(DOPAC)やアスコルビン酸、尿酸の酸化速度の遅い電極を作製できた。これら多くの妨害分子との選択性を調べた結果、図 41 に示すようにいずれの妨害分子に対してもリン酸イオンを含む緩衝溶液中で300 倍以上の高い選択性を達成した。この原因として、図 42 に示したように、本 ITO 電極は、平坦性の高いアモルファス構造を有しており、その表面にはリン酸イオンの吸着サイトであるヒドロキシル基が多く存在していることが明らかとなった。その結果、アモルファス ITO 薄膜表面では、従来の多結晶性 ITO 薄膜と異なり、リン酸イオンが高密度に吸着することで、アニオン性の妨害分子を電極表面から静電的に著しく除去していることが明らかとなった。さらに本特性はペンシル型のガラスファイバーナノプローブ上へ薄膜形成した場合でも同様に示される事が明らかとなっており、細胞から放出される微量のドーパミンの測定に対しても高感度・高選択的に検出可能であることが示唆された。

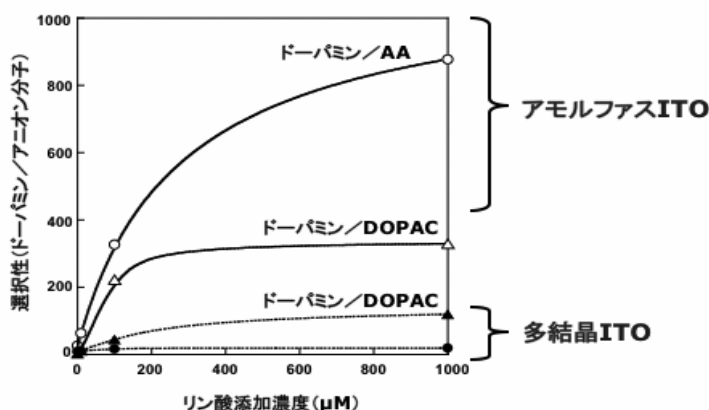


図 41 ITO 薄膜電極を用いたドーパミンの測定におけるリン酸イオン濃度の添加効果

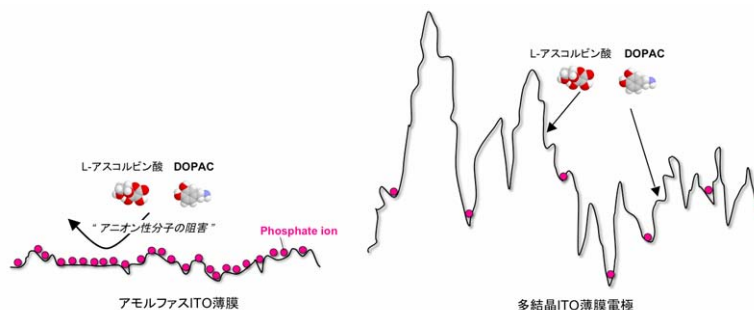


図 42 アモルファス ITO 薄膜表面へのリン酸イオン吸着、および選択性発現

(2)研究成果の今後期待される効果

上記の薄膜電極において、今後細胞応答計測を目的に、微小な光ファイバー上にスパッタを行いナノプローブとし、実際に本ナノプローブを用いて PC12 や肥満細胞への薬物等への刺激と放出される生体分子(ドーパミン・ヒスタミン)の細胞近傍の極微領域のリアルタイム分子計測を行うための必須のツールと成り得る。その際、ECR カーボン電極におけるノイズの低さ、高い定量性、ならびに電極表面の汚染を抑制するといった特徴や、アモルファス ITO 薄膜電極における高選択性は、今後薄膜をプローブ上に形成し、細胞測定用プローブを形成する際にプローブの感度、選択性、安定性ならびに再現性の面で極めて大きな利点となる。さらに、ECR カーボン電極においては、他の金属ならびにカーボン電極を極めて凌駕する結果であり、従来の HPLC 用の電気化学検出器や、センサー素子部分に代替されうる薄膜であり、社会への波及効果は極めて大きいものと思われる。

3.3 NTT-MI 研グループ

ナノパターン SPR の開発

本研究は、NTTマイクロシステムインテグレーション研究所を実施機関とし、産総研グループ、慶應大学グループ、神奈川県産業技術センターグループと共同で行った。

実験的に細胞間の情報伝達を解析するためには、情報伝達物質の検出と同定、さらにこのような分子の特異的結合の速度を測定する必要がある。このためには、対象分子または対象分子のレセプターを蛍光分子などで標識する方法が一般的である。

一方、無標識での生体分子間の特異的結合測定は、生体中での反応状態により近い測定が可能である。その実現のためには、質量変化、分子回転の緩和、誘電率・屈折率の変化を測定する方法が提案されている。このなかで表面プラズモン共鳴(SPR)法は、分子間の特異結合による溶媒排除に伴うサブマイクロメートルオーダーの局所的な屈折率を測定できるために、情報伝達物をはじめとする生体分子間相互作用測定に広く使われている。さらにSPR法ではリアルタイム測定が可能であり、特異的結合の速度定数を直接測定できる利点がある。従来の連続金薄膜とプリズムを用いる光学系で実現されるSPR法の屈折率感度は基板に用いる金薄膜や光学材料の複素屈折率に制限され、大幅な感度向上は望めない。また、全反射光学系を用いる制限から測定の簡易化が図りにくい問題があった。一方、島構造の金薄膜による局所SPR(Localized SPR, LSPR)法では、より簡便な、透過型または、反射型光学系で測定が可能であり、方島構造の形状によって感度が大きく変化する。本研究では、この利点に注目し、島構造の金薄膜をリソグラフィーによるボトムアップ的手法で作製、島構造の形状だけではなく、多重周期の配列を用いるナノドットパターンSPRによって、LSPRによる特異結合の高感度検出や結合速度測定、測定の簡易化を目指した。

図 43 に示す方法により、LSPRによる吸収スペクトル変化と反射光の位相シフトの両方を測定するため、100 nm 以下の周期の金薄膜構造が波長

程度の周期で配列したナノドットパターンを作製し、基本的な SPR 効果による屈折率測定と、分子認識反応の検出を行った。金のドットパターンは、電子線露光とドライエッチング法を用いて作製した。一辺 100nm 以下の正方形金薄膜島がクラスター(集合体)を形成し、回折格子になるようにデザインした。このナノドットパターンの基板をマイクロ流路に組み込み、透過スペクトルまたは、レーザー光の回折像の変化から屈折率の測定を行った。この結果、マイクロ流路中に埋め込んだ状態

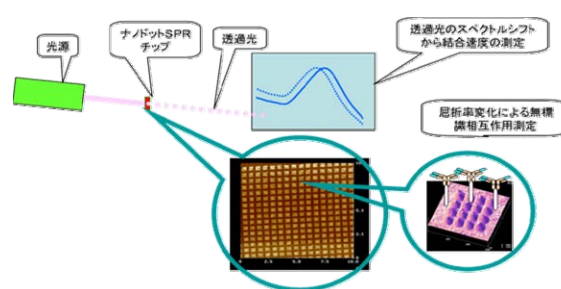


図 43 多重周期島構造ナノドットLSPR(ナノドットSPR)による情報伝達分子の結合解析測定

で、透過光の吸収最大波長のシフトから屈折率の測定ができた。また、SAMの形成、抗体の固定化、抗原の結合によって、スペクトルの長波長シフトが見られ、生体分子の特異的結合測定が可能であることを確認した。さらにクラスター周期による回折像からも屈折率変化の測定ができた。

また、測定の利便性、感度の向上を図るために長方形の島構造を用いたナボットパターンSPRチップを作製し、情報伝達分子として代表的なインターロイキンの検出を行ったところ、図44に示すように、インターロイキンと抗インターロイキンの結合速度を直接測定することができる吸着曲線を得ることができた。

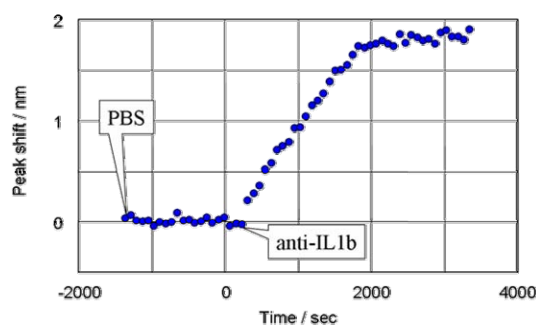


図 44 多重周期LSPR基板の(ナノパターンSPR)による抗インターロイキン-インターロイキンの吸着速度

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究では、細胞情報伝達物質の特異的結合の検出を単純な透過光の測定で行うことができることを代表的な分子の測定について示した。特定の測定対象分に最適化した島構造配列のデザインによって、感度の向上を得られると考えられる。

SPR測定は、生体分子測定だけではなく、局所的な屈折率が測定できることから、同様に局所的な不均一反応である、電気化学反応の解析に応用できる。島構造の金薄膜の微小電極としての機能との組み合わせで、構造的に機能性電極の解析(分析化学的反応、電池反応)に期待が持たれる。

本研究ではLSPR基板の作製に電子線露光技術を用いたために、量産や低コスト化には問題がある。しかし、ナノメートルオーダーの構造であってもスタンプ法などによって低いコストで生産できる可能性があり、簡便な透過光測定装置との組み合わせで、現在のELISA法の代わる免疫測定、医療用ベッドサイド測定、食品検査に応用が可能である。

3.4 神産センターグループ

マイクロ流体デバイスの開発(細胞内物質の網羅的測定用システム基板開発)

(1)研究実施内容及び成果

マイクロ流体デバイスを分析の場として用いた場合、試験管レベルに比べて物質の拡散距離が極端に短くなるため反応が速く終了する。そのため短時間で検出が可能となるだけでなく、微量のサンプルを検出できるため化学、生化学、環境、医療分析など様々な分析分野で注目を集めている。既存のマイクロ流体デバイスは、微細加工技術を用いてガラス、シリコンなどをエッチングすることで溝を作製した後、フタ基板を接合することで作製されてきた。しかしながら生産コストが高いため、産業化に向けたマイクロ流体デバイスの作製技術に取り組む必要があった。本研究では、細胞応答観察システムを構築するに当たり、ナノパターンSPR分析法やMAPI法を用いた質量分析技術との融合化を目指し、安価かつ高精度のマイクロ流体デバイスの作製技術に関する検討を行った。特に最終的なターゲットとなる医療分析へのマイクロ流体デバイスの利用を考えると、二次感染の恐れから使い捨てデバイスの必要性がある。そこで、本研究ではプラスチックを用いたマイクロ流体デバイスの作製技術について2つの手法を構築した。

はじめに大量生産に向けたマイクロ流体デバイスの作製技術について述べる。現在、プラスチック製品の大量生産には射出成型法やインプリント法が用いられており、そのいずれの場合においても金型が必要である。マイクロ流体デバイスを作製する場合にも、金型を利用した生産を行うことがコストダウンにつながる。例えば、シリコン基板をドライエッチング技術により溝加工することで母型を作製し、母型に電鍍処理を行って金型を形成する技術や高精度と高アスペクト比を得るために放射光を利用した

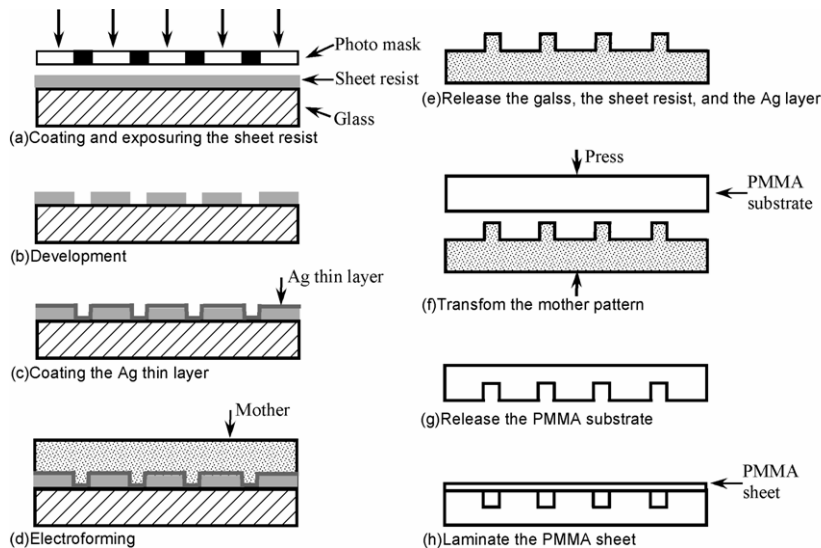


図 45 金型作製及びマイクロ流体デバイス作製プロセス

LIGA プロセスにより母型を作製する技術が報告されている。しかしながら、これらの技術を用いた場合、金型作製費用が非常に高くなるため低コスト金型作製技術が必要であった。本研究では、ドライフィルムレジストを用いた金型作製技術を確立した。ドライフィルムレジストはプリント配線板作製に使われてきたため非常に安価であると共に、レジストがフィルム状であり、均一な厚みを持つため基板へのコート後も平坦性が高く、剥離性にも優れている。金型作製からマイクロ流体デバイス作製までの工程を図 45 に示す。工程の順番は以下の通りである。①ガラス基板にドライフィルムレジストをラミネートし、紫外線露光器を用いてパターンを転写する。②レジストの現像。③電鍍用の導電層 (Ag) を製膜する。④電鍍処理。⑤ガラス基板を剥離。⑥導電層及びレジストを剥離。⑦パターンをプラスチック基板に転写。⑧フタとなるフィルムをラミネート。以上により作製された流路金型パターンを PMMA 基板に転写した際の流路構造の SEM 像を図 46 に示す。その結果、流路底面や壁面は非常に平らであることがわかった。しかしながら、不良箇所も見て取れるため転写後の基板剥離条件の最適化が必要である。

また、各工程における三次元構造を超深度形状測定顕微鏡を用いて測定したところ、表2に示すように転写された溝部は母型とほぼ一致しており、表面粗さは 100 nm 以下を保ったまま転写できることがわかった。このことから、本技術を用いることで精度の良い転写が行えることが実証された。さらに、この技術を用いて DNA 分離・分析用のマイクロ流体デバイスを作製し、実サンプルの分離・分析を試みた。その結果、市販品と同等の分離能を有することが明らかとなった。

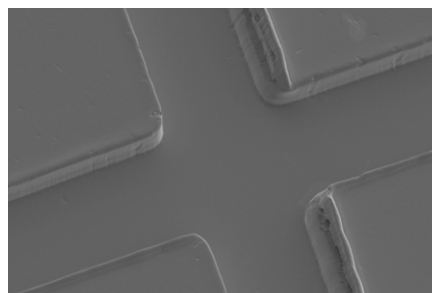


図 46 流路パターンが転写された PMMA 基板の SEM 像

表2 各プロセスにおける流路の評価結果

	Ra [μm]	Width [μm]	Depth [μm]
Photosensitive sheet	0.08	104.5	24.8
Mother	0.08	101.5	24.2
PMMA substrate	0.08	104.3	23.4

次に多品種少量生産に向けたマイクロ流体デバイス作製技術について述べる。企業の研究開発などでは、商品開発の前段階においてある程度まとまった量のデバイスが必要となる。前述した金型を利用する場合には、大量生産向きであり、少量生産には向いていない。しかしながら、従来のようにガラスやシリコンの微細加工技術を用いてマイクロ流体デバイスを作る程度まとまった量作製すると、時間とコストが掛かってしまう問題があった。有機材料を用いた流体デバイス作製技術では、レーザー加工や感光性材料を用

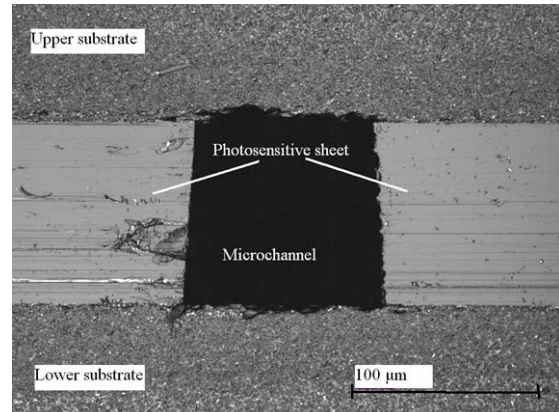


図 47 ビルドアップ製法による流体デバイスの断面構造

いる検討が行われてきた。レーザーを用いた場合には、流路端面において荒れや炭化が発生するため歩留まりが悪い。そのため、高アスペクト比を得られる感光性材料(SU-8)が盛んに用いられているが、クラックが入り易い、粘性が高いために塗布工程が難しい、接合が難しいなどの問題があった。本研究では、ドライフィルムレジストを流路層及び基板接合層として利用するビルドアップ法を取り入れることで簡便なマイクロ流体デバイス作製技術を確立した。ドライフィルムレジストの厚みは $10\sim 50\mu\text{m}$ であり、フィルムの重ね合わせも容易であることから膜厚を簡便に厚くすることが可能である。得られるアスペクト比は1程度であるが、マイクロ流体デバイスとして利用するには十分である。ガラス基板—ドライフィルムレジスト($50\mu\text{m}$ 厚 $\times$ 2層)—ガラス基板の4層を張り合わせて作製したマイクロ流体デバイスの断面図を図 47 に示す。流路壁面はほぼ垂直であり、パターン作製後にフタ基板を接合しても、流路の変形が生じていないことが分かる。この技術を利用すると流路内に三次元構造を簡便に形成することが可能である。その一例として、流路内に段差構造を形成し、段差構造により酵素固定化担体を流路内に閉じ込めることでマイクロリアクターとして機能させ、リアクターの下流に電気化学検出器を配置することで酵素反応により生成した物質をすぐに検出することが可能なマイクロ流体デバイスを作製した。この手法を用いると、酵素の固定化面積が流路壁面に固定化する場合に比べて大きくすることができるとともに流路を短くすることが可能であると共に、担体の交換が容易である。図 48 に示すとおり、担体はダム構造によってトラップされ、下流には流れ出ない。実例としてグルコース酸化酵素をガラスビーズに固定化しマイクロ流路内に保持し、流速 $5\mu\text{L}/\text{min}$ でグルコースの導入を行った。その結果、 $0.1\sim 10\text{mM}$ の範囲で直線性の高い検量線を得ることができた。

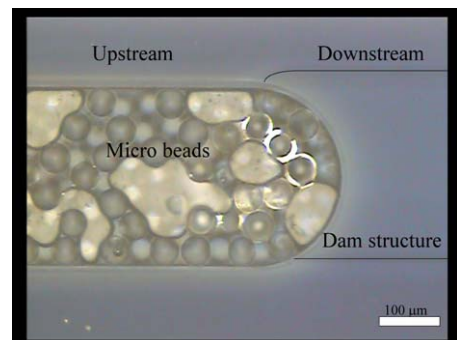


図 48 マイクロリアクターの顕微鏡写真

さらに、本技術を用いて細胞培養用デバイスの作製と評価を行った。ビルドアップ法により細胞培養用デバイスを作製後、高温高圧下で滅菌処理を行ったところ、流路の変形が生じたためこの手法が適用できないことがわかった。次に、エタノール 70%溶液を 1 時間導入したところ、構造の変化が生じなかったためエタノール滅菌法により滅菌が可能であることが確認された。図 49 に示すように、シリンジポンプにより培養液を送り込み、ペルチェ素子を利用して温調を行うシステムを構築した。また、

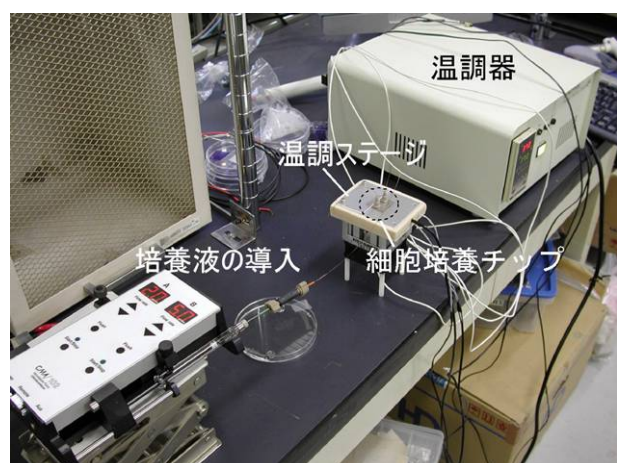


図 49 マイクロ流体デバイスを用いた細胞培養システム

流路内に段差構造を作製し、細胞が流れ出ない構造とした。このデバイスを用いて大腸菌の培養を24時間行ったところ、菌体数の十分な増加が認められた。このように、菌体や細胞培養にこのデバイスは有用である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究で確立したマイクロ流体デバイス作製技術は実践的であり、企業からの問い合わせも多い。今後、分析デバイスの小型化は加速的に推進されるであろう。その場合、医療、環境、食品分野などプラスチック流体デバイスの必要な現場で本技術が有効に活用されることが考えられる。また本研究グループの他のチームの分析技術との組み合わせとの融合が可能である。例えば、本技術を用いた細胞培養用流体デバイスをナノ SPR 検出器と接続することで、細胞応答のシグナルを短時間のうちに分析することが可能となり、MPAI デバイスと接続することで高感度分析が可能となる。また、後半に述べたビルドアップ法を用いたマイクロリアクターを用いることで、多段階の複雑な反応を伴う物質の検出が連続的に処理することが可能となる。また、菌体や細胞培養にマイクロ流路をそのまま利用できるため、細胞からの放出や細胞への作用など、生細胞の特性評価に有用なデバイスが作製できた。本技術開発で、安価な統合したデバイスやシステムへの応用が展開できる。

4 研究参加者

①慶大理工グループ(蛍光プローブ、質量解析プローブ、ナノパターン MS の開発)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
鈴木孝治	慶大理工	教授	分子プローブの設計	H14.11.1～ H20.3.31
萩原将文	慶大理工	教授	ニューラルネットワーク解析	H14.11.1～ H20.3.31
鈴木祥夫	KAST/ 慶大理工	研究員	分子プローブの合成及び機能評価	H14.11.1～ H16.9.30
本田亜希	慶大理工	CREST 研究員	質量解析プローブの設計及び生体試料への応用	H14.11.1～ H20.3.31
丸山健一	慶大理工	研究員	ナノ電極及び光プローブを用いた DNA 及び細胞イメージング測定	H14.11.1～ H20.3.31
山田幸司	KAST/ 慶大理工	研究員	分子プローブの設計及び合成	H14.11.1～ H18.3.31
岩澤尚子	慶大理工	CREST 研究補助員	各種分子プローブの合成	H14.11.1～ H20.3.31
田中さえみ	KAST/ 慶大理工	研究補助員	各種プローブの機能性評価	H14.11.1～ H20.3.31
越智ゆうこ	KAST/ 慶大理工	研究補助員	各種プローブの機能性評価	H15.4.1～ H20.3.31
三浦綾子	JST/慶大理工	研究補助員	各種プローブの機能性評価	H15.5.1～ H16.3.31
柿崎佳子	KAST/ 慶大理工	CREST チーム事務員		H14.11.1～ H15.9.12
加治真里	慶大理工	CREST 研究補助員	各種プローブの機能性評価	H15.9.1～ H20.3.31
藤井永治	慶大理工	大学院生	各種プローブの評価	H15.4.1～ H16.9.30
小松広和	慶大理工	助手	各種プローブの設計及び合成	H15.4.1～ H19.3.31
飯野真史	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成	H15.4.1～ H.17.3.31
遠藤啓	慶大理工	大学院生	各種プローブの評価	H15.4.1～ H.17.3.31
岡佐登代	慶大理工	大学院生	各種プローブの評価	H15.4.1～ H.17.3.31
宮地麻紀子	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成	H15.4.1～ H.17.3.31
藤原由貴男	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成	H15.4.1～ H.17.3.31

石内孝幸	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H15.4.1～ H.17.3.31
石原才子	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H15.4.1～ H.17.3.31
梅澤啓太郎	慶大理工	CREST 研究補助員	各種プローブの合成及び評価	H15.4.1～ H20.3.31
野村友紀	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H15.4.1～ H.17.3.31
一二三洋希	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H15.4.1～ H20.3.31
小川証	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
近藤明香	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
古川智和一	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
本間裕也	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
牧野弘	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
松熊佳奈	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
三木孝裕	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
八子知泰	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H16.4.1～ H18.3.31
宮崎真抄子	KAST / 慶大理工	研究補助員	質量解析プローブの応用	H14.11.1～ H15.3.31
安藤洋介	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H17.4.1～ H20.3.31
古後紘子	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H17.4.1～ H19.3.31
佐藤朱美	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H17.4.1～ H19.3.31
牧野恵	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H17.4.1～ H19.3.31
遠藤美帆	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H17.4.1～ H19.3.31
ダニエル・チッテリオ	慶大理工	準教授	分子プローブの設計および合成	H18.4.1～ H20.3.31
林真一郎	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H19.3.31
厚見孟	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H19.3.31

緒方章子	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
小林康宏	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
須賀千絵	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
鈴木隆一	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
空花俊人	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
関屋真喜	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
中村有希	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
長谷川由紀	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
辺田祐志	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
星野高宏	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31
山岡誠一	慶大理工	大学院生	各種プローブの合成及び評価	H18.4.1～ H20.3.31

②産総研グループ(電気光化学プローブ、ナノ薄膜電極の開発)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
丹羽修	産総研 生物機能工学	主任研究 員リーダー	ECR 電極を用いた生体分子セ ンシングへの応用	H14.11.1～ H20.3.31
佐藤縁	産総研 生物機能工学	主任研究 員	ナノ組織膜の分子認識	H16.4.1～ H20.3.31
平田芳樹	産総研 生物機能工学	主任研究 員	ナノ組織膜の分子認識	H16.4.1～ H20.3.31
栗田僚二	産総研 生物機能工学	研究員	ECR 電極を用いた生体分子セ ンシングへの応用	H17.4.1～ H20.3.31
吉本惣一郎	産総研 生物機能工学	研究員	ナノ組織膜の分子認識	H17.4.1～ H18.3.31
加藤大	産総研 生物機能工学	CREST 研 究員	ECR や ITO 薄膜電極を用いた 生体分子センシングへの応用	H16.11.1～ H20.3.31
Jia Jianbo	産総研 生物機能工学	特別研究 員	ECR 電極を用いた生体分子セ ンシングへの応用	H17.4.1～ H18.3.31
吉岡恭子	産総研 生物機能工学	主任研究 員	ナノ組織膜の分子認識	H18.4.1～ H20.3.31
関岡直行	筑波大/産総研	大学院生	ECR 電極を用いた生体分子セ ンシングへの応用	H18.4.1～ H20.3.31

中元浩平	筑波大/産総研	大学院生	ECR 電極を用いた生体分子センシングへの応用	H18.4.1～ H20.3.31
上田晃生	東工大/産総研	大学院生	ECR 電極を用いた生体分子センシングへの応用	H17. 4. 1～ H20.3.31

③NTT グループ (ナノパターン SPR の開発)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
岩崎弦	NTT MI 研	主任研究員	ナノ電極及び光プローブを用いたナノ連続ドットアレイの光測定	H14.11.1～ H20.3.31
陳子林	NTT MI 研	研究員	ナノ電極及び光プローブを用いた細胞応答用チップ加工・評価	H14.11.1～ H16.3.31
Guobao Xu	NTT MI 研	研究員	ナノ電極測定	H15.9.1～ H16.8.31
上野祐子	NTT MI 研	研究員	ナノ構造の解析	H15.4.1～ H17.3.31
由天艶	NTT MI 研	研究員	ナノ電極及び光プローブナノドット電極の評価	H14.11.1～ H15.1.31
堀内 勉	NTT MI 研	主任研究員	ナノプローブを用いた分子認識機構	H17.4.1～ H19.3.31

④神産センターグループ (マイクロ流体デバイスの開発)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
伊藤 健	神奈川県産業技術センター 電子技術部	主任研究員	マイクロ流体デバイスの作製と評価	H14.11.1～ H20.3.31

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
由天艶(NTT MI 研、研究員)	ナノ電極及び光プローブナノドット電極の評価	NTT MI 研	H15.2.1～ H15.2.28

6 成果発表等

<慶大理工グループ>

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 28 件)

1. Takuji Shoda, Kazuya Kikuchi, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Hirokazu Komatsu, Koji Suzuki, Tetsuo Nagano “Development of selective, visible light-excitabile, Fluorescent Magnesium Ion Probes with ad Novel Fluorescence switching mechanism”, *Analyst*, 128, 719-723 (2003).
2. Takeshi Kubota, Kantaro Tokuno, Jun Nakagawa, Yohiichiro Kitamura, Hiroto Ogawa, Yoshio Suzuki, Koji Suzuki, Kotaro Oka “Na/Mg²⁺ transporter acts as a Mg²⁺ buffering mechanism in PC12 cells”, *Biochem. Ciphys. Res. Commun.*, 303, 332-336 (2003).
3. Daniel Citterio, Takashi Kawada, Jun Yagi, Tomonori Ishigaki, Hideaki Hisamoto, Shin-chi Sasaki, Koji Suzuki “Molecular design, characterization, and application of multiinformation dyes for optical chemical sensing IV. Multiinformation Dyes with extended spectral sensitivity in the near-infrared range”, *Anal. Chim. Acta*, 482, 19-28 (2003).
4. Yoshio Suzuki, Nobuo Nakano, Koji Suzuki “Probe Sick House Syndrome Gas Monitoring System Based on Novel ColorimetriReagents for the Highly Selective and Sensitive Detection of Formaldehyde”, *Environ Sci Technol.*, 37, 5695-5700 (2003).
5. Yasunobu sato, Shinichi Ikegami, Koji Suzuki, Haruma Kawaguchi “Hydrogel-microsphere-enhanced surface plasmon resonance for the detection of K-ras point mutation employment peptide nucleic acid”, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 114, 8, 603-820 (2003).
6. Eiji Fujii, Kaori Nakamura, Shin-ichi Sasaki, Daniel Citterio, Kazuyoshi Kurihara, Koji Suzuki “Applicatioin of the Absorption-based surface Plasmon Resonance Principle to the Determination of Glucose Using an Enzyme Reaction”, *Instrumentation Science and Technology*, 31, 343-356 (2003).
7. Yasunobu Sato, Yuko Sto, Aya Okumura, Koji Suzuki, Haruma Kawaguchi “Flow-stress-induced discrimination of a K-ras point mutation by sandwiched polymer microsphere-enhanced surface plasmon resonance”, *J. Biomater.Sci. Polymer Edn.* 100, 1-14 (2003).
8. A. Honda, T. Ametani, A. Matsumoto, H. Iwaya, S. Kano, K. Hachimura, S. Ohkawa, S. Kaminogawa, K. Suzuki, E. E. Sercarz, V. Kumar “Vaccination with an immunodominant peptide of bovine type II collagen induces an anti-TCR response and modulates the onset and severity of collagen-induced arthritis”, *International Immunology* 16, 737-45 (2004).
9. Yoshio Suzuki, Noriyuki Tanji, Chikako Ikeda, Aki Honda, Kenji Ookubo, Daniel Citterio, Koji Suzuki “Design and Synthesis of Labeling Reagents (MS Probes) for Highly Sensitive Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Their Application to the Detection of Carbonyl, Alcohol, Carboxylic Acid and Primary Amine Samples”, *Analytical Science*, 20, 475-482 (2004).
10. Daniel Citterio, Mio Omagari, Takashi Kawada, Shin-chi Sasaki, Yoshio Suzuki, Koji Suzuki “Chromogenic betaine larists for highly selective calcium ion sensing in aqueous environment”, *Analytica Chimica Acta*, 504, 227-234 (2004).
11. S. Sasaki, S. Ozawa, D. Citterio, K. Yamada, K. Suzuki “Organic tin compounds combined with anionic additives- an ionophore system leading to a phosphate ion-selective electrode”, *Talanta*, 63, 131-134 (2004).
12. Dan Mikami, Toshifumi Ohki, Ken Yamaji, Saeko Ishihara, Daniel Citterio, Masafumi Hagiwara, Koji Suzuki “Quantification of Ternary Mixtures od Heavy Metal Cations from Metallochromic Absorbance Spectra Using Neural Network Inversion”, *Analytical Chemistry*, 76, No.79, 5726-5733 (2004).

13. Hirokazu Komatsu, Naoko Iwasawa, Daniel Citterio, Yoshio Suzuki, Takeshi Kubota, Kentaro Tokuno, Yoshiichiro Kitamura, Kotaro Oka, Koji Suzuki "Design and Synthesis of Highly-Sensitive and -Selective Fluorescein-Derived Magnesium Fluorescent Probes and Application to Intracellular 3D-Mg²⁺ Imaging", *Journal of the American Chemical Society*, 126, No.50, 16353-16360 (2004),
14. Kazuyoshi Kurihara, Hiroyuki Ohkawa, Yuzuru Iwasaki, Osamu Niwa, Tatsuya Tobita, Koji Suzuki "Fiber-optic conical microsensors for surface plasmon resonance using chemically etched single-mode fiber", *Analytica Chimica Acta*, 523, 165-170 (2004).
15. Hirokazu Komatsu, Takahiro Miki, Yukio Fujiwara, Daniel Citterio, Takeshi Kubota, Yutaka Shindo, Yoshiichiro Kitamura, Masafumi Hagiwara, Kotaro Oka, Koji Suzuki "Single molecular multi analyte (Ca, Mg) fluorescent probes and applications to bioimaging", *Journal of the American Chemical Society*, 117(31), 10798-10799 (2005).
16. Hirokazu Komatsu, Daniel Citterio, Yukio Fujiwara, Katsuya Minamihashi, Yoshio Araki, Masafumi Hagiwara, Koji Suzuki "Single Molecular Multianalyte Sensor:Jewel Pendant Ligand", *Organic Letters*, 7(14), 2875-2859 (2005).
17. Aki Honda, Hideki Sonobe, Akiko Ogata, Koji Suzuki "Improved Method of the MALDI-TOF Analysis of DNA with Nanodots Sample Target Plate", *Chemical Communications*, 42, 5340-5342 (2005).
18. Koji Yamada, Yuki Nomura, Daniel Citterio, Naoko Iwasawa, Koji Suzuki "Highly Sodium-Selective Fluoroionophore Based on Conformational Restriction of Oligoethyleneglycol-bridged Binary Boron-dipyrromethene", *Journal of the American Chemical Society*, 127 (19), 6956-6957 (2005).
19. Ishihara S, Ikeda A, Citterio D, Maruyama K, Hagiwara M, Suzuki K "Smart chemical taste sensor for determination and prediction of taste qualities based on a two-phase optimized radial basis function network", *Anal. Chem.*, 24, 7908-7915 (2005).
20. Takeshi Kubota, Yutaka Shindo, Kentaro Tokuno, Hirokazu Komatsu, Hiroto Ogawa, Susumu Kudo, Yoshiichiro Kitamura, Koji Suzuki, Kotaro Oka "Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imagings in PC12 cells", *Biochemical and Biophysica Acta*, 1744, 19-28 (2005).
21. Yoshio Suzuki, Koji Suzuki "Optical Sensors for Ions and Protein Based on Digital Color Analysis", *Springer Ser Chem Sens Biosens*, 3, 343-365 (2005).
22. Shin-ichi Sasaki, Gou Monma, Daniel Citterio, Koji Yamada, Koji Suzuki "Fluorescence Enhancement Detection of Underivatized Amino Acids Using a Trifluoroacetophenone-Based Tripodal Fluoroionophore", *CHIMIA*, 59, 204-208 (2005).
23. Kenichi Maruyama, Hiroyuki Ohkawa, Shou Ogawa, Akio Ueda, Osamu Niwa, Koji Suzuki "Fabrication and characterization of a nanometer-sized optical fiber electrode based on selective chemical etching for scanning electrochemical/optical microscopy", *Anal Chem*, 78 (6), 1904-1912 (2006).
24. Aki Honda, Yoshio Suzuki, Koji Suzuki "Mass Probe-assisted Ionization Method for Total Analysis of Biomolecules With Electrospray Ionization-Mass Spectrometry", *The Chemical Record*, 6, 100-106 (2006).
25. Aki Honda, Hiroki Hifumi, Yuya Honma, Noriyuki Tanji, Yoshio Suzuki, Koji Suzuki "Semicomprehensive and Semiquantitative Determination of Proteins with Mass Probes", *Chemistry Letters*, 35, 290-291 (2006).
26. Komatsu H, Miyachi M, Fujii E, Citterio D, Yamada K, Sato Y, Kurihara K, Kawaguchi H, Suzuki K "SPR sensor signal amplification based on dye-doped polymer particles", *SCIENCE AND TECHNOLOGY OF ADVANCED MATERIALS*, 7 (2), 150-155 (2006).
27. Hiroki Hifumi, Seiichi Yamaoka, Akihiro Tanimoto, Daniel Citterio, Koji Suzuki "Gadolinium-Based Hybrid Nanoparticles as a Positive MR Contrast Agent", *Journal of the*

- American Chemical Society, 128, 15090-15091 (2006).
28. D. Citterio, J. Takeda, M. Kosugi, H. Hisamoto, S. Sasaki, H. Komatsu, K. Suzuki "pH-Independent Fluorescent Chemosensor for Highly Selective Lithium Ion Sensing", *Analytical Chemistry*, 7(3), 1237-1242 (2007).
29. A. Honda, S. Hayashi, H. Hifumi, Y. Honma, N. Tanji, N. Iwasawa, Y. Suzuki, and K. Suzuki "MPAI (Mass Probes Aided Ionization) Method for Total Analysis of Biomolecules by Mass Spectrometry" *Analytical Sciences*, 23(1), 11-15 (2007).

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

1. 本田亜希, 鈴木祥夫, 鈴木孝治 “質量分析用ラベル化試薬の創製とバイオへの応用”, *ぶんせき*, 11, 643-645 (2004).
2. 本田亜希, 鈴木祥夫, 鈴木孝治 “バイオ・医療計測に向けたケミカルプローブ～質量分析用プローブ～”, *臨床検査*, 50(12), 1459-1465 (2006).
3. 小松広和, 鈴木孝治 “識別の化学」に基づく分子センサー—複数物質のセンシングが可能な分子プローブ“, *化学*, 62(1), 68-69 (2007).

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演（国内会議 11 件、国際会議 7 件）

1. Koji Suzuki “Past , Present and Future of Ionophore-Based Optosensing”, *Europtode VII* (Madrid, Spain) 2004/4.
2. 鈴木孝治 “バイオケミカルプローブの創始とセンシング応用”, 日本分析化学会第 65 回分析化学討論会依頼講演(沖縄) 2004/5/15.
3. 鈴木孝治 “化学センサーの開発と実用化”, 日本分析化学会第 53 年会(千葉) 2004/9/1.
4. Koji Suzuki “Design and Synthesis of MS Probes for the Detection of Ions and Biomolecules by Mass Spectrometry”, *Pittcon 2005* (Orlando, USA) 2005/3.
5. 鈴木孝治 “光を用いる界面化学計測の展開”, 第 85 回春季年会特別企画講演(横浜) 2005/3/26.
6. 鈴木孝治 “光を利用する化学センサーの開発と実用化展開”, ナノオブティクス研究グループ第 14 回研究討論会(横浜) 2005/7/4.
7. Koji Suzuki “Design and Potential of Smart Chemical Sensors Based on Artificial Neural Networks”, *Matrafured 2005* (Matrafured, Hungary) 2005/11/14.
8. K. Suzuki C. Daniel, M. Hagiwara, A. Ikeda, S. Ishihara, H. Komatsu, K. Maruyama, “Smart Chemical Sensor for Determination and Prediction of Taste Qualities”, *Pittcon2006* (Orlando, USA) 2006/3/14.
9. Koji Suzuki “CHEMICAL SENSORS BASED ON NOVEL CHEMICAL SENSING PROBES”, *ICAS2006* (Moscow, Russia) 2006/6/27.
10. Koji Suzuki , Saeko Ishihara, Daniel Citterio, Hirokazu Komatsu, Ryuichi Suzuki, Atsushi Ikeda, Masafumi Hagiwara, and Osamu Niwa “Design of Smart Chemical Sensors Based on Artificial Neural Networks”, *IMCS 11* (Brescia, Italy) 2006/7/17.
11. 鈴木孝治 “化学センサーの創製と医療・環境センシング”, 日本化学会東北支部宮城地区講演会(仙台) 2006/8/28.
12. 鈴木孝治 “オブティカルケミカルセンサーの創製と応用展開”, 日本分析化学会第 55 年会シンポジウム講演(大阪) 2006/9/20.
13. Koji Suzuki “Creation and Application of Chemical Sensing Probes”, *COE-LCC Keio-Aachen Joint Symposium* (Aachen, Germany) 2006/10/5.
14. 鈴木孝治 “有機分子、電気化学、分子生物学の融合”, 第 2 回学際領域における分子イメージングフォーラム(早稲田, 東京) 2006/11/16.
15. 鈴木孝治 “安全・安心に貢献する化学センサー”, 全日本科学機器展第 1 回環境問題セ

- ミ ナー ―サステナブル・テクノロジーへの取り組み― (東京) 2006/11/29.
16. 鈴木孝治 “化学センシングプローブの創製とイメージング応用”, 第 68 回分析化学討論会 (宇都宮) 2007/5/19.
 17. 鈴木孝治 “生体成分のセンシングとイメージング技術”, 日本分析化学会第 56 年会 (徳島) 2007/9/19.
 18. 鈴木孝治、本田亜希、鈴木祥夫 “質量分析法における新たなイオン化法の提案と展開”, 日本化学会第1回関東支部大会 (東京) 2007/9/27.

②口頭発表 (国内会議 39 件、国際会議 14 件)

1. 本田亜希、丹治範文、鈴木祥夫、岩澤尚子、鈴木孝治 “DNA 関連物質の高感度質量分析” 第 51 回 日本質量分析学会 (つくば) 2003/5/15.
2. 鈴木祥夫、丹治範文、大久保顕治、本田亜希、Daniel Citterio、鈴木孝治 “LC/MS のための高感度検出用ラベル化剤 (アダクティブプローブ) の開発 (6)”, 第 64 回日本分析化学討論会 (高知) 2003/5/25.
3. 丸山健一・大川博之・雨宮成・丹羽修・鈴木孝治 “光ファイバーナノ電極の開発と走査型光電気化学顕微鏡への応用”, 第52回日本分析化学会年会 (岩手) 2003/9.
4. Aki Honda, H. Hiroki, Y. Honma, Yohio Suzuki, Noriyuki Tanji, Naoko Iwasawa, K. Yamada, K. Suzuki “Comprehensive and Quantitative Analysis by Use of a Mass-Probe system”, Pittcon 2004 (Chicago) 2004/3.
5. Hirokazu Komatsu, Takeshi Kubota, Kotaro Oka, Koji Suzuki “Simultaneous fluorescent imaging of intracellular calcium and magnesium ions”, Pittcon 2004 (Chicago) 2004/3.
6. Koji Yamada, Yuki Nomura, Koji Suzuki “New Color-Changeable Chemical sensing Molecules and Devices Based on Boron-Dipyrromethene Chromophore”, Pittcon 2004 (Chicago) 2004/3.
7. Koji Suzuki, Hirokazu Komatsu, Dwi Swiswanta, Naoya Kawasaki, Yoshio Suzuki, Takeshi Kubota, Kotaro Oka “Design and Synthesis of Magnesium Ion Sensitive and Selective Ionophores and Fluoroionophores (Fluorescent Probes)”, Pittcon 2004 (Chicago) 2004/3.
8. Yoshio Suzuki and Koji Suzuki “Design and Synthesis of Colorimetric Reagents for Sick House Syndrome Gas Monitoring”, Pittcon 2004 (Chicago) 2004/3.
9. 本田亜希、鈴木孝治 “環境中のダニ抗原の定量測定”, 第 84 回日本化学会年会 (兵庫) 2004/3.
10. 鈴木祥夫・八子知泰・山田幸司・鈴木孝治 “重金属イオン分析用質量分析試薬(マスプローブ)の創製と応用”, 第 84 回日本化学会年会 (兵庫) 2004/3.
11. 丸山健一、小川証、丹羽修、鈴木孝治 “走査型電気化学・近接場光学顕微鏡 (EC-NSOM) の開発と DNA アレイイメージングへの応用”, 第 71 回電気化学大会 (神奈川) 2004/3.
12. 本田亜希、鈴木孝治 “環境中のダニ抗原の定量測定”, 第 65 回分析化学討論会 (沖縄) 2004/5/16
13. 丸山健一、田中さえみ、Dwi Swiswanta、丹羽修、鈴木孝治 “ISE ポリマーマトリックスの開発と Na⁺、K⁺イオンセンサーへの応用”, 第 65 回分析化学討論会 (沖縄) 2004/5/15
14. 本田亜希、鈴木孝治 “環境中のダニ抗原の定量測定”, 日本分析化学会第 53 年会 (千葉) 2004/9.
15. Kenichi Maruyama, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Shigeru Hirono, Koji Suzuki “Oxidation of nucleotide derivatives by ECR sputter deposited carbon films in high potential region”, 206th Meeting of The Electrochemical Society (Honolulu, Hawaii) 2004/10/7.
16. 丸山健一、松熊佳奈、栗田遼二、丹羽修、藤島清太郎、鈴木孝治 “医療集積化マイクロチップの開発と医療応用”, 第 18 回日本エム・イー学会秋季大会 (松山) 2004/11/5.
17. 丸山健一、松熊佳奈、栗田遼二、伊藤健、藤島清太郎、丹羽修、鈴木孝治 “集積化電気化学マイクロチップの開発と医療応用”, 第 10 回化学とマイクロナノシステム研究会 (高松)

- 2004/11/25.
18. Aki Honda, Naoko Iwasawa, Koji Suzuki “Direct Measurement of House Dust Mite Allergen”, Pittcon2005 (Florida) 2005/2/28
 19. Koji Yamada, Naoko Iwasawa, Yuki Nomura, Koji Suzuki “Highly Selective and Sensitive Na⁺ and K⁺ Fluorescent Sensors Based on Conformational Restriction”, Pittcon2005 (Florida) 2005/3/3.
 20. 山田幸司、野村友紀、岩澤尚子、鈴木孝治 “配向制御によってスペクトルシフトするビリアルボロンジピロメテン蛍光色素の合成とセンシング応用”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 21. 丸山健一、丹羽修、廣野滋、鈴木孝治 “ECRスパッタカーボンフィルム電極による核酸誘導体の高電位検出”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 22. 近藤明香、丸山健一、丹羽修、廣野滋、鈴木孝治 “ECRスパッタカーボンフィルム電極による 8-OHdG の定量とニューラルネットワーク”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 23. 松熊佳奈、上野亜紀子、丸山健一、丹羽修、藤島清太郎、鈴木孝治 “メディカルチップの開発と血液連続モニタリングへの応用”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 24. 上田晃生、丸山健一、伊与木誠人、丹羽修、鈴木孝治 “走査型電気化学・近接場光学・原子間力顕微鏡(SECM/NSOM/AFM)の開発と局所細胞イメージングへの応用”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 25. 牧野恵、一二三洋希、小松広和、本田亜希、谷本伸弘、鈴木孝治 “新規MRIprobe の設計と合成(2) グルコースの測定”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 26. 一二三洋希、牧野恵、小松広和、本田亜希、谷本伸弘、鈴木孝治 “新規MRIprobe の設計と合成(1) 生体内イオンの測定”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 27. 本田亜希、岩澤尚子、鈴木孝治 “環境中のダニ抗原への測定ー色変化による測定ー”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 28. 梅澤啓太郎、Citterio Daniel、岩澤尚子、山田幸司、鈴木孝治 “新規近赤外蛍光ラベル化色素の開発と生体ラベル化への応用(3)”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/14.
 29. 佐藤朱美、山田幸司、鈴木孝治 “マルチカラー化学発光プローブの設計と合成”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/15.
 30. 小松広和、三木孝裕、Citterio Daniel、新藤豊、久保田健、北村美一郎、岡浩太郎、鈴木孝治 “単分子マルチセンサーの設計と多成分同時定量への応用”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/15.
 31. 遠藤美帆、八子知泰、鈴木祥夫、山田幸司、鈴木孝治 “微量重金属イオン定量用質量分析試薬(MSProbe)の設計と性能評価”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/15.
 32. 安藤洋介、飯野真史、山田幸司、鈴木孝治 “長期連続モニタリングpHオプトードデバイスの開発”, 第 66 回分析討論会 (北見) 2005/5/15.
 33. 上田晃生、丸山健一、伊与木誠人、丹羽修、斎木敏治、鈴木孝治 “走査型電気化学・近接場光学・原子間力顕微鏡(SECM/NSOM/AFM)の開発”, ナノオプティクス研究グループ第 14 回研究討論会 (横浜) 2005/7/4.
 34. 山田幸司、飯野真史、野村友紀、本間祐也、安藤洋介、佐藤朱美、鈴木孝治 “分子光学デバイスに向けたボロンジピロメテン”, ナノオプティクス研究グループ第 14 回研究討論会 (横浜) 2005/7/4.
 35. Hirokazu Komatsu, Tkahiro Miki, Yuraka Shindo, Yoshiichiro Kitamura, Kotaro Oka, Koji Suzuki “Single molecular multi analyte fluorescent probes for bioimaging”, 230th ACS National Meeting (Washington. DC, USA) 2005/9/1.
 36. 梅澤啓太郎、Citterio Daniel、岩澤尚子、山田幸司、鈴木孝治 “スクワリウム骨格を用いた新規近赤外蛍光ラベル化色素の開発”, 2005 年光化学討論会 (福岡) 2005/9/11.
 37. 小松広和、新藤豊、堀田耕司、岡浩太郎、鈴木孝治 “オルガネラ局在型マグネシウム蛍光プローブの開発”, 日本分析化学会第 54 回大会 (名古屋) 2005/9/15.
 38. 古後紘子、石内孝幸、本田亜希、鈴木孝治 “FRETを用いた免疫競合センサーの設計と

- 開発”, 日本分析化学会第 54 回大会 (名古屋) 2005/9/15.
39. 一二三洋希, 牧野恵, 小松広和, 本田亜希, 谷本伸弘, 鈴木孝治 “新規 MRI probe の設計・合成と応用(3)イオン・グルコースの測定” 日本分析化学会第 54 回大会 (名古屋) 2005/9/15.
 40. 本田亜希, 一二三洋希, 本間祐也, 山田幸司, 小松広和, 鈴木孝治 “MPAI 法による生体分子の質量分析計を用いたトータルアナリシス”, 日本分析化学会第 54 回大会 (名古屋) 2005/9/15.
 41. Koji Suzuki “A new generation of chemical sensors; a taste sensor system based on chemical sensors and artificial neural networks”, Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 42. H. Komatsu, K. Hotta, K. Oka, Y. Shindo, K. Suzuki “Observation of Magnesium Release from Mitochondria with a Novel Magnesium Fluorescent Probe”, Pittcon 2006 (Orlando, USA) 2006/3/15
 43. 小松広和, 新藤豊, 堀田耕司, 岡浩太郎, 鈴木孝治 “ミトコンドリアのマグネシウムイメージング”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 44. 小林康宏, 酒井優, 上田晃生, 丸山健一, 山田幸司, 志智雄之, 斎木敏治, 鈴木孝治 “バイオ応用を目指したフォトナノソグラフィーによる界面制御”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 45. 小林康宏, 酒井優, 上田晃生, 丸山健一, 志智雄之, 斎木敏治, 鈴木孝治 “バイオ応用を目指したフォトナノソグラフィーによる界面制御”, ナノオプティクス研究グループ第 15 回研究討論会 (浜松) 2006/7/21.
 46. 本田亜希, 緒方章子, 岩崎弦, 丹羽修, 鈴木孝治 “ナノ構造基板を用いたMALDI-MS 解析”, 東京コンファレンス 2006 (幕張) 2006/8/30.
 47. 安藤洋介, 飯野真史, 山田幸司, 鈴木孝治 “高耐久性蛍光カチオンセンサー分子の設計・合成と長期水溶液モニタリングデバイスへの応用”, 日本分析化学会第 55 年会 (大阪) 2006/9/20.
 48. 小松広和, 空花俊人, 三木孝裕, 新藤豊, 堀田耕司, 岡浩太郎, 鈴木孝治 “単分子マルチセンサーによるマルチアナライトイメージング”, 日本分析化学会第 55 年会 (大阪) 2006/9/21.
 49. H. Komatsu, Y. Shindo, T. Kubota, K. Hotta, K. Oka and K. Suzuki “Mitochondria magnesium imaging”, The 232th ACS National Meeting, San Francisco(USA) 2006/9/9-15.
 50. Akio Ueda, Masato Iyoki, Kenichi Maruyama, Osamu Niwa, Koji Suzuki “Simultaneous Electrochemical, Near-Field Optical and Topographic Imaging by Using Scanning Electrochemical/ Near-Field Optical/ Atomic Force Microscopy”, PITTCON2007 (Chicago, USA) 2007/2/27.
 51. Hiroki Hifumi, Aki Honda, Hirokazu Komatsu, Koji Suzuki, Akihiro Tanimoto “Novel MRI Probes: Design, Synthesis, and imaging of Ion Selective Probes”, PITTCON2007 (Chicago, USA) 2007/3/1.
 52. 小林康宏, 酒井優, 上田晃生, 丸山健一, 斎木敏治, 鈴木孝治 “バイオ応用のための近接場ナノフォトソグラフィーの開発”, ナノオプティクス研究グループ第 16 回研究討論会 (神戸) 2007/7/14
 53. 梅沢啓太郎, 中村有希, 牧野弘, チッテリオ ダニエル, 鈴木孝治 “バイオ分析を目的とした新規高輝度近赤外蛍光色素の開発”, 東京コンファレンス 2007 (幕張) 2007/8/29

③ポスター発表 (国内会議 14 件、国際会議 19 件)

1. Hirokazu Komatsu, Yukio Fujiwara, Daniel Citterio, Kotaro Oka, Masafumi Hagiwara, Takahiro Miki, Takeshi Kubota, Yoshiichiro Kitamura, Yutaka Shindo, Koji Suzuki “Single Molecular Multi Analytes Sensors and Applications to Bioimaging”, Pittcon2005 (Florida)

- 2005/2/28.
2. M. Makino, H. Hifumi, A. Honda, A. Tanji, K. Suzuki "Design and synthesis of glucose sensitive magnetic resonance imaging probes", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA), 2005/12/19.
 3. A. Honda, N. Iwasawa, K. Suzuki "Colorimetric measurement of house dust mite allergen", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 4. K. Yamada, Y. Nomura, N. Iwasawa, K. Suzuki "Boron-dipyrromethene fluorescent sensor molecules with the spectral shift function based on conformational restriction", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 5. H. Kogo, A. Honda, K. Suzuki "Simple measurement by competitive FRET", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 6. K. Matsukuma, K. Maruyama, R. Kurita, T. Ito, S. Fijishima, A. Ueno, O. Niwa, K. Suzuki "Design and fabrication of an integrated electrochemical microchip "medical chip" for clinical application", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 7. Y. Homma, A. Honda, H. Hifumi, N. Tanji, K. Yamada, Y. Suzuki, K. Suzuki "Design and synthesis of mass-probes for immunoassay", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 8. S. Kondo, K. Maruyama, O. Niwa, S. Hirono, K. Suzuki "Simultaneous determination of nucleotide derivatives by using artificial neural network(ANN) and ECR sputtered- carbon film electrode", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 9. Y. Ando, K. Yamada, K. Suzuki "High-sensitive fluorescent ion-sensing devices for long-term measurements of aqueous solutions", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 10. A. Ueda, K. Maruyama, O. Niwa, M. Iyoki, K. Suzuki "Simultaneous electrochemical, near-field optical and topographic imaging by using scanning electrochemical/near-field optical/atomic force microscopy(SECM/NSOM/AFM)", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 11. K. Umezawa, D. Citterio, N. Iwasawa, K. Yamada, K. Suzuki "Novel near-infrared fluorophores based on squaraines as biological labeling reagents", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 12. M. Endo, T. Yako, Y. Suzuki, K. Yamada, K. Suzuki "ESI-MS probe molecules for sensitive detection of harmful heavy metal ions", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 13. T. Miki, H. Komatsu, N. Iwasawa, D. Citterio, T. Kubota, Y. Shindo, Y. Kitamura, K. Oka, K. Suzuki "Design and synthesis of single molecular multianalyte fluorescent probes and their applications to bioimaging", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 14. A. Sato, K. Yamada, K. Suzuki "Multicolor chemiluminescent probes based on phthalhydrazide-linked boron-dipyrromethene derivatives", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 15. K. Maruyama, O. Niwa, S. Hirono, K. Suzuki "Electrochemical Recognition of DNA Bases and Derivatives by ECR Sputtered Carbon Film", Pacificchem 2005 Meeting (Hawaii, USA) 2005/12/19.
 16. H. Hifumi, A. Honda, H. Komatsu, M. Makino, K. Suzuki, A. Tanimoto "Design and Synthesis of Potassium Ion and Calcium Ion Sensitive Magnetic Resonance Imaging Probes", Pittcon 2006 (Orlando, USA) 2006/3/14.
 17. K. Umezawa, D. Citterio, N. Iwasawa, K. Suzuki, K. Yamada "Novel Near-Infrared Fluorophores Based on Squaraines as Biological Labeling Reagents", Pittcon 2006 (Orlando, USA) 2006/3/15.
 18. 佐藤朱美・山田幸司・鈴木孝治 "ボロン-ジピロメテン誘導体を用いたマルチカラー化学発

- 光色素”, 2005 年光化学討論会 (福岡) 2005/9/11.
19. 山田幸司・野村友紀・岩澤尚子・鈴木孝治 “配向制御によりスペクトルシフトするボロン-ジピロメテン蛍光プローブとセンサー応用”, 2005 年光化学討論会 (福岡) 2005/9/11.
 20. 安藤洋介・飯野真史・山田幸司・鈴木孝治 “イオン応答性波長シフト型ボロン-ジピロメテン色素”, 2005 年光化学討論会 (福岡) 2005/9/11.
 21. 佐藤朱美, 山田幸司, 鈴木孝治 “マルチカラー化学発光プローブの創製と展開”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 22. 緒方章子, 本田亜希, 鈴木孝治 “MALDI-TOF MS 用ナノドットプレートの開発と応用”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 23. 一二三洋希, 牧野恵, 谷本伸弘, 本田亜希, 小松広和, 鈴木孝治 “新規 MRI probe の設計・合成と応用 (9) 生体内イオンの測定”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 24. 一二三洋希, 牧野恵, 谷本伸弘, 本田亜希, 鈴木孝治 “新規 MRI probe の設計・合成と応用 (10) グルコースの測定”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 25. 林真一郎, 本間祐也, 一二三洋希, 本田亜希, 岩澤尚子, 鈴木孝治 “タンパク質検出のためのアダクティブマスマスプローブの合成と新規イムノアッセイへの応用 (2)” 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 26. 梅澤啓太郎, Citterio Daniel, 牧野弘, 岩澤尚子, 山田幸司, 鈴木孝治 “バイオイメージングを目的とした新規近赤外蛍光色素の開発”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 27. 須賀千絵, 上野由貴, 小川証, 松熊佳奈, 上田晃生, 丸山健一, 山田幸司, 鈴木孝治 “レドックスタグプローブ法による電気化学的イムノアッセイならびに SNPs 検出への応用”, 第 67 回分析化学討論会 (秋田) 2006/5/13.
 28. 佐藤朱美, 山田幸司, 梅澤啓太郎, 鈴木孝治 “ボロン-ジピロメテン誘導体を用いたマルチカラー化学発光色素”, 2006 年光化学討論会 (仙台) 2006/9/10.
 29. Daniel Citterio, Hideaki Hisamoto, Hirokazu Komatsu, Masaki Kosugi, Shin-ichi Sasaki, Koji Suzuki, Junichiro Takeda “A pH-Independent Fluorescent Chemosensor for Highly Selective Lithium Ion Sensing”, PITTCON2007, Chicago(USA), 2007/2/28.
 30. Keitaro Umezawa, Daniel Citterio, Naoko Iwasawa, Hiroshi Makino, Yuki Nakamura, Koji Suzuki, Koji Yamada “Novel Near-Infrared Fluorescent Dyes Based on Boron-Dipyrromethene for Biological Analysis”, PITTCON2007, Chicago(USA), 2007/2/28.
 31. Yosuke Ando, Daniel Citterio, Shinji Iino, Koji Suzuki, Koji Yamada “Ratiometric Fluorescent Ion Glass Optodes Based on Boron-Dipyrromethene Derivatives”, PITTCON2007, Chicago(USA), 2007/2/28.
 32. 梅澤啓太郎, 鈴木孝治 “バイオイメージングを目的とした高輝度近赤外蛍光色素の開発”, 第 2 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (福井) 2007/6/28.
 33. 梅澤啓太郎・チッテリオ ダニエル・鈴木孝治 “スクワリウム骨格を有する新規ソルバトクロミック近赤外蛍光色素の開発”, 日本分析化学会第 56 年会 (徳島) 2007/9/19.

(4) 特許出願

① 国内出願 (18 件)

1. 名称: 質量分析用プローブ

発明者: 本田亜希, 鈴木祥夫, 丹治範文, 鈴木孝治

出願人: (独) 科学技術振興機構, 神奈川科学技術アカデミー

出願日: 2003/8/13 出願番号: 特願 2003-207469

2. 名称: 質量分析用プローブ及びそれを用いた質量分析方法

発明者: 本田亜希, 鈴木孝治, 一二三洋希, 本間祐也, 山田幸司, 岩澤尚子, 丹治範文

出願人: (独) 科学技術振興機構

出願日: 2003/11/10 出願番号: 特願 2003-380422

3. 名称:環境中のアレルゲンの測定方法及び装置
発明者:本田亜希、鈴木孝治
出願人:本田亜季、鈴木孝治、科学技術振興事業団
出願日:2003/12/17 出願番号:特願 2003-419346
4. 名称:第二銅イオン測定用プローブ及びそれを用いた第二銅イオンの測定方法
発明者:鈴木孝治、鈴木祥夫、小松広和
出願人:神奈川科学技術アカデミー、(独)科学技術振興機構
出願日:2004/1/15 出願番号:特願 2004-8475
5. 名称:カルシウム・マグネシウムマルチ蛍光プローブ
発明者:鈴木孝治、小松広和
出願人:神奈川科学技術アカデミー、(独)科学技術振興機構
出願日:2004/1/19 出願番号:特願 2004-10433
6. 名称:免疫細胞クローンの拡大の有無の判定方法
発明者:本田亜希、鈴木孝治
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:2004/5/8 出願番号:特願 2004-63670
7. 名称:超微小ナノ酵素電極
発明者:鈴木孝治、丸山健一
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:2004/9/14 出願番号:特願 2004-266304
8. 名称:電気化学測定用カーボン薄膜電極
発明者:鈴木孝治、丸山健一、丹羽修、廣野滋
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:2004/9/24 出願番号:特願 2004-277406
9. 名称:ガス中の被検物質検出器及びそのためのホルダー
発明者:鈴木孝治、鈴木祥夫
出願人:(独)科学技術振興機構、神奈川科学技術アカデミー
出願日:2004/10/19 出願番号:特願 2004-303793
10. 名称:質量分析用基板
発明者:本田亜希、鈴木孝治
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:2004/10/29 出願番号:特願 2004-315699
11. 名称:可塑剤を用いないポリマー材料
発明者:鈴木孝治、丸山健一
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:2004/11/15 出願番号:特願 2004-330130
12. 名称:被検物質の定量方法
発明者:石原才子、荒木敬夫、ダニエル・チッテリオ、萩原将文、鈴木孝治、丸山健一
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:2004/11/26 出願番号:特願 2004-341811
13. 名称:プロテアーゼの測定方法及びそのための試薬
発明者:本田亜希、岩澤尚子、鈴木孝治
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:2004/12/17 出願番号:特願 2004-365671
14. 名称:FRET を利用した競合センサー
発明者:本田亜希、鈴木孝治、石内孝幸、古後紘子
出願人:(独)科学技術振興機構／慶應義塾
出願日:2005/8/3 出願番号:特願 2005-225577
15. 名称:環境中のアレルゲンの測定方法及びそのための試薬

発明者:本田亜希、鈴木孝治

出願人:(独)科学技術振興機構

出願日:2005/6/17 出願番号:特願 2005-177814

16. 名称:蛍光性化合物及びそれから成る標識剤

発明者:鈴木孝治、梅澤啓太郎、牧野弘、チッテリオ ダニエル

出願人:学校法人慶應義塾

出願日:2006/4/28 出願番号:特願 2006-126208

17. 名称:無機・有機材料を用いた新規 MRI プローブ

発明者:鈴木孝治、一二三洋希、谷本伸弘、山岡誠一

出願人:学校法人慶應義塾

出願日:2006/7/10 出願番号:特願 2006-189119

18. 名称:局在表面プラズモン共鳴法と質量分析法によるリガンドの分析方法及びそのためのセンサー素子

発明者:岩崎亜希、鈴木孝治

出願人:学校法人慶應義塾

出願日:2006/7/15 出願番号:特願 2006-194974

②海外出願 (2 件)

1. 名称:環境中のアレルゲンの測定方法及び装置(特願 2003-419346 に基づく新規PCT出願)

発明者:本田亜希、鈴木孝治

出願人:(独)科学技術振興機構

出願日:2004/12/17 出願番号:PCT/JP2004/18895

2. 名称:ガドリニウム錯化合物及びそれから成るMRIプローブ(特願 2005-65033 に基づく新規PCT出願)

発明者:鈴木孝治、一二三洋希、谷本伸弘、牧野恵

出願人:(独)科学技術振興機構

出願日:2006/3/8 出願番号:PCT/JP2006/304474

(5)受賞等

①受賞

1. 2005 年 本田亜希、一二三洋希、本間祐也、山田幸司、小松広和、鈴木孝治
日本分析化学会第 54 回大会ポスター賞 “MPAI 法による生体分子の質量分析計を用いたトータルアナリシス”
2. 2005 年 鈴木孝治他 日立環境賞 優良賞受賞
3. 2006 年 本田亜希 東京コンファレンス優秀講演賞 “ナノ構造基板を用いた MALDI-MS 解析”
4. 2007 年 鈴木孝治 日本分析化学会 学会賞
5. 2007 年 梅沢啓太郎 東京コンファレンス優秀講演賞 “バイオ分析を目的とした新規高輝度近赤外蛍光色素の開発”, 東京コンファレンス 2007 (幕張) 2007/8/29

②新聞報道

1. 2003/6/5 日刊工業新聞 「数十秒で抗体検出」
2. 2003/10/3 日刊工業新聞 「短い DNA 塩基配列の解析 質量分析計使い数分で」
3. 2004/3/5 日本経済新聞 「ダニ検出テープで簡単」
4. 2005/5/2 フジビジネスアイ 「テープの色でダニを簡単計測」
5. 2005/5/30 日経産業新聞 「病変見つけやすく MRI 検査 慶大が造影剤 イオンの変化「腕」使い補足」
6. 2005/7/25 日経産業新聞 「イオン濃度性格計測 慶大 がん細胞発見期待」
7. 2006/5/30 日経産業新聞 「DNA 質量分析 精度 7 倍 慶大などシリコン基板使う」

③その他

なし

<産総研グループ>

(1)原著論文発表 (国内誌 2 件、国際誌 8 件)

1. Osamu Niwa “Electroanalytical chemistry with carbon film electrodes and micro and nano-structured carbon film-based electrodes”, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 78, 555-571 (2005).
2. Guobao Xu, Yuzuru Iwasaki, Osamu Niwa “Selective electrochemical response of dopamine against 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid at bare indium-tin oxide electrode”, Chemistry Letters, 34, 1120-21 (2005).
3. Osamu Niwa, Guobao Xu, Yuzuru Iwasaki “Highly selective response of dopamine against its metabolite and interfering molecules at sputtered ITO electrode surface”, Electrochemistry, 74, 135-137 (2006).
4. Osamu Niwa, Jianbo Jia, Yukari Sato, Dai Kato, Ryoji Kurita, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono “Electrochemical Performance of Angstrom Level Flat Sputtered Carbon Film Consisting of sp² and sp³ Mixed Bonds”, J. Am. Chem. Soc., 128, 7144-7145 (2006).
5. Jianbo Jia, Dai Kato, Ryoji Kurita, Yukari Sato, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono, Toshihiro Ando, Osamu Niwa “Structure and Electrochemical Properties of Carbon Films Prepared by Electron Cyclotron Resonance (ECR) Sputtering Method”, Anal. Chem., 79, 98-105 (2007).
6. Dai Kato, Seiichiro Iijima, Ryoji Kurita, Yukari Sato, Jianbo Jia, Soichi Yabuki, Fumio Mizutani, Osamu Niwa “Electrochemically Amplified Detection for Lipopolysaccharide Using Ferrocenylboronic Acid”, Biosens. Bioelectron., 22, 1527-1531 (2007).
7. Osamu Niwa, Dai Kato, Ryoji Kurita, Tianyan You, Yuzuru Iwasaki, Shigeru Hirono “Electrocatalytic Detection of Hydrogen Peroxide Using Platinum-Nanoparticle Dispersed Carbon Film Electrodes”, Sensors and Materials, 19, 225-233 (2007).
8. Dai Kato, Guobao Xu, Yuzuru Iwasaki, Yoshiki Hirata, Ryoji Kurita, Osamu Niwa “Heavy Phosphate Adsorption on Amorphous ITO Film Electrodes: Nano-Barrier Effect for Highly Selective Exclusion of Anionic Species”, Langmuir, 23, 8400-8405 (2007).
9. Naoyuki Sekioka, Dai Kato, Ryoji Kurita, Shigeru Hirono, Osamu Niwa “Improved Detection Limit for an Electrochemical α -Aminobutyric Acid Sensor Based on Stable NADPH Detection Using an Electron Cyclotron Resonance Sputtered Carbon Film Electrode, Sensors & Actuators: B., in press.
10. Akio Ueda, Osamu Niwa, Kenichi Maruyama, Yutaka Shindo, Kotaro Oka, Koji Suzuki, “Neurite Imaging of Living PC12 Cell with Scanning Electrochemical /Near-Field Optical /Atomic Force Microscopy”, Angew. Chem. Int. Ed. in press

(2)その他の著作物 (総説、書籍など)

1. 丹羽修, “マイクロ、ナノ構造を有する電極を用いた電気化学反応、センシング”, 表面技術, 55(6), 398-401 (2004).

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演 (国内会議 6 件、国際会議 2 件)

1. Osamu Niwa, Jianbo Jia, Yukari Sato, Dai Kato, Tianyan You, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono “Sputter deposited carbon film electrodes for measuring

- biomolecules”, The 56th Annual Meeting of International Society of Electrochemistry (Busan, Korea) 2005/9/26-30.
2. Osamu Niwa, Jianbo Jia, Yukari Sato, Dai Kato, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono “Electrochemical Determination of Biomolecules with ECR Sputter Deposited Carbon Film Electrodes”, The 6th East Asian Conference on Chemical Sensors (Guilin, China) 2005/11/6-9.
 3. 丹羽修, 佐藤縁, 栗田僚二, 丸山 健一, 岩崎弦, 鈴木孝治, 廣野滋 “スパッタ薄膜電極の作製とその生体分子検出への応用”, 第 50 回ポラログラフィ及び電気分析化学討論会 (京都大学) 2004/11/26.
 4. 丹羽修, 上野祐子, “メゾポーラス材料, ナノ構造電極を用いた生体環境分析”, 第 53 回分析化学年会 (千葉工大) 2004/9/1.
 5. 丹羽修 “電気化学界面技術を利用した生体分析化学”, バイオウィーク in Sapporo 2005, 2005/7/5-6.
 6. 丹羽修 “電極表面、ナノ材料表面を利用したセンシング”, バイオ分子センサー連携PJ, レクチャーコース(岡崎統合バイオサイエンスセンター) 2005/7/31.
 7. 丹羽修 “ナノ材料や自己組織化膜を用いたバイオセンサ、マイクロ流体デバイスの開発”, 第 53 回次世代センサセミナーシリーズ バイオセンサにおけるナノテクノロジー (東京) 2005/12/12.
 8. 丹羽修, 栗田僚二, 佐藤縁, 水谷文雄, 岩崎弦, 鈴木孝治, 廣野滋 “ナノ表面を利用したセンシングデバイスの開発”, 第 67 回応用物理学会学術講演会, 立命館大学(大阪) 2006/8/29.

②口頭発表 (国内会議 13 件、国際会議 5 件)

1. 丹羽修、上野 祐子, “メゾポーラス材料、ナノ構造電極を用いた生体環境分析(依頼講演)”, 分析化学学会年会, 千葉, 2004/9/1
2. 丹羽修、佐藤縁、栗田僚二、岩崎弦、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋, “スパッタ薄膜電極の作製とその生体分子検出への応用(依頼講演)”, 第 50 回ポラログラフィおよび電気分析化学討論会, 京都, 2004/11/26
3. O. Niwa, Y. Sato, Y. Iwasaki, S. Hirono, K. Maruyama, K. Suzuki, “Electrochemical performance of ECR sputter deposited carbon films with different sp³ binds content”, 2004 電気化学日米合同大会, ハワイ, 2004/10/4
4. Jianbo Jia, Yukari Sato, Dai Kato, Ryoji Kurita, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono, Toshihiro Ando, and Osamu Niwa “Structure and Electrochemical Properties of Carbon Film Electrodes Prepared by Electron-Cyclotron-Resonance (ECR) Sputtering Method”, The 6th East Asian Conference on Chemical Sensors (Guilin, China), 2005/11/6-9
5. Dai Kato, Seiichiro Iijima, Yukari Sato, Jianbo Jia, Ryoji Kurita, Fumio Mizutani and Osamu Niwa “Electrochemical Detection of Lipopolysaccharide using Enzyme-Modified Electrodes”, The 6th East Asian Conference on Chemical Sensors (Guilin, China), 2005/11/6-9
6. Osamu Niwa, Jianbo Jia, Dai Kato, Yukari Sato, Fumio Mizutani, Kenichi Maruyama, Koji Suzuki, Shigeru Hirono, “Electrochemical interface for sensing biomolecules based on new carbon based film electrodes and SAM technique”, Pacificchem 2005 (Honolulu), 2005/12/18
7. 丹羽修, Jia Jianbo, 佐藤縁, 加藤大、栗田僚二、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋, “ECR スパッタカーボン電極の特性と生体試料検出への応用”, 電気化学会 72 回大会(熊本), 2005/4/1-3
8. Xu Guobao, 岩崎弦、丹羽修, “ITO 電極によるカテコールアミンの選択的センシング”, 電気化学会 72 回大会(熊本), 2005/4/1-3

9. 加藤大、飯島誠一郎、佐藤縁、Jia Jianbo、栗田僚二、坂田真砂代、丹羽修、水谷文雄、”電気化学的手法によるリポポリサッカライドの検出”、電気化学会 72 回大会(熊本)、2005/4/1-3
10. Jia Jianbo、佐藤縁、加藤大、栗田僚二、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋、安藤寿浩、丹羽修、”ECR スパッタ法で作製したカーボン薄膜電極の構造と電気化学特性”、電気化学秋季大会(千葉大学)、2005/9/8-9
11. 丹羽修、ジア ジアンボ、栗田僚二、加藤大、佐藤縁、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋、”ECR スパッタカーボン薄膜電極上での電気化学活性種の応答”、日本分析化学会第 54 回大会(名古屋大学)2005/9/14-16
12. 丹羽修、Jia Jianbo、加藤大、栗田僚二、佐藤縁、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋 “ECR スパッタカーボン薄膜を用いた核酸分子の定量的測定”、第 67 回分析化学討論会、秋田大学(秋田)、2006/5/13.
13. Dai Kato, Seiichiro Iijima, Ryoji Kurita, Yukari Sato, Fumio Mizutani, Osamu Niwa, “Lipopolysaccharide Detection Using Current Amplification for Ferrocenylboronic Acid with an Enzyme-modified Electrode”, The 11th International Meeting on Chemical Sensors, Brescia(Italy), 2006/7/16-19.
14. 加藤大、Xu Guobao、岩崎弦、平田芳樹、栗田僚二、佐藤縁、丹羽修 “ITO 電極表面へのリン酸基含有化合物の吸着を利用した電気化学測定”、2006 年電気化学秋季大会、同志社大学(大阪)、2006/9/15.
15. 関岡直行、加藤大、栗田僚二、佐藤縁、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋、丹羽修 “ECR スパッタカーボン薄膜電極を用いたバイオセンサによる生体分子の検出”、2006 年電気化学秋季大会、同志社大学(大阪)、2006/9/15.
16. 関岡直行、加藤大、栗田僚二、梅村 茂、廣野滋、丹羽修、”電気化学処理による導電性ナノカーボン薄膜電極の電気化学特性の変化”、2007 年電気化学秋季大会、東京工業大学、2007/9/19
17. 加藤大、関岡直行、栗田僚二、廣野滋、鈴木孝治、丹羽修、”導電性ナノカーボン薄膜電極を用いた1塩基多型の検出”、2007 年電気化学秋季大会、東京工業大学、2007/9/20
18. 上田晃生、丹羽修、丸山健一、新藤豊、岡浩太郎、鈴木孝治、”SECM/NSOM/AFM による生細胞 PC12 軸索イメージング”、日本分析化学会 56 回年会、徳島大学、2007/9/20

③ポスター発表 (国内会議 2 件、国際会議 0 件)

1. 加藤大、Xu Guobao、岩崎弦、平田芳樹、栗田僚二、丹羽修 “アモルファス ITO 電極表面へのリン酸イオン吸着を利用したドーパミンの選択的検出”、第 68 回分析化学討論会、宇都宮大学、2007/5/20.
2. 関岡直行、加藤大、栗田僚二、中元浩平、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋、丹羽修 “電子サイクロトン共鳴(ECR)スパッタカーボン電極を用いた γ -アミノ酪酸の検出”、第 68 回分析化学討論会、宇都宮大学、2007/5/20.

(4)特許出願

①国内出願 (4 件)

1. 名称:電気化学測定用カーボン薄膜電極
 発明者:丹羽修、佐藤縁、丸山健一、鈴木孝治、廣野滋
 出願人:産総研、NTTアフティ、慶応大学
 出願日:2004/9/24 出願番号:
- 2.名称:エンドトキシンの電気化学的測定方法
 発明者:加藤大、飯島誠一郎、Jia Jianbo、栗田僚二、佐藤縁、坂田真砂代、水谷文雄、丹羽修
 出願人:JST/産総研
 出願日:2005/9/28 出願番号:特願 2005-282892

3. 名称:DNA 及び RNA 中の核酸塩基の電気化学的検出方法

発明者:加藤大、丹羽修、栗田僚二

出願人:産総研

出願日:2007/5/28 出願番号:特願 2007-140216

4. 名称:メチル化 DNA の電気化学的定量方法

発明者:加藤大、丹羽修、栗田僚二

出願人:産総研

出願日:2007/9/13 出願番号:特願 2007-238216

②海外出願 (0 件)

(5)受賞等

①受賞

日本化学会学術賞(平成 15 年度):丹羽 修

②新聞報道

2005/2/2 日経産業新聞 「DNA 濃度を電気測定」

③その他

なし

<NTT-MI 研グループ>

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 5 件)

1. Tianyan You, Osamu Niwa, Masato Tomita and Shigeru Hirono “Characterization of Platinum Nanoparticle-Embedded Carbon Film Electrode and Its Detection of Hydrogen Peroxide”, Anal. Chem., 75, 2080 (2003).
2. Tianyan You, Osamu Niwa, Zilin Chen, Katsuyoshi Hayashi, Masato Tomita, Shigeru Hirono “An Amperometric Detector Formed of Highly Dispersed Ni Nanoparticles Embedded in a Graphite-like Carbon Film Electrode for Sugar Determination”, Anal. Chem., 75, 5191-96 (2003).
3. Tianyan You, Osamu Niwa, Ryoji Kurita, Yuzuru Iwasaki, Katsuyoshi Hayashi, Koji Suzuki, Shigeru Hirono “Reductive H_2O_2 Detection at Nanoparticle Iridium/Carbon Film Electrode and Its Application as L-Glutamate Enzyme Sensor”, Electroanalysis 16, 54-59 (2004).
4. Yuzuru Iwasaki, Osamu Niwa “Electrochemical Surface Plasmon Resonance Measurement of Electrocatalytic Oxidation of Glucose on Gold Electrode (E)”, Electrochemistry, 74, 172-174 (2006).
5. Yuzuru Iwasaki, Tatsuya Tobita, Kazuyoshi Kurihara, Tsutomu Horiuchi1, Koji Suzuki and Osamu Niwa “Imaging of flow pattern in micro flow channel using surface plasmon resonance”, Meas. Sci. Technol., 17, 3184-3188 (2006).

(2)その他の著作物 (総説、書籍など)

なし

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

①招待講演 (国内会議 3 件、国際会議 2 件)

1. 丹羽修(基調講演) “分子認識ナノ材料、薄膜を利用したマイクロセンシングチップ”, 第7回化学とマイクロ、ナノシステム研究会,(北大、札幌)2003/4.
2. 丹羽修, 由天艶, 林 勝義, 富田雅人, 広野滋 “Electrochemical properties of sputter deposited diamond-like carbon and metal nano-particle dispersed graphite-like carbon film electrodes”, 203rd Electrochemical Society Meeting (Paris)2003/4.

3. 丹羽修、由天艶、陳子林、岩崎弦、鈴木孝治、広野滋 “Metal nanoparticles embedded in graphite-like carbon film for electroanalysis”, BCEIA2003 (北京) 2003/10.
4. 丹羽修 “マイクロ、ナノ構造を有する電極を用いた電気化学反応、センシング”、第62回表面技術アカデミック研究会討論会 (東京) 2003/11/11.
5. 丹羽修 “マイクロ電気化学分析の研究開発と高感度生体分子センシングへの応用”、日本化学会 84 春季年会 学術賞受賞講演 (関西学院、西宮) 2004/3/27.

②口頭発表 (国内会議 4 件、国際会議 2 件)

1. 丹羽修、由天艶、陳子林、岩崎弦、鈴木孝治、広野滋 “Metal nanoparticles embedded in graphite-like carbon film for electroanalysis”, BCEIA2003 (北京).
2. 岩崎弦, Guobao Xu, 丹羽修, 鈴木孝治 “ナノ電極の構造と反応選択性”, 第 50 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会 (京都) 2004/11/25~26.
3. Xu Guoba, 岩崎弦, 丹羽修 “ITO 電極によるカテコールアミンの選択的センシング” 電気化学会(熊本) 2005/4/1.
4. 岩崎弦, 丹羽修 “ナノサイズパターンによる表面プラズモン共鳴を使った生体分子相互作用測定”, 電気化学会 (千葉) 2005/9/8.
5. 岩崎弦, 丹羽修 “変調構造ナノドット配列による生体分子相互作用測定”, 日本化学会 (関西大学, 大阪) 2007/3/27.
6. Yuzuru Iwasaki, Tsutomu Horiuchi, Tsuneyuki Haga, Tatsuya Tobita, Koji Suzuki, Osamu Niwa, “DEVELOPMENT OF SURFACE PLASMON RESONANCE SENSOR SYSTEM FOR BIOLOGICAL REACTION SENSING”, 13th MICROOPTICS CONFERENCE, 高松, 2007/10/30

③ポスター発表 (国内会議 0 件、国際会議 0 件)

(4)特許出願

①国内出願 (1 件)

1. 名称: SPRセンサーおよび屈折率測定方法
発明者: 岩崎弦、丹羽修、館彰之
出願人: 日本電信電話株式会社 出願日: 2004/6/16

②海外出願 (0 件)

(5)受賞等

①受賞

なし

②新聞報道

なし

③その他

なし

<神産センターグループ>

(1)原著論文発表 (国際誌 4 件)

1. Takeshi Ito, Kenichi Maruyama, Kazuharu Sobue, Seishiro Ohya, Osamu Niwa, Koji Suzuki “Electrochemical Behavior of Parallel Opposed Dual Electrode in a Microchannel”, Electroanalysis, 16, 2035-2041 (2004).
2. Takeshi Ito, Taku Kawaguchi, Hiroko Miyoshi, Kenichi Maruyama, Aki Honda, Satoru, Kaneko, Seishiro Ohya, Osamu Niwa, Kouichi Terasaka, Koji Suzuki “Fabrication of High Performance Polymeric Microfluidic Device by a Simple Imprinting Method using a Photosensitive Sheet”, Japanese Journal of Applied Physics, 45, L64-L67 (2006).

3. Takeshi Ito, Taku Kawaguchi, Hiroko Miyoshi, Kenichi Maruyama, Satoru Kaneko, Seishiro Ohya, Yuzuru Iwasaki, Osamu Niwa, Koji Suzuki “Characterization of a Microfluidic Device Fabricated Using a Photosensitive Sheet”, Journal of Micromechanics and Microengineering, 17, 432-438 (2007).
4. Takeshi Ito, Masayuki Kunimatsu, Satoru Kaneko, Seishiro Ohya, Koji Suzuki “Microfluidic Device for the Detection of Glucose Using a Micro Direct Methanol Fuel Cell as an Amperometric Detection Power Source”, Analytical Chemistry, 79, 1725-1730 (2007).

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

1. Takeshi Ito, Kenichi Maruyama, Osamu Niwa, and Koji Suzuki “Electrochemical response dependent with composition of parallel opposed dual electrode and flow rate in a microchannel”, Chemical sensors VI: Chemical and Biological Sensors and Analytical Methods, 289-299 (2004).

(3)学会発表（国際学会発表及び主要な国内学会発表）

①招待講演

なし

②口頭発表（国内会議 6 件、国際会議 1 件）

1. 伊藤健、川口卓、三好裕子、丸山健一、本田亜希、大屋誠志郎、鈴木孝治 “感光性シートを用いたマイクロ流体デバイスの開発”, 第 66 回応用物理学会学術講演会（徳島大学, 徳島） 2005/9/10.
2. 伊藤健、川口卓、三好裕子、丸山健一、本田亜希、大屋誠志郎、鈴木孝治 “感光性シートを用いたマイクロ流体デバイスの基礎特性評価”, 第 53 回応用物理学関連連合講演会（武蔵工業大学, 東京） 2006/3/25.
3. 伊藤健、川口卓、三好裕子、丸山健一、本田亜希、大屋誠志郎、鈴木孝治 “感光性シートから作製した鋳型を転写したポリマー流体デバイスと DNA 分離分析への応用”, 電気化学会 73 回大会（首都大学東京, 東京） 2006/4/2.
4. 伊藤健、国松昌幸、大屋誠志郎、丹羽修、鈴木孝治 “マイクロ燃料電池を電圧印加素子として使用したマイクログルコースセンサーの作製と評価”, 2006 年電気化学会秋季大会（同志社大学, 京都） 2006/9/15.
5. Takeshi Ito, Kenichi Maruyama, Seishiro Ohya, Koji Suzuki “Easy Fabrication of Microfluidic Device Using Photosensitive Sheet”, 210th Meeting of the Electrochemical Society (Cancun, Mexico) 2006/11/1.
6. 伊藤健、大屋誠志郎、鈴木孝治 “ビルドアップ製法によるマイクロバイオリアクターと電気化学検出器を内蔵したマイクロ流体デバイス”, 第54回応用物理学関連連合講演会（青山学院大学相模原キャンパス, 神奈川県） 2007/3/27.
7. 伊藤健、篠原俊朗、鈴木孝治 “検出器一体型ナノバイオリアクターを用いたナノインジェクション分析”, 2007 年秋季第 68 回応用物理学会学術講演会（北海道工業大学, 北海道） 2007/9/5.

③ポスター発表（国内会議 5 件、国際会議 1 件）

1. 伊藤健、丸山健一、祖父江和治、大屋誠志郎、丹羽修、鈴木孝治 “平行平板型電極を有するマイクロチップの作製と評価” 第8回化学とマイクロシステム研究会（早稲田大学, 東京） 2003/11/8.
2. 伊藤健、丸山健一、祖父江和治、大屋誠志郎、丹羽修、鈴木孝治 “Redox Recycling 効果を利用したプラスチック製電流増幅チップの開発”, 第9回化学とマイクロナノシステム研究会（京都大学, 京都） 2004/5/21.
3. Takeshi Ito, Kenichi Maruyama, Osamu Niwa, Koji Suzuki “Electrochemical Response Dependent with Composition of Parallel Opposed Dual Electrode and Flow Rate in a Microchannel”, 206th Meeting of the Electrochemical Society (Hawaii, USA) 2004/10/8.

4. 伊藤健、丸山健一、丹羽修、鈴木孝治 “フロー型平行平板電極チップの電気化学応答特性”，第10回化学とマイクロ・ナノシステム研究会（香川）2004/11/26.
5. 伊藤健、川口卓、三好裕子、大屋誠志郎、鈴木孝治 “感光性シートを用いた微小流路の作製と評価”，第12回化学とマイクロ・ナノシステム研究会（京都）2005/12/1.
6. 伊藤健、大屋誠志郎、鈴木孝治 “感光性シートを用いたビルドアップ製法によるマイクロバイオリアクターの開発”，第15回化学とマイクロナノシステム研究会（東北大学,宮城県）2007/5/26.

(4)特許出願

①国内出願（2 件）

1. 名称: 平行平板電極を有する電気化学検出用マイクロチップ
発明者: 伊藤健、丸山健一、鈴木孝治
出願人: JST、神奈川県
出願番号: 特願 2003-414756
2. 名称: マイクロチップの基板形成用金型の製造方法及び該金型を用いたマイクロチップの基板の製造方法
発明者: 伊藤健、大屋誠志郎、丸山健一、鈴木孝治
出願人: JST、神奈川県
出願番号: 特願 2005-253141

②海外出願（0 件）

(5)受賞等

①受賞

1. 2005 年 秋季第66回応用物理学会学術講演会 講演奨励賞受賞 伊藤健

②新聞報道

なし

③その他

なし

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

特になし

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

1) 神奈川科学技術アカデミーに、平成 18 年度よりナノフォトコンソシアムが誕生し、平成 19 年度よりナノフォトバイオグループが設立された。これは、CREST の成果が評価されたためである。そこでは、SPR センサー関連で NEDO プロジェクト(ナノテク事業)を展開している。

2) ITO 薄膜電極: ナノプローブ顕微鏡の開発の中で走査型電気化学顕微鏡(SECM)の機能化を目的として開発したドーパミンを代謝物、妨害物質の存在下で高選択的に検出できるアモルファス ITO 電極の成果が、NEDO プロジェクト「心疾患治療システム」の中でカテコールアミンセンサを検出する微小アレイ電極の材料として応用展開された。

(2)実用化に向けた展開

1) 細胞リアルタイム観察システム(マルチモード走査型顕微鏡システム)については、SII ナノテクノロジーがナノプローブ作製に参加しており、システムを共同研究している。今後は実用化販売を検討する。

2) SPR 基板およびセンサーは、テクノメディカが実用化を検討中である。システムインスツルメンツが開発中の自社装置中にアレイ SPR センサー基板導入を検討している。

3) 電子サイクロトロン共鳴(ECR)スパッタナノカーボン膜などセンサー商品を開発し、販売するベンチャー企業を立ち上げる予定である。成膜技術は、NTT アフティ社と共同開発している。この膜を電気化学式ガスセンサー用電極材料として応用したいと、ガスセンサーメーカー RK 社から要望があり、性能テスト中である。その他、大手写真メーカー C 社、電機メーカー N 社など多数から同様に話がきている。

4) 蛍光プローブを和光純薬と協議中のほか、MS プローブは、東京化成および関東化学と協議中である。

5) SPR-MS システムは、島津製作所と協議中である。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果

片岡チーム、長崎グループとの研究コラボレーション: 細胞アレイ構築や生体分子の非特異的な吸着が低いポリマーナノ粒子やポリマーをベースとするソフトインターフェイスを開発している筑波大学と、膜の評価に関して、鈴木研究チームの産総研グループが、ナノプローブ顕微鏡(主に原子間力顕微鏡)を利用した界面評価についてコラボレーションを行っている。また、片岡教授と岡野教授には、慶応にきていただいて、本研究推進への多くの助言をいただいた。

(2)領域横断的活動とその効果

平成 19 年 6 月に「センサー研究会合同ワークショップ」の第 1 回大会を企画、運営し、100 名以上の参加者を得て、成功裏に終わった。

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

1) マルチ蛍光プローブの開発

多成分を一分子で定量可能な単分子マルチセンサー(プローブ)の概念、カルシウム・マグネシウムマルチ蛍光プローブ、マルチ蛍光プローブを用いた同時定量方法、細胞内でのカルシウム・

マグネシウム同時定量に至る全てが独創的な概念およびそれに基づく機能分子であり、国内外に類を見ない。このため、マグネシウムマルチ蛍光プローブについても JACS(2004)、マルチ蛍光プローブ JACS(2005)に高く評価されて掲載された。また、マグネシウムマルチ蛍光プローブについても今後は、このプローブを利用して、今まで知られていなかった生体内カルシウム・マグネシウムのメカニズムが解明される期待があり、すでにミトコンドリアにマグネシウムが貯蔵されていること、パーキンソン病の原因とされる物質によってミトコンドリアから放出されることがわかった。こうした疾患解明に役立つことが期待される。

2) SECM/NSOM/AFM の開発とナノプローブの機能拡大を目的とした薄膜材料開発

走査型プローブ顕微鏡に関して、国内外において生体をターゲットにした研究開発は東北大の末永ら、テキサス大 A. J. Bardらのグループにより精力的に開発が進められている。しかしながら、3モード(SECM/NSOM/AFM)多機能型 SPM 開発は、本グループがリードしており、AFM や SNOM との集積化に成功し、その作製法が Anal. Chem. (2006)で評価されたことに加え、SECM においても解像度が 100 nm 程度と細胞の局所領域を明瞭に観察可能な世界トップの性能を実現し Angewandte Chem.(2007 in Press)に掲載が決まった。

一方、プローブ顕微鏡に使用する為に開発を進めているカーボン系薄膜材料では、ECR スパッタ薄膜電極が電位窓の点でミシガン州立大の Swain らや東大の藤嶋らにより開発されたボロンドープダイヤモンド膜を越える性能を有することを JACS(2006)や Anal. Chem. (2007)に報告した。この薄膜は、ナノレベルで平坦なグラファイト膜を凌駕する原子レベルの平坦性を有する初のカーボン膜材料である。さらに製造に高温でのプロセスが不要などの利点からプローブ顕微鏡探針をそのサイズや形状を変えることなく容易に修飾でき、特にこれまで測定対象が限定されていた SECM のイメージング可能な生体分子の範囲を飛躍的に拡大できる。さらに、共スパッタという簡便な方法で触媒活性の高い金属ナノ粒子を複合化できるため、他機関で報告されている電析法に比較し安定で、平坦性に優れた膜が得られ、プローブをベースにしたナノサイズのバイオセンサー開発に有力な材料と考える。このカーボン膜は、カーボンナノチューブを高密度に並べたような構造で、 sp^2 と sp^3 の比を作製条件で制御することができる。新たな電極として画期的な材料である。特に DNA などのヌクレオチドの酸化電流電位測定が可能であり、この特性を利用して SNP などの DNA ミスマッチ検出ができた。この成功と方法論は画期的なものであり、現在レベルの高い雑誌に投稿中である。

同様に ITO スパッタ薄膜電極は、これまでのナフィオンなど高分子膜修飾を必要とせず、高選択的なドーパミン測定が実現でき、Langmuir(2007)に掲載された。このようなスパッタ膜は、新規電極材料として、幅広く実用デバイスに使われていくであろう。

3) マイクロ流体デバイスに集積したナノパターンSPRによる生体分子相互作用測定

抗原抗体反応をマイクロ流体デバイス中で行うものについては、これまでに ELISA 法をマイクロ流体デバイスに統合したものがある。しかしながら、この方法では、ラベル化試薬を外部から投入する必要がある。この点において、本研究では、ラベル化が不要であり、サンプルを直接測定できる点において有利である。また、流体デバイスと SPR センサーを統合したものとして、BIAcore 社などの装置が上げられるが、これらは実際に SPR 測定をしたい試料を装置に導入して測定を行うのに対し、本研究が目指すものは、サンプリングも行うことができ、なおかつセンサーとして SPR-MS を集積した一連のデバイス化であるという点が異なる。タンパク質の相互作用と同時にその相が作用するタンパク質はなにかとういことを決定できることが重要かつバイオ研究のニーズに合致した分析法である。

ナノドットアレイを使ったセンサーの研究は、ナノドットを三次元形状の殻状に作製する方法や屈折率感度の向上を狙った研究が、Northwestern University の P. Van Duyne らによって行われている。また、SPR 効果による位相変化によってセンサー感度を上げる方法は、GPI of the Russian Academy of Sciences の P. I. Nikitin らによって提案されている。本研究では、この両方の効果を2重周期のナノドットアレイで実現することによって、どちらよりも微小流路に組み込みやすい構造で、簡単な光学系、高感度化を目指している点がより独創的である。SPR-MS は、マトリクスレスのタン

パク質イオン化法として実用化することを期待している。

4) MPAI 法を用いた質量分析計によるトータルアナリシス

これまでに低分子化合物を誘導体化してイオン効率を上げ、質量分析計で測定するという方法が行われているが、目的物質の価数を調節して測定するという方法は全くない。タンパク質を質量分析するためのラベル化法としては、放射性同位体を用いて測定する ICAT: isotope coded affinity tags が広く用いられる。しかし、ICAT ではあくまでもタンパク質の同定を目的としており、定量、とりわけ同時定量は行われていない。さらに言えば、本研究のように、タンパク質のみでなく、イオンや低分子化合物なども同時に質量分析計で測定するという考え方は全く新しいものである。このようにラベル化により、電荷イオン部位(4級アンモニウムなど)を付加したり、4級アンモニウムを切り出したりして、リガンドとして作用してイオン化の効率を飛躍的に上げることでできる方法を MAPI (Mass Probe Aided Ionization) 法として提案、確立したことは独創的である Chemical Record(2006)にも掲載されたほか、Anal.Chim.Acta から Review の依頼がきている。

加えて、MPAI 法に用いるためのナノドットターゲットプレートの開発を行い、その有効性を実証したことで Chem.Comm.に掲載された。この技術は、MALDI MS を自動化するうえで欠くべからざるものである。また、感度や再現性を上げるために、サンプルをスポッティング技術を用いて塗布するなどの方法があるが、本方法は、効果も高い上、調整が簡易であり、既存の方法に比べて優れている。最近、このプレートとタンパク質用マスプローブを併用すると、マトリクスレス MALDI MS (LDI MS と呼ぶべき)が実現した。こうした簡便な質量分析法はバイオ分析にとって重要な方法になると期待している。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

1) マルチ蛍光プローブの開発

マグネシウム蛍光プローブ KMG-20AM の実用化は生体内(特に細胞内)マグネシウムの動態観察に役立っている。さらに、共焦点顕微鏡に向く最高性能の KMG-104 は、それにつづくものとなるであろう。また、ミトコンドリアイメージング用の KMG-301 およびカルシウム・マグネシウム蛍光プローブ KCM-1 の実用化を期待している。これらは、細胞内のマグネシウムの動態・相関の解析に最適であり、カルシウムについてマグネシウムが重要な役割を担う解析が活発化し、近い将来にマグネシウム研究がブレイクするのを期待している。

2) SECM/NSOM/AFM の開発とナノプローブの機能拡大を目的とした薄膜材料開発

ナノケミカルプローブの細胞観察用ツールとしてのマルチモード (AFM/NSOM/SECM) 走査型顕微鏡システムの実用化開発を進めており、ほぼ主要な技術開発は終了したと考えている。メーカーがプローブ作製に参加しており、装置化を進めたい。具体的な目標として、100nm 分解能はほぼ3モード (AFM/NSOM/SECM) で達成し、蛍光イメージングも組み合わせられることを実証した。また、細胞放出物質のドーパミン測定を実現できた。現在はこのシステムを走査型顕微鏡だけでなく、走査型ナノリソグラフィシステムとしての利用を検討しており、現在の DNA チップ(100 マイクロメートル平方アレイ)の1000倍の集積化が可能なチップ(100 ナノメートル平方アレイ)作製に挑戦しており、こうした技術にも展開できる。

さらに、ECR ナノカーボン膜は、ボロンドープダイヤモンド(BDD)電極の安定性や広い電位窓を有する特性、従来のグラファイト系カーボン材料が有する高い電極活性を合わせ持ち、BDD 電極が 700℃程度の高温で作製が必要なのに対して、常温で作製できる特性を有するため、ポリマー基板などにも膜形成ができるなど、現在の電極材料を凌駕する特性を有する。そのため、新たなセンサー、センシング法の開発、各種の電気化学センサーの高性能化に資すると予想される。この薄膜と関連センサーデバイスは、ベンチャーを起業して展開する予定である。すでに大手企業を中心に数社から、問い合わせが来ており、今後は実用化応用の展開が図られる見通しである。

3) マイクロ流体デバイスに集積したナノパターン SPR による生体分子相互作用測定

ナノドット SPR 基板は実用性が高く、実用化検討している。SPR-MS は、新たなタンパク質の網羅

的解析に最適であり、同様に実用化が期待できる技術である。この場合、マイクロ流路などをさまざまな形で設計して最終的に自動化するような装置に搭載することになるが、マイクロ流路デバイスを高価な鋳型から作らずに、ガラスやプラスチックに電着する形で作製できる方法を考案した。この技術は、簡便かつ安価であることから、さまざまなマイクロデバイス作製に応用されたいと考えている。

4) MPAI 法を用いた質量分析計によるトータルアナリシス

タンパク質のマスプローブについては、測定のアプリケーションによりタンパク質、イオン、低分子化合物用を開発した。現在は希望者に配布しているが、実用化して使用の拡大を果たしたい。また、ナノドットターゲットプレートを用いた測定は、MALDI-MS の自動化に最適であるため、この技術を搭載した質量分析装置を期待している。

11 結び

自己評価

本研究は、生細胞内外物質の動態解析を可能とする新規ナノケミカルプローブを創製し、これをバイオ計測と医療計測に展開することをねらいとした。研究の目標は、「単一細胞レベルの動態解析」に設定し、蛍光プローブ、光・電気化学プローブ、質量分析プローブという3種類の新規なケミカルプローブを利用した分析法を提案、確立することを目指した。その主な研究内容は、細胞の形状、および動態を細胞外からナノプローブ顕微鏡で観察する「細胞のリアルタイム測定システムの開発」と、細胞内物質の網羅的測定および細胞の外的刺激に対する応答および物質の放出を観察する「細胞応答観察システムの開発」との2つの面から細胞の分析システムの技術開発を行った。

4-1. 研究の成果

個々の成果を見ると、当初計画はおおむね達成し、それ以上に進んだものが多い。特に、種々のセンサー、プローブの開発、種々のケミカルプローブ開発については、多くの優れた独創的研究成果が得られた。中間評価では、いずれの成果も独立したものであり、方向性が希薄な印象があったが、研究課題・研究者を2つの開発グループに再編成し直し、最終目標を「単一細胞レベルの動態解析」に設定してバイオ・医療計測の目的を明確にしたアプローチをした。このため、完全に画一化された技術体系ではないにせよ、「単一細胞レベルの動態解析」についての基盤分析技術のコンセプトは達成された感がある。

個々の研究については着実に成果が上がり、近接場光・電気化学・原子間力を一つのプローブで同時測定できるマルチモード走査型顕微鏡の開発では世界最高の分解能を獲得し、マルチ蛍光プローブの開発と細胞内複数物質検出の成功も大きな成果である。さらに、電極型ナノプローブにおいては、エレクトロサイクロトロンスパッタ(ECR)薄膜電極や、特殊な表面をもつインジウムスズ酸化物(ITO)電極などの革新的センサー開発にも成功したことは評価に値する。

また、刺激に対する細胞の応答を直接観察するシステムとして、ナノドット表面プラズモン(SPR)センサを組み込んだマイクロ流体デバイス、タンパク質分析用のマスプローブ(MPAI 法; マスプローブ支援イオン化法)の開発も順調に行われた。このうち、新たなイオン化法である MPAI 法の研究はオリジナリティーの高いものであり、数種類のユニークな分子形のマスプローブを作製し、その適用性を調べた研究成果は高く評価される。このように、当初設定された種々のケミカルプローブ開発については、多くの研究成果をレベルの高い学会誌などに報告し、公表している点も評価できる。

4-2. 今後の研究に向けて

今後さらに発展させていくためには、得られた成果と技術を細胞レベルで疾患の同定(診断)、治療への知見を得る目標とし、医療分野との連携などが重要なポイントになってくるであろう。医療面

に大きく貢献できる研究展開を期待する。

4-3. 総合的評価

個々の課題については多くの成果を上げ、高く評価出来る。「単一細胞レベルの動態解析」の概念を持ち込み、分子プローブ、ナノプローブ、マルチモード走査型顕微鏡の開発を成功させた。また、新たなイオン化法となるMPAI法とそれを実現するさまざまなマスプローブ分子を合成して展開した質量分析や、表面プラズモン共鳴 (SPR) と質量分析 (MS) を同じ1つのプレートで実現するナノドットプレート SPR-MS の開発などの独創性と実用性の高い技術開発を果たしたことは、高く評価できる。

最後に、本 CREST 研究に尽力いただいた相澤総括、雀部総括、山本技術参事をはじめ、アドバイザーの先生方および事務ご担当者各位に深謝いたします。本研究の成果は、鈴木孝治の平成 19 年度(2007 年 9 月)日本分析化学会・学会賞(研究業績「化学センシング分子およびデバイスの創製と実用化」)や丹羽修の平成 15 年度(2004 年 3 月)日本化学会学術賞 (研究業績「マイクロ電気化学分析の研究開発と高感度生体分子センシングへの展開」)およびスタッフ・院生の多くの受賞につながりました。ここに御礼申し上げます。