バイオチップの走査型電気化学顕微鏡解析

安川智之*, 珠玖 仁**, 水谷文雄**, 末永智一**

*兵庫県立大学 大学院物質理学研究科(〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1)

**東北大学 大学院環境科学研究科(〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11)

Sensing System for Bioassay Based on Scanning Electrochemical Microscopy

Tomoyuki YASUKAWA*, Hitoshi SHUKU**, Fumio MIZUTANI* and Tomokazu MATSUE**

*Graduate School of Material Science, University of Hyogo(3-2-1, Kouto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297)

**Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University(6-6-11, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8579)

Keywords: SECM Imaging, Cellular Activity, Single Cell Analysis, Biochip

1. はじめに

マイクロ電極は表面化学やバイオ分析化学の分野で活躍している。走査型電気化学顕微鏡(SECM)は、1980年代の後半に表面・界面の局所領域で進行する化学反応および生体化学反応を評価および可視化する新規技術として導入された^{1)~3)}。電気化学活性種を検出可能なマイクロ電極をプローブとしたSECMを用いると局所領域における電気化学活性種の濃度変化をリアルタイムで計測し、電気化学活性種の空間的な濃度プロファイルをイメージとして取得できる。現在、SECMは広範囲の分野に応用されており、局所領域で進行する化学反応を定量的に評価できるシステムとして高く評価されている。走査型プローブ顕微鏡の代表である走査型トンネル顕微鏡や走査型原子間力顕微鏡の有する原子レベルの空間分解能と比較して、近年改良が進んでいるがSECMの空間分解能は極めて低い。この低い空間分解能の原因は、化学反応が進行している位置から電極プローブへの電気化学活性種の拡散にある。しかし、マイクロ電極のサイズが単一細胞測定やバイオチップの評価のために一致し、サンプルを破壊することのない非侵襲性を有しているため、この分野において多用されるようになった。SECMは電極の走査方法において高さ一定モードと距離一定モードに大別され、電流の計測方法においてフィードバック(FB)モードとジェネレーション・コレクション(GC)モードに大別され、これらは総説や書籍で紹介されている^{4)~8)}。高さ一定モードSECMは、比較的簡便な装置で計測可能でありバイオチップの評価ツールとして使用されている。高さ一定モードの欠点を補い、高低差の大きなサンプルである単一細胞の機能を高感度に多方面から解析する目的で距離一定モードSECMが開発されている。しかし、距離一定モードSECMは、プローブの作製、距離制御機構および走査モードなどにおいて開発途上であり、現在でも細胞評価に高さ一定モードSECMが活躍している。

本解説では、2および3章において、ネガティブFBモードSECMおよびポジティブFBモードSECMの測定原理について解説し、単一細胞の形状イメージングと抗体チップの評価ツールへの応用へと展開する。さらに、4章でGCモードSECMの測定原理を解説するとともに、細胞をセンサ素子とした薬物センサや薬剤スクリーニングへのSECMの適用について述べる。最後に、微細加工技術を利用して作製した微生物や細胞アレイチップの検出ツールとして、高さ一定モードSECMを応用した例について我々の研究を中心に紹介したい。

2. ネガティブフィードバック(FB)モードSECM

SECMではマイクロ電極を3次的に駆動可能なXYZステージおよびピエゾ駆動のポジショナーに取り付けサンプルへと近接させる。電極をサンプル近傍で走査し電気化学反応を検出することにより、表面の凹凸情報や化学的および生物化学的な反応を画像化する。一般的に、溶液中に介在させた電気化学活性種の酸化還元電流は拡散支配的であるため、表面近傍で得られる電流は電極先端一表面間距離に依存する。FBモードの理論は、Markinらによって報告されている^{9),10)}。図1aに、電極一表面間距離に対する酸化還元電流応答を示す。電極が基板表面から離れておりバルク溶液中にある場合には、電気化学活性種の定常拡散層が電極先端から溶液層に半球状に形成され、 $i_{T,s}=4nFDCA$ で表される定常電流($i_{T,s}$)が観測される。ここで、 n は反応電子数、 F はファラデー定数、 D は電気化学活性種の拡散定数、 C は電気化学活性種のバルク濃度、 A は電極半径を表している。電極を絶縁性基板に近接させると、バルクから電極表面への電気化学活性種の輸送が絶縁性基板によって阻害され通常の半球状拡散層が形成できないため電流(i_T)は電極一基板表面間距離の減少とともに減少する。これがネガティブFB効果である。電極位置一電流曲線(図1a)を用いると電極の z 方向

位置情報を得ることができる。電極と表面の衝突は、電極および表面の双方にダメージを与える可能性が高いため、ネガティブFBモードを利用したz方向距離制御は有効である。また、電極を絶対的な高さを一定に保ちxy方向に走査すると基板の凹凸に応じて電極-基板間距離が変化するため、その際に生じる電流応答の変化から凹凸をイメージングできる。

ネガティブFBモードを用いると単一細胞の形状をイメージングできる^{11),12)}。平板基板上に培養された細胞の存在により、電極-細胞間の距離が変化するためFB効果により細胞形状を電流として捉えることが可能になる。しかし、溶液中に介在させるメディエータの選択に注意する必要がある。すなわち、メディエータは細胞膜を透過しないことが必要である¹³⁾。図2に、ネガティブFB効果を利用した単一細胞の形状イメージを示す。マイクロ電極で溶液中のメディエータ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$)を酸化すると、電極表面近傍に半球状の拡散層が形成される。この状態で電極を細胞表面に近接させると電流はバルク中と比較して減少する。この電流の減少は、メディエータの物質移動が、マイクロ電極と細胞膜の接近にともない空間的に抑制されるためである。しかし、電極が細胞から遠ざかると拡散妨害効果(ネガティブFB効果)が小さくなり電流応答が増加する。よって、細胞の形状イメージングにはメディエータの膜透過性が応答に大きく影響を与える。細胞膜透過性は、メディエータの親・疎水性、大きさおよび電荷に大きく依存する。一般的に、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ 、 $\text{Ru}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ のような金属錯体メディエータは、電荷を有し親水性が高いため細胞膜の透過性が低い。よって、これらのメディエータは、細胞の形状イメージを得るために適している。しかし、メディエータとして膜透過性の大きなキノン類を使用すると、ネガティブFB効果が小さく、細胞内で電子授受を行うため形状を得ることが困難である。さらに、形状イメージを得るためには、メディエータが細胞に毒性を示さないこと、メディエータの刺激により細胞活性が変化しないことが重要である。

神経細胞の機能を研究するためにモデルとしてよく使用されているPC12の形状がネガティブFBモードSECMを用

いてイメージングされている¹⁴⁾。膜透過性が小さく細胞毒性の低い $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ がPC12の形状イメージングに用いられている。PC12は、成長因子の存在下で細胞体から神経突起をのびることが知られている。この神経突起の構造は、光学顕微鏡で観察することが困難であるが、ネガティブFBモードSECMを用いて明確に可視化されている。局所領域における神経突起の高さの差をイメージとして捉えることが可能である。しかし、SECMイメージングでは、電極とサンプルの衝突を避けるために、イメージング領域のサンプルの中で最も高い位置のさらに数 μm 上方にマイクロ電極を設置しなければならない。PC12では、細胞体の上に電極を設置する必要がある。それゆえ、1フレームの中に神経突起を含む細胞全てをイメージングできない。ネガティブFB効果は、電極-サンプル間距離の増加にともない急激に減少する(図1)。よって、電極から10 μm 程度離れた細胞突起の形状を得ることは困難である。そこで、細胞の形状を詳細にイメージングするために電極-サンプル間距離を制御した距離一定モードSECMが開発されている^{15)~18)}。

図2 ネガティブFBモードSECMを用いた細胞形状のイメージング
(a) 形状イメージングの模式図。(b) x方向距離に対するフェロシアンイオンの酸化電流応答。

図1 マイクロ電極-基板間距離に対する電流応答。マイクロ電極を(a)絶縁性基板および(b)導電性基板に近接させた場合。
d; 電極-基板間距離, r; 電極半径, i; マイクロ電極で観測された電流, i_d ; バルク中で観測される酸化還元電流, Med; メディエータ

3. ポジティブフィードバック(FB)モード SECM

一方、マイクロ電極を金属平板のような導電性基板に近接させた場合、電流は電極—基板間距離の減少にともなって増加する(図1 b)。マイクロ電極において酸化反応により生成された電気化学活性種の酸化体は、拡散により導電性基板に到達し還元される。さらに、この再生された還元体はマイクロ電極に到達して再酸化されるレドックスサイクリングが進行するためマイクロ電極で得られる電流応答は増幅される。これが、ポジティブFB効果である。

FBモードを用いたイメージングの典型的な例は、固定化酵素の活性イメージングである。たとえば、固定化されたグルコースオキシダーゼ(GOx)の活性イメージングが行われている(図3)¹⁹⁾。走査するマイクロ電極で還元型メディエータ(Med_R)を酸化すると酸化体(Med_O)が生成する。拡散し固定化GOxに到達した Med_O はGOxの電子受容体として作用すると、グルコースが酸化される際にGOxから電子を受け取りもとの Med_R へと還元される。さらに、GOxで再生された Med_R はマイクロ電極へと拡散し再び酸化される。1分子のメディエータが電極—基板間を何度も往復するため、マイクロ電極での応答は増大する。これが、酵素反応を利用したポジティブFB効果である。マイクロ電極をxy方向に移動させ、酵素の固定されていない絶縁性基板に達すると、ネガティブFB効果によりバルクから電極表面へのメディエータの拡散が抑制されるため、検出される電流は減少する。両方の効果を有効に利用し電極を走査して電流を2次元マッピングすると基板表面で進行する酵素反応をSECMイメージとして得ることができる。この技術は、基板上にパターン化された酵素や酵素センサ表面の評価に極めて有効である。また、他の酵素のイメージングもこの手法を用いて行われている。中でも、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)酸化酵素であるジアフォラーゼの活性評価は実用的にきわめて重要である。300種類以上ものデヒドロゲナーゼが NAD^+ を電子受容体として作用するため、ジアフォラーゼとこれらの酵素と組み合わせることにより多種多様なセンサを構築することが可能になる²⁰⁾。

ポジティブFBモードSECMは、基板上に抗体を集積化した抗体アレイチップの検出に応用することができる^{21)~24)}。基板表面上に作製した抗体アレイに測定対象物質および酵素標識抗体を反応させる。捕捉された酵素量はサンプル溶液中に含まれていた測定対象物質の濃度に依存するため、抗体スポット上の酵素活性を調査することにより検出が可能となる。

図3 ポジティブFBモードSECMを用いた固定化グルコースオキシダーゼ活性のイメージング

標識酵素には、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ(HRP)、GOxなどがよく利用される。ポジティブFBモードSECMは、メディエータが電極—酵素間でサイクルする増幅系であるため、検出シグナルが大きく測定対象物質の高感度測定が可能になる。また、抗体アレイを用いることにより、複数種類の分子を同時に検出することができる。

4. ジェネレーション—コレクション(GC)モード SECM

表面から生成される化学物質をマイクロ電極で検出する方法は、GCモードSECMと呼ばれている。GCモードSECMは、細胞から放出される生物学的に重要な物質の調査に用いられ²⁵⁾、細胞の機能を利用したバイオチップの構築に応用されている。個々の細胞の機能や活性の評価から始まり、そのイメージングおよび外部刺激に対する応答について調査されており、細胞および微生物チップの評価系に組み込まれている。

単一植物細胞の光合成および呼吸による酸素の放出および吸収を定量的に評価し、電極を2次元に走査することにより光合成および呼吸活性のイメージングを行うことができる^{26)~28)}。暗所において植物細胞(ハネモのプロトプラスト)は 2.0×10^{-14} mol/sで呼吸により酸素を消費する。一方、光を照射すると細胞は光合成により酸素を放出する。酸素生成速度は光強度の増加にともなって増加し、15 kLx以上の光強度で酸素放出速度は 7.5×10^{-14} mol/sに到達し飽和した。単一細胞近傍の酸素濃度プロファイルを計測することにより、酸素の消費および生成速度を定量的に評価することが可能である。また、細胞近傍の酸素還元電流をマッピングすることにより単一細胞の呼吸および光合成活性をイメージングできる。図4に、単一植物細胞の呼吸および光合成活性のSECMイメージを示す。これらのイメージは同じ植物細胞を対象に暗所下および明所下において得ている。暗所下においては、細胞の近傍で酸素還元電流の小さいイメージが得られており、細胞が呼吸により酸素を吸収していることがわかる。一方、明所下では細胞近傍の酸素還元電流が大きく、光合成により酸素が生成されていることを示している。また、複数の植物細胞を同時にイメージングすることも可能である²⁹⁾。片方の細胞に光合成電子伝達鎖の阻害剤であり農薬の一種である3(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素(DCMU)をインジェクションすると、DCMUを注入した細胞の光合成活性が迅速に低減する結果を得た。よって、これは細胞を利用した薬物センサおよび薬剤スクリーニングに応用可能であることがわかる。酸素還元電流を指標とした単一がん細胞の呼吸活性評価およびシアン化物イオンの膜透過性の評価も行われている³⁰⁾。また、パターン配列された細胞の呼吸活性も評価されている。コンタクトプリンティングを用いて疎水性基板に細胞外マトリックスやフィブロネクチンのパターンを作製し、細胞を培養することにより細胞パターン培養が行われている³¹⁾。バンド状に配列されたHeLa細胞の活性は島状に配列された細胞の活性と比較して大きいことが示されている。バンド状に配列された細胞はある程度自由に広がって基板に接着しているが、小さな島状に配列された細

胞の形状は接着面積が不足しているため球状に制限されている。細胞の活性を利用したバイオアッセイシステムを構築するためには、細胞の形状の変化に起因する細胞活性の差は極めて重要であるため、SECM による細胞チップの活性評価が有効であることがわかった。

GC モード SECM を用いると細胞のレドックス活性をイメージングできる³²⁾。GC モード SECM では、溶液中に介在させた酸化型メディエータが細胞により還元され細胞外に放出される還元体を検出する。酸化型メディエータであるベンゾキノン(BQ)は、細胞膜を透過することができ、細胞内の光合成電子伝達鎖および呼吸鎖から2つの電子を受け取ってヒドロキノン(QH₂)へと還元される。図5は、単一細胞近傍におけるQH₂の酸化電流応答である。暗状態から植物細胞に光を照射すると、QH₂の酸化電流は急激に増加し一定に達する。また、暗状態に戻すと電流はもとのレベルに戻る。一方、BQの酸化電流は光照射により減少する。光照射下において、BQは細胞に取り込まれ、光合成電子伝達鎖から電子を受け取りQH₂へと還元され、生成したQH₂は

細胞外へと放出されることを示している。SECM を用いると単一細胞が放出、吸収する化学物質の経時変化をリアルタイムで計測することが可能になる。

近年、Markin らのグループは、GC モード SECM を用いた動物細胞やバクテリアのレドックス活性の評価を行っている。SECM を用いて細胞内で進行するメディエータの再生反応をマッピングしている。細胞外液に加えられたメナジオン、1,2-ナフトキノン、BQ、N,N,N',N'-テトラメチル-1,4-フェニレンジアミン(TMPD)のような疎水性のメディエータの細胞による再生輸送反応がSECM を用いて検出された。メディエータの反応速度定数や細胞膜透過係数のような細胞特性が、単一細胞にマイクロ電極を近接させることにより評価された。SECM を用いると正常細胞と腫瘍細胞でレドックス活性の差を検出することができるので、培養皿中の細胞の中から正常細胞と腫瘍細胞を区別することが可能である。よって、この手法は薬剤のスクリーニングやがん診断に有用である。

5. 微生物・細胞チップ

上述した SECM を用いる細胞機能および活性の評価手法をバイオアッセイの検出システムとして利用している。細胞の培養技術、微細加工によるチップの三次元加工技術および細胞の配列化技術の進展とともに、基板上に微生物や細胞を集積固定化したチップが開発されている。たとえば、微生物チップのグルコース検出のためにSECM が利用されている^{33),34)}。基板上的のマイクロ孔内にコラーゲンゲルに包埋した大腸菌をスポットし微生物チップを作製している。大腸菌の呼吸活性は、微生物から生成されるフェロシアンイオンをSECM で検出して評価している。溶液中に介在させたフェリシアンイオンは細胞膜を透過し、呼吸鎖から電子を受け取ってフェロシアンイオンに還元され細胞外へと放出され拡散する。固定化されている大腸菌から生成されるフェロシアンイオンの量は細胞の呼吸活性に依存する。溶液中にグルコースを添加すると、細胞の代謝活性が増加するため固定化大腸菌から生成されるフェロシアンイオンの量も増加する。よって、微生物チップはグルコースやアルコールなどの栄養

図5 単一細胞から放出されるヒドロキノンの酸化電流の経時変化

図4 GC モード SECM を用いた単一植物細胞の呼吸および光合成活性のイメージング

素を検出するためのセンサとして利用可能である。また、微生物チップを用いた SECM は、生体や環境への毒性物質の検出に用いることができる。SECM を用いるとマイクロ孔内に固定化された微生物の増殖挙動をモニタリングできるため、微生物の同定、薬剤スクリーニングおよび細胞工学に応用することが可能になる。近年では、微生物の遺伝子発現の検出にも微生物チップを用いた SECM を応用している³⁵⁾。

細胞をチップ上に集積した細胞チップを用いて制がん剤感受性評価を行っている³⁶⁾。ヒトがん細胞株をコラーゲンに包埋し、チップ上の微細貫通孔に固定する。コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分であり、現在使用されている制がん剤感受性試験においても細胞培養に利用されている。コラーゲン包埋培養による細胞の増殖速度は、通常のフラスコ内培養と比較して遅く *in vivo* に近い。よって、この培養方法は生体内における増殖挙動を比較的再現しておりアッセイに有利である。図 6 に、細胞チップおよびその SECM イメージを示す。細胞としてヒト赤白血球細胞株(K 562, 写真左)およびアドリマイシン耐性細胞株(K 562/ADM, 写真右)を固定化し、制がん剤としてアドリマイシンを作用させた際の細胞の呼吸活性を評価した。SECM イメージでは、細胞と一致した位置に 2 つの電流スポットが観測された。この電流の減少は、細胞の呼吸による酸素濃度の減少に起因する。 $1\mu\text{M}$ のアドリマイシンを細胞チップに投与し 3 日間培養後の SECM イメージでは、K 562/ADM の呼吸活性が K 562 と比較して高くなった。K 562 細胞はアドリマイシンにより増殖を阻害されるが、K 562/ADM 細胞は増殖することが示された。これは、複数の細胞種に対する薬剤感受性を同時に継続的に示している。

また、細胞チップにマイクロ流路を組み合わせることで、複数種類の薬剤の効果を同時に評価できる(図 7)^{37),38)}。たとえば、 4×5 の微細貫通孔アレイを有する基板に 4 本の

図 6 細胞チップおよびその SECM イメージ

(a) 微細貫通孔にコラーゲンゲル包埋法により集積化された細胞チップ。左：K 562 細胞，右：アドリマイシン耐性 K 562 細胞。(b) 細胞チップの呼吸活性に基づく SECM イメージ。(c) 1mM アドリマイシンを含む培地中で 3 日間培養後の SECM イメージ。

図 7 微細孔アレイとマイクロ流路を組み合わせた細胞アレイチップの作製と SECM を用いた複数種類の薬剤効果評価システム

(a) マイクロ流路を用いた細胞アレイチップの概念図。上：デバイスの断面図，左：流路の上面図，右：微細貫通孔アレイの写真。流路のサイズ： $700\text{mm}\times 10\text{mm}$ ，微細貫通孔；一辺 450mm 。(b) 細胞チップ上の呼吸活性に基づく SECM イメージ。

マイクロ流路を組み合わせている。微細貫通孔にはヒト乳がん由来細胞株(MCF-7)を固定化し、4本の流路に違う種類の制がん剤を投与する。そして、所定時間培養後に細胞の呼吸活性をSECMで計測する。貫通孔を用いているので、制がん剤投与に利用した流路を下側に配置すると、流路を構成するパーツを除去することなく1枚のチップを経時的にSECM計測できる。SECM計測の際には、電極をz方向に走査し細胞チップ近傍の酸素濃度プロファイルを測定する(図7b)。酸素濃度は細胞集積化微細孔からの距離の逆数に比例するため、その直線性から高精度に細胞活性を計測できる。3種類の制がん剤(cisplatin, 5-fluorouracil, paclitaxel)をそれぞれ流路に導入し、24時間薬剤接触培養を行った。1本の流路は制がん剤を含まない培地を導入しコントロールとして使用した。接触培養後、経時的に細胞の活性をSECM計測すると、paclitaxelが細胞活性を抑制しMCF-7に対して効果的に作用する制がん剤であることがわかった。他の一般的に用いられている細胞活性評価法を用いても薬剤効果に同様の傾向が観測されるため、細胞チップのSECM計測法が薬剤スクリーニングにおいて有効であることが示された。

6. おわりに

本解説では、SECMの測定モードにおける測定の特長について述べ、その測定技術を利用したバイオチップの評価システムへの応用へと展開した。ネガティブFBモードSECMでは、マイクロ電極と測定対象物質の空間的な接近によるメディエータの拡散阻害現象を利用した細胞の形状イメージングおよびメディエータの細胞膜透過性の評価が可能である。ポジティブFBモードSECMでは、固体基板上に固定化された酵素反応と電極反応間において進行するメディエータのレドックスサイクリングを用いた、酵素センサの評価や免疫測定への応用について述べた。さらに、GCモードSECMを用いると、単一細胞により放出または吸収される物質のリアルタイムモニタリングおよびイメージングが可能である。さらに、この検出方法は、微生物チップや細胞チップの評価法として応用可能であることを紹介した。SECMが細胞の活性評価法として極めて有効であることが示されており、今後、実用的な薬剤スクリーニングシステムの開発への展開が期待される。

現在、SECMは高感度、高分解能計測を行うために、本解説で紹介した高さ一定モードSECMから距離一定モードSECMへと開発が進んでいる。この手法を用いると、細胞-サンプル間距離を100nm以下に保持しサンプルの凹凸に沿って電極のz方向位置を制御できるため、サンプル形状と電気化学情報を同時に高感度に取得できる。また、光ファイバ電極を使用することにより、3系同時計測が可能な多機能型SECMの開発も進めている。このような、SECM装置の改良および多機能化の進展とともに、医療、環境分野における高性能センシングシステムとしての発展を期待している。

(2008-9-29 受理)

文 献

- 1) R. C. Engstrom, M. Weber, D. J. Wunder, R. Burgess and S. Winquist; *Anal. Chem.*, **58**, 844 (1986).
- 2) A. J. Bard, F.-R. F. Fan, J. Kwak and O. Lev; *Anal. Chem.*, **61**, 132 (1989).
- 3) R. C. Engstrom and C. M. Pharr; *Anal. Chem.*, **61**, 1099 A (1989).
- 4) G. Wittstock; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370**, 303 (2001).
- 5) G. Nagy L. Nagy; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 735 (2000).
- 6) M. V. Mirkin and B. R. Horrocks; *Anal. Chim. Acta*, **406**, 119 (2000).
- 7) B. Horrocks and G. Wittstock; *Scanning Electrochemical Microscopy*, p. 445 (Marcel Dekker, N. Y., 2001).
- 8) H. Shiku, H. Ohya and T. Matsue; *Bioelectrochemistry*, p. 257 (Wiley-VCH, 2002).
- 9) M. V. Mirkin; *Scanning Electrochemical Microscopy*, p. 145, (Marcel Dekker, Inc, 2001).
- 10) A. J. Bard, F.-R. F. Fan and M. V. Mirkin; *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 18, p. 243, (Marcel Dekker, Inc, 1994).
- 11) T. Yasukawa, T. Kaya and T. Matsue; *Electroanalysis*, **12**, 653 (2000).
- 12) T. Yasukawa, T. Kaya and T. Matsue; *Anal. Chem.*, **71**, 4637 (1999).
- 13) T. Yasukawa, I. Uchida and T. Matsue; *Biochim. Biophys. Acta*, **1369**, 152 (1998).
- 14) J. M. Liebetrau, H. M. Miller, J. E. Baur, S. A. Takacs, V. Anupunpisit, P. A. Garriss and D. O. Wipf; *Anal. Chem.*, **75**, 563 (2003).
- 15) D. Oyamatsu, Y. Hirano, N. Kanaya, Y. Mase, M. Nishizawa and T. Matsue; *Bioelectrochemistry*, **60**, 115 (2003).
- 16) H. Yamada, H. Fukumoto, T. Yokoyama and T. Koike; *Anal. Chem.*, **77**, 1785 (2005).
- 17) H. Yamada, M. Ogata and T. Koike; *Langmuir*, **22**, 7923 (2006).
- 18) A. Hengstenberg, A. Blochl, I. D. Dietzel and W. Schuhmann; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 905 (2001).
- 19) D. T. Pierce, P. R. Unwin and A. J. Bard; *Anal. Chem.*, **64**, 1795 (1992).
- 20) H. Shiku, T. Takeda, H. Yamada, T. Matsue and I. Uchida; *Anal. Chem.*, **67**, 312 (1995).
- 21) H. Shiku, T. Matsue and I. Uchida; *Anal. Chem.*, **68**, 1276 (1996).
- 22) H. Shiku, Y. Hara, T. Matsue, I. Uchida, T. Yamauchi; *J. Electroanal. Chem.*, **438**, 187 (1997).
- 23) S. Kasai, A. Yokota, H. Zhou, M. Nishizawa, K. Niwa, T. Onouchi and T. Matsue; *Anal. Chem.*, **72**, 5761 (2000).
- 24) T. Yasukawa, Y. Hirano, N. Motochi, H. Shiku and T. Matsue; *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 3099 (2007).
- 25) E. R. Travis R and M. Wightman; *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, **27**, 77 (1998).
- 26) T. Yasukawa, I. Uchida and T. Matsue; *Denki Kagaku*, **66**, 660 (1998).
- 27) T. Yasukawa, T. Kaya and T. Matsue; *Electroanalysis*, **12**, 653 (2000).
- 28) T. Yasukawa, T. Kaya and T. Matsue; *Anal. Chem.*, **71**, 4637 (1999).

- 29) T. Yasukawa, T. Kaya and T. Matsue ; *Chem. Lett.*, 975 (1999).
- 30) T. Yasukawa, Y. Kondo, I. Uchida and T. Matsue ; *Chem. Lett.*, 767 (1998).
- 31) M. Nishizawa, K. Takoh and T. Matsue ; *Langmuir*, 18, 3645 (2002).
- 32) T. Yasukawa, I. Uchida and T. Matsue ; *Biophys. J.*, 76, 1129 (1999).
- 33) T. Kaya, K. Nagamine, D. Oyamatsu, M. Nishizawa and T. Matsue ; *Electrochem.*, 71, 436 (2003).
- 34) T. Kaya, K. Nagamine, D. Oyamatsu, H. Shiku, M. Nishizawa and T. Matsue ; *Lab. Chip*, 3, 313 (2003).
- 35) K. Nagamine, S. Onodera, Y. Torisawa, T. Yasukawa, H. Shiku and T. Matsue ; *Anal. Chem.*, 77, 4278 (2005).
- 36) Y. Torisawa, T. Kaya, Y. Takii, D. Oyamatsu, M. Nishizawa and T. Matsue ; *Anal. Chem.*, 75, 2154 (2003).
- 37) Y. Torisawa, H. Shiku, S. Kasai, M. Nishizawa and T. Matsue ; *Int. J. Cancer*, 109, 302 (2004).
- 38) Y. Torisawa, H. Shiku, T. Yasukawa, M. Nishizawa and T. Matsue ; *Secs. Actuat. B*, 108, 654 (2005).
- ~~~~~