電気化学ナノテクノロジーのバイオ・医療分野への展開

逢坂哲彌^{***}, 笹野順司^{**}, 松永真理子^{**}, 飯田広範^{*}

^{*}早稲田大学 先進理工学部(〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1)

^{**}早稲田大学 生命医療工学研究所(〒162-0041 東京都新宿区早稲田鶴巻町 513)

Application of Electrochemical Nanotechnology to Bio and Medical Fields

Tetsuya OSAKA^{***}, Junji SASANO^{**}, Mariko MATSUNAGA^{**} and Hironori IIDA^{*}

^{*}Faculty of Science and Engineering, Waseda University (3-4-1, Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555)

^{**}Biomedical Engineering Institute, Waseda University (513, Waseda-tsurumaki-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-0041)

Keywords: Self-Assembling Monolayer, Chirality, Field Effect Transistor, Nanoparticle

1. はじめに

20 世紀には、鉄鋼産業、自動車産業、半導体産業が世界的な産業発展のドライブフォースとなってきた。ここで、21 世紀をむかえ、社会の成熟化にともなう次世代の産業の主流は何であるかを考えると、人として心身ともに健康を保ちながら生活を続けていけるための高齢化社会に対応した産業の創出が重要になっている。我々は、このような背景の下、我々が持つ電気化学および表面処理技術をこの分野に利用し役立てていくための試みを始めている。

そこで、酵素、免疫センサをはじめとするバイオセンシングシステムが医療、製薬などの分野において広く利用され、特に昨今のゲノム工学の発展にともなう、DNA マイクロアレイをはじめ、個々の生体分子の認識および生体反応に基づく分子レベルの反応解析などをもとにして、人それぞれに対応する高精度なバイオセンシングシステムが、高齢化社会の健康維持、あるいは病気を持ちながらも社会で活躍し続けるための道具として、その利用開発の要求が高まっている。今後の医療分野においてはとくにテーラーメイド医療の実現のために、このシステムではより簡便かつ高精度な検出が求められている。従来の DNA マイクロアレイなどのバイオチップにおいては蛍光検出を基本原理としており、レーザや複雑な光学系システムが必要となり、装置が大型化して高価となるという点が挙げられる。さらに、蛍光標識剤などを対象物質に付与する必要があるため、その分の手間とコストが必要とされる。そこで、我々は、半導体デバイス工業のプロセスを利用して、簡便性と高精度化の両方を満足させ、かつ、安価なセンサチップを作製することを目的に、特に電界効果トランジスタ (FET)^{1)~3)} を利用した応答センシング系の提案を行ってきている^{4)~6)}。その基本的な考え方として量産プロセスの利用ができないと半導体プロセス利用がむずかしいので、基本パターンを量産、それを加工していくつかの目的別に製品化、さらにはディスプレイに量産をこなすとい

うシステムを考えにいれ、開発研究を行っている。

本解説論文では、電気化学ナノテクノロジーを活用した表面処理技術の導入によるバイオ・医療分野への新たな応用展開の例として、上記有機単分子膜修飾 FET によるセンシングデバイスの研究に加えて、キラル認識界面の構築、および、磁気ナノ粒子の医療応用について概説する。

2. 有機単分子膜修飾 FET によるセンシングデバイスの作製

半導体デバイスはシリコン微細加工技術の発展により微細化・集積化が容易であり、デバイス制御システムも小型・簡便化することが可能であること。また、FET による測定ではゲート電極の表面電位変化を電気信号に直接変換が可能のため、ラベル剤などのメディエーターを必要としないといった特徴を有する。このような電気信号検出系をイオン・バイオセンサ応用に結びつけることは、小型・簡便なセンシングシステムの達成のみならず、半導体産業の付加価値向上にも繋がると期待される。

一方で、センサチップの小型化のためにはセンサデバイスのみならず、参照電極の縮小化も必要とされている。従来の参照電極はガラス電極ベースのものが主体であり、それがチップ自体の小型化の大きな障壁となっている。最近では Ag/AgCl 薄膜を用いたチップ型固体参照電極の作製も報告されているが、安定性の面で更なる改良が求められている。

我々は、電極部において自己組織化有機単分子膜を生体分子固定用のテンプレート表面として活用し、イオン・生体反応にともなう表面電位変化を電界効果トランジスタ (FET) で直接的に電気信号検出する新規センシングデバイスの構築を試みている。さらに、有機単分子膜の機能性の違いを利用した、FET ベースの固体参照電極の作製も行っている。

ここでは上述の有機単分子膜修飾 FET センサデバイス・参照デバイスの作製、およびそれを用いたイオン・バイオセンサ応用についてのこれまでの研究成果を概説する。

2. 1 有機単分子膜修飾 FET の作製^{4)~6)}

オンチップでのセンシングを可能とするためには、溶液耐性を有するセンサデバイスおよび参照デバイスを同一基板上に形成する必要がある。特に、有機単分子膜修飾 FET においてはゲート電極の認識能を仕様に応じて変化させることが要求される。たとえば、イオン・バイオセンシング用のデバイスにおいてはそれぞれイオン応答・生体分子固定のために、表面にアミノ基などのイオン性もしくは化学的に活性な官能基が存在することが望ましい。一方で、参照デバイスにおいてはイオン応答に対して不活性であり、かつ生体分子などの非特異的な吸着を抑制可能な表面が必要とされる。この場合、化学的に不活性なアルキル・フッ化アルキル分子などで表面が修飾されていることが相応であると考えられる(図 1)。このようなデバイス作製のために、溶液耐性を有する FET の作製、有機単分子膜の形成とパターンニングに関して検討した^{7)~9)}。

まず、デバイス構造として、有機単分子膜をゲート電極・保護層両面に形成させるために SiO₂ を材料として選定した(図 1)。ここで、ゲート表面部の SiO₂ は熱酸化法により高密度な薄膜形成が可能であるが、保護層部の SiO₂ は化学気相成長法(CVD)などによって形成されるため、低密度な酸化膜しか得られず、溶液の浸み込みによるドリフトなどの問題が懸念される。そこで、CVD-SiO₂ 膜の高密度化と細密パッキングされた有機単分子膜による表面保護により、デバ

表 1 熱酸化膜と CVD-SiO₂ 膜の特性

SiO ₂	Refractive index	Etching rate with
		1.0 wt.% HF (nm/min)
Thermally grown	1.462	6.0
CVD (as-deposited)	1.449	36.8
CVD (after 800°C annealing)	1.460	6.5

イスの溶液耐性の向上をめざした。表 1 に熱酸化、および CVD 法によって形成された SiO₂ 膜の密度の指標となる屈折率とフッ化水素酸に対するエッチング速度を示す。CVD-SiO₂ 膜は屈折率が小さく、またエッチング速度が速いことが確認され、膜密度が低いことが示唆された。膜密度向上のために成膜後にアニール処理を行ったところ、熱酸化膜に類する特性が得られた。以上より、CVD-SiO₂ 膜の特性向上のためには FET 作製において、高温処理に耐えるプロセス設計・材料選定が必要なることが明らかとなった。そこで、コンタクト・配線材料としてそれぞれ Ti₂Si, Pt を適用し、デバイス作製を行った。

修飾する有機単分子膜として、有機シラン化合物であるオクタデシルトリメトキシシラン(ODS)、ヘプタデカフルオロ-1,1,2,2,-テトラヒドロデシルトリメトキシシラン(FAS)、アミノプロピルトリエトキシシラン(APS)を用いた。疎水性分子である ODS, FAS の単分子膜形成に関しては気相化学形成法、アミノ基を有する APS の単分子膜形成については液相成膜法により行った。

有機単分子膜のパターンニングは紫外線(UV)露光とプラズマ除去を組み合わせた手法により行った。まず、基板全面に疎水性単分子膜(ODS, もしくは FAS)を形成し、UV レジスト塗布、パターンニングの後、パターン開口部にむき出しにした ODS, もしくは FAS を酸素プラズマにより除去し、SiO₂ を露出させた。最後に、パターン露出部に APS を形成させ、所望のデバイスを得た。

2. 2 オンチップ pH センサチップ^{4)~6)}

作製したデバイスの動作確認および安定性・溶液耐性について検討した。ゲート引出電極に Ag/AgCl ガラス電極を用いて、アミノ分子がゲート電極に修飾されたデバイスを pH 6.86 のリン酸緩衝液中で測定したところ、本デバイスは水溶液中において良好な I-V 特性を示し、また、その特性は溶液に 24 時間浸漬後もドリフトなどは確認されず一定の特性を保っていたことが確認された。さらに、単分子膜修飾前の強酸による洗浄や、測定後の再利用の際の酸素プラズマによる単分子膜の除去プロセスを繰り返しても同様の特性が得られた。したがって、本デバイスは十分な溶液耐性を有し、かつ安定性も優れていることが示された。

本デバイスをイオンセンサとしての応用を図るべく、pH 応答特性の評価を行った。その結果、図 2 に示すようにアミノ基末端を有する分子(APS)修飾表面は良好な pH 応答性(59 mV/pH)を示し、メチル(ODS), もしくはフッ化メチル基末端を有する分子(FAS)修飾表面は溶液中の pH の違いに依存せず、一定の表面電位を示すことが見出された。この結果は、デバイスのゲート電極に修飾する分子種の選定に

図 1 センサチップの構造

よって特性の制御が可能であることを示しており、APS 修飾デバイスは「イオン感性 FET」として、ODS、もしくは FAS 修飾デバイスは、イオン種に対して応答を示さない「参照用 FET」として利用できることが示唆された。このような両デバイスの同一基板上での形成によって、微小な参照電極一体型のオンチップ pH センサの開発が期待できる。

2. 3 バイオセンサ応用⁶⁾

2. 3. 1 尿素センサ

有機単分子膜修飾 FET を用いたバイオセンシングの一例として、尿素センサへの応用を試みた。ここで用いた検出原理は、FET のゲート電極上に固定化されたウレアーゼの作用による尿素的加水分解反応にともなう pH 変化を FET で測定することで、間接的に尿素的検出を行う手法である。この原理を利用すれば、pH 変化をともなう他のさまざまな酵素反応へも同様に適用可能である^{10)~15)}。ここでは酵素による加水分解反応を利用した尿素センシングの例を示す。FET ゲート電極上に修飾されたアミノ基末端単分子膜上に、架橋剤であるグルタルアルデヒドを介して酵素ウレアーゼを固定した。結果として、図 3 に示すように、溶液中の尿素濃度の増大により、ゲート電圧が正方向(アルカリ方向)にシフトすることが確認された。この電圧シフト量を尿素濃度に対してプロットしたところ、 10^{-9} – 10^{-6} M の範囲で直線的な変化を示した。したがって、ナノモル濃度レベルの微量な尿素量も検出可能であることが示された。これは通常の尿素センサの感度よりも 2-3 桁優れており、酵素センサにおいても

FET の利用は有効であることが示された。なお、本測定においては酵素固定化量を少なくしたため、 10^{-6} M 以上の濃度では加水分解反応律速で電圧飽和しているが、固定化する酵素量の調整により様々な濃度範囲での検出が可能になるものと考えられる。すでに、我々は pH 応答をともなう酸素反応として、このウレアーゼだけでなくアセチルコリンなどの応答の可能性を報告¹⁵⁾しているの、この分野への拡がり

図 2 有機単分子膜修飾 FET の光学顕微鏡像および pH 応答特性

図 3 酵素固定化 FET による尿素濃度測定

図 4 プローブ DNA とターゲット DNA のハイブリダイゼーション反応に基づく検出の概念図

が期待できる。

2. 3. 2 DNA センサ

FET センサの更なる応用として、一塩基多型解析用の DNA センサシステムの構築を試みた。DNA センシングにおいては蛍光検出が主流であるが、FET を用いたオンチップ型のシステムが構築可能ならば、より簡便なツールとなり得る。とくに、現在はゲノム解析よりも医療診断に用いられるケースが多いため、小型なシステムの構築によりテーラーメイド医療の飛躍的な進歩が見込まれる。DNA センサシステムの概略図を図 4 に示す。基板表面上に固定化されているプローブ DNA と溶液中のターゲット DNA とのハイブリダイゼーションに基づく二本鎖 DNA の検出を基本原理としている。DNA は負電荷を有することからハイブリダイゼーション反応によって、表面電位がより負にシフトすることが知られており、この表面電位変化を電気信号変換して検出がなされる。我々は 20 塩基対(プローブ: 3'-NH₂-ACGAACATAGCCCCGCCTTAC-5')からなる混合塩基 DNA を用いたハイブリダイゼーション反応の検出を行った。最近の結果として、完全相補なターゲット-DNA をハイブリダイゼーションさせることで、ゲート電圧シフト($\Delta V_g = 53$ mV)が観測された。一方で、非相補的な DNA との反応において V_g シフトは認められなかった。以上より、本デバイスはハイブリダイゼーション反応において選択的な応用検出が可能であることが示された。さらに、ミスマッチを含むターゲット DNA を用いて検討を行ったところ、一塩基ミスマッチを含む DNA と完全相補的な DNA との間でシフト量の有意な差(約 30 mV)が確認された(図 5)。以上より、本デバイスは一塩基ミスマッチの検出において高い可能性を秘めており、簡便かつ高精度な DNA 診断への応用に繋がるものと考えられる。

3. キラルセンサ

我々は、新しいセンシングシステム開拓にむけて、有機自己組織化単分子膜による表面処理(修飾)を用いたキラルセンサ構築に関する研究を進めている。分子の右と左といわれる鏡像異性体を識別する場と信号変換素子とで構成される「キラルセンサ」は生理活性(薬理活性・環境適応性・味・匂い)

Probe: 3'-NH₂-ACGAACATAGCCCCGCCTTAC-5'

Target 1: 5'-TGCTGTTATCGGGCGGAATG-3'	Complementary
Target 2: 5'-TGCTGTTATCGTGC GGAATG-3'	1 base mismatch
Target 3: 5'-TGCTGATATCGTGC GGAATG-3'	3 base mismatch
Target 4: 5'-AGCTGATATCGTGC GGAATG-3'	5 base mismatch

図5 ハイブリダイゼーション反応に基づくミスマッチ検出

の異なる鏡像体を対象とすることにより、人工五感センサや有害物質検出などに応用できるデバイスとして 1990 年代より取り上げられてきている^{16)~19)}。また、小型化・集積化を実現すれば、生体内や類似環境での検出も可能となり、生体内で発生する鏡像体と病気との関連性を評価する研究ツールや病気の早期診断用在宅医療デバイスなどの高齢化社会に適した展開も期待できる。しかしながら、構造が鏡像であるだけの差(鏡像異性体)を識別・検出するキラルセンサの開発は難易度が高く、実用化には至っていない。今後は、医療への応用に向けて性能および信頼性の向上が求められるものと考えている。

前章において、単分子膜を信号変換素子用 FET の構築に应用する例を述べたが、機能性分子、とりわけ規則構造をとりうる単分子膜による表面修飾は、固体表面への高機能の導入に有用な手法として分子認識センサの認識界面構築においても広く検討されている^{20)~22)}。我々は固体表面へのキラル認識能付与に単分子膜を効果的に利用することによって、キラル選択性の高い界面現象を見出すことに成功したので、これらの成果をここで概説する。

3. 1 二次元不斉配列単分子膜におけるキラル識別現象

金(111)単結晶面上に二次元不斉配列単分子膜を形成する 1,1'-ビナフタレン-2,2'-ジチオール(BNSH)に注目した。まず、金-チオール系単分子膜の土台となる、より簡素化した表面として、平滑な金(111)表面を真空蒸着法により蒸着速度や蒸着温度の制御により得ている²³⁾。このような表面に形成された単分子膜内では BNSH 3 分子がスクリュウ状超分子構造を形成していることが確認されているが²⁴⁾、この二次元不斉配列 BNSH 単分子膜のキラル識別場としての評価を単分子膜上へのキラルな対象分子の吸着挙動を水晶振動子マイクロバランス法により追跡したところ、フェニルアラニン²⁵⁾ およびサリドマイド²⁶⁾、いずれの吸着もキラル選択的に起こることが確認できた。たとえば、R 体のサリドマイド添加では(R)-BNSH 膜でのみ、S 体のサリドマイド添加では(S)-BNSH 膜でのみ質量増加が観測でき、質量増加から換算される分子数は、いずれの場合も、単分子膜を形成する BNSH 分子数のおよそ 3 分の 1 に相当している。このことは、超分子構造を有する単分子膜がこのようなキラル識別に有効であることを示している。

3. 2 アミノ酸修飾表面におけるキラル識別現象

酵素や抗原抗体などのタンパク質は生体内において高い基質特異性を有し、キラル識別能を有するものも知られている¹⁹⁾。我々は、複雑な構造を有するタンパク質の代わりにタンパク質を構成するアミノ酸に着目し、アミノ酸の薄膜上におけるキラル識別現象に関して以下のような成果を得ている。

3. 2. 1 ロイシン固定 SAM 上におけるロイシンの結晶成長

光学活性アミノ酸であるロイシンの一方の鏡像体をアミド結合により固定した 11-メルカプトウンデカン酸(MUA)単分子膜において、固定されたロイシンと同じ鏡像体の結晶成長が優先的に起こりうること²⁷⁾に着目し、単分子膜修飾表面上での結晶相形成を実際に確認した²⁸⁾。ロイシン固定 MUA 単分子膜修飾表面を用いた検討においては、D 体固定

膜はD体溶液中、L体固定膜はL体溶液中に浸漬させた場合にのみ、キラル結晶に帰属されるX回折ピークが観測され、キラル選択的な結晶相形成が確認された。また、水晶振動子マイクロバランス法により追跡した結晶化の初期過程においてもキラル選択性の発現が認められた²³⁾。なお、形成される結晶相の結晶性および原子間力顕微鏡により観測した結晶析出形状は、その初期過程とともに基板の表面形状に大きく影響されること、および表面ラフネスが異なっているにもかかわらずキラル選択性が認められうることも確認されている²⁹⁾。

3. 2. 2 システイン系単分子膜修飾金電極におけるキラル分子の酸化還元挙動

電気化学反応が反応分子の電極界面での物理化学的状态に敏感に反映することに着目し、対象分子に電気化学活性なキラル分子を選択し、アミノ酸修飾電極とのキラル選択的な相互作用をキラル分子の電気化学反応から検出した。酸化還元反応にともなう電流が電気化学活性種と電極との距離の増加により指数関数的に減少することから、感度を損失しないため識別場には鎖長の短いアミノ酸に着目し、金電極上に直接固定化できるものとしてチオール基を有するシステインまたはホモシステインの単分子膜を選択した。その結果、電気化学活性なカテコール部位を有する、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(ドーパ, DOPA)³⁰⁾、およびカテキン類³¹⁾に対して、酸化還元ピーク位置や形状にキラル特異性が明瞭に観測できる条件を見出した^{32),33)}。たとえばL体のホモシステインで修飾した金電極をドーパの一方の鏡像体が含まれる溶液に浸漬した場合、D体のドーパ溶液中で観測される酸化ピークがL体溶液中よりも顕著であるといった、鏡像体間における明確な差を見出した。単分子膜による電極被覆率、溶液中の対象分子の濃度、または溶液のpHを変えて行った実験により、(1)修飾分子が対象分子と相互作用できる空間が存在しうる表面分子数(1.8×10^{18} 分子 cm^{-2})³²⁾、および(2)配向性の高い安定なSAMが形成されるpH(酸性領域)³³⁾が上述に示した現象におけるキラル識別に有効であることが示された。この際のL-ホモシステイン単分子膜の走査型トンネル顕微鏡像、予想される単分子膜の構造、およびキラル識別の結果を図6に示している。

3. 2. 3 ホモシステイン単分子膜修飾金電極上における錯体形成反応とその電気化学的検出

対象分子の拡張を期待して、対象分子と錯体形成反応を通じて相互作用をする銅(II)の電気化学反応を用いた電気化学不活性な分子の電気化学的キラル検出を考案し、一級アミンを有するD体アミノ酸の中性条件におけるキラル検出に成功した³⁴⁾。金属錯体は配位子によって異なる構造および安定性を有するが、この安定性の差によって起こるキラル配位子交換反応(キラル選択的に進行する金属イオンの配位圏内におけるリガンドの交換反応)は鏡像体の分離において広く利用されている現象である。特にアミノ酸はキラル固定相として上述の鏡像体分離に多く用いられている³⁵⁾。そこで、錯体形成反応の場として、アミノ酸の自己組織化単分子膜(3.2.2で用いたホモシステイン単分子膜)に着目すると同時に、キラル選択的な錯体形成を行う銅(II)の熱力学的・速度論的安定性に着目し、銅(II)の電気化学反応による検出をサイク

リックボルタンメトリーによって試みた。その結果、銅のアンダーポテンシャル析出(通常の銅析出電位より貴電位側で進行する一層以下の析出反応)にともなう還元ピーク電流がD体のアミノ酸を含む溶液中において顕著に観測されたのに対し、L体のアミノ酸溶液でほとんど観測されなかった。D体アミノ酸溶液で観測された銅のアンダーポテンシャル析出にともなう還元ピーク電流値は、アミノ酸が存在しない場合に比べても大きいことから、L-ホモシステインとともに銅(II)錯体を形成しているD体のアミノ酸が還元電流値の増大に寄与しているものと考察し、詳細な検討を進めている。図7aはL-ホモシステイン修飾金電極をドーパが含まれる中性の溶液に浸漬した際に得られた結果で、0.15 V (vs. Ag/AgCl (飽和KCl))において観測される還元電流値をドーパの鏡像体と比較したものである。ドーパキノ(ドーパの酸化体)そのものに由来する還元電流(左図)に比べ、銅(II)添加後に観測される還元電流(右図)では鏡像体間での差

図6 (a)キラル特異性が観測されたpH 0.6硫酸溶液中でのL-ホモシステイン(Hcy)SAMのSTM像。(b)STM像から予想されるL-Hcy SAMの構造、(c)キラル識別の結果を示す模式図

が顕著であった。この結果は、図 7 b に示すようなメカニズムでの考察が可能である。以上のように、銅錯体からの銅のアンダーポテンシャル析出を利用することでキラル選択性の向上が認められ、このことは、より高感度な系としての可能性において興味深い。

4. 磁気ナノ粒子の化学合成とバイオ・医療応用

近年、磁気ナノ粒子のバイオ・医療応用に関する研究が盛んに行われている^{8),36)~39)}。たとえば、磁気ナノ粒子と比較してサイズが同程度もしくは小さい DNA やタンパク質、細胞などの生体関連物質の検出など、バイオへの応用が盛んに研究されている⁴⁰⁾。また、マグネタイト(Fe_3O_4)やマグヘマイト($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)などの酸化鉄ナノ粒子は人体に対して無害であることが報告されており、磁気引力を利用した薬物伝達システム(DDS)のためのキャリア⁴¹⁾や、交流磁界に対する発熱を利用した温熱療法⁴²⁾、さらには核磁気共鳴における緩和時間が短縮されることを利用した磁気共鳴画像(MRI)の造影剤⁴³⁾としての利用など、医療への応用も広く研究されている。

磁気ナノ粒子をバイオや医療へ応用するためには、磁気特性に大きな影響を及ぼす粒径の制御はもとより、溶媒への分散性や基板への吸着性、そして生体親和性の制御が重要な課題となる。そのため、合成中または合成後におけるナノ粒子の溶媒分散性や生体親和性の向上を目的とした表面改質も極めて重要なプロセスである。また、ナノ粒子の粒径やそのば

らつきの度合いは合成段階で制御されることが多く、磁気ナノ粒子のバイオ応用のためには、材料設計を意識した粒子合成が求められる。

ここでは、バイオ・医療応用のための酸化鉄ナノ粒子の化学合成とその医療用材料としての応用について述べる。粒径および表面状態の制御を可能とする酸化鉄ナノ粒子材料の化学的合成法の確立をめざし、ナノ粒子の液相合成に取り組み、溶媒への分散性や生体物質との親和性の向上を目的とした表面改質を行い、最終的に医療用材料としての応用を試みた。

4. 1 磁気微粒子の化学合成⁴⁴⁾

酸化鉄ナノ粒子に求められる磁気特性はその用途に大きく依存する。MRI の造影剤として用いるためには粒径が数ナノメートルに制御された超常磁性を示すものが用いられる一方で、DDS のキャリアとしては大きな磁化を示す粒径数十ナノメートルのものが適している。ここでは、さまざまな医療応用を想定した比較的広い範囲の粒径制御を可能とする酸化鉄ナノ粒子の合成法を提案する。

二価と三価の鉄イオンを用いた加水分解反応において、図 8 に示すように、二価の金属イオンの添加量の割合が粒径に大きく影響することを見出し、全鉄イオン濃度に対する二価の鉄イオン濃度比の調整によって、約 10 nm から 40 nm の間での Fe_3O_4 ナノ粒子の粒径制御を可能とした。ここで、粒径の変化にともなって磁気特性にも変化が見られ、特に超常磁性とフェリ磁性の転移を示す臨界粒径が 15 nm 付近に観測されたことから、種々の粒径や磁気特性を有した酸化鉄ナノ粒子の簡便な作製手法の確立に成功している。これにより簡便な手法によりさまざまな用途のための医療材料としての適用が可能な酸化鉄ナノ粒子の合成が可能となった。

4. 2 磁気微粒子の表面改質⁴⁵⁾

生体物質に関連した諸反応は水溶媒中で取り扱われるため、磁気ナノ粒子の水への分散性制御が重要な課題となる。そこで、実際の医療応用のために水溶媒中での使用を想定し、酸化鉄ナノ粒子の水系溶媒中における分散性を評価した。また、分散性および生体適合性の向上を目的としたアミノプロピルシリル(APS)基やリン脂質膜による表面修飾にも取り組んだ。

酸化鉄ナノ粒子のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)への分散性を動的光散乱法により評価される溶媒中での平均粒径によって議論した。合成直後の未修飾の Fe_3O_4 ナノ粒子は粒径約 $1\mu\text{m}$ の凝集体として PBS 中に存在していることが示唆された。これは、合成された粒子の表面エネルギーが大きいためだと考えられる。APS 基およびリン脂質二重膜により表面修飾を試みたところ、平均粒径の減少が認められ、PBS への分散性の向上が示唆された。特に、リン脂質膜による表面修飾によって、酸化鉄ナノ粒子の溶媒への分散性が改善されるとともに、生体適合性の向上も期待され、4.3 で述べる酸化鉄ナノ粒子の医療用材料としての応用を図る際に有用な結果を得た。

4. 3 磁気微粒子の免疫細胞療法への応用⁴⁵⁾

酸化鉄ナノ粒子の医療用材料としての応用へと展開するため、新規磁気誘導型の免疫細胞療法のための磁性ナノ粒子内包免疫細胞の合成に取り組んだ。酸化鉄ナノ粒子を含んだ培

図 7 (a) (左) L-ホモシステイン(Hcy)修飾 Au 電極における Dopaquinone(DOPA の酸化体)の還元電流値と(右)Cu(II)添加後における DOPA/dopaquinone 溶液における同電極で観測される電流値。走査速度 50 mV/s.(Ag/AgCl(飽和 KCl))。 (b) Hcy SAM 修飾 Au 電極上で形成される錯体からの Cu アンダーポテンシャル析出(Cu UPD)の模式図。

図8 二価の金属イオンの比率を制御して合成した Fe_3O_4 ナノ粒子の TEM 像と粒径分布

地中でリンパ球細胞を培養したところ、リンパ球細胞が食作用効果によって粒径約 $1\mu\text{m}$ 程度の凝集塊として酸化鉄ナノ粒子を取り込む様子が確認された。また、溶媒中での凝集度合いが小さい酸化鉄ナノ粒子の方がリンパ球細胞中へ取り込まれ易いという結果が得られ、溶媒分散性がリンパ球細胞への取り込み効率に大きく影響することを見出し、酸化鉄ナノ粒子内包リンパ球細胞を用いた新規磁気誘導型の免疫細胞療法の確立にあたって有用な知見を得ている。

5. おわりに

我々が推し進めている電気化学ナノテクノロジーを活用した新しい試みとして、バイオ・医療分野への新たな応用展開の例を紹介しているが、ここでは、特に固体・電解質界面での原子・分子レベルの制御により、新たな反応場設計ができることを強調したい。有機単分子膜修飾と FET センサ界面の組み合わせ、さらにはキラル認識界面の構築および磁気ナノ粒子の設計から新たな医療分野への応用が開けると確信している。また、これらの技術は今後バイオ・医療応用において、さまざまな応用展開が検討されるものと考えられる。このような界面設計は表面処理分野の発展に向けた一つの新しい試みとなるが、さらに学際的研究を相乗的に発展させていくことで、今後の本分野の発展を期待したい。

(2008-4-3 受理)

文 献

- 1) P. Bergveld ; *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-19**, 342 (1972).
- 2) T. Matsuo and M. Esashi ; *Sens. Actuators*, **1**, 77 (1981).
- 3) T. Matsuo and K. D. Wise ; *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-21**, 485 (1974).
- 4) D. Niwa, Y. Yamada, T. Homma and T. Osaka ; *J. Phys. Chem. B*, **108**, 3240 (2004).
- 5) D. Niwa, T. Homma and T. Osaka ; *Jpn. J. Appl. Phys.*, **43**, L 105 (2004).
- 6) D. Niwa, K. Omichi, N. Motohashi, T. Homma and T. Osaka ; *Sens. Actuators B*, **108**, 721 (2006).
- 7) D. Niwa, K. Omichi, N. Motohashi, T. Homma and T. Osaka ; *Chem. Lett.*, **33**, 176 (2004).
- 8) T. Osaka, T. Matsunaga, T. Nakanishi, A. Arakaki, D. Niwa and H. Iida ; *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 593 (2006).
- 9) A. Arakaki, S. Hideshima, T. Nakagawa, D. Niwa, T. Tanaka, T. Matsunaga and T. Osaka ; *Biotechnol. Bioeng.*, **88**, 543 (2004).
- 10) S. Komaba, M. Seyama, T. Momma and T. Osaka ; *Electrochim. Acta*, **42**, 383 (1997).
- 11) S. Komaba, M. Seyama, K. Tanabe and T. Osaka ; *Denki Kagaku*, **64**, 1228 (1996).
- 12) T. Osaka, S. Komaba, M. Seyama and K. Tanabe ; *Sens. Actuators B*, **35**, 463 (1996).
- 13) T. Osaka, S. Komaba and A. Amano ; *J. Electrochem. Soc.*, **145**, 406 (1998).
- 14) T. Osaka, S. Komaba, A. Amano, Y. Fujino and H. Mori ; *Sens. Actuators B*, **65**, 58 (2000).
- 15) T. Kuwahara, N. Yamakawa, T. Monma and T. Osaka ; *Electrochemistry*, **69**, 598 (2001).
- 16) T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake and S. Shinkai ; *Nature*, **374**, 345 (1995).
- 17) Y. Kubo, S. Maeda, S. Tokita and M. Kubo ; *Nature*, **382**, 522 (1996).
- 18) K. Bodenhofer, A. Hierlemann, J. Seemann, G. Gauglitz, B. Koppenhoefer and W. Gopel ; *Nature*, **387**, 577 (1997).
- 19) O. Hofstetter, H. Hofstetter, M. Wilchek, V. Schurig and B. S. Green ; *Nature Biotechnology*, **17**, 371 (1999).
- 20) T. Wink, S. J. vanZuilen, A. Bult and W. P. vanBennekom ; *Analyst*, **122**, R 43 (1997).
- 21) S. Flink, F. van Veggel and D. N. Reinhoudt ; *Adv. Mater.*,

- 12, 1315 (2000).
- 22) J. J. Gooding, F. Mearns, W. R. Yang and J. Q. Liu ; *Electroanalysis*, **15**, 81 (2003).
- 23) T. Osaka, M. Matsunaga, T. Nakanishi, T. Asahi and N. Banno ; *Chem. Lett.*, **35**, 438 (2006).
- 24) B. Ohtani ; A. Shintani, K. Uosaki ; *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6515 (1999).
- 25) T. Nakanishi, N. Yamakawa, T. Asahi, T. Osaka, B. Ohtani and K. Uosaki ; *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 740 (2002).
- 26) T. Nakanishi, N. Yamakawa, T. Asahi, N. Shibata, B. Ohtani and T. Osaka ; *Chirality*, **16**, S 36 (2004).
- 27) H. Eun and Y. Umezawa ; *Anal. Chim. Acta*, **413**, 223 (2000).
- 28) N. Banno, T. Nakanishi, M. Matsunaga, T. Asahi and T. Osaka ; *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 428 (2004).
- 29) T. Nakanishi, N. Banno, M. Matsunaga, T. Asahi and T. Osaka ; *Colloids Surf. A*, **284**, 270 (2006).
- 30) T. Nakanishi, M. Matsunaga, M. Nagasaka, T. Asahi and T. Osaka ; *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (41), 13322 (2006).
- 31) T. Nakanishi, M. Matsunaga, M. Nagasaka, T. Ueno and T. Osaka ; *Electrochim. Acta*, **53**, in press (2008).
- 32) M. Matsunaga, T. Nakanishi, T. Asahi and T. Osaka ; *Chirality*, **19**, 295 (2007).
- 33) M. Matsunaga, M. Nagasaka, T. Nakanishi, T. Sawaguchi and T. Osaka ; *Electroanalysis*, **20**, 955 (2008).
- 34) M. Matsunaga, T. Nakanishi, T. Asahi and T. Osaka ; *Electrochem. Commun.*, **9**, 725 (2007).
- 35) V. A. Davankov ; *Journal of Chromatography A*, **1000**, 891 (2003).
- 36) R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger and C. A. Mirkin ; *Science*, **277**, 1078 (1997).
- 37) Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones and J. Dobson ; *J. Phys. D : Appl. Phys.*, **36**, R 167 (2003).
- 38) M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos ; *Science*, **281**, 2013 (1998).
- 39) W. C. W. Chan and S. Nie ; *Science*, **281**, 2016 (1998).
- 40) Y. Zhang and F. Wang ; *Top. Appl. Phys.*, **109**, 353 (2007).
- 41) T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann and B. von Rechenberg ; *J. Magn. Magn. Mater.*, **293**, 483 (2005).
- 42) A. Ito, M. Shinkai, H. Honda and T. Kabayashi ; *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 1 (2005).
- 43) D. Portet, B. Denizot, E. Rump, J. J. Lejeune and P. Jallet ; *J. Colloid Interface Sci.*, **238**, 37 (2001).
- 44) H. Iida, K. Takayanagi, T. Nakanishi and T. Osaka ; *J. Colloid Interface Sci.*, **314**, 274 (2007).
- 45) H. Iida, T. Nakanishi and T. Osaka ; *Electrochim. Acta*, **51**, 855 (2005).
- 46) H. Iida, K. Takayanagi, T. Nakanishi, A. Kume, K. Muramatsu, Y. Kiyohara, Y. Akiyama and T. Osaka ; *Biotechnol. Bioeng.*, in press.