

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23760745

研究課題名(和文)3次元培養組織評価に向けた電気化学チップデバイスの開発

研究課題名(英文)Electrochemical device for evaluation of three-dimensional tissue organs

研究代表者

伊野 浩介 (Ino, Kosuke)

東北大学・環境科学研究科・助教

研究者番号：00509739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞解析に向けた新規電気化学チップデバイスを開発した。このデバイスには、新規電気化学分析システムが組み込まれており、小さなチップデバイス内に多数の電気化学センサを組み込むことに成功した。また、3次元培養した細胞を評価するために、微小ウェルを組み込んだデバイスを開発した。くし型電極や、リング電極、リングディスク電極など、様々な形状のセンサを検討し、それぞれの特徴に合わせた計測法を提案した。この開発したデバイスを用いて、細胞が持つ酵素活性や分泌タンパク質の計測に成功した。本研究で開発したシステム・デバイスは3次元細胞組織評価だけでなく、様々なバイオアッセイへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel electrochemical system and device for cell analysis. The system is based on redox cycling, which is used for signal amplification and addressable detection. By using the electrochemical system, many electrochemical sensors were successfully incorporated into a small chip device. Microwells were also placed onto each sensor for trapping cells. We developed several kinds of devices containing interdigitated array electrodes, ring-ring electrodes, ring-disk electrodes, and applied the devices for bioassays. By using the devices, cell activity and enzyme activity were successfully evaluated, indicating that the system and device are useful for cell analysis.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオセンサー 電気化学分析 バイオMEMS 微小電極アレイ 細胞解析 マイクロ・ナノシステム

1. 研究開始当初の背景

現在、培養細胞を用いた移植医療が発展している。培養細胞はフラスコなどで増えるため、ドナー不足の移植医療において有用な細胞供給源になりえる。このような目的のためには、細胞の活性や機能をハイスループットに評価する必要がある。また、生体様組織である3次元培養した細胞を評価する手法も求められている。

ハイスループットに細胞を評価・分別できる手法としてフローサイトメトリーが挙げられる。フローサイトメトリーはハイスループットな手法であるが、培養しながらの細胞アッセイや、細胞塊のアッセイには不向きである。そこで、このようなアッセイに向けた新しい手法が求められている。

これまでに我々は、複数の電極を配置したデバイスを作製し、培養とアッセイを同時に行うことが可能な電気化学的手法を提案している。このような電気化学チップデバイスは、光学的手法にはない優れた特徴を有している。一方で、多数の電極を配置した場合は電極の面積が膨大になるという致命的な問題点を抱えていた。

このような問題点を解決するために、我々は新しい原理による電気化学測定システムの開発を行っている(後述)。本研究では、この多点電気化学計測システム・デバイスを用いた3次元組織評価法の開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では、多数の3次元組織を一括に評価が可能な電気化学チップデバイスの開発を目指した。その際、実用的な使用を考え、小型のチップデバイスをデザインした。また、微細ウェルを組み込んだ電気化学チップデバイスを開発し、新規3次元組織評価法として提案を行った。

3. 研究の方法

これまでに我々が開発してきたシステムを示す(図1)。

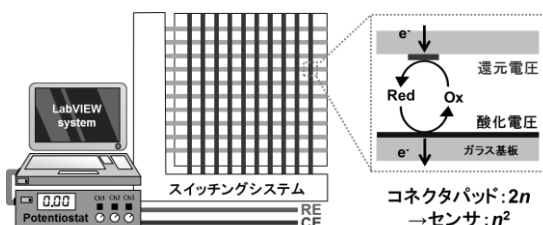


図1 多点電気化学チップデバイスの概要。縦電極と横電極が立体的に交差しており、マルチプレクサを通してPC、ポテンショントラックと繋がっている。目的の格子点のみに、レドックスサイクルを誘導できる。

このシステムでは、縦電極と横電極が3次元的に交差したデバイスを用いており、目的の格子点のみにレドックスサイクル(酸化、還元を繰り返す反応)を誘導することができる。

このレドックスサイクルの信号を読み取ることで、各格子点を独立した電気化学センサとして用いることができる。したがって、 $2n$ 本のコネクタパッドで、 n^2 個の電気化学センサを搭載できる。したがって、単純に電極を配置させたデバイスよりも飛躍的に多数の電気化学測定点をデバイスに組み込む事ができる。

本研究で開発を目指したデバイスのイメージを図2に示す。

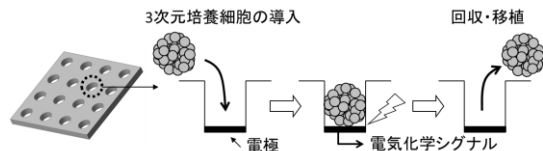


図2 開発を目指したデバイスのイメージ図。

電気化学チップデバイスのデザインと作製を行った。まず始めにくし型の電極をセンサ部分に配置したチップデバイスを作製した。作製方法を図3に示す。作製後、3次元培養した胚性幹細胞が持つアルカリホスファターゼ(ALP)活性を評価した。胚性幹細胞のALP活性は、分化の指標として用いられている。

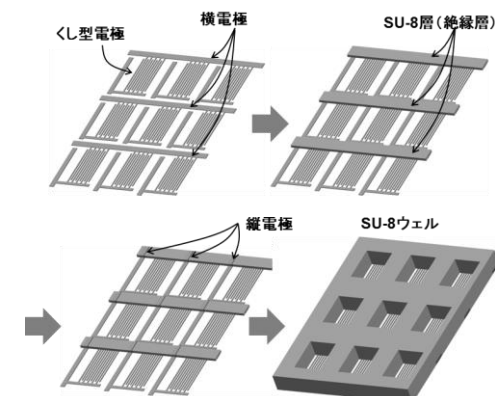
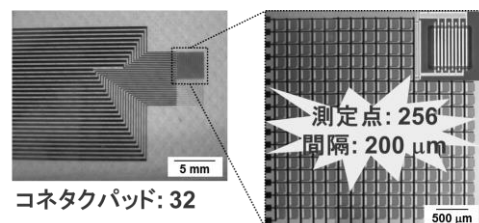


図3 デバイス作製のスキーム (Angew Chem Int Ed. 51, 6648, 2012)。

4. 研究成果

開発したデバイスを図4に示す。このデバイスを用いて、胚性幹細胞の分化評価に成功した(図5)。これらの結果から、本デバイスの細胞分化のための細胞スクリーニングへの応用が示された。



くし型電極 幅: 5 μm、間隔: 5 μm、電極数: 10 ウェル: 115 × 115 × 50 μm

図4 くし型電極を含む電気化学チップデバイス (Angew Chem Int Ed. 51, 6648, 2012)。

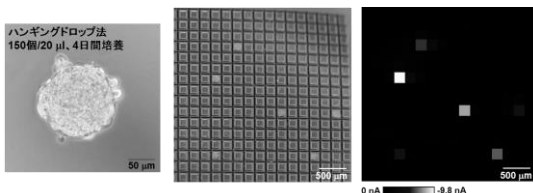


図 5 胚性幹細胞の電気化学イメージング (Angew Chem Int Ed. 51, 6648, 2012)。

また、3 次元的に電極を配置したデバイスをデザインした。このデザインを採用することで、センサの高密度化を実現した (図 6)。また、酵素-電極間のレドックスサイクルによる新規測定手法を開発し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 活性の電気化学イメージングに成功した (図 7)。

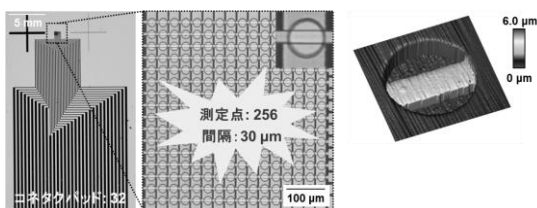


図 6 3 次元的に電極を配置したデバイス (Anal Chem. 86, 4016, 2014)。

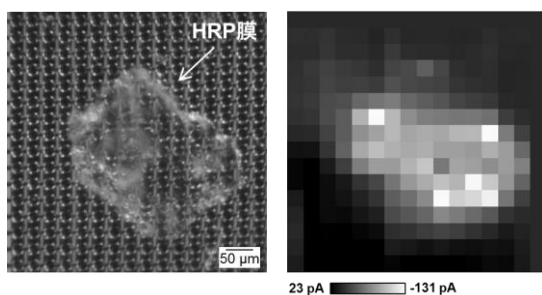


図 7 HRP の電気化学イメージング (Anal Chem. 86, 4016, 2014)。

これ以外にも、DNA 検出やバイオ試料を含む液滴の電気化学イメージング、細胞分泌酵素の計測に成功しており、様々なバイオアッセイへの応用が期待できる。

また、くし型電極以外にも、リング-リング電極やリング-ディスク電極を組み込んだデバイスの開発に成功しており、用途に合わせた電気化学分析が可能になっている。

この他に、誘電泳動による細胞操作や高分子ゲルの電解析出法の開発を行い、細胞解析に向けた電気化学チップデバイスの応用を検討した。

このように本研究では、細胞評価に向けた新規電気化学デバイスの開発に成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)
全て査読有

1. Ino K, Kanno Y, Nishijo T, Komaki H, Yamada Y, Yoshida S, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Densified electrochemical sensors based on local redox cycling using vertically separated electrodes for substrate generation/chip collection and extended feedback modes. *Anal Chem.* 86, 4016-23, 2014.
DOI:10.1021/ac500435d
2. Ino K, Goto T, Kanno Y, Inoue K, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Droplet array on local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. *Lab Chip.* 14, 787-94, 2014.
DOI:10.1039/c3lc51156a
3. Kanno Y, Goto T, Ino K, Inoue K, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. SU-8-based flexible amperometric device with IDA electrodes to regenerate redox species in small spaces. *Anal Sci.* 30, 305-9, 2014.
DOI:10.2116/analsci.30.305
4. Şen M, Ino K, Ramón-Azcón J, Shiku H, Matsue T. Cell pairing using dielectrophoresis-based device with interdigitated array electrodes. *Lab Chip.* 13, 3650-2, 2013.
DOI:10.1039/C3LC50561H
5. Ino K, Nishijo T, Kanno Y, Ozawa F, Arai T, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Electrochemical device with interdigitated ring array electrodes for investigating the relationship between cardiomyocyte differentiation from embryonic stem cells and alkaline phosphatase activity. *Electrochemistry.* 81, 682-87, 2013.
DOI:10.5796/electrochemistry.81.682
6. Ozawa F, Ino K, Arai T, Ramón-Azcón J, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Alginate gel microwell arrays using electrodeposition for three-dimensional cell culture. *Lab Chip.* 13, 3128-35, 2013.
DOI:10.1039/C3LC50455G
7. Şen M, Ino K, Inoue K, Y. Arai T, Nishijo T, Suda A, Kunikata R, Shiku H, Matsue T. LSI-based amperometric sensor for real-time monitoring of embryoid bodies, *Biosens Bioelectron.* 48, 12-8, 2013.
DOI:10.1016/j.bios.2013.03.069
8. Ino K, Ono K, Arai T, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Carbon-Ag/AgCl probes for detection of cell activity in droplets. *Anal Chem.* 85, 3832-5, 2013.

- DOI:10.1021/ac303569t
9. Ozawa F, Ino K, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Electrodeposition of alginate gels for construction of vascular-like structures. *J Biosci Bioeng.* 115, 459-61, 2013.
DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.10.014
 10. Ino K, Kanno Y, Arai T, Inoue Y K, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Novel electrochemical methodology for activity estimation of alkaline phosphatase based on solubility difference. *Anal Chem.* 84, 7593-8, 2012.
DOI:10.1021/ac301429n
 11. Şen M, Ino K, Shiku H, Matsue H. Accumulation and detection of secreted proteins from single cells for reporter gene assays using a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. *Lab Chip.* 12, 4328-35, 2012.
DOI:10.1039/C2LC40674H
 12. Ino K, Kanno Y, Nishijo T, Goto T, Arai T, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Electrochemical detection for dynamic analyses of a redox component in droplets using a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. *Chem Commun.* 48, 8505-7, 2012.
DOI:10.1039/C2CC34264B
 13. Ino K, Nishijo T, Arai T, Kanno Y, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Local redox cycling-based electrochemical chip device with deep microwells for evaluation of embryoid bodies. *Angew Chem Int Ed.* 51, 6648-52, 2012.
DOI:10.1002/anie.201201602
 14. Şen M, Ino K, Shiku H, Matsue T. A new electrochemical assay method for gene expression using HeLa cells with a secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter system. *Biotechnol Bioeng.* 109, 2163-7, 2012.
DOI:10.1002/bit.24461
 15. Zhu X, Ino K, Lin Z, Shiku H, Chen G, Matsue T. Amperometric detection of DNA hybridization using a multi-point, addressable electrochemical device. *Sens Actuator B-Chem.* 160, 923-928, 2011.
DOI:10.1016/j.snb.2011.09.004
 16. Ino K, Ishida A, Inoue KY, Suzuki M, Koide M, Yasukawa T, Shiku H, Matsue T. Electrorotation chip consisting of three-dimensional interdigitated array electrodes. *Sens Actuator B-Chem.* 153, 468-473, 2011.
DOI:10.1016/j.snb.2010.11.012
 17. Takeda M, Shiku H, Ino K, Matsue T. Electrochemical chip integrating scalable ring-ring electrode array to detect secreted alkaline phosphatase. *Analyst.* 136, 4991-6, 2011.
DOI:10.1039/C1AN15620A
 18. Ino K, Saito W, Koide M, Umemura T, Shiku H, Matsue T. Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection. *Lab Chip.* 11, 385-8, 2011.
DOI:10.1039/C0LC00437E
- [学会発表] (計 23 件)
1. 伊野浩介、菅野佑介、珠玖仁、末永智一、日本化学会第 94 春季年会、局所レドックスサイクルを用いた多点電気化学測定システム、2014 年 3 月 27 日 - 30 日、名古屋
 2. 伊野浩介、電気化学的手法を用いたバイオイメージング、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム(東北大学)、2014 年 3 月 3 日、仙台
 3. Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Komaki Hirokazu, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Densified electrochemical sensor based on vertically separated electrode array for electrochemical imaging, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2013), 2013 年 10 月 27 日 - 31 日, Freiburg, ドイツ
 4. Kosuke Ino, Electrochemical imaging for cell analysis using a high-density sensor array based on local redox cycling, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, 2013 年 9 月 28 日 - 30 日, 仙台, Invited lecture
 5. 伊野浩介、小沢文智、珠玖仁、末永智一、電解析出アルギン酸ゲルを用いた 3 次元細胞培養第 65 回日本生物工学会大会、2013 年 9 月 18 日 - 20 日、広島
 6. 伊野浩介、菅野佑介、珠玖仁、末永智一、局所レドックスサイクルを用いた網羅的電気化学デバイスによる細胞解析、日本分析化学会 第 62 年会、2013 年 9 月 10 日 - 12 日、大阪
 7. 伊野浩介、レドックスサイクルによる高感度・網羅的電気化学チップデバイスの開発、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 27 回研究会、2013 年 5 月 23 日 - 24 日、仙台、受賞講演
 8. Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Local redox cycling-based electrochemical chip device for high-throughput cell analysis,

- WPI-AIMR and Fraunhofer ENAS Joint Workshop on Micro Integrated Devices, 2013年2月22日, 仙台
9. 末永智一、西條拓、Mustafa Şen、珠玖仁、伊野浩介、局所レドックスサイクリングを利用した電気化学多点計測デバイスの開発、第58回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会、2012年11月26日 - 28日、東京
 10. Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical imaging device consisting of 256 local redox cycling-based electrochemical sensors for high-throughput cell analysis, Sendai Symposium on Analytical Sciences 2012 (SSAS2012), 2012年11月9-10日, 仙台, Invited lecture
 11. Kosuke Ino, Mustafa Şen, Taku Nishijo, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Comprehensive electrochemical imaging with local redox cycling-based electrochemical chip device for evaluation of three-dimensional culture cells, 23th 2012 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2012), 2012年11月4日 - 7日, 名古屋
 12. Kosuke Ino, Taku Nishijo, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Local redox cycling-based electrochemical chip device for high-throughput assay toward evaluating embryoid bodies, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2012), 2012年10月28日 - 11月1日, 沖縄
 13. 伊野浩介、Mustafa Şen、珠玖仁、末永智一、微細ウェルを組み込んだ多点電気化学デバイスによる1細胞からの分泌タンパク質の検出、第26回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2012年10月28日、沖縄、依頼講演
 14. 伊野浩介、菅野佑介、西條拓、珠玖仁、末永智一、細胞解析に向けたマイクロ・ナノギャップ電極による網羅的電気化学デバイスの開発、第64回日本生物工学会大会、2012年10月23日 - 26日、神戸
 15. Kosuke Ino, Taku Nishijo, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, A high-throughput assay for evaluation of embryoid bodies using local redox cycling-based electrochemical chip device, PRiME 2012, 2012年10月7日 - 12日, Hawaii, アメリカ合衆国
 16. Kosuke Ino, Taku Nishijo, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical imaging device consisting of microelectrode arrays to induce local redox cycling for high-throughput cell analyses, 2012 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2012), 2012年9月25日 - 27日, Kyoto
 17. Kosuke Ino, Mustafa Şen, Taku Nishijo, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Local redox cycling-based electrochemical chip devices containing 256 electrochemical sensors for cell analysis, RSC Tokyo International Conference-JASIS conference, 2012年9月6日 - 7日, Tokyo
 18. Kosuke Ino, Mustafa Şen, Taku Nishijo, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Local redox cycling-based electrochemical chip device for high-throughput cell analysis, The 4th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2012), 2012年6月10日 - 14日, 新竹, 台湾
 19. 伊野浩介、西條拓、珠玖仁、末永智一、局所レドックスサイクルを用いた網羅的電気化学チップデバイスによる胚性幹細胞の分化評価、第25回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2012年5月17日 - 18日、熊本
 20. 伊野浩介、Mustafa Şen、珠玖仁、末永智一、電気化学チップデバイスを用いた1細胞からの分泌タンパク質の検出、電気化学会第79回大会、2012年3月29日 - 31日、浜松
 21. Kosuke Ino, Taku Nishijo, Wataru Saito, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Addressable electrode array device incorporated with IDA electrodes for biological analyses, The 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2011年10月3日 - 6日, シアトル, アメリカ合衆国
 22. 伊野浩介、西條拓、珠玖仁、末永智一、細胞イメージングに向けた多点電気デバイスの開発、第63回日本生物工学会大会、2011年9月26日 - 28日、東京
 23. Kosuke Ino, Wataru Saito, Masahiro Koide, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Addressable electrode array device incorporated with IDA electrodes for multi-point detection, 62th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2011年9月12日 - 16日, 新潟

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

○受賞

1. 平成 26 年度電気化学会論文賞、2014 年 3 月 30 日、電気化学会、伊野浩介、西條拓、菅野佑介、小沢文智、新井俊陽、高橋康史、珠玖仁、末永智一、Electrochemical Device with Interdigitated Ring Array Electrodes for Investigating the Relationship between Cardiomyocyte Differentiation from Embryonic Stem Cells and Alkaline Phosphatase Activity
2. 平成 25 年度トーキン科学技術賞、2014 年 3 月 4 日、トーキン科学技術振興財団、伊野浩介、バイオイメージングに向けた電気化学チップデバイスの開発
3. 平成 24 年度化学とマイクロ・ナノシステム研究会若手優秀賞、2013 年 5 月 23 日、化学とマイクロ・ナノシステム学会、伊野浩介、レドックスサイクルによる高感度・網羅的電気化学チップデバイスの開発
4. 第 18 回青葉工学研究奨励賞、2012 年 12 月 7 日、青葉工学振興会、伊野浩介、網羅的電気化学測定に向けた新規測定システムの開発
5. Best Presentation Award SSAS 2012、Sendai Sympojium on Analytical Sciences 2012 Organizing Committee、Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue、Electrochemical imaging device consisting of 256 local redox cycling-based electrochemical sensors for high-throughput cell analysis
6. RSC Best Poster Presentation Award、RSC Publishing、Kosuke Ino、Local redox cycling-based electrochemical chip devices containing 256 electrochemical sensors for cell analysis、RSC-JAIMA Symposium on Human Health and Dioagnostics JASIS 2012, Tokyo, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊野 浩介 (INO KOSUKE)

東北大学・大学院環境科学研究科・助教

研究者番号：00509739

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし