

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25248032

研究課題名(和文) 生体組織の革新的バイオイメージングに向けた電気化学デバイスの開発

研究課題名(英文) Innovative electrochemical imaging device for bioanalysis

研究代表者

末永 智一 (Matsue, Tomokazu)

東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・教授

研究者番号：70173797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体組織の活性を可視化できる2種のタイプの電気化学デバイスを開発した。一方のデバイスはバイオLSIであり、集積回路が組み込まれてバイオ計測に特化したチップ型デバイスである。他方は、局所的なレドックスサイクルを利用したデバイス(LRC-EC)である。このデバイスには、電気化学応答を検出するための多数のスイッチングセンサが集積化されている。これらの電気化学デバイスを用いて、呼吸活性や細胞分泌物質の評価、細胞分化状態の可視化を実現した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have developed two-types of electrochemical devices for bioimaging. One was a bio-LSI device which was based on large-scale integrated (LSI) circuits dedicated to bioanalysis. The other was a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) device utilizing local redox cycling. The device consisted of many switching sensors incorporated into a small chip device to detect electrochemical responses. These bioimaging devices were successfully applied for evaluation of oxygen consumption and secreted chemicals from cells, and cell differentiation.

研究分野：電気化学

キーワード：電気化学イメージング バイオ分析 バイオMEMS 生体分子 マイクロ・ナノ化学 細胞機能解析 微小電極アレイ

### 1. 研究開始当初の背景

一般的な生体組織のイメージングには、光学的手法が用いられている。しかしながら、CCD 素子を用いたような光学的手法は、周辺装置も含めた小型化が困難、光を吸収、遮光、放出する物質や材料を使えないと言った問題を抱えている。

別の手法として、電気化学的手法が開発されている。電気化学的手法を用いることで、細胞が消費する酸素やグルコースの量、分泌物、膜タンパク質のイメージング、表面の形状評価が可能である。その際、リアルタイムの電気化学イメージングが求められており、そのために多数の電極を配置させた配列電極デバイスが開発されている。しかしながら、単純に電極を配置した場合では電極面積が膨大になってしまうため、1枚のデバイス内に多数の測定点を配置することが困難であり、低解像度の電気化学イメージしか取得できなかった。

このような問題点を解決するために、研究代表者らは集積回路 (LSI) をベースに電気化学デバイス (バイオ LSI) を開発した (Lab Chip, 12, 3481-90, 2012)。このデバイスの各測定点には、シグナル増幅器が組み込まれており、高感度かつ高解像度のリアルタイム電気化学イメージの取得が可能である。この他に、局所レドックスサイクルをベースにした電気化学測定デバイス (local redox cycling-based electrochemical device : LRC-EC デバイス) を開発した (Angew Chem Int Ed. 48, 2044-6, 2009)。この手法では、局所的にレドックスサイクル (近接した電極間で、目的物質が酸化と還元を繰り返す反応) の誘導により、 $2n$  本のコネクタパッドで  $n^2$  個の電気化学測定点を組み込める。したがって、多数の電気化学センサをデバイス内に組み込める。

本研究では、これらの電気化学デバイスを用いて、生体組織や 3 次元培養細胞のリアルタイムのバイオイメージングを実施し、これらのデバイスを用いた革新的バイオイメージング法を完成させた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体組織の活性の可視化を可能とする電気化学デバイスの開発と、開発したデバイスを用いた生体組織の細胞間シグナル伝達の解析である。

### 3. 研究の方法

本研究では、生体組織の革新的イメージングに向けたデバイス・システムとして、バイオ LSI と LRC-EC デバイスを開発した。これらのデバイスの感度やセンサ間隔、時間分解能、デバイス材料の検討を行い、生体組織や生体組織スライス、3 次元培養細胞の電気化学イメージングを実施した。

#### (1) バイオ LSI デバイス

バイオ LSI デバイスの改良を行い、評価した。また、開発したバイオ LSI デバイスによる新規バイオイメージング法を提案した。さらに、胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化評価、神経細胞から分泌される神経伝達物質の評価を実施した。また、バイオ分析以外への展開を検討するため、材料評価を行った。

#### (2) LRC-EC デバイス

センサの高密度化、高感度化に向けたデバイスデザインを考案・作製し、評価した。また、新しい計測システムを提案し、LRC-EC システムの概念を拡張した。

### 4. 研究成果

#### (1) バイオ LSI デバイス

開発したバイオ LSI デバイスを図 1 に示す。このデバイスには、400 個の独立した電気化学センサが  $250 \mu\text{m}$  間隔でアレイ状に配置されている。各センサで電流計測モードと電位計測モードを選択できるように改良し、測定対象に合った計測を可能にした (Lab Chip, 15, 848-856, 2015)。

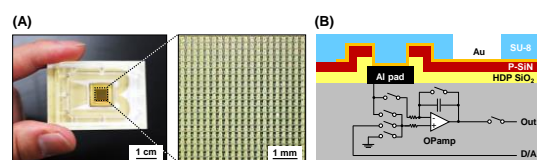


図 1 バイオ LSI の画像 (A) と断面の概要 (B) (Biosens. Bioelectron., 77, 709-714, 2016)。

開発したバイオ LSI デバイスを用いて、材料基板の導電性やトポロジー (図 2) の電気化学イメージングに成功した。また、分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) の計測により、幹細胞の分化評価を達成した (図 3、次ページ)。さらに、脳スライスから放出される物質や神経様細胞からのドーパミンのイメージングに成功し、本デバイスの生体組織の電気化学イメージングへの応用を示した。

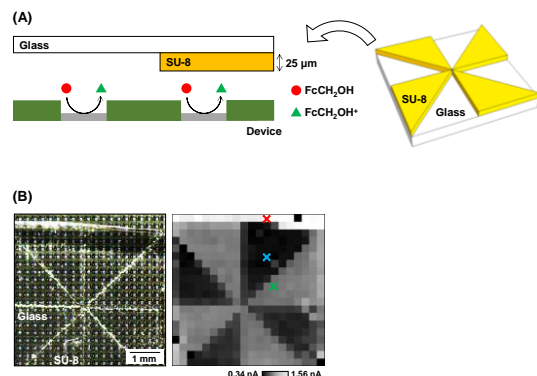


図 2 基板のトポロジーの電気化学イメージング (J. Electroanal. Chem. 741, 109-113, 2015)。(A) 検出スキーム。ネガティブフィードバックにより、対象形状の直下のセンサの電流値が変化する。(B) 風車型の基板の電気化学イメージ。

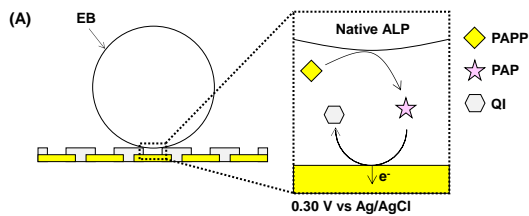


図3 胚様体 (EB) の分化状態の電気化学イメージング (文献 (Anal. Methods. 6, 6337-6342, 2014) を改変.)。 (A) 検出スキーム。 *p*-aminophenyl phosphate (PAPP) と ALP が反応し、生成された *p*-aminophenol (PAP) をセンサ電極で検出する。 (B) EB の電気化学イメージ。

次に、電位計測モードの評価を実施した。細胞イメージングへの応用のために、ES 細胞の分化状態を計測したところ (図4)。非侵襲的な幹細胞の分化状態の評価に成功した。

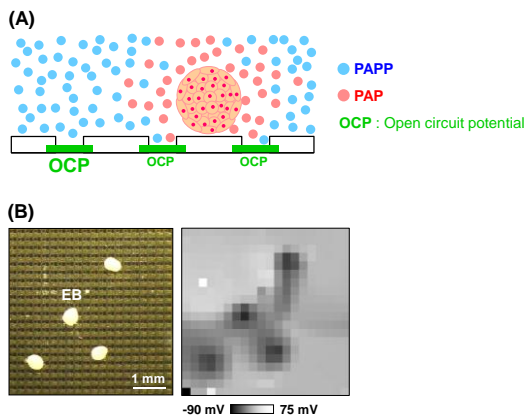


図4 EB の分化状態の電位計測イメージング (文献 (Biosens. Bioelectron. 77, 709-714, 2016) を改変.)。 (A) 検出スキーム。 (B) EB の電気化学イメージ。

## (2) LRC-EC デバイス

LRC-EC デバイスにおけるセンサの高密度化に向けたデバイス構造を考案した (図5)。これにより、研究代表者がこれまで報告しているデバイスに比べ、センサ密度を40倍以上の高解像度の電気化学バイオイメージングを達成した (図6)。また、Electrochemistry 誌に掲載された LRC-EC デバイスに関する論文 (Electrochemistry, 81, 682-687, 2013) は論文賞を受賞した。

また、拡張フィードバックモード (Anal. Chem.86, 4016-4023, 2014) と呼ばれる新しい検出機構を考案し、酵素である西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の検出に成功した。

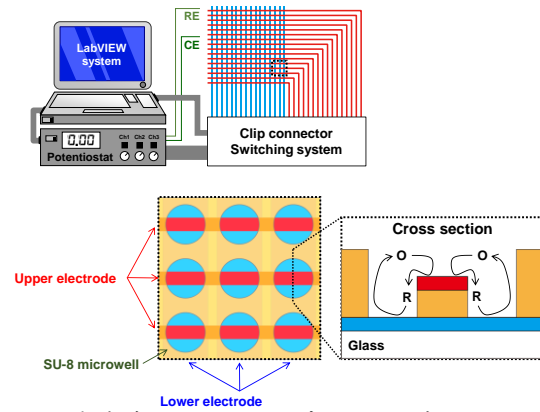


図5 高密度化 LRC-EC デバイスの概要 (Anal. Chem.86, 4016-4023, 2014)。

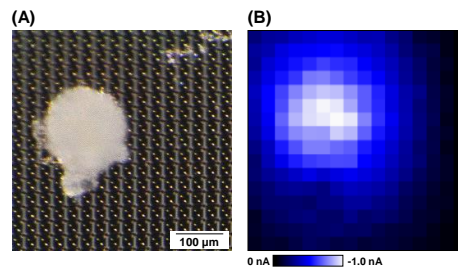


図6 高密度化 LRC-EC デバイスを用いた電気化学イメージング (Anal. Chem.86, 4016-4023, 2014)。 EB の顕微鏡画像 (A) と電気化学イメージ (B)

液滴アレイの検出を目的に、各センサに参照極/対極を配置したデバイスを開発した。これにより、液滴アレイの網羅的な解析を実現した (図7)。液滴を1つの反応器として見なすことができるため、多数の液滴内での化学反応のハイスループットな検出が可能になる。

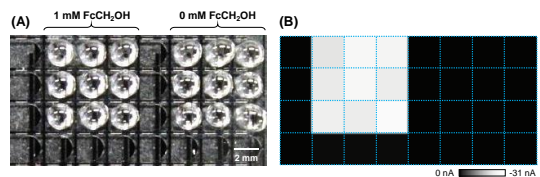


図7 LRC-EC デバイスを用いた液滴アレイ検出 (文献 (Lab Chip.14, 787-794, 2014) を改変)。

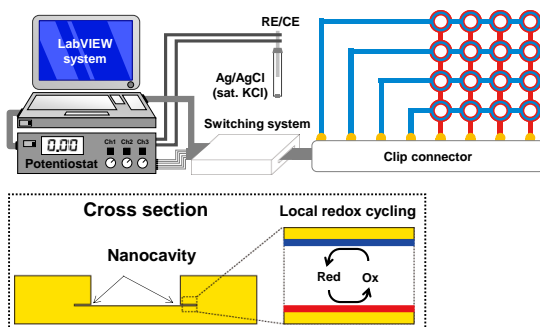


図8 ナノギャップ LRC-EC デバイスの概要 (文献 (Lab Chip, 15,4404-4414, 2015) を改変)。

また、レドックスサイクルの効率を上昇させるために、ナノ流路を介してセンサ電極を配置させたナノギャップ LRC-EC デバイスを開発した (図 8、前ページ)。これにより、劇的なシグナル増幅を達成し、細胞からのシグナルのイメージングを達成した。この研究成果は学術論文の Inside front cover に選ばれた (図 9)。



図 9 ナノギャップ LRC-EC デバイスに関する Inside front cover (Lab Chip, 15, 4372-4372, 2015)。

また、呼吸活性に向けた新たな計測システムを開発し、分子電気化学スイッチング素子と呼ばれる新しい概念を提案した (図 10)。このシステムを用いることで、生物の基本的な活性である呼吸量を評価するが可能になった (図 11)。このように、LRC-EC デバイスの概念を拡張する新しい計測システムを提案した。

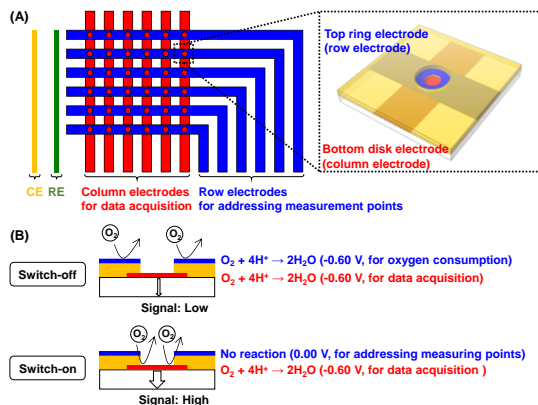


図 10 分子電気化学スイッチング素子による溶存酸素検出 (Sens. Actuator B-Chem., 201-208, 2016)。(A) 概要。(B) スwitchング原理。

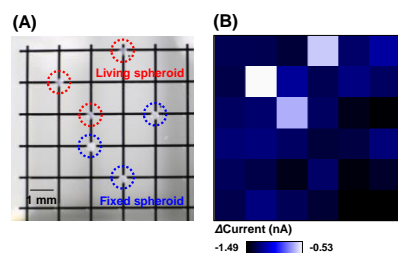


図 11 分子電気化学スイッチング素子による細胞塊の呼吸活性評価 (Sens. Actuator B-Chem., 201-208, 2016)。(A) 細胞塊の顕微鏡画像 (A) と電気化学イメージ (B)。

### (3) その他

バイオ LSI デバイスと LRC-EC デバイスの開発に加え、多機能ナノ電気化学顕微鏡の開発を行い、本研究で開発した電気化学デバイスとの比較を行った。多機能ナノ電気化学顕微鏡は、世界でトップレベルの解像度を示す一方で、本研究で開発した電気化学デバイスは、操作性やイメージングの時間分解能では優れていることを示した。また、バイオサンプルを作製するための誘電泳動デバイス・システムを開発し、ハイドロゲルと組み合わせることで、高機能な培養組織の作製を達成した。

さらに、プローブ型電極を用いた細胞・遺伝子回収システムを開発した。これにより、細胞活性の電気化学イメージングを終えた後に、局所的なサンプル回収が可能になるため、さらに複雑な細胞機能解析が実現する。

### (4) まとめ

本研究では、生体組織のバイオイメージングに向けた革新的バイオイメージングデバイスを開発した。生体機能の網羅的で動的な解析は、細胞機能解析と言った学術的意義だけでなく、医療応用が期待できる。

本研究で開発した電気化学デバイスがさらに発展すれば、集積型バイオチップとしての普及が期待できる。高感度で簡便、(対象物によっては)非侵襲な計測であるという電気化学検出の特徴により、従来手法との差別化が期待される。一方、従来汎用されている光学イメージングシステムとの融合により、さらに緻密な計測が実現できる。本デバイスの実現は、バイオセンシングだけでなく各種化学センシングに革命をもたらし、センサ工学の技術体系への新しい展開が期待できる。

## 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 38 件)

以下の主な学術論文を示す。

1. Ino K, Yamada Y, Kanno Y, Imai S, Shiku H, Matsue T. Molecular electrochemical switching element based on diffusive molecular competition for multipoint electrochemical detection of respiration activity of cell aggregates. Sens. Actuator B-Chem., 201-208, 2016, 査読有 DOI: 10.1016/j.snb.2016.04.160
2. Kanno Y, Ino K, Sakamoto C, Inoue KY, Matsudaira M, Suda A, Kunikata R, Ishikawa T, Abe H, Shiku H, Matsue T. Potentiometric bioimaging with a large-scale integration (LSI)-based electrochemical device for detection of enzyme activity. Biosens. Bioelectron., 77, 709-714, 2016, 査読有



- DOI: 10.1016/j.bios.2015.10.021
3. Takano S, Inoue KY, Ikegawa M, Takahashi Y, Ino K, Shiku H, Matsue T. Liquid-junction-free system for substitutional stripping voltammetry using a closed bipolar electrode system. *Electrochem. Commun.*, 66, 34-37, 2016, 査読有  
DOI: 10.1016/j.elecom.2016.02.014
  4. Kanno Y, Ino K, Shiku H, Matsue T. A local redox cycling-based electrochemical chip device with nanocavities for multi-electrochemical evaluation of embryoid bodies. *Lab Chip*, 15, 4404-4414, 2015, 査読有  
DOI: 10.1039/C5LC01016K
  5. Abe H, Ino K, Li CZ, Kanno Y, Inoue KY, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Electrochemical imaging of dopamine release from three-dimensional-cultured PC12 cells using large-scale integration-based amperometric sensors. *Anal. Chem.*, 87, 6364-6370, 2015, 査読有  
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01307
  6. Şen M, Takahashi Y, Matsumae Y, Horiguchi Y, Kumatani A, Ino K, Shiku H, Matsue T. Improving the electrochemical imaging sensitivity of scanning electrochemical microscopy-scanning ion conductance microscopy by using electrochemical Pt deposition. *Anal. Chem.*, 87, 3484-3489, 2015, 査読有  
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00027
  7. Kanno Y, Ino K, Inoue KY, Şen M, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, Abe H, Li CZ, Shiku H, Matsue T. Feedback mode-based electrochemical imaging of conductivity and topography for large substrate surfaces using an LSI-based amperometric chip device with 400 sensors. *J. Electroanal. Chem.*, 741, 109-113, 2015, 査読有  
DOI: 10.1016/j.jelechem.2015.01.020
  8. Inoue KY, Matsudaira M, Nakano M, Ino K, Sakamoto C, Kanno Y, Kubo R, Kunikata R, Kira A, Suda A, Tsurumi R, Shioya T, Yoshida S, Muroyama M, Ishikawa T, Shiku H, Satoh S, Esashi M, Matsue T. Advanced LSI-based amperometric sensor array with light-shielding structure for effective removal of photocurrent and mode selectable function for individual operation of 400 electrodes. *Lab Chip*, 15, 848-856, 2015, 査読有  
DOI: 10.1039/C4LC01099J
  9. Ino K, Goto T, Kanno Y, Inoue KY, Takahashi Y, Shiku H, Matsue T. Droplet array on local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device. *Lab Chip*, 14, 787-794, 2014, 査読有  
DOI: 10.1039/C3LC51156A
  10. Ahadian S, Ramón-Azcón J, Estili M, Obregón R, Shiku H, Sakka Y, Matsue T. Facile and rapid generation of 3D chemical gradients within hydrogels for high-throughput drug screening applications. *Biosens. Bioelectron.*, 59, 166-173, 2014, 査読有  
DOI: 10.1016/j.bios.2014.03.031
  11. Takahashi Y, Kumatani A, Munakata H, Inomata H, Ito K, Ino K, Shiku H, Unwin PR, Korchev YE, Kanamura K, Matsue T. Nanoscale visualization of redox activity at lithium-ion battery cathodes. *Nature Commun.*, 5, 5450, 2014, 査読有  
DOI: 10.1038/ncomms6450
  12. Ino K, Kanno Y, Nishijo T, Hirokazu K, Yamada Y, 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, 4016-4023, 2014, 査読有  
DOI: 10.1021/ac500435d
  13. Matsumae Y, Arai T, Takahashi Y, Ino K, Shiku H, Matsue T. Evaluation of the differentiation status of single embryonic stem cells by using scanning electrochemical microscopy. *Chem. Commun.*, 49, 6498-6500, 2013, 査読有  
DOI: 10.1039/C3CC43126F
  14. Ramón-Azcón J, Ahadian S, Estili M, Liang X, Ostrovidov S, Kaji H, Shiku H, Ramalingam M, Nakajima K, Sakka Y, Khademhosseini A, Matsue T. Dielectrophoretically aligned carbon nanotubes to control electrical and mechanical properties of hydrogels to fabricate contractile muscle myofibers. *Advanced Materials*, 25, 4028-4034, 2013, 査読有  
DOI: 10.1002/adma.201301300
  15. Şen M, Ino K, Inoue KY, 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, 12-18, 2013, 査読有  
DOI: 10.1016/j.bios.2013.03.069
- [学会発表] (計 204 件)  
以下に代表的な依頼講演を示す。
1. Tomokazu Matsue, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), High-resolution bioelectrochemical imaging and sensing for single cells, 2015 年 12 月 15-20, Honolulu (USA)
  2. Tomokazu Matsue, Electrochemical Energy

- Science and Technology 2015 (EEST2015), 2015年8月17日、Vancouver (Canada)
3. Tomokazu Matsue, UK-Japan Workshop on Biosensing Technologies for the Innovative Healthcare, Biosensing and bioimaging with integrated electrochemical devices, 2014年12月1-2日、British Embassy (Tokyo)
  4. Tomokazu Matsue, International Symposium on Chemical-Environmental-Biomedical Technology 2014 (isCEBT 2014), Bioelectrochemical imaging with micro/nanoelectrode systems, 2014年9月10日-14日、Chang Gung University (Taiwan)
  5. Tomokazu Matsue, Italian-German-Japanese Meeting of Electrochemists, High-resolution electrochemical imaging with nanoelectrode systems, 2014年6月15日、Padova (Italy)
  6. Tomokazu Matsue, 15<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis (ESEAC), Bioimaging with micro/nanoelectrode systems, 2014年6月13日、Malmo (Sweden)
  7. 末永智一、日本学術振興会第181委員会研究会、マイクロ・ナノ電極システムを用いたバイオセンシングとバイオイメージング、2015年6月10日、化学会館(東京)
  8. Tomokazu Matsue, International Meeting on Chemical Sensors 2014 (IMCS2014), Bioimaging with micro/nanoelectrode systems, 2014年3月18日、Buenos Aires (Argentina)
  9. Tomokazu Matsue, Memorial Symposium for Prof. SU-Moon Park, Bioelectrochemical imaging with micro/nanoelectrode systems, 2013年11月8日、Daejeon (Korea)
  10. Tomokazu Matsue, The 15<sup>th</sup> Beijing Conference and Exhibition on Analytical Instruments, Recent development of electrochemical imaging, 2013年10月25日、北京(中国)

〔図書〕(計0件)  
なし。

〔産業財産権〕

○出願状況(計10件)

以下に代表的な産業財産権を示す。

1. 名称：電気構造の製造方法、電気化学センサの製造方法、電極構造および電気化学センサ  
発明者：樋口拓也、末永智一、井上久美  
権利者：国立大学法人東北大学、大日本印刷株式会社  
種類：特許  
番号：特願2016-56567

- 出願年月日：2016/3/22  
国内外の別：国内
2. 名称：電極チップ  
発明者：末永智一、井上久美、伊藤隆広、珠玖仁、池川未歩  
権利者：国立大学法人東北大学  
種類：特許  
番号：特願2016-55251  
出願年月日：2016/3/18  
国内外の別：国内
  3. 名称：電気化学測定方法、電気化学測定装置及びトランスデューサ  
発明者：國方亮太、林泰之、須田篤史、伊野浩介、井上久美、末永智一  
権利者：国立大学法人東北大学、日本航空電子工業株式会社  
種類：特許  
番号：特願2015-249764  
出願年月日：2015/12/22  
国内外の別：国内

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

末永 智一 (MATSUE TOMOKAZU)  
東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・教授  
研究者番号：70173797

(2)研究分担者

1. 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. 高橋 康史 (TAKAHASHI YASUFUMI)  
東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・助教  
研究者番号：90624841  
2013-2014年度
3. Ramon Javier (RAMON JAVIER)  
東北大学・原子分子材料科学高等研究機構・助教  
研究者番号：50613270  
2013年度
4. 珠玖 仁 (SHIKU HITOSHI)  
東北大学・大学院環境科学研究科・准教授  
研究者番号：10361164  
2014-2015年度
5. 井上 久美 (INOUE KUMI)  
東北大学・大学院環境科学研究科・講師  
研究者番号：20597249  
2014-2015年度

(3)連携研究者

なし