

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600057

研究課題名(和文)電気化学イメージングデバイスを用いた細胞動体解析法の開発

研究課題名(英文)Electrochemical motion tracking for cells

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在、培養細胞や微小生物に関する様々な動体解析法が開発されている。一般的に、動体解析には光学的手法が用いられており、細胞機能解析や環境評価、細胞品質管理への応用が検討されている。一方、細胞解析において優れたツールである電気化学的手法による動体解析はほとんど報告されていない。そこで本研究では、細胞や組織が動くことによる溶液の対流から細胞の動体変化を捉えるという、新しいアイデアに基づく細胞動体イメージング法を開発した。これにより微小生物の動体の電気化学イメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Several methods for motion tracking of cells and microorganisms have been developed to investigate their biological function. In general, optical ways have been utilized for the motion tracking. In contrast, there are a few electrochemical methods for motion tracking, even though the electrochemical ways are useful for cell analysis. In the present study, we developed a novel electrochemical detection for motion tracking. By using the electrochemical detection, motion of microorganisms was successfully tracked.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：電気化学イメージング バイオMEMS 細胞解析 集積回路デバイス 微小電極アレイ

1. 研究開始当初の背景

現在、様々な細胞機能解析法が開発されている。その一つとして、細胞の動体解析が挙げられる。例えば、心筋細胞や筋肉細胞、蠕動運動する腸組織の運動性の解析により、虚血症心疾患、肥大型・拡張型心筋症の疾病解明、過敏性腸炎、パーキンソン病などの疾病解明が期待されている。

このような動体解析法として、光学的手法が挙げられる。光学イメージングにより細胞や組織の位置変化や速度解析が可能になる。一方、光学イメージングと同様に細胞解析において優れたツールである電気化学イメージングでは、そのような動体解析はほとんど報告されていない。これは、電気化学イメージングのためには多数の電極が配置された電極デバイスを作製する必要があるが、そのようなデバイスの作製が困難なためである。また、細胞動体を解析するような電気化学測定のアイディアがこれまで提案されてなかったからである。一方で、近年発達してきた微細加工技術の進歩により、電極配列デバイスの開発が可能になってきており、申請者らは多数の電気化学センサが配置された電極デバイスに開発に成功している (Angew Chem Int Ed, 51, 6648, 2012; Lab Chip, 12, 3481, 2012; Biosens Bioelectron, 48, 12, 2013)。したがって、細胞の動体解析に向けた新しい測定法さえ提案できれば、電気化学的に細胞動体解析が可能になる。

そこで本研究では、細胞の運動性を測定できる新規電気化学計測法を提案する (図1)。

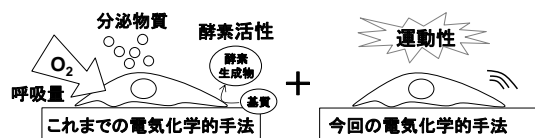


図1 本研究の概要。

2. 研究の目的

本研究では、細胞や組織の動きより発生した溶液の対流を電気化学イメージングとして捉え、そこから細胞の動体変化を観察するという、これまでに報告されていない計測法の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究で提案する手法の基本原理を図2に示す。この手法では、細胞の動きによる対流で電気化学測定物質が電極に供給され、対流が発生した場所で大きな電流値が得られる。得られた電流値の解析から細胞の動体解析を実施する。1つの電極から得られた電流値ではそのような解析は困難であるが、多数の電極を配列させたデバイスを用いて各測定点からの電流値を取得することで、動体解析を実現する。

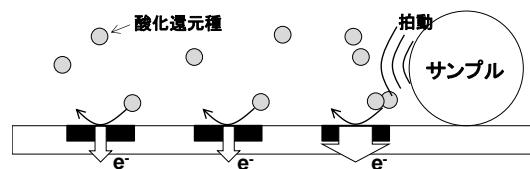


図2 測定原理。

4. 研究成果

作製したデバイスを図3に示す。作製したデバイスは、400個の独立した電気化学センサを有しており、250 μm間隔でアレイ状にセンサが配置されている。まず始めに、デバイスの作製方法の検討し、デバイス作製成功率を80%以上まで上昇させた。具体的には、チップレベルではなく、ウエハレベルでのデバイス作製を実施した。

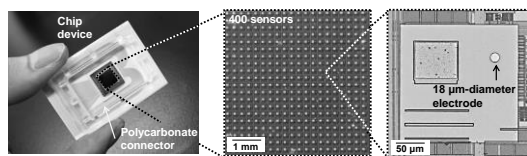


図3 作製したデバイス (J Electroanal Chem. 741, 109-13, 2015)。

続いて、開発したデバイスの機能評価として、材料の導電性評価やトポロジー評価を実施した。また、培養細胞の呼吸活性や酵素活性、接着性表を実施し、バイオ計測に耐えるチップデバイスであることを確認した。

次に、単純な運動を観察するために、ガラスキャピラリーが振動する装置を作製した。酸化還元種を含む溶液中にキャピラリーを挿入し、センサ電極近傍で振動させ、この振動による溶液の移動を電気化学的にイメージングした。その結果、振動による酸化還元種の供給の可視化に成功した。このデータを解析した結果、液流れに関する新しい知見を得た。

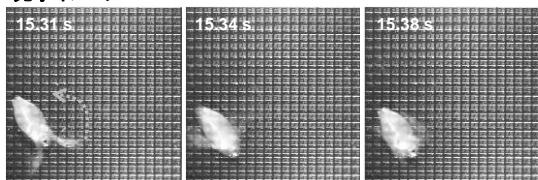
続いて、心筋細胞を拍動の電気化学イメージングを行ったが、有意な検出を達成できなかった。これは、センサの感度や時間分解が問題であると考えられる。そこで、細胞よりも大きい微小生物であるミジンコの動きの電気化学イメージングを実施し、これにより、動体解析への電気化学アプローチを検討した。その結果、ミジンコの動体解析に成功した (図4、次ページ)。また、フェロシアン化物イオンといった酸化還元種ではなく、溶存酸素を指標にした計測を達成した。これにより、非侵襲的な計測が可能であると考えられる。現在、この研究成果の論文を執筆中である。

電気化学イメージングデバイス自体についても本研究は新規性を有している。単純な電極デバイスでは外部機器と接続するためのコネクタパッドや電極配線が必要であり、多数の電流計測型センサを配置するのは困

難である。一方、本研究で使用した LSI 型電気化学計測デバイスには集積回路が搭載されており、各センサにはスイッチングシステムやシグナル増幅器が組み込まれている。したがって、これまで電気化学チップデバイスでは困難であった高解像度な電気化学イメージングを可能にしている。これにより、本研究で提案するような電気化学イメージングを可能にした。

これまで、このような測定法に関する先行研究がないため本研究の新規性が高い。動体解析には光学イメージングが一般的であるが、本研究で提案するような電気化学イメージングによる動体解析は斬新なアイデアであり、新しい細胞評価法の切り口になり得る。細胞による応力の計測や、液流による細胞間シグナル伝達の解析といった光学イメージングでは困難な測定や解析が、今後、期待される。

光学イメージ



電気化学イメージ



図4 微小生物の動体の電気化学イメージング。Ino K et al., LSI-based amperometric sensor for electrochemical imaging of microorganisms. In preparation.

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 7 件)

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*, 201-8, 2016, 査読有
DOI: 10.1016/j.snb.2016.04.160
2. Abe H, Kanno Y, Ino K, Inoue KY, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, Shiku H, Matsue T. Electrochemical imaging for single-cell analysis of cell adhesion using a collagen-coated large-scale integration (LSI)-based amperometric

device. *Electrochemistry*, 84, 364-7, 2016, 査読有

DOI: 10.5796/electrochemistry.84.364

3. 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, 709-14, 2016, 査読有
DOI: 10.1016/j.bios.2015.10.021
 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, 4404-14, 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 LSI-based amperometric sensors. *Anal Chem*. 87, 6364-70, 2015, 査読有
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01307
 6. Kanno Y, Ino K, Inoue KY, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, Shiku H, Matsue T, Simulation analysis of positional relationship between embryoid bodies and sensors on an LSI-based amperometric device for electrochemical imaging of alkaline phosphatase activity. *Anal Sci*. 31, 715-9, 2015, 査読有
DOI: 10.2116/analsci.31.715
 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, 109-13, 2015, 査読有
DOI: 10.1016/j.jelechem.2015.01.020
- [学会発表] (計 16 件)
1. 伊野浩介、珠玖仁、末永智一、バイオ・マイクロシステム研究会、マイクロ・ナノ化学に基づく電気化学バイオイメージングデバイス、2016年4月27日、東京大学(東京)
 2. 伊野浩介、日本化学会 第96春季年会(2016)、マイクロ・ナノ化学に基づく電

- 気化学イメージングデバイスの開発と細胞解析への応用、2016年3月24日-27日、同志社大学(京都)、依頼講演
3. 伊野浩介、菅野佑介、須田篤史、國方亮太、松平昌昭、珠玖仁、末永智一、日本化学会第96春季年会(2016)、電気化学バイオイメージングのカラー化に向けたLSIデバイスの開発、2016年3月24日-27日、同志社大学(京都)
 4. Kosuke Ino, Yuta Yamada, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Pacifichem 2015, Molecular diffusion-based switching system using microelectrode array, 2015年12月15日-20日、Hawaii (USA)
 5. Kosuke Ino, Yuta Yamada, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2015), Electrochemical imaging using molecular consumption-based switching system for evaluation of respiration activity of cell aggregates, 2015年10月25日-29日、Gyeongju (Korea)
 6. 伊野浩介、2015年度バイオインダストリー協会賞 発酵と代謝研究奨励賞、化学・生物素材研究開発奨励賞 合同発表会、マイクロ・ナノ化学と電気化学の融合による新規バイオ分析法の開発、2015年10月14日、幕張メッセ(千葉)、受賞講演
 7. 伊野浩介、山田祐大、菅野佑介、珠玖仁、末永智一、第9回バイオ関連化学シンポジウム-第30回生体機能関連化学シンポジウム、分子電気化学スイッチングデバイスを用いた3次元培養組織の呼吸活性イメージング、2015年9月10日-12日、熊本大学(熊本)
 8. Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Kumi Y. Inoue, Masahki Matsudaira, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, RSC Tokyo International Conference 2015, Large-scale integration (LSI)-based electrochemical chip device for imaging of cell activity in three-dimensional cultured cells, 2015年9月3日-4日、幕張メッセ(千葉)
 9. 伊野浩介、平成27年度日本分析化学会東北支部若手交流会、マイクロ・ナノ化学を利用した電気化学バイオ分析、2015年7月17日-18日、パルセいいざか(福島)、招待講演
 10. Kosuke Ino, Yuta Yamada, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, ISMM2015, Electrochemical bioimaging using a diffusion control-based electrode array device, 2015年6月8日-10日、Kyoto University (Kyoto)
 11. 伊野浩介、山田祐大、菅野佑介、珠玖仁、末永智一、第75回分析化学討論会、分子電気化学スイッチング素子を用いた細胞呼吸活性の電気化学イメージング、2015年5月23日-24日、山梨大学(山梨)
 12. 伊野浩介、菅野佑介、山田祐大、珠玖仁、末永智一、日本化学会第95春季年会、分子電気化学スイッチング素子の創成と電気化学バイオイメージングへの応用、2015年3月26日-29日、日本大学(船橋)
 13. 伊野浩介、電気化学会第82回大会、バイオ分析に向けた電気化学計測システム・デバイスの開発に関する研究、2015年3月15日-17日、横浜国立大学(横浜)、受賞講演
 14. Kosuke Ino, Fumisato Ozawa, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2014), Electrodeposited alginate hydrogels for fabrication of cell sheets, 2014年10月26日-30日、San Antonio (USA)
 15. 伊野浩介、日本分析化学会第63年会、細胞解析を指向した電気化学デバイスの開発、2014年9月19日-21日、広島大学(広島)、受賞講演
 16. 伊野浩介、小沢文智、珠玖仁、末永智一、化学とマイクロ・ナノシステム学会第29回研究会、細胞培養に向けたハイドロゲル電解析出法の開発、2014年5月22日-23日、日本女子大学(東京)
- [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. 2015年度化学・生物素材研究開発奨励賞、マイクロ・ナノ化学と電気化学の融合による新規バイオ分析法の開発、バイオインダストリー協会、2015年10月14日
 2. 平成27年度電気化学会進歩賞・佐野賞、バイオ分析に向けた電気化学計測システム・デバイスの開発に関する研究、電気化学会、2015年3月
 3. 2014年度日本分析化学会奨励賞、細胞解析を指向した電気化学デバイスの開発、日本分析化学会、2014年9月
 4. 第54回原田研究奨励賞、バイオ分析に向けた検出素子材料・測定システムの開発、公益財団法人本多記念会、2014年7月

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