

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05415

研究課題名(和文)分子電気化学スイッチ素子の開発と電気化学バイオイメージングへの応用

研究課題名(英文)Molecular electrochemical switching elements for bioimaging

研究代表者

伊野 浩介 (Ino, Kosuke)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00509739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロナノ空間内の分子拡散と電気化学反応の制御により、トランジスタのような働きをする“分子電気化学スイッチ素子”を開発した。このスイッチング素子の性能評価とこの素子を組み込んだ電気化学デバイス作製を実施し、胚性幹細胞の分化評価や、ガン細胞の呼吸活性のイメージング(可視化)を実現した。また、この概念を拡張して電気化学センサアレイの特徴を生かした新規の電気化学イメージング手法を提案した。例えば、CMOS技術により作製した電極アレイデバイスと電気化学計測を組み合わせ、複数の物質を同時に電気化学イメージングできるシステムを開発した。これにより、種々の細胞機能の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：This study presents the molecular electrochemical switching element based on molecular diffusion and electrochemical reaction. The element acts like a transistor. The elements were incorporated into a small chip device, and the device was characterized. The device was applied to evaluation of cell differentiation of embryonic stem cells and respiration activity of cancer cells. In addition to them, the novel electrochemical imaging system was developed using CMOS-based electrode arrays. By using the device, multiple analytes were electrochemically imaged at the same time.

研究分野：マイクロ・ナノ化学

キーワード：電気化学分析 バイオ計測 バイオMEMS マイクロ・ナノ化学 微小電極アレイ 細胞解析

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに様々なイメージング技術が開発されている。中でも、電気化学シグナルに置き換えて化学反応を可視化できる電気化学イメージングは、材料評価からバイオ分析まで多岐に渡り用いられている。

電気化学イメージングのために、ガラス基板などの上に多数の電極を配置した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リード電極やコネクタ電極の面積が膨大になるため、組み込めるセンサ数が限られてしまう。この問題点を解決するために、我々は分子拡散と電気化学反応による“分子電気化学スイッチ素子”という新しい概念を提案している (図 1)。

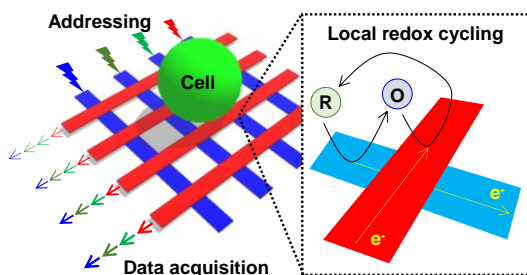


図 1 分子電気化学スイッチ素子を組み込んだ電気化学イメージングデバイスの概要 (発表論文 3)。局所的にレドックスサイクリングを誘起し、細胞機能 (酵素活性など) を電流値に置き換えて可視化する。Reproduced with permission from Elsevier.

分子電気化学スイッチ素子は、2 組の近接した電極と溶液から構成される。スイッチ電極に電位を印可して電気化学反応物を生成することで、スイッチが“On”になる。次に、この生成物をデータ読み取り電極で反応させてシグナルを得る。図 1 のように縦と横電極をデータ読み取り、スイッチ電極として用いることで、各格子を独立した電気化学センサとして利用できる。これにより、 $2n$  個の電極で  $n^2$  個のセンサを組み込み、多くの電気化学センサを搭載できる。その際、電気化学生成物と様々な化学反応を組み合わせることで、目的の化学反応のシグナルを得られる。

これまでに電極間レドックスサイクルを利用した分子電気化学スイッチ素子を報告しているが (図 1)、本研究では、分子電気化学スイッチ素子の概念を拡張した新規の電気化学バイオイメージングツールを提案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、微小空間内の分子拡散と電気化学反応の制御により、トランジスタのような働きをする“分子電気化学スイッチ素子”のコンセプトの拡張を目的とし、様々なバイオサンプル計測を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では「分子電気化学スイッチ素子の開発」と「デバイス開発」、「バイオイメージング」を行う。これまでに、電極間レドックスサイクルを報告しているが、この概念を拡張し、電極競合反応による分子電気化学スイッチ素子を開発した。また、感度向上のために、ナノ空間を有する電極デバイスを開発した。さらに開発した素子を組み込んだデバイスを作製し、幹細胞の分化評価、がん細胞の呼吸活性を行い、本研究を完成させた。

### 4. 研究成果

本システムにおいて、感度を向上させるためには、2 組の電極を近接させる必要がある。そこで、ナノ空間を介して電極を配置するためにクロム犠牲層の利用を考えた (図 2)。この手法を用いることで、クロム層の厚さ (230 nm) のナノ空間を形成できた。このナノ空間でのレドックスサイクリングにより、レドックスサイクリングを誘起しない場合と比べて、100 倍程度のシグナル増幅が期待できる。さらに、これをデバイスに組み込むことで、コネクタパッドが 8 個にも関わらず 16 個の電気化学センサを組み込む事に成功した。このコンセプトを用いれば、さらなる多数の電気化学センサの搭載が期待できる。

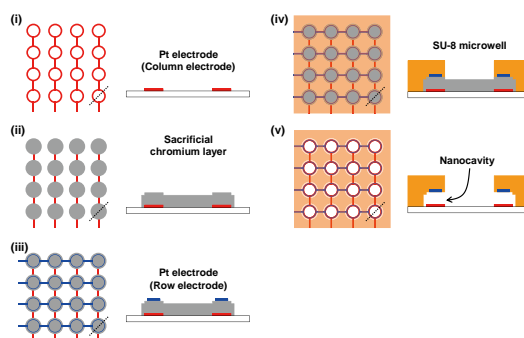


図 2 デバイス作製のスキーム。詳細は発表論文 12 に記載。Reproduced with permission from the Royal Society of Chemistry.

続いて、胚性幹細胞の細胞分化状態を計測した。分化マーカーであるアルカリホスファターゼの活性を電流値に変換してイメージングしたところ、細胞分化を可視化する事に成功した (図 3)。

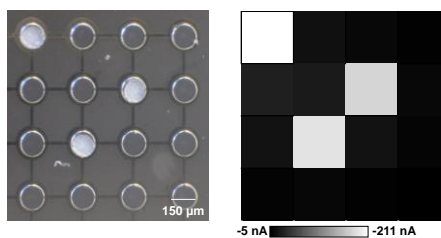


図 3 胚性幹細胞の塊の光学イメージ (左) と電気化学イメージ (右) (発表論文 12)。Reproduced with permission from the Royal Society of Chemistry.

この研究成果は Lab on a Chip 誌の inside

cover に選ばれた (図 4)。



図 4 Lab on a Chip の inside cover (発表論文 12)。Reproduced with permission from the Royal Society of Chemistry.

前述した結果では、2 組の電極間でのレドックスサイクルをシグナル増幅とスイッチングに利用しており、レドックスサイクリングが本システムで重要な役割を果たしていることが分かる。したがって、レドックスサイクリングを誘起出来ない物質、例えば溶存酸素のような物質の検出には、本システムを用いることができなかった。そこで、分子電気化学スイッチ素子のコンセプトを拡張する新しいアイデアを考案した。この検出法では、2 組の電極が電気化学反応で物質を消費することをスイッチオン、オフできる機構を考案した (図 5)。このスイッチング素子では、溶存酸素をスイッチング素子に利用しており、したがって、センサ上の溶存酸素を計測できる (図 6)。開発したスイッチング素子の基礎的評価を実施したところ、スイッチング素子としての機能を有していることを確認した。続いて、この素子を組み込んだデバイスを開発し、ガン細胞塊の呼吸活性評価に成功した。この結果から、分子電気化学スイッチング素子は、様々な種類のサンプル計測が可能であると言える。

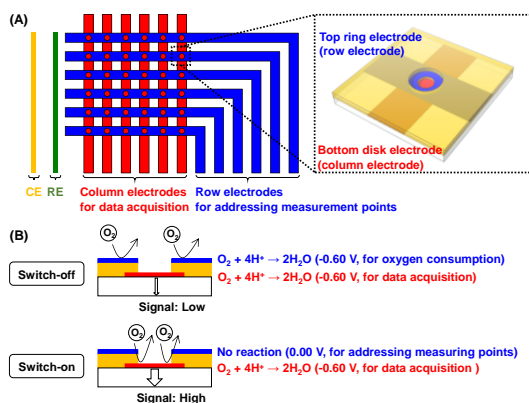


図 5 溶存酸素検出のための分子電気化学スイッチング素子の概要。詳細は発表論文 9 に記載。Reproduced with permission from Elsevier.

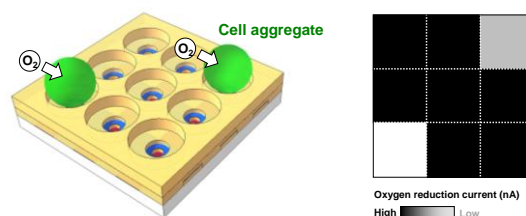


図 6 細胞の呼吸活性の計測と得られる電気化学イメージの概要。詳細は発表論文 9 に記載。Reproduced with permission from Elsevier.

この分子電気化学スイッチング素子だけでなく、CMOS 型電気化学イメージングデバイスの開発も同時に行い、マイクロ・ナノ電気化学分析と組み合わせた新しい電気化学イメージング法を開発した。これにより、細胞機能計測を含む様々なバイオ計測が実現された。

また、これらの研究成果を含む 2 報の review を報告した (発表論文 3、発表論文 4)。

今後は、細胞機能計測だけでなく、電気化学デバイスを細胞培養プラットフォームへの展開を検討している。これにより、細胞計測と細胞刺激を同時に可能とするスマート培養シャーレへの展開が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- (1) [Kosuke Ino](#), Takehiro Onodera, Yusuke Kanno, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Tomokazu Matsue, Hitoshi Shiku, Electrochemicolor imaging of endogenous alkaline phosphatase and respiratory activities of mesenchymal stem cell aggregates in early-stage osteodifferentiation, *Electrochimica Acta*, 査読有, 268, 2018, 554-561, DOI:10.1016/j.electacta.2018.02.094
- (2) Terauchi Mayuko, [Kosuke Ino](#), Yusuke Kanno, Shunsuke Imai, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Micropatterning of Nafion membranes on an electrode array using photolithographic and lift-off techniques for selective electrochemical detection and signal accumulation, *Chemistry Letters*, 査読有, 47(2), 2018, 204-206, DOI:10.1246/cl.171031
- (3) [Kosuke Ino](#), Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Bioelectrochemical applications of microelectrode arrays in cell analysis and engineering, *Current Opinion in Electrochemistry*, 査読有, 5, 2017, 146-151, DOI:10.1016/j.coelec.2017.08.004
- (4) [Kosuke Ino](#), Mustafa Sen, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Micro/nanoelectrochemical probe and chip devices for evaluation of

- three-dimensional cultured cells. Analyst, 査読有, 142, 2017, 4343-4354, DOI:10.1039/C7AN01442B
- (5) Yusuke Kanno, Kosuke Ino, Hiroya Abe, Chika Sakamoto, Takehiro Onodera, Kumi Y Inoue, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Masahki Matsudaira, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemicolor imaging using an LSI-Based device for multiplexed cell assays, Analytical Chemistry, 査読有, 89(23), 2017, 12778-12786, DOI:10.1021/acs.analchem.7b03042
- (6) Kaoru Hiramoto, Masahiro Yasumi, Hiroshi Ushio, Atsushi Shunori, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Development of oxygen consumption analysis with an on-chip electrochemical device and simulation, Analytical Chemistry, 査読有, 89(19), 2017, 10303-10310, DOI:10.1021/acs.analchem.7b02074
- (7) Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Kumi Y. Inoue, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Masahki Matsudaira, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical motion tracking of microorganisms using a large-scale integration (LSI)-based amperometric device, Angewandte Chemie International Edition, 査読有, 56(24), 2017, 6818-6822, DOI:10.1002/anie.201701541
- (8) Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Yuta Yamada, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Binary-number-based digital electrochemical detection using a single working electrode with multiple sensors, Electrochemistry Communications, 査読有, 77, 2017, 76-80, DOI:10.1016/j.elecom.2017.02.016
- (9) Kosuke Ino, Yuta Yamada, Yusuke Kanno, Shunsuke Imai, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Molecular electrochemical switching element based on diffusive molecular competition for multipoint electrochemical detection of respiration activity of cell aggregates, Sensors and Actuators B: Chemical, 査読有, 234, 2016, 201-208, DOI:10.1016/j.snb.2016.04.160
- (10) Hiroya Abe, Yusuke Kanno, Kosuke Ino, Kumi Y. Inoue, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Masahki Matsudaira, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical imaging for single-cell analysis of cell adhesion using a collagen-coated large-scale integration (LSI)-based amperometric device, Electrochemistry, 査読有, 84(5), 2016, 364-367, DOI:10.5796/electrochemistry.84.364
- (11) Yusuke Kanno, Kosuke Ino, Chika Sakamoto, Kumi Y. Inoue, Masahki Matsudaira, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Tomohiro Ishikawa, Hiroya Abe, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Potentiometric bioimaging with a large-scale integration (LSI)-based electrochemical device for detection of enzyme activity, Biosensors and Bioelectronics, 査読有, 77, 2016, 709-714, DOI:10.1016/j.bios.2015.10.021
- (12) Yusuke Kanno, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Local redox cycling-based electrochemical chip device with nanocavities and microwells for multi-electrochemical detection of alkaline phosphatase activity in embryoid bodies from embryonic stem cells, Lab on a Chip, 査読有, 15, 2015, 4404-4414, DOI:10.1039/c5lc01016k
- (13) Hiroya Abe, Kosuke Ino, Chen-Zhong Li, Yusuke Kanno, Kumi Y. Inoue, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Masahki Matsudaira, Yasufumi Takahashi, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical imaging of dopamine release from three-dimensional-cultured PC12 cells using large-scale integration-based amperometric sensors, Analytical Chemistry, 査読有, 87(12), 2015, 6364-6370, DOI:10.1021/acs.analchem.5b01307
- (14) Kosuke Ino, Microchemistry- and MEMS-based integrated electrochemical devices for bioassay applications, Electrochemistry, 83(9), 2015, 688-694, DOI:https://doi.org/10.5796/electrochemistry.83.688

[学会発表] (計 33 件)

- (1) Kosuke Ino, Integrated electrode array device for cell analysis、日本化学会第 98 春季年会 (アジア国際シンポジウム)、船橋、2018 年 3 月 20 - 23 日、口頭発表、国際会議、依頼講演
- (2) 伊野浩介、集積化した電気化学センサデバイスによるバイオ計測、H29 年度 第 3 回 信州 MEMS 研究会、長野、2017 年 12 月 8 日、口頭発表、招待講演
- (3) 伊野浩介、3 次元培養細胞の評価に向けた電気化学デバイスの開発、第 5 回細胞

- 凝集研究会、倉敷、2017年11月17日、口頭発表、招待講演
- (4) Kosuke Ino, LSI-based electrochemical device for evaluation of respiratory activity of three-dimensional cultured cells, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), Savannah (USA), October 22, 2017, ポスター発表、国際会議
- (5) 伊野浩介、末永智一、珠玖仁、チップデバイスへの多数の電気化学センサの組み込みに関する戦略、バイオ・マイクロシステム研究会、桐生、2017年10月4日、ポスター発表
- (6) Kosuke Ino, Tomokazu Matsue, Hitoshi Shiku, Electrode array devices for evaluation of three-dimensional cultured cells, The International Workshop: New Electroanalytical Techniques and Their Emerging Applications, Xi'an (China), September 24-26, 2017, 口頭発表、国際会議、招待講演
- (7) 伊野浩介、菅野佑介、小野寺岳大、須田篤史、國方亮太、末永智一、珠玖仁、電気化学カラーイメージングによる細胞呼吸活性、分泌活性、酵素活性評価、第11回バイオ関連化学シンポジウム、東京、2017年9月7-9日、口頭発表
- (8) Kosuke Ino, Integrated electrochemical devices based on micro/nano-chemistry for bioassays, 68th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Providence (USA), August 27 - September 1, 2017, 口頭発表、国際会議、Award Lecture
- (9) Kosuke Ino, Mayuko Terauchi, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Tomokazu Matsue, Hitoshi Shiku, Hydrogel fabrication based on electrodeposition using electrochemical devices, 68th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Providence (USA), August 27 - September 1, 2017, ポスター発表、国際会議
- (10) 伊野浩介、マイクロ・ナノ電気化学デバイスによる細胞活性イメージング、平成29年度第1回研究会(マルチモーダルバイオイメージセンサ研究会)、名古屋、2017年5月25日、口頭発表、招待講演
- (11) Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemicolor imaging for cell analysis, 日本化学会第97春季年会(2017), 横浜, March 16 - 17, 2017, 口頭発表
- (12) Kosuke Ino, Micro/nano electrochemical device for bioassays, 若い世代の特別講演会, 日本化学会第97春季年会(2017), 横浜, March 16 - 17, 2017, 口頭発表
- (13) 伊野浩介、バイオ LSI を用いたバイオ計測、マイクロシステム融合研究開発センターシンポジウム 文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム マイクロシステム融合研究開発拠点成果最終報告会、仙台、2017年3月13日、口頭発表
- (14) Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Multi-electrode array device for electrochemical imaging of cell activity, Pittcon 2017, Chicago (USA), March 5 - 9, 2017, 口頭発表、国際会議
- (15) 伊野浩介、バイオイメージングに向けた電気化学デバイスの開発、第3回学産交流ポスターセッション「エレクトロニクスの未来を支える新規素材・技術・プロセス」、東京、2016年12月14日、ポスター発表
- (16) Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2016), Dublin (Ireland), October 9 - 13, 2016, ポスター発表、国際会議
- (17) 伊野浩介、横川裕紀、珠玖仁、末永智一、アルギン酸カルシウム犠牲層を用いたゼラチンハイドロゲルの3次元構築、第68回日本生物工学会大会、富山、2016年9月28 - 30日、ポスター発表
- (18) Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Integrated electrochemical imaging device for cell analysis, 第3回アジア分析科学シンポジウム、北海道、2016年9月15日、口頭発表、国際会議、依頼講演
- (19) Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Kumi Y. Inoue, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Masahki Matsudaira, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Colorization of electrochemical imaging for cell analysis using a large-scale integration (LSI) device, 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, The Hague (Netherlands), August 21 - 26, 2016, 口頭発表、国際会議
- (20) Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Molecular electrochemical switching with nano- and microstructures, 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, The Hague (Netherlands), August 21 - 26, 2016, ポスター発表、国際会議

- (21) 伊野浩介、マイクロ・ナノ電気化学に基づくバイオイメージングデバイス、2016年度第1回界面ナノ科学研究会、新潟、2016年7月4-5日、口頭発表
- (22) Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical imaging for respiration activity and dopamine release of spheroids using a color amperometric device, 8th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2016), Hong Kong, May 30 - June 1, 2016, 口頭発表, 国際会議
- (23) 伊野浩介、珠玖仁、末永智一、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、バイオ・マイクロシステム研究会、東京、2016年4月27日、口頭発表
- (24) 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、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、日本化学会第96春季年会(2016)、京都、2016年3月24-27日、口頭発表
- (25) 伊野浩介、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、日本化学会第96春季年会(2016)、京都、2016年3月24-27日、口頭発表、依頼講演
- (26) Kosuke Ino, Yuta Yamada, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Molecular diffusion-based switching system using microelectrode array, Pacifichem 2015, Hawaii (USA), December 15 - 20, 2015, 口頭発表, 国際会議
- (27) Kosuke Ino, Yuta Yamada, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical imaging using molecular consumption-based switching system for evaluation of respiration activity of cell aggregates, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2015), Gyeongju (Korea), October 25 - 29, 2015, ポスター発表, 国際会議
- (28) 伊野浩介、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、横浜、2015年10月14日、受賞講演
- (29) 伊野浩介、山田祐大、菅野佑介、珠玖仁、末永智一、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、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、第18回バイオテクノロジー部会シンポジウム—、熊本、2015年9月10-12日、口頭発表

- (30) Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Kumi Y. Inoue, Masahki Matsudaira, Atsushi Suda, Ryota Kunikata, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Large-scale integration (LSI)-based electrochemical chip device for imaging of cell activity in three-dimensional cultured cells, RSC Tokyo International Conference 2015, Chiba, September 3 - 4, 2015, ポスター発表, 国際会議
- (31) 伊野浩介、マイクロ・ナノ化学を利用した電気化学バイオ分析、平成27年度日本分析化学会東北支部若手交流会、福島、2015年7月17-18日、口頭発表、招待講演
- (32) Kosuke Ino, Yuta Yamada, Yusuke Kanno, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical bioimaging using a diffusion control-based electrode array device, ISMM2015, Kyoto, June 8 - 10, 2015, 口頭発表
- (33) 伊野浩介、山田祐大、菅野佑介、珠玖仁、末永智一、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、第75回分析化学討論会、山梨、2015年5月23-24日、口頭発表

#### 〔産業財産権〕

##### ○出願状況(計2件)

名称：電気化学イメージング方法、電気化学測定装置及びトランスデューサ

発明者：伊野浩介、菅野佑介、末永智一、井上久美、國方亮太、林泰之、須田篤史

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2016-101043

出願年月日：2016年5月20日

国内外の別：国内

名称：ハイドロゲルの電気化学的な作製方法、細胞がパターンニングされたハイドロゲルの作製方法、ハイドロゲル作製装置及びトランスデューサ

発明者：伊野浩介、末永智一、珠玖仁、寺内万由子、平典子、國方亮太、須田篤史

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2017-049777

出願年月日：2017年3月15日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊野 浩介 (INO, Kosuke)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00509739