

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02280

研究課題名(和文) マルチスケール化を実現するハイブリッド電気化学バイオイメージングシステム

研究課題名(英文) Hybrid electrochemical bioimaging with multiscale

研究代表者

末永 智一 (MATSUE, Tomokazu)

東北大学・環境科学研究科・教授

研究者番号：70173797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞機能の可視化は、細胞工学や移植医療において重要である。低侵襲的に細胞活性を計測できる手法として、電極アレイを用いた電気化学イメージングが開発されている。例えば、細胞分泌物や酵素活性、呼吸活性を電気化学シグナルに変換して、リアルタイム計測できる。しかしながら、これまでの報告は同時に1種類のみ物質が可視化されるだけであった。また、得られる電気化学イメージは低解像度であった。そこで本研究では、複数の物質のリアルタイムな電気化学イメージング(シグナルのマルチスケール化)と、局所領域の高解像度イメージ取得(空間分解能のマルチスケール化)が可能なマルチスケール電気化学イメージングの概念を創成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

このようなマルチスケール化された電気化学イメージングの概念・システムはこれまでに報告されていなかった。したがって、本研究は新規性・独自性が高く、その学術的意義は大きい。創成した概念・システムは、バイオ分野だけでなく、電池や触媒評価、界面解析などへの応用展開が期待でき、様々な領域の基礎、応用、技術開発の進展に貢献できる。また、近年大きな注目を集めているOrgans on a Chip(培養細胞を用いてチップデバイス上に生体組織を再現したもの)に展開することで、実験動物を使用しない創薬開発が可能である。したがって、開発したシステムの今後のバイオチップ産業への貢献が期待でき、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：It is important to visualize cell functions for evaluation of tissues and organs in regenerative medicine, and tissue engineering. As a low-invasive method, electrochemical imaging has been proposed using several electrochemical devices such as electrode arrays. The method can convert cell functions, such as chemical secretion and consumption, enzyme activity, and respiratory activity, to electrochemical signals for evaluating them. In conventional electrochemical imaging using electrode arrays, only single targets are electrochemically monitored in real time. In addition, the spatial resolution is low. To improve this detection system, we have proposed multi-scaled electrochemical imaging system showing multiple scales of electrochemical signal and spatial resolution.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオセンサー 電気化学計測 チップデバイス プローブ顕微鏡 バイオMEMS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞機能の可視化は、細胞工学や移植医療において重要である。そのような可視化の方法として、蛍光イメージングなどの光学的手法が開発されているが、低侵襲的に細胞活性を計測できる電気化学イメージングも研究されている。例えば、研究代表者らは多数の電気化学センサを組み込むための計測システムの開発や集積化回路を組み込んだデバイスを開発しており、これにより、細胞の分泌物や酵素活性、呼吸活性を電流値に変換することで、細胞機能の可視化に成功している。しかしながら、これまでの報告は同時に1種類の物質(正確には、ある特定の電位に反応する物質)のみが可視化されるだけであった。また、電気化学デバイス上に配置できるセンサの密度には限界があるため、nmスケールの空間分解能を持つ電気化学イメージングは不可能である。そこで、これらの問題点を解決するために、代表者らは電気化学イメージングのマルチスケール化という新しい概念を生み出し、複数物質の同時計測、電気化学イメージングの分解能の向上の実現を目指した。その際、代表者らが開発したナノ走査型電気化学顕微鏡(NanoSECM)を組み込んだハイブリッドシステムを検討した。

2. 研究の目的

本研究では、マルチスケール化という新しい概念に基づく電気化学イメージングシステムを開発して、複雑で緻密な細胞機能の可視化を実現する。マルチスケール化とは、シグナルと空間分解能のそれぞれに関する複数のスケールを電気化学イメージに

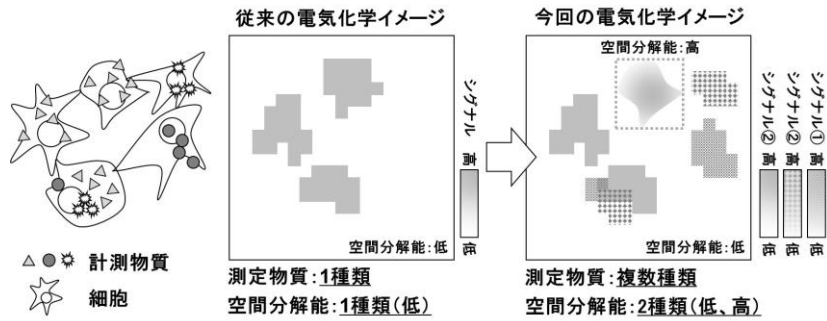


図1 従来と本研究の細胞の電気化学イメージの比較。

組み込むことである。具体的には、従来の1種類の物質のみ計測ではなく、同時に複数の物質を計測できる電気化学デバイスを開発して(図1)、複数のシグナルに関するスケールを持つ電気化学イメージを取得する。さらに、電気化学デバイスに走査型電気化学顕微鏡を組み込んだシステムを開発することで、異なる空間分解能を有する電気化学イメージを取得し、イメージの一部の高解像度化を実現する(図1)。このように、複数の物質のリアルタイム電気化学イメージングと局所高解像度イメージングが同時に可能とするハイブリッドシステムを構築し、革新的な電気化学マルチスケールバイオイメージングを完成させる。

3. 研究の方法

これまでに研究代表者らが開発してきた集積型電極アレイデバイス(図2)を使用した。この計測システムでは、個々のセンサ電極に計測モードを選べるようになっている。詳細な計測スキームは学術雑誌(Anal. Chem., 89, 12778-12786, 2017)にて報告しているが、個々のセンサに異なる電位を印加することで、複数物質の同時の電気化学イメージング(シグナルスケールのマルチスケール化)を実現した。また、開発したハイブリッドシステムを用いて、幹細胞の呼吸活性や細胞分化の同時計測を行った。また、電気化学デバイスと走査型電気化学顕微鏡を用いて細胞呼吸活性と形状計測を行った(空間分解能のマルチスケール化)。また、これらに関連した周辺技術の開発を行った。

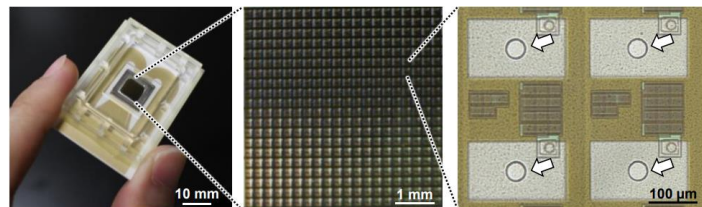


図2 集積型電極アレイデバイス(Anal. Sci. 35, 39-43, 2019)から引用。

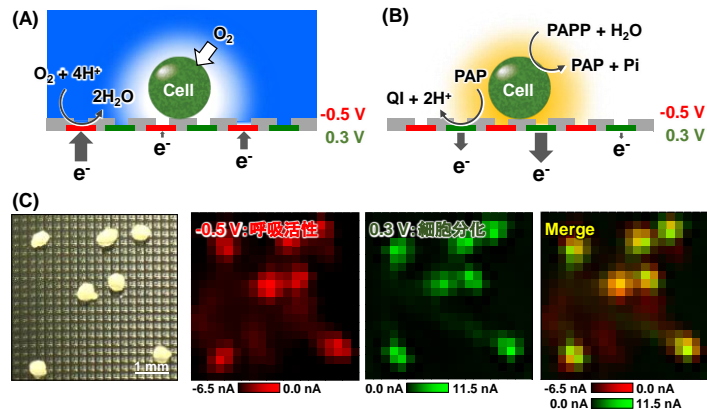


図3 幹細胞の塊の呼吸活性と分化活性の同時の電気化学イメージング。左から、光学イメージ、呼吸活性、酵素活性、重ね合わせたイメージ。Modified and Reproduced with permission from (Anal. Chem., 89, 12778-12786, 2017), American Chemical Society ©2017。

4. 研究成果

図3で示すように、世界で初めて同時かつリアルタイムで複数物質の電気化学イメージングに成功した。この例は、幹細胞の活

性の呼吸活性と分化活性を見事に可視化しており、再生医療などへの応用が期待できる。この手法に関する特許も取得した（特許第 6344775 号）。また、神経様細胞（*Anal. Chem.*, 89, 12778-12786, 2017）、間葉系幹細胞（*Electrochim. Acta*, 268, 554-561, 2018）、ガン細胞（*ACS Sens.* 2019, DOI: 10.1021/acssensors.9b00344）など様々な細胞計測への応用に成功した。電気化学デバイスとプローブデバイスの融合による研究成果は現在、論文執筆を検討中である。

これら以外にも、関連した周辺技術の開発を行った。例えば、微小生物の動態解析に向けた電気化学イメージング法を開発した（*Angew. Chem. Int. Edit.*, 56, 6818-6822, 2017）。電気化学デバイスを用いたハイドロゲル合成を考案して（*Biofabrication*, 11, 035018, 2019; *Chem. Commun.*, 55, 5335-5338, 2019）、細胞培養やバイオセンサーに応用した。また、電気化学セル顕微鏡（SECCM）を用いたリチウム電材材料評価を報告した（図 4）。SECCM を用いたグラフェンのエッジ構造における水素発生可視化にも成功しており（*Adv. Sci.*, 1900119, 2019）、SECCM は材料評価ツールとして大きな期待が持てる。これら以外にも主な論文発表で述べるように様々な手技や応用を報告しており、マルチスケール化した電気化学イメージングへの貢献が期待できる。

また、得られた研究成果は、学術雑誌（査読有）にて 38 報を報告した。それらの 1 部は、雑誌のカバーを飾っており（図 5）、本研究の注目度の高さが窺える。

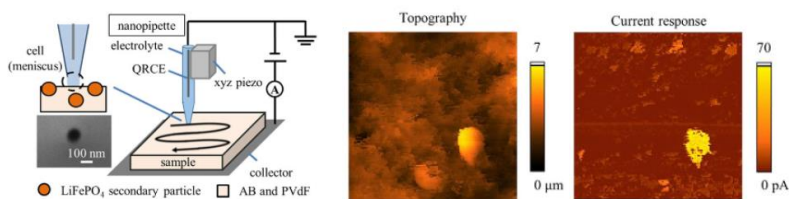


図 4 SECCM を用いたリチウム電池材料の評価 (*Surf. Interface Anal.*, 51, 27-30, 2019)。Reproduced with permission from Willey-VCH。



図 5 本研究成果を紹介している雑誌のカバー。Reproduced with permission from Willey-VCH, The Royal Society of Chemistry, and MYU。

このようなマルチスケールでの電気化学イメージングは、バイオ分野だけでなく、電池や触媒評価、界面解析などへの応用展開が可能であり、様々な領域の基礎、応用、技術開発への貢献が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 38 件）

以下に代表的な雑誌論文を示す。

1. Ino K., Onodera T, Fukuda MT, Nashimoto Y, Shiku H. Combination of double-mediator system with large-scale integration-based amperometric devices for detecting NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity of cancer cell aggregates. *ACS Sens.* 査読有, 2019
DOI: 10.1021/acssensors.9b00344
2. Taira N, Ino K., Ida H, Nashimoto Y, Shiku H. Electrodeposition-based rapid bioprinting of 3D-designed hydrogels with a pin art device. *Biofabrication*, 査読有, 11, 2019, 035018
DOI:10.1088/1758-5090/ab166e
3. Kumatani A., Takahashi Y, Miura C, Ida H, Inomata H, Shiku H, Munakata H, Kanamura K, Matsue T. Scanning electrochemical cell microscopy for visualization and local electrochemical activities of lithium-ion (de) intercalation process in lithium-ion batteries electrodes. *Surf. Interface Anal.*, 査読有, 51, 2019, 27-30
DOI:10.1002/sia.6538
4. Kumatani A., Miura C, Kuramochi H, Ohto T, Wakisaka M, Nagata Y, Ida H, Takahashi Y, Hu K, Jeong S, Fujita Ji, Matsue T., Ito Y. Chemical dopants on edge of holey graphene accelerate electrochemical hydrogen evolution reaction. *Adv. Sci.*, 査読有, 2019, 1900119
DOI:10.1002/advs.201900119
5. Ino K., Onodera T, Nashimoto Y, Shiku H. Differential electrochemicolor imaging using LSI-based device for simultaneous detection of multiple analytes. *Sens. Mater.*, 査読有, 31, 2019, 13-22

- DOI:10.18494/sam.2019.2035
- Taira N, Ino K, Kumagai T, Nashimoto Y, Shiku H. Electrochemical fabrication of fibrin gels via cascade reaction for cell culture. *Chem. Commun.*, 査読有, 55, 2019, 5335-5338
DOI:10.1039/c9cc01576k
 - Ino K, Onodera T, Kanno Y, Suda A, Kunikata R, Matsue T, Shiku H. Electrochemicolor imaging of endogenous alkaline phosphatase and respiratory activities of mesenchymal stem cell aggregates in early-stage osteodifferentiation. *Electrochim. Acta*, 査読有, 268, 2018, 554-561
DOI:10.1016/j.electacta.2018.02.094
 - Inoue KY, Ikegawa M, Ito-Sasaki T, Takano S, Shiku H, Matsue T. Simultaneous multiplex potentiostatic electroanalysis with liquid-junction-removed reference electrode system using a closed bipolar electrode. *ChemElectroChem*, 査読有, 5, 2018, 2167-2170
DOI:10.1002/celec.201800536
 - Ino K, Terauchi M, Gakumasawa M, Taira N, Suda A, Kunikata R, Matsue T, Shiku H. Local hydrogel fabrication based on electrodeposition with a large-scale integration (LSI)-based amperometric device. *Sens. Actuator B-Chem.*, 査読有, 277, 2018, 95-101
DOI:10.1016/j.snb.2018.08.135
 - Taira N, Ino K, Robert J, Shiku H. Electrochemical printing of calcium alginate/gelatin hydrogel. *Electrochim. Acta*, 査読有, 281, 2018, 429-436
DOI:10.1016/j.electacta.2018.05.124
 - Ino K, Nashimoto Y, Taira N, Ramon Azcon J, Shiku H. Intracellular electrochemical sensing. *Electroanalysis*, 査読有, 30, 2018, 2195-2209
DOI:10.1002/elan.201800410
 - Ino K, Yokokawa Y, Taira N, Suda A, Kunikata R, Nashimoto Y, Matsue T, Shiku H. Electrochemical imaging of cell activity in hydrogels embedded in grid-shaped polycaprolactone scaffolds using a large-scale integration-based amperometric device. *Anal. Sci.*, 査読有, 35, 2019, 39-43
DOI:10.2116/analsci.18SDP01
 - Abe H, Iwama T, Yabu H, Ino K, Inoue KY, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, Matsue T. Simultaneous and selective imaging of dopamine and glutamate using an enzyme-modified large-scale integration (LSI)-based amperometric electrochemical device. *Electroanalysis*, 査読有, 30, 2018, 2841-2846
DOI:10.1002/elan.201800386
 - Ino K, Matsumoto T, Taira N, Kumagai T, Nashimoto Y, Shiku H. Hydrogel electrodeposition based on bipolar electrochemistry. *Lab Chip*, 査読有, 18, 2018, 2425-2432
DOI:10.1039/c8lc00465j
 - Iwama T, Inoue KY, Abe H, Matsue T. Chemical imaging using a closed bipolar electrode array. *Chem. Lett.*, 査読有, 47, 2018, 843-845
DOI:10.1246/cl.180303
 - Fakhruddin SM, Inoue KY, Tsuga R, Matsue T. Closed bipolar electrode system for a liquid-junction-free reference electrode integrated in an amperometric probe sensor. *Electrochem. Commun.*, 査読有, 93, 2018, 62-65
DOI:10.1016/j.elecom.2018.06.006
 - Sun Y, Li F, Shen Z, Li Y, Lang J, Li W, Gao G, Ding S, Xiao C, Matsue T. NiCoO₂@CMK-3 composite with nanosheets-mesoporous structure as an efficient oxygen reduction catalyst. *Electrochim. Acta*, 査読有, 294, 2019, 38-45
DOI:10.1016/j.electacta.2018.10.060
 - Ino K, Kanno Y, Yamada Y, Shiku H, Matsue T. Binary-number-based digital electrochemical detection using a single working electrode with multiple sensors. *Electrochem. Commun.*, 査読有, 77, 2017, 76-80
DOI:10.1016/j.elecom.2017.02.016
 - Ino K, Kanno Y, Inoue KY, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, Shiku H, Matsue T. Electrochemical motion tracking of microorganisms using a large-scale-integration-based amperometric device. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 査読有, 56, 2017, 6818-6822
DOI:10.1002/anie.201701541
 - Takahashi Y, Kumatani A, Shiku H, Matsue T. Scanning probe microscopy for nanoscale electrochemical imaging. *Anal. Chem.*, 査読有, 89, 2017, 342-357
DOI:10.1021/acs.analchem.6b04355
 - Ida H, Takahashi Y, Kumatani A, Shiku H, Matsue T. High speed scanning ion

- conductance microscopy for quantitative analysis of nanoscale dynamics of microvilli. Anal. Chem., 査読有, 89, 2017, 6016-6021
DOI:10.1021/acs.analchem.7b00584
22. Sun S, Inoue KY, Shiimoto S, Takano S, Ino K, Shiku H, Matsue T. Amperometric detection of apoptosis by using *p*-methoxyaniline-conjugated substrate for caspase-3. ChemElectroChem, 査読有, 4, 2017, 941-946
DOI:10.1002/celec.201600700
 23. Ino K, Shiku H, Matsue T. Bioelectrochemical applications of microelectrode arrays in cell analysis and engineering. Curr. Opin. Electrochem., 査読有, 5, 2017, 146-151
DOI:10.1016/j.coelec.2017.08.004
 24. Hiramoto K, Yasumi M, Ushio H, Shunori A, Ino K, Shiku H, Matsue T. Development of oxygen consumption analysis with an on-chip electrochemical device and simulation. Anal. Chem., 査読有, 89, 2017, 10303-10310
DOI:10.1021/acs.analchem.7b02074
 25. Ino K, Sen M, Shiku H, Matsue T. Micro/nano-electrochemical probe and chip devices for evaluation of three-dimensional cultured cells. Analyst, 査読有, 142, 2017, 4343-4354
DOI:10.1039/c7an01442b
 26. Kanno Y, Ino K, Abe H, Sakamoto C, Onodera T, Inoue KY, Suda A, Kunikata R, Matsudaira M, Shiku H, Matsue T. Electrochemicolor imaging using an LSI-based device for multiplexed cell assays. Anal. Chem., 査読有, 89, 2017, 12778-12786
DOI:10.1021/acs.analchem.7b03042
 27. Terauchi M, Ino K, Kanno Y, Imai S, Shiku H, Matsue T. Micropatterning of nafion membranes on an electrode array using photolithographic and lift-off techniques for selective electrochemical detection and signal accumulation. Chem. Lett., 査読有, 47, 2018, 204-206
DOI:10.1246/cl.171031

〔学会発表〕（計 293 件）

以下に代表的な依頼講演、招待講演、基調講演を示す。

1. Matsue T. Recent progress of nanoscale electrochemical imaging. MicroTAS2018（国際学会）, 2018
2. Matsue T. Nanoscale electrochemical imaging for characterization of functional. 22nd Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry（国際学会）, 2018
3. 末永智一、ナノ電気化学セル顕微鏡(NanoSECCM)を用いた局所電極反応の探索、2016年真空・表面科学合同講演会、第36回表面科学学術講演会、2016
4. Matsue T. Nanoscale electrochemical imaging of bio and energy materials. EIC2017（国際学会）, 2017
5. 末永智一、電気化学バイオイメージング：原理と応用、生物化学的測定研究会、2017
6. Matsue T. Recent progress of electrochemical imaging, The International Workshop: New Electroanalytical Techniques and Their Emerging Applications (IWNET 2017)（国際学会）, 2017
7. Matsue T. Recent trend in electrochemical imaging. 21th Symposium of Association for Chemical Sensors in Taiwan（国際学会）, 2016
8. 末永智一、電気化学イメージング：何か見え、何が分かるか？、埼玉工業大学若手研究フォーラム、2016
9. 末永智一、電気化学イメージング 局所領域の電極反応を観る、第84回 武井記念講演会、2016

〔図書〕（計 0 件）

なし。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 4 件）

以下に代表的な出願状況を示す。

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：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 2017-049777

出願年：2017

国内外の別：国内

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：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 2016-101043
出願年：2016
国内外の別：国内

○取得状況（計 4 件）
以下に代表的な出願状況を示す。

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：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：特許第 6380962 号
取得年：2018
国内外の別：国内

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：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：特許第 6344775 号
取得年：2018
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊野 浩介
ローマ字氏名：(INO, kosuke)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院工学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00509739

研究分担者氏名：井上 久美
ローマ字氏名：(INOUE, kumi Y.)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院環境科学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：20597249

研究分担者氏名：熊谷 明哉
ローマ字氏名：(KUMATANI, akichika)
所属研究機関名：東北大学
部局名：材料科学高等研究所
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50568433

研究分担者氏名：梨本 裕司
ローマ字氏名：(NASHIMOTO, Yuji)
所属研究機関名：東北大学
部局名：学際科学フロンティア研究所
職名：助教
研究者番号（8桁）：80757617

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。