

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22245011

研究課題名（和文） 新原理に基づく電気化学イメージングデバイスの開発

研究課題名（英文） Novel electrode array device for electrochemical imaging

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、新規原理に基づく新しい電気化学イメージングデバイスを開発した。この手法では、局所的にレドックスサイクルを誘導できるようなデバイス・システムを用いており、これまでに報告されていない新規手法である。我々は、この手法を local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) system と名付け、新規電気化学イメージング法として提案した。

この電極デバイスには、縦電極と横電極がそれぞれ  $n$  本ずつ配置されている。それぞれの電極に適切な電圧を印加する事で、目的の格子点のみにレドックスサイクルを誘導して、そのシグナルを読み取ることができる。つまり、各格子点を電化学測定点として用いる事ができるため、 $2n$  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む事ができる。本研究では、この原理に基づいたデバイスの作製を行い、様々なバイオアッセイに応用した。これにより、DNA やタンパク質、細胞評価などを高感度で迅速、網羅的に電気化学検出する事に成功した。

一連の研究により、新規の電気化学測定・イメージング法を開発する事に成功し、その有効性を確認した。開発したシステムは、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にも新しい展開を誘起する事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have proposed a novel method for electrochemical imaging using local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) devices and systems. In the device, two arrays of microelectrodes are orthogonally arranged to fabricate an  $n \times n$  array of crossing points (measurement points) with only  $2n$  bonding pads for external connection. The crossing points of the column and row electrodes can easily be addressed by setting the proper potentials at the column and row electrodes to induce local redox cycling at desired crossing points. Therefore, the crossing points can be used as individual electrochemical sensors. This addressable and multiple detection system successfully applied for the detection of enzyme activity, gene-expression analysis, cell differentiation analysis, DNA detection and dynamic analyses of droplets. The present LRC-EC system will be widely applicable for various bioimaging and biosensing.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2010年度 | 16,000,000 | 4,800,000  | 20,800,000 |
| 2011年度 | 10,700,000 | 3,210,000  | 13,910,000 |
| 2012年度 | 10,700,000 | 3,210,000  | 13,910,000 |
| 年度     |            |            |            |
| 年度     |            |            |            |
| 総計     | 37,400,000 | 11,220,000 | 48,620,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオセンサー

### 1. 研究開始当初の背景

細胞アレイやDNAマイクロアレイ、プロテインマイクロアレイを用いた生体分子の網羅的解析法は、既に多くの研究機関で汎用され、生体機能の解析に必要不可欠な方法となりつつある。このようなバイオチップの検出には主に光学的手法が用いられている。特に網羅的な検出には、光学的手法が用いられている。しかしながら、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いった問題を抱えている。

別の手法として、電気化学的手法が以前から提案されている。これまでに、同時に多数のサンプルの電気化学検出が行えるように、多数の電極が配置されたチップ型のデバイスが開発されている。しかしながら、測定機器と接続するためのコネクタパッドを含め電極面積が膨大になってしまうために、1枚のチップ内に多数の電気化学測定点を組み合わせることが困難であった。したがって、このような課題を解決できるようなデバイス・システムの開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

このような背景から、本研究では網羅的電気化学測定に向けた新規電気化学測定システム・デバイスの開発を行った。本研究の目的は、生体分子の包括的、網羅的検出を可能とする新しいバイオデバイス用の電気化学イメージングデバイスを開発する事である。

### 3. 研究の方法

これまでに多数の電極が配置されたチップ型のデバイスが開発されているが(図1)、本研究ではレドックスサイクルと呼ばれる電気化学測定法に注目し、新しい電気化学測定システムを開発した。レドックスサイクルとは、近接させた2枚の電極に適切な電圧を印可し、測定物をそれぞれの電極で酸化、還元を繰り返させてシグナルを増幅させる手法である(図2)。

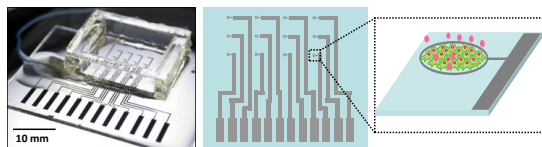


図1 細胞アッセイに向けた多点電極デバイス。

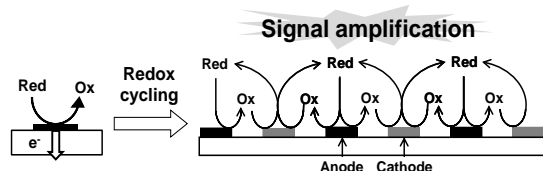


図2 レドックスサイクルの概要。

本研究では、このレドックスサイクルを局部的に誘導する事で、多くの電気化学測定点を1枚のチップ内に組み込む事ができる新しい電気化学測定デバイス・システムを開発した。このシステムに用いられるデバイスの概要を図3に示す。

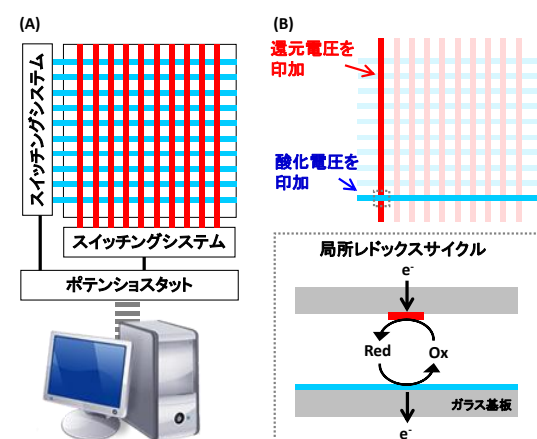


図3 LRC-EC システムの概要。(A) デバイス・システムの構成。(B) 基本測定原理。

このデバイスは、縦電極と横電極が三次元的に交差しており(図3A)、それぞれの電極に酸化電圧、還元電圧を印加する事で、目的の格子点のみにレドックスサイクルを誘導する事ができる(図3B)。したがって、このレドックスサイクルのシグナルを読み取る事で、各格子点を測定点として用いる事が可能である。つまり、従来法のように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組み合わせることができる。我々は、このシステムを local redox cycling electrochemical (LRC-EC) system と名付け、細胞アレイやDNAアレイ、プロテインアレイといった様々なバイオアッセイへの応用を行った。

また、本研究は基盤研究(S)「多機能ナノ電気化学顕微鏡システムの創生」の継続課題として行われており、上記の研究に加え、多機能電気化学顕微鏡の開発も行った。

### 4. 研究成果

本研究では、測定点にDNAやタンパク質(抗体)、細胞を固定化・捕捉する事で、バイオアッセイへの応用を検討した。また、デバイスのデザインを検討する事で、高感度化やセンサの高密度化、簡便化を兼ね備えたデバイスを開発した。

(1) DNA 検出

DNA を検出するための戦略として、DNA が負電荷を帯びている事に注目した。デバイスの各格子点に検出用 DNA を配置させて、目的の DNA を反応させると、ハイブリダイゼーションした部分で負電荷が多くなる。次に、負電荷を持つメディエーターをレドックスサイクルで測定すると、DNA がある部分でレドックスサイクルが阻害されるため (図 4)、電流値の減少値から DNA を検出できる。この原理で DNA を検出したところ、nM レベルで DNA の検出に成功した (図 5)。このように本デバイスを用いる事で、新規電気化学 DNA アレイを提案する事に成功した。

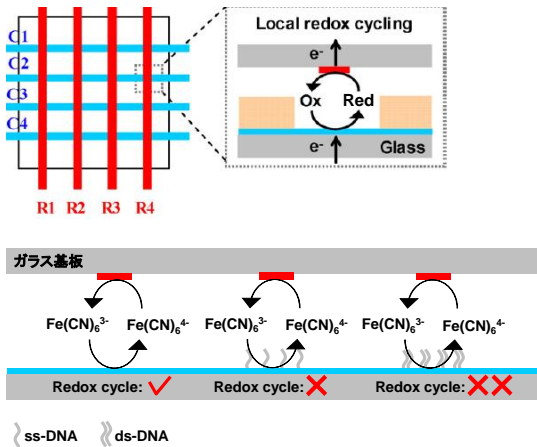


図 4 新規電気化学 DNA アレイの概要。レドックスメディエーターとして  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  を用いた。得られる電気化学シグナルの減少量から、DNA 検出が可能。

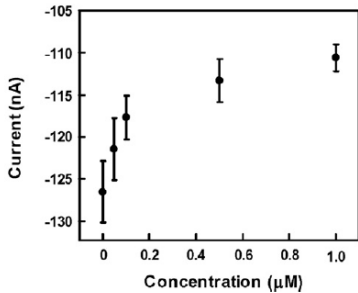


図 5 DNA の検量線。

(2) くし型電極を組み込んだ LRC-EC デバイス  
くし型電極を組み込んだデバイスを作製した。これにより、1 枚のチップデバイス上に全ての電極が配置できるため、デバイスの組み立て、サンプルの導入などが簡便化された。また、 $36 \text{ mm}^2$  に 1024 個の電気化学測定点を組み込む事に成功した (図 6)。

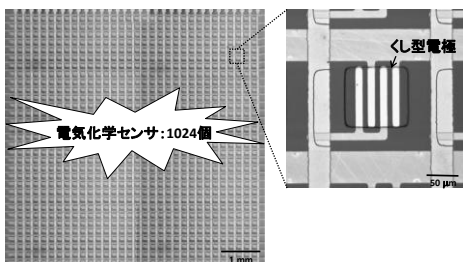


図 6 くし型電極を含む新規多点電極デバイス。縦電極と横電極が 32 本ずつあり、1024 個の電気化学測定点を形成している。

このデバイスは、比較的単純な配列電極デバイスでは世界最高レベルの電気化学測定点の数と密度を有するものであり、その成果は新聞等で紹介された。

(3) リアルタイム電気化学イメージング

リアルタイムな電気化学イメージングのデモンストレーションとして、微小液滴が変化する様子を電気化学的に観察した。その結果、微小液滴が蒸発していく過程を電気化学的にイメージングする事に成功した (図 7)。このように、LRC-EC デバイスは、リアルタイムな電気化学イメージングへの応用が期待できる。

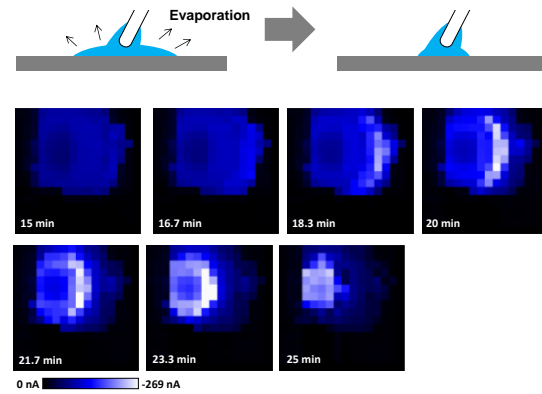


図 7 液滴蒸発の電気化学イメージング。液滴の中にはレドックスメディエーターがあり、蒸発により、濃縮され、また液滴のサイズが減少している。

(4) レポータージーンアッセイへの応用

細胞アレイを作製し、レポータージーンアッセイへの応用を行った (図 8)。このように、この LRC-EC デバイスは、網羅的な遺伝子解析、細胞を検出素子に用いた医療・環境測定デバイスへの応用が期待できる。

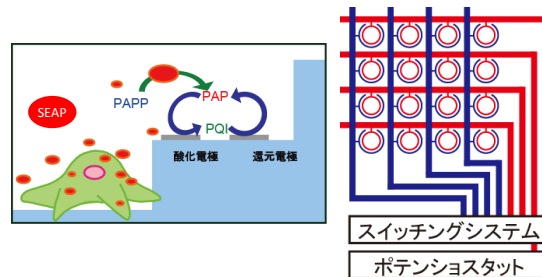


図 8 レポータージーンアッセイへの応用。細胞が生成した分泌型 ALP (SEAP) を網羅的に測定した。基質として *p*-アミノフェニルホスフェート (PAPP) を用いて、ALP による PAPP の加水分解で生成した *p*-アミノフェノール (PAP) の量を、PAP/*p*-キノ

イミン (PQI) レドックスサイクルにより、検出した。

### (5) 細胞の分化評価

胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) は、分化すると ALP 活性が変化する。本研究では細胞の ALP 活性を LRC-EC デバイスで測定した (図 9)。その結果、電流値から細胞分化を評価する事に成功した。LRC-EC デバイスを用いた移植医療に向けた細胞評価への応用が強く期待できる。

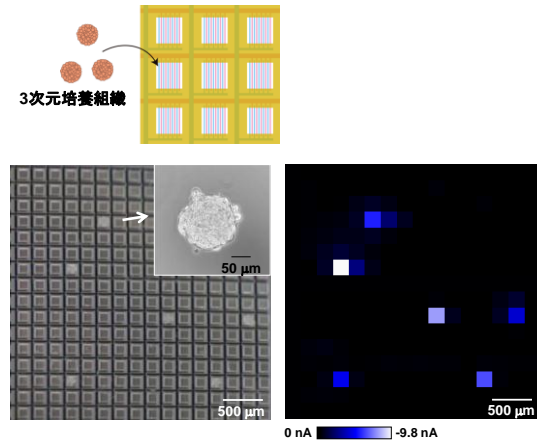


図 9 ES 細胞が持つ ALP 活性の電気化学イメージング。三次元的に培養した ES 細胞を測定点に捕捉して測定を行った。

### (6) 細胞分泌物の検出

細胞分泌物の検出に向けて、抗体を固定化した。また、微小ウェルを測定点に組み込み、この微小ウェル内で細胞分泌物を基板上に”転写”する事で、細胞からの分泌タンパク質の検出を行った (図 10)。

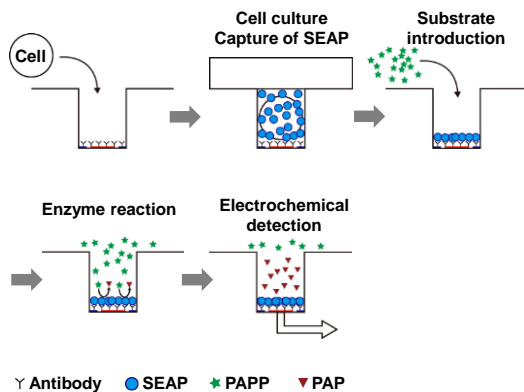


図 10 微小ウェルを用いた分泌タンパク質検出の戦略。

これにより、1 細胞からの分泌タンパク質の高感度な測定が可能になった (図 11)。この結果から、網羅的な 1 細胞解析といった基礎研究の分野への展開、タンパク質生産、細胞診断によるメディカルチェックに向けた

細胞解析への応用も期待できる。

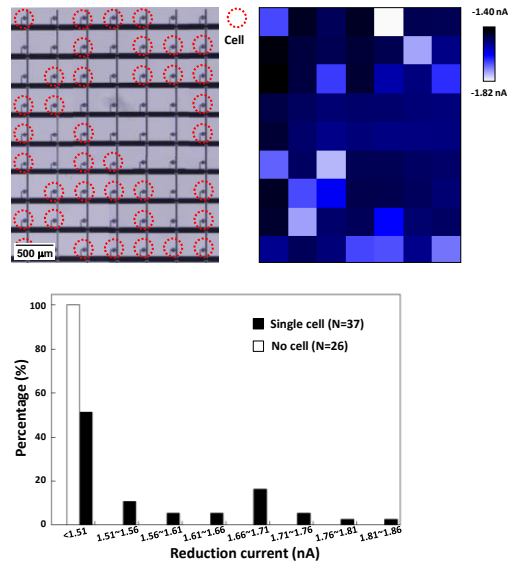


図 11 1 細胞が分泌したタンパク質の電気化学測定。

### (7) ナノ構造を有する LRC-EC デバイス

レドックスサイクルによるシグナル増幅は、電極間距離に大きく依存する。したがって、電極間距離を狭める事で、シグナルを飛躍的に増幅する事が可能である。そこで、犠牲層を用いたデバイス作製法を検討した。この手法を用いる事で、ナノメートルオーダーで電極を配置することに成功した。また、高効率なレドックスサイクルにより、電気化学シグナルを 100 倍以上に増幅させる事に成功した。この LRC-EC デバイスにより、超高感度な測定が期待できる。

このように、本研究により新規の電気化学測定・イメージング法を開発する事に成功した。今後、開発したシステムと従来汎用されている光学的手法を利用したシステムとの差別化、融合が行われ、新たなセンサ技術への確立につながると考えられる。開発したシステムは、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にも新しい展開を誘起する事が期待できる。

### (8) その他

本研究は基盤研究 (S) 「多機能ナノ電気化学顕微鏡システムの創生」の継続課題として行われており、上記の研究に加え、多機能電気化学顕微鏡の開発も行い、開発したプローブを用いて、デバイス評価などを行った。

また、電気化学測定における新しい基質の開発や電極アレイを用いた細胞チップ作製を通して、網羅的な細胞アッセイへの検討を行った。

### 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 30 件)

- ① Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Toshiharu Arai, Kumi Y. Inoue, Yasufumi Takahashi, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Novel electrochemical methodology for activity estimation of alkaline phosphatase based on solubility difference, *Analytical Chemistry*, 査読有, Vol. 84, No. 18, 2012, pp. 7593-7598 DOI:10.1021/ac301429n
- ② Mustafa Şen, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, 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 on a Chip*, 査読有, Vol. 12, No. 21, 2012, pp. 4328-4335 DOI:10.1039/C2LC40674H
- ③ Kosuke Ino, Yusuke Kanno, Taku Nishijo, Takehito Goto, Toshiharu Arai, Yasufumi Takahashi, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Electrochemical detection for dynamic analyses of a redox component in droplets using a local redox cycling-based electrochemical (LRC-EC) chip device, *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 48, No. 68, 2012, pp. 8505-8507 DOI:10.1039/C2CC34264B
- ④ Yasufumi Takahashi, Andrew I. Shevchuk, Pavel Novak, Babak Babakinejad, Julie Macpherson, Patrick R. Unwin, Hitoshi Shiku, Julia Gorelik, David Klenerman, Yuri E. Korchev, Tomokazu Matsue, Topographical and electrochemical nanoscale imaging of living cells using voltage switching mode scanning electrochemical microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, Vol. 109, No. 29, 2012, pp. 11540-11545 DOI:10.1073/pnas.1203570109
- ⑤ Kosuke Ino, Taku Nishijo, Toshiharu Arai, Yusuke Kanno, Yasufumi Takahashi, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Local redox cycling-based electrochemical chip device with deep microwells for evaluation of embryoid bodies, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, Vol. 51, No. 27, 2012, pp. 6648-6652 DOI:10.1002/anie.201201602
- ⑥ Yasufumi Takahashi, Andrew I. Shevchuk, Pavel Novak, Yanjun Zhang, Neil Ebejer, Julie V. Macpherson, Patrick R. Unwin, Andrew J. Pollard, Debdulal Roy, Charles A. Clifford, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, David Klenerman, Yuri E. Korchev, Multifunctional nanoprobes for nanoscale chemical imaging and localized chemical delivery at surfaces and interfaces, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, 2011, 50, pp. 9638-9642 DOI:10.1002/anie.201102796
- ⑦ Kosuke Ino, Wataru Saito, Masahiro Koide, Taizo Umemura, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Addressable electrode array device with IDA electrodes for high-throughput detection, *Lab on a Chip*, 査読有, Vol. 11, No. 3, 2011, pp. 385-388 DOI:10.1039/C0LC00437E
- ⑧ Yasufumi Takahashi, Andrew I. Shevchuk, Pavel Novak, Yumi Murakami, Hitoshi Shiku, Yuri E. Korchev, Tomokazu Matsue, Simultaneous non-contact topography and electrochemical imaging by SECM/SICM featuring ion current feedback regulation, *Journal of American Chemical Society*, 査読有, 2010, Vol. 132, No. 29, pp. 10118-10126 DOI:10.1021/ja1029478

[学会発表] (計 160 件)

- ① 末永智一, 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キング, 日本化学会第 93 春季年会 (招待講演), 2013 年 3 月 22-25 日, 草津
- ② 末永智一, 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キング, 第 32 回表面科学会学術講演会 (招待講演), 2012 年 11 月 22 日, 仙台
- ③ Tomokazu Matsue, Bioelectrochemistry: fundamentals and applications, ISE 62nd Annual Meeting (招待講演), 2011 年 9 月 11-16 日, Niigata
- ④ Tomokazu Matsue, Bioelectrochemical imaging with micro/nanoelectrode systems, IEEE International NanoElectronics Conference 2011 (招待講演), 2011 年 6 月 21-24 日, Taipei, Taiwan
- ⑤ Tomokazu Matsue, Bioimaging with integrated electrochemical devices, XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics 2011 (招待講演), 2011



年 5 月 8-12 日, Cracow, Poland

〔図書〕(計 2 件)

- ① 末永智一, 高橋康史, 伊野浩介, 珠玖仁, 走査型電気化学顕微鏡による酵素イメージング, 酵素活用ハンドブック, エヌ・ティー・エス, 2010, Vol. 4, pp. 112-116
- ② 珠玖仁, 伊野浩介, 末永智一, 単一細胞由来 mRNA 回収マイクロプローブの開発, “シングルセル解析の最前線 第 4 章 mRNA をターゲットとしたデジタル精密計測技術の開発”, シーエムシー出版, 2010, Vol. 3, pp. 223-228

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 8 件)

- ① 名称: Electrode device for an electrochemical sensor chip  
発明者: Atsushi Suda, Tatsuo Kimura, Ryota Kunikata, Tomokazu Matsue  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 13/311, 237 (出願番号)  
出願年月日: 2011 年 12 月 5 日  
国内外の別: 国外
- ② 名称: Electrode device for an electrochemical sensor chip  
発明者: Atsushi Suda, Tatsuo Kimura, Ryota Kunikata, Kumi Inoue, Tomokazu Matsue  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 13/311, 270 (出願番号)  
出願年月日: 2011 年 12 月 5 日  
国内外の別: 国外
- ③ 名称: Electrode device for an electrochemical sensor chip  
発明者: Atsushi Suda, Tatsuo Kimura, Ryota Kunikata, Kosuke Ino, Tomokazu Matsue  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 13/311, 255 (出願番号)  
出願年月日: 2011 年 12 月 5 日  
国内外の別: 国外
- ④ 名称: ウェルユニット及び電気化学的分析方法  
発明者: 青柳重夫, 内海陽介, 末永智一, 珠玖仁, 阿部宏之, 河野浩之, 柏崎寿宣, 星宏良, 星翼  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 2010-208817 (出願番号)

出願年月日: 2010 年 9 月 17 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

- ① 名称: 電気化学計測チップ用電極装置  
発明者: 須田篤史, 木村龍男, 國方亮太, 末永智一  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 4996738 (特許番号)  
取得年月日: 2012 年 5 月 18 日  
国内外の別: 国内
- ② 名称: 電気化学計測チップ用電極装置  
発明者: 須田篤史, 木村龍男, 國方亮太, 伊野浩介, 末永智一  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 4933656 (特許番号)  
取得年月日: 2012 年 2 月 24 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

- ① プレスリリース: 細胞活性の網羅的モニタリングを可能にする微小チップの開発  
(<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2012/06/press20120605-01.html>)
- ② プレスリリース: 生きている細胞表面の構造と化学物質濃度をナノスケールで可視化  
(<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2012/06/press20120601-01.html>)

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

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

(平成 23 年度からは連携研究者)

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

(3) 連携研究者

なし