

マイクロ・ナノ電極を利用する環境・医工学バイオセンサデバイスおよび材料評価システムの開発

Development of Environmental/Biomedical Sensors and Visualization Systems for Material Functions with Micro/Nano Electrodes



教授 珠玖 仁
(工学研究科 兼任)
Professor
Hitoshi Shiku



准教授 伊野 浩介
(工学研究科 兼任)
Associate Professor
Kosuke Ino



准教授 井上 久美
(山梨大学 兼任)
Associate Professor
Kumi Y. Inoue



准教授 熊谷 明哉
(材料科学高等研究所、
物質・材料研究機構 兼任)
Associate Professor
Akichika Kumatani



助教 梨本 裕司
(学際科学フロンティア研究所、
工学研究科 兼任)
Assistant Professor
Yuji Nashimoto



助教 井田 大貴
(学際科学フロンティア研究所、
材料科学高等研究所 兼任)
Assistant Professor
Hiroki Ida

秘書 高野 聡美
研究補佐員 近藤 朋子

現在、微小なデバイスのバイオ応用・環境モニタリングに大きな期待が寄せられている。これらのデバイスを用いることで、これまで難しかった生体現象を観察することや、簡便かつ迅速な環境評価・医療用検査が可能になっている。また、生体を模倣した微小な細胞チップを作製することで、再生医療応用や生体内での化学物質のモニタリングが可能になる。このような目的のために、我々はマイクロ・ナノシステムを組み込んだ電気化学デバイスの開発を行った。

Micro/nano devices have continuing demands on biological science, engineering, and accurate analytical information. We have developed micro/nano-electrochemical systems for environmental/biomedical applications and evaluation of battery materials. We are also investigating the role of the tissue microenvironment, utilizing a microfluidic device and scanning probe microscopy. These devices are useful in environmental monitoring, medical, and engineering applications.

バイポーラー電極を用いた細胞活性評価、および新規バイオイメージング技術の開発

電解質中に置いた導電性材料に電場を付与すると両端において酸化・還元反応が誘導され、その導電性材料をバイポーラー電極 (BPE) と呼ぶ。BPE は電気化学発光と組み合わせると、一端で起きる目的の電気化学反応を他端で生じる電気化学発光シグナルとしてモニタリングすることができる。

これを利用して、三次元的に培養された細胞凝集体 (スフェロイド) の酸素代謝活性を評価した。32 本の BPE が集積されたデバイスを作製し、乳がん細胞スフェロイドの酸素代謝活性を識別することに成功した (*ACS Sens.*, 5, 740 (2020))。本成果は、当該雑誌のカバーに選ばれた (図 5)。

さらに、配線が不要という BPE の特徴を最大限に生かし、「バイポーラー電気化学顕微鏡」を開発した。無電解析出を利用し、多孔膜の各孔の内部に金を析出させることで、平均の電極間隔が 41 μm という BPE アレイを得た。これを用いて溶液内のフェリシアン化物イオンのイメージングを行ったところ、100 ms の時間分解能で、フェリシアン化物イオンの拡散を可視化できた。また、呼吸活動に伴うスフェロイド周囲の酸素濃度減少をイメージとして捉えることにも成功した (*Analyst*, 145, 6895 (2020))。

Development of bipolar electrode arrays for cell analysis and bioimaging

When an electric field is applied to conductive materials placed in an electrolyte solution, oxidation/reduction reactions are induced at both ends of the materials. The conductive materials are called “bipolar electrodes” (BPEs). By combining BPEs with electrochemiluminescence, the target electrochemical reaction at one end of a BPE can be monitored by quantifying a luminescence at the opposite end.

By using this BPE-electrochemiluminescence system, the oxygen metabolic activity of three-dimensionally cultured cells (spheroids) was evaluated. The device with 32 BPEs successfully provided the oxygen metabolic activity of breast cancer cell spheroids (*ACS Sens.*, 5, 740 (2020)). The figure in the project was featured on the cover of the journal (Fig. 5).

Because BPE does not need any direct electrical connection, a large number of BPEs can be easily integrated into a single platform and is applicable to bioimaging, namely, “bipolar electrochemical microscopy” (BEM). The average interval between BPEs in our platform was 41 μm . By using BEM for the imaging of ferricyanide ions in a solution, the diffusion of ferricyanide ions was visualized with a time resolution of 100 ms. In addition, the decrease of the oxygen concentration near a tumor spheroid was visualized, which reflects the respiration activity of the tumor spheroid (*Analyst*, 145, 6895 (2020)).



Fig.1 Lab members 2020

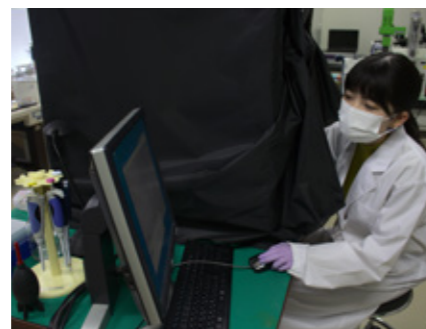


Fig.2 Electrochemiluminescence analysis



Fig.3 Oxygen consumption rate analysis using scanning electrochemical microscopy

電気化学デバイスを用いた、血管化スフェロイド、がんスフェロイドの酸素代謝計測

これまでに開発してきた電気化学計測ツールのうち、Bio-LSI、走査型電気化学顕微鏡 (SECM) を用いて、血管網を有する繊維芽細胞スフェロイドの酸素代謝機能の評価を行った。Bio-LSI を用いた酸素代謝の計測結果は、これまで研究室が知見を蓄積してきた SECM による結果と傾向がよく一致し、Bio-LSI による計測の妥当性が再確認された。さらに、血管化の有無で抗がん剤の投与時の酸素代謝の低下の程度に相違があることが確認できた。これは、薬剤効果における血管の影響の大きさを示しており、新たな薬剤評価プラットフォームとしての活用が期待される (*Electrochimica Acta*, 340, 135979 (2020))。一方、がんスフェロイドの評価では、スフェロイドが成長した際に内部に形成される壊死コアの形成時の酸素代謝の変化を調査した (*Analyst*, 145, 6342 (2020))。壊死コアの形成は、腫瘍においては、腫瘍微小環境の低酸素の程度を示す指標となる。壊死コア (図 6) が形成されるようなスフェロイドの大きさにすると、体積あたりの細胞の酸素消費量に減少が見られた。これは、スフェロイド中心部の細胞が呼吸できなくなっていることを示し、壊死コアの形成を非侵襲的に予測可能であることを示した。

その他の研究活動

バイオ用の 3D プリンターへの応用を目指し、糖を鋳型として、アルギン酸カルシウムの立体的なゲルを構築する技術を開発した (*J. Biosci. Bioeng.*, 130 539 (2020))。また、電気化学デバイスを用いたバイオ材料の加工技術 (*Adv. Biosyst.*, 4, 1900234 (2020))、電気化学発光を用いた細胞計測に関する総説論文 (*Micromachines*, 11, 530 (2020)) を出版した。さらに、多点液滴デバイスを用いた DNA の検出技術を和文誌へ発表した (*分析化学*, 採択)。

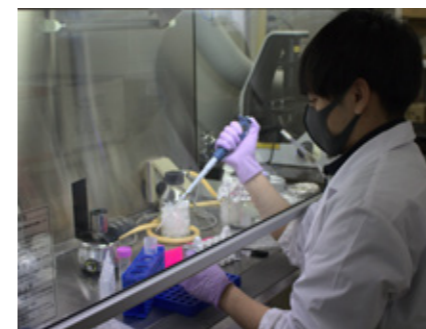


Fig.4 Enzymatic assay in a bio-safety hood



Fig.5 Our research featured on the cover of ACS Sensors

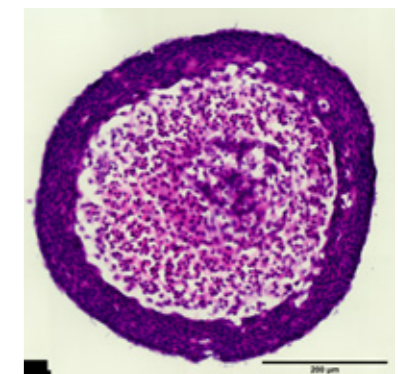


Fig.6 Tumor spheroid with a necrotic core evaluated in our study

Oxygen consumption rate analysis of a vascularized spheroid and a tumor spheroid

We evaluated the oxygen consumption rates (OCRs) of a vascularized fibroblast spheroid using Bio-LSI and scanning electrochemical microscopy (SECM). The OCRs determined using Bio-LSI fairly corresponded to those using SECM, a conventional OCR measurement tool used for more than 20 years. The result indicates that Bio-LSI can be another analytical tool for OCR, with advantages in rapid detection. Furthermore, we found that vascularization enhanced anti-cancer drug effects in a spheroid culture, suggesting that vascularization should be considered in the drug-screening platform (*Electrochimica Acta*, 340, 135979 (2020)). For the analysis of a tumor spheroid, we investigated whether the formation of a necrotic core (Fig. 6) affected oxygen metabolism. The OCR per spheroid volume decreased with increased spheroid radius, indicating the limitation of the oxygen supply to the core of the tumor spheroid. OCR analysis using SECM noninvasively monitors the change of oxygen metabolism in tumor spheroids. The approach is promising to evaluate various three-dimensional culture models (*Analyst*, 145, 6342 (2020)).

Others

We developed a new method using sacrificial templates of sugar structures to fabricate three-dimensionally (3D) designed Ca-alginate hydrogels (*J. Biosci. Bioeng.*, 130 539 (2020)). In addition, two review papers related to biofabrication (*Adv. Biosyst.*, 4, 1900234 (2020)) and electroluminescence (*Micromachines*, 11, 530 (2020)) using electrochemical devices were also published. Furthermore, a new concept to detect a DNA duplex was proposed using a droplet array device in *Bunsekikagaku*.