

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野研究成果展開事業(先端計測分析技術・機器開発プログラム)
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfers: Development of Advanced Measurement and Analysis Systems (AMED-SENTAN)

研究開発課題名：(日本語) 超高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡の開発
(英語) Advanced Scanning Electrochemical Microscope System for High-Resolution Imaging and Electrochemical Applications

研究開発担当者 (日本語) (旧) 東北大学 原子分子材料科学高等研究機構
(現) 東北大学 大学院環境科学研究科 教授 末永 智 一

所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University,
Previous address: Advanced Institute for Materials Research Tohoku University
Professor Tomokazu Matsue

実施期間：平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 超高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡の開発
開発課題名：(英語) Development of Advanced Scanning Electrochemical Microscope System
研究開発分担者 (日本語) 北斗電工株式会社 営業部 担当部長 青柳重夫
所属 役職 氏名：(英語) Hokuto Denko, Chief Manager, Dr Shigeo Aoyagi

II. 成果の概要(総括研究報告)

電気化学顕微鏡は、走査型プローブ顕微鏡の一種であり、ガラスキャピラリーを先鋭化したナノピペットをプローブとする。本プロジェクトでは、光の回折限界を超えた空間分解能を有する超高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡の開発を行った。

市販化に向けたプロトタイプ機の開発には、金沢大学：高橋准教授と協力し、東北大学：末永研究室にて試作機を創製し、北斗電工株式会社によりプロトタイプ機を完成させた。また、解像度 50 nm の超高解像度を実現するため、ナノピペットの開口径を 50 nm まで微細化し、単管型から θ 型のプローブなどに応用し多機能性を有する複合電極プローブの作製を可能とした。この成果により、マウス海馬細胞の 60 nm 程度の神経ネットワークや有毛細胞のひだの形状の観測など、高解像度イメージングの取得が可能となった。

また、ユーザーニーズを考慮し、測定に合わせた顕微鏡に換装可能なピエゾ制御ステージのユニットをナノコントロール社にて開発した。最大ストローク 110 μm まで延伸が可能となり、かつ早い応答速

度（共振周波数：3 kHz 以上）を兼ね揃えたユニットの製作に成功した。また、応答速度の改善（共振周波数：7 kHz 以上）も行い、高速でのイメージングも可能となった。それに合わせ、高速イメージング用の新規アルゴリズムも作製した。また、外部ノイズを 0.2 pA 以下に低減することにより、500 nm/ミリ秒（通常の SICM：50～100 nm/ミリ秒）を達成した。その結果、10×10 μm の測定範囲（64×64 ピクセル数）にて 1 画像の取得をデータ収録速度 10 kHz にて 18 秒以内で取得が可能となった。これは現状、世界最速の測定スピードである。また、5×5 μm の測定範囲（64×64 ピクセル数）では、1 画像の取得を 60 秒内で取得した。以上から 1 画像を 20 分以内で取得するという当初の目標値を大きく下回る数十秒以内での測定環境の構築に成功した。その結果、ヒト上皮様細胞癌由来細胞株である A431 細胞の微絨毛の動的形態変化を本顕微鏡で観察することにも成功している。

超高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡の更なる医療応用のために、顕微鏡のナノピペットを用いて、局所的な薬剤投与や細胞の局所回収を行うシリンジの開発に成功し、回収や投与する技術も確立した。プローブ内に異なった溶液を同時に回収することに成功している。本技術を用いれば、特定細胞への薬品投与やターゲット細胞の回収が可能となり、医療分野への応用も期待できる。

本顕微鏡は、電気化学反応に起因する応答をイメージングとして捉えることができる。その特徴を活かし、材料科学の分野からも注目を浴びている。例えば、金属の腐食に関連する研究では、材料の局部腐食（孔食、粒界腐食、隙間腐食、疲労腐食）及び防食腐食（亜鉛メッキ膜欠陥、化成処理皮膜欠陥、導電性有機膜欠陥、絶縁性有機膜欠陥）の電気化学イメージングの取得が可能である。更に、二次電池などへの応用も期待されており、リチウムイオン 2 次電池の電極表面の電流分布イメージングによる電極の反応性を可視化による電極の充放電反応の均一性を評価や、電位イメージングによる電位の不均一性及び電極劣化を把握の検証試験も可能となった。

製品の販売を目指し、得られた検証データを技術資料にまとめており、プロトタイプ機の不具合を抽出やブラッシュアップも図ってきた。その結果、市販化可能な超高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡のプロトタイプ機の開発は終わることが出来た。そして、プロトタイプ機は既に BioJapan 2016 や 2017 年春季電気化学会にも出展されており、北斗電工株式会社から今後、販売される予定である。

Scanning electrochemical microscopy is one of scanning probe microscopies, which uses a nano-pipette sharpened from a glass capillary as a probe of microscopy. In this project, we have developed an advanced scanning electrochemical microscope system for high-resolution imaging whose spatial resolution is beyond the diffraction of the light.

Toward a commercialization in the world market, a prototype module for scanning electrochemical microscope system was firstly established in Matsue laboratory of Tohoku University with Prof. Y. Takahashi in Kanazawa University. Then, after the system improvement by trial and error, Hokuto Denko was promoted the system to commercially available products. For realization of high resolution imaging beyond the diffraction of the light, the highly reproducible nano-pipette's tips were achieved with 50 nm in a diameter. By utilizing the tips, the system developed was successfully obtained high resolution images such as the neural network with 60 nm of the hippocampal cells.

Besides, for user friendly system, the reconfigurable piezo-units were refined in the microscope system by Nano Control ltd. For example, to measure large area sub millimeter, the stroke of the XY piezo unit was designed up to 110 μm with high response unit (resonance frequency above 3 kHz).

Further, the higher response for high-speed imaging, a new measurement algorithm was also developed for high response piezo units (resonance frequency above 7 kHz). Consequently, a topographic image is taken within 18 seconds with a 64×64 pixel resolution at $10 \times 10 \mu\text{m}$. As far as we know, the speed for imaging is so-far world fastest as scanning ion conductance microscopic measurement. The system also revealed a dynamics of the microvilli on the surface of A431 cells.

For next generation medical applications lead by the electrochemical microscope system in this project, a method was successfully developed for collecting localized cell features in single cells or meditation toward target cells by using a nanopipette in the microscopy. As the nanopipette was acted as an electrochemical syringe, the collection or meditation can be applied toward nanoscale feature which was observed by the high-resolution electrochemical microscopy.

The most advantage of the advanced scanning electrochemical microscope system for high-resolution imaging is to obtain a sub-micro/nanoscale electrochemical reaction as an electrochemical imaging. The feature was paid great attentions by material sciences. For example, corrosion on the surface of metal electrodes. In general, it was difficult to investigate to visualize or distinguish localized electrochemical features directly by different type of corrosion (corrosion fatigue, intergranular corrosion, etc.) Additionally, in the secondary batteries such as lithium-ion batteries, the local homogeneity of current response related to ion transport was able to investigate by the system. The system has excellent potential to become only one system to measure such physical phenomena in electrochemistry.

At last, the system was brushed-up by revising the system faults with a note for technical supports. By the efforts and strong belief to establish commercial products from this project, we have successfully developed an advanced scanning electrochemical microscope system for high-resolution imaging as a commercial product. The system was demonstrated in the conferences or workshops such as BioJapan 2016 and 2017 The 84nd Spring Meeting for The Electrochemical Society of Japan, and it is commercially available soon by Hokuto Denko.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4 件、国際誌 9 件)

1. 松岡涼, 青柳重夫, 松本尚志, 松平昌昭, 高橋康史, 熊谷明哉, 井田大貴, 棟方裕一, 飯田克彦, 珠玖仁, 金村聖志, 末永智一, 超高解像度電気化学顕微鏡の創成と応用, *Electrochemistry (電気化学および工業物理化学)*, 2017, 85.
2. H. Hibino, M. Takai, H. Noguchi, S. Sawamura, Y. Takahashi, H. Sakai, H. Shiku, An approach to the research on ion and water properties in the interphase between the plasma membrane and bulk extracellular solution, *The Journal of Physiological Sciences*, DOI 10.1007/s12576-017-0530-3.
3. Y. Takahashi, A. Kumatani, H. Shiku, T. Matsue, Scanning Probe Microscopy for Nanoscale Electrochemical Imaging, *Analytical Chemistry*, 2016, 89 342.
4. 熊谷 明哉, 高橋 康史, 三浦 千穂, 渡邊 徹弥, 猪又 宏貴, 棟方 裕一, 珠玖 仁, 金村 聖志, 末永智一, ナノ電気化学セル顕微鏡を用いた電極表面の局所電気化学測定, *表面科学*, 2016, 37 494.
5. H. Ito, M. Tanaka, Y. Zhou, Y. Nashimoto, Y. Takahashi, K. Ino, T. Matsue and H. Shiku, Continuous collection and simultaneous detection of picoliter volume of nucleic acid samples using a mille-feuille probe,

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409,961.

6. 高橋 康史, 高解像度走査型電気化学顕微鏡の開発, 化学と工業, 2016年9月, 69(9) 777- 779.
7. Y. Zhang, J. Clausmeyer, B. Babakinejad, A. López Córdoba, T. Ali, A. Shevchuk, Y. Takahashi, P. Novak, C. Edwards, M. Lab, S. Gopal, C. Chiappini, U. Anand, L. Magnani, C. Coombes, J. Gorelik, T. Matsue, W. Schuhmann, D. Klenerman, E. Sviderskaya and Y. Korchev, Spearhead nanometric field-effect transistor sensors for single-cell analysis, ACS Nano, 2016, 10(3), 3214.
8. Y. Takahashi, Development of high-resolution scanning electrochemical microscopy for nanoscale topography and electrochemical simultaneous imaging, Electrochemistry, 2016, 84 662-666.
9. Nashimoto Y, Takahashi Y, Zhou Y, Ito H, Ida H, Ino K, Matsue T, Shiku H, Evaluation of mRNA Localization Using Double Barrel Scanning Ion Conductance Microscopy, ACS Nano 2016, 10(7), 6915.
10. H. Ida, K. Ino, J. Suzuki, Y. Takahashi, H. Shiku, T. Matsue, Redox cycling-based electrochemical reporter gene assay for single cells using a scanning electrochemical microscope-microwell system, Electrochemistry 2016, 84 308.
11. Takano S, Inoue KY, Ikegawa M, Takahashi Y, Ino K, Shiku H, Matsue T, Liquid-junction-free system for substitutional stripping voltammetry using a closed bipolar electrode system, Electrochemistry Communications 2016, 66 34.
12. H. Ito, Y. Nashimoto, Y. Zhou, Y. Takahashi, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, Localized gene expression analysis during sprouting angiogenesis in mouse embryoid bodies using a double barrel carbon probe, Matsue, Analytical Chemistry, 2016, 88(1), 610.
13. 高橋康史, ナノスケールの形状・化学物質濃度プロファイルを可視化するナノ電気化学顕微鏡の創生, 生物物理, 2016年56(3) 179-180.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

①招待講演

(国内)

1. 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、名古屋国際会議場、名古屋、2016 年 11 月 29 日-12 月 1 日
2. 高橋康史、
“ナノ電気化学セル顕微鏡を用いた 局所的な電気化学計測”、平成 28 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、岩手大学、2016 年 9 月 13 日

②口頭講演

(国内)

1. ナノ電気化学セル顕微鏡による Si-C 複合電極用架橋型ポリアクリル酸バインダーの局所電気化学評価, 熊谷明哉, 佐藤悠人, 高橋康史, 久保田圭, 瀧本一樹, 水田浩徳, 岡本訓明, 珠玖仁, 駒場慎一, 末永智一, 第 84 回電気化学会、2017 年 3 月 25-27 日、東京
2. 水素/空気二次電池用水素吸蔵合金における電気化学応答の可視化, 田中元基、熊谷明哉、近真起雄、陶山博司、錦織英孝、中西真二、珠玖仁、高橋康史、射場英紀、末永智一, 第 84 回電気化学会、2017 年 3 月 25-27 日、東京

3. 高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡によるアルミダイカストの腐食特性の検証, 青柳重夫, 松岡涼, 松本尚志, 松平昌昭, 高橋康史, 熊谷明哉, 井田大貴, 棟方裕一, 珠玖仁, 金村聖志, 末永智一, 第 84 回電気化学会, 2017/3/25, 東京
4. ナノ電気化学セル顕微鏡によるグラフェン/グラファイト構造における電気化学活性の局所電気化学測定と可視化, 三浦千穂、熊谷 明哉, 岡田健、寒川誠二、珠玖 仁, 高橋康史, 末永 智一, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 3 月 14-17 日、横浜
5. ナノ電気化学セル顕微鏡を用いたリチウムイオン電池 Si-黒鉛複合負極の評価, 熊谷 明哉, 渡邊徹弥, 高橋 康史, 久保田 圭, 佐藤 悠人, 珠玖 仁, 駒場 慎一, 末永 智一, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 3 月 14-17 日、横浜
6. ナノ電気化学セル顕微鏡を用いたリチウムイオン電池 Si-黒鉛複合負極の評価, 熊谷 明哉, 渡邊徹弥, 高橋 康史, 久保田 圭, 佐藤 悠人, 珠玖 仁, 駒場 慎一, 末永 智一, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 3 月 14-17 日、横浜
7. Scanning Electrochemical Cell Microscopy for Visualization of Local Electrochemical Activities on Graphene/Graphite, 熊谷 明哉, 三浦千穂、岡田健、寒川誠二、珠玖 仁, 高橋康史, 末永 智一, 第 51 回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム、2017 年 3 月 1 日-3 日、東京
8. ナノ電気化学セル顕微鏡の局所電気化学測定を利用した SEI 被膜生成過程の解析, 渡邊徹弥, 熊谷 明哉, 阿部真知子, 岡崎智子, 伊藤友一, 佐藤悠人, 井田大貴, 珠玖 仁, 高橋康史, 射場英紀, 末永 智一, 第 57 回電池討論会、2016 年 11 月 29 日-12 月 1 日、幕張メッセ
9. ナノ電気化学セル顕微鏡による Si-黒鉛複合負極の局所電気化学特性評価, 渡邊徹弥, 熊谷明哉, 高橋康史, 久保田圭, 井田大貴, 珠玖仁, 駒場慎一, 末永智一, 第 57 回電池討論会、2016 年 11 月 29 日-12 月 1 日、幕張メッセ

(国際)

1. Localized Electrochemical Analysis of Polyacrylate Binders on Graphite-Silicon Negative Electrodes in Lithium-ion Batteries, A. Kumatani, Y. Takahashi, T. Watanabe, K. Kubota, K. Yamagiwa, H. Ida, H. Shiku, S. Komaba, T. Matsue, PRiME2016、2016 年 10 月 2-7 日、Hawaii (USA)
2. Localized electrochemical analysis on high capacity electrodes in lithium-ion batteries, A. Kumatani, Y. Takahashi, T. Watanabe, K. Kubota, K. Yamagiwa, H. Ida, H. Shiku, S. Komaba, T. Matsue, 2016 EMNT、2016 年 8 月 17-19 日、Brussel (Belgium)

(ポスター発表)

(国内)

1. グラフェン/グラファイト表面構造における電気化学活性の可視化, 三浦千穂、熊谷明哉、高橋康史、井田大貴、珠玖仁、末永智一、みちのく分析科学シンポジウム、2016 年 10 月 22 日、東北大学

(国際)

1. Visualization of Electrochemical Activity at Graphene/Graphite Edges, C. Miura, A. Kumatani,

T. Okada, S. Samukawa, H. Shiku, Y. Yasufumi, T. Matsue,

The AIMR International Symposium 2017, Feb. 13-17, 2017, Sendai, Japan

2. Local analysis and visualization of ion transport, A. Kumatani, T. Matsue, "Scanning Electrochemical Cell Microscopy: International Conference "Global/Local Innovations for Next Generation Automobiles, 2016年10月11日 - 12日、仙台国際センター、仙台
3. Localized electrochemical analysis for the formation of solid electrolyte interface in silicon-graphite-polyacrylate electrodes in lithium-ion batteries, A. Kumatani, Y. Takahashi, T. Watanabe, K. Kubota, K. Yamagiwa, H. Ida, H. Shiku, S. Komaba, T. Matsue, Faraday Discussion, 2016年8月21-9月2日、York University (UK)"

(企業展示)

1. 「高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡」,展示, BioJapan 2016, 2016/10/12-10/14, 国内.
2. 「高解像度電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡」,展示, 電気化学会第 84 回大会, 2017/3/25-3/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

【 該当： 無 】

(4) 特許出願

1. 日本：特開 2010-261923：走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡測定法、走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡、その探針および探針の製造方法、平成 26 年 2 月 7 日、登録（特許第 5467473 号）北斗電工
2. 日本：特願 2016-188803：走査型プローブ顕微鏡及びその制御方法、平成 28 年 9 月 27 日、高橋康史（金沢大）