

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14012

研究課題名（和文）バイポーラ電極アレイによる大規模多項目分析システムの構築

研究課題名（英文）Large-scale multi-analyte sensing system with bipolar electrode array

研究代表者

珠玖 仁（Shiku, Hitoshi）

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：10361164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、バイポーラ電極（BPE）アレイデバイスをワイヤレスな次世代センシングシステム開発のプラットフォームと位置付け、超小型・省電力・高感度な迅速・簡便スクリーニング系を構築する。種類の異なるタンパク質や核酸の生体分子および標準電極電位の異なるレドックスを任意の場所にパターンニングする技術と組み合わせ、自律型の新規大規模多項目分析法を提案する。電気化学イメージングの研究蓄積を活用し、デバイスの局所における電位分布や、従来法では観測不能な局所電流分布のマッピングに挑戦することにより、理論的根拠に基づいた効率的なデバイスデザインに反映させる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a multi-analyte sensing platform based on bipolar electrode (BPE) array device to realize small size, power saving, highly sensitive, and rapid screening system. BPE array allows wireless controlling individual redox reactions at conductive plate. Autonomous and novel large-scale multi-analyte sensing system is designed, by addressing various combination of different types of biomolecules, including nucleic acids and proteins, and redox couples with different electrode potentials. Electrochemical bioimaging instrument we have developed has been applied for mapping of localized surface charge or current.

研究分野：分析化学

キーワード：カーボンナノチューブ 光硬化性ゲル バイポーラ 多項目分析 誘電泳動

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで電気化学イメージングの新規デバイスの開発に携わり、電流検知型デバイスとしては異例のスループット(1,024点)を誇る多点電極チップに基づく多検体・多項目分析系を構築した。本研究課題では、ハイドロゲルシート中にカーボンナノチューブ(CNT)を配向固定化したバイポーラ電極(bipolar electrode, BPE)型の素子をプラットフォームとするCNT-BPEアレイ素子を作製し、ハイスループット・マルチセンシングを実施する。BPEの局所における表面電位分布や、従来法では観測不能な局所電流分布のマッピングに挑戦することにより、理論的根拠に基づいた効率的なCNT-BPE素子のデザイン設計に反映させる。

近年、BPEに応用可能な電気化学反応の組み合わせが世界レベルで探索されている。電気化学発光や貴金属・導電性高分子の電析、さらに部位選択的な生体分子およびナノマテリアルの修飾などと組み合わせることにより、現存する多点電極系電気化学分析を凌駕するハイスループットのマルチセンシング・システムの実現が期待されている。しかし、これまで報告されてきたBPEアレイの材料はPt・Au等の金属が主に用いられ、作製する度に微細加工工程を必要とする点が課題であった。

我々は、誘電泳動によりカーボンナノチューブやグラフェンなどナノ炭素材料を配向させた基板を作製し、細胞培養やバイオセンサのプラットフォームに利用する研究を展開してきた。誘電泳動を用いると多層カーボンナノチューブ(MWCNT)やグラフェンの配向パターンを作製することができる。MWCNTの分散液をくし型電極とカバーガラスを対向させたスペースに導入し、印加する交流電圧を最適化することでくし型電極のギャップを架橋するように水平方向にMWCNTを配列化することができる(*Adv. Mater.* 25, 4028-4034, 2013)。カバーガラスの代わりにITO電極を対向させると電場強度の分布が変化し、くし型電極とITO電極を架橋するように垂直方向の電気力線に沿ってMWCNTが配列化する(*Sci.Rep.* 4, 4271, 2014)。本研究課題では、MWCNTを水平および垂直方向に配列化し、MWCNT両端に多様な生体分子およびナノマテリアルを修飾した傾斜材料の設計、素子が作動する際の局所電位および電流マッピングに基づく素子性能の最適化について検討を行う。この技術を応用し、定量分析用のバイポーラ電極アレイデバイスの作製と評価を行った。

局所の電気化学的不均一性に関する実測データが得られれば、BPEの分野のみならず、電池材料・腐食材料の分野でも、その知見が活用できる。腐食電流と同様、BPEの両端で進行する酸化・還元反応は共役しており、既存の電気化学測定法では正味の電流は外部から観測できない。ガラス電極探針を試料表

面に近接させる際に、イオン電流を観測しながら探針-基板間距離曲線(アプローチカーブ)を取得することにより、表面電荷の不均一性が高解像度で(サブミクロンの解像度で)マッピング可能である。

2. 研究の目的

本研究課題では、バイポーラ電極(BPE)アレイデバイスをワイヤレスな次世代センシングシステム開発のプラットフォームと位置付け、超小型・省電力・高感度な迅速・簡便スクリーニング系を構築する。種類の異なるタンパク質や核酸の生体分子および標準電極電位の異なるレドックスを任意の場所にパターンニングする技術と組み合わせ、自律型の新規大規模多項目分析法を提案する。電気化学イメージングの研究蓄積を活用し、デバイスの局所における電位分布や、従来法では観測不能な局所電流分布のマッピングに挑戦することにより、理論的根拠に基づいた効率的なデバイスデザインに反映させる。

3. 研究の方法

(1) CNT配列化条件の最適化:

【Open型BPEデバイスの作製】MWCNTは酸処理によりCOOH基を導入したものをを用いた。MWCNTを、10%ポリエチレングリコールジアクリレート(PEG-DA)と光重合開始剤(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオフェノン)を含む水溶液に分散させた。交互くし型ITO電極(電極幅/ギャップ幅/電極長さ、500 μm/800 μm/18.5 mm)基板とカバーガラスを100 μmのスペーサーを挟んで対向させ、マイクロ流路にMWCNT分散液を注入し、交互型電極間に位相差180°の交流電圧(20 V_{pp}, 1 MHz)を印加した。電圧をかけたままの状態では波長365 nmの紫外線を照射し、PEG-DAをゲル化した。交互くし型ITO電極側にはフッ素シラン化剤(3,3,4,4,5,5,6,6,6-Nonafluorohexyltrichlorosilane (LS-912), 信越化学工業株式会社)を修飾し、カバーガラス側には(3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate) (TMSPMA)を修飾することで、配向MWCNT含有ハイドロゲルシートをカバーガラスに接着させたまま、交互くし型ITO電極から剥離した。この配向MWCNT含有ハイドロゲルシートをOpen型BPEデバイスとして使用した(MWCNT-oBPE)。

陽極と陰極間距離が21 mmのセルの中央にMWCNT-oBPEを置き、5 mM [Ru(bpy)₃]Cl₂, 25 mM トリプロピルアミン(TPA)を含む1xTBE(Tris-borate-EDTA)緩衝溶液を満たした。電圧180V_{DC}を印加し暗黒下CCDカメラで発光イメージを撮影した。

【Closed BPEデバイスの作製】MWCNTを、14 mg/mL 2,2-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)、33%PEG-DA、33%メタノール水溶液に分散させた。2つの交互くし型ITO電

極基板（電極幅/ギャップ幅, 50 μm /100 μm ）を、くしが 90° 交差するように 600 μm のスペーサーを挟んで対向させ、マイクロ流路に MWCNT 分散液を注入し、位相差 180° の交流電圧 (20V_{pp}, 1 MHz) を印加した。この状態で 1 時間半 55 加熱することで、MWCNT 垂直配向パターンを固定化したハイドロゲルシートを作製した。剥離した垂直配向 MWCNT 含有ハイドロゲルシートを Closed BPE デバイスとして利用した (MWCNT-cBPE)。

【条件の最適化】異なる製造法で作製された多層カーボンナノチューブ MWCNT を入手し、CNT の親水化処理を検討した。ハイドロゲルの濃度、種類、電極デザイン、誘電泳動の条件 (交流電圧の振幅および周波数) を変えることにより、水平および垂直方向に MWCNT を配列化する試みを実施した。

(2) 生体分子の固定化：

クォーツ製ピペット内壁に熱分解析出法により作製した炭素微小電極の系で Closed BPE を構築し、微小炭素電極両端の異なる酸化還元反応と見かけ上のボルタモグラムの形状の変化から、BPE の両端で進行する反応の進行を制御・解析する。BPE に接触する溶液に含まれるレドックス種の種類を変えることにより、観測されるボルタモグラムの半波電位のシフトを解析した。

炭素微小電極を 1 mM Na[AuCl₄] 水溶液中に設置し、-0.1V vs Ag/AgCl, 40sec 還元電位を印加することにより Au を析出した。さらに、チオール標識ピオチン/エタノール溶液に 60 分、アビジン DH、ピオチン標識グルコースオキシダーゼに 60 分浸漬し酵素修飾電極を作製した。

(3) 走査型プローブ顕微鏡による表面電荷計測：

先端径が 50 nm のガラスナノピペットに電解質電解液を充填し、作用極 (Ag/AgCl 線) を挿入した。3 軸方向の走査をピエゾ素子により制御した。生体試料をピペット内と同じ電解液に浸漬し、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) 計測を行った。電解液には pH の異なる 3 種類の溶液を使用した。ピペットを薄膜にアプローチした際、バルクの電流値に対して 3% 電流が増加、または減少した時点でアプローチを停止した。印加電圧が正の場合、表面が負に帯電している試料に近接させるとイオン電流が減少し、正電荷の試料に近接させるとイオン電流が増加する。印加電圧が負の場合、負電荷の試料に近接させるとイオン電流は増加し、正電荷の試料に近接させると電流が減少する。SICM では、電流の増減を捉えることで試料の表面電荷を nm スケールで計測できる。

4. 研究成果

(1) CNT 配列化条件の最適化：

【Open 型 BPE デバイスの評価】MWCNT の端部で [Ru(bpy)₃]²⁺ と TPA の酸化が進行し電気化学発光が観測された。SEM 観察により、MWCNT はくし型電極のエッジに対し一様に配向していることが分かった。電極/ギャップの境界では MWCNT の密度が非常に高く、ギャップの中央部では密度が低下していることが分かった。誘電泳動の過程では初期に MWCNT の端が ITO バンド電極のエッジに接触し、MWCNT の逆側の端から配向パターンが伸長する。そのため、電極に近い部分で MWCNT の密度が高くなったと考えられる。

【Closed BPE デバイスの作製】MWCNT 垂直配向ハイドロゲルシートの作製には、AIBN の作用に基づく熱硬化に先立ち、光重合開始剤を用いた UV ゲル化法も試みたが、MWCNT が紫外線を透過しないためにシートを均一にゲル化させることが困難であった。厚さ 600 μm の垂直配向 MWCNT 含有ハイドロゲルシートで仕切った溶液セルの片側に [Ru(bpy)₃]²⁺ と TPA を含むリン酸緩衝液を、もう片側にはリン酸緩衝液のみを入れ、2 つの溶液相間に 3V を印加したところ電気化学発光は確認されなかった。MWCNT/ハイドロゲルシートの代わりに、炭素ファイバーを垂直方向に固定化して埋め込んだ PDMS シートに電圧を加えた場合には、電気化学発光が観測できた。

同様に、Au ワイヤをアレイ化した Closed BPE アレイデバイスを作製した。サンプルセルにリン酸緩衝液のみを充填し、2.3 V 印加した状態で 1M K₃Fe(CN)₆ を滴下しながら、測定セル側 ([Ru(bpy)₃]²⁺ と TPA を含む) の電気化学発光を高感度冷却 CCD カメラで観察した。[Fe(CN)₆]³⁻ が拡散し Au -BPE アレイ上で還元される反応を可視化することに成功した。

BPE アレイデバイスをフォトリソグラフィにより作製し、各反応サイトにおける反応条件の均一性が担保された系において多項目分析を実施した。Closed BPE アレイデバイスを設計することにより、省電力化および各反応サイトの独立性を保ち、異なる BPE 間での交差反応を抑制できた。具体的には、電気化学発光と溶存酸素の還元反応を組み合わせることにより、細胞の呼吸活性を評価した。亜硫酸ナトリウムを加えて酸素濃度を調整した溶液を用いて発光強度の検量線を作成した。複数の細胞試料の呼吸活性を測定ウエルごとに評価した。

(2) 生体分子の固定化：

炭素電極を析出させたピペット型 BPE の内液として、0.1 M KCl, 2.5 mM K₄[Fe(CN)₆]+0.1 M KCl, 2.5 mM K₃[Fe(CN)₆]+0.1 M KCl, 1.25 mM K₄[Fe(CN)₆]+1.25 mM K₃[Fe(CN)₆]+0.1 M KCl を選んだ。外液には 0.5 mM

Ferrocenemethanol (FMA) + 0.1 M KCl を充填し、サイクリックボルタンメトリー(CV)を行った。通常の2極式測定系で観測されるFMAの半波電位 $E_{1/2}$ と比較して、BPEのCVでは $E_{1/2}$ が負側にシフトした。電位のシフトからBPEの両端における微小電極の実効半径の比 ($|i_{ss}^c|/i_{ss}^a$) を見積もることが可能となる。内液が 1.25 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ + 1.25 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ + 0.1 M KCl の場合は、両端の酸化還元反応の反応電子数はともに $n = 1$ であり、かつ可逆反応であることから、Closed BPE系の電位シフトを表す理論式(文献: J. T. Cox et al. **Anal Chem** 84 (2012)8797-8840) を適用できる。

$$E_{1/2} = (E_a^{0'} - E_c^{0'}) - \frac{RT}{F} \ln \left(2 \left(\frac{|i_{ss}^c|}{i_{ss}^a} \right) - 1 \right)$$

ここで、 $E_c^{0'}$ および $E_a^{0'}$ は $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ および FMA⁺⁰ の式量電位を表す ($E_c^{0'} = 0.139$ V, $E_a^{0'} = 0.240$ V vs Ag/AgCl)。様々な大きさの炭素微小電極を作製したところ、($|i_{ss}^c|/i_{ss}^a$) > 10^6 という大きな値が算出された。

炭素微小電極に Au を析出させ、さらにチオール基とアビジン/ビオチン結合を介してグルコースオキシダーゼを固定化した。架橋剤の濃度比を最適化することにより、酵素固定化量を制御し、グルコースの添加に伴う電流応答の増加を確認した。また、フェロセンチオールを Au 析出微小電極に修飾し、微小電極の面積と SAM 修飾分子の固定化量の関係について調査した。

(3) 走査型プローブ顕微鏡による表面電荷計測:

ピペット内外の電解質濃度を低下させると、試料表面の電荷密度に依存してイオン電流の整流作用が観測される。ピペット内の Ag/AgCl 電極に -0.4 V を印加した場合には、負に帯電したガラス表面にピペット探針を近接させた際にイオン電流値が増大する。アプローチカーブの電流値変化からガラス、ポリ(ジメチルシロキサン)、タンパク質ナノフィルムの表面電荷の違いを評価した。

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5件)

1. S. Ahadian, U. Naito, V. J. Surya, S. Darvishi, M. Estili, X. Liang, K. Nakajima, H. Shiku, Y. Kawazoe, T. Matsue. Fabrication of poly(ethylene glycol) hydrogels containing vertically and horizontally aligned graphene using dielectrophoresis: An experimental and modeling study. **Carbon** 査読有 123, (2017) 460-470. doi: 10.1016 / j. carbon. 2017. 07. 082
2. K. Ino, M. Şen, H. Shiku, T. Matsue.

Micro/nanoelectrochemical probe and chip devices for evaluation of three-dimensional cultured cells. **Analyst** 査読有 142(23), (2017) 4343-4354. DOI: 10.1039 / c7an01442b

3. K. Ino, H. Shiku, T. Matsue. Bioelectrochemical applications of microelectrode arrays in cell analysis and engineering. **Current Opinion in Electrochemistry** 査読有 5(1), (2017) 146- 151. doi: 10.1016/j.coelec.2017.08.004

4. S. Ahadian, S. Yamada, M. Estili, X. Liang, R. Banan Sadeghian, K. Nakajima, H. Shiku, T. Matsue, A. Khademhosseini, Carbon nanotubes embedded in embryoid bodies direct cardiac differentiation. **Biomed Microdevices** 査読有 93 (3) (2017) 57. doi: 10.1007 / s10544-017-0184-1

5. S. Ahadian, Y. Zhou, S. Yamada, M. Estili, X. Liang, K. Nakajima, H. Shiku, T. Matsue. Graphene induces spontaneous cardiac differentiation in embryoid bodies. **Nanoscale** 査読有 8(13), (2016) 7075-84. doi: 10.1039/c5nr07059g.

[学会発表](計8件)

1. 八重垣稜佑, 伊野浩介, 珠玖仁, クローズドバイポーラ電極を用いた電気化学発光による細胞呼吸活性の多点同時評価, 電気化学会第 85 回大会, 東京理科大学葛飾キャンパス (2018).
2. 今井俊輔, Fei Li, Peng Yang, 井田大貴, 熊谷明哉, 高橋康史, 伊野浩介, 珠玖仁, 末永智一, 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡によるタンパク質薄膜表面のナノスケール電荷マッピング, 電気化学会第 85 回大会, 東京理科大学葛飾キャンパス(2018).
3. 岩間智紀, 井上久美, 珠玖仁, 末永智一, 多点バイポーラ電極システムを用いた生体分子イメージングの検討, 電気化学会第 85 回大会, 東京理科大学葛飾キャンパス(2018).
4. 井上(安田)久美, シティ マストウラ, 都賀亮人, 伊藤佐々木隆広, 珠玖仁, 末永智一, Close 型バイポーラ電極による液絡不要の参照電極集積型アンペロメトリックセンシングプローブの開発, 電気化学会第 85 回大会, 東京理科大学葛飾キャンパス(2018).
5. 珠玖仁, 内藤潮, 伊野浩介, 井上(安田)久美, 末永智一, 誘電泳動を用いたナノ炭素材料配向電極デバイスの作製, 電気化学会第 84 回大会, 首都大学東京(2017)
6. R. Yaegaki, K. Ino, T. Matsue, H. Shiku, Close bipolar electrode array for electrochemiluminescence detection. 平成 29 年度化学系学協会東北大会, 岩手大学 (2017).
7. 内藤潮, 山田淑代, 珠玖仁, Samad Ahadian, 伊野浩介, 末永智一, 多層カーボンナノチューブ配向型バイポーラ電極アレイの作製と機能評価, 平成 28 年度東日本分析化学若手交流会, 日本大学軽井沢研修所

(2016).

8. 内藤潮, 山田淑代, 珠玖 仁, Samad Ahadian, 伊野浩介, 井上久美, 末永智一, Construction of simultaneous multi sensing device using bipolar electrodes made with multiwall carbon nanotube array. 第10回バイオ関連化学シンポジウム, 金沢市(2016).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.che.tohoku.ac.jp/~est/member.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

珠玖 仁 (SHIKU, Hitoshi)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 10361164