

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510129
 研究課題名 (和文) カーボンナノチューブ多項目高感度バイオセンサーアレイの開発
 研究課題名 (英文) Microfluidic and Label-free Multi-biosensors based on Carbon Nanotube Microelectrodes
 研究代表者
 前橋 兼三 (MAEHASHI KENZO)
 大阪大学・産業科学研究所・准教授
 研究者番号：40229323

研究成果の概要：本研究開発においては、「カーボンナノチューブ多項目高感度バイオセンサーアレイ」の開発を目指す。金属表面に高密度のカーボンナノチューブを形成し、カーボンナノチューブ表面にプローブ DNA や抗体を固定化する。カーボンナノチューブに結合した DNA や蛋白を電気化学的に酸化・還元することにより、標識なしで電流として直接高感度に検出する。本課題では、これをチップ上にアレイ化し、多くの健康マーカーを網羅的に解析する QOL 向上、家庭内診断チップを開発することを目的とする。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：半導体物性

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学システム、カーボンナノチューブ、バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

バイオセンサーを用いた次世代の医療システムとして、在宅医療を基礎とした様々な医療形態が提案されている。その鍵となる生体分子のアフィニティ (特異的相互作用) を利用した計測は、現在、ラジオイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、蛍光法等により実施されている。しかしながら、これらの方法は専用の施設と技師が必要であるため、小型化、簡便性の追求は不十分であり、家庭で簡便に利用できない。したがって、従来の標識法では不可能であった極微量の試料を

高感度、非標識で網羅的に計測する技術を実現し、しかも簡便かつ小型化に適したナノバイオ計測システムにまとめることが求められている。

2. 研究の目的

本研究開発においては、上記の問題を解決するために、「カーボンナノチューブ多項目高感度バイオセンサーアレイ」の開発を目指す。金属表面に高密度のカーボンナノチューブ (CNT) を形成し、CNT 表面にプローブ

DNA や抗体を固定化する。CNT に結合した DNA や蛋白を電気化学的に酸化・還元することにより、標識なしで電流として直接高感度に検出する。本課題では、これをチップ上にアレイ化し、多くの健康マーカーを網羅的に解析する QOL 向上、家庭内診断チップを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

白金表面上に、直接 CNT をアレイ上に形成し、固定化した CNT 電極と空気駆動型マイクロポンプを組み合わせることで、マイクロフローチップを作製した。

次に、フェリシアン化カリウム導入し、マイクロポンプの動作確認および CNT 電極での電気化学的検出を行った。

さらに、化学修飾した CNT 電極と、PDMS 製のポンプ付きの微小流路を組み合わせ、バイオチップを作製した。作製したチップ上のマイクロポンプを用いて溶液を導入し、電気化学的に生体分子の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 図 1 (a)および(b)に開発したマイクロフローチップの光学顕微鏡像および模式図を示す。

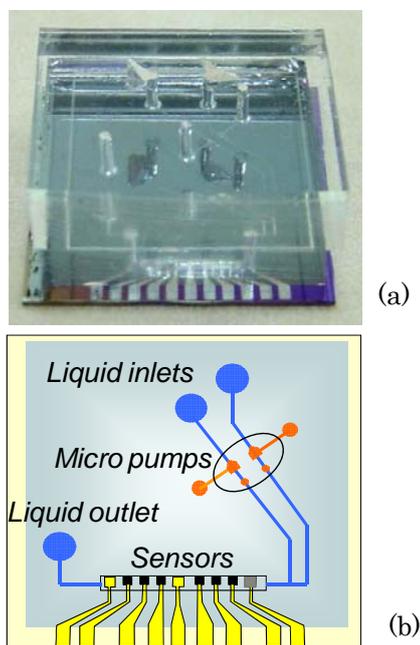


図 1 マイクロフローチップの光学顕微鏡像(a)および模式図(b)

フォトリソグラフィーにより製作した鋳型と PDMS (polydimethylsiloxane) を用いて、空気層および流路層を形成し、中間層を

組み合わせることで、三層構造の空気駆動型マイクロポンプ (図 2) と流路を作製した。それを SiO₂ 基板の金属表面上に、熱 CVD 法によって作製した CNT 電極 (図 3) と組み合わせることで、微小流体の自動流量制御可能な CNT バイオチップの製作に成功した。図 1 に示すように、2 cm×2 cm のチップ上に 2 つのマイクロポンプを用いて、CNT 電極上に 2 種類の溶液を同時に導入することができる。

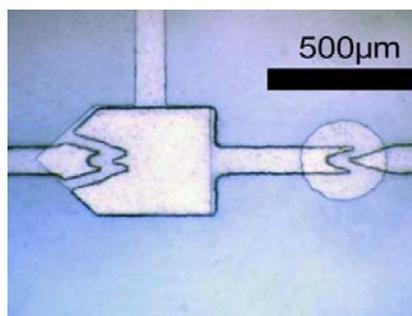


図 2 マイクロポンプ

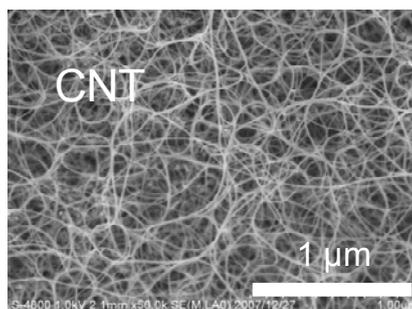


図 3 CNT 電極

フェリシアン化カリウムおよびリン酸バッファー溶液を導入し、このチップの特性を調べた。マイクロポンプによって、26 nL/s の溶液を導入できることが明らかとなり、微小流体の流量制御を行うことに成功した。1 つのポンプを使ってフェリシアン化カリウムを導入すると、+0.06 V 辺りに酸化電流信号が現れ、次に、他方のポンプを使いリン酸バッファー溶液を導入すると、フェリシアン化カリウムの酸化ピークが消失していることが観測された。つまり、CNT 電極上のフェリシアン化カリウムがリン酸バッファー溶液によって、完全に洗い流されたことを意味している。さらに、濃度の異なるフェリシアン化カリウムを導入することによって、濃度依存性を測定した。図 4 は各濃度におけるピーク位置をプロットしたものである。ピーク電流値は、フェリシアン化カリウムの濃度に比例していることが明らかになった。したがって、CNT 電極を有するマイクロフローチップは、高感度な定量分析に有効であることがわかった。

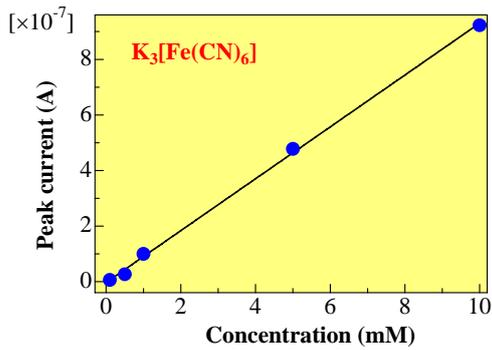


図4 フェリシアン化カリウムの酸化ピーク電流の濃度依存性

次に、マイクロフローチップを用いて、グルコースのリアルタイム検出を試みた。グルコースの検出には酵素基質反応を応用するために、まず、図5(a)のように酵素であるグルコースオキシダーゼをCNT電極に化学的に修飾する。次に、グルコースを導入し、発生した過酸化水素水を電気化学的に酸化させることでグルコースを検出する。2つのポンプを利用して、リアルタイムでグルコースを検出した結果を図5(b)に示す。

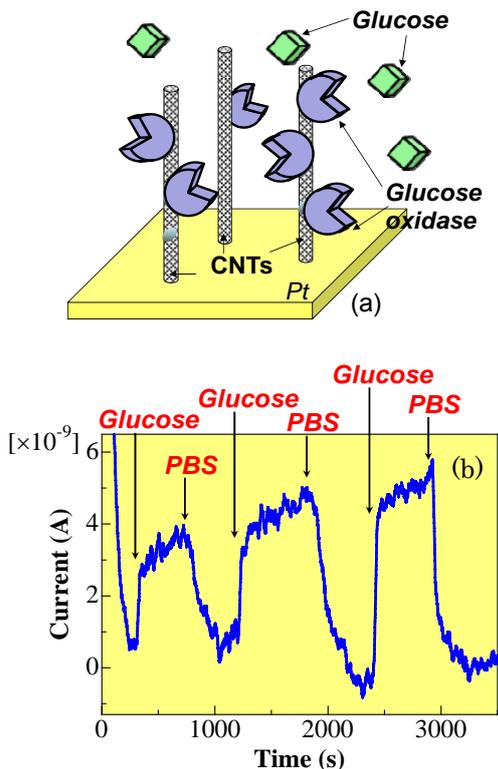


図5 (a)グルコースオキシダーゼをCNT電極を化学修飾し、グルコース検出の模式図、(b)グルコースのリアルタイム検出。グルコースとリン酸バッファー溶液を交互に導入した。

まず、1つのポンプを用いて、リン酸バッファー溶液を導入した状態で測定を開始し、他のポンプを用いて、濃度の異なるグルコースを導入した。グルコース導入後、すぐに電流値の上昇が観察された。次に、リン酸バッファー溶液を導入すると、電流値が減少し、ほぼ、元の電流値に変化した。したがって、グルコースオキシダーゼを修飾したCNT電極は、ポンプに送液されたグルコースを電気化学的にリアルタイムに測定できることを明らかにした。さらに、図5(b)に示すように、グルコースの濃度を変化させ、同様にリアルタイムで測定した。グルコース導入後の酸化電流の信号は、グルコースの濃度に大きく依存していることがわかる。ここで、グルコースの濃度が大きいときに電流の立ち上がりは早くなっているのは、基質濃度が高くなるにつれて、酵素反応の反応速度が大きくなっていることに起因している。以上より、マイクロフローチップを用いることにより、測定中に溶液を交換することが出来、リアルタイムで生体分子を測定できることがわかった。

(2) 図6(a)および(b)に開発したCNT電極多項目免疫センサーの光学顕微鏡像および模式図を示す。

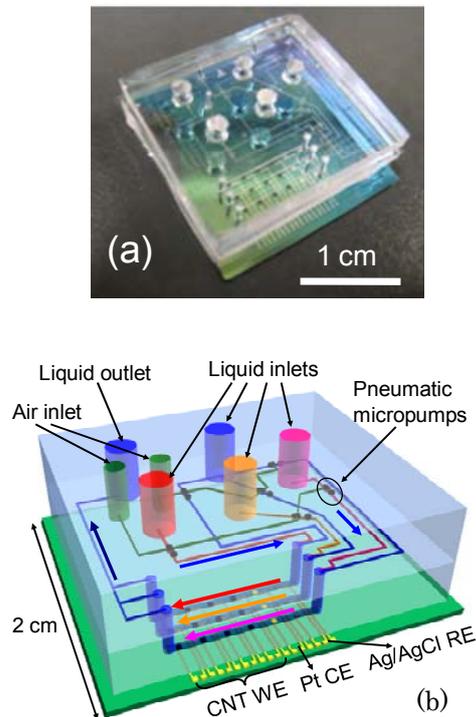


図6 CNT電極多項目免疫センサーの(a)光学顕微鏡像および(b)模式図

このチップには、図 7 に示すように、CNT 電極が 12 個集積化されており、3 つのマイクロチャンネルに分けられている。さらに、マイクロポンプが 6 つ搭載されているため、4 種類の試薬をセンシング部分である CNT 電極上に独自に送液することが可能となっている。したがって、チップ上で、CNT 電極の化学修飾、溶液の導入、電極の洗浄等の全てのプロセスを行うことが出来る。

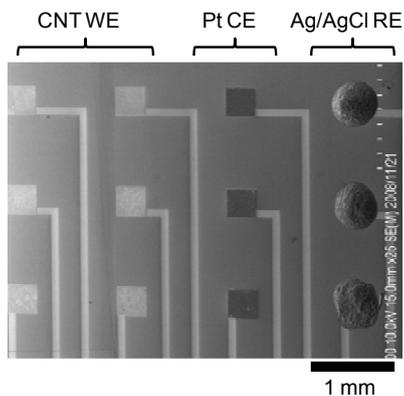


図 7 アレイ化した CNT 電極、白金対抗電極、Ag/AgCl 参照電極

本研究では、上記システムを利用し、2 種類の腫瘍マーカー（前立腺特異抗原：PSA、ヒト絨毛ゴナドトロピン：hCG）のワンチップ測定を行った。まず、複数のマイクロポンプを使い、全ての CNT 電極に linker を導入した後、それぞれの腫瘍マーカーの抗体を別々のチャンネル上に作製した CNT 電極に化学修飾した。次に、別々の導入口から、PSA および hCG を各マイクロチャンネルに送液し、電気化学測定を行った。その結果を図 8 に示す。抗原の導入後、0.45 V 辺りにピークが現れているのがわかる。これは、導入された抗原が CNT 電極上で抗体と反応し抗原抗体の複合体を形成することで、CNT 電極上での電気化学的に活性なアミノ酸が酸化されたためであると考えられる。これにより、作製したチップを用いて PSA および hCG という 2 種類の腫瘍マーカーの検出に成功したといえる。

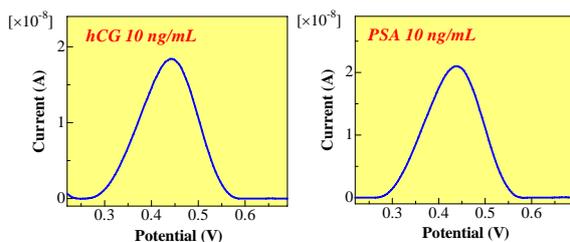


図 8 hCG および PSA 導入後の電気化学信号

以上より、本研究で作製した集積化した CNT 電極を有するマイクロフローチップは、様々な生体分子の検出し、さらにワンチップ上で多項目の分子を検出する可能性があることを示した。さらに、このセンサーは、構造が複雑でなく測定においてもラベリングプロセスを必要としないことから、多項目化の生体分子の自動測定可能なチップへの応用が期待される。

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 2 件）

- ① Yuichi Tsujita, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Miyuki Chikae, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, “Microfluidic and Label-free Immunosensors based on Carbon Nanotube Microelectrodes” Jpn. J. Appl. Phys. 48 (2009) impress. 査読有り
- ② Yuichi Tsujita, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Miyuki Chikae, Soichiro Torai, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, “Carbon Nanotube Amperometric Chips with Pneumatic Micropumps” Jpn. J. Appl. Phys. 47 (2008) 2064-2067. 査読有り

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① Yuichi Tsujita, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Miyuki Chikae, Soichiro Torai, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, “Microfluidic and Label-free Immunosensors based on Carbon Nanotube Microelectrodes”, 21st International Microprocesses and Nanotechnology Conference, October 27 - 30, 2008, Fukuoka, Japan
- ② 前橋兼三, 松本和彦, 「カーボンナノチューブデバイスの作製とバイオセンサーの開発」、第 69 回応用物理学会学術講演会、2008 年 9 月 2～5 日、中部大学、愛知県
- ③ 辻田雄一, 前橋兼三, 松本和彦, 民谷栄一, 虎井総一郎, 近江みゆき, 高村禅, 「微小流体制御されたカーボンナノチューブ電極多項目免疫センサーの開発」、第 55 回応用物理学会関係連合講演会、2008 年 3 月 27～30 日、日本大学、

千葉県

- ④ Yuichi Tsujita, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Miyuki Chikae, Soichiro Torai, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, “Microfluidic Multi-Biosensors Based on Carbon Nanotubes Arrayed Electrodes”, 2008 International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, February 25 - 29, 2008, Melbourne, Victoria, Australia

- ⑤ Yuichi Tsujita, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Hyukchang Kwon, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, “Microfluidic Amperometric Biochips Based on Carbon Nanotube Arrayed Electrodes”, 2007 International Conference on Solid State Device and Materials, September 18 - 21, 2007, Tsukuba, Japan

- ⑥ 辻田雄一、前橋兼三、松本和彦、民谷栄一、虎井総一郎、近江みゆき、高村禪、「カーボンナノチューブ電極を有する微小流体チップを用いた生体分子の検出」、第68回応用物理学会学術講演会、2007年9月4日～8日、北海道工業大学、北海道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前橋 兼三 (MAEHASHI KENZO)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：40229323

(2) 研究分担者

大野 恭秀 (OHNO YASUHIDE)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号：90362623