

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05218

研究課題名（和文）グラフェン透明電極を利用した電気化学発光免疫分析プラットフォームの構築

研究課題名（英文）Development of platform for electrochemiluminescence immunoassay using graphene transparent electrode

研究代表者

渡辺 剛志（Watanabe, Takeshi）

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：30803506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：CVD法により作製したグラフェンを電気化学発光(ECL)測定の透明電極として利用することで、従来の電極に比べ高感度な測定が可能となることを実証した。単層、多層、積層グラフェンの比較から、欠陥の少ない単層グラフェン及び積層グラフェンが高いECL強度を示すことを見出した。単層グラフェンを用いて代表的ながんマーカーとして知られるガン胎児性抗原（CEA）の免疫測定を行い、健常者における正常濃度以下の濃度での測定に成功した。また積層グラフェンを利用することグラフェンの電気特性を損なわずに表面修飾することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、単層のグラフェンが電気化学発光分析用途の電極として優れた特性をもつことを見出した。炭素原子わずか一層のシートが、電気化学発光のような電極表面にラジカル種を生成するプロセスにも適用可能であると示したことはECL分析やグラフェンの電気化学応用の可能性を広げるものである。

グラフェンは資源として豊富に存在する炭素原子が一層のみのシートであるため、使い捨ての電極材料として利用可能である。高感度測定可能な電気化学発光免疫測定にグラフェンを使い捨て電極として利用すれば、高感度測定可能な迅速感検査機器の開発が可能であり、新たな感染症発生時の備えや遠隔地の難病治療などに貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study has demonstrated graphene grown by CVD method allows for highly sensitive electrochemiluminescence-based (ECL) analysis owing to its high optical transparency, compared to the conventional electrode materials. ECL imaging for multilayer graphene revealed multilayer islands showed greater ECL than single-layer domain, while pristine single-layer graphene electrode that has no multilayer islands showed higher ECL intensity than multilayer graphene electrodes. ECL-based immunoassay of a carcinoembryonic antigen (CEA), known as a typical tumor marker, using single-layer graphene transparent electrodes, was successfully demonstrated below the reference concentration level. Furthermore, covalent surface modification of graphene without compromising intrinsic electric properties was successfully demonstrated by utilizing stacked two-layer graphene electrodes.

研究分野：電気化学

キーワード：グラフェン 電気化学発光 免疫分析 POCT ECL 透明電極

1. 研究開始当初の背景

POCT (Point-of-care testing) と呼ばれる患者の近くで行う迅速で簡易な検査が、疾病予防や健康増進の観点から重要視されており、高感度と簡便性を両立する機器開発の需要が高まっている。電気化学発光 (ECL) は電極反応を通して起こる発光現象であり、抗原抗体反応と組み合わせた ECL 免疫分析法 (ECL 法) は高感度な分析方法として知られる。しかし、ECL 法では電極が必要なことから、POCT に対応した機器を開発するためには、使い捨て可能な電極材料の利用が求められる。炭素原子 1 層の導電性シートであるグラフェンは使い捨て電極としてだけでなく、透明電極としても利用できることから、ECL 測定の光度計を電極の背面に置くことができるなどの検査機器の小型化にも利点があり、ECL 法の POCT 化に魅力的な性質をもつ。酸化グラフェン等のフレーク状のものを ECL 法に適用した研究例は数多くあるものの、CVD 法により作製した結晶性の良い透明なグラフェン電極を ECL に応用した報告例は 2 報のみである [1, 2]。ECL 免疫分析応用に至っては報告例のない未開な研究分野である。本研究を開始した当初、我々は CVD グラフェン電極を用いて $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /トリプロピルアミン (TPrA) 溶液系で ECL 測定を行い、酸化インジウムスズ (ITO) 電極と比較してグラフェン電極が共反応物である TPrA の酸化反応に高い活性を示し、発光体である $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ が低濃度であっても発光が生じることを確認した。簡便性と高感度測定を両立した免疫分析システムを実現するためには、ECL 法の電極としての光学的透明性の優位性を明らかにすることと電極表面への抗体や抗原の修飾方法の指針を得ることが重要である。炭素原子で構成されるグラフェンは、強固な共有結合を用いて抗体などを表面修飾することが可能となる。しかしながら、共有結合修飾を行うとグラフェンの π 共役系のネットワークが崩れるため、グラフェン本来の高い電気伝導性が損なわれてしまうことが課題である。

2. 研究の目的

本研究はグラフェン透明電極をプラットフォームとする高感度かつ簡便な ECL 免疫分析システムを構築するため、以下の研究項目を通し機能界面の設計指針を確立することを目的とする。

- (1) グラフェン透明電極の基礎評価
- (2) ECL 応用に適したグラフェンの検討
- (3) グラフェン表面への分子修飾法の検討
- (4) グラフェン透明電極を用いた ECL 免疫測定

3. 研究の方法

- (1) グラフェン透明電極の基礎評価

CVD 法により銅基板上に成長温度 1000°C でグラフェン膜を作製し、作製したグラフェンを PMMA 支持転写法により石英ガラス基板上に転写した。電気化学測定用の導通コネクタとしてグラフェン上に金を蒸着し、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /TPrA 溶液系で ECL 測定を行った。代表的な炭素材料電極であるグラッシーカーボン (GC) 電極と代表的な透明導電膜材料である ITO 電極と比較し、単層グラフェン電極の ECL 分析応用に向けた電極特性を評価し、その光学的透明性の有用性について調べた。

- (2) ECL 応用に適したグラフェンの検討

ECL 測定に適したグラフェン電極を調べるため、多層グラフェン電極の ECL 顕微観察を行った。また単層グラフェン電極と多層グラフェン電極及び積層グラフェンとの比較を通し、ECL 応用に適したグラフェンの検討を行った。

- (3) グラフェン表面への分子修飾法の検討

グラフェンに共有結合性の分子修飾を行うと sp^2 炭素の π ネットワークが崩れるため、導電性の低下を招いてしまう可能性がある。そこで 2 枚の単層グラフェンが重なった積層グラフェンを利用することを考えた。積層グラフェン及び単層グラフェンを作製し、ジアゾニウム塩の電気化学還元を利用してグラフェン表面にニトロフェニル基修飾を行った。単層及び積層グラフェンの表面修飾前後で van der Pauw 法によりホール効果測定を行い、電荷輸送特性を評価した。

- (4) グラフェン透明電極を用いた ECL 免疫測定

代表的ながんマーカーであるがん胎児性抗原 (CEA) を測定対象物質として、磁性ビーズを利用したサンドイッチ法により単層グラフェン電極を用いた免疫測定を行った。

4. 研究成果

- (1) グラフェン透明電極の基礎評価と ECL 応用に適したグラフェンの検討

図 1 に CVD 法により作製した単層グラフェンのラマンスペクトルを示す。2700 cm^{-1} 付近の 2D ピークが単一のローレンツ関数成分で構成され、G ピークとの強度比の 2D/G が 3.17 と高い値が観測されるなどの単層グラフェンの特徴が得られた。また図 2 の透過率が 97% 以上の高い値を示したことから、結晶性の良い単層グラフェンの作製が確認された。図 3 に単層グラフェン、ITO、GC 電極での ECL 測定結果を示す。グラフェン電極では、2 通りの光検出器配置で測定を行った。光検出器を電気化学セル上部に配置した場合と比べ、電極の直下に配置した場合は ECL 強度

が2倍以上となり、グラフェン電極の光学的透明性がECL分析における利点となることが実証された。グラフェン電極では、GC電極と同様に2段形状のECL曲線が得られ、ITO電極に比べ高いECL強度が得られた。Ru(bpy)₃²⁺の酸化反応が生じない1.1 Vより低い電位領域でのECLは、電極上でのRu(bpy)₃²⁺の酸化を必要としないECLプロセスによるものである[3]。このプロセスはRu(bpy)₃²⁺が低濃度であってもECLを生じることからECL免疫分析応用に魅力的な性質といえる。実際に、Ru(bpy)₃²⁺の検出下限濃度をITO電極と比較すると、グラフェン電極とGC電極では2桁以上の低濃度条件でもECLを検出することが可能であった(図3c)。このように僅か原子一層のシートであるにもかかわらず、グラフェンはGC電極に類似した電気化学的挙動を示し、さらに光学的透明性を活用することでGC電極よりも高いECL強度を示すことを明らかにした。

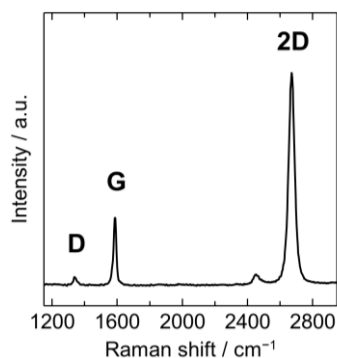


図1 単層グラフェンのラマンスペクトル

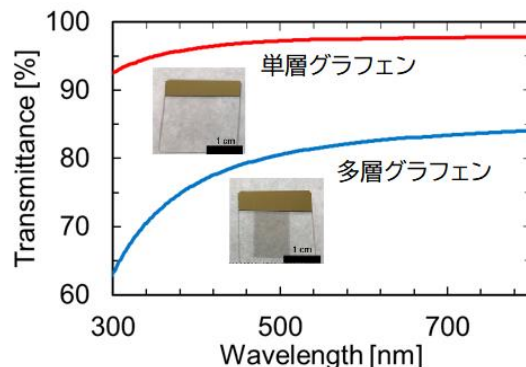


図2 単層及び多層グラフェンの透過率スペクトル (写真) 作製した単層及び多層グラフェン電極

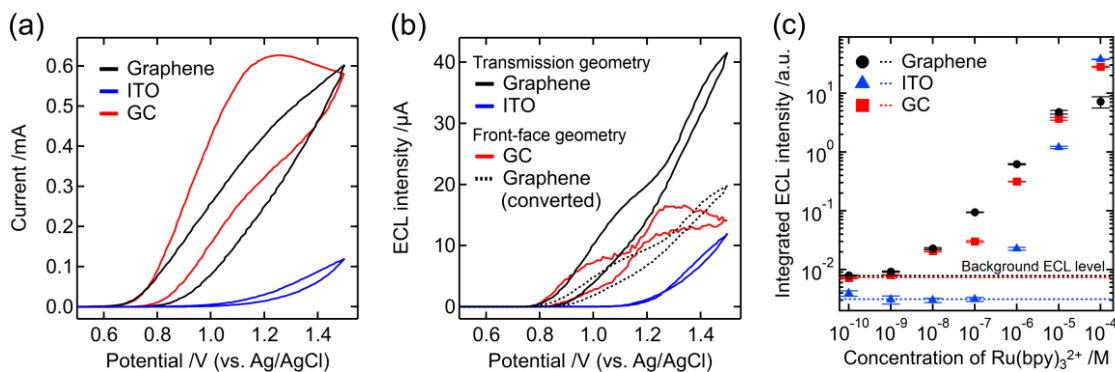


図3 (a) 1 μM Ru(bpy)₃Cl₂と0.1 M TPrAを含むPBSでのCV曲線と(b) ECL強度-電位曲線(c) ECL強度のRu(bpy)₃Cl₂濃度依存性 (TPrA濃度: 0.1 M)

(2) ECL 応用に適したグラフェンの検討

ECL 応用に適したグラフェン電極を探索するため、CVD 法により島状の多層領域を有する多層グラフェン透明電極を作製し(図2)、ECL 顕微観察を行った。図4に示す光学顕微鏡像とラマンスペクトルより、作製した多層グラフェンは数 μm の多層島が単層グラフェンを介して密に連なった構造である。この多層グラフェン膜を用いてECL測定を行いながら顕微観察すると、単層領域よりも多層領域の発光強度が高いことが確認された(図5)。しかし、多層グラフェン電極のECL測定結果を単層グラフェンと比べると、透過率の差によるECL増加分を差し引いても単層グラフェン電極のほうが高いECL強度を示すことが明らかとなった(図6)。この違いはTPrA酸化の起こりやすさの違いに起因しており、欠陥の少ない単層グラフェンがTPrAの酸化に適していると考えられる。そこで単層グラフェン電極にUVオゾン処理を行い、UVオゾン処理時間とECL強度の相関を調べた。その結果、UVオゾン処理の時間の増加に伴い欠陥量が増加すると、ECL強度が低下することが確認された。一方、欠陥が導入されない程度の短時間

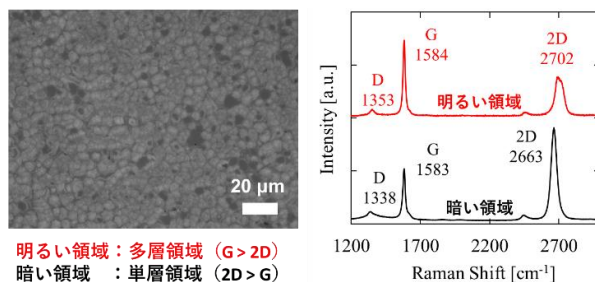


図4 多層グラフェンの顕微鏡像とラマンスペクトル

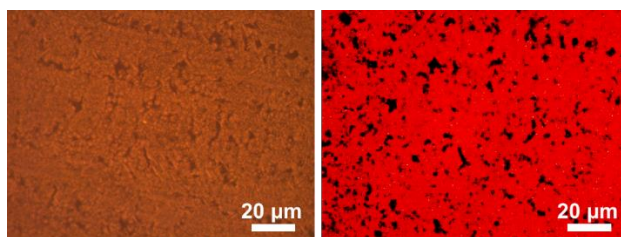


図5 多層グラフェンの顕微鏡像(左)とECL像(右)

のUV オゾン処理を行うと、ECL 強度の著しい増加が確認された。これらの結果より、ECL 応用には清浄な表面を持つ欠陥の少ないグラフェン電極が適していることが分かった。そこで、単層グラフェンを2回転写することで作製する2層積層グラフェンを作製し、単層グラフェン電極と比較した。積層グラフェンは単層と同様に欠陥の少ない表面を有しながら単層グラフェンよりも低いシート抵抗を持つ(表1)。図7にECL測定結果を示す。抵抗が減少したことにより、積層グラフェンは単層グラフェンよりも大きいTPrA酸化電流が流れ、より高いECL強度を示した。

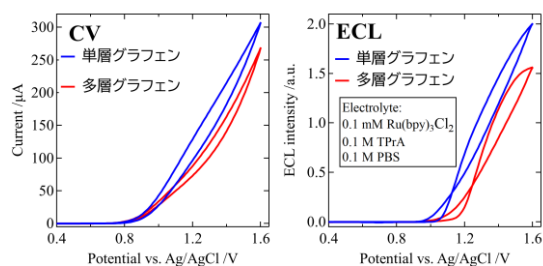


図6 CV-ECL測定結果 -単層と多層の比較-

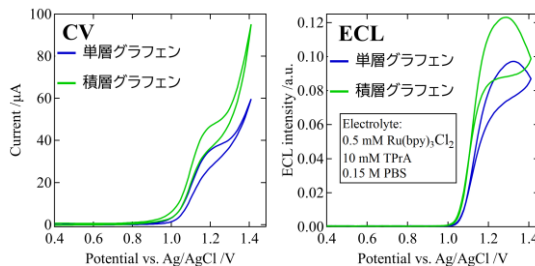


図7 CV-ECL測定結果 -単層と積層の比較-

(3) グラフェン表面への分子修飾法の検討

表1に積層グラフェンと単層グラフェンにニトロフェニル基を共有結合修飾した前後でのホール効果測定の結果を示す。表面修飾後の単層グラフェンでは π 共役ネットワークが崩れ一部導通パスが切断されたため測定することができなかった。一方、積層グラフェンでは表面修飾したことでキャリア移動度が減少したものの、キャリア密度の増加が確認され、シート抵抗が減少した。これは上層のグラフェンシートだけにニトロフェニル基が結合し、下層のグラフェンシートの π 共役系が崩れずに高い導電性が維持されているためと考えられる(図8)。またキャリア密度が向上したことから、電子求引性のニトロ基がグラフェンの電子を引き寄せp型ドーピング作用をもたらしたと考えられる。

表1 表面修飾前後のグラフェン電極のホール効果測定の結果

	単層グラフェン		積層グラフェン	
	修飾前	修飾後	修飾前	修飾後
シート抵抗 [Ω/sq]	650	N/A	520	430
移動度 [$\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$]	1510	N/A	1680	840
キャリア密度 [$\text{cm}^{-2}\times 10^{12}$]	6.4	N/A	7.3	17

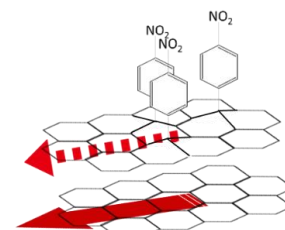


図8 積層グラフェンへの共有結合性修飾の影響

(4) グラフェン透明電極を用いたECL免疫測定

健康な人間の正常濃度範囲である5 ng/ml以下の濃度のCEAをビオチン化CEA抗体と $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 標識CEA抗体と混合し振盪しながら30分間インキュベートした。その後、ストレプトアビジン磁性ビーズと結合させ、10 mM TPrAを含む0.15 M PBSを用いて磁性ビーズを洗浄した。洗浄排液を用いてECL測定を行い、ECL強度がバックグラウンドレベルになるまで洗浄を繰り返した。洗浄後、磁性ビーズをグラフェン電極表面に移し、10 mM TPrAを含む0.15 M PBSを用いて1.45 V vs Ag/AgClの定電位を印加し、ECL強度を測定した。図9にECL測定結果を示す。1.45 Vを印加している間(5~35 s)、ECL強度の増加が観測された。そのECL強度がCEAの濃度に比例して増加したことから、グラフェン電極を用いたECL測定が、がんマーカーCEAの定量測定に利用できることが確認された。

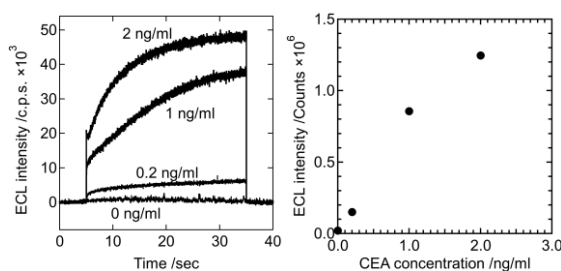


図9 CEAのECL免疫分析の結果

以上よりECL免疫分析に向けてグラフェン電極の有用性を実証し、積層グラフェンをベースとする電極機能の設計指針を示した。グラフェンをECL免疫分析の使い捨ての透明電極に使うことで高感度測定と迅速簡易検査を両立する免疫分析機器の開発が期待できる。

<引用文献>

1. N.L. Ritzert et al., *Faraday Discuss.*, **172**, 666-669 (2014).
2. T.C. Cristarella et al., *Langmuir*, **31**, 3999-4007 (2015).
3. W. Miao et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14478-14485 (2002).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miki Keishu, Watanabe Takeshi, Koh Shinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Electrochemical Characterization of CVD-Grown Graphene for Designing Electrode/Biomolecule Interfaces	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Crystals	6. 最初と最後の頁 241 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cryst10040241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sakurai Atsushi, Niki Masaya, Watanabe Takeshi, Sawabe Atsuhito, Koh Shinji	4. 巻 59
2. 論文標題 Reusability of Ir(111)/ -Al2O3(0001) substrates in graphene chemical vapor deposition growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 S11D01 ~ S11D01
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ab7f1a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuromatsu Sho, Watanabe Takeshi, Nonoguchi Yoshiyuki, Kawai Tsuyoshi, Koh Shinji	4. 巻 736
2. 論文標題 Development of poly (methyl methacrylate)-supported transfer technique of single-wall carbon nanotube conductive films for flexible devices	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thin Solid Films	6. 最初と最後の頁 138904 ~ 138904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tsf.2021.138904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Takeshi, Ishikawa Ryohei, Hara Natsumi, Iwasaki Takamitsu, Miyachi Mamoru, Shiigi Yusei, Takahashi Mayu, Kuroki Daichi, Koh Shinji	4. 巻 138
2. 論文標題 Single-layer graphene as a transparent electrode for electrogenerated chemiluminescence biosensing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Electrochemistry Communications	6. 最初と最後の頁 107290 ~ 107290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.elecom.2022.107290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 石川 遼平、岩崎 貴充、渡辺 剛志、黄 晋二
2. 発表標題 迅速簡易免疫検査に向けたグラフェン電極の電気化学発光特性評価
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Natsumi Hara, Takeshi Watanabe, Takamitsu Iwasaki, Shohei Kosuga and Shinji Koh
2. 発表標題 Comparison between mono- and multi-layer CVD-grown graphene transparent electrodes for electrochemiluminescence applications
3. 学会等名 32nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎 貴充, 渡辺 剛志, 原 菜摘, 黄 晋二
2. 発表標題 ECLイメージングを利用したグラフェン透明導電膜の局所分析
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 菜摘, 渡辺 剛志, 岩崎 貴充, 小菅 祥平, 黄 晋二
2. 発表標題 CVDグラフェン透明電極における電極表面の性質と電気化学発光特性の相関
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryohei Ishikawa, Natsumi Hara, Takamitsu Iwasaki, Takeshi Watanabe, and Shinji Koh
2. 発表標題 Evaluation of electrochemiluminescence properties of graphene transparent electrodes for rapid and simple testing
3. 学会等名 2021 International chemical congress of pacific basin societies (PACIFICHEM 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusei Shiigi, Ryohei Ishikawa, Takeshi Watanabe, and Shinji Koh
2. 発表標題 Improved electrochemiluminescence behavior of CVD-grown graphene electrode by UV/ozone treatment
3. 学会等名 2021 International chemical congress of pacific basin societies (PACIFICHEM 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 椎木 優成、石川 遼平、渡辺 剛志、黄 晋二
2. 発表標題 CVDグラフェン電極へのUV/オゾン前処理が電気化学発光特性に与える効果
3. 学会等名 電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 遼平、渡辺 剛志、岩崎 貴充、黄 晋二
2. 発表標題 電気化学発光免疫分析応用に向けたグラフェン透明電極の評価
3. 学会等名 電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坪内 克樹、渡辺 剛志、黄 晋二
2. 発表標題 ジアゾニウム塩還元による共有結合修飾を施した単層及び積層グラフェンの電気化学特性評価
3. 学会等名 電気化学秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------