

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02540

研究課題名(和文)金ナノ粒子触媒活性を用いた超高感度デジタル電気化学発光バイオセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of Sensitive digital electrochemiluminescent biosensor using catalytic activity of gold nanoparticles

研究代表者

民谷 栄一 (TAMIYA, Eiichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・ラボ長

研究者番号：60179893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：金ナノ粒子がトリスTrisやTricineと共存して溶存酸素から活性酸素を生成するナノ触媒として機能し、ルミノールエレクトロケミルミネセンスで評価できることを新たに見出した。形状の異なるナノフラー構造の金ナノ粒子も作成し、表面積の増加や表面状態の違いの影響を評価できた。次に、集積化された電極アレイを用いて検討したところ、160pLに相当する容量で触媒活性を確認できた。その中には、50nmの金ナノ粒子6000個分が含まれており、 μm オーダーの微小化により金ナノ粒子を10個単位まで計測できる。我々の開発した金ナノ粒子の触媒活性に着目した電気化学発光を用いてデジタル分子計測を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金ナノ粒子の有する触媒活性に着目してこれを電気化学発光の誘発と連携させたバイオセンサーに関して発展させたもので、世界的にも初めてのオリジナルな成果である。また、電気化学発光の有意なイメージング解析や発光計測に伴う高感度な分子レベルの計測への発展を期待できるもので、作成したマイクロ電極アレイを用いた発光イメージングデバイスにより明らかにしたことは、学術的にも大変意義が高い。この成果はバイオセンサーとして種々の診断分子マーカーを超高感度(分子レベル)に測定するデバイスとして発展できるもので、医療診断、食品計測、環境計測などへの計測基盤技術として社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We newly discovered that gold nanoparticles coexist with Tris and Tricine and function as nanocatalysts that generate active oxygen from dissolved oxygen, and that they can be evaluated by luminol electrochemiluminescence. Gold nanoparticles with nano-fuller structures with different shapes were also prepared, and the effects of the increase in surface area and the difference in surface conditions could be evaluated. When we investigated using an integrated electrode array, we were able to confirm catalytic activity in a volume equivalent to 160 pL. It contains 6,000 gold nanoparticles of 50 nm, and can measure up to 10 gold nanoparticles by micronization. We were able to demonstrate digital molecular measurement using electrochemiluminescence focusing on the catalytic activity of gold nanoparticles.

研究分野：バイオセンサー

キーワード：金ナノ粒子 電気化学発光 バイオセンサー デジタルデバイス ヘルスケア

1. 研究開始当初の背景

水溶液条件で金ナノ粒子単独で Tris, Tricine などのアミノ基を有する化合物の存在下で溶存酸素から活性酸素種が触媒的に生成することを見出しており、これと電気化学発光センサーと連携させたバイオセンサーへの応用を進めていた。

2. 研究の目的

金ナノ粒子の調製条件により触媒活性や電気化学発光を評価し、高い活性を有する金ナノ粒子の形状に関する知見を得る。さらに微小容量を有するマイクロチャンバー内に極微量の金ナノ粒子の分布が反映される条件で測定できれば、デジタル量として絶対濃度計測が実現可能な超高感度なバイオセンサーを開発するための基盤技術に開発を目指した。

3. 研究の方法

ナノフラワー構造の金ナノ粒子 (AuNF) は、四塩化金酸を還流させながら攪拌し、四塩化金酸を加え2%クエン酸三ナトリウム溶液で 30 分反応させてシードを作成した。ヒドロキシルアミン塩酸塩を加え 30 分間攪拌すると青紫色に変化する。超純水で 3 回遠心分離で調製した。作成した AuNF は、DLS、UV-Vis 分光計および SEM で評価した。マルチウェル電極はフォトリソグラフィー及びスパッタリングによって作製した。作成プロセスを図 1 に示す。作成したマルチウェル電極の構造は、図 2A-C に示されている。なお、ポジ型フォトレジスト (AZ4330-RS、Merck)、マスクアライナー (MA-20、MIKASA)、現像液 (AZ-400、Merck) スパッタリングシステム (ACS4000、ALVAC) を使用した。電気化学発光計測には、印刷電極 EP-P(BDT 社製)を測定には BDTeCL(BDT 社製)を用いた。

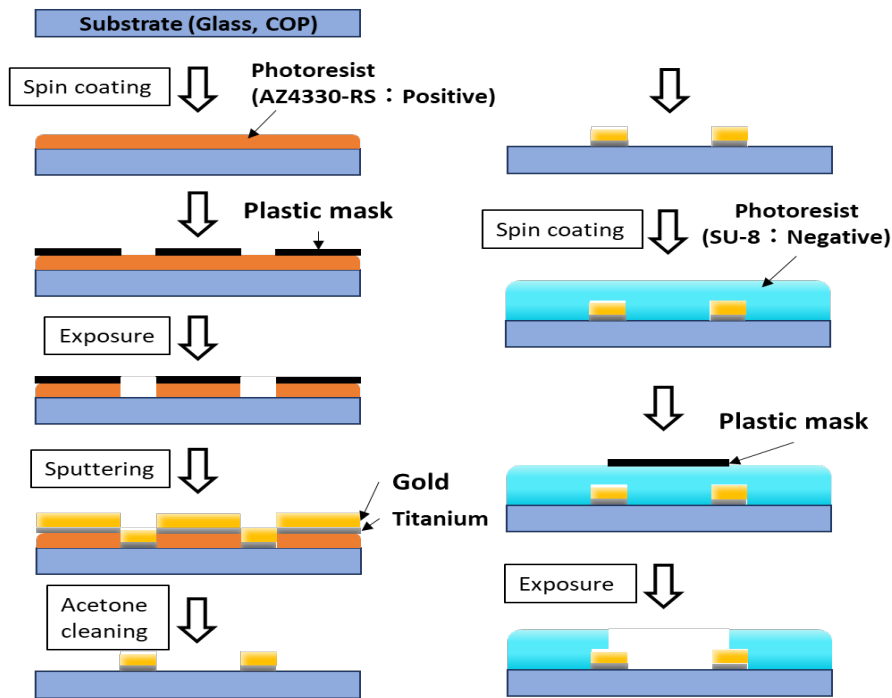


図 1 マルチ電極チャンバーアレイの作成プロセス

4. 研究成果

4-1 金ナノ構造の触媒活性

大きさや形状の異なる金ナノ粒子の活性を調べた。図 2 に、球形で大きさの異なる (5、15、30、50、400 nm) と新たに合成した AuNF の電気化学活性を示した。1個あたりの活性は、大きさが大きくなるほど大きくなった(図 2 A,C)。そこで大きさに応じた表面積を球形近似で計算し、比較したところ、15nm サイズが最も大きな活性を示した(図 2 B)。このことは、単純に表面積によるだけでなく、大きさによって触媒活性の単位活性が異なることを示すものとしても興味深い。作製した AuNF(図2)は、球状の AuNP よりも1個あたりで高い活性を有することも示された(図 2 C)。AuNF は、AuNP に比べて凹凸のある表面形態であり、より大きな表面積が得られる。さらに、表面の微細構造は、A 触媒活性の増加にも寄与する可能性もある。AuNF を使用することで信号を増感することも期待された。

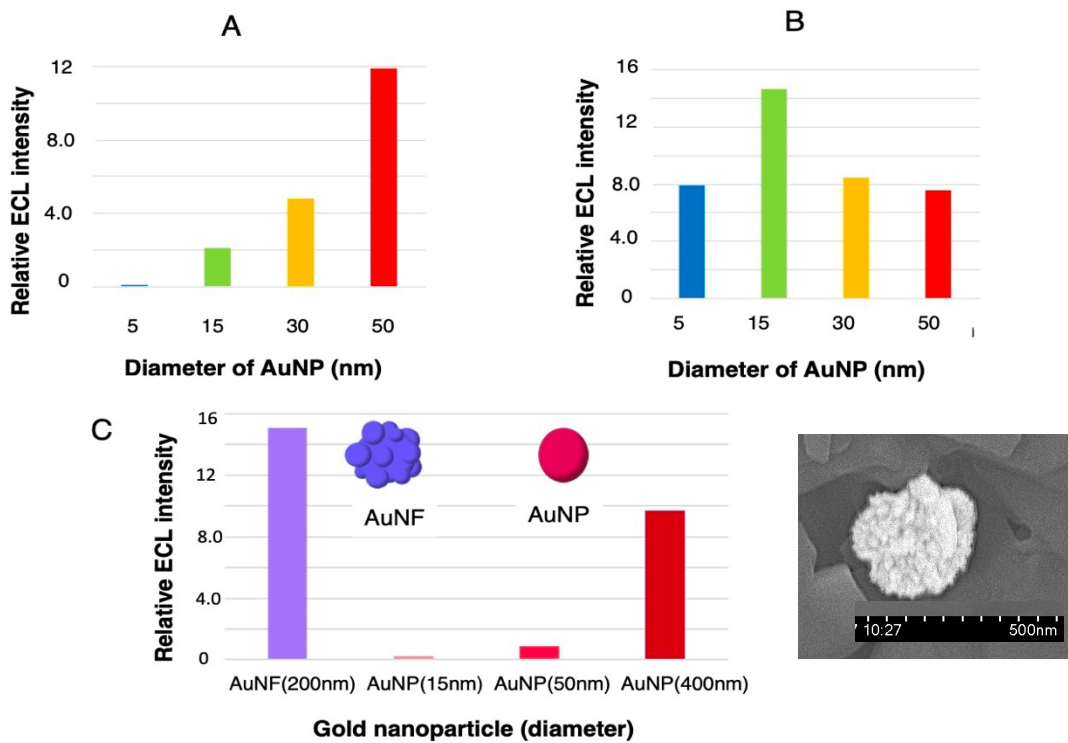


図2 直径 5 ~ 50 nm のさまざまな金ナノ粒子の触媒活性の比較

(A) 金ナノ粒子 1 個あたりの活性 (B) 単位表面積あたりの活性 (C) AuNF および AuNP のナノ粒子 (15、50、400 nm) の 1 個あたりの活性比較 SEM 像は、合成した AuNF を示す。ECL は、印刷電極を用いて LSV モードで 0-800 mV の範囲で 50 mV/s 走査速度で測定。

4-2 マイクロチャンバー電極アレイを用いたデジタル分析

次に、マイクロチャンバー電極のアレイを作成し、デジタル分析に向けた超微量での測定について検討をした。2 種類の電極パターン A、B を作成した(図3-1)。パターン A は、各ウェルの直径は 200-1000 μm で、電極への接続端子が 1 箇所集約されている。パターン B は、直径が 50-400 nm のウェルがあり、端子接続はウェルのサイズによって独立している。これらのウェルの大きさと容積は図 4 に示した。今回の作成では、ウェルの最小が 50 μm で、容積が約 39pL であった(図 3-2)。

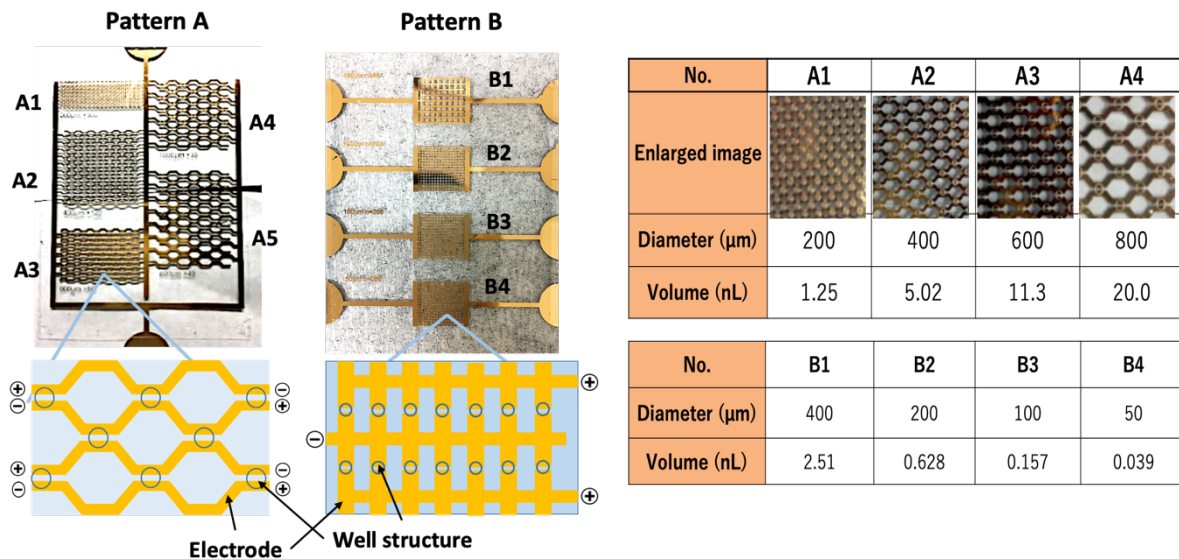


図3 作成した電極チャンバーアレイ

図 4 は、電極アレイチップの構造の明視野像(A)及び金ナノ粒子の触媒活性の ECL 像 (B,C) を示している。また、ECL 画像(C)の 12 個の輝点の時間経過とピーク強度をそれぞれ(D)と(E)としてプロットした。これによりマイクロチャンバーに配置される金ナノ粒子の活性をチャンバーごとに計測できることが示された。パターンB3は、 $100\ \mu\text{m}$ のサイズで $160\ \text{pL}$ の容量となるが、今までの結果から触媒活性を観測できるのは、 50nm の金ナノ粒子 6000 個となるため、単一粒子での活性が 10 倍の高い 400nm の AuNP、 20 倍活性の高い AuNF を用いれば、数 10 個程度までの感度になる。B4 に示すように $50\ \mu\text{m}$ サイズの大きさでは、 40pL となり、デジタル分析に向けての可能性がより高くなることを示している。こうしたシステムを用いれば、超高感度なバイオセンサーを開発できることを示している。

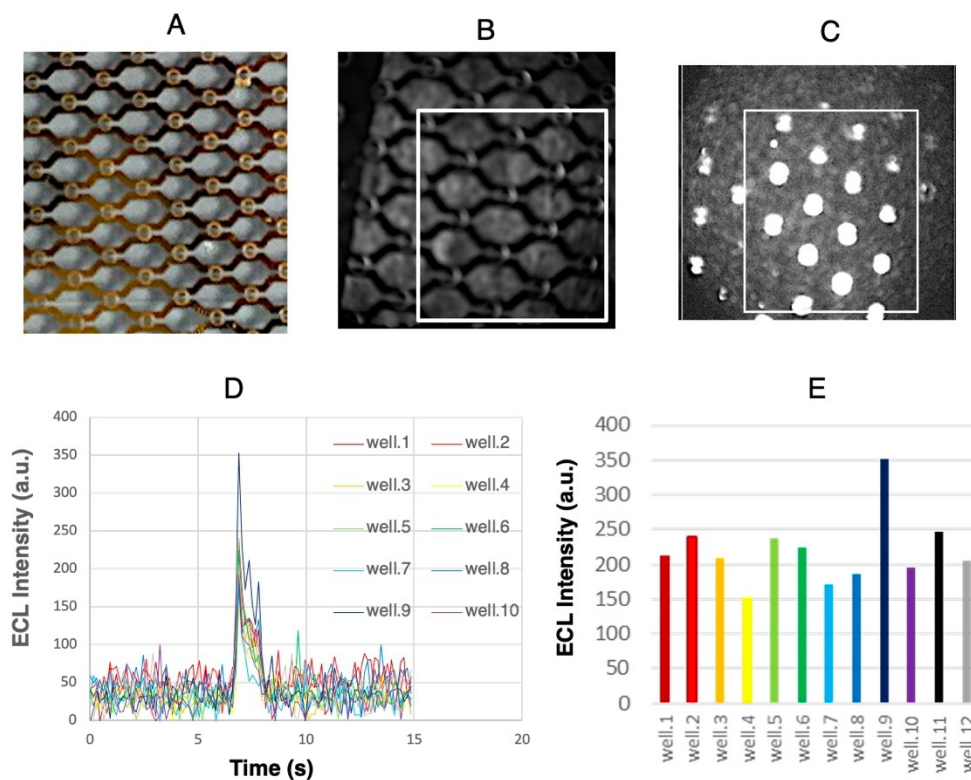


図 4 電極アレイチップの構造の明視野像(A)及び金ナノ粒子の触媒活性の ECL 像 (B,C) ECL 画像(C)の 12 個の輝点の時間経過とピーク強度をそれぞれ(D)と(E)としてプロット。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shu Jiang, Wilfred V. Espulgar, Xi Luo, Masato Saito*, Hiroyuki Yoshikawa, Eiichi Tamiya	4. 巻 88(3)
2. 論文標題 SERS active hierarchical nanopillar-huddle array fabricated via the combination of nanoimprint lithography and anodization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 165-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/electrochemistry.19-00072	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 該当する
1. 著者名 Riyaz Ahmad Mohamed Ali, Daiki Mita, Wilfred Espulgar, Masato Saito*, Masayuki Nishide, Hyota Takamatsu, Hiroyuki Yoshikawa, Eiichi Tamiya	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Single Cell Analysis of Neutrophils NETs by Microscopic LSPR Imaging System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines 2020	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11010052	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 Ric John L. Ombid, Glenn G. Oyong, Esperanza C. Cabrera, Wilfred V. Espulgar, Masato Saito, Eiichi Tamiya, and Romeric F. Pobre	4. 巻 11(10)
2. 論文標題 In-vitro study of monocytic THP-1 leukemia cell membrane elasticity with a single-cell microfluidic-assisted optical trapping system ,	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 6027-6037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.402526	査読の有無 無
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 Yuko Gondoh-Noda, Mitsuhiro Kometani, Akihiro Nomura, Daisuke Aono, Shigehiro Karashima, Hiromi Ushijima, Eiichi Tamiya, Toshinori Murayama and Takashi Yoneda	4. 巻 8(9)
2. 論文標題 Feasibility of a Novel Mobile C-Reactive Protein-Testing Device Using Gold-Linked Electrochemical Immunoassay: Clinical Performance Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMIR mHealth and uHealth	6. 最初と最後の頁 e18782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2196/18782.	査読の有無 無
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 Xi Luo, Chen Zhu, Masato Saito, Wilfred Villariza Espulgar, Xiaoming Dou, Yuhei Terada, Ain Obara, Sachiyo Uchiyama, and Eiichi Tamiya	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Cauliflower-Like Nanostructured Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor Chip for Cytokine Detection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 123-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20200088	査読の有無 無
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 Shuto Osaki, Shin-ichi Wakida, Masato Saito, Eiichi Tamiya	4. 巻 193(5)
2. 論文標題 Towards On-site Determination of Secretory IgA in Artificial Saliva with Gold-Linked Electrochemical Immunoassay (GLEIA) Using Portable Potentiostat and Disposable Printed Electrode	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Biochemistry and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1311-1320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12010-020-03332-8	査読の有無 無
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 Jonathan Briones, Wilfred Espulgar, Shohei Koyama, Hyota Takamatsu, Eiichi Tamiya, Masato Saito	4. 巻 28(9)
2. 論文標題 The future of microfluidics in immune checkpoint blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 895-910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-020-00248-7	査読の有無 無
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 Jonathan C. Briones, Wilfred V. Espulgar, Shohei Koyama, Hiroyuki Yoshikawa, JeongHoon Park, Yujiro Naito, Atsushi Kumanogoh, Eiichi Tamiya, Hyota Takamatsu, and Masato Saito	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 A Microfluidic Platform for Single Cell Fluorometric Granzyme B Profiling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theranostics	6. 最初と最後の頁 123-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/thno.37728	査読の有無 無
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 Wilfred Villariza Espulgar, Masato Saito, Kazuya Takahashi, Sakiko Ushiro, Norihisa Yamamoto, Yukihiro Akeda, Shigeto Hamaguchi, Kazunori Tomono, and Eiichi Tamiya	4. 巻 21(4)
2. 論文標題 Deskilled and rapid drug-resistant gene detection by centrifugal force-assisted thermal convection PCR device	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s21041225	査読の有無 無
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 Hiroki Ide, Wilfred Villariza Espulgar, Masato Saito, Taiki Aoshi, Shohei Koyama, Hyota Takamatsu, Eiichi Tamiya	4. 巻 330
2. 論文標題 Profiling T cell interaction and activation through microfluidics-assisted serial encounter with APCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B	6. 最初と最後の頁 129306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2020.129306	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Espulgar Wilfred・齋藤 真人・小山 正平・高松 漂太・民谷 栄一
2. 発表標題 1 細胞分泌因子の分離分析に向けた遠心操作型マイクロ流路チップの検討
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羅 希・寺田 侑平・齋藤 真人・民谷 栄一
2. 発表標題 Plasmonic biosensor for single-cell level interleukin-6 detection
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wilfred Espulgar, Masato Saito, Shohei Koyama, Hyota Takamatsu, Eiichi Tamiya
2. 発表標題 Efficient PDMS through-hole membrane fabrication for microwell-based bioassay utility
3. 学会等名 2021年第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 民谷栄一
2. 発表標題 COVID-19診断とバイオセンサ
3. 学会等名 2021年第68回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 民谷栄一
2. 発表標題 コロナ時代を生き抜く産業を支える素材と技術 “ 先端バイオセンシング 技術の基礎と最近の動向 ”
3. 学会等名 高分子学会 2020 年度 印刷・情報・電子用材料研究会講座
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 民谷栄一
2. 発表標題 COVID-19 診断技術とバイオセンサー
3. 学会等名 応用物理学会第11回市民講座（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	斉藤 真人 (SAITO Masato) (80457001)	大阪大学・工学研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------