

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05300

研究課題名(和文) 平行平板電極による高安定な電気化学インピーダンスバイオセンサの作製と応用

研究課題名(英文) Fabrication and Application of Highly Stable Electrochemical Impedance Biosensors with Parallel Plate Electrodes

研究代表者

大貫 等 (OHNUKI, Hitoshi)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：60223898

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)：インピーダンス計測型バイオセンサは、抗原抗体反応などの特異吸着反応を検知する強力な測定法である。しかし、測定チップ毎のばらつきが非常に大きく、この点が実用性を大きく阻んできた。本研究では、独自に開発したマイクロギャップ平行平板電極を本センサに適用することで高い再現性が得られることを唾液中コルチゾール濃度測定より示した。電流分布シミュレーション解析から、マイクロギャップ平行平板電極における高再現特性が得られる理由を解明した。さらに、本センサでは標準法であるELISA測定と同等の結果を10分間程度で得ることが可能であり、これは4-5時間を要するELISAと比べて非常に迅速であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康長寿社会の実現には客観的な指標による健康管理が不可欠である。唾液は手軽に採取できる検体であり、コルチゾールをはじめとする多くのバイオマーカーを含んでいる。従って、唾液は日常的なモニタリングによる健康管理に非常に適していると言える。しかし、唾液中の多くのバイオマーカーは数nM以下という極めて低濃度であるため、血液などの高濃度検体に比して未だ十分に活用されていない。本研究で開発されたバイオセンサは、コルチゾールといった比較的小さな分子に対しても非常に高い感度を持ち、再現性にも優れていることが唾液検体において実証された。本センサの開発により、唾液による健康管理デバイスの可能性が拓かれたと考える。

研究成果の概要(英文)：Impedance-based biosensors are powerful measurement methods for detecting specific adsorption reactions such as antigen-antibody reactions. However, the significant variability among measurement chips has greatly hindered their practicality. In this study, we demonstrated that by applying our newly developed micro-gap parallel plate electrodes to this sensor, high reproducibility can be achieved for the measurement of salivary cortisol concentration. Furthermore, our sensor is capable of obtaining results comparable to the standard method, ELISA measurement, in approximately 10 minutes, which is significantly faster compared to the 4-5 hours required by ELISA. Through current distribution simulation analysis, we have elucidated the reasons behind the high reproducibility achieved with the micro-gap parallel plate electrodes.

研究分野：応用物理学

キーワード：バイオセンサ 抗原抗体反応 電気化学インピーダンス分光法 免疫センサ 唾液

1. 研究開始当初の背景

本研究で取り上げる電気化学インピーダンス(EIS) 法によるバイオセンサは、アレルギー検査、病原菌検知、DNA 解析等の先端医療分野での適用範囲が極めて広く、将来の発展可能性が高いことから、近年急速に研究が進められている。このタイプのセンサは、選択的な吸着反応(抗原-抗体反応、DNA ハイブリダイゼーション等の特異吸着反応)を非標識で検知する原理に基づいている。すなわち、EISは溶液/電極界面のインピーダンスを直接測定することで、分子吸着による電気抵抗や電気容量の変動を検知する。しかし不安定な定量性、小さなターゲット分子に対する信号の弱さ、非特異吸着によるシグナル再現性低下などの問題が指摘されていた。特に大きな問題となっているのは、センサチップ毎の特性変動が非常に大きく、実際の使用を考えるとチップ毎の校正が必須となってしまう点であり、これがセンサの実用化を大きく阻んでいた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発した電極間隔を極限まで近づけた平行平板電極を用いることにより、高感度化と高安定性・高選択性を両立する画期的な解決手法を確立する。この電極は2枚の平板電極を数 μm 程度の狭い電極間隔で平行に配置させた電極構造を有し、平滑な電極表面に電流が均一に分布することから高い再現性が期待できる。また、狭い電極間隔であるため酸化還元サイクルの高効率化がなされ、高感度計測も可能であると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では以下の項目を研究期間内に行う:a. 有限要素法による電流密度シミュレーション、b. 電極基板の作製とセンサ特性の評価、c. 2 電極基板の作製と評価および差分による非特異吸着成分の除去、d. 唾液検体中のコルチゾール濃度測定への応用。

研究は研究代表者の大貫と研究協力者の遠藤英明(東京海洋大学・教授)、大学院生で行う。大貫はこれまでに微細櫛形電極の開発、EIS バイオセンサの作製に精通していることから大学院生と共に a-d の全てに参加する。遠藤はこれまで各種免疫センサの開発を手がけ、この分野のエキスパートであることから d. に参加する。

4. 研究成果

a. 有限要素法による電流密度シミュレーション

有限要素法計算ソフト(COMSOL Multiphysics) を用いて、代表的な高感度測定用電極である櫛形電極と本研究で開発した平行平板電極における電流密度シミュレーションを行った。図1は両電極の断面方向でのシミュレーション結果である。これによると櫛形電極(図1a)においては電流はエッジの角部に一点集中する一方、広い平滑な平面部分にはほとんど分布していないことが分かる。このような電流分布は、測定上の安定性には非常に不利に働く。なぜならエッジの角部は基板作製時にエッチングやリフトオフで最も構造が乱される箇所であるが、電流が集中するために信号への寄与が最大となり、反対に均一で滑らかな構造の平面部分には電流がほとんど流れておらず、この理想的な表面での反応は信号としてほとんど反映されないからである。くし形電極のチップ毎のばらつきが大きいのは、このような不適切な箇所での反応を信号化していることが原因ではないかと考えられる。一方、平行平板電極では滑らかな電極平面上に均一に電流密度が分布することが分かる(図1b)。すなわち、理想的な表面での抗原抗体反応が信号化されていると考えられ、再現性の高いセンサ特性が期待できる。

b. 電極基板の作製とセンサ特性の評価

a.の結果を踏まえ、我々は図2のような平行平板構造を持つ電極を開発した。これはガラス基板上に真空蒸着法とリソグラフィーで形成した円板形のパターン電極の縁を $5 \mu\text{m}$ 厚の SiN 絶縁層で覆い、その2枚を重ね合わせてできる $10 \mu\text{m}$ の隙間をレドックスプローブ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ を含む溶液で満たした平行平板構造となっている。

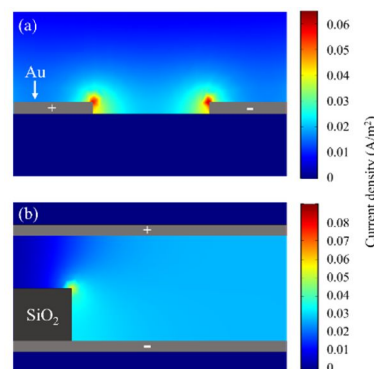


図1 櫛形電極 (a) および 平行平板電極 (b)における電流密度シミュレーション結果

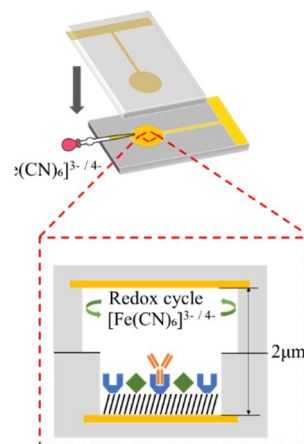


図2 平行平板電極の概略

楕形電極 (IDE)と平行平板電極(PPE)のセンサ特性を比較するため、各タイプ 3 個のチップ上にヒト免疫グロブリン G (IgG) と特異吸着する Protein G を固定化して IgG センサを構成し、それらの特性を調べた。図 3 は各濃度の IgG 標準濃度溶液と反応させたセンサの電荷移動抵抗 R_{ct} (初期値を 1 として規格化) をプロットした校正曲線である。全てのチップが 10^{-13} - 10^{-7} g/mL の IgG 濃度範囲で対数濃度に比例した直線的な増加を示し、この範囲においてセンサとして振る舞う事が分かる。しかし二つのタイプのセンサの出力特性にはかなり違いがある。すなわち、くし形電極は各チップ間で大きく傾きが異なるためチップ間の特性の違いが明瞭となる一方、平行平板電極はほぼ同一直線に沿った特性となることから、ばらつきが非常に小さく抑えられていることが分かる。この結果は理想的な表面での反応を最大化するように電流分布をコントロールすることで、特性上の不安定性を効果的に抑制できることを示している。

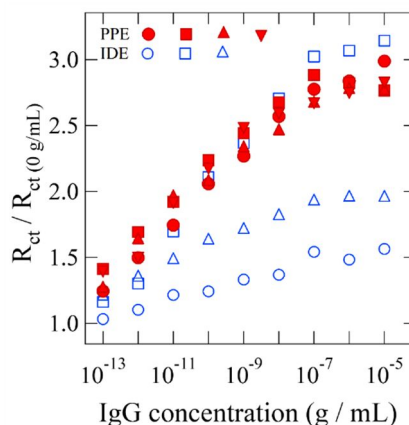


図 3 PPE と IDE のセンサ特性

c. 電極基板の作製と評価および差分による非特異吸着成分の除去

同一基板上に二つの電極を蒸着し、前節と同様に電極の縁を厚さ 5 μm の SiN で覆った。その 2 枚の電極を向かい合わせに重ね合わせることで 10 μm のギャップを持つ 2 電極平行平板基板を形成した(図 4)。2 電極基板の一方をセンサ電極(コルチゾール抗体+ブロッキング, A), 他方をブランク電極(ブロッキングのみ, B)として表面修飾し、差分 (A-B) による非特異吸着成分の除去を試みた。この差分操作を行うには基板上の 2 電極が同一のセンサ特性を有している必要がある。2 電極を同一の抗体修飾した基板を用いてこの点を確認したところ、ほぼ同一の特性を示すことが分かった。従って、この 2 電極センサを用いて差分処理を行うことができることが確認された。

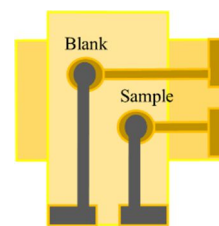


図 4 2 電極 PPE センサ基板

表面修飾の異なる電極 A, B のコルチゾール標準溶液に対する応答を調べたところ、B はわずかに信号強度を示し、ブランク電極においてこの程度の非特異吸着が生じることが分かった(図 5, 図 6)。しかし、実際に唾液試料に対して差分処理を行ったところ、信号強度が弱くなりすぎてしまい、基準とする ELISA 測定値から大きく外れてしまうことが分かった。ここでは、電極 A におけるブロッキング分子で覆われている面積比を別の手法で評価し、その比に応じた非特異吸着の寄与を差し引く処理を行った。この結果が示唆するのは、単純な差分処理では不十分であるという事実である。我々はこの原因を次のように推定している。ブロッキング表面(ブランク)と抗体+ブロッキング表面(センサ)では吸着メカニズムが大きく異なっており(例えば前者では平滑なブロッキング表面となっているためクラスター化したコルチゾールが吸着する等)、これをセンサ表面での非特異吸着モデルとするのは不適切であり、両者の単純な差分処理で非特異吸着成分をキャンセルできない。結論として、非特異吸着のみを効率的に除去する表面の洗浄方法などのアプローチを取った方が実際的であろうと思われる。

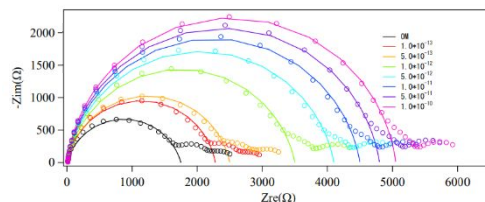


図 5 センサ電極 A

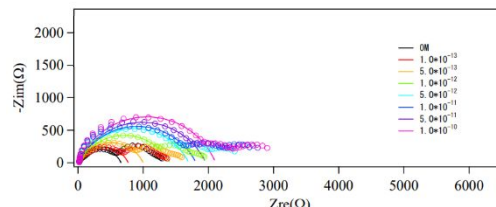


図 6 ブランク電極 B

d. 唾液検体中のコルチゾール濃度測定への応用

本項目では実際にヒトの唾液検体採集を行い、そこに含まれるコルチゾール濃度を、開発した EIS センサと ELISA で測定を行い、両者の結果を比較することで、標準技術である ELISA に対する EIS センサの性能を評価した。

具体的には濃度が既知のコルチゾール標準試料を作製し、得られた EIS スペクトルから電荷移動抵抗を計算して濃度 vs. 電荷移動抵抗変化率の検量線を作成した。この検量線をもとに、1000 倍希釈した唾液試料での電荷移動抵抗変化率を計測して唾液中のコルチゾール濃度を推定した。濃度推定結果は、唾液中コルチゾールの定量として確立されている ELISA 測定の結果と比較し評価した。作製したセンサの濃度変化特性を図 7 に示す。縦軸に 0 mol/L に対する電荷移動抵抗の変化率(10⁻¹⁰ mol/L での変化を 100 %とした)をとり、横軸にコルチゾール濃度を対数表示で示している。この検量線に各唾液試料における表面抵抗変化率(図中の緑の四角)を当てはめ、濃度推定を行った。この推定結果と同試料における ELISA 測定結果との比較を図 8 に示す。ここでは縦軸に採取した唾液試料番号、横軸にコルチゾール濃度(mol/L)を示している。図 8 から明らかなように、

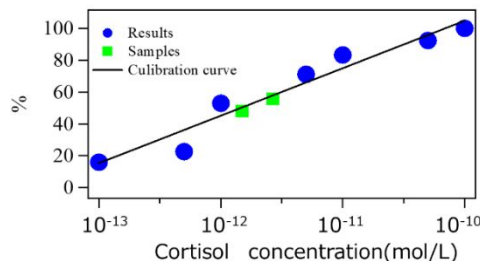


図 7 検量線と 1000 倍希釈

EIS は標準的な ELISA の測定結果に準拠した定量精度を与えることが分かった。

唾液サンプルを 1000 倍希釈した際、コルチゾールは濃度 pmol/L レベルで存在していることが確認されている。そのため、検査時間の短縮のために 1, 3, 5, 10, 15 分の反応時間における、標準試料コルチゾール (10^{-12} mol/L) の変化率を計測した。図 10 に、縦軸に反応時間 0 分の抵抗値に対する変化率、横軸に反応時間を示す。変化率は、反応時間 5 分以降で一定となっており、この時間程度で反応が飽和していることが分かる。このことは、EIS 全体の測定時間として 10 分程度で終了できることを示している。

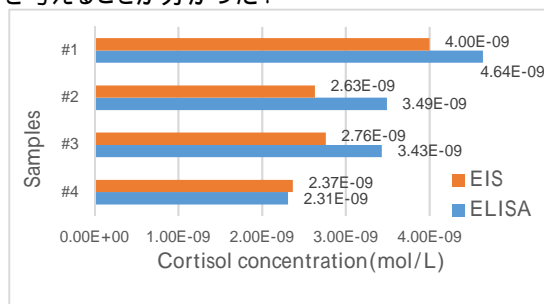


図 8 インピーダンス型センサと ELISA 型センサによる唾液中コルチゾール濃度測定結果

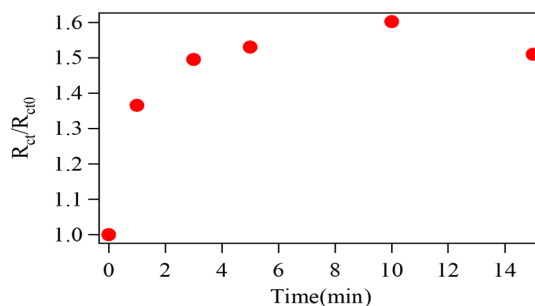


図 9 EIS 型コルチゾールセンサの時間依存性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 Haruka Honda, Yusuke Kusaka, Haiyun Wu, Hideaki Endo, Daiju Tsuya, and Hitoshi Ohnuki | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Toward a Practical Impedimetric Biosensor: A Micro-Gap Parallel Plate Electrode Structure That Suppresses Unexpected Device-to-Device Variations | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 10854-11520 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c06942 | 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 大貫 等 | 4. 巻 55 |
| 2. 論文標題 電気化学インピーダンス型バイオセンサのばらつきを抑える電極デザイン | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 細胞 | 6. 最初と最後の頁 41-43 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 Wu Haiyun, Saito Yusuke, Yoshizaki Goro, Yoshiura Yasutoshi, Ohnuki Hitoshi, Endo Hideaki | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Study on the development of carbon nanotube enhanced biosensor for gender determination of fish | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Sensing and Bio-Sensing Research | 6. 最初と最後の頁 100474 ~ 100474 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sbsr.2022.100474 | 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 Costa de Oliveira Maida Aysla, D'Epifanio Alessandra, Ohnuki Hitoshi, Mecheri Barbara | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Platinum Group Metal-Free Catalysts for Oxygen Reduction Reaction: Applications in Microbial Fuel Cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Catalysts | 6. 最初と最後の頁 475 ~ 475 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/catal10050475 | 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 Wu Haiyun, Saito Yusuke, Yoshiura Yasutoshi, Ohnuki Hitoshi, Endo Hideaki | 4. 巻 154 |
| 2. 論文標題 Development of an enzyme-functionalized immunosensor for measuring maturation-inducing hormone in fish | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal | 6. 最初と最後の頁 107460 ~ 107460 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bej.2019.107460 | 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 Wu Haiyun, Ogata Madoka, Ohnuki Hitoshi, Endo Hideaki | 4. 巻 87 |
| 2. 論文標題 Development of biosensor for measuring oxidative stress of fish | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Fisheries Science | 6. 最初と最後の頁 151 ~ 159 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01484-4 | 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 Wu Haiyun, Yamada Kazuki, Murata Masataka, Matsumoto Haruto, Ohnuki Hitoshi, Endo Hideaki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 A novel interactive biosensor system for real-time remote stress response monitoring and visualization by using bi-directional data link | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics: X | 6. 最初と最後の頁 100133 ~ 100133 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biosx.2022.100133 | 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 Shibata Takayuki, Nakamura Kota, Nozaki Shu, Iwaizumi Hiroki, Ohnuki Hitoshi, Moritomo Yutaka | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Optimization of electrode parameters of Na Co[Fe(CN)6]0.88/Na Cd[Fe(CN)6]0.99 tertiary battery | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Sustainable Materials and Technologies | 6. 最初と最後の頁 e00483 ~ e00483 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.susmat.2022.e00483 | 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 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 森慶太郎, 柴田恭幸, 呉海云, 遠藤英明, 津谷大樹, 丸山由貴, 大貫等 |
| 2. 発表標題 唾液中コルチゾールを検出するEIS型バイオセンサの開発 |
| 3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤城 志遥、張 民芳、津谷 大樹、呉 海云、遠藤 英明、大貫 等 |
| 2. 発表標題 カーボンナノチューブによるコルチゾールバイオセンサの性能向上 |
| 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 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 慶太郎, 柴田 恭幸, 呉 海伝, 遠藤 英明, 津谷 大樹, 丸山 由貴, 大貫 等 |
| 2. 発表標題 唾液中コルチゾールを検出するEIS型バイオセンサの短時間計測 |
| 3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大貫 等, 森 慶太郎, 柴田 恭幸, 呉 海云, 遠藤 英明, 津谷 大樹, 丸山 由貴 |
| 2. 発表標題 マイクロギャップ平行平板電極による電気化学インピーダンスバイオセンサ : 唾液中コルチゾール濃度計測への応用 |
| 3. 学会等名 電気学会 基礎・材料・共通部門 誘電・絶縁材料研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村田一樹, 柴田恭幸, 呉海云, 遠藤英明, 津谷大樹, 大貫等 |
| 2. 発表標題 コルチゾールセンサの作製CV型、DPV型、EIS型の比較 |
| 3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第12回 CSJ化学フェスタ 2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 慶太郎, 柴田 恭幸, 呉 海伝, 遠藤 英明, 津谷 大樹, 丸山 由貴, 大貫 等 |
| 2. 発表標題 唾液中コルチゾールを検出するEIS型バイオセンサの研究 |
| 3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 村田 一樹, 柴田 恭幸, 呉 海云, 遠藤 英明, 津谷 大樹, 大貫 等 |
| 2. 発表標題 3種の電気化学測定法を用いたコルチゾールバイオセンサの構築と比較 |
| 3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keita Mori, Takayuki Shibata, Hitoshi Ohnuki, Haiyun Wu, Hideaki Endo, Daijyu Tsuya, Yuki Maruyama |
| 2. 発表標題 Development of EIS biosensors for rapid cortisol determination in saliva |
| 3. 学会等名 13th International Conference on Nano-Molecular Electronics |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hitoshi Ohnuki, Keitaro Mori, Takayuki Shibata, Haiyun Wu, Hideaki Endo, Daijyu Tsuya, Yuki Maruyama |
| 2. 発表標題 Development of EIS based biosensor for rapid cortisol determination in saliva |
| 3. 学会等名 33rd Anniversary world congress on biosensors (BIOSENSORS 2023) |
| 4. 発表年 2023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 |
|-------|-----------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 遠藤 英明 (ENDO Hideaki) | | |

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 |
|---------|---------|