

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：24403
 研究種目：基盤研究 B
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21350044
 研究課題名（和文） 金ナノ粒子被覆マイクロビーズの導電性を利用する新規検出法の開発
 研究課題名（英文） Development of a Novel Conductivity Detection Technique using Microbeads Coated with Gold Nanoparticles
 研究代表者
 長岡 勉 (NAGAOKA TSUTOMU)
 大阪府立大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：00172510

研究成果の概要（和文）：

本研究では金ナノ粒子をコートした導電性樹脂ビーズを応用する電気的検出法を開発した。樹脂ビーズの導電性は表面に修飾したリガンド層とターゲット分子との結合により変化することが確認できた。このことから、導電性マイクロビーズを用いることにより電気的に対象物質の定量操作が可能となることが分かった。従来、このような操作は ELISA 法などの煩雑かつ複雑な機器の使用が前提となることが多かったが、本法により、簡便な機器構成で同様の定量が可能となることが示された。

研究成果の概要（英文）：

In this research project, we have developed a novel detection system using plastic microbeads, which was coated with gold nanoparticles. The gold nanoparticle coated beads had an electrical conductivity ranging from 30 to a few mega ohm, and ligand coating was made on the gold layer by the self-assembly process. We have confirmed that the formation of a ligand-analyte linkage led to an increase in the electrical resistance of the microbeads.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：化学センサ、金ナノ粒子、マイクロビーズ

1. 研究開始当初の背景

最近のナノ技術のめざましい発展に伴い、その成果を分析化学に応用する試みも多数みられる。ただし、これら技術の実用化には依然多くの障壁が存在することも事実である。本研究は、ナノ技術の中でも進展著しい金属ナノ粒子を要素材料として選択し、これをマイクロ技術と融合して分析化学に応用す

る。この手法により提案課題の速やかな実用化を目指した。

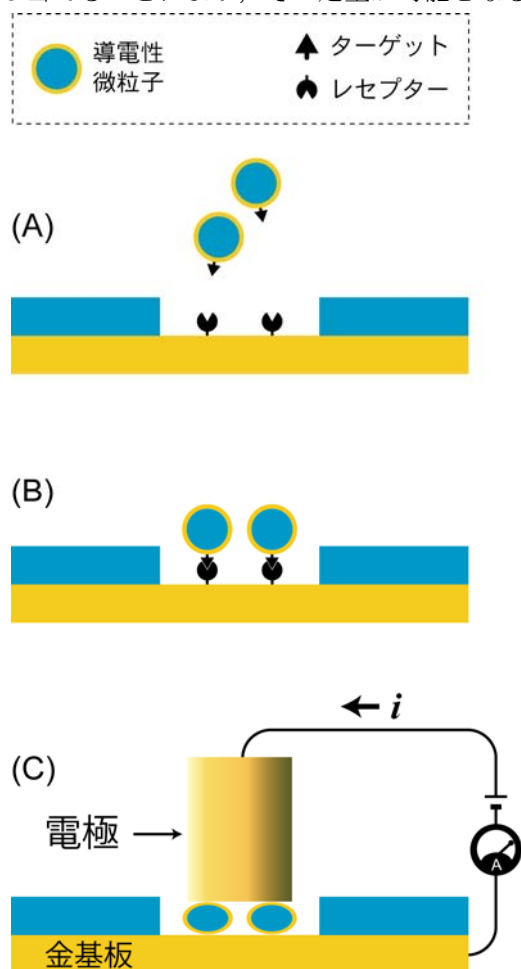
2. 研究の目的

本研究の目的は、蛍光測定や表面プラズモン共鳴法などの高感度計測法に対して、十分な競争力を有する計測技術を開発することにある。提案手法は特定の化学反応・相互作用

に限定されないため、この手法を汎用的なセンシング・プラットフォームとして実用化することが目標である。

3. 研究の方法

ここで開発する電流型検出法は、蛍光検出などの分光学手法と比べ、機器価格、運用コスト、さらに機器の小型化・操作性の面において高い競争力を有する。図1はこの新規手法の概要を示したもので、マイクロメートル径の導電性ビーズを用いることに特がある。現在、このビーズとして金ナノ粒子で被覆した樹脂ビーズを用いているが、この金ナノ粒子層は検出段階において導電性を確保すると共に、ターゲットやレセプタ分子修飾のための足場としても利用する。導電性基板に捕捉されるビーズの数はターゲット分子の濃度に比例しており、基板にプローブ電極を押し当てることにより、その定量が可能となる



(図1C)。

図1 提案手法の概要 (A)ターゲット分子を導電性基板に固定(吸着, 自己組織化などにより)し, レセプタで修飾したマイクロビーズを加えて, (B)ビーズを基板に固定する。(C)その後プローブ電極を降ろして電流を測定する。

この測定法は基本原理が単純であり, 高価なラベル試薬も用いない。また, 樹脂ビーズはサブミクロンにまで微小化することが可能であり, 高密度なアレイチップの作製に際しても技術的障壁が小さい。

本研究ではマイクロビーズの導電性が重要な因子となる。アルキルチオールは金ナノ粒子の接着剤として機能する。すなわち, そのアルキル鎖はマイクロビーズ(ポリスチレン製)の表面を膨潤させ, これにより, チオールがビーズに固定される。その結果, 金ナノ粒子はチオールのイオウ原子を介してビーズ表面に固定される。表面のナノ粒子同士はアルキル鎖により隔てられており, 強固な結合状態にはない。従って, ナノ粒子はビーズの変形に追従でき, 無電解メッキ法のような金属層の破断は起こらない。また, このビーズは遠心分離などの負荷にも強い。

ナノ粒子層の導電性はチオールの分子・に相関があり (T. Nagaoka et al., *Chem. Commun.*, 1038, 2003), これはナノ粒子間の距離がチオールのアルキル鎖で決定されるためである。実際, チオールの分子(C4→C7)を変化させるだけでビーズ1個当たりの抵抗を $10^1 \rightarrow 10^7 \Omega$ に変化させることが可能であった。

4. 研究成果

未修飾ビーズアレイの電気抵抗は 30Ω であった。導電性ビーズにビオチンを修飾させると電気抵抗は 180Ω となった。これは, ビオチンの持つチオール基がビーズ表面の金属層に結合し, ビオチンの単分子膜を形成するためと考えられる。ビーズに修飾したビオチンにローダミン標識化ストレプトアビジンを結合させた後の電気抵抗は更に $2 \text{ k}\Omega$ 以上増大した。蛍光顕微鏡観察の結果, ローダミンに基づく蛍光像が得られたことから, アビジンがビオチンと結合したことが確認でき, このことから, アビジンの結合によりビーズ表面の絶縁層が増大することで電気抵抗が増大したものと考えられる。以上のことから, 導電性ビーズの電気抵抗に着目することで, 抗原-抗体の特異反応に基づく検出が簡易かつ迅速に達成される可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① S. Tokonami, Y. Yamamoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: A review", *Anal. Chim. Acta*, **716**, 76-91, 2012, DOI: 10.1016/j.aca.2011.12.025, 査読有
- ② S. Tokonami, S. Shirai, I. Ota, N. Shibutani, Y. Yamamoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, "Electrical and thermal properties of conducting

microbead prepared by green electroless plating method using gold nanoparticles”, *J. Electrochem. Soc.*, **158**, D689-D693, 2011, DOI: 10.1149/2.022112jes, 査読有

- ③ R. Morita, R. Inoue, S. Tokonami, Y. Yamamoto, M. Nakayama, H. Nakao, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Organic-inorganic Hybrid Nanoraspberry Consisted of Gold Nanoparticle and Aniline Oligomer”, *J. Electrochem. Soc.*, **158**, K95-K100, 2011, DOI: 10.1149/1.3549166, 査読有
- ④ S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications”, *Anal. Chim. Acta*, **641**, 7-13, 2009, DOI: 10.1016/j.aca.2009.03.035, 査読有
- ⑤ M. Iwamoto, S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Activity enhancement of a screen-printed carbon electrode by modification with a gold nanoparticle for glucose determination”, *Research on Chemical Intermediates*, **35**, 913-930, 2009, DOI: 10.1007/s11164-009-0074-0, 査読有
- ⑥ S. Tokonami, Y. Yamamoto, Y. Mizutani, I. Ota, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Green Electroless Plating Method Using Gold Nanoparticles for Conducting Microbeads: Application to Anisotropic Conductive Films”, *J. Electrochem. Soc.*, **156**, D558-D563, 2009, DOI: 10.1149/1.3240594, 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① T. Nagaoka, H. Shiigi, S. Tokonami, Y. Yamamoto, “Plastic Microbeads Coated with Au Nanoparticles for Analytical Applications”, ICAS2011, 2011 年 5 月 24 日 (京都国際会議場)
- ② 宮下尚之, 水谷祐太, 山本陽二郎, 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「金被覆バイオビーズの作製」, 第 71 回分析化学討論会, 2010 年 5 月 16 日 (松江)
- ③ T. Miyashita, Y. Mizutani, S. Tokonami, Y. Yamamoto, H. Shiigi, and T. Nagaoka, “Plastic microbeads coated with Au nanoparticles for analytical applications”, 16th ICFIA, 2010 年 4 月 28 日 (Pattaya, Thailand)
- ④ 床波志保, 溝畑裕己, 椎木 弘, 長岡 勉, 「過酸化ポリピロールを用いるペプチドセンサの開発」, 電気化学会第 77 回大会, 2010 年 3 月 29 日 (富山大学)
- ⑤ 床波志保, 溝畑裕己, 椎木 弘, 長岡 勉, 「金ナノ粒子アレイ膜を利用したラベルフリーな電氣的 DNA 検出」, 第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム, 2009 年 12 月 7 日 (横浜市開港記念会館)

- ⑥ 床波志保, 溝畑裕己, 椎木 弘, 長岡 勉, 「DNA フローアナリシスのためのナノ粒子電気抵抗検出器の開発」, 第 48 回フローインジェクション分析講演会, 2009 年 11 月 27 日 (大阪府立大学)
- ⑦ 溝畑裕己, 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「分子鑄型過酸化ポリピロール膜を用いた QCM 検出器の開発」, 第 48 回フローインジェクション分析講演会, 2009 年 11 月 27 日 (大阪府立大学)
- ⑧ 長岡 勉, 「金ナノ粒子アレイを用いる電流検出法の開発」, 同志社大学第 29 回分野別研究講演会, 2009 年 10 月 24 日, 同志社大学
- ⑨ 長岡 勉, 「センサー開発と流れ分析」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ⑩ 太田 至, 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「HPLC を用いた皮膚成分測定」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ⑪ 森田亮輔, 床波志保, 山本陽二郎, 椎木 弘, 長岡 勉, 「有機-無機ハイブリッドナノラズベリーの作製と特性評価」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ⑫ 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「金ナノ粒子架橋構造を利用した電気抵抗型 DNA センサの開発」, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日, 北海道大学高等教育機能開発総合センター
- ⑬ S. Takeda, S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Performance Assessment of Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors by Using Flow Injection Techniques”, FLOW ANALYSIS XI, 2009 年 9 月 14 日 (Mallorca)
- ⑭ S. Tokonami, I. Ota, S. Shirai, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Development of Electrical DNA Detection System by Using Open Bridge-Structured Gold Nanoparticle Array”, FLOW ANALYSIS XI, 2009 年 9 月 14 日 (Mallorca)
- ⑮ S. Tokonami, I. Ota, S. Shirai, H. Shiigi, T. Nagaoka, “Open Bridge-Structured Gold Nanoparticle Film for Electrical DNA Detection”, EURO ANALYSIS 2009, 2009 年 9 月 9 日 (Convention center, Innsbruck)
- ⑯ 水谷祐太, 太田 至, 床波志保, 山本陽二郎, 椎木 弘, 長岡 勉, 「低環境負荷ナノめっき法による導電性ビーズの作製とその特性評価」, 第 70 回分析化学討論会, 2009 年 5 月 16 日 (和歌山大学)
- ⑰ 床波志保, 椎木 弘, 長岡 勉, 「金ナノ粒子の分析化学的応用」, 第 70 回分析化学

- 討論会, 2009年5月16日(和歌山大学)
- ⑱床波志保, 水谷佑太, 太田 至, 山本陽二郎, 椎木 弘, 長岡 勉, 「低環境負荷ナノめっき法により作製した導電性ビーズの表面および電気特性評価」, ナノ学会第7回大会, 2009年5月9日(東京大学)

[図書] (計4件)

- ① S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Elsevier B. V., “Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications”, 2012, 73-89, 印刷中.
- ② T. Nagaoka and H. Shiigi, Nova Science Publishers, Inc., “An Environmentally-friendly Plastic Coating Technique Using Gold Nanoparticles for Nanoelectronic Device Applications in Environmentally Harmonious Chemistry for the 21th Century”, Chapter 9, 2010, 163-179.
- ③ N. Uehara and T. Nagaoka, WILEY-VCH, “Gold-polymer Nanocomposites for Bioimaging and Biosensing in Nanocomposites”, Chapter 6, 2010, 199-240.
- ④ S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, WILEY-VCH, “Nanostructured Thin Films and Surfaces”, Volume 5, Chapter 5, 2009, 175-202.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 勉 (NAGAOKA TSUTOMU)
大阪府立大学・工学研究科・教授

研究者番号 : 00172510

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

椎木 弘 (SHIIGI HIROSHI)
大阪府立大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 70335769