

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32410

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26288074

研究課題名(和文) 金属ナノアロイ分散カーボン薄膜電極の開発と腸疾患糖マーカーの一括測定への応用

研究課題名(英文) Development of metal nanoalloy embedded carbon film electrode and its application for sugar markers of intestinal permeability test

研究代表者

丹羽 修 (Niwa, Osamu)

埼玉工業大学・先端科学研究所・教授

研究者番号：70392644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸疾患糖マーカーの非標識での高感度・簡便な検出を目的とし、高い電極触媒活性を有する合金ナノ微粒子(ナノアロイ)が分散したカーボン薄膜電極を開発した。アンバランストマグネトロン(UMB)共スパッタ法を用いて、ニッケルと銅の組成比(Ni/Cu)の異なるナノアロイが埋め込まれたカーボン薄膜電極を形成し、合金化により腸疾患糖マーカーの感度と安定性が向上することを確認した。また、カーボン膜内のナノアロイ濃度を最適化し、高速液体クロマトグラフィーの電気化学検出器に応用して、5種類の糖マーカーの一括分離検出を行ったところ、従来の金電極を2ケタ程度凌駕する検出限界を達成した。

研究成果の概要(英文)：We report the fabrication of a nickel (Ni)-copper (Cu) bimetallic nanoalloy embedded carbon film electrode with the unbalanced magnetron (UBM) co-sputtering in order to detect clinical sugar markers of intestinal diseases. The sensitivity and stability of the electrode for detecting clinical sugar markers were greatly improved by changing Ni/Cu ratio. Then, the concentration of Ni/Cu nanoalloy was optimized and applied for an electrochemical detector of high performance liquid chromatography. As a result, the detection limits of 5 kinds of clinical sugar markers was greatly improved by 2 order of magnitude compared with conventional Au electrode.

研究分野：分析化学、電気化学

キーワード：電気化学分析 ナノアロイ カーボン薄膜 スパッタリング 腸疾患マーカー 糖類検出

1. 研究開始当初の背景

近年、腸粘膜障壁の透過性が様々な症状に関与することが分かってきた。例えば、腸損傷による透過性増加は、セリアック病、食物アレルギー、非ステロイド性抗炎症薬の摂取などとの相関性が高い。一方、透過性低下は栄養失調、吸収不良の一因となっている。そのため、胃腸疾患の臨床診断において、腸の透過性測定は今後益々重要になってくる。腸透過性の指標としては、尿中に排泄される分子量の異なる非代謝性糖分子(D-マンニトールやラクツロース)を測定する手法が一般的である。

糖化合物は光吸収を示さない構造的特徴のため、屈折率や蒸発光散乱、電気化学法が一般的な分析法である。なかでも電気化学法は、金属電極の触媒作用を利用することで非標識に高感度な糖類測定が可能であるため、多用されている。しかしながら、現在用いられている貴金属電極(金など)は電極触媒活性が低く、さらに夾雑物質による電極汚染を受けやすいためパルス電位印加による電極表面の洗浄と再生が必要であった。その結果、感度と検出限界が不足していた。一方、我々は、白金、銅、ニッケル等とカーボンを共スパッタすると、電極触媒活性の高い金属ナノ粒子が分散したカーボン薄膜電極を形成でき、過酸化水素や糖類の高感度な定量ができることを報告した。この技術を応用することで、腸疾患マーカーに対して高い感度を実現できる可能性があるが、単一金属のナノ粒子では、電気化学触媒活性がそう高くなく、高感度化が難しかった。

2. 研究の目的

本研究では、腸疾患糖マーカーの非標識での高感度・簡便な検出を目的とし、高い触媒活性を有する合金ナノ微粒子(ナノアロイ)が埋め込まれたカーボン薄膜電極を開発することを目的とする。具体的には基板上で原子の運動性が優れた、アンバランストマグネトロン(UBM)スパッタ法を用いて、糖類を触媒的に電極で酸化する性質を有するニッケル(Ni)と銅(Cu)をカーボンと共に共スパッタすることによりNi/Cuのナノアロイ微粒子をカーボン薄膜に分散させた電極を形成する。その際、高い触媒活性を実現するために、Ni/Cuの量比、粒子のサイズ等を最適化するだけでなく、触媒活性の高いとされるコアシェル構造を実現する。開発した電極を用いて、測定が困難であった腸疾患糖マーカーの高感度検出を実現し、高速液体クロマトグラフィーの検出器に応用して、上記マーカーの一括分離検出を実証する。

3. 研究の方法

UBMスパッタ装置¹にNi, Cuの2種類の金属とカーボンをセットしたターゲットを図1に示すように各ターゲットが中央の基板を設置した部分に収束するように配置した。各ターゲットでスパッタを行うことで、Ni/Cu

の合金ナノ粒子(ナノアロイ)が埋め込まれたカーボン薄膜を作製する。その際に、各ターゲットのパワーを制御することで、カーボン薄膜内のナノアロイの量(濃度)やNi/Cuの比を幅広く制御できる。

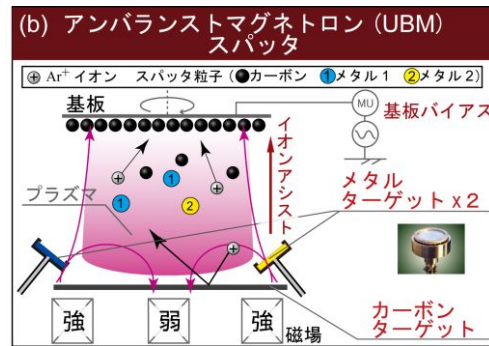


図1.UBM スパッタ装置の構造

作製したナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極の構造は、高分解能透過型電子顕微鏡(TEM)観察、X線光電子分光測定(XPS)、原子間力顕微鏡(AFM)により解析した。腸疾患マーカーであるラクツロースやマンニトールなどの5種類の糖をNi/Cu比やナノアロイの濃度を変えたカーボン薄膜電極でボルタンメトリ測定を行うことで、感度を評価した。また連続的な測定を行うことで電極の安定性を調べた。更にこの電極を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の電気化学検出器としての評価を行うため、フローセルにセットしてカラムの下流に接続し、5種類の糖を試料に用いて感度や検出限界の評価を行い、既存(市販)の金電極との比較を行った。

4. 研究成果

図2にナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極の構造を示す。TEM観察により球状のNi/Cuナノアロイが狭い粒径分布(90%が2-4nm内)でカーボン薄膜中に分散していることがわかった(図2)。またXPS測定より、薄膜表面の金属濃度とナノアロイのサイズに正の相関がみられ、およそ2-4nmの粒径制御が可能であること、粒径はNi/Cu比に依存しないことを見出した。薄膜の断面TEM像を元素マッピングしたところ、NiとCu由来の分布がほぼ重なることから、ナノアロイは均一に合金化していると考えられる。薄膜表面は1.5nm以下の凹凸よりなる極めて平坦な形状であり、平均粒径3.2nmのナノアロイの半分以上がカーボン薄膜に埋め込まれた構造であることがAFM観察により示された。

まず、ナノ粒子の粒径を一定としたまま、Ni/Cu比が異なるナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極を作製した。それらの電極をアルカリ水溶液中で、5種類の腸透過性評価のための糖マーカーの電気化学応答をサイクリ

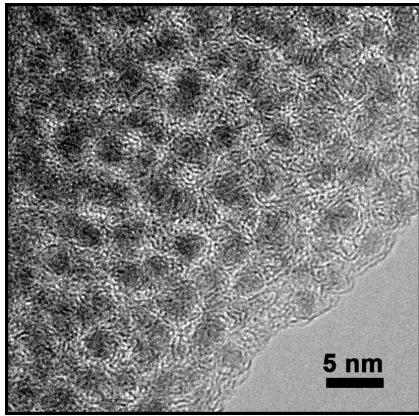


図2. ナノアロイ埋め込みカーボン薄膜のTEM写真

ックボルタンメトリ (CV) 法で評価した。糖類の電気化学酸化は、Ni などの金属表面にアルカリ溶液中で電位を正方向に掃引することで、水酸化物を形成しその酸化作用によって触媒的な酸化が起こることが知られている。まず、Ni/Cu の合金薄膜電極とナノアロイ埋め込みカーボン電極 (Ni/Cu=64/36) により 300 μ M の D-マンニトールの測定を行ったところ、D-マンニトールの酸化による電流値の増加の絶対値は Ni/Cu の合金薄膜電極が大きいものの、金属の量で補正するとナノアロイは極めて大きな電流密度が得られていることが分かった。その結果、Ni/Cu ナノアロイは、Ni/Cu の合金薄膜に比べて極めて高い電極触媒活性を示すことが明らかとなった。そこで、図3に Ni/Cu の比を変えて作製した電極で D-マンニトールの感度を評価した結果を示す。D-マンニトール酸化に対する

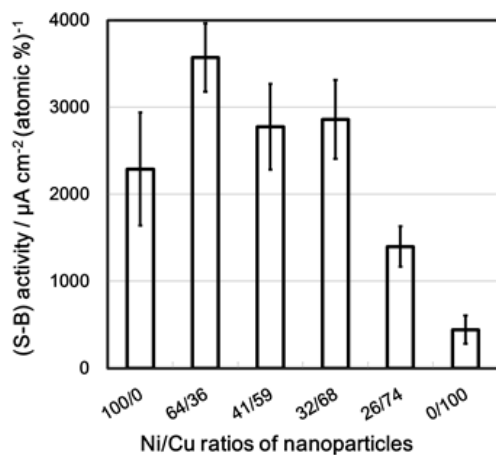


図3. D-マンニトールの感度のナノアロイ Ni/Cu 比依存性

電極触媒活性は Ni/Cu 比によりダイナミックに変化し、64/36 で最大値をとることを見出した。更にキシロースやラクツロースなどの腸透過性を評価する残り4種類のマーカー分子の測定を行ったところ、D-マンニトールと同様な特性を示した。

次に、最も高い感度が得られたナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極の測定安定性を、D-マンニトールの連続フローインジェクション分析により検討し、ほぼ同様の Ni/Cu 比である合金薄膜電極と比較した (図4)。

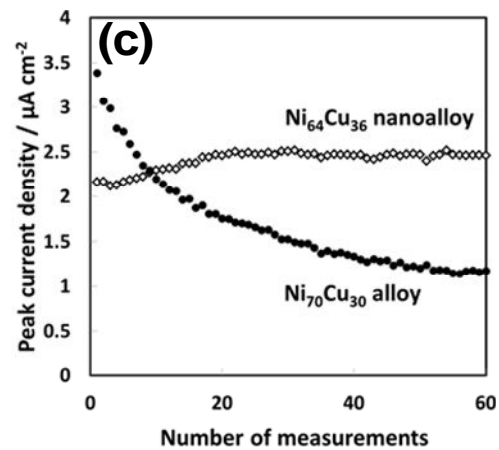


図4. Ni/Cu ナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極と Ni/Cu 合金薄膜電極の連続測定による感度変化の比較

その結果、定電位条件下で変動係数 4.6 % (n=60) と極めて測定安定性が高く、類似組成の Ni₇₀Cu₃₀ 合金薄膜では測定安定性が低い (変動係数 32.2 % ,n=60) ことが分かり、ナノアロイの高い触媒活性が安定性に寄与していることを示唆している。更に、この結果は、これまで金電極のパルスアンペロメトリーを用いる検出法で、表面を常に清浄化して測定を行っていたのに対して、HPLC 検出器などの長時間の測定においても Ni/Cu ナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極を定電位印加でパルス法を使うことなく測定できる可能性がある。

これを実証するため、ナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極を HPLC の検出器に用いてマルチシュガーテストに用いる5種類の腸疾患糖マーカー (各 1 μ M) の分離検出を行った。その結果を図5に示す。図5の3つのクロマトグラムにおいて、一番上の(1)は、ナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極、(2)は、Niバルク電極 (市販) を用いて得られたもので、両者とも定電位印加で測定を行った。これに対して、(3)では、従来法である金電極のパルスアンペロメトリー法で得られた結果である。Niバルク電極では、ピークがほとんど検出されないのに対して、ナノアロイ埋め込み電極では、5種の糖が分離し、明瞭な5本のピークが観測された。更に、従来法である、金電極のパルスアンペロメトリー法で得られたクロマトグラムと比較しても極めて感度が高いことが確認できる。一例として、ラムノースに対する検出限界は 64 nM と算出され、これは従来法に比べて2桁以上優れた検出限界であり、質量分析法と同等の分析性能である。さらに、疑似尿成分に対する当該

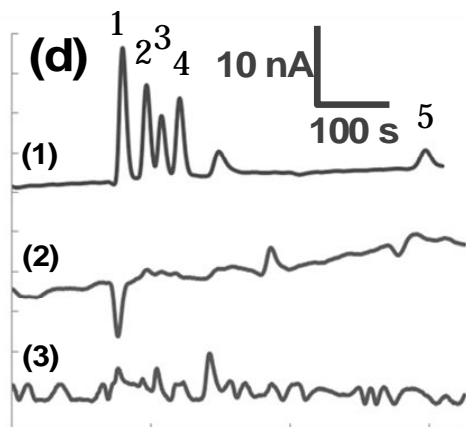


図 5.5 種の糖マーカ混合物のクロマトグラム: (1) $\text{Ni}_{31}\text{Cu}_{69}$ ナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極を用いた定電位測定(+0.55 V vs. Ag/AgCl), (2) ニッケルバルク電極を用いた定電位測定 (+0.60 V), (3)金電極を用いたパルスアンペロメトリー(検出電位 +0.15 V)ピークはそれぞれ 1:エリトリトール、2: ラムノース、3:ラクツロース、4:スクロース、5:スクラロース

電極の被毒耐性が、金のパルスアンペロメトリー法よりも優れているデータが得られている。したがって、当該電極の開発により Multi-sugar test の実現可能性が飛躍的に向上したと考えている。

以上の結果を得た要因として、(1) ナノアロイ化により糖の酸化速度が向上し、かつ埋め込まれた構造により活性が維持されたことや、(2)酸化物中間体による電極汚染や金属腐食がある程度抑制されたことが挙げられる。以上より、電極表面が平坦かつ低ノイズなカーボンで構成されており、さらに微量分析に有利な定電位測定が可能となることから、当該電極は極微量の糖混合物の高感度検出にむけた高速液体クロマトグラフィーの検出器として好適であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

芝 駿介、丸山 莉奈、鎌田 智之、加藤 大、丹羽 修、Chromatographic determination of sugar probes used for gastrointestinal permeability test by employing nickel-copper nanoalloy embedded in carbon film electrodes, *Electroanalysis* 査読有、in press. <https://doi.org/10.1002/elan.201800072>

芝 駿介、加藤 大、鎌田 智之、丹羽 修、Co-sputter deposited Nickel-Copper bimetallic nanoalloy embedded carbon films for electrocatalytic

biomarker detection, *Nanoscale* 査読有、8 巻、2016、12887-12891

加藤 大喜、鎌田 智之、加藤 大、柳澤 博章、丹羽 修、Au nanoparticle-embedded carbon films for electrochemical As^{3+} detection with high sensitivity and stability, *Analytical Chemistry* 査読有、88 巻、2016、2944-2951

丹羽 修、加藤 大、鎌田智之、国武雅司、スパッタナノカーボン薄膜材料を応用したバイオセンサ、*応用物理*、査読なし、84 巻、10 号、2015、908-912

〔学会発表〕(計 16 件)

丹羽 修、“微小電極や新規電極材料を用いる電気化学分析、センシング法の研究、日本分析化学会第 66 年会 (学会賞受賞講演) AS3003, (東京理科大学 葛飾キャンパス) 2017 年 9 月 11 日

丹羽 修、加藤 大、“ハイブリッドナノカーボン薄膜電極による電気化学分析、第 77 回分析化学討論会 B2008 (龍谷大学)(依頼講演) 2017 年 5 月 28 日

丹羽 修、芝 駿介、鎌田智之、加藤 大、Metal nanoparticles embedded carbon film electrodes for electroanalysis, International Congress on Analytical Sciences 2017 (ICAS 2017), 6p-EC-12 (中国海南島)(招待講演) 2017 年 5 月 6 日

丹羽 修、加藤 大、芝 駿介、栗田 僚二、Biochemical detection based on SPR and electrochemical measurements, International Conference on Biosensors and BioMedical Devices (招待講演), BioMEMS/NEMS & Applications (Bio4Apps 2016), Abstract pp31, Gold Coast, Australia, 2016 年 12 月 15 日

丹羽 修、加藤大、Nanostructured electrode materials for bioanalytical applications (招待講演), The 11th BK21+ International Symposium on Materials Chemistry 2016, Pusan National University, 2016 年 11 月 18 日

丹羽 修、芝 駿介、加藤大喜、鎌田智之、山口直人、今屋浩志、加藤 大、金属ナノ粒子埋め込みカーボン薄膜電極の化学センシングへの応用、日本分析化学会第 65 年会、講演番号 G 1006、北大(札幌)、2016 年 9 月 14 日

丹羽 修、芝 駿介、加藤大喜、鎌田智之、加藤 大 Metal nanoparticles embedded

carbon film electrodes for environmental and biochemical analysis, 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE), Abs. No:s01-046, The Hague, The Netherland, 2016年8月21-26日

丹羽 修, 加藤 大, 鎌田智之, 芝 駿介, 梅村 茂, 蔵屋英介, 国武雅司, Surface terminated and hybrid nanocarbon film electrodes for biosensing applications (招待講演), 11th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS 2015), pp34, Penang, Malaysia, 2015年11月17日

丹羽 修, 加藤 大, 鎌田智之, 芝 駿介, 廣野 滋, 蔵屋英介, 国武雅司, Electrochemical applications of surface terminated and hybrid sputtered carbon film electrodes (招待講演), BCEIA 2015 F13 pp69, Beijing China, 2015年10月29日

丹羽 修, 加藤 大, 鎌田智之, 加藤大喜, 芝駿介, 廣野 滋, 蔵屋英介, 国武雅司, 山口直人, 今屋 浩志, Hybrid carbon film electrodes for electroanalytical applications(キーノート講演)66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, pp29, Taipei, 2015年10月6日

丹羽修, 加藤大, 吉岡恭子, 栗田僚二, “創薬に関連したバイオセンシング技術の開発”(招待講演), センサ・アクチュエータ・マイクロナノ/ウイーク 2015 次世代センサ総合シンポジウム pp9-18, 東京ビックサイト, 2015年9月18日

丹羽 修, 加藤 大, 鎌田智之, 廣野 滋, 蔵屋英介, 国武雅司, Electrochemical Properties of Surface Terminated and Hybrid Carbon Films and Their Application to Electroanalysis (招待講演), 16th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2015年3月26日, Angra dos Reis, ブラジル

他4件、合計16件

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:合金ナノ粒子含有カーボン電極、当該電極を含む装置、及び、当該電極の製造方法
発明者:加藤 大, 鎌田智之, 芝 駿介, 丹羽 修
権利者:産総研
種類:特許
番号:特願2014-203328

出願年月日:2014年10月1日
国内外の別:国内

〔図書〕(計2件)

芝 駿介, 鎌田智之, 加藤 大, 丹羽 修, Electroanalysis with carbon film-based electrode”, Nanocarbons for Electroanalysis edited by Sabine Szunetits, Rabah Boulherroub, Alison Downard, Jun-Jie Zhu and Nianjun Yang, Chapter 1, Wiley, ISBN 978-1-119-24390-8

丹羽 修, 加藤大, Nanocarbon Film Based Electrochemical Detectors and Biosensors, Chapter 7, pp 121-136, “Nanobiosensors and Nanobioanalyses, edited by M. C. Vestergaard, K. Karman, I-M. Hsing, E. Tamiya, Springer, 2015年
ISBN 978-4-431-55189-8

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 修 (NIWA Osamu)
埼玉工業大学・先端科学研究所・教授
研究者番号:70392644

(2)研究分担者

加藤 大 (KATO Dai)
(国)産業技術総合研究所・バイオメディカル
研究部門・主任研究員
研究者番号:80533190

(2)研究分担者

吉岡 恭子 (YOSHIOKA Kyoko)
(国)産業技術総合研究所・バイオメディカル
研究部門・主任研究員
研究者番号:50358321