

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05528

研究課題名(和文) ナノホール型フィルター電極を用いるマルチバイオセンシングシステムの開発

研究課題名(英文) Multi-analyte biosensing system using nanohole-type filter electrodes

研究代表者

水口 仁志 (Mizuguchi, Hitoshi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・講師

研究者番号：30333991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、トラックエッチ膜フィルターを鋳型とする多孔性フィルター電極を用いる新しい集積型バイオセンサを提案することである。これは、厚さ約10マイクロメートルの当該フィルターに金をコーティングして作製した電極に、種々の分子認識機能を有する官能基を修飾した後に、これを複数枚重ねて集積化することで、微量試料中の複数種の分析対象物を簡便に検出するものである。本研究では、化学めっきと電解めっきを併用したトラックエッチ膜フィルター電極の作製方法を確立し、マルチバイオセンシングを目的として最大で4枚のフィルター電極が搭載できるデバイスを試作した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work is to develop an integrated biosensor for multi-analyte sensing using porous gold filter electrodes fabricated with a track-etched membrane filter as a template. The proposed device can be fabricated by stacking the porous gold electrodes modified with functional groups for molecular recognition. The simultaneous detection of plural kinds of analytes in a small-volume sample will be achieved by using the proposed device. In this study, a fabrication protocol of the porous gold filter electrode have been established by combination of chemical plating and electroplating, and fabricated a device that can mount up to four filter electrodes for multi-analyte biosensing purpose.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオセンサ トラックエッチドメンブレン アプタマー 金電極 同時検出

1. 研究開始当初の背景

人の健康状態を端的に示す物質を可能な限り簡便かつ迅速に検出することは、疾病の早期発見と適切な処置のためには重要であり、またそのような技術は、予後の診断を支援するツールとしても有用である。電気化学的な分析法には簡便かつ小型化が容易であるという利点があり、これまで多くの手法が開発され実用化されてきた。今日では、生理学的に関連のある複数種の物質を同時に検出することがさらに重要となっている。核酸アプタマーや酵素による電極の修飾は、標的分子に対する選択性の確保に対して有用であるが、認識した物質を検出するにはフェロセンやアントラキノンなどの酸化還元プローブを用いることが多い。この場合、各項目の同時分析を実現するためには、それぞれの要素から独立した電気化学的シグナルを得る必要がある。その戦略としては、酸化還元電位が大きく離れた複数の物質をプローブとして用いることと、それぞれ独立した電極から別々のシグナルを取得することに大別される。前者の場合、電流検出において互いに干渉しないほどに酸化還元電位が大きく離れた物質をプローブとして用いる必要があり、水溶液の電位窓という制限のもとでは2種類のプローブを使った同時測定が事実上の限界である。一方、後者においては、先に集積化した複数の微小電極に対してそれぞれ異なる修飾を施す必要があるが、実際にそのような電極の作製は困難であり、マイクロチップのような狭小流路を用いる場合においても、その作製手順は極めて煩雑であるという欠点があった。

2. 研究の目的

本研究では、トラックエッチ膜フィルターを鋳型として作製した多孔性電極を用いて従来にないマルチバイオセンシングシステムを提供することを目的とする。すなわち、物質認識のための官能基を修飾した多孔質フィルター電極を積層させたプラットフォームである。これらの電極は厚さがわずか10 μm であるため、重ねただけで多項目同時分析用システムを構築することができる。この場合、それぞれ個別に電極を作製した後に集積化できるので、従来よりもシンプルな構造で安価に作製でき、さらには、それぞれ独立した電極からシグナルが得られるという理想的な多項目同時分析システムとなる。本研究はこの全く新しいタイプのバイオセンサーを開発することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 電極の作製方法

本研究では、孔径1~20 μm のトラックエッチ膜フィルターを鋳型としてその表面と細孔内壁への湿式めっきによって金をコーティングすることで多孔性金電極を作製した。ここでは、カニゼン法を応用した無電解

ニッケルめっきに引き続き、シアン化第一金カリウムを用いる電解めっきによって金をコーティングした後、希硫酸に浸漬することで作製した。作製した電極の表面は走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

(2) 自己組織化単分子膜の修飾

上記で作製した電極を短冊状に切断した後、アルカンチオールやチオール末端を有する核酸アプタマーを用いて修飾することで分子認識機能を持つ電極を作製した。

(3) マルチバイオセンシングを目的とした分析デバイスの作製

本研究では、円形の試料導入口を備えたラミネートフィルムで電極を挟み込むタイプ(図1(A))と、直径4 mmの試料導入口を設けた厚さ5 mmのアクリル板に挟み込むタイプ(図1(B))のそれぞれについて検討した。図に示すように作製した多孔性金電極と何もコーティングしていないトラックエッチ膜フィルター電極をスペーサーとして交互に重ねることでデバイスを構成した。これにより、各電極は互いに短絡することなく独立して動作することができる。それぞれの電極は銅箔テープを介してリードを取り、それぞれ電気化学アナライザに接続した。なお、アクリル板を用いるタイプのデバイスに関しては、最大で4枚のフィルター電極を搭載できる設計となっている。

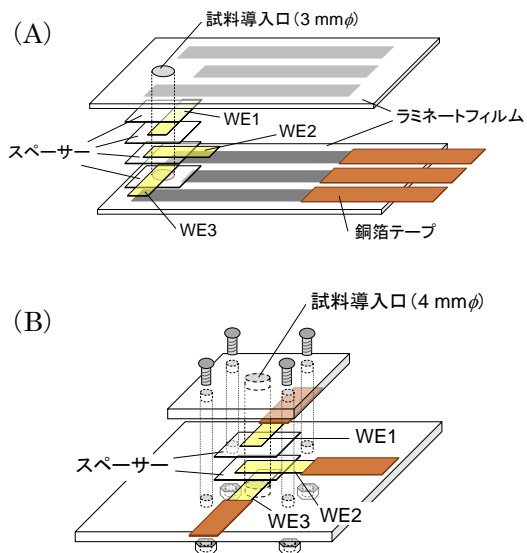


図1. 本研究で作製した分析デバイス, (A) ラミネートフィルムタイプ, (B) アクリル板を筐体に用いた場合

4. 研究成果

(1) トラックエッチ膜フィルターを鋳型とする多孔性電極の作製

本研究において湿式めっき法で作製した電極のSEM像の例を図2に示す。カニゼン

法でニッケルをコーティングしたものを、さらに電解めっきによって金めっきを施したもののいずれにおいても、フィルターの表面および細孔の内壁がニッケルおよび金でそれぞれ被覆されていることがわかった。さらに希硫酸に浸漬する処理によってニッケル層が除去され、テンプレートのフィルターの形状を維持した金の多孔性電極が作製することができた。またこれらのことは別途 EDS 分析においても確認されており、最終的に作製した電極では、塩化カリウム水溶液を電解液とするサイクリックボルタンメトリーにおいて、ニッケルのアノード酸化によるバックグラウンド電流が完全に除去された。電極の表面は微細な粒子によって構成されており、フェリシアン化物/フェロシアン化物イオンを含む電解液を用いるサイクリックボルタンメトリーにおいて、金の平板電極と比べ高い表面積が反映した大きな電流値が観測された。一方テンプレートフィルターの孔径が小さくなると、金の電解めっきの際に細孔内部への入り込みが低下する傾向にあった。このため、以後の実験では、孔径 5 μm または 20 μm のフィルターをテンプレートとして使用することとした。

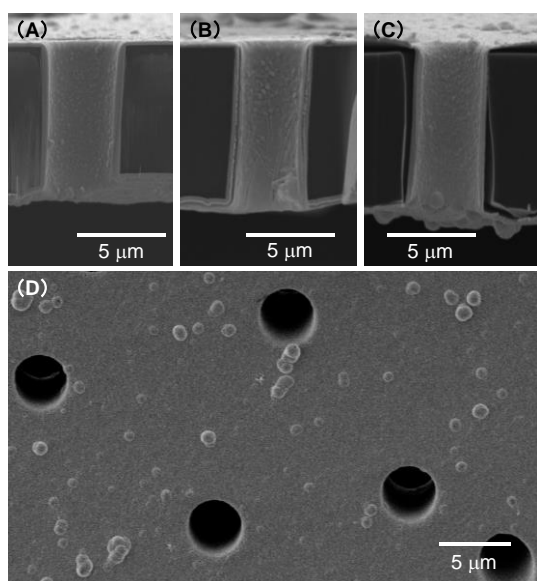


図2. トラックエッチ膜フィルターを鋳型とする多孔性電極の作製, (A) ニッケルめっき後, (B) 電解金めっき後, (C) 硫酸処理後, (D) 硫酸処理後の電極の表面

(2) マルチバイオセンシングを目的とした分析デバイスの性能

図1に示したデバイスを用いて、フェリシアン化物/フェロシアン化物イオンを含む電解液を用いるサイクリックボルタンメトリーによって性能を評価した。図1(A)のラミネート型デバイスでは、試料導入口を電解液に浸し、別途準備した参照電極および対電極(白金線)を電解液に浸して電気化学セル

を構成した。その結果、WE1~3のそれぞれの電極について、短絡することなく独立に電位を制御して等価な電流シグナルを得ることができた。しかしながら、当該ラミネート型の電極は作製が容易ではあるものの、自然沈降だけでは試料の導入が難しいという欠点があった。そこで図1(B)に示すように、試料導入口を設けたアクリル板の間に、本研究で作製した多孔性電極を挟み込むデバイスを準備した。この際、試料導入口にプラスチック製シリンジを取り付けて電解液を導入した。その結果、3枚の作用電極のそれぞれにおいて独立して等価な電流シグナルを得ることができた。これは将来的にマルチバイオセンシング用のデバイスとして有用である。なお、このデバイスは、試料導入口を中心として4方向に向けてフィルター電極を最大で4枚積層させ、それぞれ銅箔テープを介して接続できる設計となっている。

(3) アルカンチオールを用いる表面修飾とコレステロール検出

本研究で作製した多孔性電極にオクタデカンチオールを修飾し、図1(A)のようなラミネート型デバイスに挟み込んでその性能を評価した。ここでは、作用電極1枚を使用した。その結果、フェリシアン化物/フェロシアン化物イオンを含む電解液を用いるサイクリックボルタンメトリーにおいて、何も修飾していない場合と比べて電流値が大きく低下し、酸化還元反応が大きく阻害されることが確認できた。そこで、分子インプリンティングに基づく Nagaoka らの手法¹⁾を参考にしてエタノール中のコレステロール検出を試みた。その結果、0~20 mM のコレステロール濃度に対してサイクリックボルタンメトリーにおける電流値の減少幅が増加することが確認された。

¹⁾ T. Nagaoka, et al., Anal. Chem., **28**, 187 (2012).

(4) チオール修飾型核酸アプタマーの導入について

前述のようにアルカンチオールを用いて修飾した電極については、フェリシアン化物/フェロシアン化物イオンを含む電解液を用いるサイクリックボルタンメトリーにおけるファラデー電流の低下から、再現性良く修飾できることが確認できた。一方、チオール修飾型核酸アプタマーについては、今のところ再現性の良い導入には至っていない。これは電極表面の清浄化が不十分であることが原因と考えられ、現在引き続き検討しているところである。この電極の前処理法が確立できれば、それぞれ別々に機能化した電極を本研究で提案する分析デバイスに導入することで、マルチバイオセンシングが達成できるものと期待でき、また、その成果を近日中に公表できる見込みである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

①トラックエッチ膜フィルターを鋳型とする多孔性電極の作製と複数種同時定量用デバイスへの試み, 水口仁志, 吉川直人, 飯山真充, 木島龍朗, 高柳俊夫; 第 63 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会, 海峽メッセ下関, 下関市, 平成 29 年 11 月.

②アルカンチオール修飾型多孔質金電極の作製とコレステロール検出, 吉川直人, 飯山真充, 木島龍朗, 高柳俊夫, 水口仁志; 2016 年日本化学会中国四国支部大会香川大会, 香川大学幸町キャンパス, 高松市, 平成 28 年 11 月.

③トラックエッチ膜フィルターを母体とする多孔質電極を用いる電気化学分析 (依頼講演), 水口仁志; 日本分析化学会第 65 年会, 北海道大学工学部, 札幌市, 平成 28 年 9 月.

④トラックエッチ膜を鋳型とする多孔質電極を用いるコレステロールの迅速検出, 吉川直人, 飯山真充, 木島龍朗, 高柳俊夫, 水口仁志; 日本分析化学会第 65 年会, 北海道大学工学部, 札幌市, 平成 28 年 9 月.

⑤ An electrochemical flow-through cell fabricated with nanohole shaped gold electrode; N. Yoshikawa, S. Sato, T. Sato, G. Hayakawa, M. Iiyama, H. Mizuguchi; 2015 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Dec. 15–20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.

⑥ Determination of arsenite by anodic stripping voltammetry with a nano-hole shaped membrane electrode; N. Yoshikawa, S. Sato, T. Sato, G. Hayakawa, M. Iiyama, H. Mizuguchi; RSC Tokyo International Conference 2015, Sep. 3–4, 2015, Chiba, Japan.

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.chem.tokushima-u.ac.jp/B1/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水口 仁志 (Mizuguchi, Hitoshi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部
(理工学域)・講師

研究者番号：30333991

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

木島 龍朗 (Kijima, Tatsuro)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：50272084

飯山 真充 (Iiyama, Masamitsu)

野村マイクロ・サイエンス株式会社