

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17878

研究課題名(和文)カーボンナノドットを用いたフロー電気化学イムノアッセイ法の開発

研究課題名(英文)Development of flow electrochemical immunoassay using carbon nanodots

研究代表者

石松 亮一 (ISHIMATSU, Ryoichi)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：90512781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノドットをクエン酸とエチレンジアミンにマイクロ波を照射して作製した。このカーボンナノドットの電気化学特性、電気化学発光特性、並びに光物性を明らかにした。さらに、カーボンナノドットを、抗原である3-phenoxybenzoic acid (除草剤の土壌代謝物)に化学的に修飾し、これを認識する抗体をPDMSマイクロチップ上に固定化し、フローイムノアッセイを行い、抗原が定量できることを示した。この時、検出に電気化学発光法、蛍光法、電気化学法を検討したが、蛍光法が最も高感度であり、100 ppm程度の定量が可能であった。

研究成果の概要(英文)：Carbon nanodots were synthesized from a mixing solution of citric acid and ethylenediamine. We revealed the photophysical and electrochemical properties including electrogenerated Chemiluminescence. Moreover, carbon nanodots were chemically modified to an antigen, 3-phenoxybenzoic acid (3PBA), which is a metabolite of diphenylether herbicide in soil. The anti-3PBA antibody was immobilized on PDMS channel, and we performed immunoassay. In the detection part, we carried out electrochemical, fluorescence, and electrogenerated chemiluminescence detection, and found that fluorescence detection was the most sensitive method among them.

研究分野：電気分析化学

キーワード：電気化学発光 フローインジェクション分析 マイクロ流路 ジフェニルエーテル

1. 研究開始当初の背景

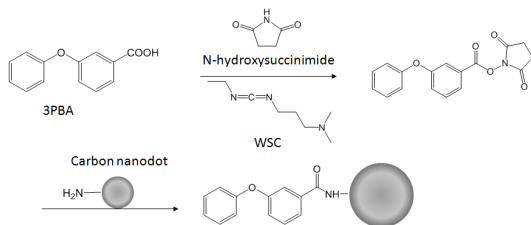
カーボンナノドットは、クエン酸等を熱分解することによって得られるナノ粒子である。特徴として、表面にカルボキシ基や水酸基が存在するので、親水性であり、さらに近紫外光を吸収して青色の蛍光を発する材料である。比較的最近発見された材料であり、さらに近年、カーボンナノドットの親水性、蛍光性といった特徴を利用して、様々な応用が模索され始めている。

2. 研究の目的

カーボンナノドットは、新規発光材料として、その応用に注目が集まっている。本研究代表者もカーボンナノドットの低コスト、その親水性と蛍光性といった特徴に着目し、これをマイクロチップ上でのフローイムノアッセイへと展開することを目的とした。この時、検出方法として電気化学的応答、即ちカーボンナノドットの酸化還元電流によるもの、蛍光応答、並びに電気化学発光 (ECL) に着目した。フローイムノアッセイ法は分析物を連続的に注入することによって、比較的短時間で多くのサンプルの定量が可能であり、実用的な分析法である。抗原抗体反応を利用するので、非常に高選択的である。今回、ジフェニルエーテル系除草剤の検出を目的として、これらの土壤代謝物であるジフェニルエーテルに応答する抗体を用いた。また、カーボンナノドットの電気化学、電気化学発光特性および光物性を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

カーボンナノドットの表面に存在する官能基を利用し、アミノカップリング法によってジフェニルエーテルの骨格を持つ 3-phenoxybenzoic acid (3PBA) にカーボンナノドットを化学修飾した(スキーム 1)。抗体は、タイのチェンマイ大学の Surat Hongsibsong 博士より提供を受けた。電気化学測定では、金ディスクを作用極に、白金線に対極に、銀塩化銀電極を参照極に用いた 3 電極式セルを用いて測定を行った。電気化学発光は、通常、電極反応で生成する酸化体と還元体間の電荷移動によって励起状態が発生するので、作用電極に矩形波を印加して電気化学発光が発生するかを確認した。また、コリアクタントを用いることによっても発生できる。この



スキーム 1. アミノカップリング法によるカーボンナノドットへの修飾。

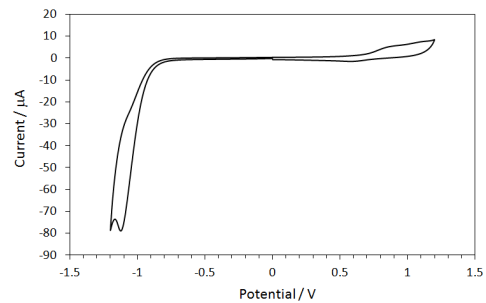


図 1. 1000 ppm カーボンナノドット分散液 (pH=7.5 のリン酸緩衝液中) のサイクリックボルタモグラム。掃引速度: 100 mV s⁻¹。

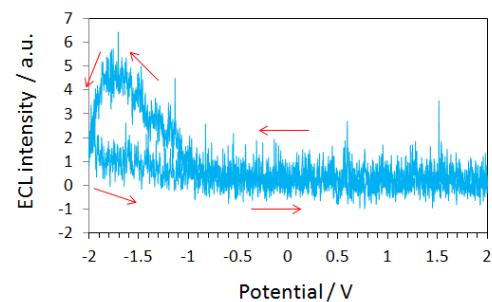


図 2. 1000 ppm のカーボンナノドット分散液の電気化学応答。20 mM S₂O₈²⁻ を含む。

場合、コリアクタントの分解生成物が発光材料の励起状態を直接生成するので、一定電圧の印加または電位の掃引によって電気化学発光が発生できる。今回、コリアクタントとして S₂O₈²⁻ を用いた。電気化学発光の検出には光電子増倍管を用いた。

4. 研究成果

電気化学及び電気化学発光特性

図 1 にカーボンナノドットのサイクリックボルタモグラムを示す。酸化還元ともに非可逆的な波が観察された。即ち、電極反応で生成したカーボンナノドットの酸化体、並びに還元体は不安定であることが分かる。また、還元電流ピークの方が酸化電流ピークに比べ大きい。これは、カーボンナノドット表面に存在する還元可能な官能基が多いことを示唆している。

カーボンナノドットの酸化と還元が起こる矩形波電圧を印加しても電気化学発光は観察されなかった。そこで、S₂O₈²⁻ を添加し、電位掃引を行った。結果を図 2 に示す。S₂O₈²⁻ の還元電流は 1.2 V 付近から増加する(この電位はカーボンナノドットの還元が起こるのに十分である)が、電気化学発光も 1 V 付近から増加しており、S₂O₈²⁻ の添加によって電気化学発光が観察された。しかしながら強度が弱く、発光スペクトルは得られなかった。光物性

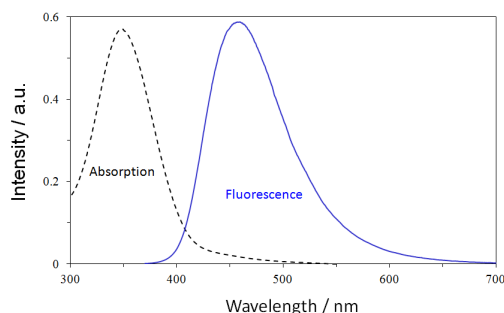


図 3. 600 ppm カーボンナノドット分散液 (pH=7.1 のリン酸緩衝液) の吸収および蛍光スペクトル。

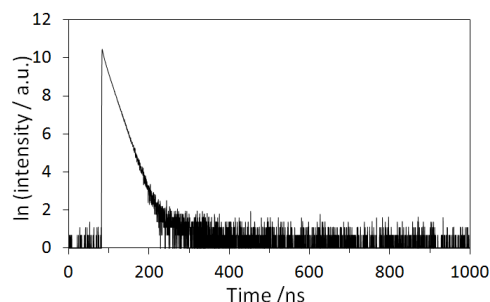


図 4. 100 ppm カーボンナノドット分散液 (pH=7.1 のリン酸緩衝液) の蛍光減衰曲線。

調製したカーボンナノドット水分散液の吸収及び蛍光スペクトルを図 3 に示す。355 nm と 460 nm にそれぞれ吸収、蛍光極大を示した。さらに、発光寿命の測定を行った。結果を図 4 に示す。合成したカーボンナノドットにはサイズの分布があるが、得られた蛍光減衰曲線は単一の減衰定数を持つ指数関数で良くフィットが可能であり、その発光寿命は 16 nm 程度であった。

3PBA のフローインジェクション分析 SU8 のテンプレートを用いて作製した PDMS チップを用いたフローインジェクションイムノアッセイ測定系の模式図を図 5 に示す。PDMS チップは Y 字の流路を持ち、その深さは 650 μm 、幅は 1 mm 程度であった。2 つのシリンジポンプから送液を行い、流量は 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ であった。一方のシリンジより、5000 ppm の抗体を注入し、他方より 1000 ppm の 3PBA-カーボンナノドットコンジュゲートを注入した。キャリア溶液には pH=7.1 のリン酸緩衝液を用いた。注入量は 100 μL であった。この時、345 nm の主波長を持つ LED を PDMS の背面から照射し、発生する蛍光をチャンネル上方に設置した PMT を使って検出した。図 6 にその蛍光応答を示す。コンジュゲート注入後に大きな蛍光応答を示しているが、これは、注入した 3PBA-カーボンナノドットコンジュゲートの応答である。その後、このコンジュゲートの流出とともに蛍光強度が減少

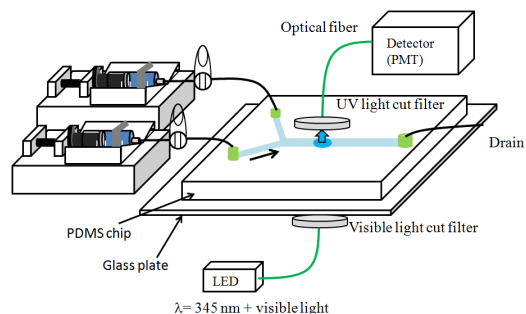


図 5. フローインジェクション蛍光イムノアッセイ法の模式図。

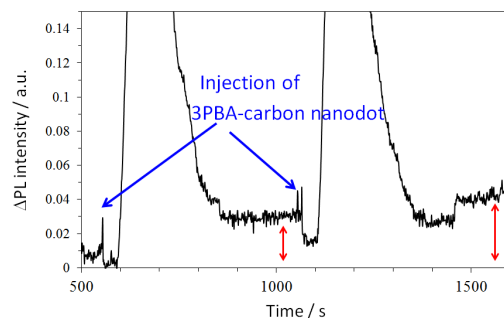


図 6. 3PBA-カーボンナノドットコンジュゲートのフローインジェクション蛍光イムノアッセイ応答。

するが、流出後にベースラインの蛍光強度の増加が観察された。これは即ち 3PBA カーボンナノドットコンジュゲートが抗体に捕捉されていることを示す。2 回目の注入では、バックグラウンド蛍光強度の増加が少なく、コンジュゲートの捕捉が飽和していると考えられる。蛍光強度変化から、100 ppm 程度のジフェニルエーテルの検出が可能であると見積もられる。また、PDMS に抗体を固定化していない場合に 3PBA カーボンナノドットコンジュゲートを注入してもベースラインの増加はほとんど観察されず、PDMS 表面へ特異的に吸着しない。これはカーボンナノドットが親水性であることが一因と考えられる。さらに、コンジュゲートが補足された後、pH=2.2 のグリシン塩酸塩を解離剤として注入することにより、ベースラインの蛍光強度の減少が観察された。即ち、解離剤を注入することによって、測定系の再生が可能である。さらに、検出系に電気化学応答、電気化学発光応答を検討したが、どちらも応答が小さく、蛍光法による検出がこれらの検出法で高感度であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 6 件)

R. Ishimatsu et. al., "Flow injection immunoassay based on luminescent carbon nanodots" *Asianalysis* 13, 2016/12/11. チェンマイ (タイ)

石松亮一ら「抗体および抗原へのカーボンナ

ノドットの化学修飾とフロー分析への応用」第 53 回 FIA 講演会 2016 年 11 月 5 日 同志社大学室町キャンパス(京都市)

R. Ishimatsu et. al., "Flow Injection Immunoassay for a Degeneration Product of Herbicides, 3-Phenoxybenzoic Acid with Fluorescent Carbon Nanodots" 20th ICFIA, 2016/10/4, マヨルカ(スペイン)

石松亮一ら「蛍光性カーボンナノドットの抗体への修飾とフロー免疫アッセイ法への応用」第 76 回分析化学討論会 2016 年 5 月 28 日 岐阜大学および岐阜薬科大学 (岐阜市)

石松亮一ら「蛍光性カーボンナノドットのフローインジェクション分析への応用」第 52 回 FIA 分析講演会 2015 年 11 月 20 日 桐生地域地場産業振興センター(群馬県桐生市)

石松亮一ら「カーボンナノドットを用いた電気化学発光免疫アッセイ」第 75 回分析化学討論会 2015 年 5 月 24 日 山梨大学(山梨県甲府市)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.cstf.kyushu-u.ac.jp/~imatola/b/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石松 亮一 (ISHIMATSU, Ryoichi)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：90512781