

修士学位論文

酸化カーボンナノチューブ固定化ろ紙電極を用いた新規コルチゾールバイオセンサの開発

2023 年度

(2024 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
海洋システム工学専攻

藤本隆正

修士学位論文

酸化カーボンナノチューブ固定化ろ紙電極を用いた新規コルチゾールバイオセンサの開発

2023 年度

(2024 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
海洋システム工学専攻

藤本隆正

目次

第1章 序論.....	1
1.1 研究背景.....	2
1.2 バイオセンサ.....	2
1.2.1 信号変換方法.....	3
1.2.2 標識/非標識センサ.....	4
1.2.3 免疫センサ.....	4
1.2.4 コルチゾールバイオセンサ.....	6
1.2.5 非侵襲・低侵襲計測.....	6
1.2.6 検量線.....	7
1.3 電気化学インピーダンス分光法.....	8
1.4 電極素材.....	14
1.4.1 ナノカーボン素材によるバイオセンサ.....	14
1.4.2 グラフェン.....	14
1.4.3 フラーレン.....	15
1.4.4 カーボンナノチューブ.....	15
1.4.5 紙ベースのセンサ電極.....	16
1.5 研究目的.....	16
第2章 実験方法.....	17
2.1 使用試薬と実験装置.....	18
2.2 溶液の作製方法.....	19
2.3 コルチゾールバイオセンサの作成方法.....	21
2.3.1 酸化 CNT の成膜.....	21
2.3.2 電極基板作製方法.....	21
2.3.3 抗コルチゾール抗体の固定化.....	23
2.3.4 ブロッキング処理.....	24
2.4 測定方法.....	25
2.4.1 電極上酸化 CNT 膜の SEM による観察方法.....	25
2.4.2 電極の表面抵抗率測定.....	26
2.4.3 EIS 測定手順.....	27
2.4.4 表面修飾による電荷移動抵抗の評価方法.....	27
2.4.5 センサ電極の耐久性評価方法.....	28
2.4.6 コルチゾール応答特性についての評価方法.....	28
2.4.7 電極 ox-CNT 成膜量による性能評価方法.....	29
2.4.8 センサの再現性についての評価方法.....	29

2.4.9	センサの非特異吸着の評価方法	29
2.4.10	センサの選択性についての評価方法	30
第3章	実験結果	31
3.1	電極 CNT の表面、断面観察	32
3.2	電極のシート抵抗測定	34
3.3	表面修飾による電荷移動抵抗の評価結果	35
3.4	センサ電極の耐久性評価結果	37
3.5	コルチゾール応答特性についての評価結果	38
3.6	電極 ox-CNT 成膜量による性能評価結果	40
3.7	センサの再現性についての評価結果	44
3.8	センサの非特異吸着の評価結果	45
3.9	センサの選択性についての評価結果	47
3.10	先行研究との比較	49
3.11	まとめ	50
	謝辞	51
	参考文献	52
	参考資料	53
	抗原抗体反応時の適切な温度条件	53
	ブロッキング材の違いによる非特異吸着の評価	54
	研究業績	55

第 1 章 序論

1.1 研究背景

近年、平均寿命の伸びとともに健康寿命を伸ばすことが重視されるようになってきた。健康寿命を伸ばすためには、疾病や癌の予防とともに早期発見することが重要となってくる。早期発見のために人間ドックなどで頻繁に検査を行うのは限界があり、より手軽な唾液の成分を解析する検査が注目されている。

また COVID-19 の世界的流行は、途方もない規模のロックダウンと経済の停滞をもたらした。感染者をできるだけ早期に特定することは、病気の蔓延を大幅に遅らせることができる効果的な検疫のために重要である。しかし、感染者数が急激に増加している状況では、医療従事者や医療施設が不足し、発熱しても十分な検査が行えない事案が数多く発生した。このような状況において、家庭で使用可能で手頃な価格の検査キットが大いに役立つ可能性がある。特に検体の採取を家庭でも行えるようにするため、人体に負担が少なく操作が簡便である点も重要である。また衛生上の観点からセンサは 1 度きりの使用を前提にすることが望ましい。このように低コスト、短い測定時間で簡単に扱うことの可能な新規センサの開発が求められている。

1.2 バイオセンサ

バイオセンサの基本原理を示した図を Fig. 1.1 に示す。バイオセンサは特定の分子を選択的に認識するため、生体関連物質の持つ分子識別機能を利用し、電極や半導体などのトランスデューサ（信号変換デバイス）と組み合わせて電気信号などの物理情報に変換するものである。その利用目的が工業計測のものは化学センサと呼ばれることもある。

分子認識反応には物質同士の反応における特異性が重要な働きを担っている。しかし現実にはただ 1 種類の物質としか反応しない組み合わせ ($A \rightleftharpoons B$) はほとんどなく、ごく少数ではあるが他の物質 (C) とも反応してしまうことが多い。よって特異性を利用する際にはできるだけ少数の物質としか反応しないこと、すなわち高い選択性が求められる。分子識別機能を持つ物質として酵素、抗体、DNA/RNA、レセプタタンパクなど生体関連物質や、人工的に作成した糖鎖や分子インプリントポリマーが使用されることもある。これらの物質は特定の分子と結合したり触媒反応を引き起こしたりする。トランスデューサは生体反応の種類に応じて選択される。そして特異性が高い化学反応ほど高精度なセンサを実現できる [1]。



Fig. 1.1 バイオセンサの基本原理

Table 1.1 分子識別素子とセンサデバイス [1]

分子識別法	バイオマーカー	センサ機器
酵素反応	タンパク質	試験紙 酵素センサ
抗原抗体反応	抗体、ホルモン、神経伝達物質、 タンパク質、外来物質	酵素標識免疫測定 (ELISA) 電気泳動 電気化学測定 表面プラズモン共鳴法
ハイブリダイゼーション	mRNA、DNA	DNA チップ

1.2.1 信号変換方法

バイオセンサは生体分子識別素子で発生した生体反応を信号に変換する。光計測は、酵素などの触媒で反応する発色基質(色原体)や発光基質などの基質を加えることで、分子認識素子で捕捉したバイオマーカーの濃度に比例、もしくは反比例(競合法など)した反射光や透過光蛍光発光(可視光や紫外光)などの強度を測定する。

電気化学測定は溶液中のイオンや残留物質を定量・定性分析する手法として応用され、電気化学測定の中で電流量を測定するサイクリックボルタンメトリー (CV)、微分パルスボルタンメトリー (DPV 法)、そしてインピーダンス値を測定する EIS 法などが知られている。

機械振動計測は機械共振現象に基づき、片持ち梁などの振動体に付着した物質の質量に比例して共振周波数が低下することを利用する。

半導体計測はイオン感応性電界効果トランジスタ (ion-sensitive field-effect transistor、ISFET) を用いた pH センサに代表される。ゲート上のイオン感応膜に検体溶液が接すると、溶液中のイオン活量に応じた界面電位が発生するしくみを利用している。

表面プラズモン共鳴はプリズムなどを用いて、金などの薄膜表面で全反射するように光を入射すると、金属側にエバネッセント波と呼ばれる表面波が生じる。これが金属の自由電子と相互作用し、プラズモンと呼ばれる電子密度波が生じ、反射光の減衰から抗原抗体反応などの反応によって生じる質量増加を検出する[1]。

1.2.2 標識/非標識センサ

標識センサは抗体あるいは抗原に酵素や蛍光色素、ラジオアイソトープなどを標識し、その標識による酵素活性や吸光度、放射線量などを捉えることで定量分析を行う。標識センサの例として、ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)や Western blotting がある。増幅機能を有する標識材による高感度化や測定の安定性から医療機関や研究機関で幅広く活用されており、代表的な測定手法として確立されている。一方で、非標識センサは標識センサとは異なり、酵素や蛍光色素などの標識材を使用せず、直接抗原抗体反応を捉えるセンサである。デバイス上に抗体を固定して、抗原と結合した際に生じる物理的な変化をシグナルとして捉え、その変化から抗原の吸着量(濃度)の定量分析を行う。標識センサと比べて、標識材を添加するなどの複雑な工程は不要で、低コストで簡便な測定が可能となる。そのため、表面プラズモン共鳴や水晶振動子、電気化学測定法などを用いた非標識センサの研究開発が行われている[1]。

1.2.3 免疫センサ

ウイルスや細菌、がん細胞などの免疫応答を引き起こすものを抗原と呼ぶ。抗原分子は抗体と特異的に結合する領域があり、この領域を抗原決定基またはピトープという。たんぱく質の場合は、アミノ酸の組み合わせや立体構造によって特異性が決まる。

抗体分子は糖タンパク質からなり、血清の γ -グロブリン分画に存在することから、免疫グロブリンと呼ばれる。抗体の基本構造を Fig. 1.2 に示す。アミノ酸約 200 個からなる L (Light) 鎖と約 400 個からなる H (Heavy) 鎖それぞれ 2 本ずつが、ジスルフィド結合 (S-S) によって Y 字型分子を構成している。さらに抗原が結合する部位 Fab (fragment antigen binding) の N 末端から 109 個のアミノ酸残基からなる部分は、抗原に対して独特な配列を持つ可変領域[variable region (V 領域)]、カルボキシ末端側はどの抗体でも同じ配列の定常領域[constant region (C 領域)]と呼ばれる。免疫グロブリンは構造の違いから IgG、IgA、IgM、IgD、IgE に分類される。免疫グロブリンの種類を Table 1.2 に示す[2][3]。

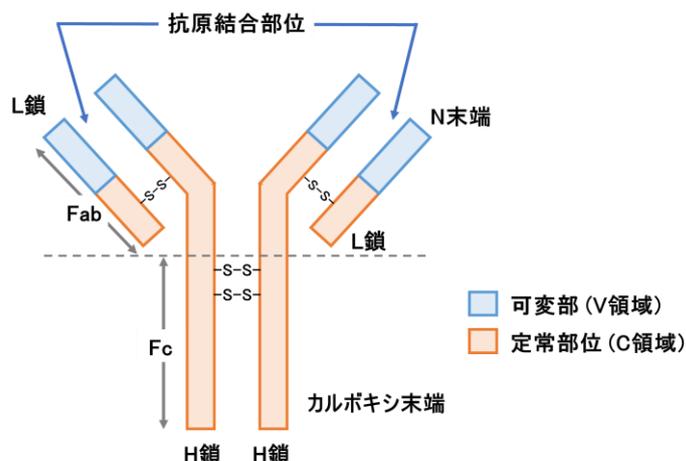


Fig. 1.2 免疫グロブリン G の基本構造 [2]

Table 1.2 免疫グロブリンの種類 [3]

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Ig 総量に対する割合 (%)	70~80	15(10~20)	7(3~10)	0.2	0.001
血清内分布 (%)	80	10~12	3~10	0.2	0.02~0.05
分子量 ($\times 10^4$)	15	17(40)	95	18	20
性状	液性免疫の主役	母乳に含まれ、新生児の感染防御に役立つ。	感染の最初に作られる。	生物活性の詳細は不明。	アレルギーを起こす。

免疫センサは、抗原と抗体の特異的な結合反応を利用したセンサである。抗体は抗原が生体内に侵入した際に免疫反応によって生成される。抗体は対象の抗原と特異的に結合し、抗原を無害化する。このような反応を抗原抗体反応という。抗原と抗体との間の結合定数が高く、抗原の一部分の立体構造の違いやアミノ酸配列や電荷の分布などを識別することが可能なため、複数のタンパク質を含む血液中で特定の対象物質のみと結合する。その識別能力から免疫学的検査で利用され、医療診断分野で重宝されている。

1.2.4 コルチゾールバイオセンサ

コルチゾールは副腎皮質から分泌されるホルモンの一つであり、代表的な糖質コルチコイドである。肝臓での糖の新生、筋肉でのたんぱく質代謝、脂肪組織での脂肪の分解などの代謝の促進、抗炎症および免疫抑制などの役割を持つ。またストレスを受けた際に、脳からの刺激を受けて分泌が増えることから「ストレスホルモン」とも呼ばれており、体内のコルチゾール量上昇は、慢性的疲労症候群、過敏性腸症候群、心的外傷後ストレス障害などのストレス関連疾患との関連が指摘されている。

コルチゾールは血清中に $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-7}$ mol/L 間で変動し、通常は朝に最大値を示す。唾液中のコルチゾール濃度は血清中の濃度と正の相関があり、採血を行わなくても濃度を測定することが可能である。しかし唾液中のコルチゾール濃度は最大となる朝に測定した場合でも、健康な成人では $2.78 \times 10^{-9} \sim 1.22 \times 10^{-7}$ mol/L となっている。そのため $10^{-11} \sim 10^{-9}$ mol/L の領域のコルチゾールを正確に推定できる技術が必要となる [4]。

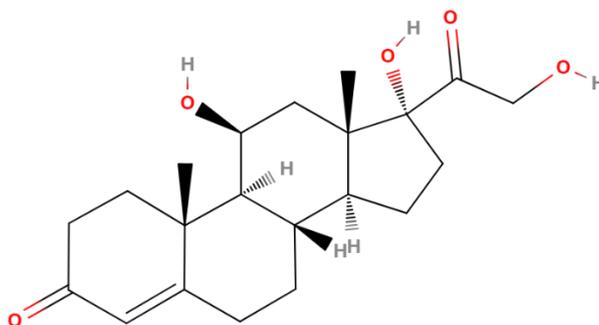


Fig. 1.3 コルチゾールの構造式

1.2.5 非侵襲・低侵襲計測

侵襲とは、人の生体内の環境を乱す可能性のある外部からの刺激を意味し、非侵襲とは、身体を著しく侵襲して精神的、肉体的苦痛を与えないことを意味する。工業計測で製品や人工物などを対象とする場合には非破壊という。生体計測では、精神的・肉体的苦痛ができるだけ少ない非侵襲的方法をとることが望まれており、Table 1.3 に示すように生体と計測手段(センサ)との距離から 4 つに分類できる。これらは侵襲の強度から侵襲計測と非侵襲計測の 2 つに大別される。そして、非侵襲的に得られる唾液や尿を検体とした検体測定も非侵襲計測に含まれる [1]。

Table 1.3 生体計測の分類

非侵襲	① 近接計測	X線、超音波、MRI、PET、カプセル型内視鏡
	② 体表計測	脳波、心電、血圧、血流、心拍、O ₂ 、CO ₂
	③ 検体計測	尿、唾液の化学物質濃度
侵襲	③ 検体計測	血液、リンパ液の化学物質濃度
	④ 体内計測	連続血糖測定 (穿孔や埋め込み)

1.2.6 検量線

検量線は、物質の量や濃度などを求めるために用いられる基本となるものである。検量線は、あらかじめ絶対値がわかっている標準検体と、それに対する測定データとの間の関係を回帰分析で求めて近似式で表したものである。直線近似する場合は回帰直線の y 切片 a 、傾きを b とすると、これらは最小二乗法により次式で示される。

$$b = \frac{\text{偏差積和}}{\text{偏差平方和}} = \frac{S_{xy}}{S_x^2} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{1}{n} \left(\sum y_i - b \sum x_i \right)$$

ここで x_i は i 番目の x の値、 y_i は i 番目の y の値、 \bar{x} は x の平均値、 \bar{y} は y の平均値である。関数 x を説明変数、関数 y を目的変数といい、説明変数 x が原因であり、目的変数 y が説明すべき目的(結果)である。回帰分析では説明変数 x を基準として目的変数 y を関係づけており、両者の関係の強さは y 方向の誤差の大きさによって判断されるが、 x 方向の誤差については考慮しない。なお指数関数などで曲線近似する場合もある。

また回帰式の説明力を表す指標として決定係数 R^2 が用いられる。回帰式による推定値を f とし、 R^2 は以下のように求められる。

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - f_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

決定係数は相関係数を二乗した値で、1 から 0 の間をとり、決定係数が 1 に近いほど回帰直線の説明力があることを意味する[1]。

1.3 電気化学インピーダンス分光法

電気化学インピーダンス分光法(electrochemical impedance spectroscopy、EIS)とは電極に正弦波の電位信号を入れたときの応答電流を調べ、電極反応の伝達関数(インピーダンス)を決める手法である。測定装置の概要を Fig. 1.4 に示す。

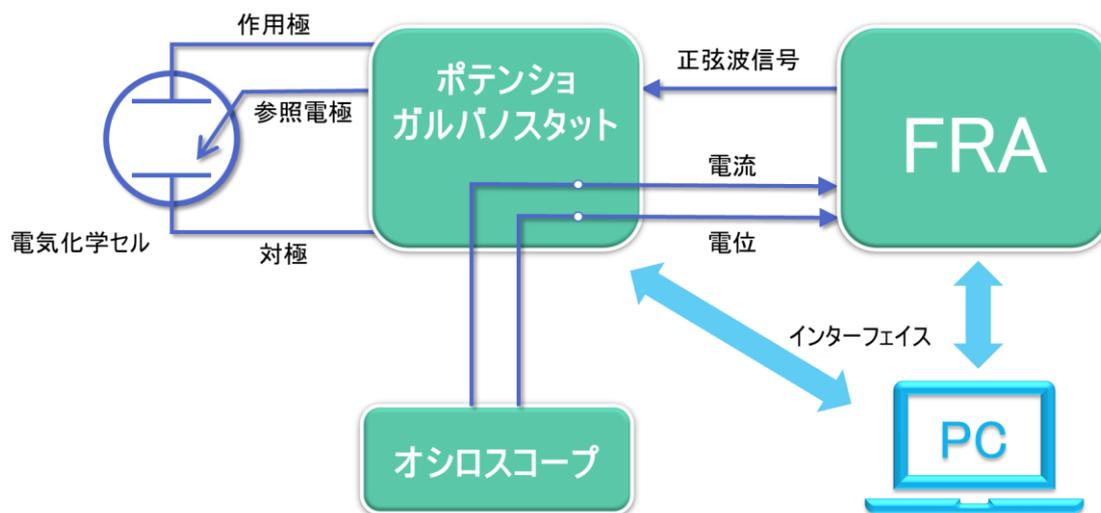


Fig. 1.4 EIS 測定の概要 [4]

この測定装置は周波数応答解析装置 (frequency response analyzer、FRA) とポテンシオガルバノスタットを組み合わせたものである。ポテンシオガルバノスタットは電位と電位の制御と測定を行う装置である。得られたインピーダンススペクトルから、電極-溶液界面の状態や電極反応、電解液中の物質移動等の情報が得られる[4]。

EIS 法では通常、電気化学反応系を電気回路に置き換えて表したモデルである等価回路を仮定し解析を行う。電極を電解面に浸漬させた際の理想的な等価回路を Fig. 1.5 に示す。

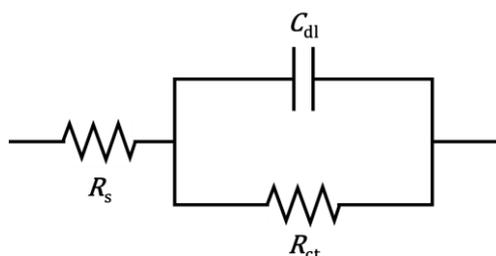


Fig. 1.5 電解面に浸漬させた際の理想的な等価回路

電極-電解液界面では界面の溶液側に電気二重層が存在するため大きな電気容量を持つ。この界面を電気二重層容量 (C_{dl}) という。電気二重層に界面電位差が生じると、電極-溶液界面において電荷移動が発生する。この電荷移動反応の速度は電流と比例関係にあるため、界面電位差と電流の比を電荷移動抵抗 (R_{ct}) といい、反応の起こりづらさを表す。電極-溶液界面から十分に離れた場所における電気抵抗を溶液抵抗 (R_s) といい、測定セルの形状や溶液のイオン濃度に依存する。

測定により得られたインピーダンスは複素数なので複素平面上に表示する (ナイキストプロット)。Fig. 1.5 に示した等価回路に角周波数 ω の交流電圧を印加した際に得られるインピーダンス Z は次のように求める。

$$Z = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + j\omega C_{dl}R_{ct}}$$

Z を実部 Z' と虚部 Z'' に分解すると、

$$Z = Z' - jZ'' = \left(R_s + \frac{R_{ct}}{1 + (\omega C_{dl}R_{ct})^2} \right) - j \frac{\omega C_{dl}R_{ct}^2}{1 + (\omega C_{dl}R_{ct})^2}$$

$$Z' = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + (\omega C_{dl}R_{ct})^2}$$

$$Z'' = \frac{\omega C_{dl}R_{ct}^2}{1 + (\omega C_{dl}R_{ct})^2}$$

この式から媒介変数 ω を消去すると

$$\left(Z' - R_s - \frac{R_{ct}}{2} \right)^2 + Z''^2 = \left(\frac{R_{ct}}{2} \right)^2$$

となる。この式を複素平面上に表すと、中心 $\left(R_s + \frac{R_{ct}}{2}, 0 \right)$ 、半径 $\frac{R_{ct}}{2}$ の半円となる。これをナイキストプロットに示すと Fig. 1.6 のようになる。

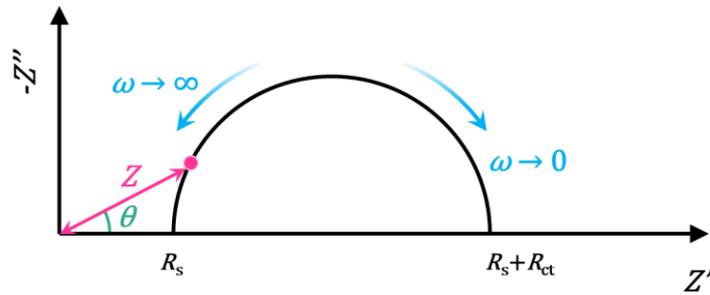


Fig. 1.6 RC 並列回路のナイキストプロット

Fig. 1.6 のモデルでは電極-溶液界面での電荷移動過程のみを考慮したものであるが、電気化学反応はこのほかに溶液内での物質移動過程が存在する。拡散と電荷移動が混合で律速する電極の等価回路を Fig. 1.7 に示す。

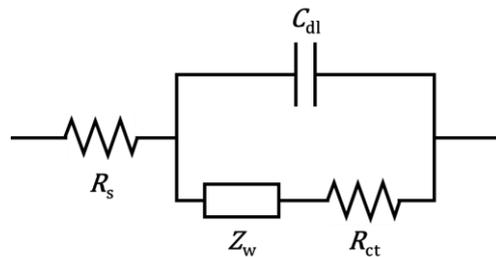


Fig. 1.7 拡散インピーダンスを含む等価回路

一般に物質移動速度は電荷移動速度と比較して遅いので、複素平面上に示したインピーダンススペクトルの軌跡は、低周波領域で実数軸に対して 45° の傾きを持つ直線を示す。これを拡散インピーダンス (warburg impedance) Z_w という。 $O_x + ne^- \leftrightarrow Red$ の可逆反応が起こっている平行平板電極の Z_w は、拡散条件に関する定数 σ とすると以下のように求められる。

$$Z_w = \frac{(1-j)\sigma}{\sqrt{\omega}}$$

Fig. 1.7 に示した等価回路の電気化学インピーダンス Z は以下となる。

$$Z = R_s + \frac{1}{j\omega C_{dl} + \frac{1}{R_{ct} + \frac{(1-j)\sigma}{\sqrt{\omega}}}}$$

Z を実部 Z' と虚部 Z'' に分解すると、

$$Z = Z' - jZ''$$

$$Z' = R_s + \frac{R_{ct} + \frac{(1-j)\sigma}{\sqrt{\omega}}}{(C_{dl}\sigma\sqrt{\omega} + 1)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 \left(R_{ct} + \frac{(1-j)\sigma}{\sqrt{\omega}}\right)^2}$$

$$Z'' = \frac{\frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(C_{dl}\sigma\sqrt{\omega} + 1) + \omega C_{dl} \left(R_{ct} + \frac{(1-j)\sigma}{\sqrt{\omega}}\right)^2}{(C_{dl}\sigma\sqrt{\omega} + 1)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 \left(R_{ct} + \frac{(1-j)\sigma}{\sqrt{\omega}}\right)^2}$$

低周波域での軌跡を求めるために、 $\omega \rightarrow 0$ を代入すると以下の近似式が得られる。

$$Z' = R_s + R_{ct} + \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}$$

$$Z'' = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} + 2\sigma^2 C_{dl}$$

この式から媒介変数 ω を消去すると

$$Z'' = Z' - (R_s + R_{ct} - 2\sigma^2 C_{dl})$$

となる。Fig. 1.7 に示した等価回路に交流電圧を印加した際のインピーダンスを Fig. 1.8 に示す。

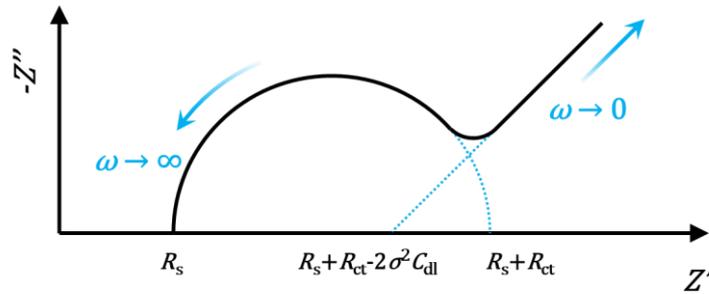


Fig. 1.8 拡散インピーダンスを含む等価回路のナイキストプロット

実際の測定ではナイキストプロットの半円が真円からずれ、実軸方向に潰れた軌跡を示すことがある。これは電極の幾何学的形状などに起因する電位や電流密度の不均一性によるものと考えられている。この場合は C_{dl} の代わりに Q (constant phase element、CPE)を含む等価回路で表す。Fig. 1.9 に Q を含む等価回路をに示す。

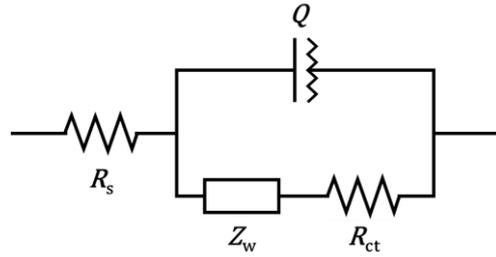


Fig. 1.9 CPE を含む等価回路

CPE のインピーダンス Z_{CPE} は CPE 定数 T と CPE 指数 p ($-1 \leq p \leq 1$) で構成される。

$$\begin{aligned} Z_{\text{CPE}} &= \frac{1}{(j\omega)^p T} \\ &= \frac{1}{\omega^p T \left(\cos\left(\frac{\pi}{2}p\right) + j \sin\left(\frac{\pi}{2}p\right) \right)} \end{aligned}$$

並列部のインピーダンスを Z_{int} とし、次のように示す。

$$\begin{aligned} Z_{\text{int}} &= \frac{1}{\frac{1}{Z_{\text{CPE}}} + \frac{1}{R_{\text{ct}} + \frac{1-i}{\sqrt{\omega}}\sigma}} \\ &= \frac{1}{\omega^p T \cos\left(\frac{\pi}{2}p\right) + i(\omega^p T \sin\left(\frac{\pi}{2}p\right)) + \frac{1}{R_{\text{ct}} + \frac{1}{\sqrt{\omega}}\sigma - \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}i}} \end{aligned}$$

$A = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}$, $B = \omega^p T \cos\left(\frac{\pi}{2}p\right)$, $C = \omega^p T \sin\left(\frac{\pi}{2}p\right)$ とし、 Z_{int} を変換する。

$$\begin{aligned} Z_{\text{int}} &= \frac{1}{B + Ci + \frac{1}{R_{\text{ct}} + A(1-i)}} \\ &= \frac{R_{\text{ct}} + A(1-i)}{(B + Ci)(R_{\text{ct}} + A(1-i)) + 1} \\ &= \frac{R_{\text{ct}} + A(1-i)}{(B(R_{\text{ct}} + A) + AC + 1) + (C(R_{\text{ct}} + A) - AB)i} \end{aligned}$$

$D = B(R_{\text{ct}} + A) + AC + 1$, $E = C(R_{\text{ct}} + A) - AB$ として変換する。

$$\begin{aligned}
Z_{\text{int}} &= \frac{R_{\text{ct}} + A(1 - i)}{D + Ei} \\
&= \frac{(R_{\text{ct}} + A(1 - i))(D - Ei)}{D^2 + E^2} \\
&= \frac{(DR_{\text{ct}} + A(D - E)) + (-ER_{\text{ct}} - A(D + E))i}{D^2 + E^2}
\end{aligned}$$

Fig. 1.9 の合成インピーダンス Z は以下の通りである。

$$Z = R_s + Z_{\text{int}} = R_s + \frac{DR_{\text{ct}} + A(D - E)}{D^2 + E^2} + \frac{-ER_{\text{ct}} - A(D + E)}{D^2 + E^2}i = Z' + Z''$$

また合成インピーダンスの絶対値 $|Z|$ は。

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2}$$

となる。Fig. 1.9 インピーダンススペクトルを複素平面上にプロットしたものを Fig. 1.10 に示す。

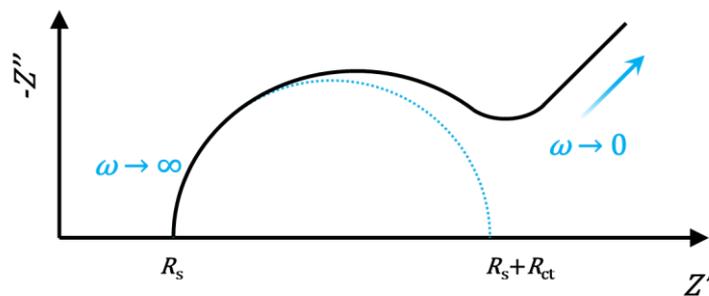


Fig. 1.10 CPE を含む等価回路のナイキストプロット

EIS 法は、センサ表面で起こる抗原抗体反応や、特定のタンパク質、レセプター同定、核酸、細胞全体の分子認識など、センサ表面で起こる特異的な生体認識反応に関連する界面特性の変化を検知することが可能である。そのため、EIS バイオセンサに関する研究は、アプタセンサや免疫センサに数多くみられる。アプタマーは短い一本鎖オリゴヌクレオチド (RNA または DNA) で、高い安定性と強い結合親和性を持つことから、高性能の EIS バイオセンサを設計するのに適している。また免疫センサでは、抗体とその抗原分子がセンサ表面での結合することで、電子移動が阻害され、電荷移動抵抗が変化する。したがって、ラベルフリー検出として、EIS バイオセンサは生体分子認識反応を直接判定することが可能である。EIS バイオセンサは、操作性、迅速な応答、小型化能力、低コスト化、および非常に低濃度領域で検出可能であることから、今後も増加していくとみられる [5][6]。

1.4 電極素材

1.4.1 ナノカーボン素材によるバイオセンサ

近年、フラーレン (C₆₀)、グラフェン、カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバーなどのナノカーボンを使用した新しい電極設計によるバイオセンサが報告されている。これらナノカーボン材料は、原料電極材料からナノスケールでの表面修飾に至るまで、様々な面で継続的に拡大してきた。特にグラフェンやカーボンナノチューブは、高い電気化学活性、高い電気伝導性、広い比表面積、官能基化の容易さ、生体適合性などから、EIS バイオセンサの電極材料に多く使用されている[7]。

1.4.2 グラフェン

グラフェンは超音波処理を用いて水中で黒鉛を剥離すると、単層から数層 (ナノシート) の酸化グラフェンが生成する。特にグラフェン中の炭素原子を一部酸化させた酸化グラフェン (graphene oxide、GO) や還元酸化グラフェン (reduced graphene oxide、rGO) は、その構造中にヒドロキシ基、カルボキシ基、エポキシ基などの官能基を含み、バイオセンサに広く使用されている。

Satish K. Tuteja (2018) [8]らは、スクリーン印刷された電極上に電気還元酸化グラフェン (e-RGO) を感知機構の生体結合のための基盤として使用した。コルチゾールおよび乳酸抗体は、共有結合により e-RGO に固定化した。ラベルフリーの電気化学クロノアンペロメトリー検出を使用して、生体分子に対する応答を分析した。コルチゾールの検出限界は 0.1 ng/mL、乳酸の検出限界は 0.1 mmol/L であり、濃度と電流の間に相関関係が確認された。

1.4.3 フラーレン

フラーレンは炭素原子が球状の構造を成している化合物の総称で、 C_{60} 、 C_{70} 、 C_{84} などが知られており、特に研究が進んでいる C_{60} は 0D カーボン同素体の 1 つで、直径約 0.71nm の単純で球状の構造をしている。

Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun (2020) [9]らは、フラーレン変性炭素電極にコルチゾール分子を刻印したアクリルアミドポリマーを用いて、唾液試料中のコルチゾールを EIS 測定により検出した。ポリマー層は、フラーレン修飾スクリーン印刷カーボン電極上に 1 : 2 (コルチゾール : アクリルアミド) の割合で形成し、重合開始剤として過硫酸アンモニウム (APS) を使用した。検量線は 0.5 nmol/L から 64 nmol/L、 $R^2=0.9939$ であり、検出限界と定量下限はそれぞれ 0.14 nmol/L と 0.44 nmol/L であった。

1.4.4 カーボンナノチューブ

カーボンナノチューブ (Carbon nanotube、CNT) は 1991 年に飯島澄男氏が発見した炭素の同素体で、グラフェンをらせん状に丸めた円筒状の構造を持っている。筒が 1 層の単層 CNT、直径の異なる複数の筒が層状に重なった多層 CNT が存在する。単層 CNT では直径 0.7~2 nm 程度となっている。CNT の構造を Fig. 1.11 に示す。鋼の 20 倍の強度、銅の 10 倍の熱伝導性、アルミの半分の密度、シリコンの 10 倍の電子移動度を持ち、リチウムイオン電池 (LiB) 電極の電気抵抗を低減する導電助剤などに使用されている [10]。

本研究では繊維状の構造を持つことから紙繊維に強く絡みつき成膜しやすい点、実効表面積が大きい点、化学的な酸化処理によって表面にカルボキシ基が導入できることにより、タンパク質の修飾ができる点に着目し、カーボンナノチューブを電極材料に使用したバイオセンサを作製した。

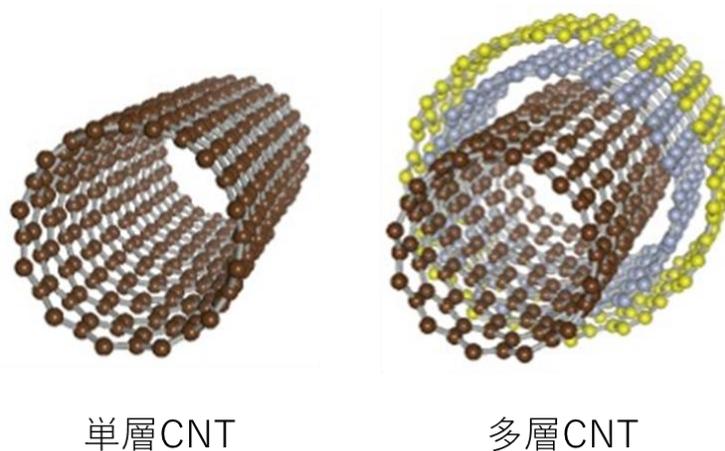


Fig. 1.11 CNT の構造 [10]

1.4.5 紙ベースのセンサ電極

コルチゾールバイオセンサの電極素材にはこれまで、ガラス基板上に Au、Pt を成膜した電極、ガラス化カーボン電極など様々なものが報告されている。しかしこれらの素材は使い捨てには向かず、家庭で日常的に使用するためには、より軽量、安価で大量生産可能な電極素材を使用する必要がある。

紙は化学的および物理的修飾の自由度、使い捨て性、大量生産の可能性などからバイオセンサの電極材料として注目されており、和紙、ろ紙、事務用紙、クロマトグラフィー紙など、さまざまな紙ベースの基板を使用して、さまざまな電気化学紙ベースのセンサが開発されている。特に紙ベースの基板はナノカーボンとの親和性が高く、グラフェン、CNT、カーボンドットなどの炭素材料を成膜し、電気化学測定に使用されている。また印刷可能な電極材料カーボンインクによって、センサ電極を大量生産する試みもなされている[11][12]。

1.5 研究目的

本研究では、CNT が持つ優れた導電性や広い比表面積によって多くの抗体を CNT 表面に固定できることに着目し、簡易かつ高感度な測定が可能なコルチゾールバイオセンサの開発を目指す。また、メンブレンフィルターろ紙上に酸化 CNT を成膜した安価、軽量で使い捨て可能なセンサ電極を実現し、センサとしての使用可能であることを明らかにすることが目的である。この目的のために、以下のアプローチを行った。

1. ろ紙上に酸化 CNT を成膜し、電極の構造を確認した。
2. EIS 測定を用いて酸化 CNT を成膜したろ紙電極によるセンサの特性の評価を行った。
3. ろ紙電極を使用したセンサの耐久性評価を行った。
4. 酸化 CNT を成膜したセンサを複数作製し、センサとしての再現性の評価を行った。
5. 酸化 CNT の成膜量を変化させ、センサの性能が最も高くなる条件を評価した。
6. 非特異吸着や夾雑物によるセンサの応答特性への影響を評価した。

第 2 章 実験方法

2.1 使用試薬と実験装置

使用試薬の製品名、製造会社は以下の通りである。

Table 2 使用試薬一覧

製造会社	製品名
富士フィルム 和光純薬(株)	蒸留水
	トルエン (C ₆ H ₅ CH ₃)
	エタノール (C ₂ H ₅ OH)
	2-プロパノール ((CH ₃) ₂ CHOH))
SIGMA-ALDRICH	11-Mercaptoundecanoic acid 98%
	6-Mercapto-1-hexanol
	N-Hydroxysuccinimide (NHS)
	K ₃ [Fe(CN) ₆] (ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム)
	K ₄ [Fe(CN) ₆] · 3H ₂ O (ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム三水和物)
	Phosphate buffered saline tablet (PBS タブレット)
	Hydrocortisone (コルチゾール)
	melatonin(メラトニン)
progesterone(プロゲステロン)	
藤倉化成(株)	ドータイト TM
東京化成工業(株)	Amino-PEG ₃ (トリエチレングリコールアミン)
EMD Millipore Corp.	Mouse anti-cortisol monoclonal antibody (抗コルチゾール抗体)
Thermo Fisher Scientific	MTNR1A Polyclonal Antibody (抗メラトニン抗体)
同人化学研究所(株)	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride (EDC)
名城ナノカーボン(株)	MEIJO eDIPs (EC1.5) (カーボンナノチューブ、CNT)

電極ろ紙は Merck Millipore 社の PVDF メンブレンフィルター Durapore 0.1 μm、47 mm (VVLP04700) を使用した。吸引ろ過はアズワンのアスピレーター (DAS-01) と、Advantec の減圧ろ過用フィルタホルダー (KG-47) を使用した。電気化学測定には Metrohm 社の Autolab ポテンショガルバナスタット (PGSTAT128N) を使用した。抵抗値測定には KESIGHT の DMM6500 型 6.5 桁デジタル・マルチメータを使用した。

2.2 溶液の作製方法

- ・ 酸化 CNT 溶液
CNT (eDIPs (EC1.5)) 500 mg を 50 mL の 30 %過酸化水素に分散させ、70 °Cに加熱した後に、2時間攪拌させることで酸化処理を施し、酸化 CNT とした。得られた酸化 CNT を超純水で洗浄した後に凍結乾燥させ、500 mg/L となるようエタノール:2-プロパノール=1:9 の混合溶液と混合した。作製した酸化 CNT 溶液を超音波ホモジナイザーで2時間攪拌し、CNT に欠陥 (ディフェクト) を生じさせることで分散性を高めた。
- ・ 導電性銀ペースト
ドータイト:トルエンを体積比 1:1 で混合させたものを、遮光サンプル管 (4 mL) に準備して使用した。冷蔵庫で保管した。
- ・ EDC 溶液
遮光サンプル管中で EDC 粉末 38.3 mg を蒸留水 500 µg に溶解させた。(400 mmol/L)
- ・ NHS 溶液
遮光サンプル管中で NHS 粉末 5.78 mg を蒸留水 500 µg に溶解させた。(100 mmol/L)
- ・ PBS 緩衝溶液
200 mL のビーカー中で PBS タブレット 1 錠を蒸留水 200 mL に溶解させ、137 mmol/L の NaCl、2.7 mmol/L の KCl を含む Na₂HPO₄ 10 mmol/L のリン酸緩衝液を作製した。作製した溶液を pH メーターで計測すると、水温 25 °C で pH 約 7.4 を示す。その後フィルタリングをかけ、不純物をこしとり、遮光瓶 (500 mL) に入れ冷蔵庫で保管した。
- ・ 抗コルチゾール抗体水溶液
抗コルチゾール抗体原液 (3.7 g/L、270 µL) を PBS 緩衝溶液 9.73 mL に溶解させた (100 µg/L)。作製した溶液をスクリーキャップチューブ (1.5 mL) に 1 mL ずつ分注し、冷凍保存する。使用前に 30°C 恒温槽中で解凍させた。
- ・ 抗メラトニン抗体水溶液
抗メラトニン抗体原液 (1.3 g/L、100 µL) を PBS 緩衝溶液 4.9 mL に溶解させた (26 mg/L)。作製した溶液をスクリーキャップチューブ (1.5 mL) に 1 mL ずつ分注し、冷凍保存する。使用前に 30°C 恒温槽中で解凍させた。

- ブロッキング溶液
遮光サンプル管中で Amino-PEG 2 μL を PBS 緩衝溶液 100 μL と混合させた。
- 測定溶液
三角フラスコ (100 mL) 中でフェロシアン化カリウム 221 mg、フェリシアン化カリウム 165 mg を PBS 緩衝溶液 100 mL に溶解させた。(それぞれ 5 mmol/L)
- コルチゾール水溶液
コルチゾール粉末 3.62 mg を PBS 緩衝溶液 100 mL に溶解させる (10^{-4} mol/L)。超音波洗浄機で振動を加え溶解させた後、フィルタリングを行った。得られたコルチゾール溶液を一部とり、PBS 緩衝溶液と混合し 10 倍希釈を行う。この手順を繰り返し、10 倍刻みで 10^{-14} ~ 10^{-4} mol/L のコルチゾール水溶液を作製した。
- メラトニン水溶液
メラトニン粉末 2.32 mg を PBS 緩衝溶液 100 mL に溶解させる (10^{-4} mol/L)。超音波洗浄機で振動を加え溶解させた後、フィルタリングを行う。得られたコルチゾール溶液を一部とり、PBS 緩衝溶液と混合し 10 倍希釈を行う。この手順を繰り返し、10 倍刻みで 10^{-14} ~ 10^{-4} mol/L のコルチゾール水溶液を作製した。
- プロゲステロン水溶液
プロゲステロン粉末 3.14 mg を PBS 緩衝溶液 100 mL に溶解させる (10^{-4} mol/L)。超音波洗浄機で振動を加え溶解させた後、フィルタリングを行う。得られたコルチゾール溶液を一部とり、PBS 緩衝溶液と混合し 10 倍希釈を行う。この手順を繰り返し、10 倍刻みで 10^{-14} ~ 10^{-4} mol/L のコルチゾール水溶液を作製した。

2.3 コルチゾールバイオセンサの作成方法

2.3.1 酸化 CNT の成膜

PVDF メンブレンフィルター (Durapore 0.1 μm 、 ϕ 47 mm、VVLP04700) に電極材料の酸化 CNT の成膜を行った。500 mg/L 酸化 CNT 溶液から 100 μL 、200 μL 、400 μL 、800 μL を取り出し、それぞれ 50 mL 程度のエタノール 2-プロパノール=19 の混合溶液中に分散させ、超音波洗浄機を使用して 5 分間分散させた。希釈した酸化 CNT 溶液を吸引圧力 80 kPa、30 秒吸引ろ過を行いメンブレンフィルター上に成膜した。それぞれの酸化 CNT 成膜量は直径 35 mm の領域のメンブレンフィルター一枚当たり、50 μg 、100 μg 、200 μg 、400 μg 、単位面積当たりの成膜量は、1.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、2.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、5.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、10.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。今後特に断りがない場合は酸化 CNT 100 μg の電極を使用した。



Fig. 2.1 酸化 CNT を成膜したろ紙

2.3.2 電極基板作製方法

酸化 CNT を成膜したメンブレンフィルターをセンサ電極基板に加工した。厚さ 1mm のテフロンシートから 20 \times 8 mm の長方形を 2 枚切り出す。切り出したテフロンシートのうち片方はボール盤で 2 か所 3 mm の穴を開ける。テフロンシートの切り出し方を図 2.2 に示す。穴を開けたテフロンシートを(A)、穴を開けないテフロンシートを(B)とする。

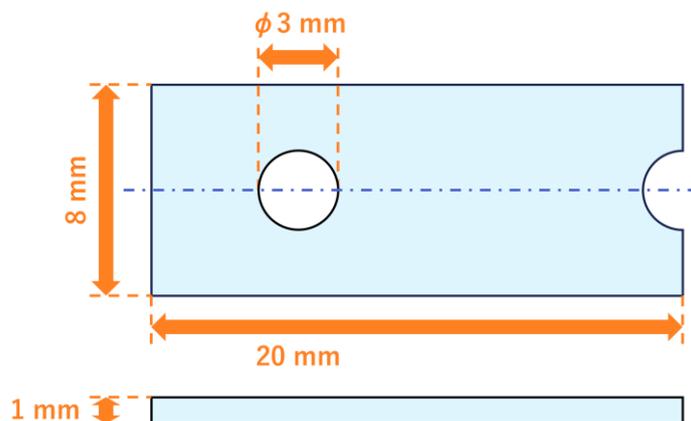


Fig. 2.2 テフロンシートの切り出し

酸化 CNT を成膜したメンブレンフィルターから 5×15 mm の長方形を切り出す。電気的接点を保護するために、酸化 CNT が成膜されている面の半分に導電性ペーストを薄く塗り、室温で 4 時間以上乾燥させた。これを(C)とする。(C)の導電性ペースト側の短辺を、(A)の半月状の穴に合わせ、カプトンテープで張り付ける。このときに(A)からはみ出たカプトンテープはカッターナイフで切り取る。次に(A)のカプトンテープを張り付けた面に(B)を当て、2 本のカプトンテープで巻き付けてセンサ電極基板とした。

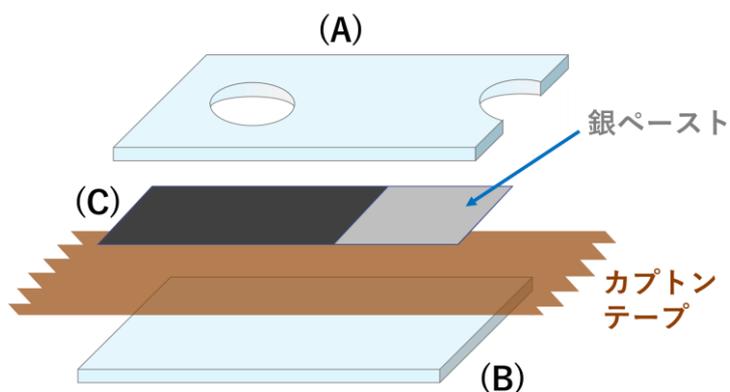


Fig. 2.3 電極組み立て方法

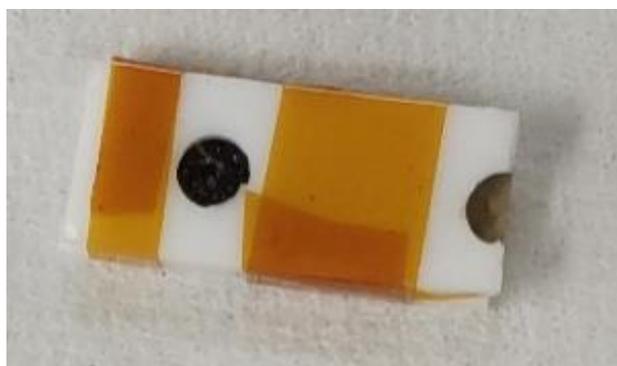


Fig. 2.4 作製した電極

2.3.3 抗コルチゾール抗体の固定化

電極表面に抗コルチゾール抗体を固定化させるため、EDC/NHS 反応を用いてカルボキシ基を持つ酸化 CNT 上に抗コルチゾール抗体を化学結合させる。反応の概略を図 2.5 に示す。初めにカルボキシ基と EDC が反応し、O-オシルイソウレア中間体を形成する。次に溶液中で不安定である O-オシルイソウレア中間体は NHS と反応することで、比較的安定性の高い NHS エステル末端がカルボキシル基に形成される。NHS エステル末端はアミノ基との反応性が高く、アミド結合によりアミノ基を有するタンパク質分子などの第一級アミンを化学結合させることが可能となる。すなわち、抗体表面に多数存在するアミノ基と酸化 CNT を化学結合によって結びつけることで、抗体を酸化 CNT 上に固定化した。

本研究では基板を 400 mmol/L の EDC 溶液液 500 μ L に基板を浸漬させ 22 $^{\circ}$ C の恒温槽内に 15 分間静置させた後、100 mmol/L の NHS 溶液 500 μ L を混合し (EDC : 200 mmol/L、NHS : 50 mmol/L、1 mL)、22 $^{\circ}$ C の恒温槽内で 30 分間静置させることで酸化 CNT のカルボキシ基を NHS エステルに置換した。その後、蒸留水で基板の洗浄を行い、電極測定窓のくぼみに 100 ng/mL の抗コルチゾール抗体溶液を電極上に 50 μ L 滴下して、30 $^{\circ}$ C の恒温槽内で 90 分間静置させ、カップリング反応による抗コルチゾール抗体の固定を行った。この際、恒温槽内で滴下した溶液が蒸発しないよう、シャーレを被せて抗体の固定を行った。

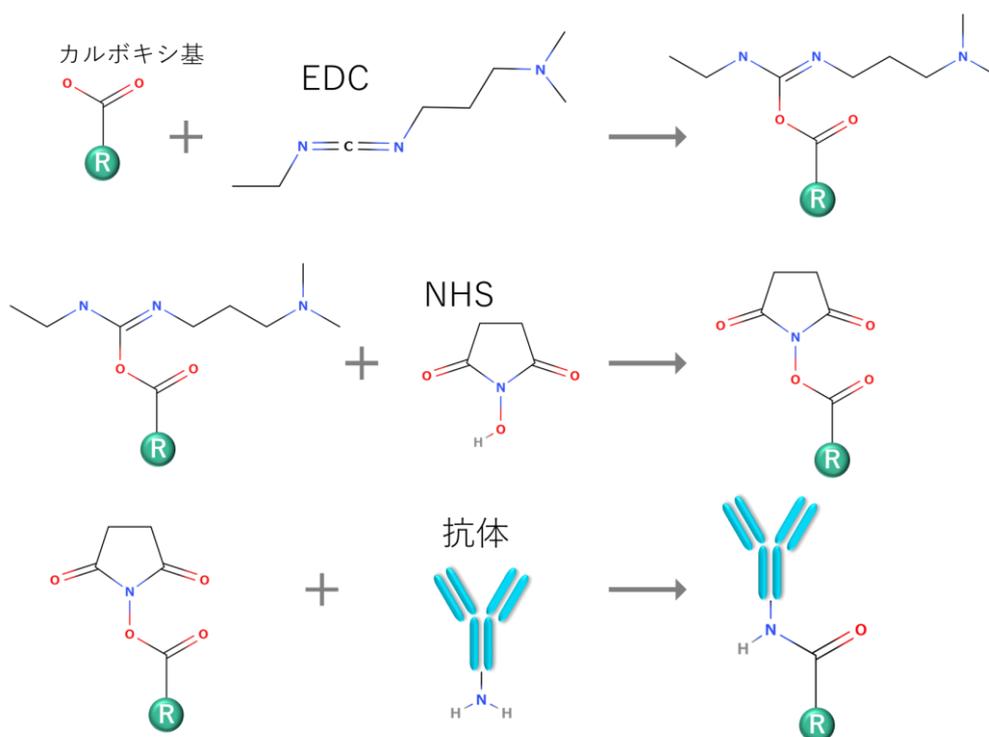


Fig. 2.5 抗体固定化手順

2.3.4 ブロッキング処理

抗コルチゾール抗体固定後の電極表面には、抗体と未反応な NHS エステル末端が残留している可能性がある。残留したエステル末端は第一級アミンと化学結合し、電極表面に予期せぬ分子の結合（非特異吸着）を引き起こすため、センサの選択性を損ねてしまう原因となる。そのため、残留したエステル末端に不活性な分子（ブロッキング材）を結合させ、非特異吸着を防ぐためのブロッキング処理を行う必要がある。本研究では、第一級アミンの一種であるトリエチレングリコールアミン（Amino-PEG）をブロッキング材として用いてブロッキング処理を行った。Amino-PEG の構造式を Fig. 2.5 に示す。

本研究では、抗体固定後の基板を蒸留水で洗浄した後、電極測定窓のくぼみに 2 wt% のブロッキング溶液を 50 μ L 滴下し、シャーレを被せて 30 $^{\circ}$ C の恒温槽内で 30 分間静置させ、ブロッキング処理を行うことでコルチゾールバイオセンサとした。作製したセンサは、蒸留水で洗浄した後、PBS 緩衝溶液に浸漬させ、4 $^{\circ}$ C の冷蔵庫内に保存した。

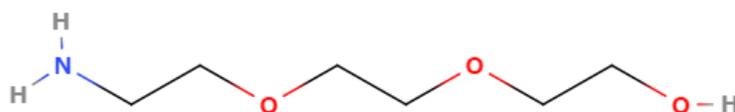


Fig. 2.6 トリエチレングリコールアミン（Amino-PEG）の構造式

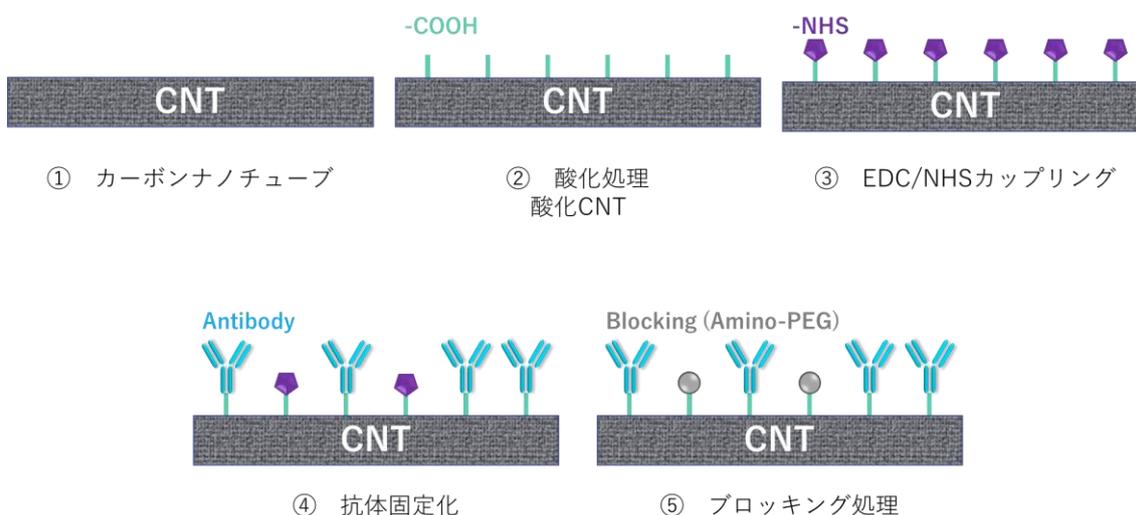


Fig. 2.7 電極表面修飾手順

2.4 測定方法

2.4.1 電極上酸化 CNT 膜の SEM による観察方法

酸化 CNT を成膜した試料がどのようにろ紙上に固定化されているかを確認するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) Hitachi S4000 を使用して表面および断面を撮影し観察した。

・表面

酸化 CNT ろ紙を一辺 5~10 mm 程度の長方形に切り取り、酸化 CNT 面を上向きにしてカーボン両面テープで試料台に固定した。印加電圧 3.0 kV または 5.0 kV、撮影倍率 13000 倍で撮影した。

・断面

酸化 CNT ろ紙を一辺 5~10 mm 程度の長方形に切り取る。そのうち測定に使用する辺は、ガラス板を敷き、鋭利な剃刀を垂直に押し当てて切断した。測定部を上向きにしてステンレスブロックの側面に張り付け、カーボンテープで固定した。ステンレスブロックをカーボン両面テープで試料台に固定した。印加電圧 10 kV、撮影倍率 600 倍または 1500 倍で撮影した。

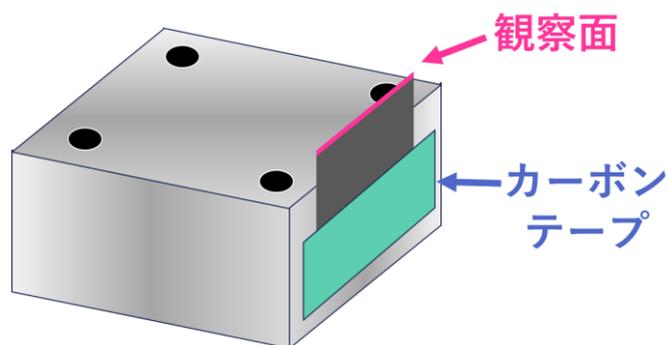


Fig. 2.8 電極断面の撮影方法

2.4.2 電極の表面抵抗率測定

電極に成膜された酸化 CNT 量を推定するため、作製した電極のシート抵抗を求めた。シート抵抗は、薄膜などの拡散層などの薄い膜の電気抵抗を表すもので、単位は Ω/\square で表される。シート抵抗は以下の式で求められる。

$$R = \rho \frac{L}{A} = \rho \frac{L}{Wt} = \frac{L}{W} \rho_s$$

$$\rho_s = \frac{\rho}{t} = R \frac{W}{L}$$

R : 抵抗 (Ω) ρ : 抵抗率 ($\Omega \cdot \text{cm}$) ρ_s : シート抵抗 (Ω/\square)
 L : 長さ W : 幅 t : 厚さ A : 断面積

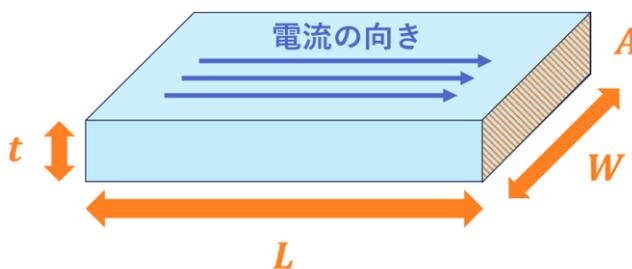


Fig. 2.9 シート抵抗概要

四端子抵抗測定法は定電流を供給する電源端子の間に、電圧降下を検知する電圧検知端子が配置されている。この方法は端子抵抗や接触抵抗の影響を受けずに抵抗値を求められる。抵抗値 R を測定し、試料幅と端子間距離から電極のシート抵抗 ρ_s を求める。本実験では酸化 CNT ろ紙を幅 2 mm で切り出し、 $L = 5 \text{ mm}$ 、 $W = 2 \text{ mm}$ とした。抵抗値測定は KESIGHT の DMM6500 型 6.5 桁デジタル・マルチメータを使用した。

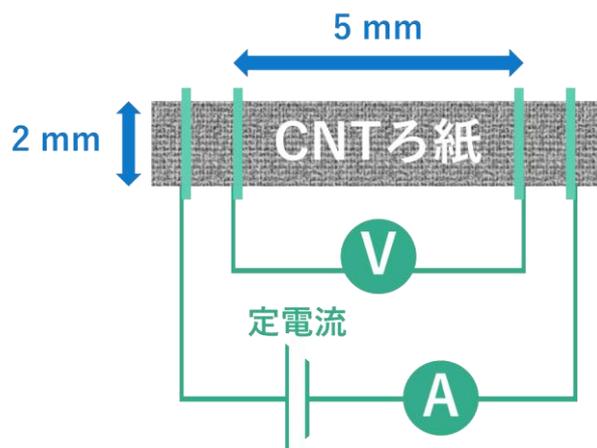


Fig. 2.10 四端子法概略図

2.4.3 EIS 測定手順

2.3 節によって作製したコルチゾールバイオセンサの特性を EIS 法によって評価を行った。測定溶液はレドックスプローブとして $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ を PBS 緩衝溶液中に溶解させた溶液を使用し、作用極に作製した試料、参照電極に Ag/AgCl 参照電極、対極に Pt 電極を使用し EIS 測定を行った。

EIS 測定は印加交流電圧 10 mV、印加直流電圧 210 mV、周波数域 100 kHz から 100 mHz、測定ポイント数 40 の条件の下で行った。測定装置は、Metrohm 社の Autolab PGSTAT128N を使用した。測定によって得られたインピーダンス値より等価回路でのフィッティングシミュレーションを行い、得られた電荷移動抵抗 (R_{ct}) の値で電極表面の状態を評価した。シミュレーションは CPE 要素を含む等価回路を利用した。 R_{ct} の値が小さい場合、フィッティングが正確に行えないため、この時は高周波領域のみを使用し、拡散インピーダンスを除いた等価回路モデルで各パラメータを算出した。EIS 測定で得られたインピーダンス実測値はナイキストプロット上に測定点ごとにシンボルをプロットし、算出したフィッティングモデルは実線で表示した。

各測定の共通事項として、始めにセンサ作製直後の何も反応させていない電極を用いて、EIS 測定を行った。すなわちコルチゾールと未反応な状態のセンサの抵抗値を基準としてセンサの特性を評価した。具体的には作製したセンサを PBS 緩衝溶液に浸漬し、30°C の恒温槽内で 20 分間静置した上で EIS 測定を行った。この結果を濃度 0 mol/L とし、濃度定量的ためのデータの規格化に用いた。

2.4.4 表面修飾による電荷移動抵抗の評価方法

電極上に抗体固定化及びブロッキング処理がなされたか確認を行うため、2.3.3 節、2.3.4 節の表面修飾過程のうち、未反応の酸化 CNT、NHS エステル末端、抗体固定化、ブロッキング処理の各段階において R_{ct} の変化を測定した。

2.4.5 センサ電極の耐久性評価方法

作製したセンサとして使用する上で浸漬、洗浄、測定を繰り返すに耐えられるかを確認するために、同様の測定手順を繰り返し R_{ct} の変化を調べた。作製したセンサを PBS 緩衝溶液に浸漬し、30°Cの恒温槽内で20分間静置した。基板を蒸留水で洗浄し、ブローアで電極上の水滴を取り除いた後に EIS 測定を行った。測定後、基板を蒸留水で洗浄し再び PBS 緩衝溶液に浸漬させた。この手順を繰り返し R_{ct} の変化率を求め、センサ電極の劣化の有無を判定した。

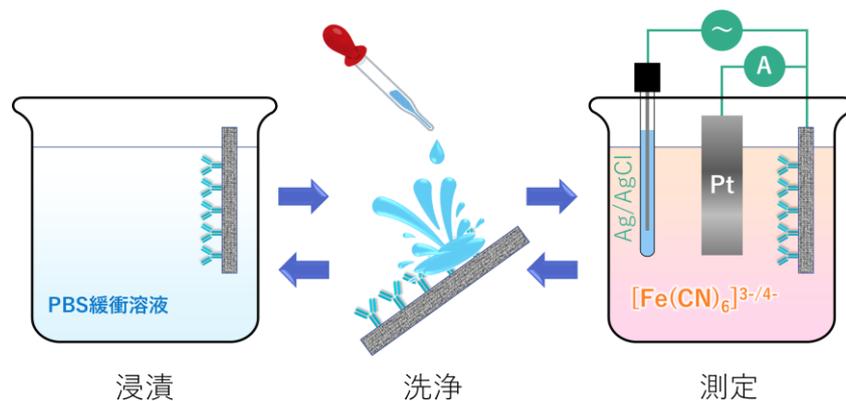


Fig. 2.11 センサの耐久性評価手順

2.4.6 コルチゾール応答特性についての評価方法

作製したセンサを PBS 緩衝溶液に浸漬し、30°Cの恒温槽内で20分間静置した上で EIS 測定を行った。次に 10^{-14} mol/L のコルチゾール溶液に浸漬し、30°Cの恒温槽内で20分間静置し、抗原抗体反応させた。反応後、基板を蒸留水で洗浄し、ブローアで電極上の水滴を取り除いた後に EIS 測定を行った。一連の EIS 測定を 10^{-14} ~ 10^{-4} mol/L まで100倍ずつの濃度、計6濃度のコルチゾール溶液に対して行った。測定で得られた R_{ct} の変化率を求め、 10^{-14} ~ 10^{-4} mol/L の範囲で対数近似の検量線を求めた。

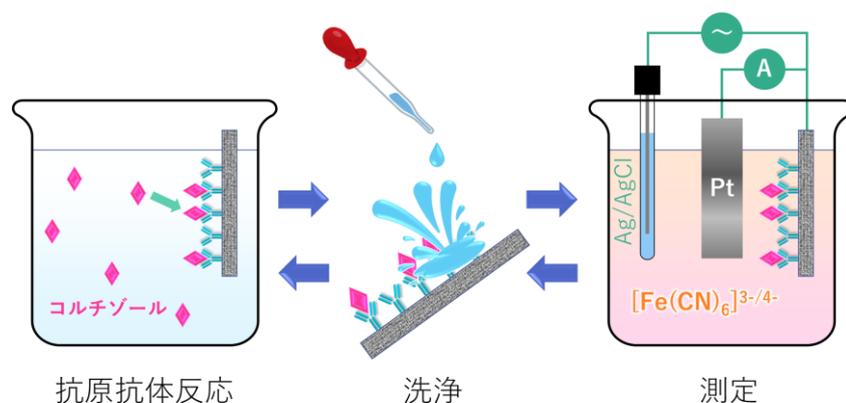


Fig. 2.12 濃度測定手順

2.4.7 電極 ox-CNT 成膜量による性能評価方法

最もセンサの感度が高くなる条件を調べるため、2.3.1 節で作製した CNT 成膜量 50 μg 、100 μg 、200 μg 、400 μg の 4 つの電極を使用して、2.3 節と同様の手順でセンサ電極を作製し、2.4.6 節と同様の測定でコルチゾールの応答特性を調べた。

2.4.8 センサの再現性についての評価方法

センサを作製する上で、センサ特性の再現性は非常に重要な評価対象である。特に、酸化 CNT 膜を成膜したセンサは、酸化 CNT 膜の膜厚や分布状態などが試料により差異があると考えられる。これらの差異が及ぼす影響を調べるため、2.4.6 節の同じ条件で複数の試料作製を行い、センサのコルチゾール応答特性を比較することで再現性の評価を行った。

2.4.9 センサの非特異吸着の評価方法

EIS 測定によって得られた結果には、ファンデルワールス力による物理吸着の影響が含まれている可能性がある。そのため抗コルチゾール抗体と同じ IgG 抗体である抗メラトニン抗体を電極上に固定化させた電極を作製し、特異性の評価を行った。

具体的には抗コルチゾール抗体の代わりに抗メラトニン抗体溶液 50 μL を使用し 2.3 節と同様の手順で作製した電極を使用して 2.4.6 節と同じ条件の下測定した。得られたコルチゾール応答特性を比較することで物理吸着の影響を評価した。

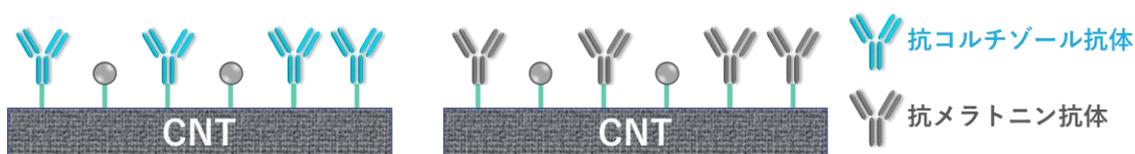


Fig. 2.13 非特異吸着の評価方法

2.4.10 センサの選択性についての評価方法

唾液は、99.5%の水分と 0.5%の無機、および有機成分から構成されている。このことから唾液の実試料には、目的物質のほかに様々な夾雑物が含まれている。夾雑物をセンサが捕らえてしまうと、物理吸着などの非特異的な吸着が解析結果に含まれ、定量精度が落ち定量精度の信頼性が得られない。そのためバイオセンサには、夾雑物に対する選択性が重要である。

今回は、メラトニンとプロゲステロンの測定を行う。メラトニンは、松果体から分泌されることから、睡眠ホルモンと呼ばれる。プロゲステロンは、コルチゾールと同じステロイドホルモンである。コルステロールがプレグネノロンへと変換し、プレグネノロンがプロゲステロンに変換、そしてプロゲステロンからコルチゾールに変換されるため、プロゲステロンとコルチゾールは構造が非常に近い関係にある。ともに唾液中バイオマーカーの一種であるため、これらの物質に対するシグナルを確認することで、夾雑物に対するセンサの選択性からコルチゾール定量結果の信頼性を確認した。

本研究では 2.3 節の手順で作製したセンサ電極（酸化 CNT 100 μg ）を 10^{-14} mol/L のメラトニン水溶液またはプロゲステロン水溶液に浸漬し、30 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽内で 20 分間静置し、抗原抗体反応させた。反応後、基板を蒸留水で洗浄し、EIS 測定を行った。一連の EIS 測定を 10^{-14} ~ 10^{-4} mol/L まで 100 倍ずつの濃度、計 6 濃度のコルチゾール溶液に対して行った。

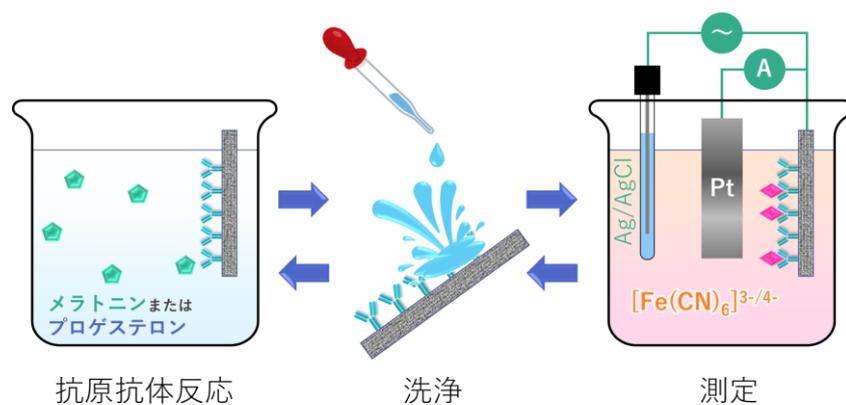


Fig. 2.14 センサ選択性の評価法

第 3 章 実験結果

3.1 電極 CNT の表面、断面観察

各成膜量で酸化 CNT を成膜したろ紙 (PVDF メンブレンフィルター) の表面 SEM 画像を Fig. 3.1a に示す。

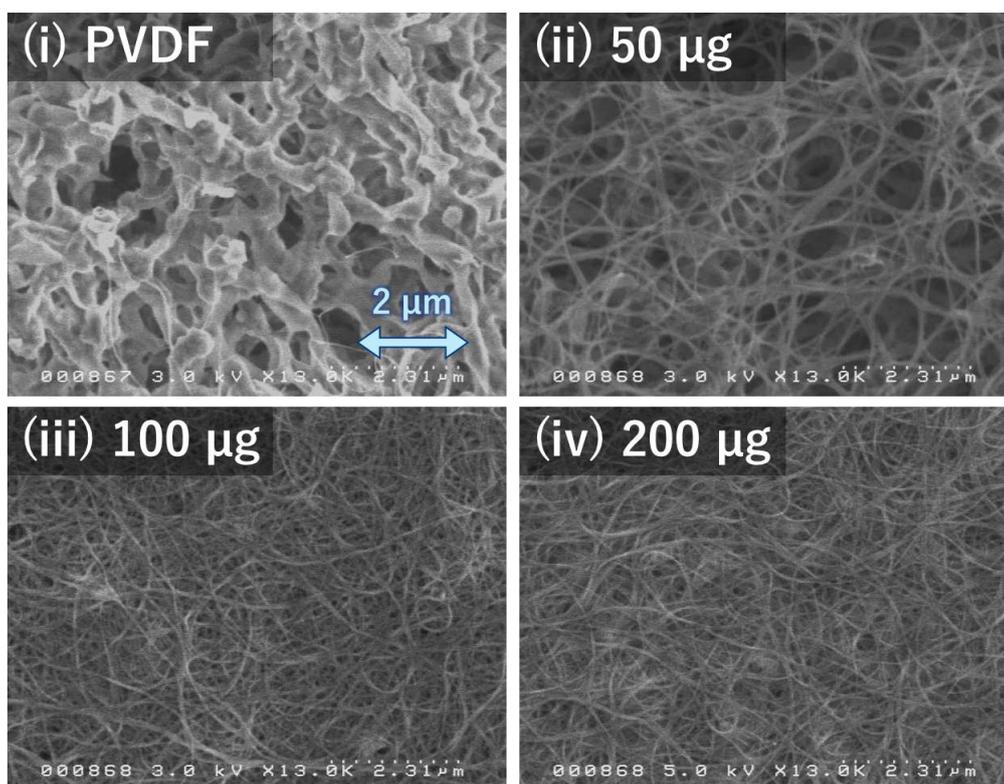


Fig. 3.1a 電極表面の SEM 画像 (13000 倍)

PVDF 表面はひだ上の繊維と穴が開いている様子が確認された。酸化 CNT 成膜後は CNT のチューブ構造と、複雑に絡み合っている様子が確認できる。(ii)成膜量 50 μg の試料は酸化 CNT の奥に PVDF の繊維が確認できる。(iii)100 μg の試料では PVDF の繊維が酸化 CNT に隠れ、見えなくなっている。また(iii)100 μg と(iv)200 μg の資料では表面の形状はほとんど変化がない。

次に CNT ろ紙を切断した断面の SEM 画像を Fig. 3.1b、3.1c に示す。

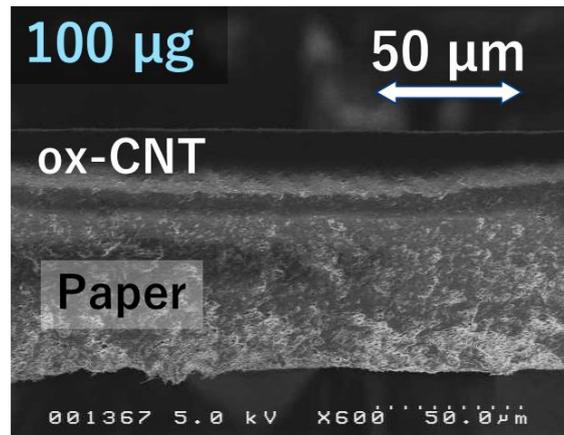


Fig. 3.1b 電極断面の SEM 画像 (100 μg 、600 倍)

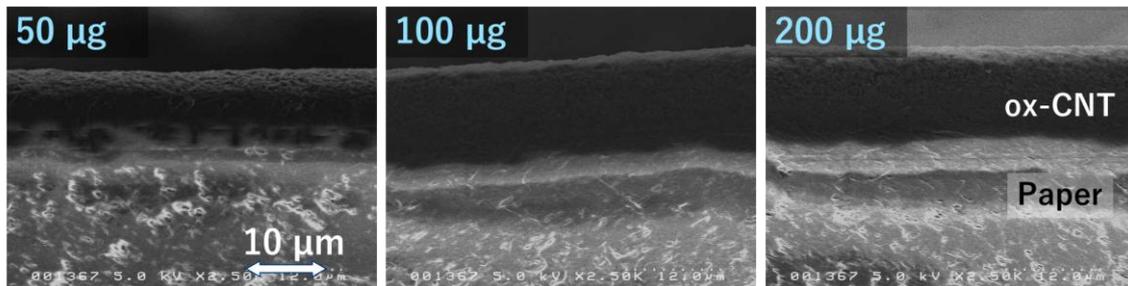


Fig. 3.1c 電極断面の SEM 画像 (2500 倍)

いずれの試料もろ紙の層と酸化 CNT が堆積している層に分離している様子が確認された。また成膜量によらず酸化 CNT 層の厚さは 10 μm 程度で大きな変化がないため、酸化 CNT 密度が変化したと考えられる。2つの層の境界には PVDF の繊維と酸化 CNT が複雑に絡み合っている様子が確認できた。

3.2 電極のシート抵抗測定

測定によって得られた抵抗およびシート抵抗を Table 3.2 に示す。また酸化 CNT 成膜量とシート抵抗の関係を Fig. 3.2 に示す。

Table 3.2 電極シート抵抗

電極	抵抗値 R (Ω)	シート抵抗 ρ_s (Ω/\square)
50 μg	240	96
100 μg	140	56
200 μg	65	26
400 μg	25	10

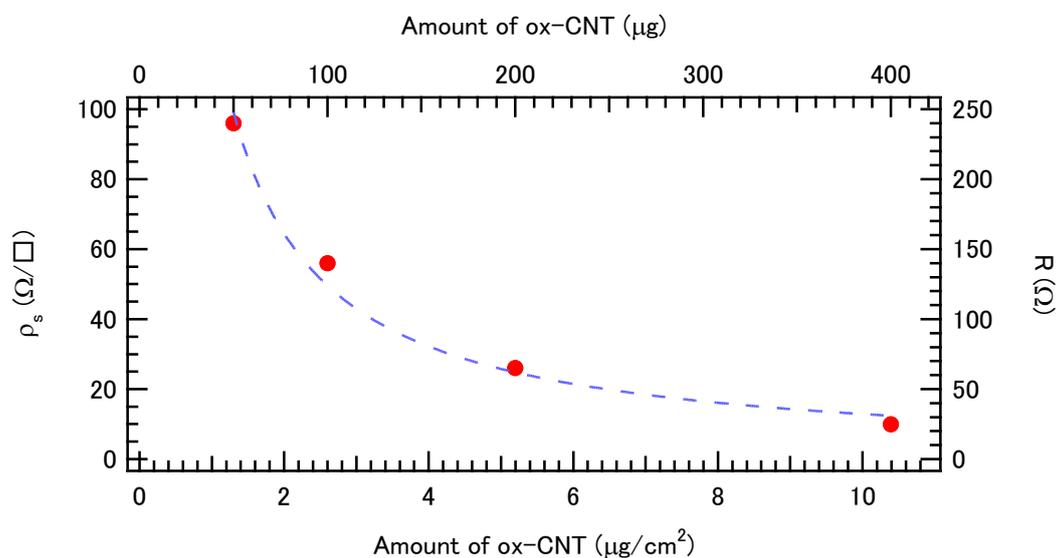


Fig. 3.2 成膜量と電極シート抵抗の関係

成膜量とシート抵抗の間には反比例の関係が成り立つ。これは酸化 CNT が導電性であることによるものと考えられる。また 3.1 節より酸化 CNT の成膜量を変えても厚さが変化しないことが確認されたが、この結果から酸化 CNT 層の密度が成膜量に比例していると考えられる。 $\rho_s = \rho/t$ より ρ_s は t に反比例すると考えられるが、SEM 画像より t は一定であることが確認されている。酸化 CNT が増加することによって抵抗率 ρ が反比例で減少すると考えられる。

3.3 表面修飾による電荷移動抵抗の評価結果

センサ電極の表面修飾過程のうち、未反応の酸化 CNT、NHS エステル末端、抗体固定化、ブロッキング処理の各段階におけるナイキストプロットを Fig.3.2a に示す。またナイキストプロットのシミュレーション結果から得られた R_{ct} の変化を Fig 3.3b に示す。この実験の結果、表面修飾過程ごとのナイキストプロットの変化が確認された。

センサ電極では、酸化 CNT から EDC/NHS カップリングで R_{ct} の減少、抗体固定化後で R_{ct} の増加がみられ、抗体固定化後からブロッキング後で R_{ct} のさらなる増加がみられた。EDC/NHS によるカルボキシ基の活性化後の抵抗値減少は、前過程の電極表面カルボキシ基が負の電荷を持っている状態に対して、NHS 基は電気的中性であり、電極上に修飾されることで、電氣的に負に帯電した $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ を表面により引き寄せることによって電荷移動が行いやすくなったことが要因として考えられる。抗体の修飾とブロッキングによる抵抗値の増加は、抗体とトリエチレングリコールアミンが電極に修飾されることで、レドックスプローブから電極表面への電荷移動が阻害されることが要因として考えられる。このように、各過程のプロットに違いがあることから、各段階で表面が修飾されていることが確認できた。

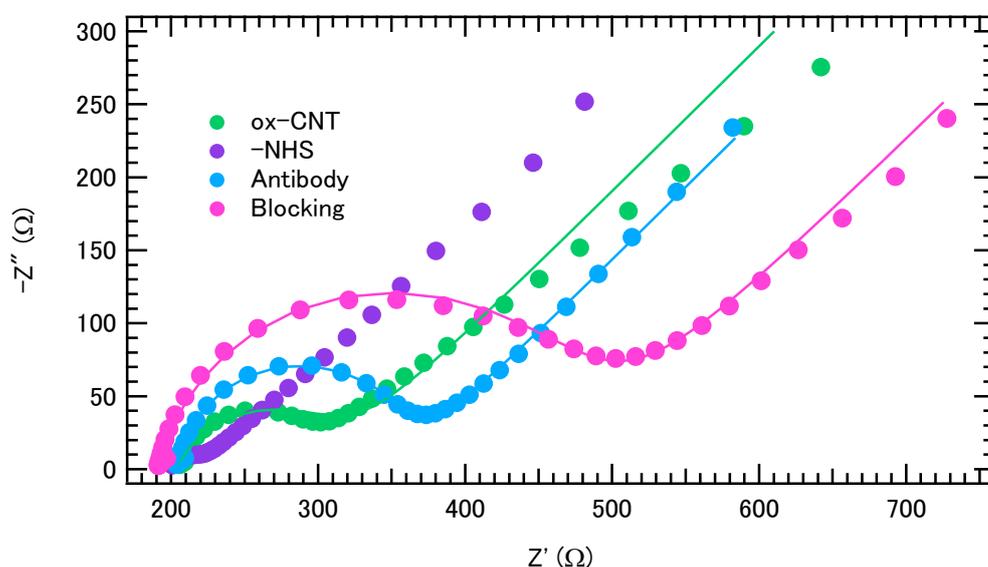
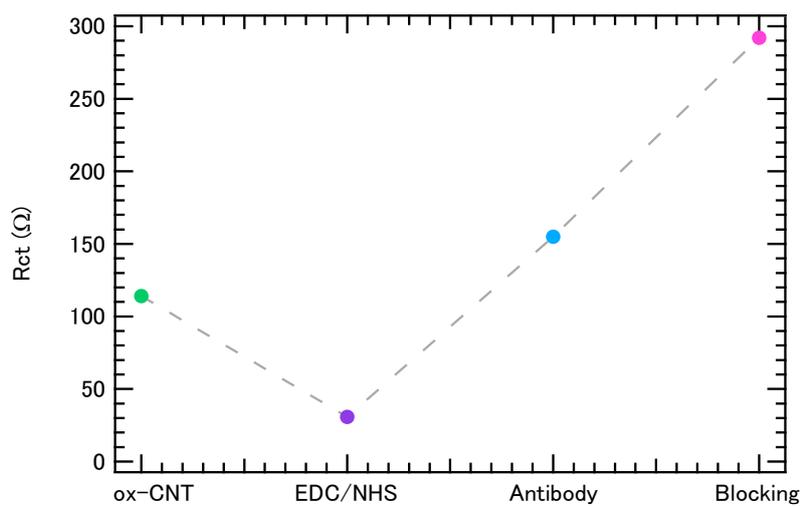


Fig. 3.3a 修飾過程毎の EIS 測定ナイキストプロット

Table 3.3 シミュレーション結果

<i>Count</i>	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
ox-CNT	204	114	39.9	0.737	70.0	251
-NHS	199	33.4	8.20	0.679	20.4	—
Antibody	204	155	11.7	0.919	14.2	179
Blocking	191	292	25.7	0.850	36.5	197

Fig. 3.3b 修飾過程毎の R_{ct} の変化

3.4 センサ電極の耐久性評価結果

PBS 緩衝溶液への浸漬と EIS 測定を繰り返した際に酸化 CNT が表面から脱離するなどにより、電極そのものが劣化する可能性がある。これを調べるため、浸漬と測定を繰り返した際のナイキストプロットを Fig. 3.4a、シミュレーション結果から得られた等価回路の各パラメータを Table 3.4、 R_{ct} の変化率を Fig. 3.4b に示す。7 回の測定の変化率は上下 5% 程度に収まっている。3.5 節の濃度測定では測定回数が 7 回であることから、測定手順における浸漬と測定を繰り返して、十分な耐久性を持つことを確認した。

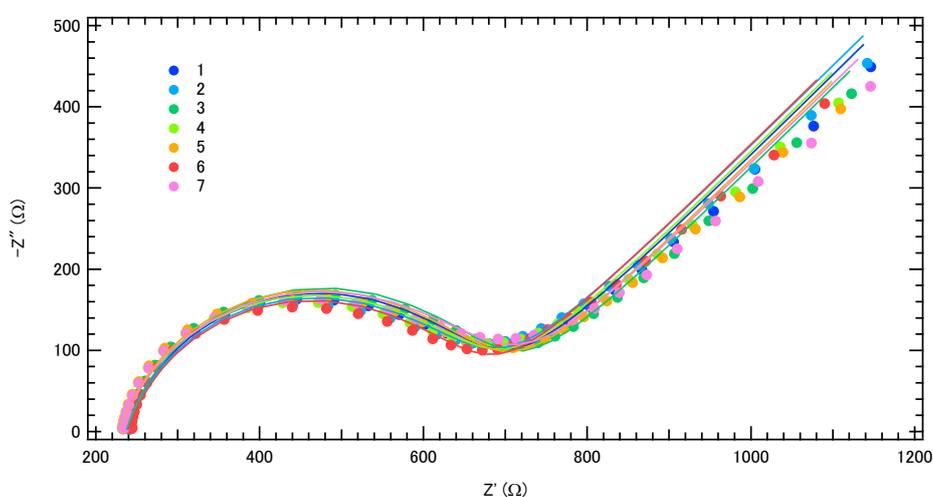


Fig. 3.4a 測定繰り返しにおける EIS 測定ナイキストプロット

Table 3.4 シミュレーション結果

Count	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
1	238	432	10.4	0.824	20.2	376
2	238	422	11.3	0.815	22.6	384
3	237	448	10.3	0.825	20.0	350
4	229	438	12.6	0.806	25.8	348
5	230	447	10.9	0.819	21.5	340
6	239	417	11.7	0.813	23.5	342
7	230	454	13.2	0.799	27.8	361

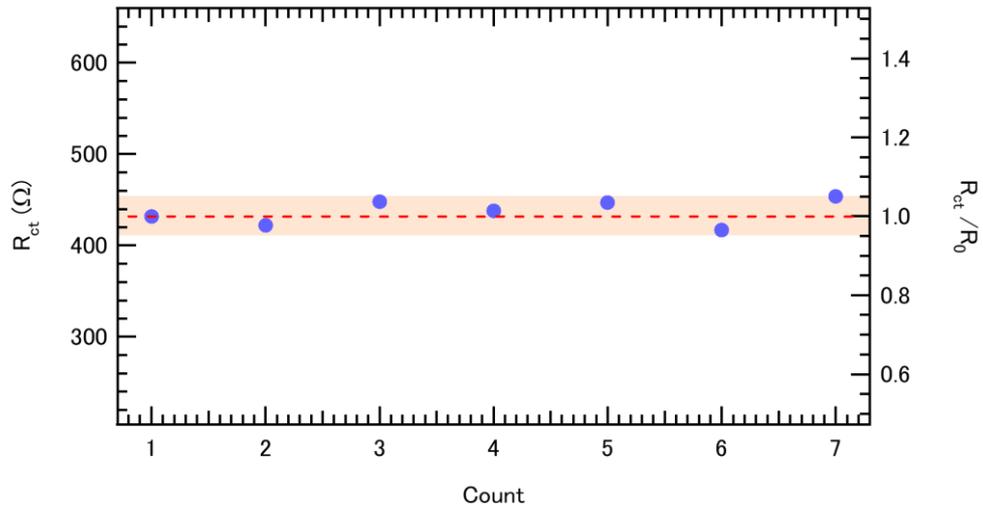


Fig. 3.4b 測定繰り返しにおける R_{ct} の変化

3.5 コルチゾール応答特性についての評価結果

2.4.6 節の手順で、センサ電極を異なる濃度のコルチゾール溶液に浸漬させ、EIS 測定によって得られたナイキストプロットとシミュレーション結果を Fig. 3.5a に示す。また等価回路モデルによるフィッティングパラメータの結果を Table 3.5 に、コルチゾール濃度と R_{ct} の変化率の関係、また測定結果から得られた検量線を Fig. 3.5b 示す。プロットの色はコルチゾール濃度の遷移に対応しており、青から赤になるにつれ、濃度が濃くなっていることを表している。最も内側にある灰色のプロットは、コルチゾールと反応させていないときのプロットである。反応させるコルチゾール濃度の上昇とともに、 R_{ct} 増加していくことがわかる。これは、抗原抗体反応によりコルチゾールがセンサ表面に吸着し、電流を阻害したためである。

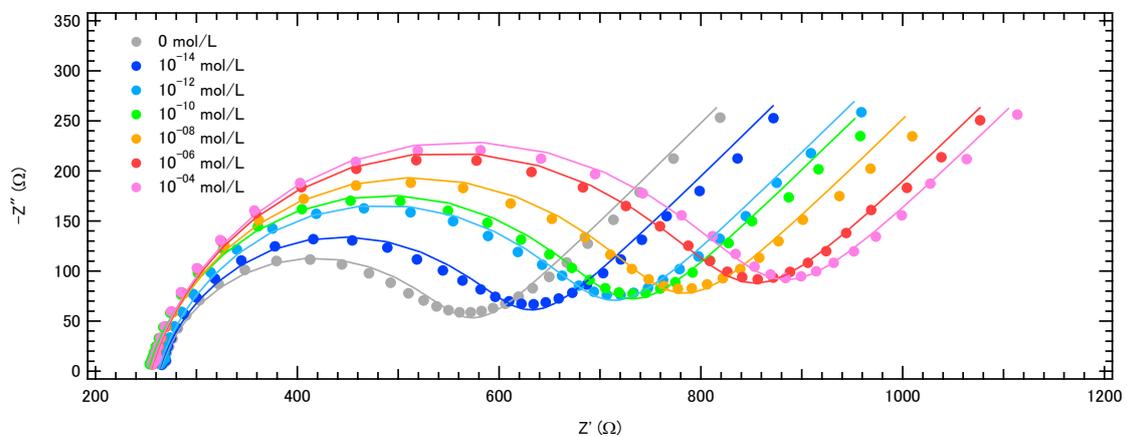


Fig. 3.5 コルチゾール濃度変化に対応した EIS 測定ナイキストプロット (100 μg)

Table 3.5 シミュレーション結果

c (mol/L)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
0	264	292	11.3	0.819	21.7	208
10^{-14}	263	348	11.3	0.819	22.0	209
10^{-12}	262	426	10.5	0.827	20.3	212
10^{-10}	252	454	11.1	0.824	21.5	199
10^{-8}	255	500	11.0	0.820	22.0	200
10^{-6}	255	567	11.3	0.821	22.6	206
10^{-4}	254	597	11.4	0.819	23.1	206

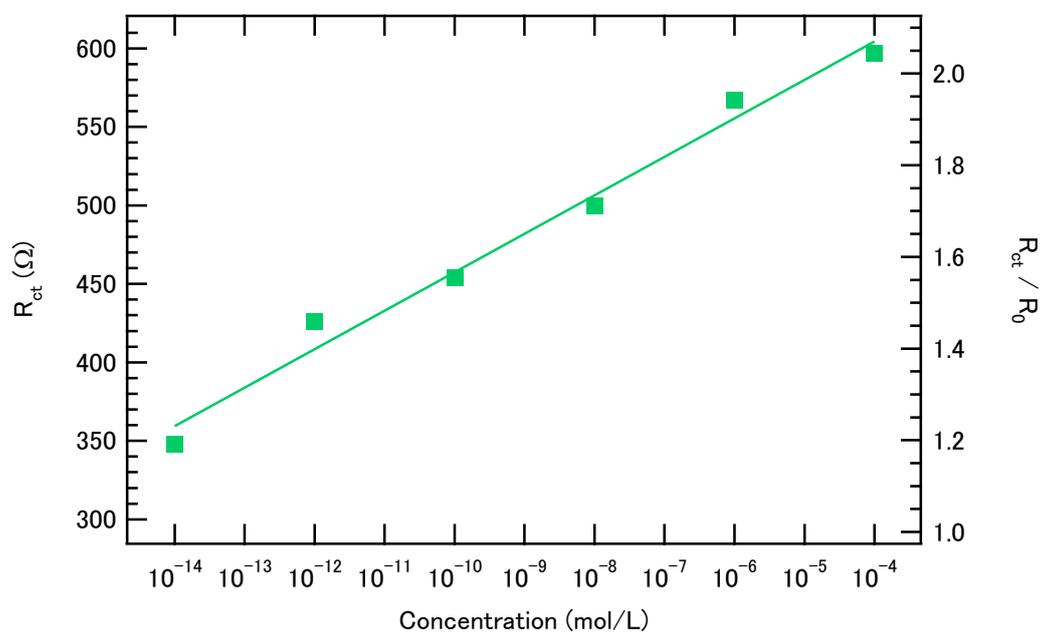


Fig. 3.5b センサのコルチゾール応答特性

R_{ct} の変化率から得られた検量線は

$$y = 0.08381 \log_{10}(x) + 2.4054$$

決定係数は $R^2 = 0.984$ となった。

3.6 電極 ox-CNT 成膜量による性能評価結果

2.4.7 節の手順で酸化 CNT 成膜量を変えた電極でセンサを作製し、EIS 測定を行った結果を Fig. 3.6a、3.6b、3.6c に示す。また等価回路モデルによるフィッティングパラメータの結果を Table 3.6a、3.6b、3.6c に、それぞれの電極において、コルチゾール濃度と R_{ct} の変化率の関係を Fig. 3.6d に示す。酸化 CNT 成膜量 100 μg の電極によるセンサの EIS 測定結果は、前節 3.4 に記述した。酸化 CNT 成膜量と各濃度での R_{ct} 変化率の関係を Fig. 3.6e に示す。これを比較すると、最もセンサ感度が高くなるのは酸化 CNT 100 μg の電極、次に 200 μg の電極であったが、両者のセンサ感度に大きな差はなかった。酸化 CNT 50 μg 、400 μg の電極はセンサ感度が半分程度に低下している。

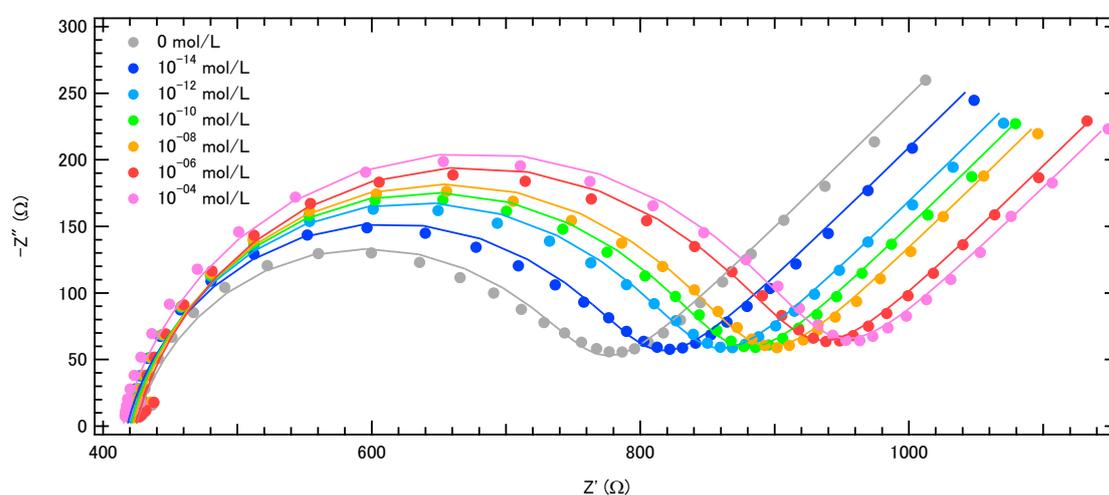


Fig. 3.6a コルチゾール濃度変化に対応した EIS 測定ナイキストプロット (50 μg)

Table 3.6a シミュレーション結果 (50 μg)

c (mol/L)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
0	264	292	11.3	0.819	21.7	208
10^{-14}	263	348	11.3	0.819	22.0	209
10^{-12}	424	331	7.66	0.849	14.3	206
10^{-10}	418	377	7.52	0.852	14.0	198
10^{-8}	420	416	7.47	0.853	14.0	185
10^{-6}	421	434	7.43	0.853	13.9	180
10^{-4}	422	450	7.40	0.854	13.9	176

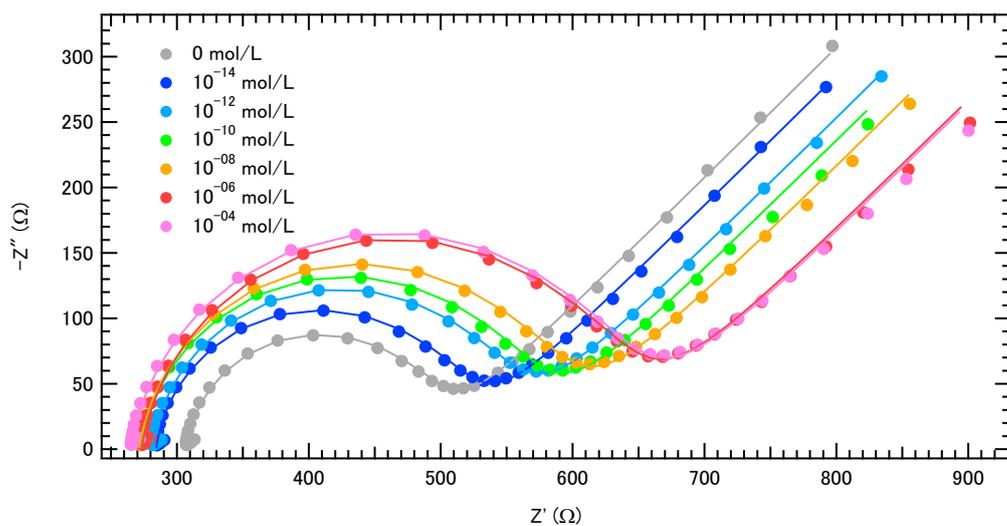


Fig. 3.6b コルチゾール濃度変化に対応した EIS 測定ナイキストプロット (200 µg)

Table 3.6b シミュレーション結果 (200 µg)

c (mol/L)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
0	307	188	7.82	0.927	9.79	240
10^{-14}	284	233	8.63	0.919	11.1	219
10^{-12}	281	269	8.95	0.917	11.7	225
10^{-10}	272	295	9.56	0.909	12.8	204
10^{-8}	271	316	9.62	0.909	12.9	214
10^{-6}	273	364	10.2	0.903	14.0	206
10^{-4}	265	375	10.2	0.903	14.0	203

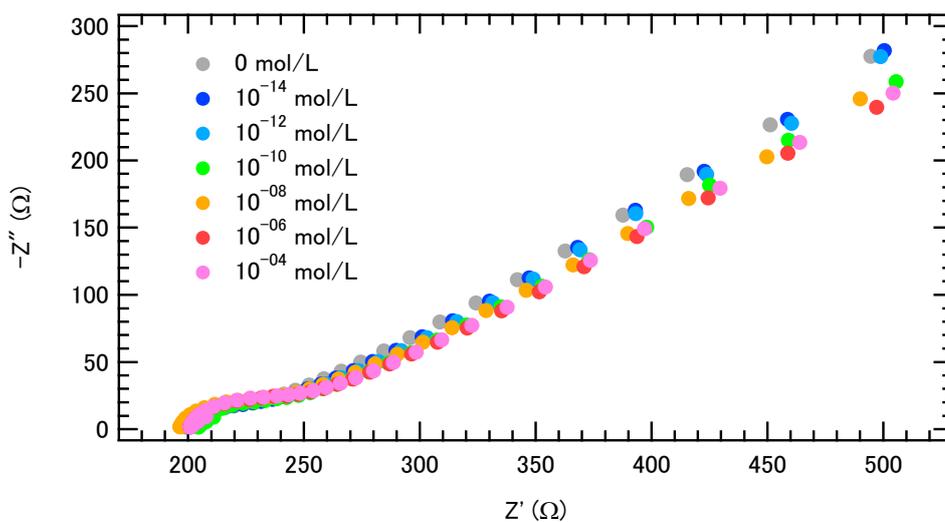


Fig. 3.6c コルチゾール濃度変化に対応した EIS 測定ナイキストプロット (400 µg)

Table 3.6c シミュレーション結果 (400 μg)

c (mol/L)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
0	198	40.7	28.2	0.836	32.5	—
10^{-14}	200	44.5	27.1	0.844	31.5	—
10^{-12}	200	49.9	27.6	0.835	33.1	—
10^{-10}	204	50.0	27.0	0.851	31.5	—
10^{-8}	196	56.7	28.0	0.826	34.8	—
10^{-6}	200	57.0	27.0	0.849	32.2	—
10^{-4}	200	62.2	28.7	0.831	35.7	—

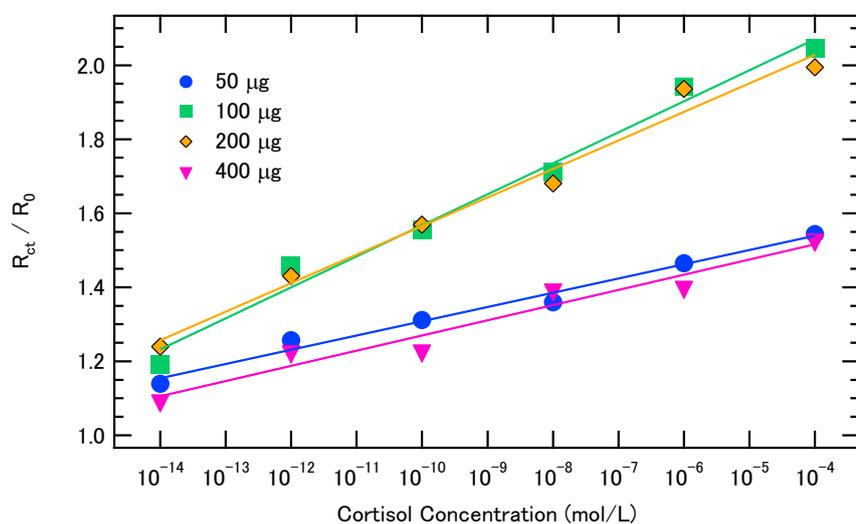


Fig. 3.6d 酸化 CNT 成膜量ごとのセンサのコルチゾール応答特性

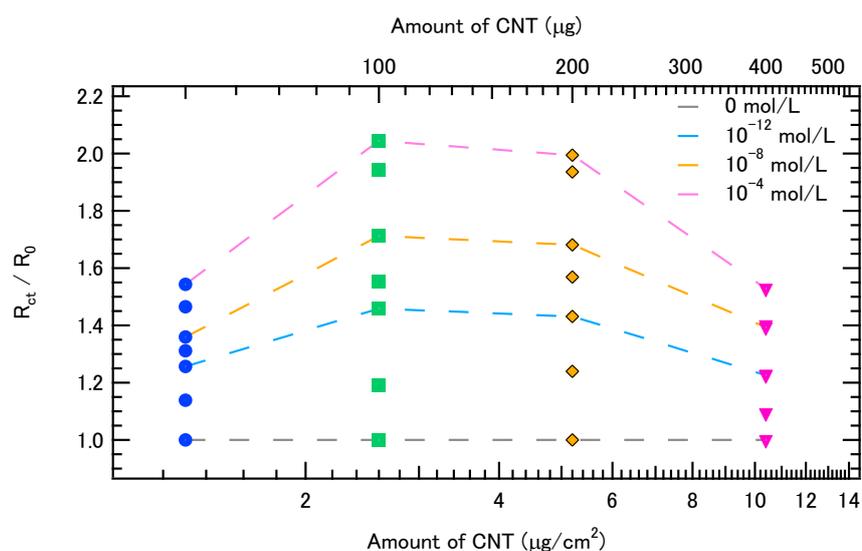


Fig. 3.6e 酸化 CNT 成膜量と R_{ct} 変化率の関係

$$\begin{aligned}
50 \mu\text{g}: y &= 0.03845 \log_{10}(x) + 1.6928, & R^2 &= 0.985 \\
100 \mu\text{g}: y &= 0.08381 \log_{10}(x) + 2.4054, & R^2 &= 0.984 \\
200 \mu\text{g}: y &= 0.07714 \log_{10}(x) + 2.2367, & R^2 &= 0.983 \\
400 \mu\text{g}: y &= 0.04099 \log_{10}(x) + 1.6797, & R^2 &= 0.949
\end{aligned}$$

酸化 CNT 成膜量に対するセンサ感度の依存性について以下のように考察した。3.1 節より酸化 CNT とろ紙の繊維が複雑に絡み合っていることが確認されている。酸化 CNT 成膜量が過少であるとき (50 μg)、実効表面積に対して、ろ紙の繊維と酸化 CNT の接触領域の割合が増加する。抗体は接触部分には固定化されないことから、実効表面積に対する抗体の数が減少したことによるものであると考えた。対して、酸化 CNT の成膜量が過大であるとき (400 μg)、酸化 CNT の層の密度が大きくなるとともに、実効表面積は増加した。分子量が大きい抗体分子 (分子量: 約 15 万) は、ち密な酸化 CNT の層の中に入り込めず、表面部分にのみ固定化されたと推測される。そのため同じく実効表面積に対する抗体の数が減少し、 R_{ct} 変化率が低下してしまうと考える。一方 100 μg ~ 200 μg の成膜量では、実効表面積に対する抗体数が最も大きくなり、センサの感度が最大になると考えられる。酸化 CNT 成膜量と抗体固定化の模式図を Fig. 3.6f に示す。

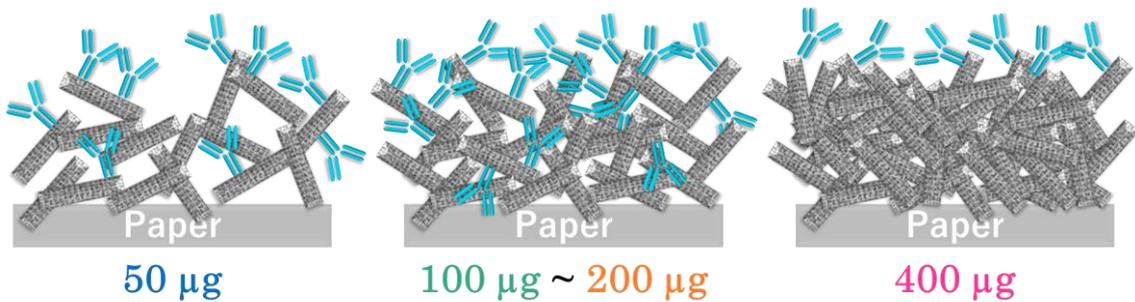


Fig. 3.6f 成膜量と抗体固定化量の関係

3.7 センサの再現性についての評価結果

同じ手順で複数のセンサを作製し、コルチゾール応答特性を測定した結果と回帰分析で得られた検量線を Fig. 3.7 に示す。いずれの試料も非常に一致した特性を示している。異なる基板間でも同様の測定結果が得られ、安定した結果を得られることが確認された。これは、成膜された酸化 CNT 膜は試料ごとの差異が小さいためと考えられ、吸引ろ過を用いた成膜法が有効的であることが測定結果からも示唆される。作製したセンサは高い再現性を持つ結果を示すことが確認された。

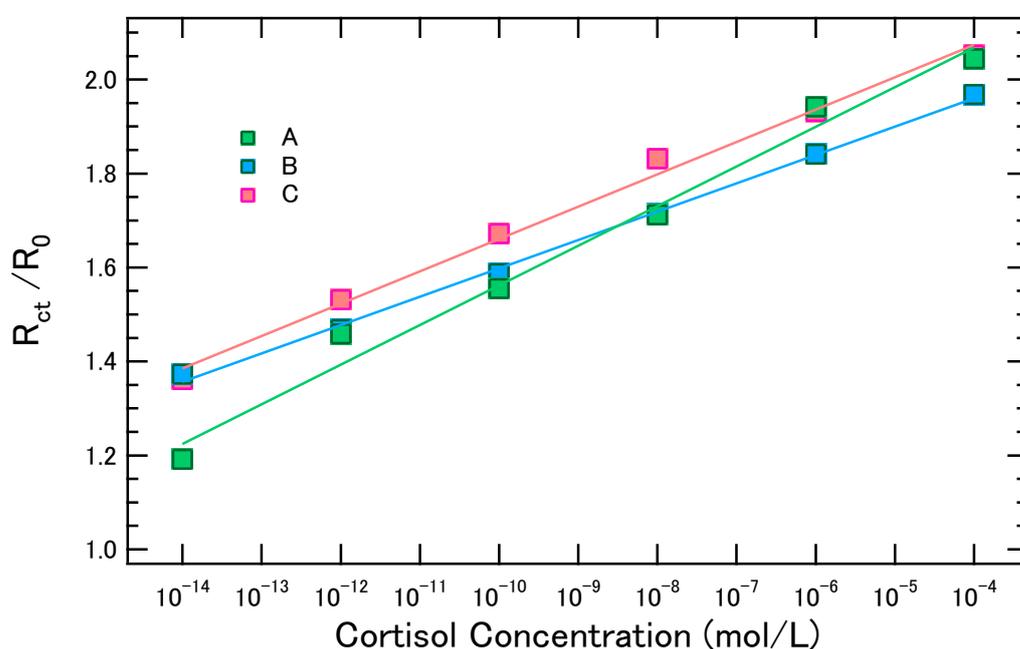


Fig. 3.7 異なる3つのセンサのコルチゾール応答特性比較

測定によって得られた検量線は

$$A: y = 0.08437 \log_{10}(x) + 2.4054, \quad R^2 = 0.993$$

$$B: y = 0.06033 \log_{10}(x) + 2.2016, \quad R^2 = 0.998$$

$$C: y = 0.06885 \log_{10}(x) + 2.3491, \quad R^2 = 0.984$$

となった。

3.8 センサの非特異吸着の評価結果

抗メラトニン抗体を固定化した電極（酸化 CNT 100 μg ）を使用して、EIS 測定によって得られたコルチゾール応答特性のナイキストプロットとシミュレーション結果を Fig. 3.8a に、等価回路モデルによるフィッティングパラメータの結果を Table 3.8 に示す。また各濃度での R_{ct} の変化率において 3.4 節の結果との比較を Fig. 3.8b に示す。抗メラトニン抗体を固定化した電極ではコルチゾール濃度が増加に対し、 10^{-8} mol/L で R_{ct} がわずかに上昇したものの、ほとんど変化が発生しない。つまり抗メラトニン抗体を固定化電極に、コルチゾールは物理吸着を含めてほとんど吸着しないことが分かる。一方、抗コルチゾール抗体を固定化した電極は R_{ct} が大きく増加していることから、この信号は抗原抗体反応に由来することが確認された。このことから作製したセンサは抗原抗体反応によりコルチゾールが吸着し、高い特異性を持つことが示された。

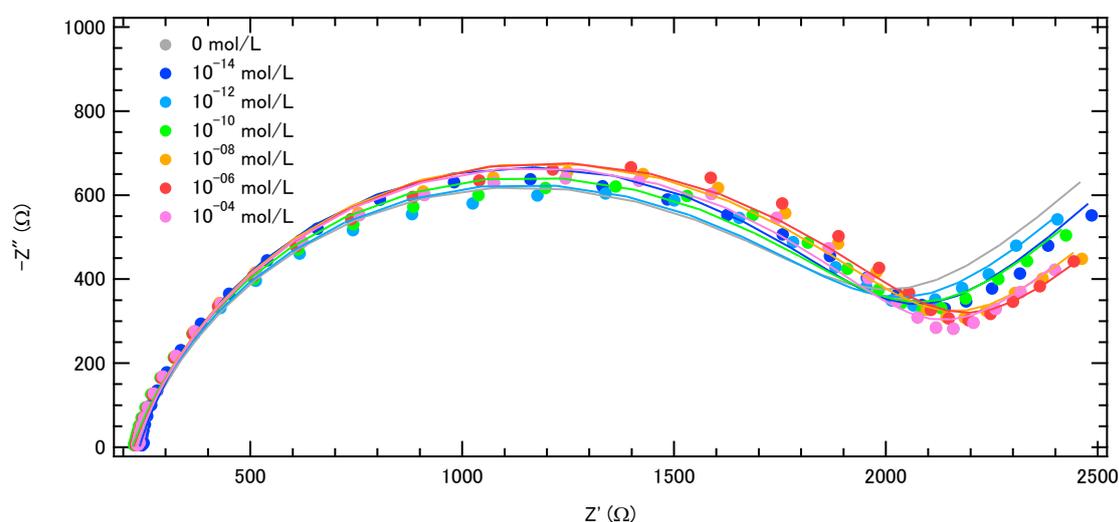


Fig. 3.8a メラトニン抗体を使用した電極の EIS 測定ナイキストプロット

Table 3.8 シミュレーション結果

c (mol/L)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
0	230	1690	17.4	0.780	41.5	468
10^{-14}	238	1730	13.1	0.816	27.2	431
10^{-12}	224	1720	18.6	0.777	44.2	404
10^{-10}	221	1770	18.0	0.781	42.0	374
10^{-8}	227	1840	16.6	0.791	37.5	332
10^{-6}	226	1870	18.1	0.782	42.3	305
10^{-4}	229	1810	16.6	0.791	37.6	302

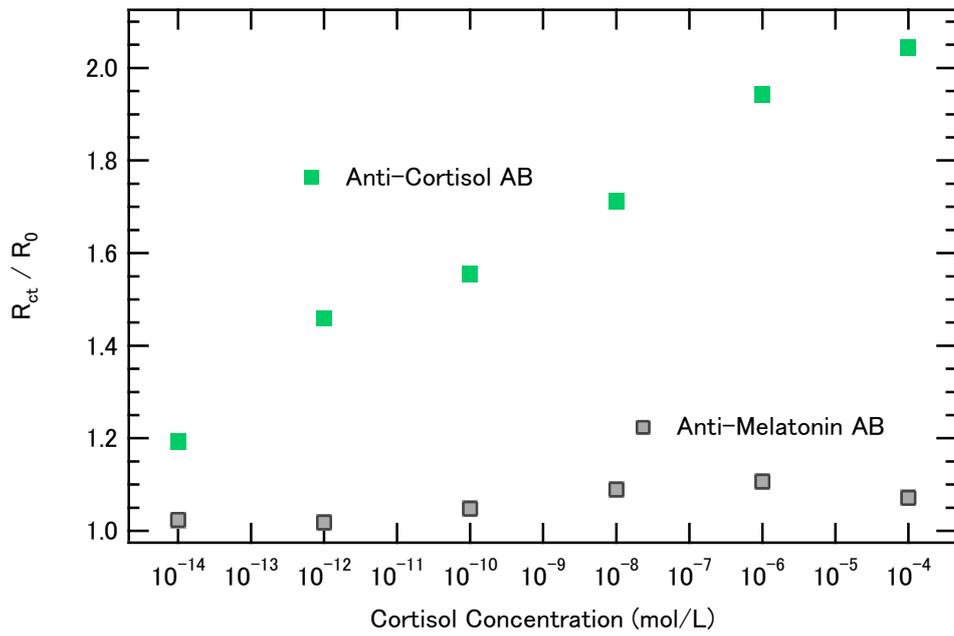


Fig. 3.8b センサのコルチゾール特異性

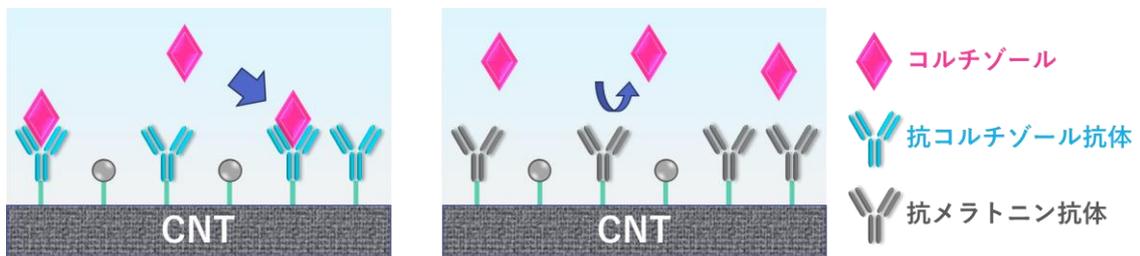


Fig. 3.8c センサ特異性の概要

3.9 センサの選択性についての評価結果

作製したセンサ電極（酸化 CNT 100 μg ）をメラトニンと反応させ、EIS 測定によって得られたコルチゾール応答特性のナイキストプロットとシミュレーション結果を Fig. 3.9a に、等価回路モデルによるフィッティングパラメータの結果を Table 3.9a に示す。またセンサ電極をプロゲステロンと反応させ、EIS 測定によって得られたコルチゾール応答特性のナイキストプロットとシミュレーション結果を Fig. 3.9b に、等価回路モデルによるフィッティングパラメータの結果を Table 3.9b に示す。各濃度での R_{ct} の変化率において 3.4 節の結果との比較を Fig. 3.9c に示す。メラトニン、プロゲステロンを反応させた電極ではどちらも濃度の増加に対し、 10^{-8} mol/L で R_{ct} がわずかに上昇したものの、その後ほとんど変化がない。この結果は 3.8 節の非特異吸着を測定した結果と類似した。このことから作製したセンサはコルチゾール以外の物質を吸着させないことが確認された。

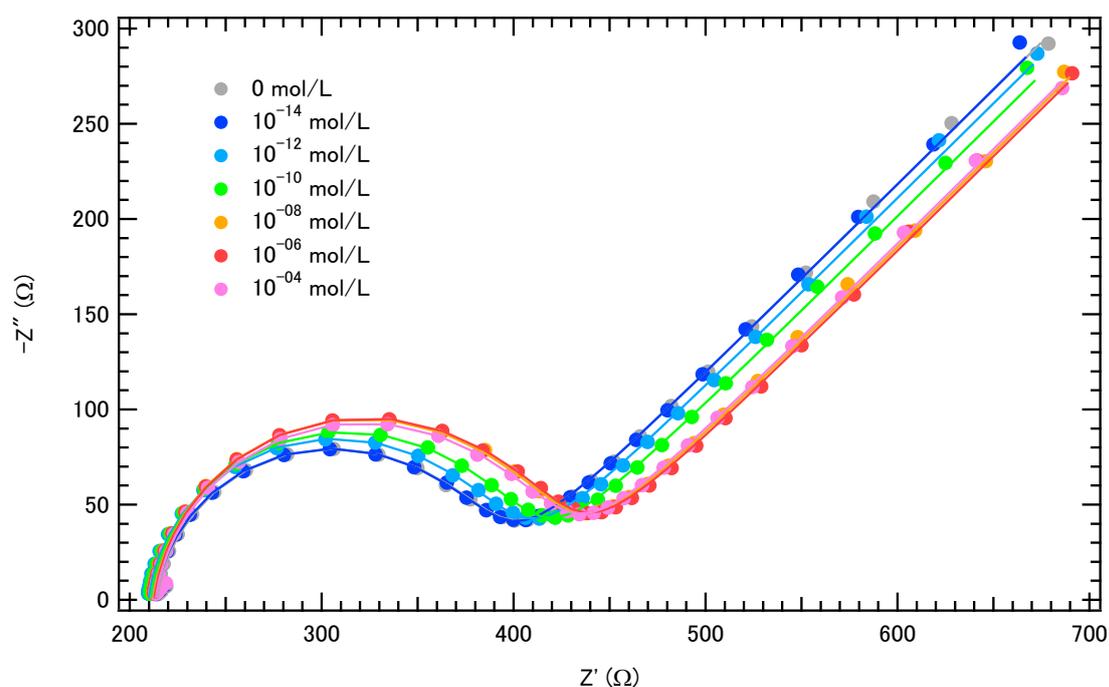


Fig. 3.9a メラトニン反応時の EIS 測定ナイキストプロット

Table 3.9a シミュレーション結果

c (mol/L)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
0	214	170	7.96	0.929	9.73	232
10^{-14}	213	171	8.18	0.926	10.1	225
10^{-12}	210	182	8.01	0.929	9.81	222
10^{-10}	211	190	8.10	0.927	10.0	216
10^{-8}	213	205	8.02	0.929	9.87	217
10^{-6}	213	207	8.2	0.926	10.2	215
10^{-4}	214	202	8.5	0.922	10.7	214

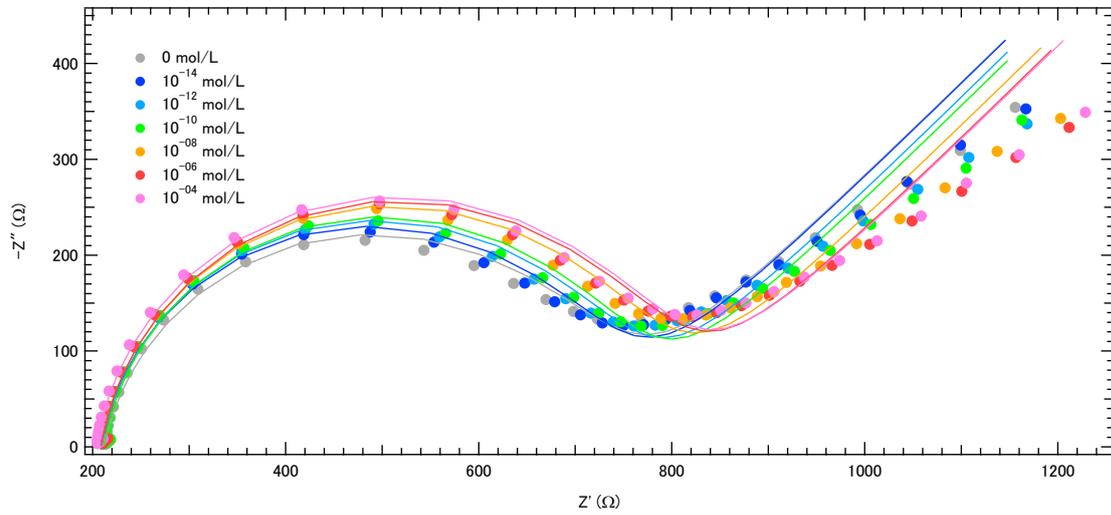


Fig. 3.9b プログステロン反応時の EIS 測定ナイキストプロット

Table 3.9b シミュレーション結果

c (mol/L)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	T ($\mu\text{F}\cdot\text{s}^{p-1}$)	p	C_{eff} (μF)	σ ($\Omega/\text{s}^{1/2}$)
0	212	519	10.40	0.874	16.0	334
10^{-14}	208	522	8.81	0.896	12.6	334
10^{-12}	210	535	8.67	0.898	12.3	324
10^{-10}	212	541	8.43	0.901	11.9	317
10^{-8}	209	566	8.45	0.902	11.8	327
10^{-6}	209	580	8.52	0.900	12.0	326
10^{-4}	204	587	8.17	0.904	11.4	334

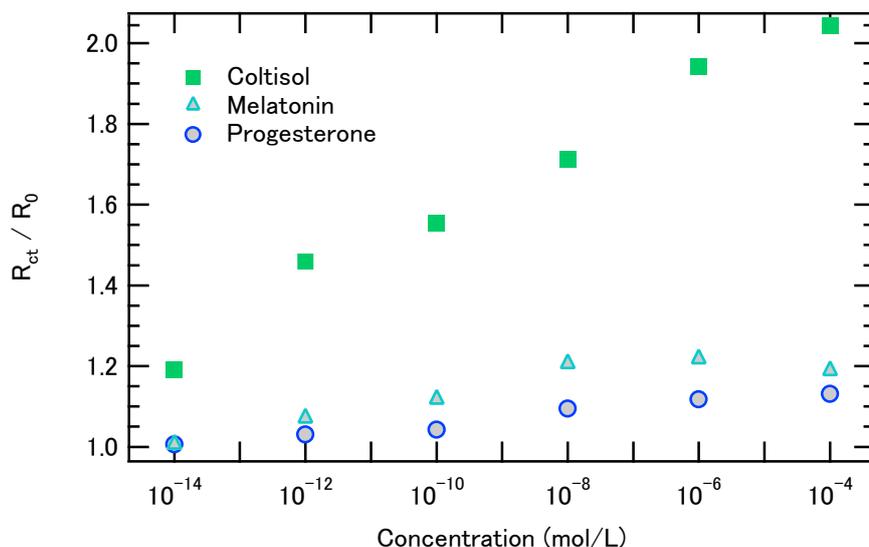


Fig. 3.9c センサのコルチゾール選択性

3.10 先行研究との比較

センサのコルチゾール応答特性をより明確に理解するために、他の電気化学コルチゾールバイオセンサの結果と本研究の結果の比較を行った。電極素材と実験法の比較結果を Table 3.10 に示す。先行研究で報告されているセンサと比較して、本研究のコルチゾールバイオセンサは、低い検出限界と、特に高濃度領域において広い直線範囲を持つことが示された。これは、酸化 CNT が持つ広い有効表面積により、固定される抗コルチゾール抗体の量が他の電極素材を用いたセンサより多いため、また複雑な電極形状により抗体の吸着サイトが埋まりにくいと考えられる。

Table 3.10 先行研究との比較

センシングプラットフォーム	測定法	検出限界(LOD)	線形領域	参照
Au/SAM	EIS 法	1×10^{-12} mol/L	$10^{-12} \sim 10^{-7}$ mol/L	[13]
グラフェン埋め込み スクリーン印刷電極	CV 法	2.8×10^{-10} mol/L	$2.8 \times 10^{-10} \sim$ 5.6×10^{-7} mol/L	[8]
フラーレン/アクリルアミド	EIS 法	1.4×10^{-10} mol/L	$5 \times 10^{-10} \sim$ 6.4×10^{-8} mol/L	[9]
酸化 CNT/ろ紙電極	EIS 法	1×10^{-14} mol/L	$10^{-12} \sim 10^{-6}$ mol/L	本研究

3.11 まとめ

ろ紙上に酸化 CNT を成膜した電極を使用してコルチゾールバイオセンサを作製し、コルチゾール濃度の定量を行ったところ、高感度かつ高濃度域で広い検出領域を有することが確認された。また、酸化 CNT を用いたセンサでも試料ごとのばらつきが小さく、再現性のあるセンサの作製に成功した。さらに非特異吸着を抑え、メラトニンやプロゲステロンなどの夾雑物質と反応せず、コルチゾールのみに対する選択性を持つことが確認できた。したがって、酸化 CNT を用いた本研究で作製したコルチゾールバイオセンサは高感度かつ安定した測定結果が得られるセンサである。また、本研究では、吸引ろ過法により酸化 CNT の成膜を行った。この方法により簡単かつ均一な膜の成膜を実現し、煩雑な工程を要することなくセンサの作製が可能であり、安価、軽量で使い捨て可能なバイオセンサを実現することが可能である。

そして、本センサではコルチゾールの検出を行ったが、識別タンパク質を変更することでウイルスなど様々な対象を検知するセンサへの応用が可能である。

以上のことから、本研究で作製したセンサは CNT を用いた紙ベースバイオセンサの新たな電極モデルに成り得ると考えられる。

謝辞

本研究は東京海洋大学 機能デバイス研究室において行いました。本研究を遂行するための機会や環境を与えていただき、親切な御指導、御鞭撻を賜りました、指導教員の東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 大貫等教授に深く感謝申し上げます。副指導教員の同研究科 柴田恭幸助教には、永くサポートして頂いたと共に本論文の執筆に関する御指導、御鞭撻を賜りました。深く感謝申し上げます。

同研究科の吉岡諭教授には本論文作成にあたり、副査として執筆に関する御指導、御鞭撻を賜りました。深く感謝申し上げます。

本研究では、酸化 CNT 溶液の作製は国立研究開発法人 産業技術総合研究所の施設内にて行いました。CNT の取り扱いに関する御指導や施設の提供を頂いた共同研究者である産業技術総合研究所 ナノカーボンデバイスリサーチセンター所属の張民芳氏に深く感謝申し上げます。

本研究室の学部生、院生には多大な協力と励ましを頂き、日々の研究生生活を楽しく有意義に過ごすことができました。深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] 山口昌樹, 石川拓司, 大橋俊朗, 中島求, “はじめての生体工学”, 講談社 (2016)
- [2] 木元幸一, 後藤潔, 大西敦之, “生化学”, 建帛社 (2021)
- [3] 田中越郎, “病態生理学”, 医学書院 (2011)
- [4] 板垣昌幸, “電気化学インピーダンス法 第3版 原理・測定・解析”, 丸善株式会社 (2022)
- [5] Hend S. Magar, Rabeay Y. A. Hassan, Ashok Mulchandani,
“Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications.” (2021)
- [6] Madison E. Strong, Jeffrey R. Richards, Manuel Torres, Connor M. Beck, Jeffrey T. La Belle, “Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics” (2021)
- [7] Reza Eivazzadeh-Keihan, Ehsan Bahojb Noruzi, Elham Chidar, Mahdokht Jafari, Farahnaz Davoodi, Amir Kashtiaray, Mostafa Ghafari Gorab, Seyed Masoud Hashemi, Shahrzad Javanshir, Reza Ahangari Cohan, Ali Maleki, Mohammad Mahdavi,
“Applications of carbon-based conductive nanomaterials in biosensors” (2022)
- [8] Satish K. Tuteja, Connor Ormsby, Suresh Neethirajan,
“Noninvasive Label-Free Detection of Cortisol and Lactate Using Graphene Embedded Screen-Printed Electrode” (2018)
- [9] Hilmiye Deniz Ertuğrul Uygun, Zihni Onur Uygun, Erhan Canbay, Ferhan Girgin Sağın, Ebru Sezer, “Non-invasive cortisol detection in saliva by using molecularly cortisol imprinted fullerene-acrylamide modified screen printed electrodes” (2020)
- [10] 産業技術総合研究所, 産総研マガジン, “#話題の○○を解説 カーボンナノチューブとは” (2023) https://www.aist.go.jp/aist_j/magazine/20231206.html
[アクセス日 2023.12.5]
- [11] Xiao Li, Zhen Qin, Hao Fu, Ted Li, Ran Peng, Zhijie Li, James M. Rini, Xinyu Liu
“Enhancing the performance of paper-based electrochemical impedance spectroscopy nanobiosensors: An experimental approach” (2021)
- [12] Stefano Cinti, Noemi Colozza, Ilaria Cacciotti, Danila Moscone, Maxim Polomoshnov, Enrico Sowade, Reinhard R. Baumann, Fabiana Arduini, “Electroanalysis moves towards paper-based printed electronics: carbon black nanomodified inkjet-printed sensor for ascorbic acid detection as a case study” (2018)
- [13] Sunil K. Arya, Ganna Chornokur, Manju Venugopal, Shekhar Bhansali
“Dithiobis(succinimidyl propionate) modified gold microarray electrode based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of cortisol (2010)”

参考資料

抗原抗体反応時の適切な温度条件

2.4.6 節の抗体抗原抗体反応時の温度を 26°C、30°C、34°C、38°C に変化させて測定を行った。それぞれの電極において、コルチゾール濃度と R_{ct} の変化率の関係を Fig. 4.1a に示す。また酸化 CNT 成膜量と各濃度での R_{ct} 変化率の関係を Fig. 4.1b に示す。反応温度 30°C でセンサ感度が最大となる。

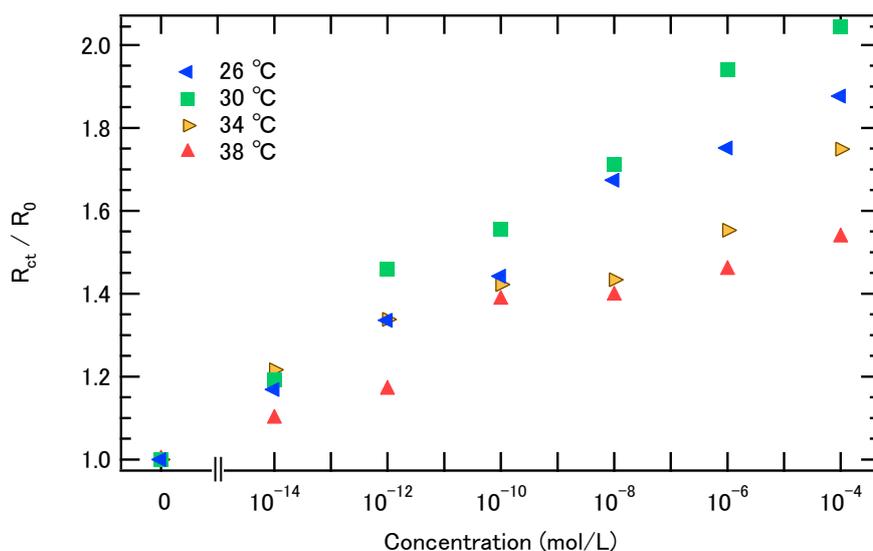


Fig. 4.1a 抗原抗体反応温度ごとのセンサのコルチゾール応答特性

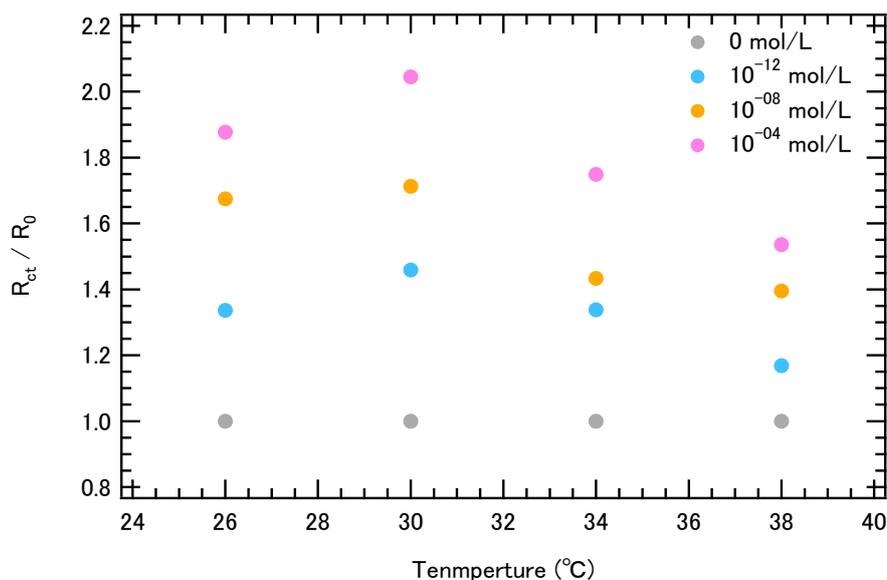


Fig. 4.1b コルチゾール応答特性の抗原抗体反応温度依存性

ブロッキング材の違いによる非特異吸着の評価

非特異吸着の評価を行う際、抗コルチゾール抗体の代わりに、コルチゾールと反応性の乏しい抗メラトニン抗体、ウシ血清アルブミン (BSA)、Amino-PEG を電極に固定化し、コルチゾール水溶液と反応させた際の応答特性から最適なものを選定した。比較に使用した条件を Fig. 4.2a に示す。それぞれのコルチゾール応答特性のナイキストプロットとシミュレーション結果を Fig. 4.2b に示す。すべての電極で抗コルチゾール抗体を固定化した電極に比べ R_{ct} の変化率が小さく、非特異吸着が抑制された。最も R_{ct} の変化率が小さくなったものは抗メラトニン抗体を固定化した電極であった。

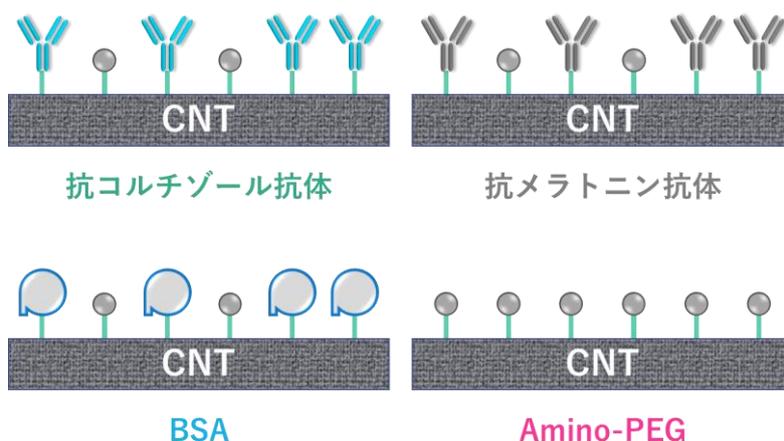


Fig. 4.2a 固定化物質一覧

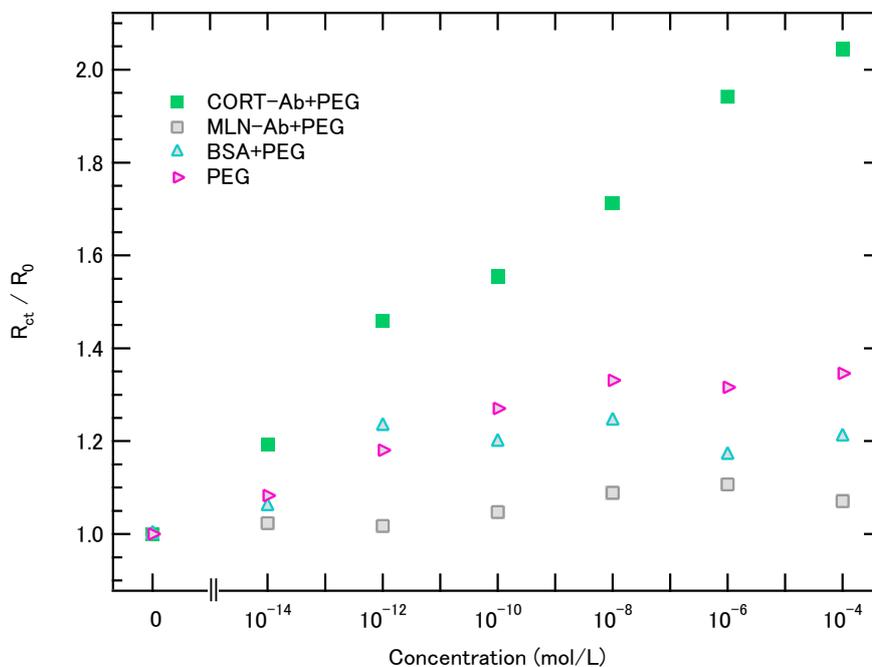


Fig. 4.2b ブロッキング材の違いによる非特異吸着の比較

研究業績

ポスター発表

1. 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(II)
～インピーダンス測定と電位差測定の比較～
藤本隆正, 前田有斗, 柴田恭幸, 張民芳, 津谷大樹, 呉海云, 遠藤英明, 大貫等
2022年 第69回応用物理学会春季学術講演会
2022年3月22日~26日 青山学院大学 相模原キャンパス
2. CNT固定化ろ紙電極によるコルチゾールバイオセンサの開発
藤本隆正, 柴田恭幸, 張民芳, 呉海云, 遠藤英明, 大貫等
2023年 第70回応用物理学会春季学術講演会
2023年3月15日~18日 上智大学 四谷キャンパス
3. 唾液中コルチゾールを検出する ox-CNT ろ紙電極バイオセンサの研究
藤本隆正, 柴田恭幸, 張民芳, 呉海云, 遠藤英明, 大貫等
2024年 第71回応用物理学会春季学術講演会
2024年3月22日~25日 東京都市大学 世田谷キャンパス

口頭発表

4. 電極構造におけるろ紙電極コルチゾールバイオセンサの性能評価
藤本隆正, 柴田恭幸, 張民芳, 呉海云, 遠藤英明, 大貫等
2023年 第84回応用物理学会秋季学術講演会
2023年9月19日~23日 熊本城ホールほか3会場
5. Dependence of ox-CNT Deposition Amount on Sensing Performance of Paper-Based Electrode for Cortisol Biosensor
T. Fujimoto, T. Shibata, M. Zhang, H. Wu, H. Endo, and H. Ohnuki
第33回日本MRS年次大会
2023年11月14日~16日 横浜産業貿易センターほか

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(Ⅱ) ～インピーダンス測定と電位差測定の比較～

Performance Improvement of Cortisol Biosensor based on Carbon Nanotubes (II) ~Comparison of Impedance Measurement and Potentiometry~

東京海洋大¹, AIST², NIMS³

○藤本隆正¹, 前田有斗¹, 柴田恭幸¹, 張民芳², 津谷大樹³, 呉海云¹, 遠藤英明¹, 大貫等¹

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.¹, AIST², NIMS³

○T. Fujimoto¹, Y. Maeda¹, T. Shibata¹, M. Zhang², D. Tsuya³, H. Wu¹, H. Endo¹, H. Ohnuki¹

E-mail: t182049@edu.kaiyodai.ac.jp

【はじめに】抗原抗体反応を利用したバイオセンサは免疫反応を電気信号に変換してセンシングを行う。センサ作製にはこれまで Au 電極表面に自己組織化単分子膜(SAM)を成膜し、これを基に抗体を固定化する手法が用いられてきた。酸化カーボンナノチューブ(ox-CNT)は表面に多くのカルボキシ基を有し、抗体を ox-CNT 表面に固定することが可能である。CNT は高い導電性、大きな比表面積などの優れた特性を持つことが知られており、ox-CNT を成膜した基板は SAM を成膜した基板と異なるセンサ特性を持つことが予想される。

本研究では、Au 表面に SAM と ox-CNT を成膜した試料を用いてバイオセンサを作製し、電気化学インピーダンス(EIS)法と電位測定の両方でセンサ特性の比較を行った。

【実験方法】ガラス基板上に作用極として $\phi=2$ mm の円形 Au パターン電極を蒸着し、電極の縁を厚さ $5 \mu\text{m}$ の SiN で覆った。同様にして作製した $\phi=3$ mm の電極(対極)を重ね合わせることで平行平板構造とした。作用極上には ox-CNT をスプレーコートまたは溶液中での SAM 成膜を行い、抗コルチゾール抗体を化学結合させてコルチゾールバイオセンサとした。作製したセンサを異なる濃度のコルチゾール溶液に浸漬させ、EIS 測定では浸漬後の電極の電荷移動抵抗(R_{ct})の変化率を、電位測定では Ag/AgCl 参照電極に対する電極電位の変化を測定した。

【結果】ox-CNT 及び SAM を用いた試料の EIS 測定の結果を Fig.3 に、電位測定の結果を Fig.4 に示す。両結果とも濃度増加とともに信号強度が増し、特に ox-CNT を用いた試料は SAM を用いた試料よりも高い上昇率を示した。これは CNT が持つ広い比表面積によって面積あたりの抗体量が増えたことによるものと考えられる。これにより異なる測定方法でも同様の結果が得られたと考えている。

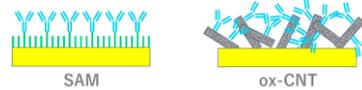


Fig.1 Schematic pictures of electrode surface

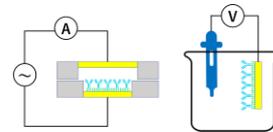


Fig.2 EIS measurement and Potentiometry

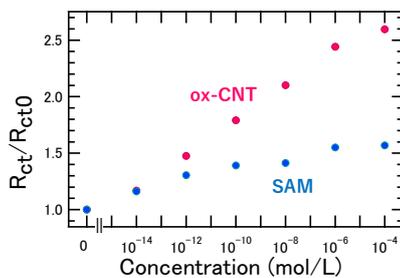


Fig.3 Experimental results of EIS measurement

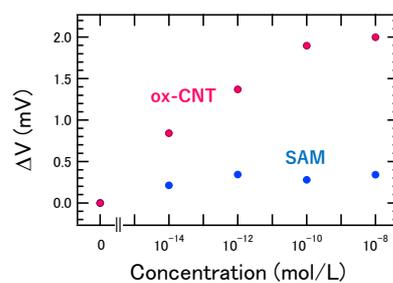


Fig.4 Experimental results of potentiometry

CNT 固定化ろ紙電極によるコルチゾールバイオセンサの開発

Development of Cortisol Biosensor Using CNT-immobilized Filter Paper Electrode

東京海洋大¹, 産総研² ◯藤本隆正¹, 柴田恭幸¹, 張民芳², 吳海云¹, 遠藤英明¹, 大貫等¹

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.¹, AIST²

◦T. Fujimoto¹, T. Shibata¹, M. Zhang², H. Wu¹, H. Endo¹, H. Ohnuki¹

E-mail: m224016@edu.kaiyodai.ac.jp

【はじめに】

抗原抗体反応を利用したバイオセンサは特異吸着反応を電気信号に変換してセンシングを行う。これまで多くの場合, Au 電極表面に COOH 末端された自己組織化単分子膜(SAM)を成膜し, この表面に抗体を化学結合する手法が用いられてきた。一方, これまでに我々は酸化カーボンナノチューブ(ox-CNT)が表面に多くの COOH 基を有することに注目し, SAM の代わりに ox-CNT を Au 上に固定化して抗体を化学結合するとセンサの特性が大きく向上することを確認してきた。CNT は高い導電性, 大きな比表面積などの優れた特性を持つことから, 基板として導電性のないろ紙を使用しても十分にセンサとしての性能が得られると予想される (Fig. 1)。本研究では CNT 固定化ろ紙電極を用いてバイオセンサを作製し, 電気化学インピーダンス分光(EIS)測定でセンサの濃度特性および非特異吸着成分の影響を調べた。

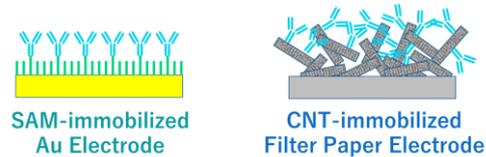


Fig.1 Schematic pictures of electrode surface

【実験方法】

ox-CNT 溶液を吸引ろ過によりろ紙に固定化し, 短冊状に切り取った。一端に導電性ペーストを塗り電気的接触部分を形成した後, テフロンシートに固定することで CNT 基板とした。さらに抗コルチゾール抗体を化学結合させてコルチゾールバイオセンサとした。作製したセンサを異なる濃度のコルチゾール溶液に浸漬させ, EIS 測定で電極の電荷移動抵抗(R_{ct})の変化を測定した。また抗体の代わりにブロッキング処理のみ行った基板を使用することで非特異吸着成分が R_{ct} に及ぼす影響を調べた。

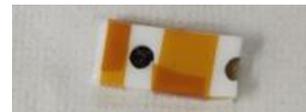


Fig.2 CNT-immobilized filter paper electrode

【結果】

各センサの EIS 測定により抽出した R_{ct} の変化率を Fig.3 に示す。抗体ありの基板はコルチゾール濃度の増加とともに信号強度が大きく増したのに対し, ブロッキングのみの基板では信号が小さくなっている。これにより基板素材を Au からろ紙に変えても抗原抗体反応による電荷移動抵抗の上昇が確認さ

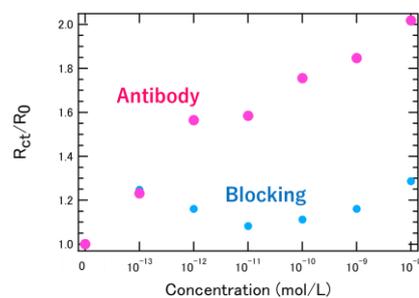


Fig.3 Comparison between antibody and blocking responsiveness using CNT-immobilized filter paper electrode

唾液中コルチゾールを検出する ox-CNT ろ紙電極バイオセンサの研究

ox-CNT Paper Based Electrode Biosensor for Detection of Cortisol in Saliva

東京海洋大¹, 産総研² ○藤本隆正¹, 柴田恭幸¹, 張民芳², 呉海云¹, 遠藤英明¹, 大貫等¹

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.¹, AIST²

○T. Fujimoto¹, T. Shibata¹, M. Zhang², H. Wu¹, H. Endo¹, H. Ohnuki¹

E-mail: m224016@edu.kaiyodai.ac.jp

【はじめに】

酸化カーボンナノチューブ(ox-CNT)は高い導電性と多数の COOH 基を有することから、バイオセンサの構成材料として注目されている。本研究ではろ紙上に ox-CNT を成膜した電極を使用し、安価で作製が容易なコルチゾールバイオセンサの実現を目指す。これまでに ox-CNT の成膜量を変化させたろ紙電極に抗体を固定化した試料を作製して、電気化学インピーダンス分光法(EIS 法)によって抗原抗体反応による電荷移動抵抗(R_{ct})の上昇を検知したところ、成膜量 $1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ において最もセンサの濃度特性が大きくなることを確認した。今回は走査型電子顕微鏡(SEM)を使用して電極断面の構造を観察することで成膜量によって測定感度が変化する原因の検討を行う。また唾液中に含まれる様々な夾雑物のうち、コルチゾール選択性を調べるため、唾液中に含まれるメラトニンおよびコルチゾールと構造が近いプロゲステロンに対して EIS 測定を行った。

【実験方法】

以下 A、B の実験を行った。

A: ox-CNT 溶液を吸引ろ過によりろ紙に固定化した試料を、鋭利な剃刀で切り取り、SEM を使用して断面構造を撮影した。

B: ox-CNT を固定させたろ紙を短冊状に切り取った後、一端に導電性ペーストを塗り電気的接触部分を形成し、テフロンシートに固定することで CNT 基板とした。さらに抗コルチゾール抗体を化学結合させてコルチゾールバイオセンサとした。作製したセンサをコルチゾール水溶液、メラトニン水溶液、プロゲステロン水溶液と反応させた。反応前後で EIS 測定を行い、 R_{ct} の変化率から選択性を確認した。

【結果】

A: 撮影した SEM 画像を Fig.2 に示す。ろ紙繊維の層と ox-CNT 層の間に 2 つが絡み合っている層が確認できる。観察結果より成膜量とセンサ特性の関係を議論する。

B: 各物質に対する信号の比較を Fig.3 に示す。この結果から、本センサにはコルチゾールでは抗原抗体反応による大きな変化が見られるが、メラトニンとプロゲステロンに対しては変化が小さく、非特異吸着の寄与が少ないことを確認できた。これは本センサが高い選択性を有していることを示している。

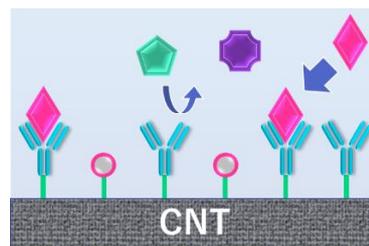


Fig.1 Overview of Selectivity

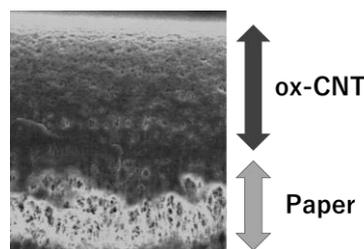


Fig.2 SEM Image of a Cross Section of ox-CNT Paper

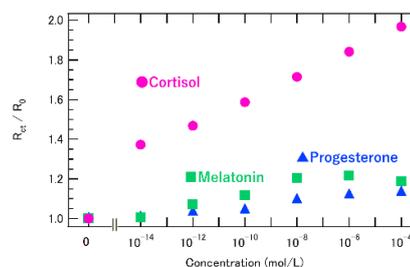


Fig.3 Experimental results of EIS measurement

電極構造におけるろ紙電極コルチゾールバイオセンサの性能評価

Performance Evaluation of Paper Based Electrode

Cortisol Biosensor in Electrode Structure

東京海洋大¹, 産総研² ○藤本隆正¹, 柴田恭幸¹, 張民芳², 呉海云¹, 遠藤英明¹, 大貫等¹

Tokyo Univ. of Marine Sci. & Tech.¹, AIST²

○T. Fujimoto¹, T. Shibata¹, M. Zhang², H. Wu¹, H. Endo¹, H. Ohnuki¹

E-mail: m224016@edu.kaiyodai.ac.jp

【はじめに】

電気化学インピーダンス分光法(EIS法)を用いた電気化学バイオセンサは、電極表面に抗体を固定化し抗原抗体反応による電荷移動抵抗(R_{ct})の上昇を検知する。従来、センサ作製には Au 電極表面に COOH 末端された自己組織化単分子膜(SAM)を成膜し、この表面に抗体を化学結合する手法が用いられてきたが、Au パターン電極は高価で作製に手間がかかる欠点がある。我々は高い導電性と表面に多くの COOH 基を有する酸化カーボンナノチューブ(ox-CNT)に注目し、Au に代わるセンサ電極の実現に取り組んでいる。本研究では、ox-CNT を製膜したろ紙をセンサ基板に使用することで、安価、軽量、作製が容易なセンサ電極を目指す。ここでは ox-CNT の成膜量を変化させたろ紙を用いてバイオセンサを作製し、EIS 法でセンサの濃度特性および非特異吸着成分の影響を調べ、適切な成膜量の検討を行った。



Fig.1 ox-CNT-immobilized filter paper

A: 0.72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ B: 1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
C: 2.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ D: 5.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

【実験方法】

吸引ろ過により成膜量の異なる ox-CNT をろ紙に固定化し

(Fig.1)、短冊状に切り取った。一端に導電性ペーストを塗り電気的接触部分を形成した後、テフロンシートに固定することで CNT 基板とした (Fig.2)。さらに抗コルチゾール抗体を化学結合させてコルチゾールバイオセンサとした。作製したセンサを異なる濃度のコルチゾール溶液に浸漬させ、EIS 測定で電極の電荷移動抵抗(R_{ct})の変化を測定した。

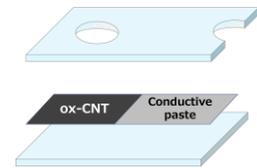


Fig. 2 CNT-immobilized paper based electrode

【結果】

各センサの EIS 測定により得られた濃度ごとの R_{ct} の変化率を Fig.3 に示す。すべての電極で濃度増加とともに R_{ct} の増加が確認された。さらに Fig.3 の 1×10^{-12} mol/L、 1×10^{-8} mol/L における成膜量と R_{ct} の変化率の関係を Fig.4 に示す。成膜量 1.4、2.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で R_{ct} の増加率が大きくなり、この範囲の成膜量で電極作製することで最も高感度なセンサが得られると推定される。

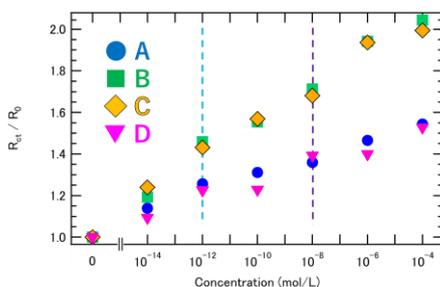


Fig.3 Experimental results of EIS measurement

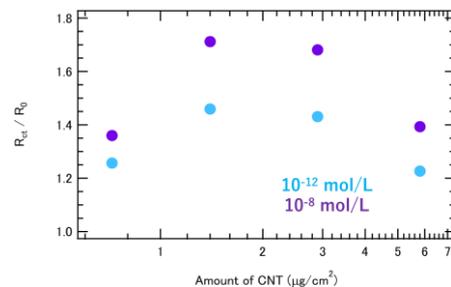


Fig. 4 Relationship between ox-CNT deposition amount and R_{ct} increase ratio

Dependence of ox-CNT Deposition Amount on Sensing Performance of Paper-Based Electrode for Cortisol Biosensor

*T. Fujimoto¹⁾, T. Shibata¹⁾, M. Zhang²⁾, H. Wu¹⁾, H. Endo¹⁾, and H. Ohnuki¹⁾,

¹⁾ Tokyo University of Marine Science and Technology, Koto, Tokyo, Japan, ²⁾ AIST

*m224016@edu.kaivodai.ac.jp

Electrochemical biosensors based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) detect the increase in charge transfer resistance (R_{ct}) due to antigen-antibody interaction with immobilizing an antibody on the electrode surface. Conventional methods for sensor fabrication have involved depositing a COOH-terminated self-assembled monolayer (SAM) on the Au electrode surface then bonding an antibody to the SAM. We have focused on oxidized carbon nanotubes (ox-CNT), which have high conductivity and many COOH groups on their surface, to realize a sensor electrode as an alternative to Au/SAM electrode. In this study, we aim to create a sensor electrode that is inexpensive, lightweight, and easy to fabricate by using filter paper coated with ox-CNTs as a sensor substrate. In this study, sensors were fabricated by varying the amount of ox-CNTs immobilized, and the appropriate amount of immobilization was investigated.

Ox-CNT were immobilized on filter paper by vacuum filtration and cut into strips. After coating one end with conductive paste for an electrical contact, the CNT immobilized paper was fixed to a Teflon sheet to form a CNT substrate.

Furthermore, an anti-cortisol antibody was chemically bonded to the CNTs to form a cortisol biosensor. The fabricated sensors were immersed in cortisol solutions of different concentrations, and changes in the R_{ct} of the electrodes were measured by EIS measurements.

The rate of change of R_{ct} for each concentration obtained by EIS measurements for each sensor is shown in Fig. 1. The R_{ct} increased with increasing concentration for all electrodes. The increase in R_{ct} increases at deposition amounts of 1.4 and 2.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, and it is estimated that the most sensitive sensor can be obtained by fabricating electrodes with deposition amounts in this range.

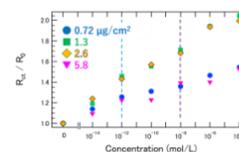


Fig.1 Experimental results of EIS measurement

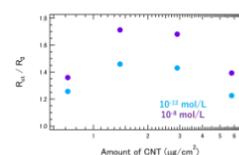


Fig.2 Relationship between ox-CNT deposition amount and R_{ct} increase ratio