

報告番号	乙 第 7190 号
------	------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 電位差計測法およびデジタル計数法を用いた電気化学バイオセンサの研究
(Study on Electrochemical Biosensors Based on Potentiometry or Digital Counting Method)

氏 名 石毛 悠

論 文 内 容 の 要 旨

ポータブル装置やウェアラブルデバイスへの適用を視野に、体外診断において重要性の高い、イオン、タンパク質、DNA、細菌・ウイルスを測定対象として、新規な電気化学バイオセンサの研究を行った。電気化学バイオセンサは全電氣的なセンサであり光学系を用いないため、小型化が容易である。しかし、従来の電気化学バイオセンサで主流となっている電流計測法は、原理的に電流値が電極面積に比例するため、センサ微小化時の電極面積ばらつきの影響を受けるという課題があった。一方、電位差計測法は、原理的に信号値が電極面積に依存しないため、この問題が生じない。そこで、イオン、タンパク質、DNAを対象として電位差計測法の電気化学バイオセンサの研究を行った。また、課題の別の解決法として、従来のアナログ電流値を測定していた方法に替えて測定対象を1つ1つ計数するデジタル計数法を用いるという着想から、細菌・ウイルスを対象にデジタル計数法の電気化学バイオセンサの研究を行った。

イオン測定では、固体型のイオン選択電極(固体電極)の研究を行った。これまでの固体電極は使い捨てや1日程度の短期間の利用に限定されていた。これは、電位安定性(要求性能:100 μ V/h)、電位再現性(要求性能:標準偏差 10mV 以内)が不十分である上、電位発生メカニズムが不明確であり、対策が見出せないでいたためである。本研究では、規定の電位でイオンを吸蔵放出するという材料特性を有するイオン吸蔵物質を内部電極として用いることで、固体電極の電位を規定できると考え、リチウムイオン吸蔵物質である鉄リン酸リチウムを内部電極に用いたリチウム選択性の固体電極を試作・評価したところ、固体電極

の電位が鉄リン酸リチウムのイオン吸蔵放出の電位に支配されていることが示された。加えて、高い電位安定性(0.1 μ V/h)と電位再現性(標準偏差 0.6mV)を得た。さらに、より臨床医学的な重要性の高いナトリウム、カリウム、カルシウムに対応できるイオン吸蔵物質としてプルシアンブルー類似体を選定し、これらを試作した。いずれの電極においても固体電極の電位がイオン吸蔵物質の電位に従い、イオン吸蔵物質の電位と固体電極の電位に高い相関($R^2=0.93$)が得られた。そして、固体電極の電位をイオン吸蔵物質の電位で規定することにより、固体電極において高い電位安定性と電位再現性が得られることが実験的に示された。

タンパク質測定では、酸化還元電位差計測方式の酵素センサを考案し、コレステロール測定および簡易農薬検査が可能であることを実証した。電位差計測方式は原理的に信号強度が電極面積に依存しないため、電流計測方式で生じていた電極面積のばらつきや電極表面状態のばらつきの影響を受けない利点がある。これまで、ISFETを用いたpH変化を利用した電位差計測方式の酵素センサがあったものの、緩衝液の働きでpH変化が理論値よりも小さい応答となる課題があった。フェロセン修飾金電極を有するFETセンサを用いて、pHに替えて酸化還元電位を測定することで、この課題を解決した。コレステロール測定においては対理論値(59.2mV/桁)97%の57mV/桁の応答を、簡易農薬検査においてはモデル試料であるチオール化合物に対して理論値通りの応答を得た。

DNA測定では、電位差計測方式のDNAセンサの研究を行った。電位差計測方式のDNAセンサとしては半導体センサであるイオン感受性電界効果トランジスタ(ISFET)を用いたDNAシーケンサが広まっている。これは、DNAの伸長反応で生じるpH変化を測定するという間接的な測定法である。DNAを電気的に直接検出できれば、原理的には1分子のDNAを読み取ることが可能になる。本研究では金電極を感応部として有する延長ゲート型FETセンサを用いてDNAのハイブリダイズおよび伸長反応を直接検出することを試みた。直接検出にはDNAを適切な間隔で配置することが必要との考えに基づき、ハイブリダイズ効率を最大化する密度でのDNAの固定化を試みた。金-チオール結合を活用しDNAを有するチオール分子と有さないチオール分子を混合して固定化することでDNA固定化密度の制御を行った。二本鎖DNA直径2.4nmのおよそ倍に相当する6.2nm間隔での固定化を行ったときにハイブリダイズ効率は最大化し、それ以上の密度では効率は低下した。最適化した固定化密度をFETセンサに適用し、ハイブリダイズおよび伸長反応による電位変化を計測したところ、それぞれ-86mV、-60mVの電位変化を得た。静電容量と電化量からキャパシタモデルを用いて予想した電位変化の1/40~1/20であり、溶液中のイオンによるデバイ遮蔽によって電位変化が抑制されたと推測した。

細菌・ウイルス測定では、デジタル検出方式としてインピーダンス計測法と酸化還元電流計測法を考案し、有限要素法を用いたシミュレーションによる原理確認と検出メカニズムの考察を行い、モデル試料を用いた実測による原理実証と課題の抽出を行った。インピーダンス計測では、電流パスが試料により遮られることで抵抗値が10%程度増大すること

がシミュレーションにより分かった。また、電極に側壁を設けることで検出に寄与しない電流パスを低減し、信号値を35%の抵抗値増加まで増大できることが分かった。実測では、15~35%の抵抗値増加として試料の有無を検出できることを実証した。加えて、寄生容量が検出可能な試料サイズの下限を決めており、寄生容量 1.7pF の現状では 3 μ m の試料が限界であることが分かった。酸化還元電流計測法では、酸化還元物質の拡散が試料により遮られることで電流値が 10%程度減少することがシミュレーションにより分かった。実測では 1 μ m のビーズを 10%の電流値減少として検出し、測定原理を実証するとともに、現在のノイズレベルからウイルスに相当する 100nm の試料であっても検出可能であることを見出した。

いずれの研究も従来の電流計測法とは異なる、それぞれ特徴を有する測定方法である。ポータブル装置やウェアラブルデバイスへの期待の高まりとともに増える電気化学センサへの要求に対し、これらの技術が課題解決の一助となることを期待している。