

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

石毛 悠



# 目次

1 章 序論 .....	1
1.1 電気化学バイオセンサの適用先.....	1
1.2 電気化学バイオセンサの課題 .....	2
1.3 電位差計測法およびデジタル計数法.....	7
1.4 本章のまとめ.....	7
2 章 イオン吸蔵物質を用いた固体イオン選択電極.....	8
2.1 背景と目的.....	8
2.2 イオン吸蔵物質を用いた固体電極の原理検証 .....	10
2.3 臨床応用に向けた陽イオン吸蔵物質を用いた固体電極.....	23
2.4 固体電極の詳細な評価.....	34
2.5 まとめと今後の展望.....	42
3 章 酸化還元電位計測方式の酵素センサ .....	44
3.1 背景と目的 .....	44
3.2 電界効果トランジスタセンサ .....	46
3.3 酸化還元電位計測方式酵素センサ.....	50
3.4 農薬センサ .....	57
3.5 まとめと今後の展望.....	63
4 章 延長ゲート型 FET センサを用いた DNA センサ.....	65
4.1 背景と目的 .....	65
4.2 DNA 固定化密度およびハイブリダイズ効率の評価.....	67
4.3 FET センサを用いたハイブリダイズおよび伸長反応検出 .....	74
4.4 まとめと今後の展望.....	76
5 章 デジタル計数方式ウイルス細菌センサ .....	78
5.1 背景と目的 .....	78
5.2 インピーダンス計測を用いたデジタル計数 .....	79
5.3 電流計測を用いたデジタル計数.....	95
5.4 まとめと今後の展望.....	100
6 章 結論 .....	102

7 章 今後の展望.....	104
8 章 (付録) 研究方法.....	106
8.1 イオン吸蔵物質を用いた固体接触型イオン選択電極.....	106
8.2 酸化還元電位計測方式の酵素センサ.....	109
8.3 延長ゲート型 FET センサを用いた DNA センサ.....	112
8.4 デジタル計数方式ウイルス細菌センサ.....	115
参考文献.....	119
謝辞.....	124
業績.....	125

# 1 章 序論

## 1.1 電気化学バイオセンサの適用先

生命科学は近年急速に発展しており，医療や農業の分野に革新的な変化が起きている。この発展を支えている技術の一つが計測技術であり，DNA，細菌，ウイルス，タンパク質，イオンなど生体物質の計測技術も進化を続けている。DNAの配列を読み取るDNAシーケンサ[1-6]，細菌固有の質量分析スペクトルから細菌同定を行う細菌同定装置[7-10]，体液中の微量なウイルスを捕捉し検出するウイルス検査装置[11, 12]，血液中のタンパク質やイオンを高速に測定する生化学免疫自動分析装置[13-15]など様々な計測機器が創りだされた。これまでは測定できなかつたり，測定に多くのコストや労力が必要であつたりしたこれらの物質が，低コストかつ簡便に測定できるようになった。

今後は，必要な時にその場での生体物質計測を可能とする技術が，生活や産業に革新をもたらすだろう。例えば，血糖値が高値となる糖尿病の診断や治療において血糖値のその場での測定は重要な意味を持つ。1980年代までは血糖値の正確な測定に大型の装置が必要であった。1990年代に小型の自己血糖測定(Self-Monitoring Blood Glucose; SMBG)装置が登場し，家庭での血糖値測定が可能となった[16]。その結果，糖尿病患者はSMBGでの測定結果をもとにインスリン(血糖値を下げる薬剤)を患者自身で投与し，血糖値を正常な範囲に留めることで，高血糖による合併症の発生を抑制できるようになった。また，血糖値の日中変動モニタリングにより，病態の把握がより正確となった。このように，その場での検査(Point Of Care Testing; POCT)は医療や生活の質(Quality Of Life; QoL)の向上に貢献してきた。

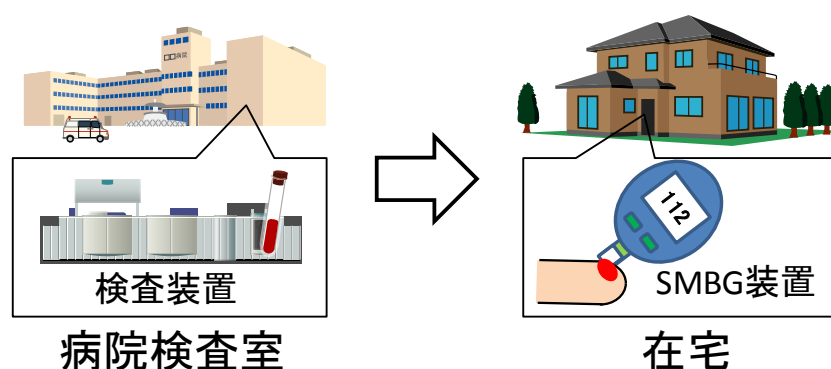


図 1.1 自己血糖測定(SMBG)装置による在宅での血糖値測定。

上述の SMBG の例は糖尿病患者についてのケースであり，今後は健康な人々にも POCT が広まると言われている。例えば，体に身に付ける計測装置(ウェアラブルデバイス)を用い

た汗成分の測定によって、活動状態や健康状態のモニタリングが可能になる[17]。その際、小型かつ高耐久性の計測装置が求められることから、全電氣的な測定法である電気化学計測法が注目されている。生体物質の計測でしばしば用いられる光学計測法は、光学系が必要であり、嵩張る上に高い組み立て精度が求められる。これに対し、電気化学計測法は電極を用いた全電氣的な計測法であるため、計測装置の小型化が容易で、要求される組み立て精度も比較的低いので高い耐久性が期待できる。実際、SMBG 装置においても大半が電気化学計測法を用いる装置となっている[18]。

電気化学計測法を用いたセンサで生体物質の計測に特化したものは、電気化学バイオセンサと言われる。本論文では、ポータブル装置やウェアラブルデバイスへの適用をめざし、新規な電気化学バイオセンサに関する研究を報告する。その際、臨床医学的に重要性の高い生体物質であるイオン、低分子、タンパク質、DNA、ウイルス、細菌を測定対象とした。

## 1.2 電気化学バイオセンサの課題

電気化学バイオセンサで主流の計測法は電流計測法であり、電極への電圧印加に対する電流応答を測定する。電流計測法の 1 つであるサイクリックボルタンメトリについて基本原理を説明し、課題を述べる。

### 1.2.1 電流計測法の基本原理

図 1.2 に電流計測法の典型的な実験配置を示す。溶液中に、測定を行う作用電極 (Working Electrode; WE)、電流供給を行う対向電極 (Counter Electrode; CE)、基準となる電圧を発生させる参照電極 (Reference Electrode; RE) が配置されている。これら 3 つの電極はポテンシostat に接続されている。ポテンシostat は、対向電極に印加する電流を制御して、参照電極を基準とした所望の電圧を作用電極に印加し、作用電極の電流応答を記録する装置である。

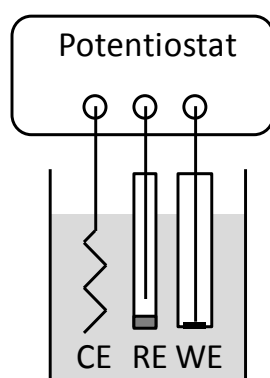


図 1.2 電流計測法の実験配置図.

図 1.3 にポテンショスタットの原理図(回路図)を示す。中央に描かれた丸は図 1.2 の測定セルに対応し、3 つの電極が配置されている。これらに接続された回路は、2 つの OP アンプ(OP1, OP2), 可変電源( $V_{in}$ ), 抵抗(R)である。対向電極には OP1 の出力が, 参照電極には OP1 の-端子が接続され, OP1 の+端子には可変電源の電圧が入力されている。OP アンプは+端子と-端子の電圧が等しくなるようなフィードバック出力を行うため, 参照電極の電圧が  $V_{in}$  と等しくなるように対向電極に電流  $I$  が流れる。OP アンプの+, -端子は理想的には入力インピーダンスが無限大であるため, 対向電極に流れる電流  $I$  は全て作用電極に向かう。一方, 作用電極は OP2 の-端子に接続され, 分岐した配線は抵抗 R を通って OP2 の出力に接続されている。OP2 の+端子は接地されているため, 作用電極の電位は常に 0V となるように OP2 のフィードバックがなされる。従って, OP2 の出力電圧は  $-IR$  であり,  $V_{out} = -IR$  となる。また, 参照電極の電位は  $V_{in}$  であるため, 参照電極を基準として作用電極には  $-V_{in}$  の電圧が印加されていることになる。以上をまとめると, 図 1.3 のポテンショスタットは対向電極に流れる電流を制御することで, 作用電極に参照電極を基準として  $-V_{in}$  の電圧を印加し, その時作用電極に流れる電流  $I$  を  $V_{out} = -IR$  として出力する。

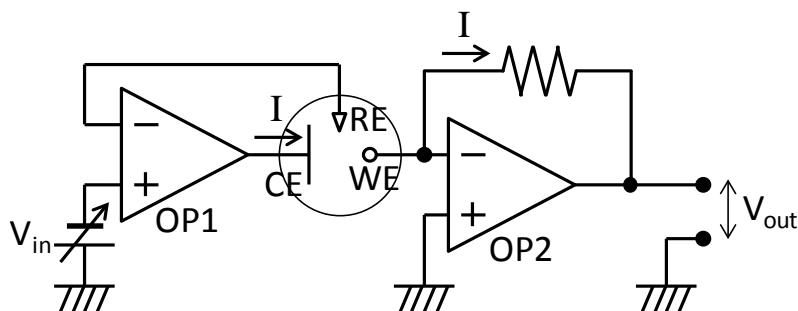
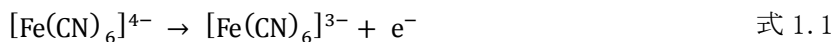
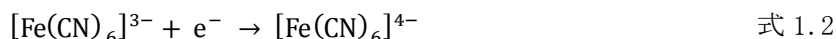


図 1.3 ポテンショスタットの原理図.

サイクリックボルタンメトリは, 作用電極に三角波の電圧を印加したときの電流応答を測定する計測手法である。溶液を 1 mol/L と比較的高濃度の塩化カリウム, 5 mmol/L のフェリシアン化カリウム, 5 mmol/L のフェロシアン化カリウムとし, 作用電極を金電極, 参照電極を銀塩化銀参照電極, 初期電位を 600mV, 掃引速度(電圧の変化速度)を 100mV/s としたときの電流応答(サイクリックボルタモグラム)を図 1.4 に示す。電圧増加時と電圧減少時で履歴があり, 電流の正負それぞれにピークを有する特徴的な形状である。それぞれのピークは, フェロシアンの酸化によるフェリシアンの生成



および、フェリシアン還元によるフェロシアン生成



に対応する。

サイクリックボルタモグラムの特徴的な形状は、ネルンストの式と拡散律則によって解釈できる。0V から電圧を増加していく場合、初期は電流があまり増加しない(図 1.4 a)ものの、0.2V 付近から急激に増大し(図 1.4 b)、0.3V 付近で極値となる。電圧を増加させる過程で式 1.1 の酸化反応が生じ、酸化反応に必要な電圧はネルンストの式

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}]}{[[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}]} \quad \text{式 1.3}$$

で規定される酸化還元電位Eで与えられる。ここで、 $E^0$ は標準酸化還元電位、Rは気体定数、Tは絶対温度、Fはファラデー定数、 $[[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}]$ はフェリシアン濃度、 $[[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}]$ はフェロシアン濃度である。図 1.5 に式 1.3 から導かれるフェリシアン濃度およびフェロシアン濃度の電圧依存性を示した。横軸は電圧であり、標準酸化還元電位との差を示した。縦軸はフェリシアン濃度およびフェロシアン濃度であり、フェリシアンとフェロシアンの合計濃度を1(任意単位)とした。フェリシアン濃度とフェロシアン濃度の電圧依存性は標準酸化還元電位付近では大きいものの、標準酸化還元電位から0.1V程度離れただけで依存性は非常に小さくなった。サイクリックボルタモグラムにおいて観測された0.2V付近での電流の増大は、フェリシアンとフェロシアンの標準酸化還元電位が約230mV(対銀塩化銀参照電極)であるため、図 1.5により説明できる。

図 1.5によれば、標準酸化還元電位より0.1V高い電圧では、フェリシアンとフェロシアンの総濃度に対してフェロシアン濃度は2%と低い。一方、サイクリックボルタモグラムでは、図 1.4 c のように電圧の増加に伴い電流の減少が見られるものの、ピーク電流の半分から1/3程度の電流値を維持している。つまり、図 1.5 ではサイクリックボルタモグラムの説明しきれない。実は、図 1.4 c では作用電極から離れた場所のフェロシアンが作用電極表面に拡散し、作用電極により酸化されて電流が生じている。作用電極近傍からフェロシアンが消費されるので、フェロシアンが作用電極表面に到達するための拡散距離は徐々に長くなる。したがって、図 1.4 c のように電流は徐々に減少する。



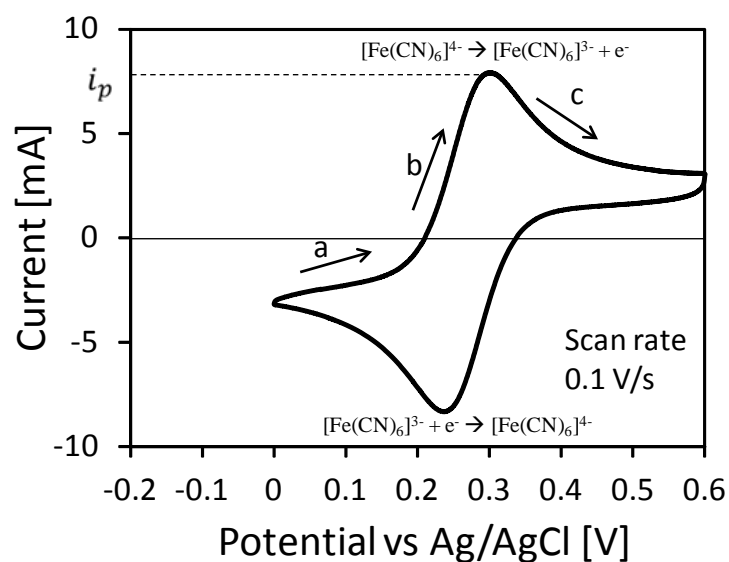


図 1.4 サイクリックボルタモグラムの一例.

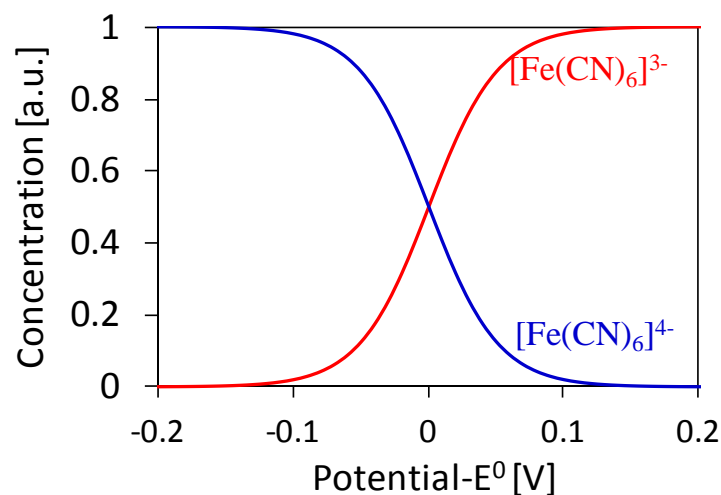


図 1.5 フェリシアン濃度およびフェロシアン濃度の電圧依存性.

サイクリックボルタモグラムのピーク電流 ( $i_p$ ) は定式化されており、円形の電極では、

$$i_p = 0.4463nFAC \sqrt{\frac{nFvD}{RT}} \quad \text{式 1.4}$$

である。ここで、 $n$ は酸化還元反応で授受される電子数(フェリシアン/フェロシアンでは1)、 $A$ は電極面積、 $C$ は酸化還元物質濃度、 $v$ は掃引速度、 $D$ は拡散係数である。このように、電流計測法での電流値は、電極面積、拡散速度、酸化還元物質濃度、掃引速度に依存する。

そのため、電流計測法で酸化還元物質濃度を測定する場合は、酸化還元物質以外のパラメータを固定もしくは既知の状態で行い、電流値から酸化還元物質濃度を求める。

### 1.2.2 電流計測法を用いたバイオセンサの課題

電流計測法に影響を及ぼすパラメータの中で、電気化学バイオセンサにおける課題の一つは電極面積のばらつきの低減である。SMBG 装置では使い捨てのセンサチップが主流であり、高精度な測定には、センサごとの電極面積ばらつきの低減が求められる。一方、コスト低減と使用する血液量の低減に向けて、センササイズの縮小も同時に求められる。そのため、電極面積ばらつきの課題はますます大きくなる。

血液成分の吸着の影響も重要な課題である。図 1.6 に示す血清に汚染された電極で取得したサイクリックボルタモグラム(赤線)は、汚染前(黒線)と比較して電流値が大きく減少している。これは、電極表面に吸着した血清中のタンパク質や脂質がフェリシアン/フェロシアン電極近傍での拡散を阻害して、見かけ上の拡散係数 $D$ が減少したためであり、式 1.4 に従って電流値が減少した。その際、拡散の阻害は電極近傍でのみ生じ、電極から離れた沖合での拡散に影響は無いため、サイクリックボルタモグラムの形状は歪になる。吸着の影響は血液試料を扱うバイオセンサでは避けがたい課題である。

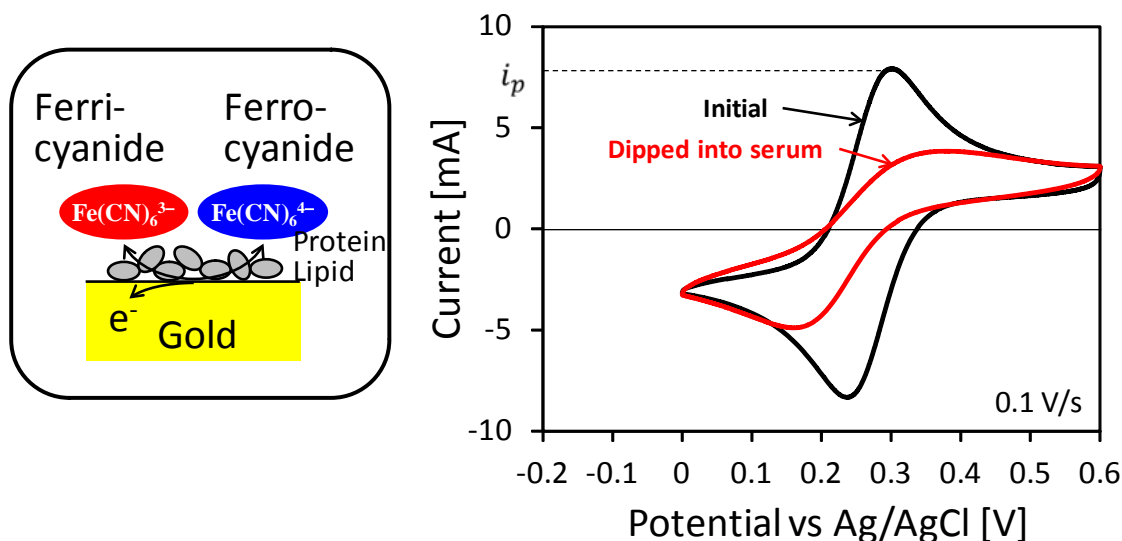


図 1.6 血清で汚染された電極で取得したサイクリックボルタモグラム。

これらの課題の解決法は各社のノウハウであり情報をえることは難しいものの、Abbott は測定法の工夫で課題を解決したことが特許情報から推定される[19]。従来は測定物質の濃度に比例する電流値を測定していたのに対し、Abbott の採用したクーロメトリでは還元電流を積分することで測定物質の量を電荷量として測定する。電極面積のばらつきや電極

汚染により電流値が変化しても、測定物質全量を電荷に変換するクーロメトリはこれらの影響を受けない。この例から、電流計測法を用いたバイオセンサにおいて、電極面積ばらつきや電極汚染が重要な課題として認識されていることが理解できる。

### 1.3 電位差計測法およびデジタル計数法

本研究では、酸化還元電位の式であるネルンストの式(式 1.3)に着目し、電位差計測法を用いて課題解決を試みた。ネルンストの式には電極面積や拡散係数が含まれていないため、電極面積のばらつきや拡散係数の変化の影響を理論上全く受けない。電位差計測法に取り組むに当たり、以前より電位差計測法が用いられてきたイオンセンサ(イオン選択電極)について研究を行った。イオンセンサでは小型化の際の電位再現性に課題があり、新規物質を用いて電位再現性の向上に取り組んだ(第 2 章)。続いて、現在は電流計測法が主流である血中物質の測定について、電位差計測法を用いた測定の研究を行った(第 3 章)。さらに、化学的にはポリイオンとして扱える DNA について、電位差計測法を用いたセンサの研究を行った(第 4 章)。

電流計測法の課題をアナログ計測による測定ばらつきととらえ、デジタル計測による解決に取り組んだ。電極 1 つごとに測定対象の有無を検出し、多数の電極で有無を足し合わせるデジタル計数法を考案し、これを用いたウイルス(大きさ 100nm 程度)、細菌(大きさ 1  $\mu\text{m}$  程度)向けセンサの研究を行った(第 5 章)。

### 1.4 本章のまとめ

本章では、電気化学バイオセンサの適用例とその課題について述べ、次章以降で議論する課題解決に向けた研究について紹介した。

- 1) 従来は大型の装置でしか測定できなかった物質がポータブルの装置を用いてその場で測定できるようになることで、生活や産業が大きく変革する可能性がある。
- 2) 電気化学バイオセンサは光学系を用いない小型で耐久性のあるセンサであり、ポータブル装置やウェアラブルデバイスへの応用に適している。
- 3) 主流である電流計測法を用いた電気化学バイオセンサでは、電極面積のばらつきが測定ばらつきを生じることが課題であり、微細化によりその影響は増大すると考えられる。
- 4) 本論文では、電極面積に依存しない電気化学測定法である電位差計測法、および、測定ばらつきの影響を受けないデジタル計数法について議論する。

## 2 章 イオン吸蔵物質を用いた固体イオン選択電極

### 2.1 背景と目的

イオン選択電極(Ion Selective Electrodes; ISEs)は、試料液に浸して電位を計測することで対象イオン濃度を選択的に測定できる、電位差計測法を基本原理とする電気化学センサである。その測定の簡便さのため、化学、生物、医療、環境の幅広い分野で用いられている。一般的な ISE は銀塩化銀などの内部参照電極 (Inner Reference Electrode; IRE), 一定濃度の測定対象イオンを含んだ内部液 (Inner Filling; IF), そして対象イオンに選択的に応答するイオン選択膜 (Ion Selective Membrane; ISM) から構成されており (図 2.1(A)), 内部液を含むことから内部液型 ISE (IF-ISE) と呼ばれている [20]。各界面における電位発生機構は深く理解されており, IF-ISE の電位は定式化されている。この式に基づいた設計により, 高い電位安定性 (電位変動  $\pm 100 \mu\text{V/h}$  以内) と電位再現性 (電位ばらつき (標準偏差) 数 mV) が実現できる。

IF-ISE は水分蒸発による IF の濃度変動を抑制するために数 mL~十数 mL の IF を必要とする。このことが IF-ISE の小型化や集積化を困難にしていた。これに対し, IRE と ISM を直接接触させた固体接触型 ISE (Solid-Contact ISE; SC-ISE; 固体電極) では, IF が無いため小型化や集積化が可能となる。SC-ISE は 30 年ほど前に提唱され [21], 医療現場で使用可能なハンドヘルド型の装置に採用されてきた [22]。ただし, IF は IF-ISE において電位安定化を担っていたため, IF を有さない SC-ISE では電位安定化の工夫が別途必要となる [23]。以下に述べるように, SC-ISE の起電力発生機構には未だ不明な点があり, 電位安定性と電位再現性は IF-ISE に及ばない。それ故, SC-ISE の電位安定性は IF-ISE に及ばないものと考えられてきた。その上, 信頼性の高い装置の設計に重要となる電位再現性に関する報告は, SC-ISE では数報しか無かった [24, 25]。

SC-ISE は IRE として導電性高分子を用いたもの [26] とカーボン材料を用いたもの [27] がある。導電性高分子である Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) / Poly(styrenesulfonate) (PEDOT/PSS) を IRE として用いると, PEDOT/PSS の陽イオン交換能により ISM との界面において陽イオンが電位支配因子となる (図 2.1(B.1))。しかし, PEDOT/PSS は立体構造が不定であるために酸化還元電位が広く [28], そのため起電力が不定であるという課題や, 長期的な電位安定性に欠けるという課題がある。一方, カーボンブラック, グラファイトなどのカーボン材料を用いたものは, 高い比表面積に起因する大きな静電容量により界面電位の安定化を図っている (図 2.1(B.2)) [27]。しかし, 界面電位を支配する化学反応は不明であり, この反応が制御できていないために起電力は不定となる。

これらの課題に対し, 導電性高分子型 SC-ISE において電流印加による起電力の制御が試みられた [29]。しかしながら, 一度起電力を定めても起電力は依然として経時変化を示し

ており、課題の解決には至っていない。別の方法として、ISMに疎水性酸化還元対を導入する試みがあるものの、ISM中の別の疎水性物質の溶出を加速させる副作用があり、寿命は一日程度と実用的でない[30]。

本研究では、イオン吸蔵物質(Intercalation Compound; IC)は陽イオンの吸蔵に伴い一定の起電力を発生させることから[31]、ICをSC-ISEのIREとして用いたIC-SC-ISEによりSC-ISEの起電力発生機構を明確にして起電力を定式化できると考えた図2.1(B.3))。文献調査の結果、IC-SC-ISEの例が少ないながらもあり[32]、例えばリチウムイオン吸蔵物質である鉄リン酸リチウム(LFP)をIREに用いたリチウムISEにおいて小さな電位変動が得られることが報告されていた。そして、LFPのリチウムイオン吸蔵率(最大イオン吸蔵量に対する吸蔵量の割合)を0.5程度とすることで、酸化還元などの外乱要因に対する電位変動が小さくなることが報告されていた。

しかしながら、IC-SC-ISEの起電力の絶対値については報告が無く起電力の定式化はなされていなかった。そこで、報告[32]と同様のリチウムISEを試作・評価し、起電力絶対値の評価から起電力を定式化することを試みた。さらに、得られた式が臨床的に重要性の高いナトリウム、カリウム、カルシウムを対象としたIC-SC-ISEにも適用可能であることを示すため、様々なイオンを吸蔵可能であるプルシアンブルー類似体(PBA)を用いたナトリウム、カリウム、カルシウムISEを試作し評価した。その際、起電力の絶対値が構築した式に対して十分な相関があること( $R^2 > 0.8$ )を評価基準とした。さらに、IF-ISEに匹敵する電位安定性( $< 100 \mu\text{V/h}$ )と電位再現性( $< \text{標準偏差 } 10\text{mV}$ )を目標として、試作したIC-SC-ISEの電位安定性と電位再現性を評価した。明確にした起電力発生機構を元に、結果の考察を行った。

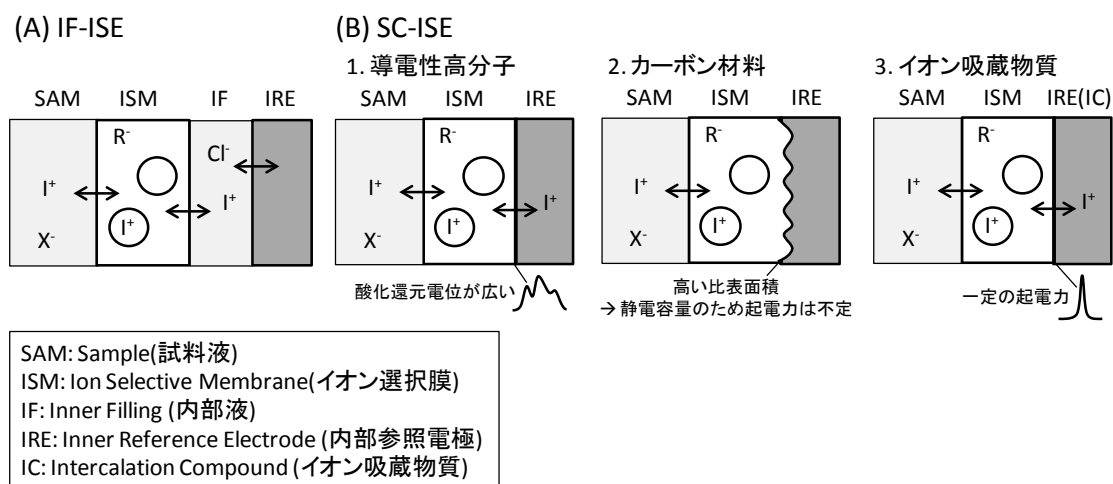


図 2.1 イオン選択電極の模式図.

(A)内部液型イオン選択電極 (IF-ISE)，(B)固体接触型イオン選択電極 (SC-ISE) 1. 導電性高分子型，2. カーボン材料型，3. イオン吸蔵物質型

## 2.2 イオン吸蔵物質を用いた固体電極の原理検証

### 2.2.1 イオン選択電極(陽イオン)の原理

本節では，イオン選択電極を用いたイオン濃度測定の実理と，陽イオン向けイオン選択電極に用いられているニュートラルキャリア型イオン選択膜について原理を説明する。イオン選択電極を用いたイオン濃度測定の配置を図 2.2 に示す。イオン選択電極と参照電極を測定対象の溶液(試料液)に浸し，二つの電極の間の電位差を測定する。イオン電極にはネルンストの式に従って測定対象イオンの対数に比例する電位が発生する。一方の参照電極には，溶液の組成によらず一定の電位が発生する。従って，電極間にはネルンストの式に従って測定対象イオンの濃度に比例する電位が発生する。そのため，ネルンストの式を用いて測定した電位差から測定対象イオンの濃度を求めることができる。

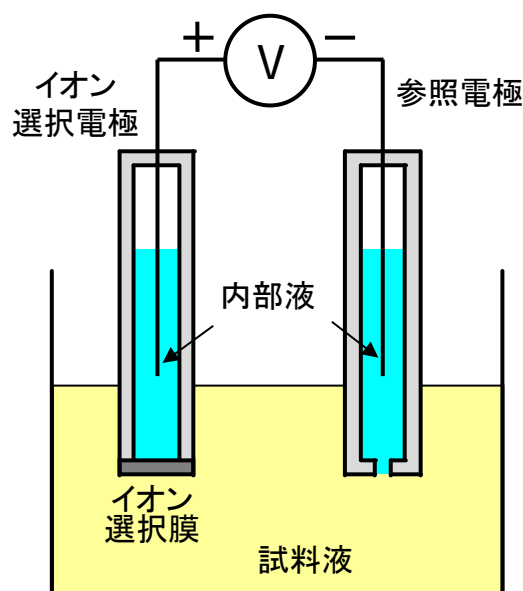


図 2.2 イオン選択電極を用いたイオン濃度測定 of 配置.

電圧計の+極を左側に、一極を右側にして、イオン濃度測定 of 回路を模擬的に図 2.3 に示す。+極からイオン選択電極 of 内部電極、内部液、選択膜、そして試料液、参照電極内部液、参照電極内部電極を経由し、一極に至る。電圧計は高入力インピーダンス of のものを用いるため、回路に発生する電流は fA オーダーと小さく、また、各構成要素は均質なもの to 仮定できるため、各構成要素内 of 電位は一定とみなせる。そのため、電圧計で測定される電位差は、各界面 of 電位差を合計したものとなる。

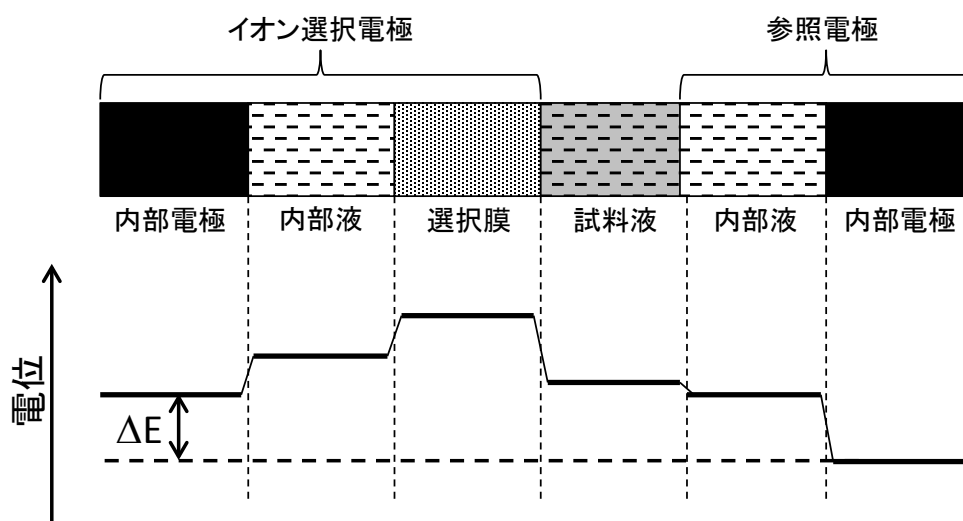


図 2.3 イオン濃度測定 of 回路における電位分布.

各界面について界面電位を考えていく。イオン選択電極の内部電極と内部液の界面電位 $E$ は、内部電極に銀塩化銀電極を用いた場合、次の式で表される。

$$E = E^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl} \quad \text{式 2.1}$$

ここで、 $E^0$ は標準電極電位、 $R$ は気体定数、 $T$ は絶対温度、 $F$ はファラデー定数、 $a_{Cl}$ は塩素イオンの活量である。これは、銀塩化銀電極の表面で生じる



の平衡反応に由来する。塩素イオンの化学ポテンシャル $\mu$ は標準化学ポテンシャル $\mu^0$ を用いて

$$\mu = \mu^0 + RT \ln a_{Cl} \quad \text{式 2.2}$$

で表され、これが界面電位によるギブズエネルギー $G$

$$G = -FE \quad \text{式 2.3}$$

と一致することから、

$$\begin{aligned} -FE &= \mu^0 + RT \ln a_{Cl} \\ E &= -\frac{\mu^0}{F} - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl} = E^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl} \end{aligned} \quad \text{式 2.4}$$

となる。式 2.4 もネルンストの式の 1 つである。参照電極内部液と参照電極内部電極の界面電位も、参照電極内部電極に銀塩化銀電極を用いる場合は同様のネルンストの式に従う。

ネルンストの式においては、厳密には濃度ではなく活量を用いる。活量は理想的な状態での濃度であり、希薄溶液 (10mmol/L 以下) において差は小さい。1mol/L 程度の高濃度溶液では、イオン同士の相互作用が生じ、実際の濃度と理想的な濃度である活量との間に差が生じる。本研究では活量を導出する場合には、各種イオンでの補正式を用いた [42]。

内部液と選択膜、選択膜と試料液の界面電位を導出するため、本研究で用いる選択膜であるニュートラルキャリヤ型選択膜の原理について説明する。一般的なニュートラルキャリヤ型選択膜は、可塑化された塩化ビニル樹脂に、対象カチオンと選択的に結合するリガ



ンド，疎水性アニオンを加えたものである。リガンドは，カリウムイオンとの結合能が強い環状ペプチドのバリノマイシンや，リチウム，カリウム，ナトリウムなどその大きさに合わせて作られたクラウンエーテルである。これらカチオンがリガンドの環にはまり込むため，対象カチオンと選択的に結合することができる。1つのカチオンを2つのクラウンエーテルで挟み込むように結合するものもある。

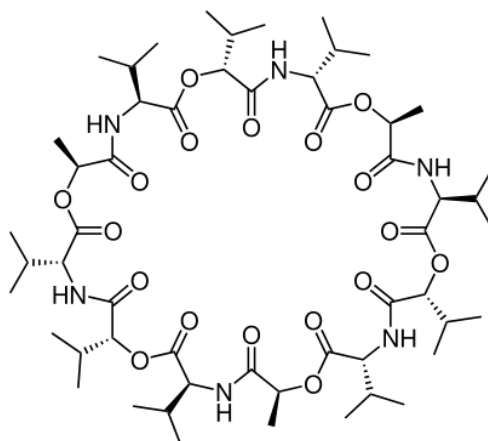


図 2.4 イオン選択電極に用いられるリガンドの例(バリノマイシン)。

水溶性のカチオンが可塑化された塩化ビニル樹脂に入り込む際には水和エネルギー分のロスが生じる。そのため，一般的にはカチオンは可塑化された塩化ビニル樹脂には入り込みにくい。一方，樹脂中にリガンドが存在すると，対象カチオンはリガンドとの結合においてエネルギー的に得するため，樹脂中に入り込めるようになる。そのため，ニュートラルキャリヤ型選択膜には対象カチオンのみが入り込むことができる。また，水溶性アニオンも同様の理由で樹脂中に入り込みにくい。そのため，樹脂中にあらかじめ加えてある疎水性アニオンが樹脂中の支配的なアニオンとなる。これらの性質をカリウム選択膜について模式的に図 2.5 に示す。

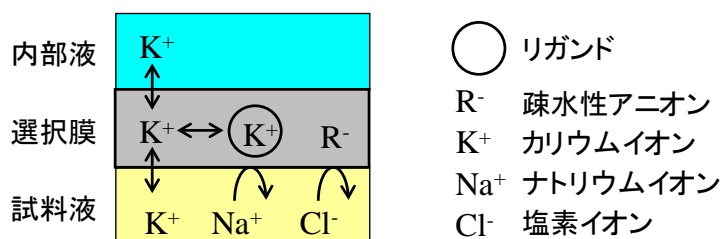


図 2.5 ニュートラルキャリヤ型選択膜における平衡の模式図(カリウム選択膜の例)。

図 2.5 に示した選択膜中での平衡反応により，

選択膜中のリガンドと結合していない対象カチオン濃度： $[K^+]_{\text{mem}}$

選択膜中の対象カチオンと結合していないリガンド濃度： $[L]$

選択膜中のリガンドと対象カチオンの結合体濃度： $[LK^+]$

選択膜中の疎水性アニオン濃度： $[R^-]$

について、以下の 3 法則が導かれる。

1) 選択膜中の対象カチオン濃度は疎水性アニオン濃度に等しい(電気的中性)

$$[K^+]_{\text{mem}} + [LK^+] = [R^-] \quad \text{式 2.5}$$

2) 対象カチオンと結合したリガンドと未結合のリガンドの総量( $[L_{\text{total}}]$ )は一定

$$[L_{\text{total}}] = [L] + [LK^+] \quad \text{式 2.6}$$

3) カチオンと結合したリガンド、未結合のリガンド、未結合のカチオンは、結合定数( $K_{\text{eq}}$ ; バリノマイシンの場合  $10^{9.3}$ )に依存した平衡に従う

$$K_{\text{eq}} = \frac{[LK^+]}{[L][K^+]_{\text{mem}}} \quad \text{式 2.7}$$

これらを解くと、

$$[K^+]_{\text{mem}} = \frac{1}{2} \left\{ [R^-] - [L_{\text{total}}] - \frac{1}{K_{\text{eq}}} + \sqrt{\left( [R^-] + [L_{\text{total}}] + \frac{1}{K_{\text{eq}}} \right)^2 - 4[R^-][L_{\text{total}}]} \right\} \quad \text{式 2.8}$$

となる。式 2.8 は、リガンド濃度( $[L_{\text{total}}]$ )と疎水性アニオンの濃度( $[R^-]$ )が一定であれば、選択膜中のリガンドと結合していない対象カチオン濃度( $[K^+]_{\text{mem}}$ )は一定となることを意味している。内部液と選択膜の界面電位 $E_{\text{IF-mem}}$ と選択膜と試料液の界面電位 $E_{\text{mem-sam}}$ は試料液中の $[K^+]_{\text{mem}}$ を用いて、

$$E_{\text{IF-mem}} = -E_{\text{mem}}^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{mem}}}{[K^+]_{\text{IF}}} \quad \text{式 2.9}$$

$$E_{\text{mem-sam}} = E_{\text{mem}}^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{sam}}}{[K^+]_{\text{mem}}} \quad \text{式 2.10}$$

と表される。ここで、 $E_{\text{mem}}^0$  は感応膜の標準電極電位、 $[K^+]_{\text{IF}}$  は内部液中の対象カチオン濃度、 $[K^+]_{\text{sam}}$  は試料液中の対象カチオン濃度である。内部液と試料液の電位差  $E_{\text{IF-sam}}$  はこの 2 式を足し合わせた

$$E_{\text{IF-sam}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{sam}}}{[K^+]_{\text{IF}}} \quad \text{式 2.11}$$

となる。

試料液と参照電極内部液の間には、小さいながらも界面電位が生じ、液間電位(Liquid Junction Potential; LJP)と言われる。液間電位の発生する原理は次のように説明できる。移動度がアニオン>カチオンの溶液があり、低濃度と高濃度のものが接している。このとき、高濃度側から低濃度側にイオンが拡散していく。アニオンの移動度が大きいので、アニオンはカチオンに先行して拡散していくため電気双極子が生まれ、電位勾配が発生する。電位勾配は泳動力を生むため、アニオンとカチオンの拡散速度が一致するような電位勾配で定常状態となる。そのため、アニオンとカチオンの移動度が等しければ、液間電位は 0 となる。塩化カリウムは塩素イオンとカリウムイオンの移動度がほぼ等しいので、参照電極内部液として用いられることが多い。例えば、1M 塩化カリウム水溶液と 20 倍希釈した血清(主成分は 140mM 程度のナトリウムイオンと 100mM 程度の塩素イオン)の液間電位は 2mV と小さく、血清中電解質濃度による変化はほとんど無い。そのため、今回の議論では液間電位を無視する。

以上の議論に従い全界面電位を足し合わせると、

$$\begin{aligned} E &= E^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{Cl,ISE}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{sam}}}{[K^+]_{\text{IF}}} - \left( E^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{Cl,REF}} \right) \\ &= -\frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{Cl,ISE}}}{a_{\text{Cl,REF}}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{\text{sam}}}{[K^+]_{\text{IF}}} \\ &= E^{0'} + \frac{RT}{F} \ln [K^+]_{\text{sam}} \\ (E^{0'} &= -\frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{Cl,ISE}}}{a_{\text{Cl,REF}}} - \frac{RT}{F} \ln [K^+]_{\text{IF}}) \end{aligned} \quad \text{式 2.12}$$

のように定式化される。ここで、 $a_{\text{Cl,ISE}}$  はイオン選択電極内部液中の塩素イオン活量、 $a_{\text{Cl,REF}}$  は参照電極内部液中の塩素イオン活量である。実用上は、測定対象イオン濃度が既知の試料液を測定し  $E^0$  を求め、濃度未知の試料液の電位を測定して電位から濃度を算出する。

## 2.2.2 従来の固体電極の原理と課題

イオン選択電極をウェアラブルデバイスなどに搭載可能な大きさまで小型化するには、内部液を不要とするのがよい。内部液を無くし内部電極と選択膜を直接接触させたものを固体接触型イオン選択電極、略して固体電極と言う。しかし、単純に接触させただけでは界面電位が規定されないため、内部電極と選択膜の界面電位を規定するための工夫が必要となる。これまでは、導電性高分子を用いたものと多孔質カーボン材料を用いたものが知られていた。

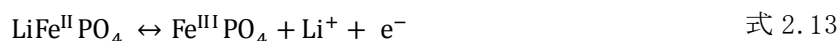
導電性高分子としては主に PEDOT/PSS が用いられてきた。PEDOT/PSS は酸化還元物質である PEDOT とイオン交換物質である PSS を組み合わせたものである。PSS 中のアニオンが PEDOT 中のホールを安定化させることで、導電性が発生する。固体電極の内部電極として用いる際には、ホールが還元されると同時に選択膜中のカチオンがポリマーに取り込まれることを利用していると考えられる。導電性高分子と選択膜の間でカチオンが移動でき、そのときの電位が導電性高分子の酸化還元電位に従うことから、結果として導電性高分子と選択膜の界面電位が安定化される。しかしながら、導電性高分子は多様な酸化還元状態を有するため酸化還元電位の幅が広く、かつ、カチオンがどのように取り込まれるか不定であるため、絶対電位を規定することは難しい。実際、電流印加による起電力の制御が試みられた[29]ものの、一度起電力を定めても起電力は依然として経時変化を示しており、課題の解決には至っていない。

多孔質カーボン材料として、メソポーラスカーボン、カーボンナノチューブなどが用いられてきた。カーボンの表面にカチオンが吸着することを利用しており、カーボン材料と選択膜の界面はキャパシタと考えることができる。容量が大きければ、すなわち表面積が大きければ吸着量による電位変化は小さい。そのため、高い電位安定性を実現することができる。しかしながら、起電力の絶対値は不定であり、根拠を持って制御することは困難である。

以上のように、従来の固体電極では起電力の絶対値を予測することが難しかった。信頼性や品質管理の観点からは、根拠を持って起電力の絶対値を予測することが必要であり、本研究ではこの課題に取り組んだ。

### 2.2.3 リチウムイオン吸蔵物質を用いた固体電極

イオン吸蔵物質は二次電池に用いられる材料であり、特定の電位でイオンを吸蔵放出することができる。例えば、リチウムイオン電池の正極に用いられる鉄リン酸リチウム (Lithium Iron Phosphate; LFP) は、



の反応式に従ってリチウムイオンを吸蔵放出する。このとき、LFP の示す電位はネルンストの式に従い、

$$E_{\text{LFP}} = E_{\text{LFP}}^0 + \frac{RT}{F} \ln[\text{Li}^+] \quad \text{式 2.14}$$

となる。また、吸蔵放出の標準電極電位 ( $E_{\text{LFP}}^0$ ) は対銀塩化銀電極で 0.2V と定まっている。そのため、固体電極の内部電極として LFP を用いれば、一定の起電力が得られると考えた。すなわち、内部電極として鉄リン酸リチウムを、選択膜としてリチウム選択膜を用いたリチウム選択電極は、一定の起電力を生じると考えた。

LFP を内部電極として用いたリチウム選択電極で、鉄リン酸リチウムによる高い電位安定性とリチウム選択膜による良好なイオン応答が得られることが、駒場らによって報告されていた [32]。しかしながら、起電力の絶対値についての報告は無く、式 2.14 から期待されるように一定の起電力を生じる固体電極となるかは不明であった。

イオン吸蔵物質を内部電極に用いた固体接触型イオン選択電極の構成は図 2.6 のとおりである。下地となる電極にイオン吸蔵物質が塗布されており、その上にイオン選択膜が配置されている。イオン選択膜のイオン吸蔵物質と反対側の面には、内部液型と同様に試料液が接触する。

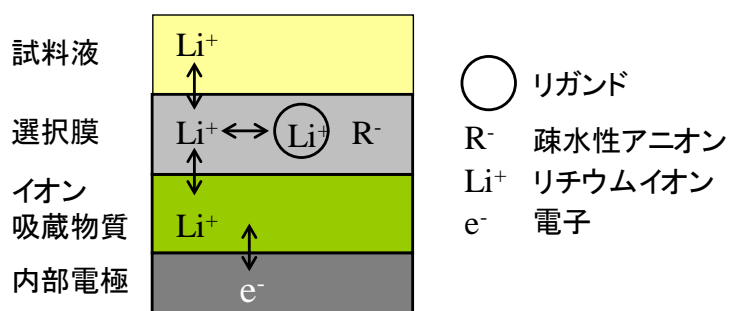


図 2.6 イオン吸蔵物質を内部電極に用いた固体接触型イオン選択電極の構成。

イオン吸蔵物質とイオン選択膜、イオン選択膜と試料液の各界面について界面電位を書き下す。イオン吸蔵物質と選択膜の界面電位 ( $E_{\text{LFP-mem}}$ ) は、式 2.14 に選択膜中のリチウムイオン濃度を代入し、ここから選択膜の標準電極電位を差し引いた、

$$E_{\text{LFP-mem}} = E_{\text{LFP}}^0 - E_{\text{mem}}^0 + \frac{RT}{F} \ln[\text{Li}^+]_{\text{mem}} \quad \text{式 2.15}$$

となる。また、選択膜と試料液の界面電位 ( $E_{\text{mem-sam}}$ ) は、内部液型で議論したように、

$$E_{\text{mem-sam}} = E_{\text{mem}}^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Li}^+]_{\text{sam}}}{[\text{Li}^+]_{\text{mem}}} \quad \text{式 2.16}$$

となる。これらを足し合わせると、

$$E_{\text{LFP}} = E_{\text{LFP-mem}} + E_{\text{mem-sam}} = E_{\text{LFP}}^0 + \frac{RT}{F} \ln[\text{Li}^+]_{\text{sam}} \quad \text{式 2.17}$$

となる。この式は、見かけ上 LFP の示す電位式の式 2.14 と同じであり、標準電極電位がイオン吸蔵物質である LFP 固有の値となっている。すなわち、イオン吸蔵物質を固体電極の内部電極に用いることで、標準電極電位を規定することが可能になることを示している。

以上の考察から、イオン吸蔵物質を内部電極に用いた固体接触型イオン選択電極は、標準電極電位がイオン吸蔵物質の水溶液試料に対する標準電極電位と一致する仮説が得られた。次項では、これらの電極を試作し、この仮説を検証する。

#### 2.2.4 リチウムイオン吸蔵物質を用いた固体電極の電位応答

内部液型リチウムイオン選択電極(内部液型電極)、イオン吸蔵物質である鉄リン酸リチウム電極(LFP 電極)、鉄リン酸リチウムを内部電極に用いた固体接触型リチウムイオン選択電極(LFP 固体電極)を試作し、塩化リチウム水溶液の濃度変化に対する電位応答を測定した。

電極作製の詳細な方法は 7.1.2 に記した。ここでは、本研究の特徴であるイオン吸蔵物質層について記す。LFP 電極および LFP 固体電極のイオン吸蔵物質層は、電池材料として用いられる場合を踏襲した[31]。イオン吸蔵物質である LFP と導電性物質であるグラファイトを、バインダであるポリビニリデンジフロライド(PVdF)で結着した。LFP は電気伝導度が低いため[33]、100nm 以下の粒塊とした上で高い導電性を有するカーボンで被覆されたものを用いた。グラファイトは、LFP の粒塊よりも長距離の電気伝導性を確保するために加えられ、1  $\mu\text{m}$  以上の粒塊のものを用いた。作製したイオン吸蔵物質層の電子顕微鏡写真を図 2.7

に示す。100nm 程度の小さい粒塊の LFP と  $1\mu\text{m}$  程度の大きい粒塊のグラファイトが混合して結着されていることが見て取れる。

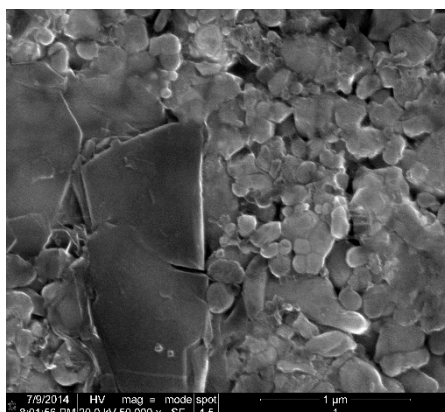


図 2.7 イオン吸蔵物質層断面の電子顕微鏡写真.

イオン吸蔵物質層の膜厚は有機溶媒である N-メチルピロリドン (NMP) を含んだ状態で  $90\mu\text{m}$  とした。溶媒とその他の材料は体積比でおおよそ 1:1 としたため、溶媒乾燥後の膜厚は  $40\sim 50\mu\text{m}$  と推定される。LFP 固体電極の場合は、図 2.6 の構成とするため、イオン吸蔵物質層と、厚さ約  $400\mu\text{m}$  のリチウムイオン選択膜を貼りあわせた。

作製した電極を用いて電位測定した結果を図 2.8 に示す。また、スロープ、測定下限、妨害イオンに対する選択性を表にまとめた。なお、実験環境は約  $25^\circ\text{C}$  であった。

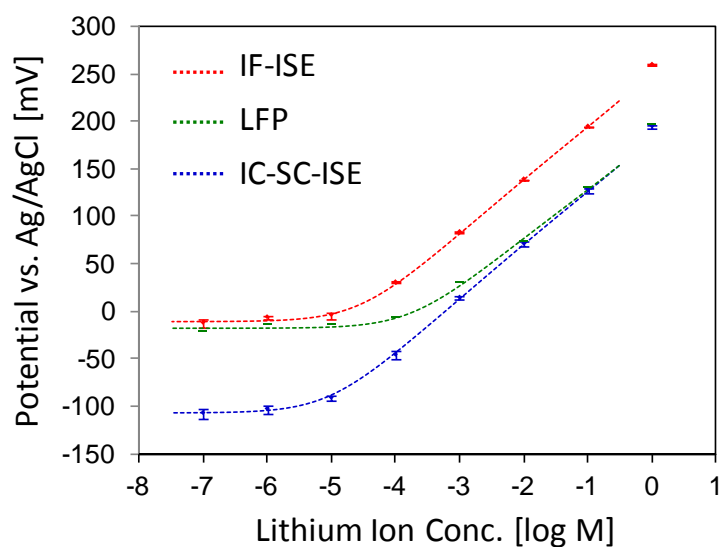


図 2.8 リチウムイオン選択電極の電位応答.

表 2.1 リチウムイオン選択電極の性能.

	$E^0$ [mV]	Slope [mV/decade]	LOD [log M]	選択係数[log]	
				Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
IF-ISE	260.2	59.2	-4.6	-2.1	-2.0
LFP	188.4	54.6	-3.8	-1.4	-1.4
IC-SC-ISE	191.2	60.4	-5.0	-2.1	-2.0
文献値[34]	-	-	-	-2.4	-2.3

図 2.8 から、いずれの電極もリチウムイオン濃度に電位応答を示していることが分かる。まず、作製したイオン選択膜が正しく機能していることを確認する観点で、内部液型電極 (IF-ISE) の結果について考察する。内部液型電極は、イオン活量  $10^{-5}\text{M}$  程度まで電位応答を示した。測定下限を考慮したネルンストの式

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln(a_{\text{sam}} + a_{\text{LOD}}) \quad \text{式 2.18}$$

を用いてこれをフィッティングした。図 2.8 に赤の破線で示したように、実験結果と再現する解が得られ、スロープ 58.7mV/桁、測定下限  $10^{-4.6}\text{M}$  であった。スロープは 25°C における理論値である 59.2mV/桁に対して 1% の誤差で一致し、測定下限も一般的に言われている  $10^{-5}\text{M}$  程度であることから、リチウムイオン選択膜が期待通りリチウムイオンに対して電位応答を示していることが確認できた。

イオン選択電極において重要な指標のひとつに、イオン選択性がある。これは、妨害イオンと言われる測定対象でないイオンに対してどの程度応答しないか、すなわち、測定対象イオンにどの程度選択的に応答するかを意味する。評価方法には何通りもあり、今回は単独液法 (Separate Solution Method; SSM) を用いた。これは、濃度既知の妨害イオン水溶液に対する電位応答が、測定対象イオンに換算した場合の電位応答でどの程度に相当するかを示すものである。選択性を  $K_{\text{pot}}$  と定義すると、測定対象イオン (I)、妨害イオン (J) に対する電位応答はそれぞれ、

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln a_i \quad \text{式 2.19}$$

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln(K^{\text{pot}} a_j) \quad \text{式 2.20}$$

となることから、この 2 式を解くと、



$$K^{\text{pot}} = \frac{a_i}{a_j} \quad \text{式 2.21}$$

が得られる。 $10^{-1}\text{M}$  塩化ナトリウム水溶液および塩化カリウム水溶液の電位を測定し、ナトリウムおよびカリウムに対する選択性を測定したところ、それぞれ  $10^{-3.3}\text{M}$ ,  $10^{-3.0}\text{M}$  に相当したことから、それぞれの選択性は  $10^{-2.2}$ ,  $10^{-2.0}$  と判明した。観測された選択性は文献値とほぼ一致し、イオン選択性の観点でもリチウム選択膜が機能していることが確認された。

図 2.8 に緑で示した LFP 電極の電位応答は、内部液型電極よりも傾きが小さく、測定下限も高めであった。測定下限を考慮したネルンストの式 2.18 でフィッティングを行ったところ、スロープ  $54.6\text{mV/桁}$ 、測定下限  $10^{-3.8}\text{M}$  であった。スロープは理論値の 90% であり、測定下限はイオン選択膜を用いた内部液型イオン選択電極よりも 1 桁高かった。LFP に行ったカーボン被覆とグラファイトの存在が、理論値よりも低いスロープの原因として考えられる。イオンに電位応答を示さない一方で導電性を有するカーボンやグラファイトが、電位応答を示す LFP に対して並列抵抗として働き、LFP の電位応答を低下させたと推測される。このように理想的ではないものの、式 2.14 で仮定した LFP 電極のネルンスト応答に由来すると推定される応答が観測された。選択性は、対ナトリウム  $10^{-1.4}$ 、対カリウム  $10^{-1.4}$  とイオン選択膜を用いた内部液型イオン選択電極には及ばなかったものの、一定の選択性を有していることが分かった。

図 2.8 に青で示した LFP 固体電極の電位応答は、内部液型イオン選択電極と同等の良好な応答であった。測定下限を考慮したネルンストの式を用いたフィッティング結果は、スロープ  $60.4\text{mV/桁}$ 、測定下限  $10^{-5.0}\text{M}$  と、内部液型電極と同等以上であった。選択性は、対ナトリウム  $10^{-2.1}$ 、対カリウム  $10^{-2.0}$  とこちらも内部液型電極と同等であった。内部液型電極と同等の特性を示したことは、前項で議論したように、試料液に対する電位応答はイオン選択膜と試料液の界面で発生していることを示している。また、測定下限が内部液型電極よりも小さくなることは、固体電極では時おり観察される現象である。これは、内部液型電極では内部液側から試料液側へのイオン流が存在し、これが測定下限の支配要因となっているためである [35]。固体電極は内部液を有さないためこのイオン流が原理的に存在せず、選択膜からのイオンのしみだしなどより小さな因子が測定下限の支配要因となる。

LFP 電極と LFP 固体電極の標準電極電位 ( $E^0$ ) が一致するという前節で示した仮説を検証するため、標準電極電位に着目した。フィッティングによれば、LFP 電極の標準電極電位は  $188.4\text{mV}$ 、LFP 固体電極の標準電極電位は  $191.2\text{mV}$  であった。LFP 電極の標準電極電位は LFP の材料特性によるものであり、その電位に LFP 固体電極の標準電極電位が  $2.8\text{mV}$  の差で一致した。このことは、前節の仮説が正しいことを強く示唆するものである。尚、図 2.8 の  $1\text{M}$  における電位は標準電極電位と近いものの、厳密には異なる。これは、標準電極電位は活量  $1\text{M}$  における電位という定義であるのに対して、図 2.8 の横軸は濃度のためである。

以上のように、リチウムイオン吸蔵物質を用いたリチウムイオン選択電極の電位応答を内部液型リチウムイオン選択電極の電位応答およびリチウムイオン吸蔵物質の電位応答と比較した。その結果、リチウムイオン吸蔵物質を用いたリチウムイオン選択電極は、イオン選択膜由来である内部液型リチウムイオン選択電極と同等以上の電位応答、測定下限、妨害イオン選択性を示した。その一方、絶対電位はリチウムイオン吸蔵物質に依存することが分かった。これらの特性は式 2.17 およびその導出から期待されたことである。従って、イオン吸蔵物質を固体電極の内部電極として用いることで、イオン選択電極としての性能はそのままに、課題であった絶対電位の予測と制御が解決できることが分かった。

#### 2.2.5 リチウムイオン吸蔵物質を用いた固体電極の電位再現性と電位安定性

LFP 固体電極の標準電極電位が LFP の材料特性に支配されているということは、LFP 固体電極に高い電位再現性や電位安定性が期待できることを意味している。これは、内部液型イオン選択電極の内部電極に銀塩化銀電極を用いることと似ている。すなわち、銀塩化銀電極は、銀塩化銀と銀の平衡反応という銀塩化銀の材料特性により決まる電位を発生させるため、高い電位再現性や電位安定性を生み出している。LFP も式 2.13 の平衡反応により決まる電位を発生させるため、同様のことが期待できる。

LFP 固体電極を 9 つ、内部液型電極を 4 つ試作し、42 日間に渡って電位を比較した (図 2.9)。試作 1 日後から電位を測定したところ、1 日後は LFP 固体電極の電位ばらつき 1.4mV、内部液型電極の電位ばらつきは 0.5mV であった。これらはどちらも高い水準にあり、LFP や銀塩化銀といったイオンに対する平衡反応を有する材料を用いることの効果を示している。LFP 固体電極は 42 日後も同程度の電位ばらつきを維持し、電位の絶対値も安定していた。一方、内部液型電極は、30 日後辺りから電位が低下し、結果として電位ばらつきは 42 日後で 2.9mV まで増大した。これは、内部液が揮発により濃縮されたためである。内部液濃度が高くなると、銀塩化銀内部電極はアニオン応答性を有するため電位は低下する。選択膜はカチオン応答性であるものの、内部液と接触しているのは試料液と反対側の面であるため符号は反転し、こちらも電位は低下を示す。従って、内部液濃度の上昇により電極の電位は低下する。内部液の揮発を抑制すればこの電位変動は抑えられるため、実用上は問題とならないものの、内部液型電極の有する原理的な弱点であることは確かである。一方、固体電極は内部液を有さないため、この点で有利である。

42 日間の測定の結果、LFP 固体電極は電位再現性 1.4mV、電位安定性  $-1.1 \mu\text{V}/\text{h}$  を示した。これまでの報告との比較を表 2.2 にまとめた。電位安定性の点では本研究が最も優れている。また、電位再現性の点では、酸化還元バッファを用いた固体電極が本研究を上回るものの、この固体電極は酸化還元物質の溶出により電位安定性が不十分である。すなわち、イオン吸蔵物質を用いた固体電極は電位安定性と電位再現性の両方を満足するという点で

これまでの固体電極よりも優れている。これは、イオン吸蔵物質が材料特性として高い電位再現性と電位安定性は有するためであり、これに適切なイオン選択膜を組み合わせることで、これらの特性を生かした固体電極とすることができたことを意味している。次節では、他のイオン吸蔵物質とイオン選択膜の組み合わせを試し、測定できるイオン種を増やすとともに、標準電極電位がイオン吸蔵物質に支配されていることの実験的裏づけを進めていく。

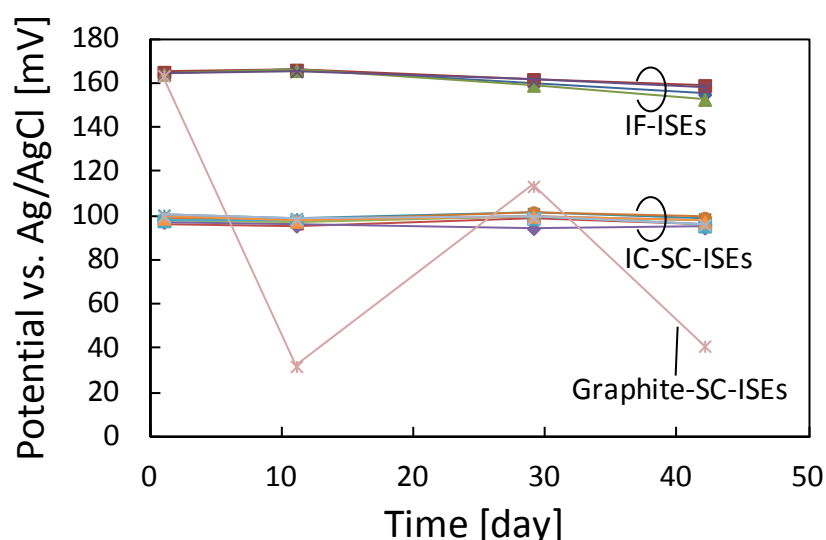


図 2.9 リチウムイオン吸蔵物質を用いた固体電極の電位安定性と電位再現性.

表 2.2 固体電極の電位安定性と再現性の比較.

	電位安定性 [ $\mu\text{V}/\text{h}$ ]	電位再現性 [mV]
導電性ポリマを用いた固体電極 [37]	30	NA
カーボン材料を用いた固体電極 [27]	1.3	NA
酸化還元バッファーを用いた固体電極 [30]	> 600	0.7
IC-SC-ISE (本研究)	-1.1	1.4

## 2.3 臨床応用に向けた陽イオン吸蔵物質を用いた固体電極

リチウムイオン電池は多くの電化製品や自動車で用いられているため、研究開発も盛んに行われており、リチウムイオン吸蔵物質には多くの選択肢がある。そのため、イオン吸蔵物質を用いた固体電極の原理確認には、リチウムイオン選択電極を採用した。一方、イオン選択電極としてはナトリウム、カリウム、カルシウムといったカチオンのほうが需要があり、これは血中に含まれるナトリウム、カリウム、カルシウムといったカチオンの臨

床医学的な重要性が高いためである。そこで、本節では、これらカチオンを吸蔵可能なイオン吸蔵物質を用いて固体電極を試作し、評価を行った。

### 2.3.1 多種カチオンを吸蔵可能なプルシアンブルー類似体

リチウムはその原子量の小ささおよびイオン化傾向の大きさから、電池に用いることで重量あたりのエネルギー密度を高くできる。そのため、リチウムイオン電池に用いられるリチウムイオン吸蔵物質は研究が進んでいる。一方、ナトリウムやカリウムはリチウムよりも原子量が大きいため、重量あたりのエネルギー密度の観点では不利であり、リチウムイオン吸蔵物質ほどには研究されていない。しかしながら、リチウムは希少金属でありナトリウムやカリウムは価格や入手の容易性の点では勝るため、ナトリウム電池やカリウム電池について一定の研究がなされている[37]。

カリウムイオン電池の材料としてプルシアンブルー類似体が提唱されている[38, 39]。プルシアンブルーは青色の顔料であり、鉄原子がシアノ結合による格子状の結晶構造をしている(図 2.10)。特徴として、

- (i) 様々なカチオンを格子の間に吸蔵可能である
- (ii) 鉄原子の一部を他の遷移金属に置換することで、イオン吸蔵の電位を制御できる
- (iii) 化学合成が比較的容易である

が上げられる。(i)は、格子サイズが  $5\text{\AA}$  [38] とナトリウムやカリウムの半径より大きいため、イオン種ごとに選択性は異なるものの、様々なイオンを吸蔵できる性質を有する。そのため、今回の目的のナトリウム、カリウム、カルシウムを含む多種の固体電極の内部電極に適用可能である。(ii)は、イオン吸蔵に伴い金属原子が還元されることによるものである。酸化還元電位は、鉄<ニッケル<銅であるため、これらの遷移金属が結晶中に存在するとイオン吸蔵の電位が増加する。これにより、電位安定性の観点からイオン吸蔵の電位を制御することができる。(iii)は、鉄原子の錯体であるヘキサシアノ鉄と鉄イオンを混合するだけで、プルシアンブルーが析出することを意味している。他の金属イオンの場合でも、2液を混合して沈殿物を回収するだけでプルシアンブルー類似体を得ることができる。

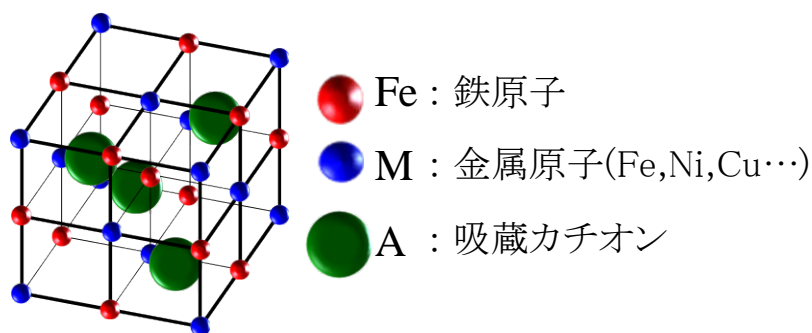


図 2.10 プルシアンブルー類似体の結晶構造.

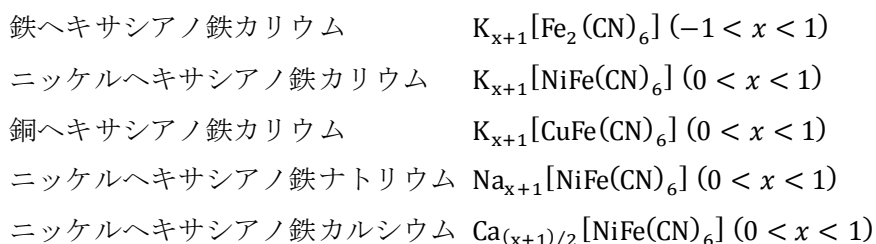
そこで、本研究ではプルシアンブルー類似体をナトリウム、カリウム、カルシウム測定用の固体電極の内部電極として用いることにした。

### 2.3.2 プルシアンブルー類似体の評価と考察

プルシアンブルー類似体として、古典的なプルシアンブルーの鉄ヘキサシアノ鉄カリウムの他に、ニッケルヘキサシアノ鉄カリウム、銅ヘキサシアノ鉄カリウムを合成した。また、他のカチオンを吸蔵した物質として、ニッケルヘキサシアノ鉄ナトリウム、ニッケルヘキサシアノ鉄カルシウムを合成した(合成法は付録を参照)。

LFPの場合と同様に、合成したプルシアンブルー類似体とグラファイトをバインダであるポリビニリデンジフロライド(PVdF)で結着したイオン吸蔵物質層を作製した。プルシアンブルー類似体を電池応用した報告では[39]、プルシアンブルー類似体をカーボン被覆せずに用いていたため、本研究でもこれを踏襲した。プルシアンブルーでは鉄原子の最外殻電子の形成するエネルギーバンドが部分占有の場合には金属的な性質を示す[40]。プルシアンブルー類似体でもエネルギーバンドが部分占有となり比較的高い電気伝導度を有すると推定され、これがカーボン被覆を行わなかった理由と考えられる。

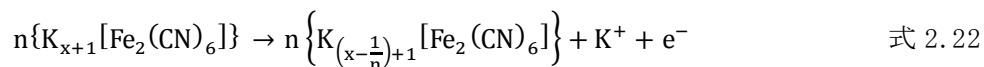
作製したイオン吸蔵物質がイオン吸蔵放出を行えることを、一定電流印加によるイオン吸蔵放出に対する電位応答により評価した。それぞれのイオン吸蔵放出曲線を図 2.11, 図 2.12 に示す。縦軸は電位を、横軸は規格化したイオン吸蔵率  $x$  を示しており、化学式において、



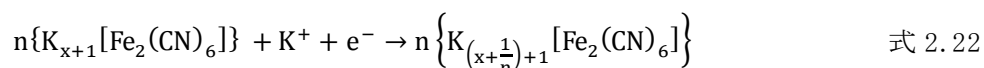
と定義した。鉄ヘキサシアノ鉄カリウム以外は、単位格子あたり 1 つの鉄原子が二価と三価の状態を取りうるため、イオン吸蔵率は 0~1 となる。同様の定義を鉄ヘキサシアノ鉄カリウムに当てはめると、単位格子あたり 2 つの鉄原子が存在し、二価二価と状態から三価三価の状態まで変化しうるため、イオン吸蔵率は -1~1 の値をとりうる。

図 2.11 はニッケルヘキサシアノ鉄のカリウム、ナトリウム、カルシウムに対するイオン吸蔵率 0~1 の間でのイオン吸蔵放出曲線を、図 2.12 はカリウム吸蔵プルシアンブルー類似体のカリウムに対するイオン吸蔵率 0~1 の間でのイオン吸蔵放出曲線を示している。ニ

ニッケルヘキサシアノ鉄カリウムを一例として、イオン吸蔵放出曲線の意味を説明する。ニッケルヘキサシアノ鉄カリウムに電流を印加すると、



のように、電子が引き抜かれると同時にニッケルヘキサシアノ鉄カリウムに吸蔵されていたカリウムがイオンとして溶液中に放出される。電流を逆に印加すると、



電子が取り込まれると同時に溶液中のカリウムイオンがニッケルヘキサシアノ鉄カリウムに吸蔵される。このようにして、電流の印加によりイオン吸蔵率を変化させることができる。図 2.11 と図 2.12 のグラフではイオン吸蔵率を横軸にとり、そのときのイオン吸蔵物質の電位変化を示したものである。

それぞれの物質について 2 本の線が描かれており、下側の線がイオン吸蔵率を増大させるため $-10\mu A$ の電流を加えた場合に、上側の線がイオン吸蔵率を減少させるため $+10\mu A$ の電流を加えた場合に対応する。印加電流の正負によって履歴が生じるのは電極の抵抗によるものであり、電池の内部抵抗に相当する。またこれらの曲線は、イオン吸蔵率 0 や 1 付近の両端において電位の急峻な増大や減少が見られ、それ以外では比較的平坦な電位の変化となっている。これは、イオン吸蔵率が 0~1 の間では鉄原子の二価と三価の平衡が電位を支配しているのに対し、両端ではこの平衡反応から外れるためである。

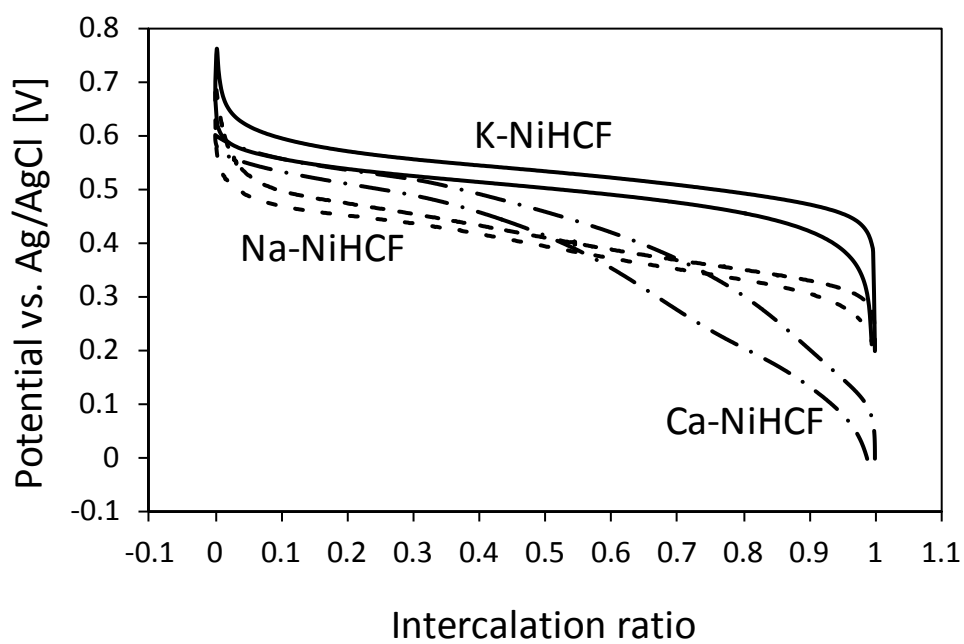


図 2.11 ニッケルヘキサシアノ鉄のイオン吸蔵放出曲線.

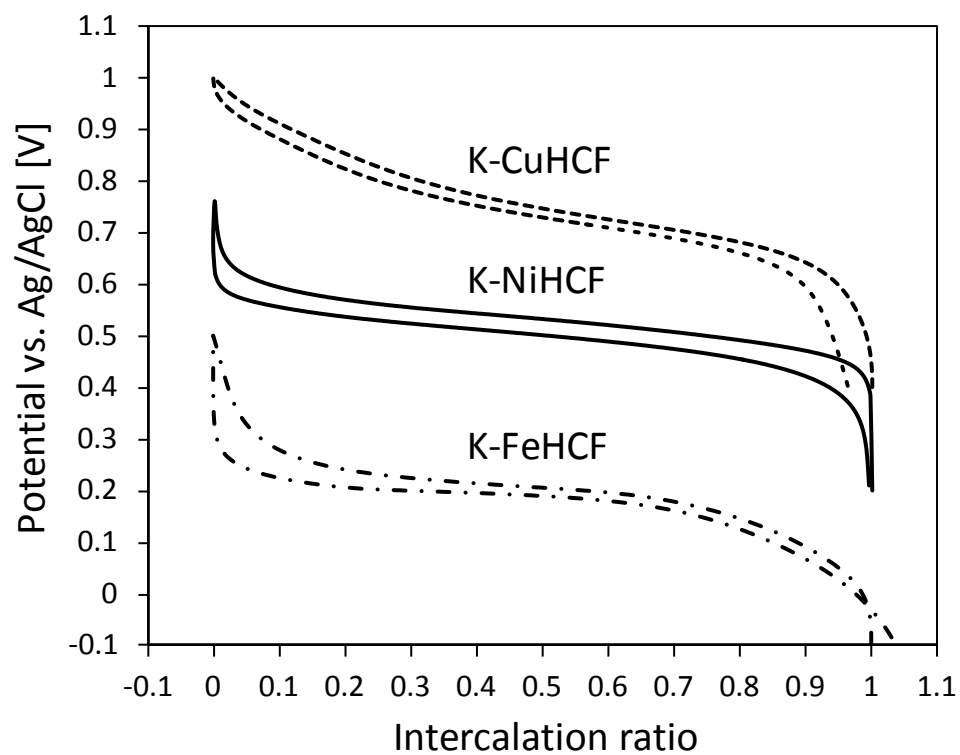


図 2.12 カリウム吸蔵プルシアンブルー類似体のイオン吸蔵放出曲線.

図 2.12 において、プルシアンブルー類似体を構成する金属元素が  $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Fe}$  の順にイオン吸蔵放出の電位が高かった。これは、金属元素のイオン化傾向と同じ序列であり、これらの金属元素がイオン吸蔵放出の電位に寄与していることが推測される。Dusseyらはこれらの元素に加えて Ag, Cd についても電位を比較しており、 $\text{Cu} = \text{Ag} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Fe}$  の序列を報告している[41]。イオン吸蔵放出の電位は結晶構造にも依存するためイオン化傾向と必ずしも一致しないものの、金属元素によってイオン吸蔵放出の電位が制御可能であることを意味している。

以上のように、いくつかのプルシアンブルー類似体を合成し、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンを吸蔵放出できるというイオン吸蔵物質の特性を確認した。次節では、得られたこれらの材料を固体電極の内部電極として用いたイオン選択電極の評価を行っていく。

### 2.3.3 プルシアンブルー類似体を用いた固体電極の電位応答評価と考察

ナトリウム、カリウム、カルシウム選択性を有する固体電極を、前節で評価したプルシアンブルー類似体を内部電極として対応する選択膜と組み合わせて作製した。組み合わせを表 2.3 に示す。

表 2.3 プルシアンブルー類似体とイオン選択膜の組み合わせ.

略号	プルシアンブルー類似体	イオン選択膜
K-FeHCF	鉄ヘキサシアノ鉄カリウム	カリウム選択膜
K-NiHCF	ニッケルヘキサシアノ鉄カリウム	
K-CuHCF	銅ヘキサシアノ鉄カリウム	
Na-NiHCF	ニッケルヘキサシアノ鉄ナトリウム	ナトリウム選択膜
Ca-NiHCF	ニッケルヘキサシアノ鉄カルシウム	カルシウム選択膜

測定対象イオン濃度の変化に対する電位応答の評価結果を図 2.13-14 に示す。いずれの図も、左側が横軸を測定対象イオン濃度としたもの、右側が測定対象イオン活量としたものである。濃度から活量への変換には、各種イオンについての変換式を用いた[42]。また、イオン活量に対するグラフには、測定下限を考慮したネルンストの式(式 2.18)でフィッティングを行った曲線を合わせて示した。いずれの電極もイオン濃度の変化に対して良好な電位応答を示しており、同じ選択膜を用いた内部液型イオン選択電極と同様の電位応答であることが分かる。これは、リチウム固体電極の場合と同様に、選択膜の試料液に接触している界面のみが濃度変化に対して電位応答をしていることを示している。この結果を、表 2.4-6 にスロープ、測定下限、選択性についてまとめた。やはり内部液型と固体電極でほぼ同様の結果であり、これらのナトリウム、カリウム、カルシウム選択性固体電極につ



いても、リチウム選択性固体電極と同様にイオン選択膜と試料液の界面が電位応答していることが確認された。

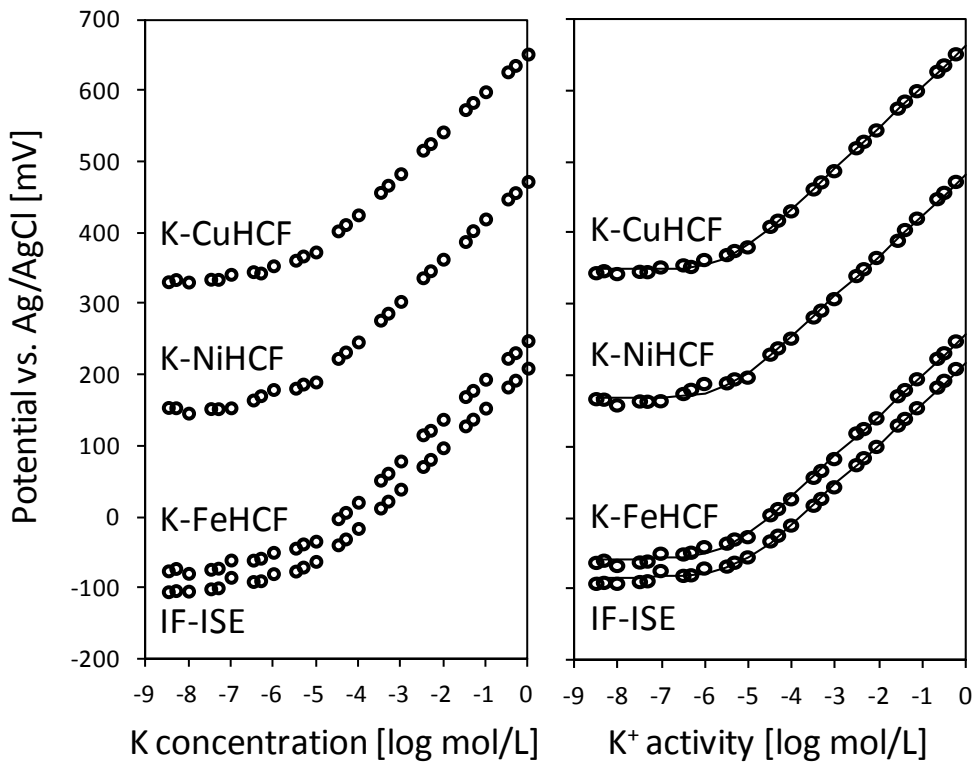


図 2.13 カリウム選択電極の電位応答.

表 2.4 カリウム選択電極の性能.

	$E^0$ [mV]	スロープ [mV/decade]	測定下限 [log M]	選択係数 [log]				
				$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{NH}_4^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$
K-CuHCF	662.1	57.3	-5.5	-4.4	-4.0	-1.9	-4.7	-4.5
K-NiHCF	480.6	56.7	-5.5	-4.4	-4.1	-1.9	-4.8	-4.5
K-FeHCF	258.6	57.4	-5.5	-4.4	-4.0	-1.9	-4.7	-4.5
IF-ISE	215.7	56.4	-5.3	-4.2	-3.9	-1.9	-4.5	-4.5
文献値 [43]	-	-	-	-4.4	-4.3	-1.8	-4.3	-4.2

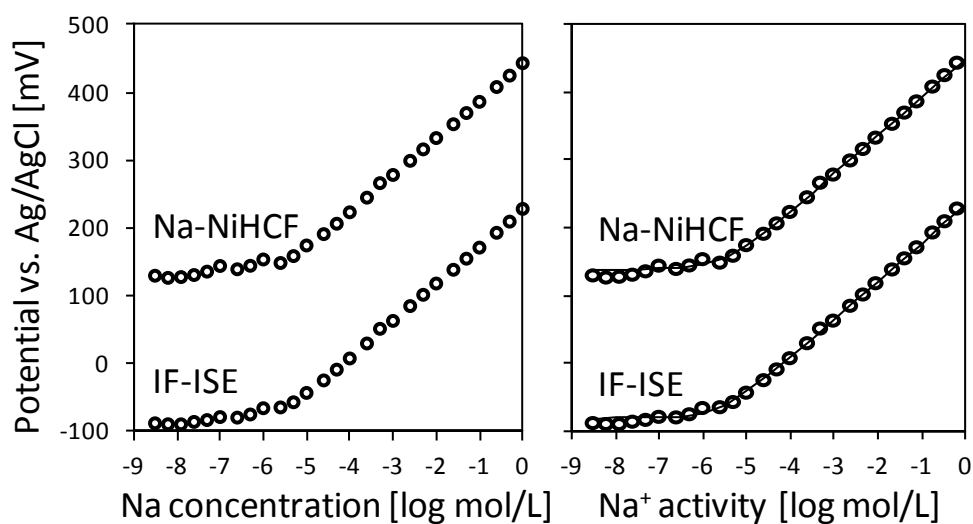


図 2.14 ナトリウム選択電極の電位応答.

表 2.5 ナトリウム選択電極の性能.

	$E^0$ [mV]	スロープ [mV/decade]	測定下限 [log M]	選択係数 [log]				
				$\text{Li}^+$	$\text{K}^+$	$\text{NH}_4^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$
Na-NiHCF	448.1	56.2	-5.5	-3.7	-2.7	-4.6	-5.4	-5.7
IF-ISE	223.2	56.2	-5.6	-3.8	-2.7	-4.6	-5.4	-5.7
文献値 [44]	-	-	-	-2.5	-1.9	-	<-6.0	-

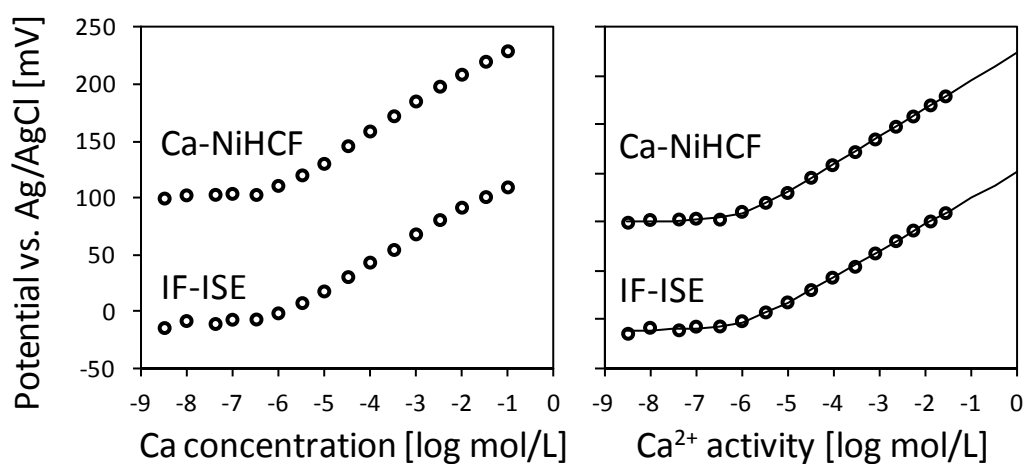


図 2.15 カルシウム選択電極の電位応答.

表 2.6 カルシウム選択電極の性能.

	$E^0$ [mV]	スロープ [mV/decade]	測定下限 [log M]	選択係数 [log]				
				$\text{Li}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{NH}_4^+$	$\text{Mg}^{2+}$
Ca-NiHCF	274.2	28.9	-6.0	-3.9	-3.6	-3.8	-3.9	-4.0
IF-ISE	151.7	27.0	-6.0	-4.0	-3.8	-4.0	-4.1	-4.2
文献値[45]	-	-	-	-5.8	-5.9	-7.5	-	-4.4

固体電極が用いた選択膜に由来するスロープや選択性を有することは、他の固体電極でも見られていることである[23-26]。今回、イオン吸蔵物質を下地電極に用いることの利点の一つは、式 2.17 示すようにイオン吸蔵物質のイオン吸蔵放出の電位に由来するイオン選択電極の標準電極電位が得られることである。リチウム選択電極で確認されたこの性質を、プルシアンブルー類似体を下地電極に用いたカリウム、ナトリウム、カルシウム電極においても検証した。図 2.16 に示したのが、イオン吸蔵物質単体とそれを下地電極に用いた固体電極で電位を比較したものである。イオン吸蔵物質単体の電位は、測定対象イオンが 1mol/L 含まれている水溶液で測定を行ったものである。固体電極の電位は、1mol/L の水溶液での活量を用いて表の標準電極電位から算出したものである。イオン吸蔵物質単体の電位と固体電極の電位の間には高い相関( $R^2=0.93$ )が見られた。このように、イオン吸蔵物質を下地電極に用いた固体電極が、式に従ってイオン吸蔵物質固有の電位を示すことが、鉄リン酸リチウムに加えて 5 種類のプルシアンブルー類似体で観測された。このように、イオン吸蔵物質を下地電極に用いた固体電極の標準電極電位がイオン吸蔵物質固有の電位に支配されるという式で求めた仮説が実験的に示された。

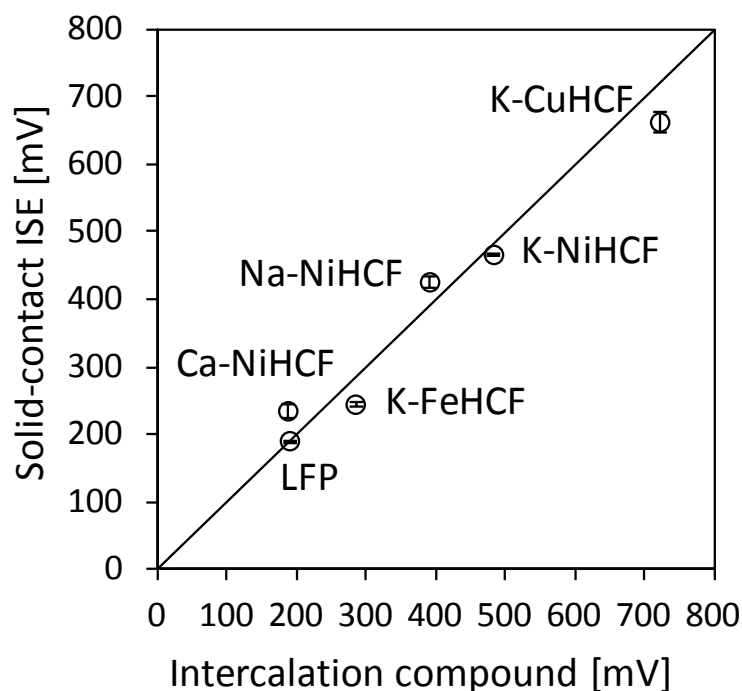


図 2.16 イオン吸蔵物質単体の電位と固体電極の電位の相関関係.

#### 2.3.4 プルシアンブルー類似体を用いた固体電極の電位再現性と電位安定性

リチウム固体電極の場合と同様に、イオン吸蔵物質を下地電極に用いた固体電極の利点の一つは、イオン吸蔵物質が電位を支配することによる高い電位再現性と安定性である。図 2.17 と表 2.7 に示したのが、100mmol/L の水溶液で評価した長期 (2 ヶ月) の電位安定性と再現性である。電位再現性は概ね 10mV 以内であり、イオン吸蔵物質が電位の支配因子となっていることを示唆するには十分であるものの、リチウム固体電極のばらつき 1.4mV と比較すると大きい。その一方で、K-NiHCF を下地電極に用いたカリウム選択電極の 33 日目の測定ではリチウム固体電極のばらつきより小さな 0.6mV の電位再現性が観測された。電位再現性に影響するまだ抽出できていないパラメータが存在することが予想され、今後の研究で明らかにされていくことが期待される。

電位安定性について、3 種類のカリウム電極を比較した。最も高い電位を示した K-CuHCF を下地電極に用いたカリウム電極では長期的な電位の低下が観測された。一方、最も低い電位を示した K-FeHCF を下地電極に用いたカリウム電極では 33 日目から 67 日目にかけて長期的な電位の増加が観測された。これらの間の電位を示した K-NiHCF を下地電極に用いたカリウム電極では 33 日目から 67 日目にかけて  $0.1 \mu\text{V/h}$  の非常に安定した電位を示した。これらの結果から、固体電極に用いたイオン吸蔵物質は酸化還元反応の起こりうる環境にあり、高い電位のイオン吸蔵物質は還元される傾向に、低い電位のイオン吸蔵物質は酸化

される傾向にあることが予想される。その結果、中間の電位を示す K-NiHCF を下地電極に用いたカリウム電極で高い電位安定性が得られたと考えられる。

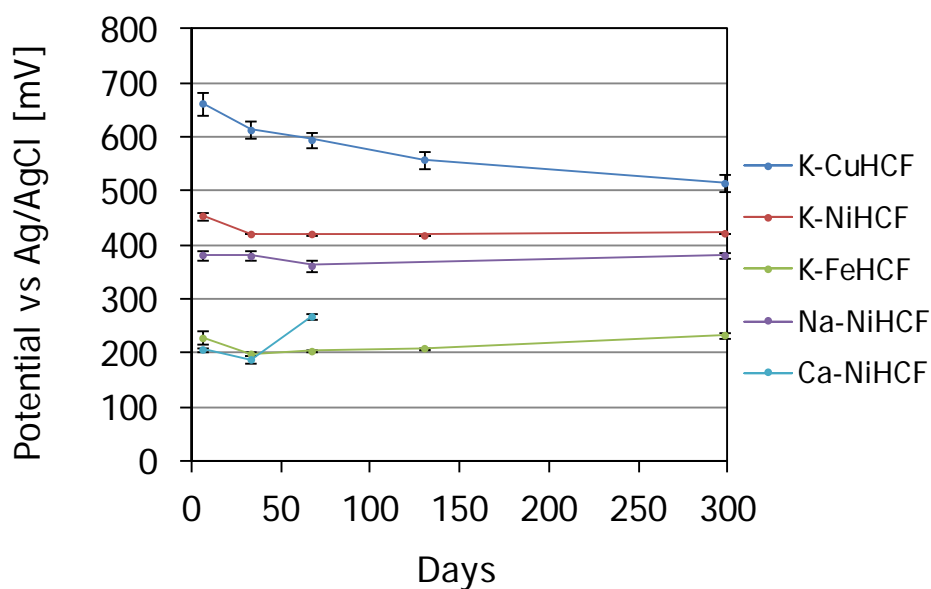


図 2.17 プルシアンブルー類似体を用いた固体電極の電位再現性と電位安定性.

表 2.7 プルシアンブルー類似体を用いた固体電極の電位再現性と電位安定性.

	Potential [mV] at					Drift [ $\mu$ V/h] (from 33rd to 67th day)
	6th day	33rd day	67th day	130th day	298th day	
K-CuHCF n=4	662.8 $\pm 20.4$	613.5 $\pm 15.1$	595.2 $\pm 14.6$	558.7 $\pm 15.2$	515.0 $\pm 16.4$	-22.5
K-NiHCF n=4	454.6 $\pm 7.2$	420.8 $\pm 0.6$	420.9 $\pm 1.2$	418.2 $\pm 1.4$	422.2 $\pm 1.0$	0.1
K-FeHCF n=3	228.2 $\pm 12.6$	198.8 $\pm 2.5$	203.8 $\pm 2.5$	209.2 $\pm 2.0$	233.5 $\pm 6.1$	6.2
Na-NiHCF n=4	382.0 $\pm 8.7$	380.2 $\pm 8.6$	361.9 $\pm 9.7$	n. a.	381.2 $\pm 6.9$	-22.4
Ca-NiHCF n=4	206.9 $\pm 3.6$	188.4 $\pm 8.7$	268.1 $\pm 6.6$	n. a.	n. a.	97.6

## 2.4 固体電極の詳細な評価

Gryusarnyi らによって提唱されている固体電極の詳細な評価方法である水層試験 (Water layer test) と電流制御分極 (Galvanostatic polarization) を用いて、本研究で試作した固体電極の評価を行った [36]。

### 2.4.1 水層試験

水層試験は選択膜と内部電極間の水層の存在を検証する試験である。理想的には、固体電極は選択膜と内部電極が接した状態でこの界面電位が安定し、電極として安定な電位を発生させる。しかし、選択膜と内部電極の間に薄い水の層が存在しても、この水の層が内部液として働き、見かけ上安定した電位を発生させる。水の層は電極剥離の原因となるだけでなく、水の層のイオン濃度は規定されていないため、安定した電位を発生させる条件は限られたものとなる。この水の層の存在を検証する試験が水層試験である。特に、今回用いたイオン吸蔵物質であるプルシアンブルー類似体は親水性であるため、水層が形成されている可能性があり、水層試験で検証する必要がある。

図 2.18 を用いて、水層試験の概要を説明する。固体電極の選択膜と内部電極の間に薄い水層が存在する場合、a のように固体電極を 0.1M KCl に浸漬すると水層にカリウムイオンが浸透していき、水層のカリウム濃度が増大する。選択膜の裏面でのイオン濃度増加なので電極の電位はグラフに示したように低下する。続いて、b のように 0.1M NaCl に浸漬すると、水層のカリウム濃度は低下し、代わりにナトリウム濃度が増加する。そのため、試料液中のカリウム濃度低下により一旦低下した電位は、選択膜の裏面でのイオン濃度低下により増加する。最後に c のように再び 0.1M KCl に浸漬すると水層のナトリウム濃度の減少とカリウム濃度の増加が起こり、電位はオーバーシュートした後に徐々に低下していく。以上が水層のある場合の電位応答であり、水層が無い場合にはグラフに破線で示したようにそれぞれの状態で一定の電位を示す。

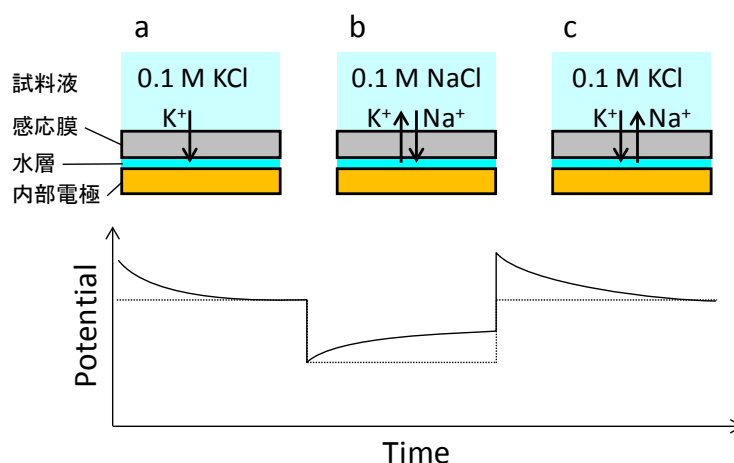


図 2.18 水層試験の概要.

図 2.19 に LFP を内部電極に用いたリチウム選択性固体電極での水層試験の結果を、図 2.20 にプルシアンブルー類似体を内部電極に用いたカリウム選択性固体電極での水層試験の結果を示す。測定対象イオンを含む溶液に戻した図 2.18c の状態において、いずれの電極も安定した電位応答を示した。しかし、図 2.20 に示すように、測定対象イオンを含まない溶液に浸漬した図 2.18b の状態において、電位が徐々に増加する挙動が見られた。ただし、このような挙動は必ずしも水層の存在を意味しているわけではない。

他の原因として、選択膜から染み出した測定対象イオンが溶液中のイオン濃度を増加させ、それにより電位が増加することも起こりうる。そこで、溶液を新しく交換したところ、電位は交換直後と同程度まで再び低下した。これは、溶液中に測定対象イオンが存在していたことを示している。仮に水層の存在による電位の上昇であった場合、溶液を新しく交換しても水層に影響は与えない。従って、以上の結果から、これらリチウム選択性固体電極とカリウム選択性固体電極では電位に影響を与えるような水層は存在しないことが分かった。

一方、プルシアンブルー類似体を内部電極に用いたナトリウム選択性固体電極では、図 2.21 に示すように異なった挙動を示した。図 2.21 の各色は同様に作製した別の電極を意味する ( $n=4$ )。図 2.18 に示すような電位のアンダーシュートやオーバーシュートは見られないものの、測定対象イオンを含まない溶液に浸漬する前後で電位の上昇が見られた。

共にプルシアンブルー類似体を用いたカリウム選択性固体電極とナトリウム選択性固体電極で水層の有無に違いが生じるとは考えにくいとため、電位上昇をもたらす別の原因を考察した。図 2.22 に仮説のモデルを示す。測定対象イオンを含まない溶液として KCl に浸漬したことで、カリウムイオンがイオン吸蔵物質と選択膜の界面に到達する。今回用いたイオン吸蔵物質であるニッケルヘキサシアノ鉄はナトリウムよりもカリウムに対する選択性

が高いため、カリウムイオンに接触することで吸蔵していたナトリウムイオンがカリウムイオンに交換される。図 2.11 に示したようにカリウムイオンを吸蔵した状態のほうが電位が高いため、イオン交換の結果電位が上昇する。この仮説を検証するには、測定対象イオンを含まない溶液として用いる水溶液により選択性の低いイオンを用いればよく、今後の課題である。

以上の水層試験の結果から、今回試作したリチウム選択性固体電極とカリウム選択性固体電極には測定に影響を及ぼすような水層は存在しないことが確かめられた。一方、ナトリウム選択性固体電極では、塩化カリウム水溶液への半日以上浸漬により 10mV 程度の電位の上昇が観測された。メカニズムの解明および実測への影響の有無は今後の検討課題である。

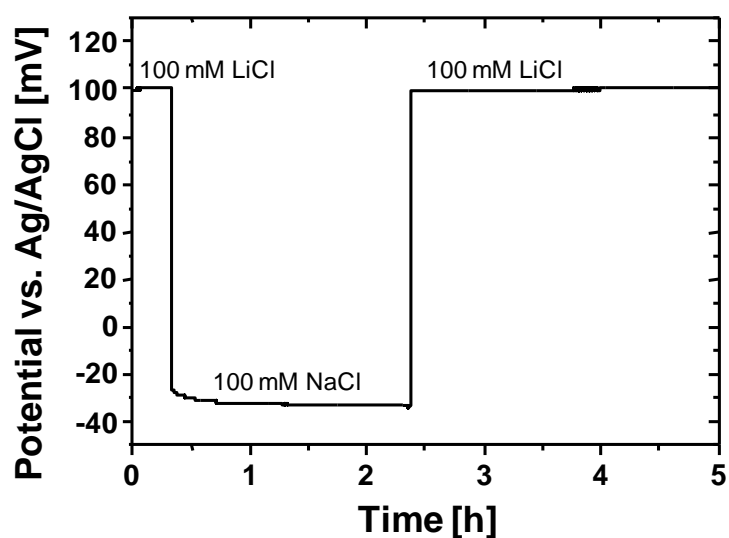


図 2.19 リチウム選択性固体電極での水層試験.



Potential vs Ag/AgCl [mV]

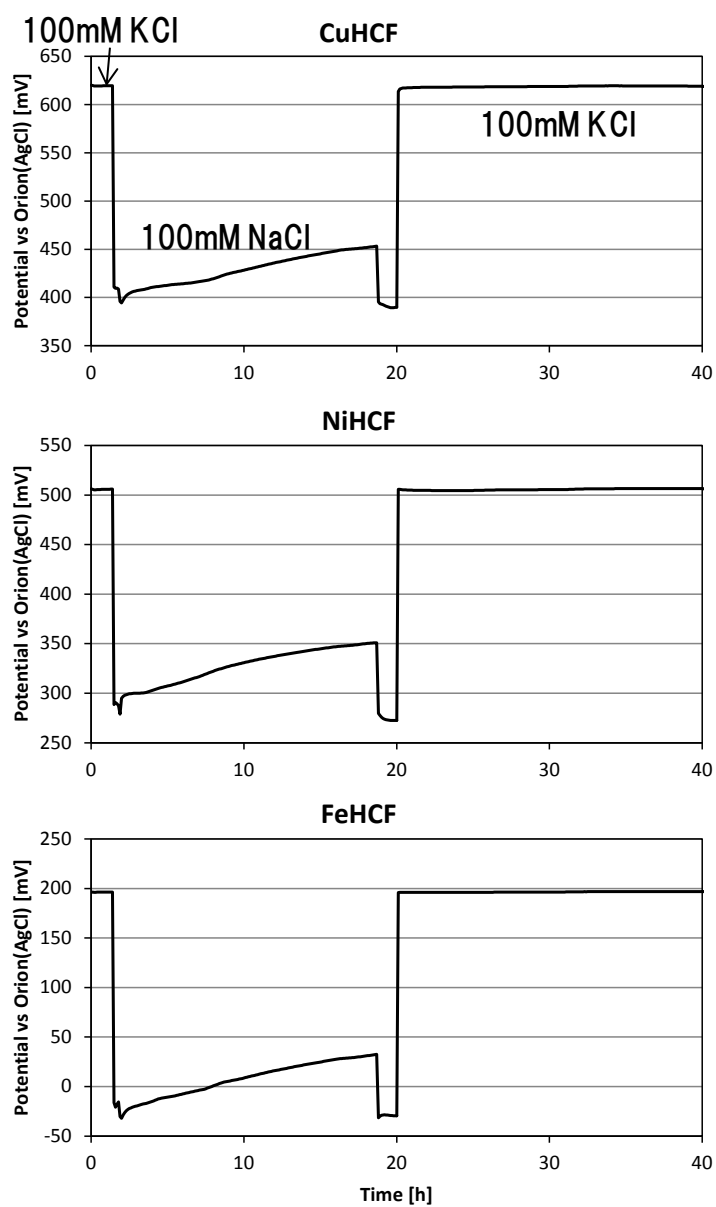


図 2.20 カリウム選択固体電極での水層試験.

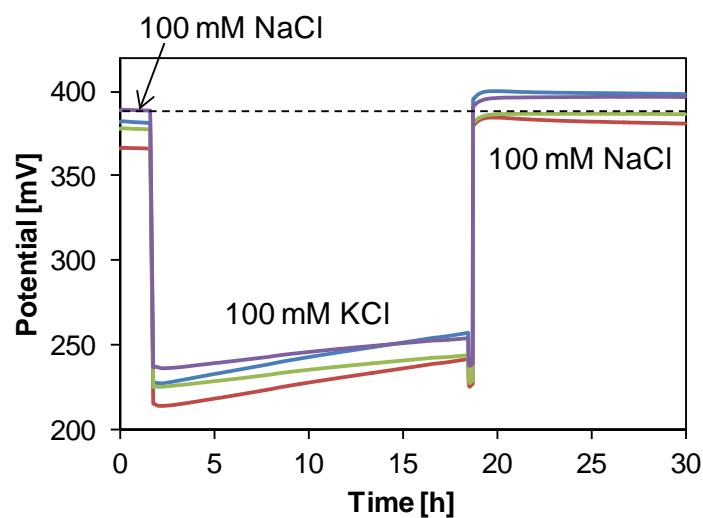


図 2.21 ナトリウム選択固体電極での水層試験。  
(各色は同様に作製した別の電極を表す)

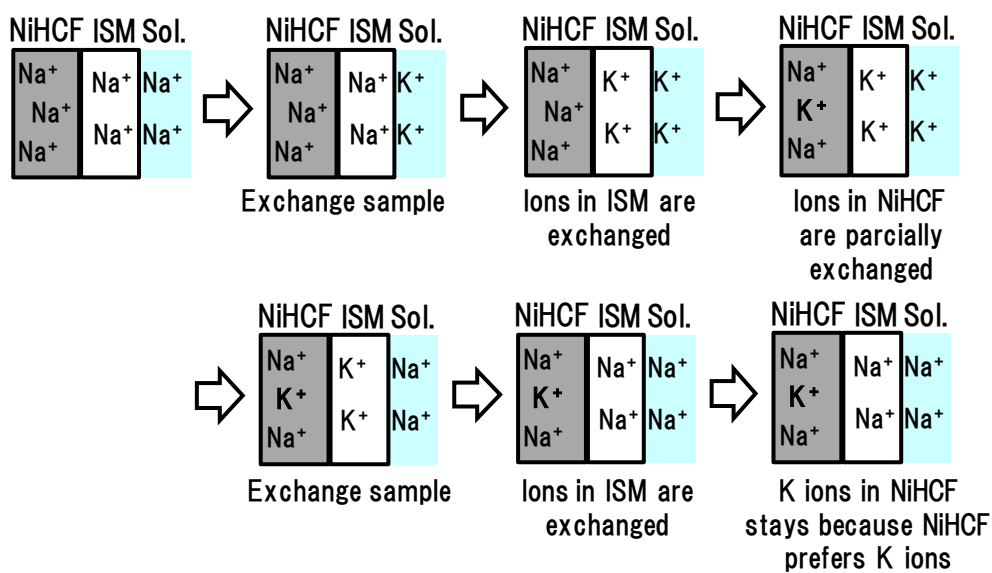


図 2.22 ナトリウム選択固体電極での電位上昇メカニズムの仮説モデル.

#### 2.4.2 電流制御分極試験

電流制御分極試験は、選択膜と内部電極の間でのイオン授受を評価する試験である。電位の安定性にはイオン授受がスムーズに行われることが求められるため、固体電極の電位安定性を評価する指標の1つである。

試験では、1～100nA の微小な電流を固体電極に印加し、その際の電位ドリフトを測定する (図 2.23)。理想的な固体電極では、電極抵抗の分だけ電流の向きによって電位は変化するものの、電流が一定であれば電位は一定のままである。一方、選択膜と内部電極の間でイオン授受がスムーズに行われていない電極では、電流が一定であっても電位がドリフトする。

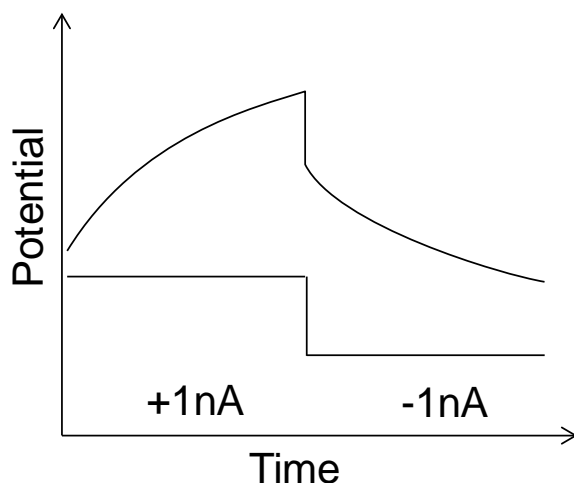


図 2.23 電流制御分極試験.

リチウム選択性固体電極について、電流制御分極試験を行った (図 2.24)。比較のため、イオン吸蔵物質を用いずグラファイトシートを内部電極として用いた固体電極と、内部液型イオン選択電極についても測定を行った。一見して分かるように、グラファイトシートを内部電極として用いた固体電極では大きな電位ドリフトが観測されたのに対し、内部液型と LFP 固体電極ではとても小さな電位ドリフトしか観測されなかった。電位ドリフトを表 2.8 にまとめた。内部液型と LFP 固体電極は同程度の電位ドリフトであり、これらに対しグラファイトシートを内部電極として用いた固体電極は 50 倍以上の電位ドリフトであった。この結果は、LFP が選択膜との間でのリチウムイオン授受に寄与していることを如実に示している。加えて LFP の電流制御分極試験を行ったところ、分極と電位ドリフトはほとんど観測されなかった。これは LFP が電流を流す電池材料として開発されたことを考えると当然の結果である。

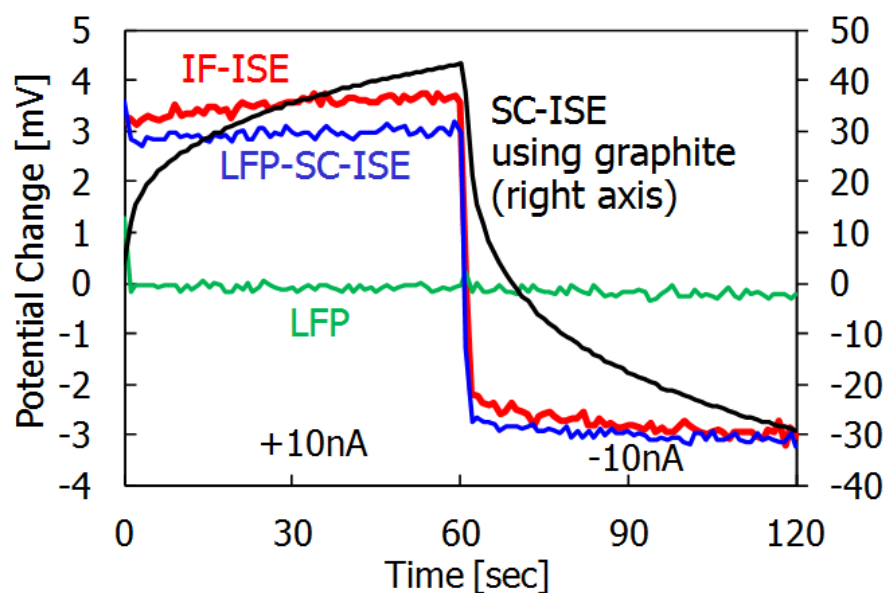


図 2.24 電流制御分極試験 (リチウム選択性固体電極).

表 2.8 電流制御分極試験での電位ドリフト (リチウム選択性固体電極).

	Drift [ $-\mu\text{V/s}$ ]		
	-1nA	-10nA	-100nA
IF-ISE	1.3	8.0	67
LFP	0.6	2.1	2.6
LFP-SC-ISE	1.7	4.9	51
Graphite-SC-ISE	76	517	4690

カリウム、ナトリウム、カルシウム選択性固体電極についても、電流制御分極試験を行った (図 2.25, 表 2.9)。内部液型と比較して電位ドリフトは2~8倍であり、グラファイトシートを内部電極として用いた固体電極の結果からすれば、いずれの電極もイオン吸蔵物質が内部電極と選択膜との間でのイオン授受に寄与していることが分かる。

以上の結果から、イオン吸蔵物質は内部電極と選択膜との間でのイオン授受を促進していることが確認された。

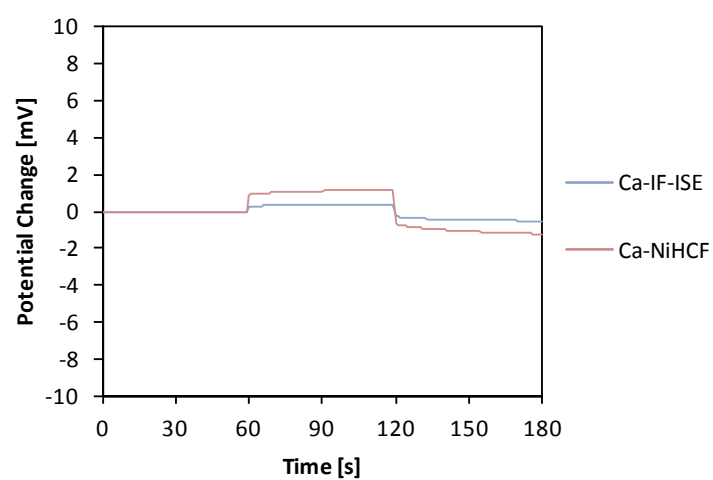
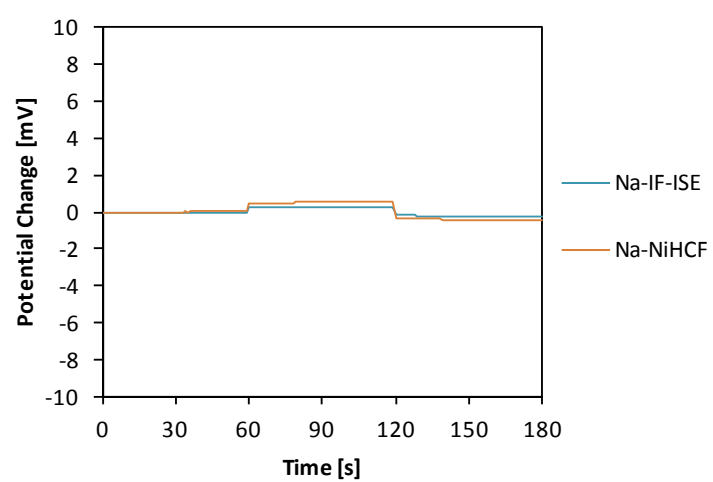
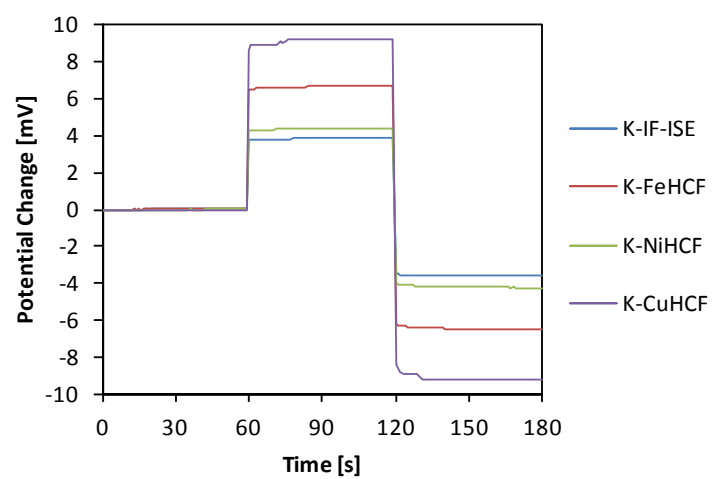


図 2.25 電流制御分極試験 (カリウム, ナトリウム, カルシウム選択性固体電極).

表 2.9 電流制御分極試験での電位ドリフト。  
(カリウム, ナトリウム, カルシウム選択性固体電極)

		Drift [ $\mu$ V/s]	
		1nA	10nA
K-ISEs	IF-ISE	2.38	7.54
	K-FeHCF (SC-ISE)	2.56	23.18
	K-NiHCF (SC-ISE)	2.58	14.79
	K-CuHCF (SC-ISE)	5.58	54.22
Na-ISEs	IF-ISE	1.03	17.76
	Na-NiHCF (SC-ISE)	3.82	45.01
Ca-ISEs	IF-ISE	0.61	5.93
	Ca-NiHCF (SC-ISE)	1.45	12.06

## 2.5 まとめと今後の展望

イオン選択電極は複数種のイオンが共存した溶液において特定のイオンを選択的に測定することのできる電極であり、電極面積に依存しない電気化学測定法である電位差計測法を用いて測定を行う。固体接触型イオン選択電極(固体電極)は従来必要であったイオン選択電極の内部液が不要であるため、ポータブル装置やウェアラブルセンサに適用可能な微細化および集積化を実現可能な一方、電位の発生機構が不明確であるため電位の安定性と再現性を両立することが困難という課題があった。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、以下のことを明らかにした。

- 1) イオン吸蔵物質を内部電極として用いた固体電極の電位について考察し、絶対電位はイオン吸蔵物質に由来し、電位応答はイオン選択膜に由来する理論式が導き出された。
- 2) 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し、鉄リン酸リチウムに由来する絶対電位と、リチウムイオン選択膜に由来する電位応答と選択性を有することを実証した。
- 3) 上記固体電極は鉄リン酸リチウムの材料特性である高い電位再現性と電位安定性により、これまでで最も高い電位再現性(標準偏差 1.4mV)と電位安定性( $-1.1 \mu$  V/h)を併せ持つことを実証した。
- 4) 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て固体電極を試作し、イオン吸蔵物質由来の絶対電位とイオン選択膜由来の電位応答と選択性を有することを実証した。

- 5) イオン吸蔵物質の電位とそれを固体電極に適用した場合の電位は高い相関 ( $R^2=0.93$ ) で一致し、イオン吸蔵物質を内部電極に用いた固体電極がイオン吸蔵物質由来の絶対電位を示すことを証明した。

近年、イオン選択電極を搭載したウェアラブルセンサが報告されるなど、イオン選択電極の応用範囲は広がりを見せている。本章の結果は、小型かつ高精度なイオン選択電極の実現につながるものであり、従来からのアプリケーションであるイオン濃度測定装置だけでなく、ウェアラブルセンサなどの新規アプリケーションに向けても意義のある研究である。

### 3 章 酸化還元電位計測方式の酵素センサ

#### 3.1 背景と目的

酵素センサは、酵素の選択的な触媒能力を活用した電気化学センサである。最も普及している酵素センサであるグルコースセンサの構成を図 3.1 に示す。電極上に酵素であるグルコース酸化酵素とメディエータと言われる酸化還元物質が存在する。ここに血液が滴下されると、血液中のグルコースと酸化型の酸化還元物質が酵素の触媒能力により選択的に反応し、その結果還元型の酸化還元物質が生成される。この時、電極にメディエータを酸化するのに十分な高電位が印加されていると、還元型のメディエータは酸化され、それに応じて電極に電流が発生する。すなわち、酵素反応に応じた電流が電極に発生する。グルコース酸化酵素によって触媒されるグルコースとメディエータの反応速度は、メディエータ濃度が一定の条件ではグルコース濃度に比例する。従って、グルコース濃度に応じた電流が電極に発生することになる。従来の酵素センサは以上の原理に従って電流値として血中のグルコース濃度を測定する電流計測法の電気化学センサであった。

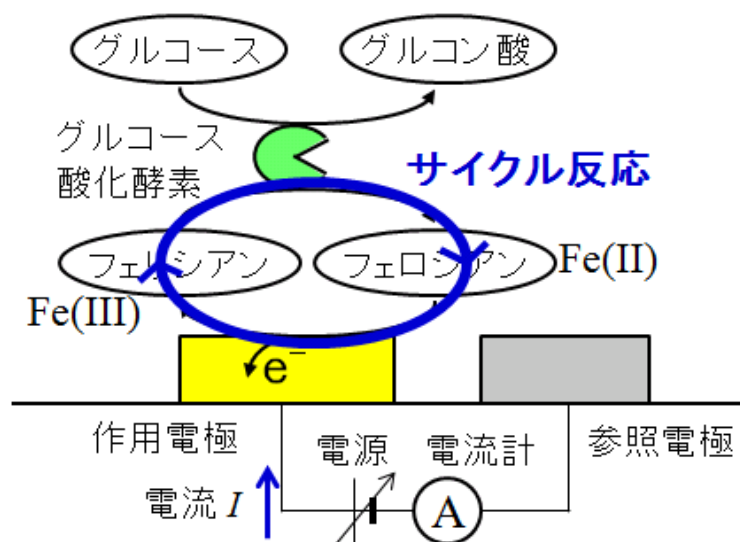


図 3.1 グルコースセンサの原理模式図。

電流計測法は 1 章で説明したように、原理的に信号値が電極面積および電極表面状態の影響を受け、誤差要因となる。Abbott のグルコースセンサは、電流値を積算し血液中のグルコース総量を測定する電荷計測法 (Coulombmetry) によりこの課題の解決を図った [18, 19]。一方、前章で扱ったイオンセンサに用いられている電位差計測法であれば、基本原理式であるネルンストの式が電極面積を含まないため、電極面積の変動の影響を受けない。



電位差計測方式の酵素センサとして、酵素反応による pH 変化を利用したセンサが実用化されている[47-49]。尿素センサの場合、ISFET(Ion sensitive field effect transistor)という電位差計測法を基本原理とする pH センサに、ウレアーゼという尿素的加水分解を触媒する酵素が塗布された構造をしている(図 3. 2)。サンプル中の尿素はウレアーゼによってアンモニアと二酸化炭素に分解され、生成されたアンモニアによって pH がアルカリ側に変化する。この pH 変化を ISFET により電位変化として検出する。

この尿素センサは電位差計測法を用いているため、電極面積の変動の影響を受けない。一方、pH 変化は緩衝液の働きにより抑制されるという課題があった。すなわち、緩衝液の有する pH を一定に保つ働きにより、酵素反応によって生成されるアンモニアよりも観測される pH 変化は小さくなっていた。緩衝液の緩衝能を抑制することで一定の効果はあるものの、酵素の働きを考慮すると緩衝能を大きくして pH を安定させる方がよく、トレードオフが生じていた。

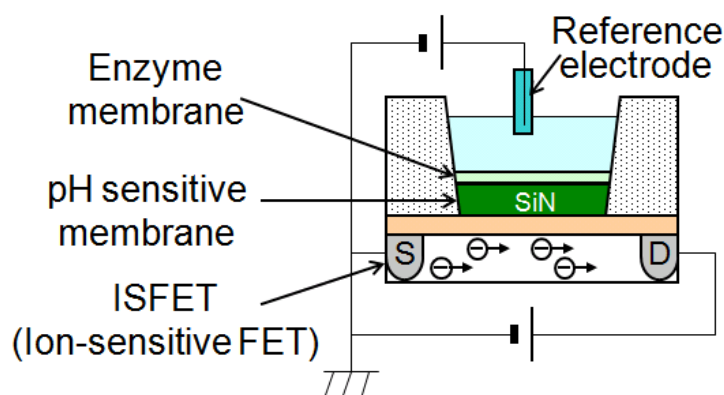


図 3.2 ISFET 式酵素センサの模式図.

pH に替えて酸化還元電位を計測する電位差計測法の酵素センサであれば、pH 変化の検出で課題であった緩衝液による変化の抑制を解決することができると考えた。そこで、本研究では酸化還元電位方式の酵素センサの原理実証を行うことを目的に、コレステロール測定用センサの開発を行った。本センサでは、酸化還元反応を触媒する酵素により生じる酸化還元状態の変化を酸化還元電位の変化として検出する。本章では、まず FET センサの原理とそれを用いた酵素センサについて述べる。次いで、感応部を酸化還元物質で修飾した金電極とした FET センサを用いた酸化還元電位の計測法について述べる。最後に、FET センサを用いた酸化還元電位差計測法を用いたコレステロールセンサの評価結果を述べる。その際、ネルンストの式から得られるスロープの 90% である 54mV/桁以上のスロープ感度が得られることを目標とした。さらに、酸化還元物質修飾の金電極を有する FET センサの別の応用として、農薬センサを構築した。これにより、酵素反応を工夫することで、コレス

テロール酸化酵素のような酸化還元酵素だけでなく，コリンエステラーゼのような加水分解酵素を用いた酵素センサも構築可能であることを示した。

## 3.2 電界効果トランジスタセンサ

### 3.2.1 イオン感応電界効果トランジスタ

イオン感応電界効果トランジスタ (Ion Sensitive Field Effect Transistor; ISFET) は Bergveld らによって発明されたイオン濃度に応答する半導体センサである (図 3.3) [50]。FET はゲート電圧に応じてソースドレイン間のチャネルの状態が変化する。チャネルがソースドレイン間で通じていてソースとドレインのどちらからもキャリアが流れこめる状態を線形状態という。線形状態では，ドレイン電流  $I_D$  はゲートーソース間電圧  $V_{GS}$ ，ゲートードレイン間電圧  $V_{GD}$ ，閾電圧  $V_t$ ，ソースードレイン間電圧  $V_{DS}$ ，トランスコンダクタンス係数  $k$  により次式で表される。

$$\begin{aligned} I_D &= \frac{k}{2}(V_{GS} - V_t)^2 - \frac{k}{2}(V_{GD} - V_t)^2 \\ &= \frac{k}{2}(V_{GS} - V_t)^2 - \frac{k}{2}(V_{GS} - V_{DS} - V_t)^2 \\ &= k \left[ (V_{GS} - V_t)V_{DS} - \frac{1}{2}V_{DS}^2 \right] \end{aligned} \quad \text{式 3.1}$$

ここで，トランスコンダクタンス係数は，チャネル幅  $W$ ，チャネル長  $L$ ，移動度  $\mu_c$ ，ゲート絶縁膜の単位面積当たりの静電容量  $C_G$  により，次式で表される。

$$k = \frac{W}{L} \mu_c C_G \quad \text{式 3.2}$$

一方， $V_{DS}$  が大きくなるとチャネルのドレイン端に空乏層が形成される。この状態を飽和状態と言い，空乏層によりキャリアはソース側からのみ流れることができるようになるので，ドレイン電流は，

$$I_D = \frac{k}{2}(V_{GS} - V_t)^2 \quad \text{式 3.3}$$

となる。これらの式から導かれる  $I_D$ - $V_G$  曲線 (IV 曲線) を図 3.4 に示す。 $V_t=0$  の場合，0V 以下ではドレイン電流は流れず，0V 付近からゲート電圧の二乗に比例してドレイン電流が流

れ出す。これは、チャネルが飽和状態となっているためである。さらにゲート電圧が大きくなるとゲート電圧の増加に比例してドレイン電流が増加する線形状態に遷移する。

図 3.3 の配置で水溶液を介してゲート電圧を印加すると、FET のゲートにはゲート絶縁膜と水溶液の界面電位が加わった電圧が印加される。ゲート絶縁膜の水溶液と接している表面には-Si-OH からなる OH 基があり、これが



の平衡反応を有する。そのため、界面電位はネルンストの式に従い、58mV/pH の変化を示す。図 3.4 に示すように、酸性では IV 曲線は負電位側に、アルカリ性では正電位側にシフトする。IV 特性からこの変化を検出することで、ISFET を用いて pH などのイオン濃度を測定することができる。

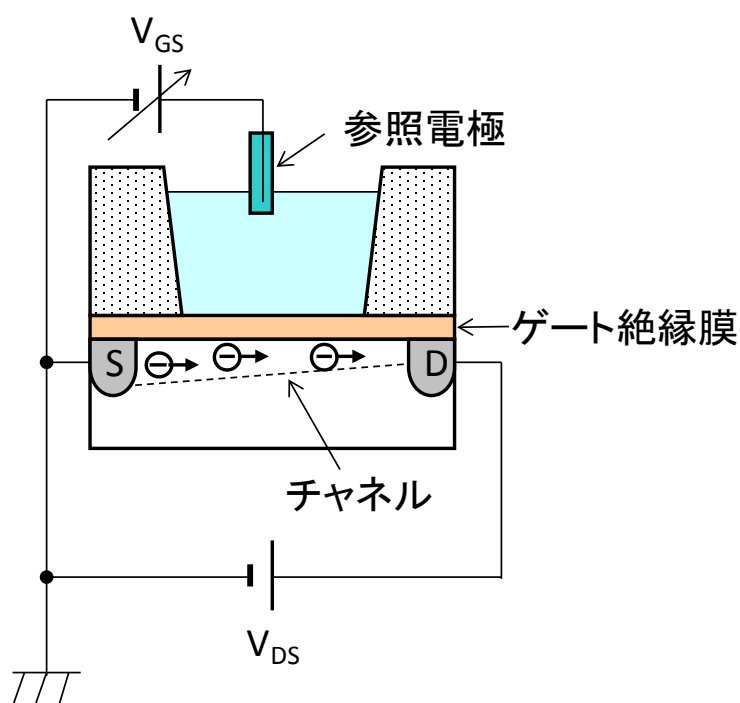


図 3.3 イオン感応電界効果トランジスタ (ISFET) の模式図.

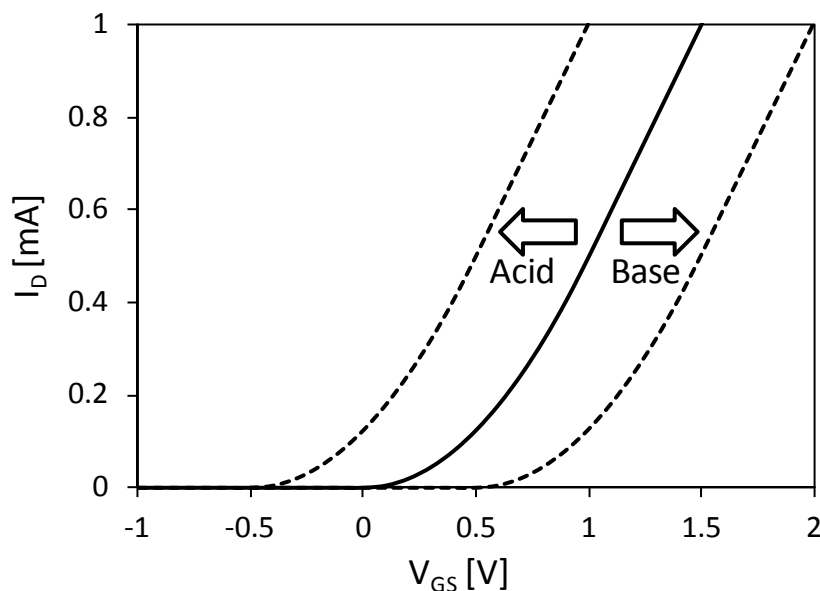


図 3.4 ISFET の  $I_D$ - $V_{GS}$  曲線.

### 3.2.2 延長ゲート型電界効果トランジスタ

本研究では酸化還元電位を測定するため、感応部を金電極としたセンサを設計製作した。トランジスタのゲートから金電極までを導電性の配線で延長して接続しているため、延長ゲート型電界効果トランジスタと言う。以下 FET センサという場合は、延長ゲート型電界効果トランジスタのことを意味する。FET センサを 2 個搭載したセンサチップの写真を図 3.5 に示す。チップ下部に FET があり、ゲート部がチップ上部にある金電極と導電性のワイヤーで接続されている。

感応部に金電極を用いるため、金電極での電気化学反応に留意した。電気化学測定では電位窓と言われる電圧の範囲が存在する。この範囲を超えると、低電位側では水素発生が、高電位側では酸素発生が起こる。電位窓は電極の種類や pH に因るものの、通常 -1~1V 程度である。そこで、今回は -0.5~0.5V の範囲で測定が行えるように、As ドーズ量を調整し、閾電圧 ( $V_t$ ) を -0.5V 付近に設定した。FET の仕様を以下に記す。

n チャネルデプレション型

ゲート絶縁膜:  $\text{SiO}_2$ , 17.5nm

サイズ:  $W/L = 2400 \mu\text{m} / 5 \mu\text{m}$

閾電圧調整用 As ドーズ量:  $8.0 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ , 打ち込みエネルギー 120 keV

作製した FET センサの IV 特性を図 3.7 に示す。設計どおり、 $-0.5\text{ V}$  付近でドレイン電流が立ち上がる特性を示した。

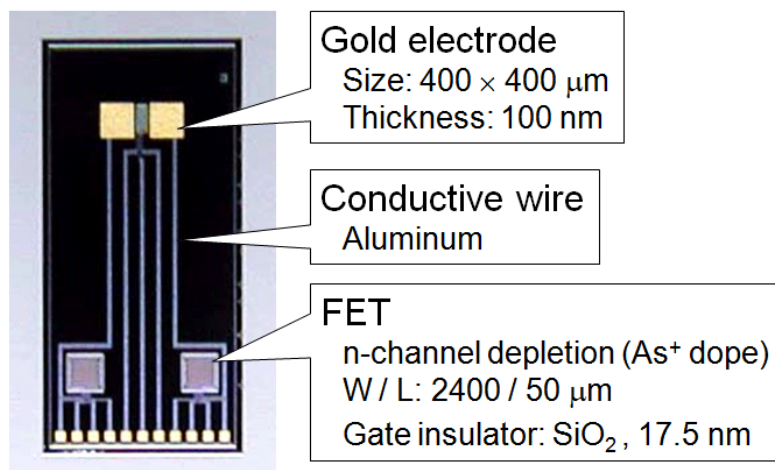


図 3.5 延長ゲート型 FET センサ.

溶液を用いた測定は、図 3.6 に示す測定配置の模式図の通り行った。金電極を試料液に接触させた状態で、銀塩化銀電極からゲート電圧を印加した。500 mM の硫酸ナトリウム水溶液を用いた測定で得られた IV 特性を図 3.7 にあわせて示す。ゲート電圧を金電極に直接印加した場合と比べて、IV 曲線が  $400\text{ mV}$  程低電位側にシフトした。すなわち、金電極の電位が銀塩化銀電極に対して  $400\text{ mV}$  程度であったことを意味している。このように、FET センサを用いて感応部である金電極の電位を測定することができる。

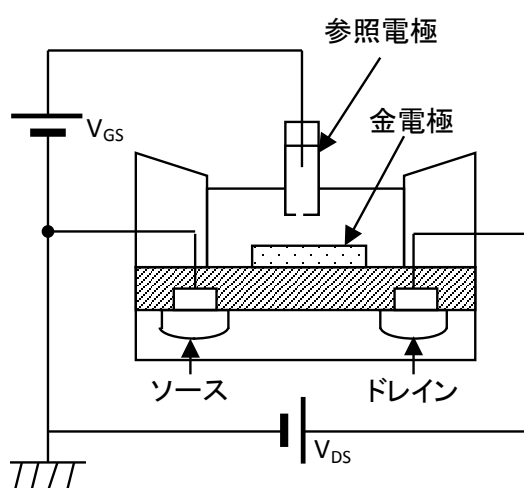


図 3.6 FET センサの測定配置.

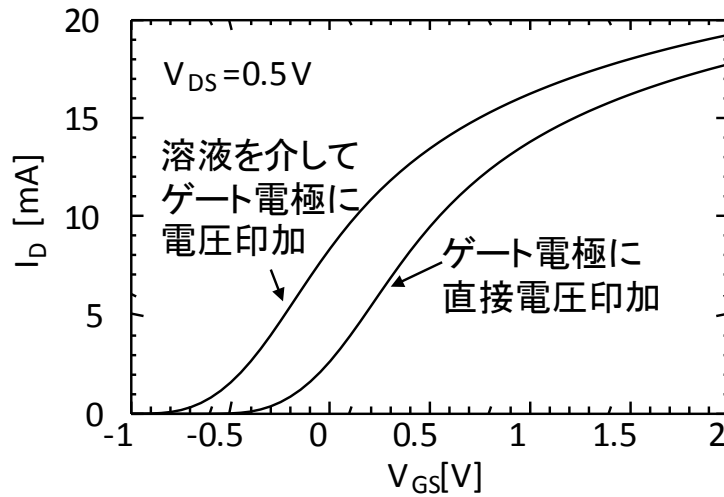
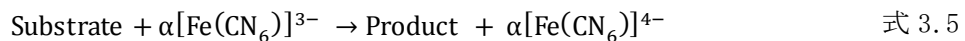


図 3.7 FET センサの IV 特性.

### 3.3 酸化還元電位計測方式酵素センサ

#### 3.3.1 酸化還元電位計測方式酵素センサの原理

図 3.8 に FET センサを用いた酸化還元電位計測方式酵素センサの構成を示す。グルコースやコレステロールなどの測定対象物質は酵素の働きによって酸化還元物質であるヘキサシアノ鉄と反応する。



ここで  $\alpha$  は反応効率を示す。この反応により、ヘキサシアノ鉄は酸化状態 ( $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-}$ ) から還元状態 ( $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-}$ ) に変化する。その変化は金電極表面にアルカンチオールによって固定化された別の酸化還元物質であるフェロセンを媒介した電荷移動により、金電極に伝えられる。これらの反応の結果、測定対象物質の濃度に応じた電位変化が金電極に生じる。

アルカンチオール単分子膜で電極上に固定化された酸化還元物質 (今回の系ではフェロセン) から電極への電荷移動は、酸化還元物質から電極へのトンネル現象で生じると言われている [51]。これは、アルカンチオール単分子膜は絶縁性であること、酸化還元物質から電極への電荷移動速度が単分子膜の厚みに対して指数関数的に減少することが根拠である。より詳細にはトンネル現象では十分に説明できないとの指摘があり [52]、電荷移動メカニズムには議論の余地がある。いずれにしても、アルカンチオール単分子膜で電極上に固定化されたフェロセンから電極への電荷移動は実験的に観測されている [53]。

金電極の電位はヘキサシアノ鉄の酸化還元電位と平衡になるため、酸化状態と還元状態のヘキサシアノ鉄のそれぞれの濃度を  $[Ox]$ ,  $[Red]$  とすると、金電極の電位はネルンストの式に従い、

$$E = E^0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad \text{式 3.6}$$

となる。上記の反応式により、酸化状態と還元状態のヘキサシアノ鉄の濃度は、初期の状態は全て酸化状態であるとし濃度を  $[Ox]^0$  とすると、それぞれ、

$$[Ox] = [Ox]^0 - \alpha c_s \quad \text{式 3.7}$$

$$[Red] = \alpha c_s \quad \text{式 3.8}$$

となる。これを式 3.6 に代入すると、

$$E = E^0 - \frac{RT}{F} \ln c_s + \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{[Ox]^0}{\alpha} - c_s \right) \quad \text{式 3.9}$$

となる。ヘキサシアノ鉄の濃度よりも測定対象物質の濃度が十分に少ない条件

$$c_s \ll [Ox]^0 \quad \text{式 3.10}$$

では、上式は、

$$E = C - \frac{RT}{F} \ln c_s \quad \text{式 3.11}$$

となる。ここで  $C$  は定数である。このように、理論的には金電極の電位は測定対象物質濃度に対して 59.2mV/桁 (25°C) のネルンスト応答をする。

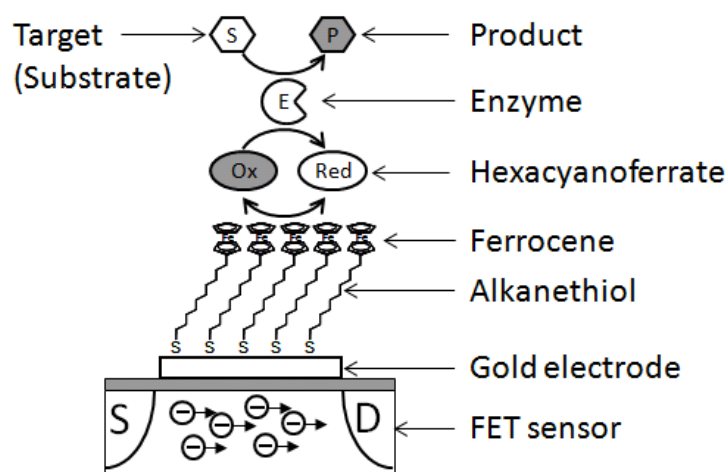


図 3.8 FET センサを用いた酸化還元電位計測方式酵素センサの構成.

### 3.3.2 修飾金電極を用いた酸化還元電位計測

図 3.8 に示したように、FET センサの金電極をアルカンチオールを用いて酸化還元物質であるフェロセンで修飾した。原理的にはフェロセン修飾を行わなくても清浄な金表面であればヘキサシアノ鉄の酸化還元電位を測定することができる。実際には金表面は物質が吸着しやすく、例えば酸化還元物質を有さないアルカンチオールで被覆された金電極はヘキサシアノ鉄に対する電気化学反応が抑制されることが知られている。そこで、あらかじめ金電極をフェロセンで修飾しておくことで、吸着による電気化学反応性の変化を抑制することにした。

フェロセン修飾された金電極によりヘキサシアノ鉄の酸化還元電位を測定できることを検証した。図 3.9 に示したのが、フェロセン修飾金電極を有する FET センサで濃度比の異なるヘキサシアノ鉄水溶液の電位を測定した結果である。 $\log [\text{Red}]/[\text{Ox}]$  を横軸として表しており、 $10^{-3}$  から  $10^2$  の範囲で線形な応答を示した。傾きは  $-59.3\text{mV/桁}$  であり、式から導かれる  $-59.2\text{mV/桁}$  ( $25^\circ\text{C}$ ) とほぼ一致する結果であった。この結果は、フェロセン修飾された金電極によりヘキサシアノ鉄の濃度比をネルンストの式に従って電位計測可能であることを示している。



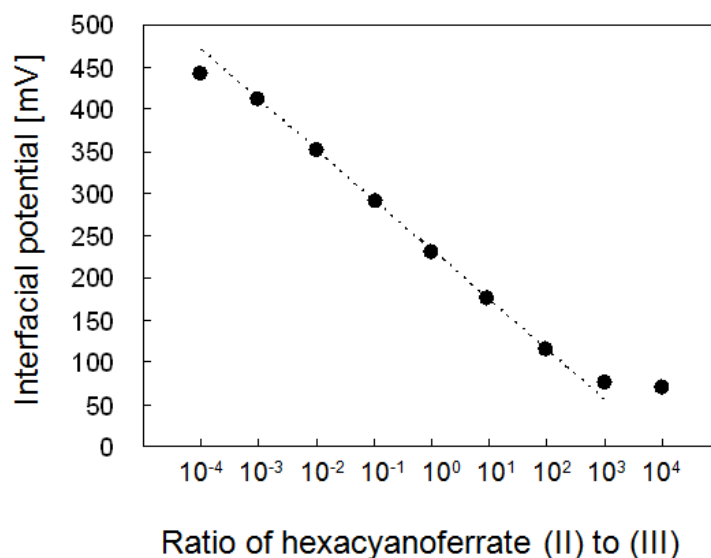


図 3.9 フェロセン修飾金電極を有する FET センサでの酸化還元電位計測.

ISFET 型酵素センサが酵素反応による pH 変化を測定したのに対し，酸化還元電位計測方式酵素センサは酵素反応による酸化還元電位の変化を測定する。そのため，酸化還元電位計測方式酵素センサに用いるセンサは pH 応答が無いことが望ましい。そこで，フェロセン修飾金電極を有する FET センサと ISFET で pH 応答性を比較した。図 3.10 に測定結果を示す。pH を 4~10 まで変化させ，pH6.8 での電位を 0mV としてプロットした。また，フェロセン修飾金電極を有する FET センサではいずれの測定においても酸化状態と還元状態の比を 1:1 としたヘキサシアノ鉄を含んだ溶液を用いた。ISFET が -58mV/pH の良好なネルンスト応答を示したのに対し，フェロセン修飾金電極を有する FET センサでは pH に対する応答がほとんど見られなかった。この結果から，本研究の酸化還元電位計測方式酵素センサにおいては，pH の大小や緩衝能の高低を気にすることなく緩衝液を選択することができる。酵素によって至適 pH などの推奨される溶液条件は様々であるため，緩衝液が自由に選択できることは酵素センサを構築する上で強みとなる。

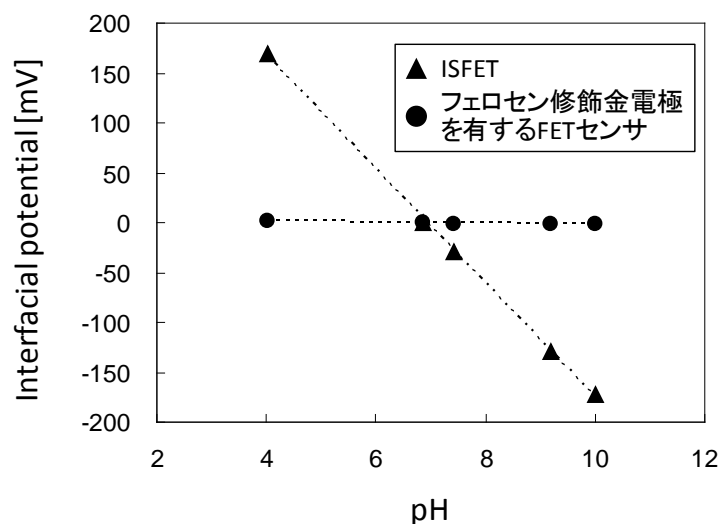
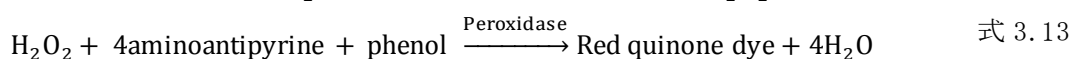


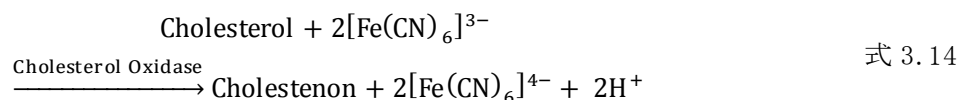
図 3.10 ISFET とフェロセン修飾金電極を有する FET センサそれぞれの pH 応答性.

### 3.3.3 コレステロール測定用の酵素反応系

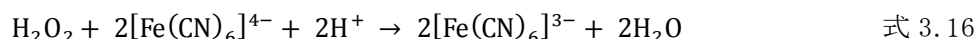
コレステロールがヘキサシアノ鉄の酸化還元状態の変化に変換されるような酵素反応系を構築し、フェロセン修飾金電極を有する FET センサと組み合わせることで、コレステロール測定用の酸化還元電位差計測方式の酵素センサとすることができる。一方、吸光度計測によるコレステロール測定には、コレステロール酸化酵素を用いた下記反応が用いられている。



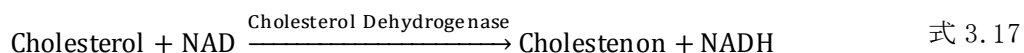
当初はこの反応を基礎として、コレステロールがヘキサシアノ鉄の酸化還元状態の変化に変換されるような酵素反応の構築を試みた。しかしながら、コレステロールと酸化状態のヘキサシアノ鉄の反応である



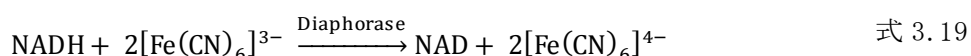
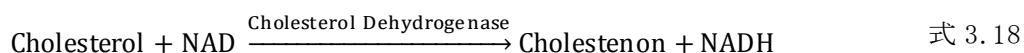
と、コレステロールと酸素の反応で生成した過酸化水素が還元状態のヘキサシアノ鉄との反応である



が競合してしまい、構築に失敗した。そこで、酸素が反応に介在しない別のコレステロール測定用の酵素であるコレステロール脱水素酵素を用いた反応である、



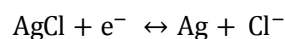
に着目して、反応系の構築を試みた。NADH と酸化型ヘキサシアノ鉄の反応を触媒するジアホラーゼ酵素を用いることで、



の反応系を構築した。コレステロール 1 分子により、2 分子の酸化型ヘキサシアノ鉄が還元型ヘキサシアノ鉄へと変換される。なお、この反応系において NAD は再利用されるため、ヘキサシアノ鉄が 60 mmol/L と高濃度であるのに対し NAD は 1 mmol/L の少量で良い。酵素は電極に固定するのではなく溶液に添加した。図 3.1 に示したような酵素を電極近傍に固定化して行う電流計測法では、酵素反応生成物が電極近傍から沖合に向かって拡散していくため、拡散速度を考慮する必要がある。一方、溶液に酵素を添加する場合、酵素反応生成物は溶液中で均一に存在するため、拡散速度を考慮する必要が無い。1 章で述べたように、電位差計測法を用いる目的の一つは拡散速度の影響を受けないようにすることであり、溶液に酵素を添加することはこの目的に合致する。

### 3.3.4 参照電極搭載 FET センサ

電気化学センサを用いた測定の利点は数  $\mu\text{L}$  と微量の試料液および測定液での測定である。本研究でもその利点を生かすため、試料液 2.5  $\mu\text{L}$  と試薬液 8.0  $\mu\text{L}$  をあわせた 10.5  $\mu\text{L}$  での測定を試みた。その際、通常の参照電極は嵩高く微量化の阻害要因となる。そこで、本研究では銀塩化銀参照電極を搭載した FET センサを用いることでこれを解決した。図 3.11 にセンサの模式図を示す。FET センサの基本設計は同じまま、銀塩化銀参照電極を搭載した。実際は、半導体プロセスで作製した金電極に銀塩化銀ペーストを塗布して銀塩化銀参照電極とした。これを用いる場合の注意点は、試料液に一定量の塩素が含まれるようにすることである。これは、銀塩化銀が、



式 3.20

の平衡反応により一定の電位を発生しているためである。

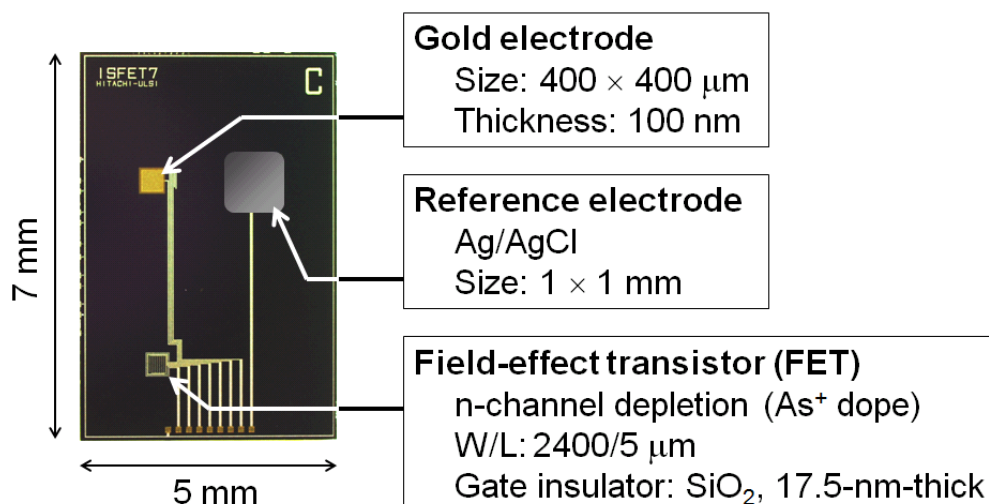


図 3.11 銀塩化銀参照電極を搭載した FET センサ.

### 3.3.5 コレステロール測定用酵素センサ

参照電極搭載 FET センサとコレステロール測定用酵素反応系を組み合わせ、酸化還元電位計測方式のコレステロール測定用酵素センサとした。試薬 8.0 μL (実験条件の章に詳細な組成を記載) とコレステロール水溶液 2.5 μL を混合し、FET センサ上に滴下し、反応が終了するのに十分な時間である 10 分後に電位を計測した。図 3.12 に横軸をコレステロール濃度の対数、縦軸を電位としてプロットした。同一のセンサチップを用いた測定において、コレステロール濃度基準値である 120~220 mg/dL を含む 33~233 mg/dL の範囲で良好な直線関係を得た。直線の傾きは 57 mV/桁であり、ネルンストの式から導かれる理論値の 97% であった。また、異なるセンサチップを用いて同一濃度 (33 mg/dL) の試料を測定したところ、再現性は 242.46 ± 1.8 mV (n=9) であり、濃度換算 33 ± 2.5 mg/dL と 7.6% のばらつきであった。実用化に向けてばらつきを低減する必要がある、今後の課題である。

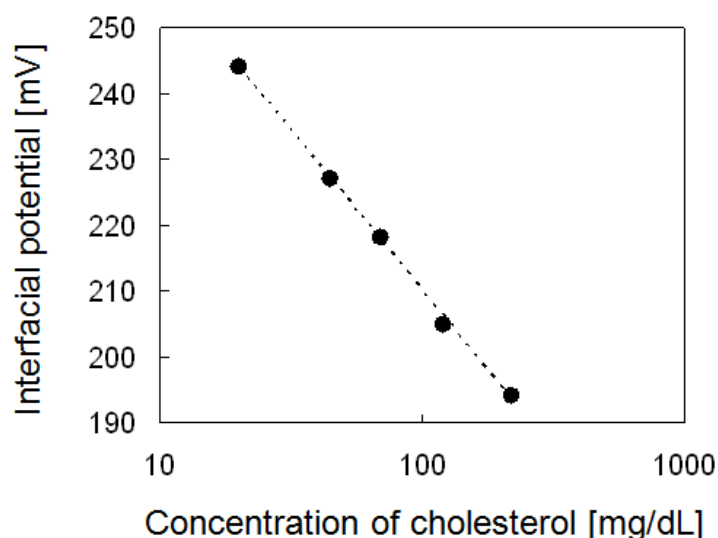


図 3.12 コレステロール測定結果.

ISFET 型酵素センサが 10 mV/桁や 16 mV/桁と理論値の 59.2 mV/桁 (25°C) から乖離した値となっているのに対し [47, 49], 本研究の酸化還元電位差計測方式の酵素センサでは 57 mV/桁とほぼ理論値の応答が得られた。これは, ISFET 型酵素センサでは pH の変化を検出しているため緩衝液の影響で応答が小さくなっているのに対し, 酸化還元電位計測方式では緩衝液の影響を受けないためである。理論値どおりの応答が得られたことは, 個体差を生み出す要因を低減できたことを意味する。すなわち, 電流計測方式で課題となっている電極面積ばらつきの影響を抑制できる電位差計測方式において, 新たな個体差要因となっていた応答の理論値との乖離を, 本研究で構築した酸化還元電位差計測方式で根本的に解決することができた。

### 3.4 農薬センサ

前節で構築した酸化還元電位差計測方式の酵素センサでは, 測定対象物質と酸化還元物質の反応を触媒する酵素である酸化還元酵素を適用することができる。生体物質の測定に用いられる酵素には, 酸化還元酵素以外に加水分解酵素があり, そのままでは本センサに適用することはできない。農薬の検出に用いられているアセチルコリンエステラーゼも加水分解酵素の一つである。本節では, 反応系を工夫してフェロセン修飾金電極を有する FET センサにより農薬検出を行うことで, 加水分解酵素の適用可能性を示す。

#### 3.4.1 従来の農薬簡易検査法およびその原理

試料中 (野菜や果物等) の残留農薬測定法を以下に説明する。試料中から有機溶媒を用いて残留農薬の抽出・濃縮を行う。液体試料の場合はそのまま, 固形試料の場合は粉碎・ホ

モジナイズ処理を行った後、アセトニトリルと混合・攪拌し、塩を加えて再び攪拌する。この処理により疎水成分のみがアセトニトリル中に移るため、試料中の農薬はアセトニトリル中に抽出される。その後、遠心分離を行い、上清のアセトニトリルを分取する。農薬の検出には農薬成分のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) に対する活性阻害能を利用する。AChE は神経伝達物質のアセチルコリンを加水分解する酵素であり、これには AChE の活性中心にあるアミノ酸のセリンが大きく寄与している。有機リン系およびカーバメート系の農薬はセリンに結合し AChE の活性を著しく低下させるため、この反応阻害の程度を測定することで試料中の農薬を検出することができる。

目視や吸光度測定で判定する農薬簡易測定キットの多くは、AChE の活性を測定用にアセチルコリンと類似の物質のアセチルチオコリンを基質として用いている。アセチルチオコリンが AChE により加水分解されるとチオコリンが生成される (図 3. 13)。チオコリンの有するチオール基 (SH 基) はチオール測定用発色剤の DTNB (ジチオニトロベンゼン) と反応し、450nm 付近に強い吸収を持つチオニトロベンゼンを生じる (図 3. 13) [54]。試料中に農薬が存在しなければ 450nm の吸収が見られるが、農薬により酵素活性が阻害を受けると 450nm の吸収は消失するため、450nm の吸収を観測することで農薬の有無を測定することができる [55]。

製品化はされていないが電気的な農薬の測定法も提唱されていて、この方法でも AChE の活性阻害を測定することで農薬を検出する [56-58]。いくつかの反応系が開発されているが、そのひとつに AChE にコリンオキシダーゼ (COD) を組み合わせたものがある。これらの酵素を組み合わせることで、AChE によるアセチルコリンの加水分解で生じたコリンが COD の働きで酸化され過酸化水素が生成される。生成された過酸化水素を過酸化水素電極で電流測定することで AChE の酵素活性を測定し、農薬の有無による変化を検出する [56, 57]。この他にも、基質としてアミノフェニルラクテートを用いる手法が考案されている [58]。電気的な測定法であるため吸光度測定を用いる場合に比べて装置を小さくできる可能性があるものの、酵素反応系が吸光度測定で用いられているものと異なるため、吸光度測定で培われた知見を応用することができない。

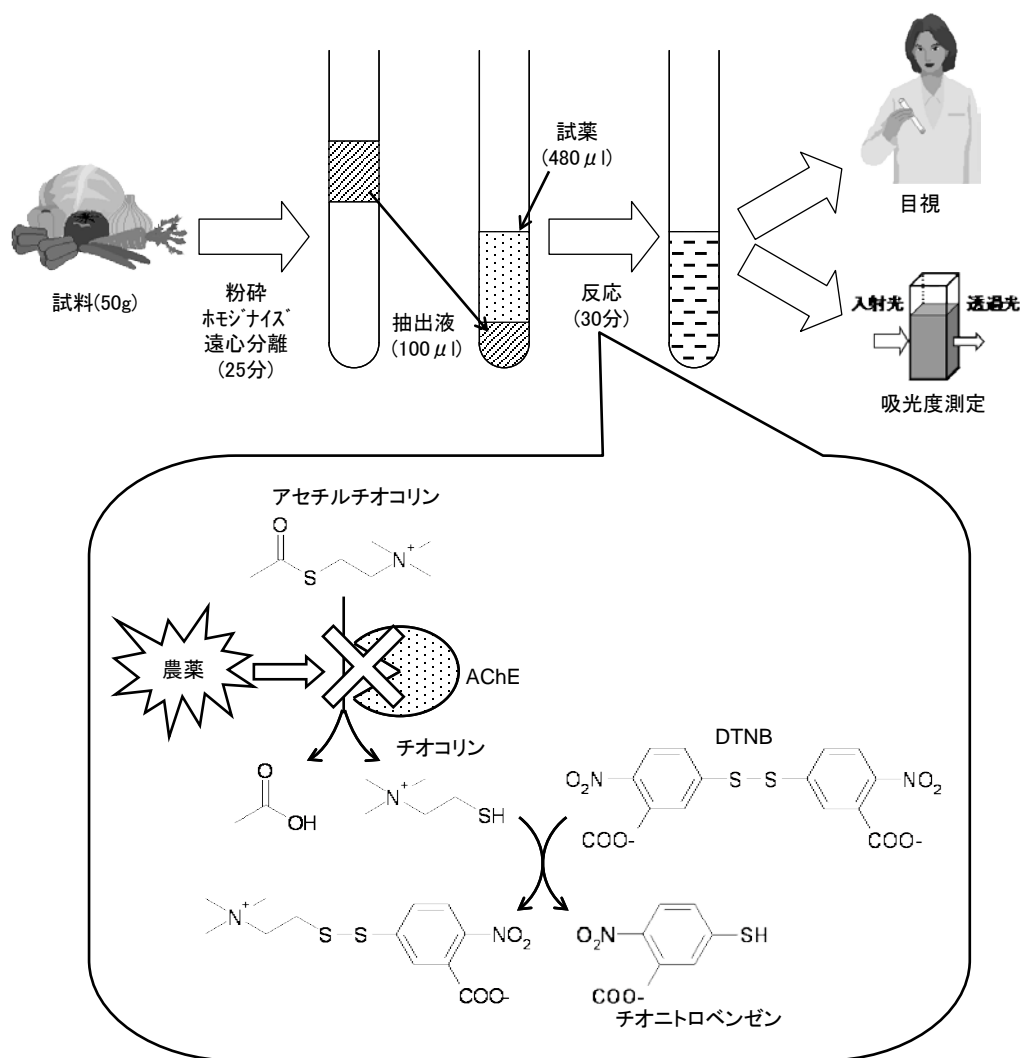


図 3.13 従来の農薬簡易検査法およびその原理.

### 3.4.2 FET センサによる簡易農薬検出に向けたチオール化合物測定

本研究では、従来の簡易農薬検査法の一部を踏襲し、AChE から生成されるチオコリンを FET センサで検出することを試みた。図 3.14 に反応系を示す。AChE によるアセチルチオコリンの加水分解で生成したチオコリンが、金電極上のフェロセンを還元する。この還元反応により、金電極の電位が低下する。農薬が存在する場合 AChE の反応は阻害されるため、金電極の電位の低下は生じない。従って、金電極の電位の低下の有無から農薬の有無を検出することができる。

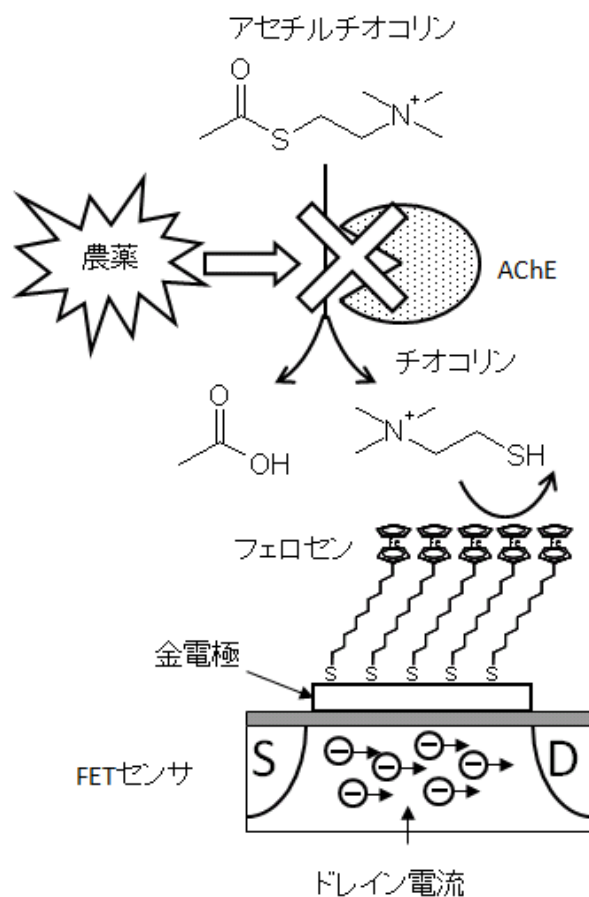


図 3.14 FET センサを用いた簡易農薬検出の原理模式図.

チオコリンなどのチオール化合物の FET センサでの測定手順を図 3.15 に示す。(A)初期状態ではフェロセンの酸化還元状態は不定であるため、(B)ヘキサシアノ鉄などの酸化還元物質により一定の酸化還元状態とする。この処理を行った FET センサをチオール化合物を含む試料液と接触させると、(C)チオール化合物濃度に応じて酸化状態のフェロセンが還元状態に変化する。最後に、(D)酸化還元物質を含まない溶液中でフェロセン修飾された金電極の電位を測定する。フェロセンの酸化還元状態はチオール化合物濃度に依存したものであるため、金電極の電位はチオール化合物濃度に応じたものになると考えられる。この測定手順で重要なのは、(C)から(D)の過程で金電極の電圧が維持されることである。証明することは困難であるものの、固定化されたフェロセンの酸化還元容量とゲート絶縁膜による金電極の基板側からの絶縁が電圧の維持の実現に寄与すると考えられる。また、一度測定に用いた FET センサも (B)の操作により何度も測定を行うことができる。これは、フェロセンが可逆的な酸化還元反応をするためである。また、本測定法を用いることで微量の試薬液でも測定を行うことができる。(D)の工程では参照電極を用いて電位計測を行うため、参照電極が浸るのに十分な 10ml の硫酸ナトリウム溶液を用いて測定を行う。その一方で、



(C)の工程では電位計測を行わないため、FET センサの金電極が浸るのに十分な  $10\mu\text{L}$  の試料液で操作を行うことができる。

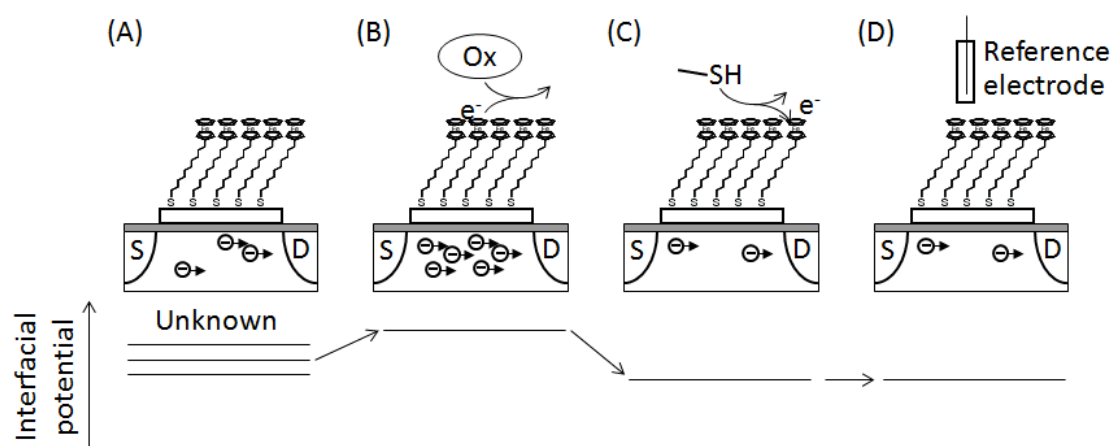


図 3.15 FET センサを用いたチオール化合物測定手順.

この測定手順に従って、チオール化合物である 6-ヒドロキシヘキサントチオール(6-HHT) の測定を行った。チオール化合物を含まない溶液を用いた場合を基準として電位変化を求めたところ、 $10^{-6}\text{mol/L}$  より高濃度で濃度に応じた電位変化が観測された。ネルンストの式から導かれる理論値である  $-59.2\text{mV/桁}$  の直線と比較したところ、 $10^{-5}\sim 10^{-2}\text{mol/L}$  においてよく一致した ( $R^2=0.9932$ )。また、測定下限はおおよそ  $10^{-6}\text{mol/L}$  であった。この結果から、フェロセン修飾金電極を有する FET センサを用いた図 3.15 の測定手順によりチオール化合物を  $10^{-6}\text{mol/L}$  まで検出できることが示された。

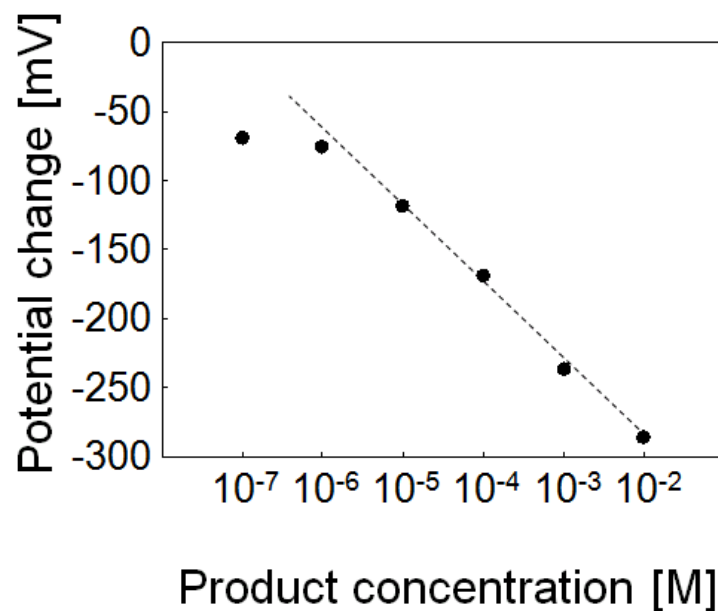


図 3.16 フェロセン修飾金電極を有する FET センサでのチオール化合物測定.

### 3.4.3 FET センサによる簡易農薬検査

農薬検査キットを用いて、吸光度を用いた従来法と本研究で考案した FET センサを用いた方法を比較した。吸光度を用いた場合は、チオニトロベンゼン色素のモル吸光係数から AChE により生成されたチオコリン濃度を求めた。FET センサを用いた場合は、図 3.16 を検量線として電位変化をチオコリン濃度に変換した。測定結果を図 3.17 に示す。

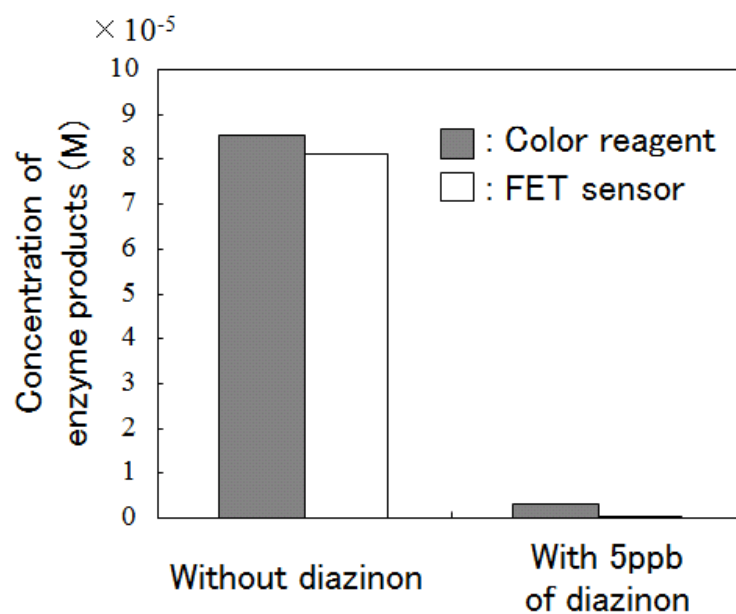


図 3.17 簡易農薬検出の比較.

吸光度測定では、農薬が無い場合は  $85 \mu\text{mol/L}$  のチオコリン濃度であったものが、農薬が AChE を阻害したことで  $5 \mu\text{mol/L}$  までチオコリン濃度が抑制された。一方、FET センサの測定では、 $80 \mu\text{mol/L}$  に相当する  $-174.3 \text{ mV}$  の電位変化が、測定下限の  $1 \mu\text{mol/L}$  に相当する  $-42.5 \text{ mV}$  の電位変化に抑制された。いずれの測定方法においても農薬の有無を同等に見分けられ、FET センサを用いた簡易農薬検査が実証された。なお、FET センサで測定されたチオコリン濃度のほうが吸光度測定よりも小さかったことは、FET センサのほうがバックグラウンド信号の小さい優れた測定方法であることを示唆しているものの、これについての詳細な検証は行っておらず、結論付けることはできない。

### 3.5 まとめと今後の展望

本章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。本研究では、以下のことを明らかにした。

- 1) pH に替えて酸化還元電位を測定するため、フェロセン修飾金電極を有する FET センサを試作した。酸化還元物質濃度比  $10^{-3}$  から  $10^2$  の 5 桁の範囲で、ネルンストの式から導かれる理論値 ( $59.2 \text{ mV/桁}$ ) 同等の応答を得た。その一方で、課題であった pH 応答性は有さないことが確認された。
- 2) コレステロールを酸化還元物質に変換する酵素反応系を構築し、上記 FET センサと組み合わせてコレステロールセンサを構築した。ヒトの基準値である  $120 \sim 220 \text{ mg/dL}$  を含む  $33 \sim 233 \text{ mg/dL}$  の範囲で、ネルンストの式から導かれる理論値の 97% の電位応答を得た。
- 3) 農薬で不活性化される酵素 (アセチルコリンエステラーゼ) の活性を、上記 FET センサで還元作用を有する酵素産物 (チオコリン) の酸化還元電位計測により測定する系を構築した。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るとともに、簡易農薬検査において従来の光計測と同等の判定能を有することを確認した。

本研究の今後の方向性として、アレイ型半導体センサへの適用が考えられる。構築した酵素センサの特徴の一つは、酵素反応が溶液中で生じ溶液全体で均一に反応が進むことである。これは、電位差計測方式という電流の発生しない測定法であるため、電極の存在が酵素反応に影響を及ぼさないことが理由である。阿南らはアレイ型半導体センサへの適用

として、グルコース測定に取り組んでいる[59]。ビーズにグルコース測定用の複数の酵素を固定し、注入された検体と酸化還元物質の反応をリアルタイムの電位変化として観察している。今後はその他の測定項目への展開が考えられる。

## 4 章 延長ゲート型 FET センサを用いた DNA センサ

### 4.1 背景と目的

DNA は生命の基本情報であり、解読により生命のメカニズムの理解が深まるばかりでなく、医療技術の向上につながることを期待されている。DNA シーケンサと言われるアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) からなる DNA の塩基配列を読み取る装置によりヒトゲノムが解読されたことをきっかけに、DNA 配列解読の重要性に対する理解はさらに深まった。より高速かつ安価に配列を読み取ることのできる DNA シーケンサが開発され、現在もその性能は向上を続けている。

DNA シーケンサの 1 つに、pH 感応性の半導体センサであるイオン感応電界効果トランジスタセンサ (ISFET) を用いたものがあり、サーモフィッシャー社より製品化されている [2, 61]。図 4.1 にその原理を示す。DNA が多数固定化されたビーズが、ISFET 上の微小のウェルに配置されている。DNA の A と T、G と C が相補的に結合 (ハイブリダイズ) する性質から、解読対象の DNA (ターゲット DNA) とそれよりも短い配列の DNA (プローブ DNA) が二本鎖を形成している。プローブ DNA の末端には DNA 伸長反応酵素 (DNA polymerase) が取り付いており、dATP、dTTP、dGTP、dCTP という ATGC の原料となる基質が存在すると、酵素の働きでターゲット DNA と相補的な塩基に対応する基質がプローブ DNA の末端に結合されプローブ DNA が伸長する。この伸長反応の結果、ピロリン酸 (PPi) とプロトン ( $H^+$ ) が放出され、ウェルの pH が酸性側にシフトする。ウェルの底部にある ISFET により pH の変化は電位変化として検出される。

ウェルに基質を dATP→dTTP→dGTP→dCTP の順に供給すると、ターゲット DNA と相補的な基質の場合は伸長反応が生じ、そうでない場合は伸長反応が生じない。そのため、加えた塩基ごとに伸長反応の有無や量を測定することで、ターゲット DNA の配列を解読することができる。伸長反応の有無や量は ISFET により電位変化として検出できるので、電位変化の有無や量からターゲット DNA の配列を解読することができる。

図 4.1 には ISFET が 1 つの場合を示したが、製品では ISFET は 1 万以上のアレイとなっているため、配列解読を同時並行に行うことができ、シーケンス速度の向上とコスト低減が実現される。

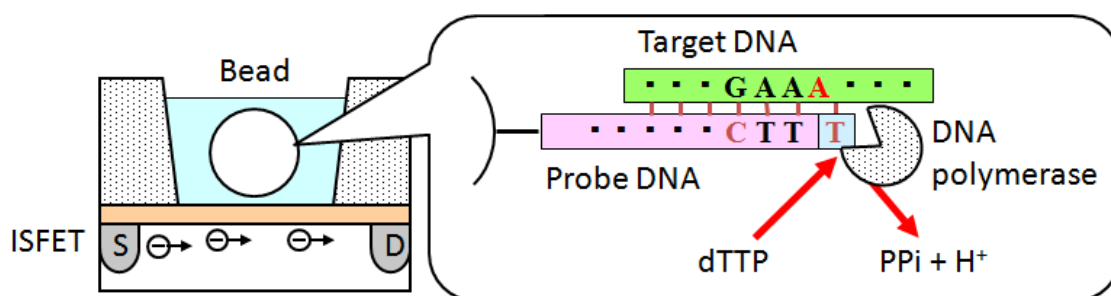


図 4.1 ISFET を用いた pH 検出型の DNA シーケンサの原理。

上記のシーケンサは pH 変化から DNA の伸長反応を間接的に検出する原理に基づいている。これに対し、DNA がリン酸基による負電荷を有していることを利用し、これを直接検出する方法がある。ISFET 表面に DNA を固定化し、ハイブリダイズや伸長反応による電荷量の変化を電位変化として検出する。負電荷が形成する電場は溶液中の陽イオンによって遮蔽されるため、巨視的には中性である。しかしながら、数 nm～数 10nm のデバイ長と言われる微視的な距離では電場は遮蔽されずに残存する。そのため、ISFET 表面に固定化された DNA の電荷が形成する電場は、ISFET により電位の違いとして検出できると考えられている。この原理に基づく DNA のハイブリダイズや DNA の伸長反応の検出、さらに、直接検出方式の DNA シーケンサの原理が実証されている [61,62]。

しかしながら、DNA の直接検出に ISFET を用いる場合、懸念されることが 2 つある。1 つ目は、ISFET は電荷だけでなく pH に対して応答性を有するため、緩衝液の効果や副産物のプロトンの影響である。2 つ目は、ISFET は表面がシリコン化合物であるためシランカップリングを用いて DNA 固定化を行うことである。シランカップリングは DNA チップでも採用されている良く知られた手法であるものの、自己重合などが起こりうることから DNA 固定化密度の制御は容易でない。そこで、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 センサに DNA を固定化し、ハイブリダイズや伸長反応を検出することを試みた。金電極を感応部としているため、ISFET のような pH 応答性を有さない。また、金電極にはアルカンチオール分子が金-チオール結合により自己組織化単分子膜 (Self Assembled Monolayer, SAM) を形成することが知られており、電気化学的に結合密度を求めることができる [63-66]。そのため、DNA の固定化密度を容易に制御することが可能となる。

本研究では、まず金電極への金-チオール結合による DNA の固定化密度の制御を試みた。続いて、固定化した DNA のハイブリダイズ効率を、伸長反応による発光の光学的計測により評価した。求めた高効率な状態において、DNA 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。

## 4.2 DNA 固定化密度およびハイブリダイズ効率の評価

金電極への DNA の固定化には，金-チオール結合によるアルカンチオール分子の自己組織化単分子膜を用いた。金電極をアルカンチオール溶液に浸すと，アルカンチオールのチオール基が金電極と結合する。アルカンチオール同士は結合しないことと，アルキル鎖同士の相互作用により，金電極表面にはアルカンチオールの単分子膜が形成される。

結合したアルカンチオール分子の量は，アルカリ溶液中で負電位を印加することで生じる電気化学的な脱離反応により測定できる。



式 4.1 および図 4.2 のように脱離反応は電子の移動を伴うため，脱離によって生じる電流を積分することで，固定化されていたアルカンチオールの量が求まる。

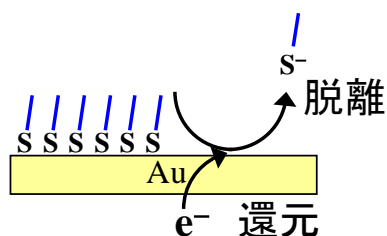


図 4.2 アルカンチオールの電気化学的な脱離反応.

図 4.3 に示したのがサイクリックボルタモグラムという上記の電気化学測定の結果である。実線が 1 回目の掃引(一定の速度で電圧を上げ下げすること)の結果を，破線が 2 回目の操引の結果を表している。1 回目の掃引でのみ観察される矢印で示したピークがアルカンチオールの脱離反応によるものである。このピークの積分値からアルカンチオール固定化量が求まる。

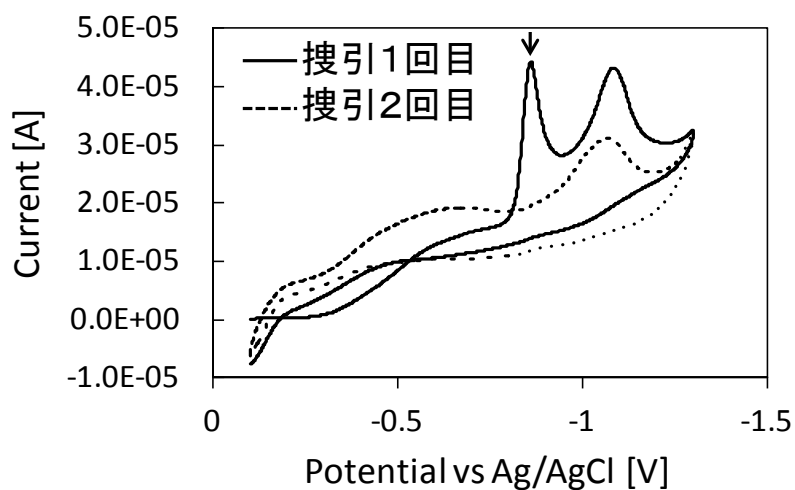


図 4.3 サイクリックボルタモグラムのアルカンチオール固定量の評価。

炭素鎖が 6 のアルキル鎖を有するアルカンチオールである 6-ヘキサントール(6-HHT)を金電極に固定化し、固定化密度と反応時間の関係を調べた。図 4.4 に示すように、30 分程度で固定化密度が飽和しているのが分かる。飽和した値は  $4.4 \times 10^{14}$  分子/cm<sup>2</sup>であった。これは、金電極に対するアルカンチオールの最密充填の理論値と一致する。

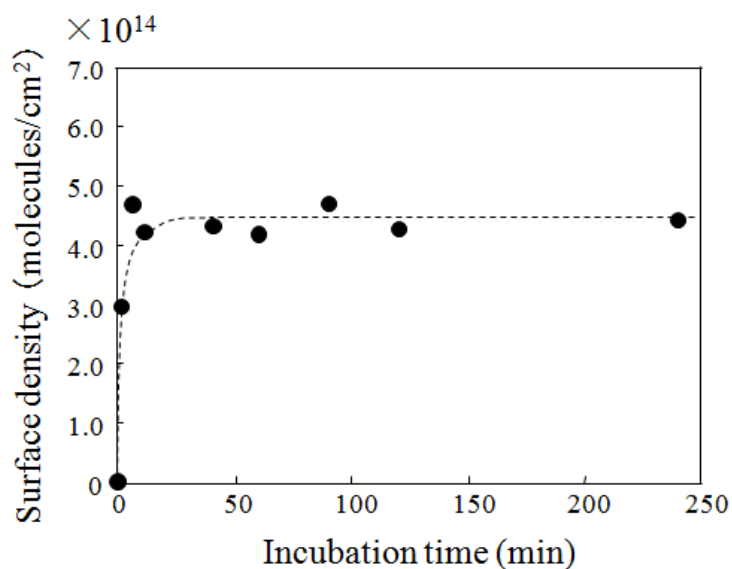


図 4.4 アルカンチオール固定化密度と時間の関係。

DNA の固定化には、塩基長 20 の DNA の 5' 末端に炭素鎖 6 のアルカンチオールが結合した分子を用いた。同様に固定化密度と反応時間の関係を調べたところ、こちらも 30 分程度で飽和に達した。その際の固定化密度は、 $4 \times 10^{13}$  分子/cm<sup>2</sup>であった。これは、1.6nm 間隔に相



当する。1本鎖 DNA の直径とほぼ等しく，DNA が最密となるまで固定化が進んだことがわかる。

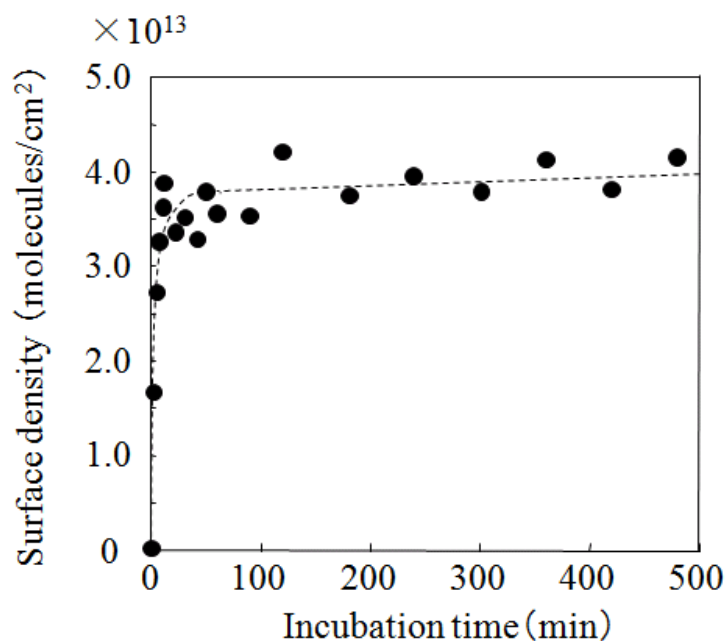


図 4.5 DNA 固定化密度と時間の関係.

DNA 固定化密度は，ハイブリダイズの効率に強く影響する。固定化密度が高すぎると，固定化されたプローブ DNA の間にターゲット DNA が入り込む隙間が無いとため，ハイブリダイズの効率が低下する。二本鎖 DNA は直径が約 2.4nm であるため，プローブ DNA はそれよりも広い間隔で固定化される必要がある。ただし，DNA はリン酸基による負電荷を有しているため静電的な反発力があり，2.4nm ちょうどよりもやや広い程度であるほうがハイブリダイズの効率が向上すると考えられる。DNA のみを固定化した場合の間隔は 1.6nm であり，ハイブリダイズ効率を考えると固定化密度を下げて間隔を広げるのがよい。

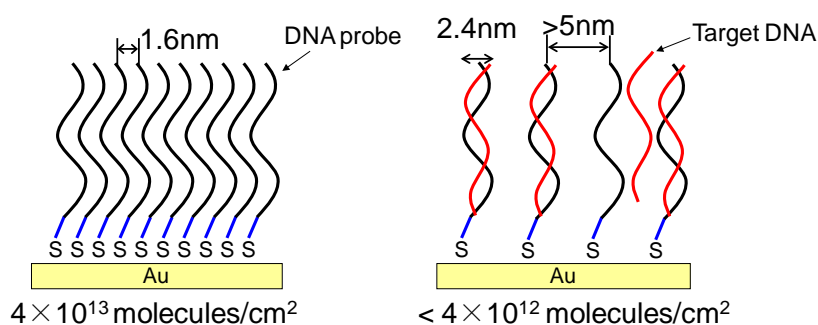


図 4.6 実際の DNA 固定化密度と理想的な DNA 固定化密度.

本研究では、DNA が結合したアルカンチオールと結合していないアルカンチオールを混合し、その混合比によって DNA 固定化密度を制御することを試みた。図 4.7 に示したのがその模式図である。DNA が結合したアルカンチオールの比が高い場合、多くの DNA が金電極表面に固定化される。一方、DNA が結合したアルカンチオールの比が低い場合、金電極表面に固定化される DNA の量は少なくなる。

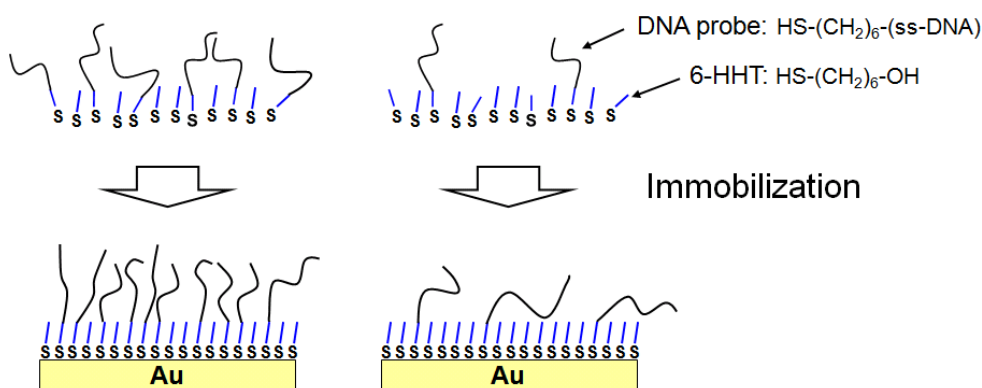


図 4.7 DNA 固定化密度の制御方法.

DNA と HHT を 1:20, 1:10, 1:5 で混合した液で固定化を行い、アルカンチオール脱離反応を測定したボルタモグラムを図 4.8 に示す。(a), (b), (c) がそれぞれ 1:20, 1:10, 1:5 に対応する。矢印で示したピークがアルカンチオール脱離反応によるものであり、DNA 混合比が増加するに従い、ピークが減少しているのが分かる。しかし、DNA の固定化密度はアルカンチオールの固定化密度の 1/10 以下であるため、アルカンチオールの脱離ピークに埋もれてしまい DNA の脱離ピークを独立に観測することはできなかった。そこで、アルカンチオール固定化密度の減少から DNA の固定化密度を算出した。DNA のみを固定化した場合の固定化密度を  $\Gamma_{\text{DNA}}^0$  , アルカンチオールのみを固定化した場合の固定化密度を  $\Gamma_{\text{HHT}}^0$  , DNA とアルカンチオールを両方固定化した場合のアルカンチオールの固定化密度を  $\Gamma_{\text{HHT}}$  として、DNA の固定化密度  $\Gamma_{\text{DNA}}$  を

$$\Gamma_{\text{DNA}} = \left(1 - \frac{\Gamma_{\text{HHT}}}{\Gamma_{\text{HHT}}^0}\right) \Gamma_{\text{DNA}}^0 \quad \text{式 4.2}$$

とした。これは、アルカンチオールの固定化密度の減少が固定化された DNA によって生じているという仮定に基づく。

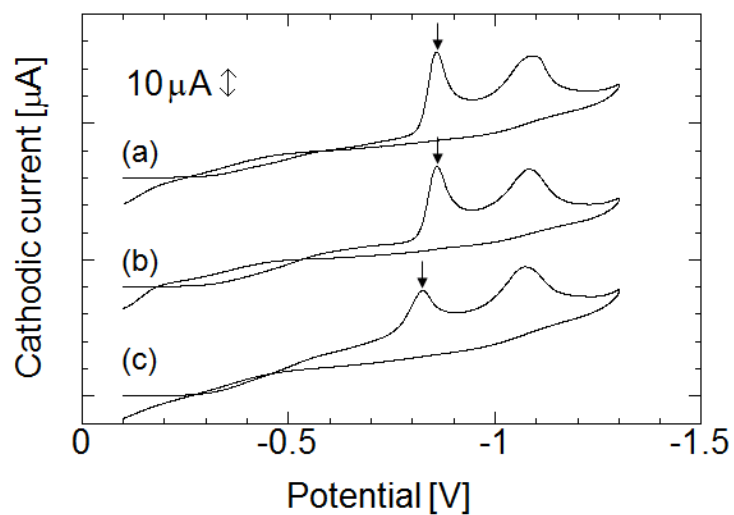


図 4.8 DNA とアルカンチオール(HHT)を固定化した電極でのアルカンチオール脱離反応.  
DNA と HHT の混合比は, (a)1:20 (b)1:10 (c)1:5

この式を用いて, 1:20~1:2 の混合液および DNA のみを固定化した場合(1:0)で DNA 固定化密度を比較した。アルカンチオールの減少分から算出しているため, DNA 混合比が少なくなるほど測定誤差が大きくなっているものの, 混合比に応じて DNA 固定化密度が制御できていることが見て取れる。

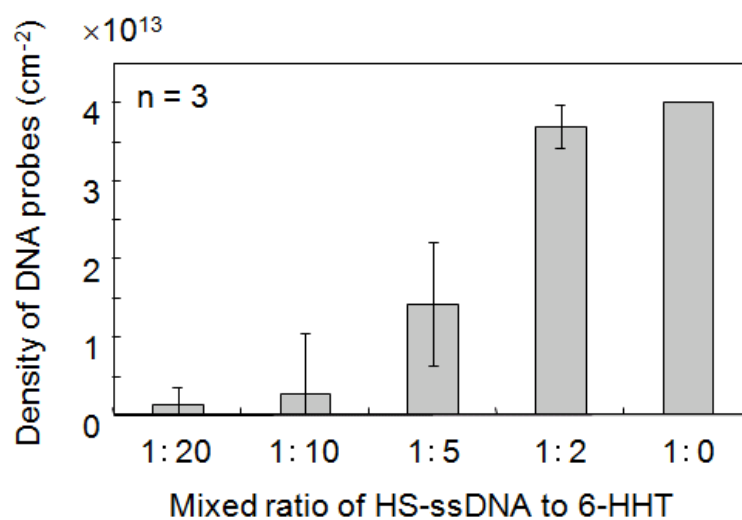


図 4.9 混合比と DNA 固定化密度の関係.

DNA 固定化密度を制御して DNA を固定化した金電極を用いて, DNA 固定化密度とハイブリダイズ効率の関係を調べた。ハイブリダイズした DNA 量の測定には, ハイブリダイズした DNA でのみ生じる伸長反応を発光で計測する方法を用いた[67]。図 4. 10に測定原理を示す。

金電極に固定化したプローブ DNA にターゲット DNA がハイブリダイズしている。金電極と反対側の末端はターゲット DNA に余剰の塩基鎖があるようにしておく。DNA 伸長反応を引き起こす DNA 伸長反応酵素 (DNA polymerase) が存在する状態でターゲット DNA の塩基配列に相補的な dNTP (図 4.10 では dTTP) を加えると、DNA 伸長反応が起きる。この反応によりピロリン酸 (PPi) が放出される。2つの酵素 (ATP Sulfurylase, Luciferase) の働きで、PPi は発光に変換される。従って、この発光を検出することで、伸長反応の有無を検出できる。また、伸長反応はハイブリダイズした DNA でのみ生じるため、同一の条件で発光量を比較することで、ハイブリダイズした DNA 量の相対値を得ることができる。

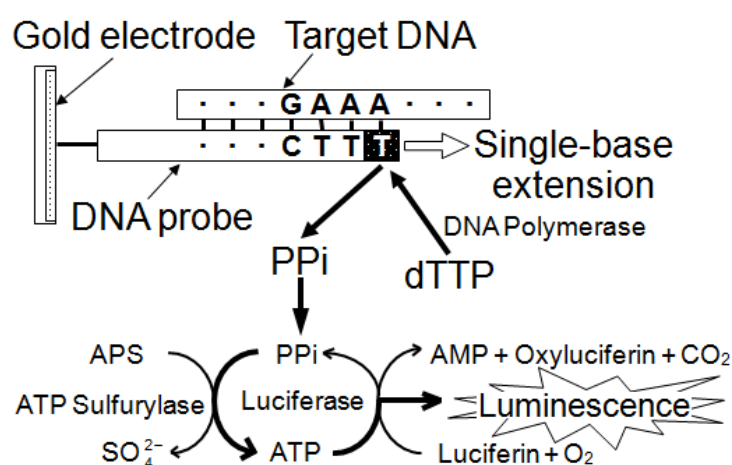


図 4.10 一塩基伸長反応の発光検出の原理.

図 4.11 に示したのが、DNA 固定化液の DNA 混合比と伸長反応での発光量の関係である。DNA 混合比が小さい 1:100 から見ていくと、DNA 混合比の増加に伴い発光量が増加している。これは、DNA 固定化密度が増加したのでハイブリダイズ DNA の量も増加したためである。ところが、発光量は 1:5 をピークに、1:2, 1:0 と DNA 混合比が増加するとかえって発光量が減少した。DNA 混合比の増加により DNA 固定化密度は増大していたため、1:2 や 1:0 の DNA 混合比においてはハイブリダイズの効率が低下していることを意味している。

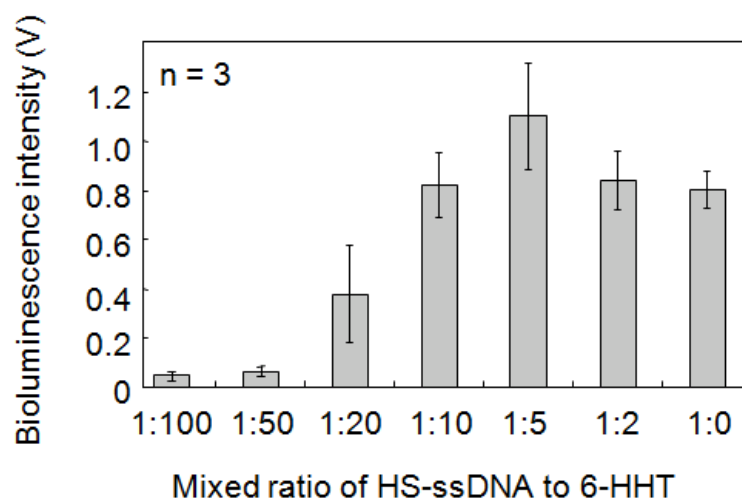


図 4.11 発光量と DNA 混合比の関係.

図 4.12 にハイブリダイズ効率を定量的に示した。発光量を固定化密度で割り，最大値を 1 として規格化した。DNA 混合比が 1:10 よりも大きくなるとハイブリダイズ効率が急激に減少していくのが分かる。

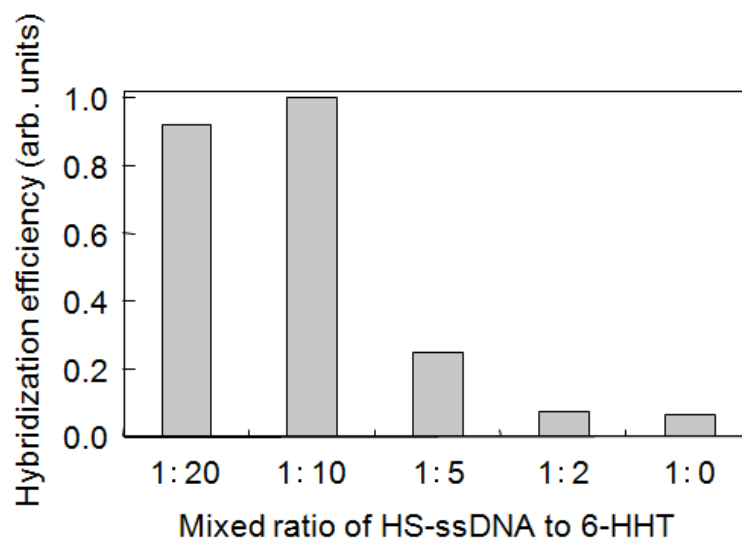


図 4.12 ハイブリダイズ効率と DNA 混合比の関係.

DNA 混合比 1:10 における DNA 固定化密度は  $2.6 \times 10^{12}$  分子/cm<sup>2</sup>であり，6.2nm 間隔で DNA が固定化されていることに相当する。6.2nm 間隔は二本鎖 DNA の直径 2.5nm の倍以上であり，ハイブリダイズが生じるための空間的余裕がある。一方，DNA 混合比 1:5 における DNA 固定化密度は  $1.4 \times 10^{13}$  分子/cm<sup>2</sup>であり，2.7nm 間隔で DNA が固定化されていることに相当する。この値はハイブリダイズが生じるギリギリの間隔であり，DNA 同士の静電的な反発を考慮す

ると、ハイブリダイズの効率が低下することが容易に想像できる。さらに、DNA のみを固定化した場合は 1.6nm 間隔であり、ハイブリダイズする空間的余裕は全く無い。DNA 固定化密度のゆらぎにより、一部の DNA が辛うじてハイブリダイズできたと推測される。以上の結果から、最もハイブリダイズ効率が高くなる条件は、DNA とアルカンチオールを 1:10 で混合した液を用いて DNA を固定化した場合であることが分かった。

#### 4.3 FET センサを用いたハイブリダイズおよび伸長反応検出

DNA とアルカンチオールを 1:10 で混合した液を用いて DNA を固定化した FET センサを用いて、ハイブリダイズおよび伸長反応に伴う電位変化を測定した。伸長反応では、全塩基の dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) を一度に加え、10 塩基を一度に伸長させた。図 4.13 に DNA が固定化された状態、ハイブリダイズ後、伸長反応後で測定した FET センサの IV 曲線を示す。ハイブリダイズおよび伸長反応で IV 曲線は高電位側にシフトしており、それぞれの工程で電極の電位が減少したことが分かる。電位の減少は、それぞれ -86mV, -60mV であった。DNA はリン酸基を有するため電気的には負電荷として扱える。今回の測定結果は、ハイブリダイズおよび伸長反応により金電極表面の負電荷は増加し、金電極の電位が減少したと解釈できる。

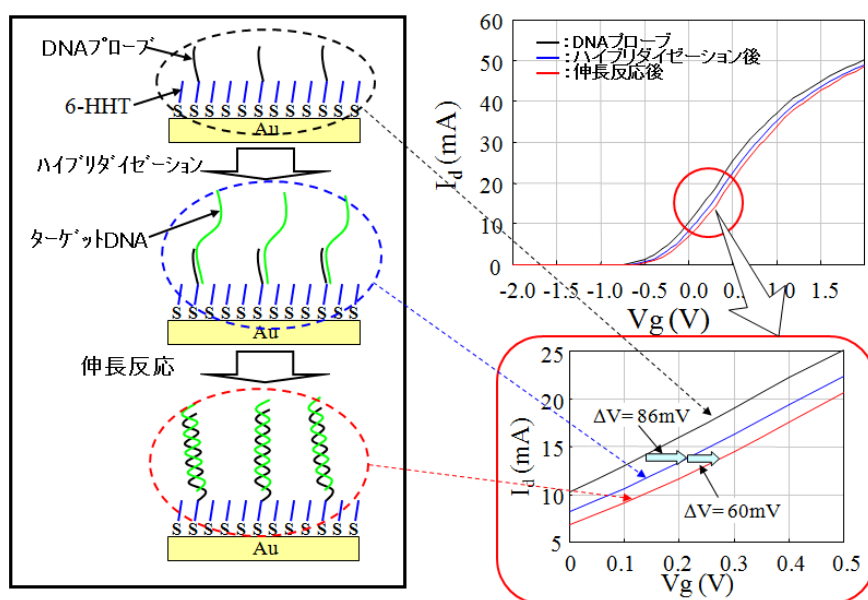


図 4.13 ハイブリダイズおよび伸長反応による電位変化.

金電極の静電容量を測定し、電位変化についての定量的な考察を行った。静電容量の測定は、高速操引時のサイクリックボルタモグラムから求めた。電荷  $Q$ 、静電容量  $C$ 、電位  $V$  の間には、

$$Q = CV \quad \text{式 4.3}$$

の関係がある。この両辺を時間  $t$  で割り整理すると、

$$C = \frac{i}{V/t} \quad \text{式 4.4}$$

となる。 $i$  は電流値であり図 4.14 の縦軸を、 $V/t$  は操引速度を意味する。従って、ボルタモグラムの電流値を操引速度で割ったものが静電容量となる。静電容量は  $4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  であり、これはハイブリダイズ、伸長反応で変化しなかった。得られた静電容量は、金電極表面に固定化した炭素鎖 6 のアルカンチオール単分子膜の文献値[68]である  $3.71 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  と同程度である。絶縁体であるアルカンチオール単分子膜が、導電性の電極と水溶液に挟まれることで、静電容量が発生している。この結果は、ハイブリダイズの前でも後でも静電容量は 6-HHT の形成するアルカンチオール単分子膜(図 4.13 では青線で表示)に支配されていることを示している。

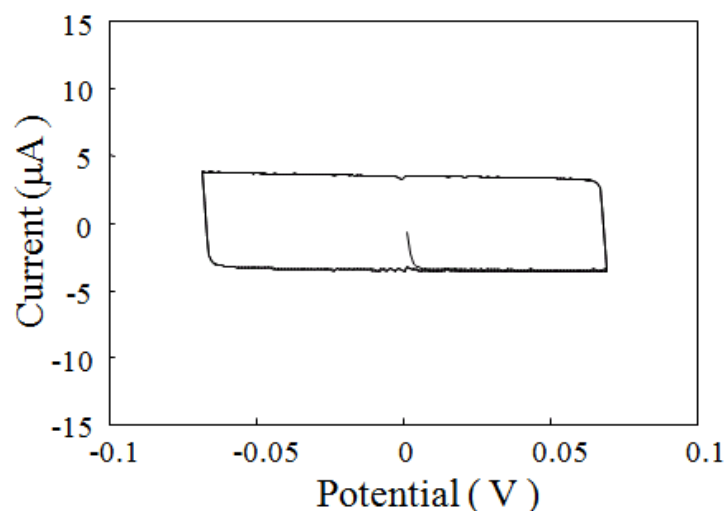


図 4.14 サイクリックボルタンメトリによる静電容量計測.

FET センサで観測された電位変化 $-86\text{mV}$ 、 $-60\text{mV}$  は、式によりそれぞれ $-340\text{nC}$ 、 $-240\text{nC}$  の電荷の変化に相当することが分かる。実際の電荷の変化は、固定化密度  $2.6 \times 10^{12}$  分子/ $\text{cm}^2$ 、素電荷  $1.6 \times 10^{-19}\text{C}/\text{分子}$ 、ターゲット DNA の塩基長 30 および伸長反応の伸長塩基数 10 から、 $-13000\text{nC}$  および $-4200\text{nC}$  と求まる。観測された電荷の変化が実際に起こった電荷の変化よりも小さいのは、溶液中のイオンによるデバイ遮蔽によるものと考えられる。溶液中のデバイ長は  $1\text{nm}$  程度であり、30 塩基の DNA の長さは  $10\text{nm}$  程度であることから、DNA の中間の

5nmの位置では $1/100(=e^{-5})$ ほどに電荷が遮蔽される。このように、観測された電位変化とDNA固定化密度の関係はデバイ遮蔽により定性的には説明できる。厳密な一致は表面における電荷分布などを考慮する必要があるため困難を極め、今後の課題である。

#### 4.4 まとめと今後の展望

本章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。

- 1) 金電極には金-チオール結合を活用して DNA プローブを固定化した。DNA プローブ固定化密度を電流印加による脱離反応で電気化学的に計測したところ  $4 \times 10^{13}$  分子/cm<sup>2</sup>であった。これは 1.6nm 間隔とハイブリダイズに最低限必要な二本鎖 DNA の太さ 2.4nm よりも小さいことが分かった。
- 2) アルカンチオール (DNA プローブを有さないチオール分子) と DNA プローブを混合した液を用いて DNA プローブ固定化密度の制御を試みた。アルカンチオール混合比増大に伴い DNA プローブ固定化密度は減少した。混合比 1:5 の場合に DNA プローブ固定化の間隔は 2.7nm, 1:10 の場合に 6.2nm と見積もられた。
- 3) DNA プローブに対してターゲット DNA をハイブリダイズさせ、ハイブリダイズの量を一塩基伸長反応に伴う生物発光量から見積もった。DNA プローブ固定化の間隔 (2.7nm) が二本鎖 DNA の太さ (2.4nm) とほぼ等しい混合比 1:5 の場合に発光量が最大すなわちハイブリダイズした DNA 量が最大であった。
- 4) 発光量を DNA 固定化密度で規格化しハイブリダイズ効率としたところ、混合比 1:10 以下の場合に効率が最大となった。二本鎖 DNA の太さ (2.4nm) の倍程度の DNA プローブの間隔 (6.2nm) が効率的なハイブリダイズを実現したと考えられる。
- 5) 混合比 1:10 で FET センサに DNA プローブを固定化し、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 の電位変化を示した。負電荷を有する DNA の量が増えたことで電位が減少したと考えられる。
- 6) 得られた電位変化は、静電容量と負電荷量の変化から見積もった理想的な電位変化の 1/30 程度であった。溶液中のイオンによるデバイ遮蔽の効果と推測される。

以上のように、DNA のハイブリダイズや伸長反応を電位変化として検出できることが示された。測定の精度を向上させるには、電極表面の DNA やイオンの状態を制御していくことが必要である。今回用いた電位差計測法は、原理的には電極面積を小さくしても同様の電位変化が得られる。すなわち、究極的には 1 分子の DNA のハイブリダイズや伸長反応を検



出することができるようになる。現在の遺伝子計測では必須の遺伝子増幅法を用いずに超高感度に DNA を計測することや、塩基配列を読み取る（シーケンス）ことが可能となる。

## 5 章 デジタル計数方式ウイルス細菌センサ

### 5.1 背景と目的

医療・製薬分野や食品製造分野において、ウイルスや細菌などの病原菌の検査は安心・安全を提供するために不可欠である。近年の安全志向の高まりから、より迅速かつ簡便に病原菌を検出したいという要求が高まってきている。2009 年に世界的流行を引き起こし 2010 年には収束が宣言された新型インフルエンザ (H1N1) [69] の防疫では、まずイムノクロマトグラフィーを用いた簡易検査を行い [70]、感染が疑われる場合はリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (リアルタイム PCR) を用いたウイルスの型の同定 [71] が行われた。しかしこの手順では、イムノクロマトグラフィーによる簡易検査の感度が低いため、感染が判明した段階では 2 次感染により既に感染が拡大している可能性がある。そのため、より確実な防疫には迅速かつ簡便に高感度にウイルスを検出する方法が必要とされる。また、細菌検査においては、通常 1 日程度の培養を要する測定方法が用いられており、医薬品や食品への細菌の混入が判明した時点で、製品の回収が必要になったり、最悪の場合被害が拡大していたりすることが懸念されている。そのため、培養を必要としない迅速かつ簡便な細菌の高感度検出が必要とされる。この要求に対して、簡便化したフローサイトメトリや ATP 発光検出などの手法が提案・開発されている [72, 73]。

本研究では、測定対象のタンパク質や DNA を 1 個単位で計測する方法 [74] に着目した。この計測方法は、蛍光標識した測定対象を蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡下で輝点として観測し、輝点を計数して測定対象を定量するデジタル計測法である。原理的な測定下限は「1 つ」と究極の高感度であり、輝点の輝度にばらつきがあっても計数に影響しないため、高感度な検出が必要な低濃度試料の測定に適している。しかし、この計測には精密な光学系が必要となるため、そのままウイルス・細菌の簡便な測定法に適用することは難しい。

高感度を実現するウイルス・細菌のデジタル計測をより簡便に行うには、精密な光学系が不要となる電氣的な測定法が適していると考えた。図 5.1 に示すように、半導体製造技術を応用してウイルス ( $\sim 100\text{nm}$ )・細菌 ( $\sim 1\mu\text{m}$ ) と同程度の大きさの電極を複数準備し (微小電極アレイ)、電氣的な測定法により各電極上のウイルス・細菌の有無を検出する方法を考案した。電極表面にはウイルスや細菌をトラップできる抗体が固定化されており、また固定化されている抗体は区画ごと (図 5.1 では A~D) に異なるウイルスや細菌に対応する。検体を加えると検体中のウイルスや細菌が抗体と結合し、一部の電極上にはウイルスや細菌がトラップされた状態となる。各電極についてウイルスや細菌の有無を電氣的かつデジタル的に判定して集計することで、A~D それぞれのウイルス・細菌の数を測定できる。この方法では、ウイルス・細菌の結合による信号変化に多少のばらつきがあってもウイルス・細菌を 1 つと認識できるため、信号ばらつきは計測誤差とならない利点がある。

本研究では、図 5.1 のシステムの基本原理である電氣的かつデジタル的な判定の実現可能性について検討し、実証を行った。電氣的な測定手法として、従来から細菌検出に用いられてきたインピーダンス計測に加えて、グルコースセンサの基本原理である電流計測について考察した。まず、有限要素法を用いた数値シミュレーションにより、原理確認と検出メカニズムの考察を行った。そして、モデル試料としてポリスチレンビーズを用いて実際の測定を行い、原理実証と課題の抽出を行った。

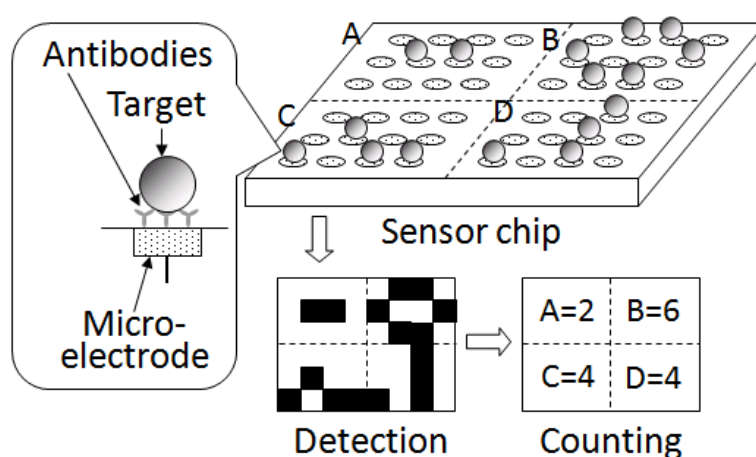


図 5.1 ウイルス・細菌の電氣的デジタル計測方法.

## 5.2 インピーダンス計測を用いたデジタル計数

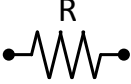
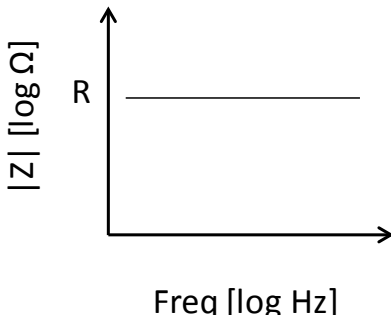
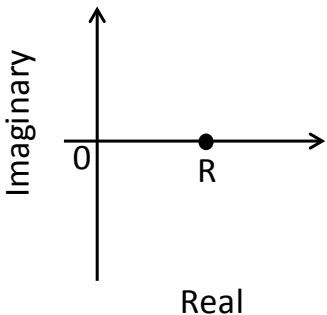

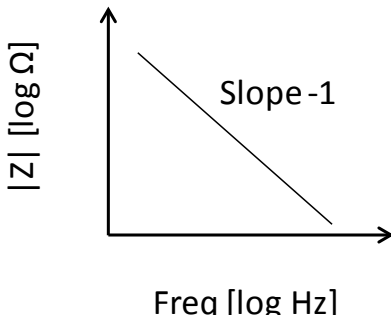
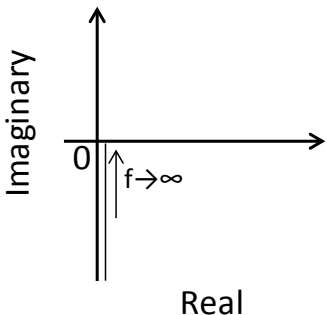

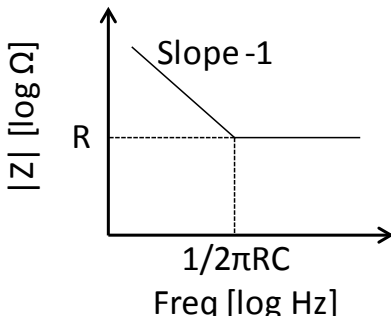
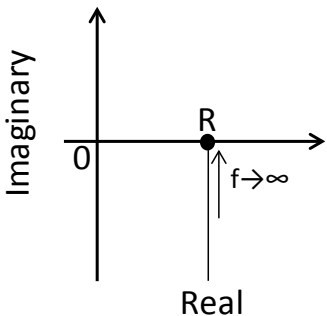
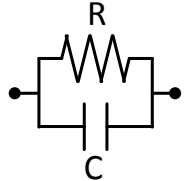
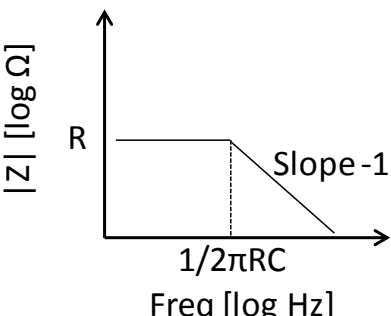
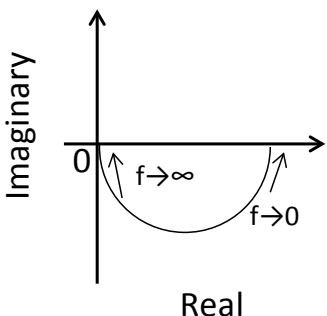
図 5.1 のシステムの基本原理である電氣的かつデジタル的な判定について、インピーダンス計測を用いた場合について検討した。インピーダンス計測は細胞の計測に適用されており [75-79]，その際のインピーダンス変化は細胞膜が電氣的に絶縁体として扱うことができることに由来する。ウイルスも脂質二重膜を有するものがあり，細胞膜と同様にインピーダンス変化をもたらすと考えられる [80, 81]。そこで，数値解析方法である有限要素法を用いて，どのようなインピーダンス変化が得られるか調べた。そして，インピーダンス変化が検出可能と考えられる条件において，ポリスチレンビーズをモデル試料として実証実験を行った。得られた実験結果の有限要素法を用いた計算結果との差異について考察を行った。

### 5.2.1 インピーダンス計測法

インピーダンス計測とは，交流電圧印加に対する交流電流応答を測定し，測定対象のインピーダンスを測定する方法である。インピーダンスの表現方法にはいくつかあり，ここでは Bode プロットと Cole-Cole プロットを用いる。Bode プロットは横軸を周波数の対数と，

縦軸をインピーダンス絶対値の対数としたプロットである。Cole-Coleプロットは、横軸をインピーダンスの実部と、縦軸をインピーダンスの虚部としたプロットである。4種類の回路(抵抗成分，容量成分，抵抗成分と容量成分の直列，抵抗成分と容量成分の並列)とそれに対応するインピーダンスのプロットを表 5.1 に示した。

表 5.1 各回路図に対応するインピーダンスのプロット.

回路図	Bode プロット	Cole-Cole プロット
インピーダンス		
		
$Z = R$		
		
$Z = -\frac{j}{2\pi fC}$		
		
$Z = R - \frac{j}{2\pi fC}$		
		
$Z = \frac{R}{1 + 2\pi j fRC}$		

### 5.2.2 有限要素法を用いたインピーダンス計測方式デジタル計測のシミュレーション

有限要素法を用いてインピーダンス計測方式のデジタル計測をシミュレートし、ウイルス・細菌の検出可能性を調べた。評価対象の系は、図 5.2 の左に示すような円盤状の電極上に抗体を介して測定対象であるウイルス・細菌が捕捉された状態とした。電極の直径は真球で仮定した測定対象の直径の 1.5 倍の大きさとした。この状態を、図 5.2 の右に示す円筒座標系のモデルで表現した。水溶液中のイオンが電極表面で双極子を作りだすことで生じる比較的静電容量の大きな層である電気二重層を、静電容量成分として電極上に配置した。電気二重層の静電容量は、別途測定した金電極の電気二重層容量である  $15\mu\text{F}/\text{cm}^2$  とした。電気二重層の直上に、抗体の大きさに相当する 10nm の間隔を空けて測定対象を配置した。測定対象は絶縁体とした。また、電気二重層より上の空間を、100mmol/L 程度の水溶液に相当する電気抵抗値  $1\Omega\text{m}$ 、誘電率 80 とした。境界条件として電極最下部に振幅 1V の電圧を印加し、溶液最上部を 0V に固定した。

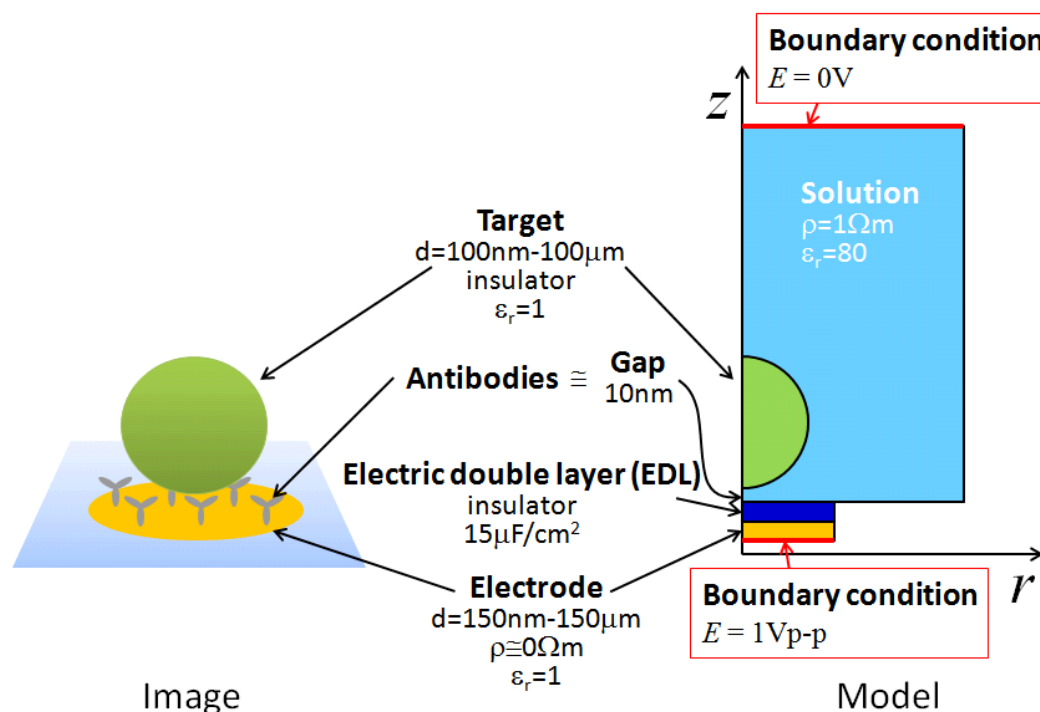


図 5.2 (左)電極上の測定対象のイメージ (右)有限要素法で解析したモデル.

測定対象が存在しない場合の計算結果を Bode プロットで図 5.3 に示す。電極直径に因らず、ある周波数での変曲点を境に低周波数側で傾き -1、高周波数側は傾き 0 のスペクトルとなった。これは、表 5.1 の抵抗成分と容量成分の直接回路の応答に相当する。また、電極直径を  $150\mu\text{m}$ ,  $15\mu\text{m}$ ,  $1.5\mu\text{m}$ ,  $150\text{nm}$  と小さくしていくと、スペクトルは上方にシフトす

るとともに、変曲点は高周波数側にシフトしていった。これらの挙動を考察するため、抵抗成分と容量成分が直列となった回路をモデルとして、それぞれの成分を電極直径に対してプロットした。容量成分は直径の二乗に比例したのに対し、抵抗成分は直径に反比例した。単位面積あたりのキャパシタンスはいずれの直径の電極においても  $15\mu\text{F}/\text{cm}^2$  と一定値であり、この値は設定した電気二重層の容量と一致した。従って、等価回路におけるキャパシタは電気二重層を表していることが分かった。一方、抵抗値は電極直径の一乗に反比例した。等価回路の抵抗は溶液の電気抵抗であると推測し、溶液の電気抵抗率(Resistivity of solution)を変化させてシミュレーションを行った。予想通り抵抗値は溶液の電気抵抗率に比例したことから、等価回路における抵抗は溶液の電気抵抗であることが分かった。抵抗値が電極直径の二乗ではなく一乗に比例したのは、電極表面から発生した電流は電極から離れるほど密度が低下するため、電極近傍の溶液が電気抵抗において支配的になるからであると考えられる。電気抵抗は、一般的に 電流パスの距離÷電流パスの断面積 で表される。微小電極においては、電流パスの距離は電気抵抗において支配的になる電極近傍の溶液の厚みに等しく、電流パスの断面積は電極直径に比例すると考えられるので、電気抵抗は電極の直径に反比例したと考えられる。

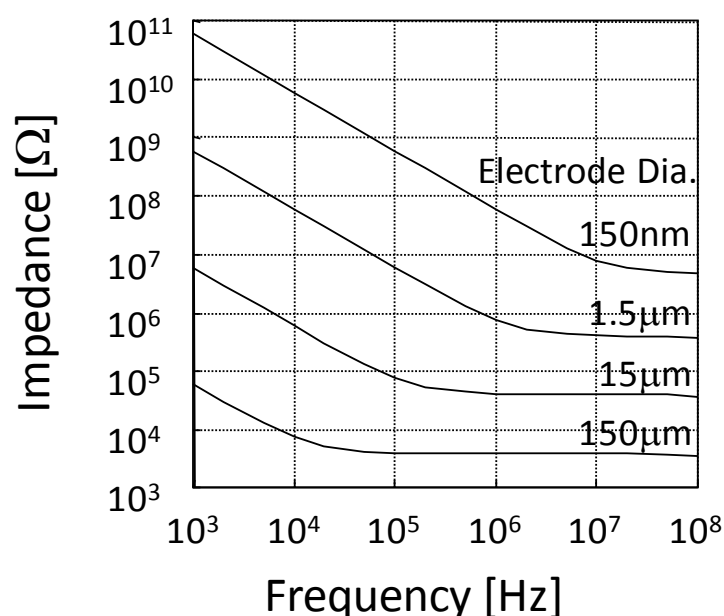


図 5.3 有限要素法で得られたインピーダンススペクトル。

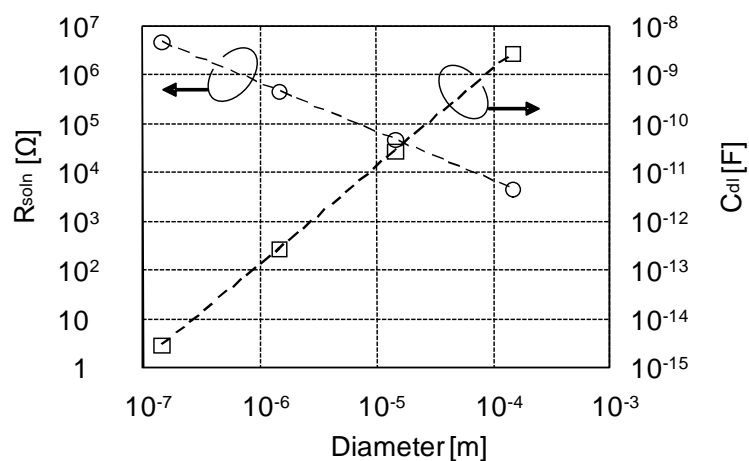


図 5.4 電極直径と直列抵抗値および直列静電容量値の関係.

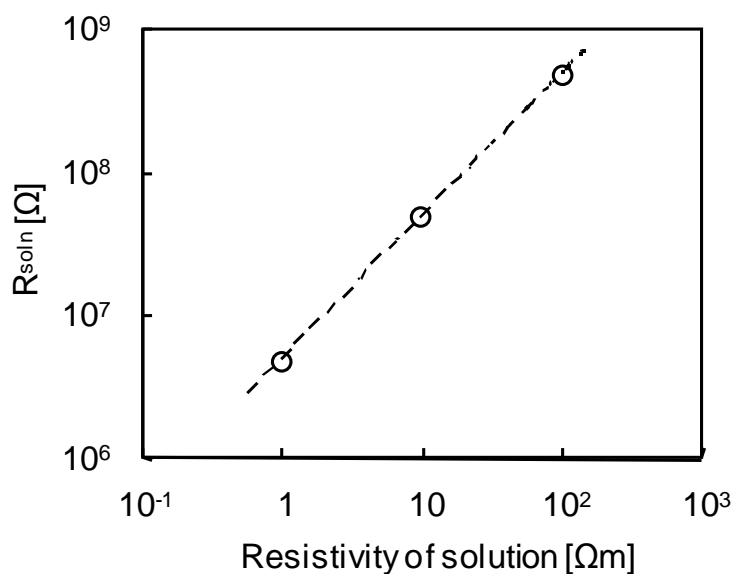


図 5.5 直列抵抗値の溶液電気抵抗依存性.

測定対象の有無によるインピーダンスの変化をシミュレーションにより求めた。その際、測定対象の直径、電極の直径、測定対象と電極の距離を表 5.2 のように設定した。実測時に電極が測定対象を捕捉する際の捕捉位置のばらつきによる信号変化ばらつきを抑制する狙いで、電極の直径は測定対象の直径よりも 1.5 倍大きくした。図 5.6 に示すように、いずれの条件においてもインピーダンスの増加が見られた。増加は、インピーダンススペクトルの変曲点 (周波数  $f_r$ ) よりも高い周波数においてのみ見られ、低い周波数においてはインピーダンスの変化は見られなかった。図 5.7 にインピーダンスの変化分を示す。 $f_r$  よりも高い周波数で、最大 10% のインピーダンスの増加であったことが分かる。抵抗と静電容量の直列回路において、 $f_r$  よりも高い周波数のインピーダンスでは抵抗が支配的である。従って、



$f_r$  より高い周波数でのインピーダンスの増加は抵抗成分すなわち溶液抵抗の成分の増加によるものであることが分かる。これは、電極上に測定対象が存在することで電極近傍の電流パスが遮られ、溶液抵抗が増加したと考えられる。

表 5.2 シミュレーションのパラメータ.

測定対象の直径	電極の直径	測定対象と電極の距離
100nm	150nm	10nm
1 $\mu$ m	1.5 $\mu$ m	10nm
10 $\mu$ m	15 $\mu$ m	100nm
100 $\mu$ m	150 $\mu$ m	1 $\mu$ m

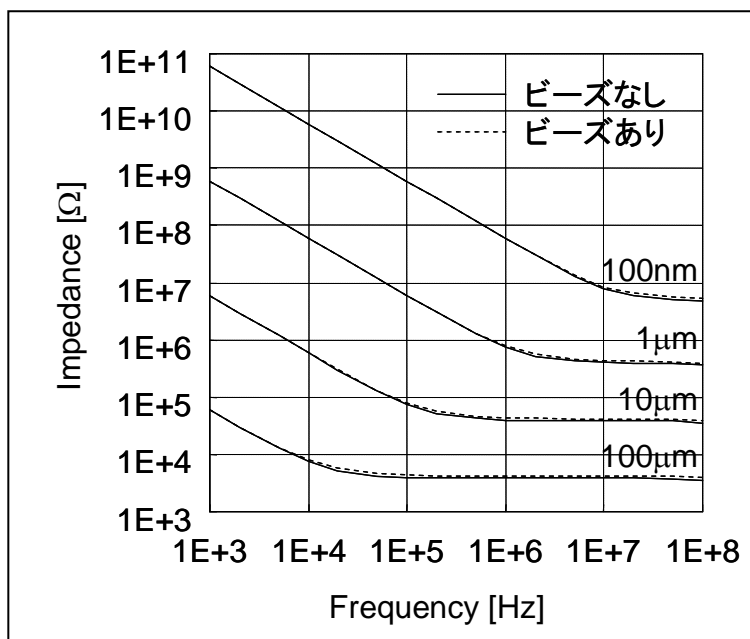


図 5.6 測定対象の存在によるインピーダンススペクトルの変化.

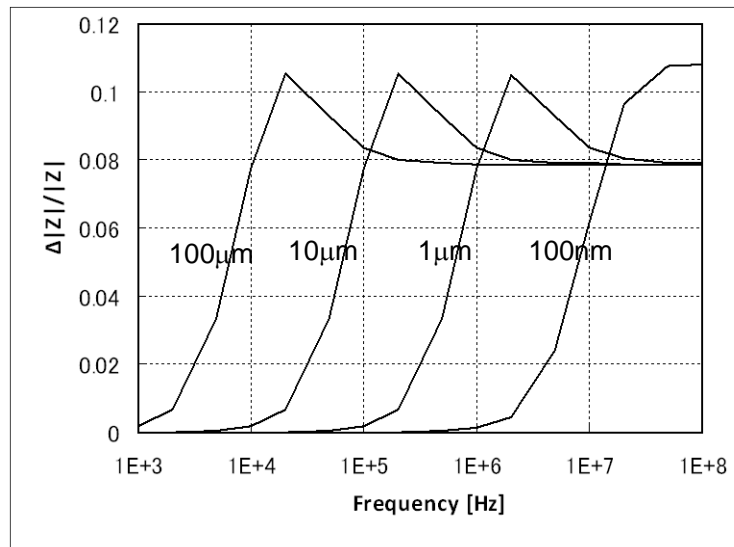


図 5.7 測定対象の存在によるインピーダンススペクトルの変化分.

以上の結果から,

- 1) 溶液中の電極は, 電極の電気二重層容量(C)と溶液抵抗(R)の直列回路で表現できる。
  - 2) 電極上に電極直径の 2/3 の真球で模擬した測定対象が存在すると, 電流パスが遮られることで, 溶液抵抗が支配的な  $f > 1/2\pi RC$  においてインピーダンスが 10%程度増加する。
  - 3) 測定対象の存在によるインピーダンスの増加は溶液抵抗成分の増加によるものであり, 電極表面の電気二重層に起因する容量成分にはほとんど変化が生じない。
- ことが分かった。

### 5.2.3 様々な電極形状の検討

測定対象の存在によるインピーダンス変化を, 電極形状の工夫により増大できるか検討した。図 5.8 に示したのが, 電極上に測定対象が存在するときの電流ベクトルの空間分布である。電極中央部付近では, 測定対象を迂回するように電流が流れているのが分かる。電極中央部からの電流パスは測定対象の影響を大きく受けているということを示している。一方, 電極周辺部の電流パスは測定対象とは無関係に外側に発散しており, 測定対象の存在の影響は小さいことを示している。従って, 電極周辺部から外側に発散する電流パスを抑制することができれば, 測定対象の結合によるインピーダンス変化を増大できると考えられる。

電極周辺部から外側に発散する電流パスを抑制するように電極周囲に側壁を設けた構造を考案し(図 5.10), シミュレーションで解析した(図 5.9, 11, 12)。なお, 側壁を設けた構造の解析には, これまでよりも 10 倍抵抗値の高い 10 mmol/L 程度の水溶液に相当する電気抵抗率  $10 \Omega \text{m}$  を用いた。以下では同じ条件の電気抵抗率を用いたデータで比較を行う。図

図 5.11 は図 5.10 の各電極での測定対象の無い状態でのインピーダンススペクトルである。図 5.11 における Plane と図 5.6 の電極直径 150nm(測定対象直径 100nm)は同じ電極についての解析結果であるものの、上記のように水溶液の電気抵抗値が 10 倍異なる。そのため、低周波数側の容量成分に依存したインピーダンスは両者でほとんど違いが見られないのに対し、高周波数側の溶液抵抗に依存したインピーダンスは、図 5.11 では図 5.6 より 10 倍ほど大きくなっている。また、図 5.11 ではさらに高周波数域 ( $10^7 \sim 10^8 \text{Hz}$ )においてインピーダンスの低下が見られた。これは、水の誘電率(比誘電率 80 と設定)によって生じる容量成分によるものである。辺の長さが  $a$  の立方体の平板キャパシタを考えると、容量成分は

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{a^2}{a} = \epsilon_0 \epsilon_r a \quad \text{式 5.1}$$

である。一方、平板間の抵抗値は、

$$R = \rho \frac{a}{a^2} = \frac{\rho}{a} \quad \text{式 5.2}$$

である。表 5.1 に示した RC 並列回路に相当し、周波数

$$f = \frac{1}{2\pi RC} = \frac{1}{2\pi \rho \epsilon_0 \epsilon_r} \quad \text{式 5.3}$$

を境に、高周波数側では容量成分が支配的になる。この周波数は、電気抵抗率  $1 \ \Omega \text{m}$ (図 5.6 の場合)では  $3 \times 10^8 \text{Hz}$  であるのに対し、電気抵抗率  $10 \ \Omega \text{m}$ (図 5.11 の場合)では一桁低い  $3 \times 10^7 \text{Hz}$  である。そのため、図 5.6 では観測されなかった高周波数域 ( $10^7 \sim 10^8 \text{Hz}$ )でのインピーダンスの低下が図 5.11 では観測された。

図 5.11 に示すように、側壁の無い状態(Plane)と比べ側壁がある状態(With sidewall)では溶液抵抗成分が 3 倍増大した。これは、図 5.9 に示すように発散していた電流パスが側壁で遮断されたためであり、そのような電流が 2/3 程度存在していたことを示している。図 5.12 に示したのが、測定対象の有無によるインピーダンスの変化割合である。測定対象の存在により  $f_r$  よりも高い周波数においてインピーダンスが増加しており、溶液抵抗成分の増加を示している。これは側壁が無いときと同様の挙動であるものの、その変化割合は側壁がない場合の 10%に対して側壁がある場合は 35%と 3 倍以上であった。これは、測定対象の存在の有無に影響を受けなかった電流パスが側壁によって除かれたことの効果と考えられる。すなわち、測定対象の存在で影響を受ける電流量が変わらないとすると、側壁により溶液抵抗成分が 3 倍増大したため、抵抗変化も 3 倍増大したと解釈できる。

側壁付き電極の考え方を発展させ、側壁に電極を設けた箱型電極について検討した。図 5.11 に示したインピーダンススペクトルのように、側壁の無い電極と比較して、 $f_r$  より低周波数においてインピーダンスの減少が、 $f_r$  より高周波数においてインピーダンスの増加が観測された。低周波数におけるインピーダンスの減少は電気二重層容量成分の増加を意味している。これは、側壁に電極を設けたことで電極の表面積が増大し、容量成分が増大したためである。また、高周波数におけるインピーダンスの増加は溶液抵抗成分の増加を意味しており、側壁の存在で発散する電流パスが遮断されたためである。ただ、電極のない側壁を有する場合に比べて増加の程度は小さかった。側壁に電極を設けたことによる電極面積の増大が、抵抗成分の減少をもたらしたためと考えられる。

箱型電極について測定対象の存在によるインピーダンスの変化を調べた。図 5.12 に示すインピーダンススペクトルの変化割合から見て取れるように、溶液抵抗成分は最大で 28% と変化割合は側壁が無い場合よりも増大した。また、インピーダンス変化の始まる周波数は半分とより低周波数側になった。これは、容量成分の増大により  $f_r$  が減少したためである。 $f_r$  の減少は測定に必要な周波数の低下につながり、後ほど説明する寄生容量の影響の低減が可能となる。

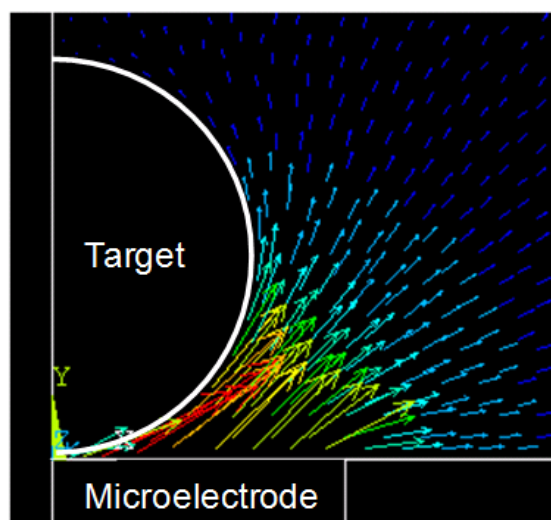


図 5.8 電極上に測定対象がある場合の電流ベクトル。

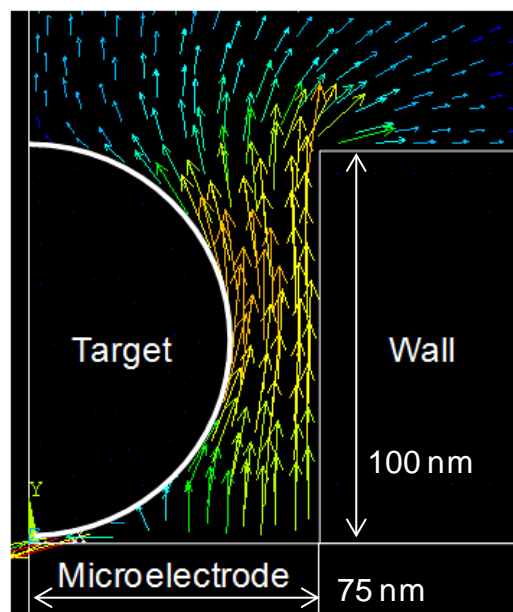


図 5.9 側壁を有する電極上に測定対象がある場合の電流ベクトル。

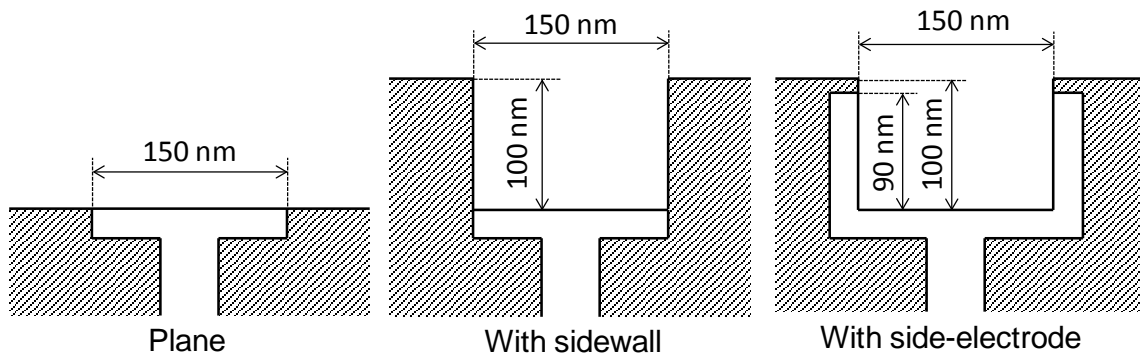


図 5.10 電極形状模式図.

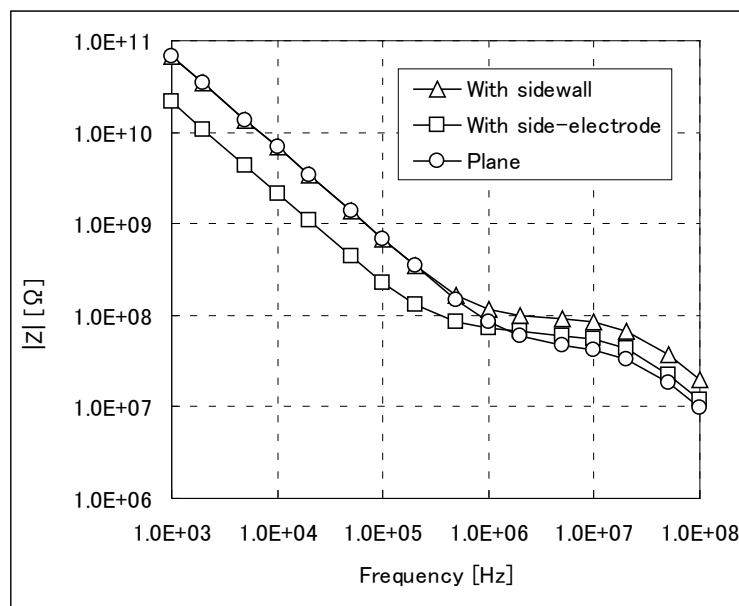


図 5.11 側壁付き電極のインピーダンススペクトル.

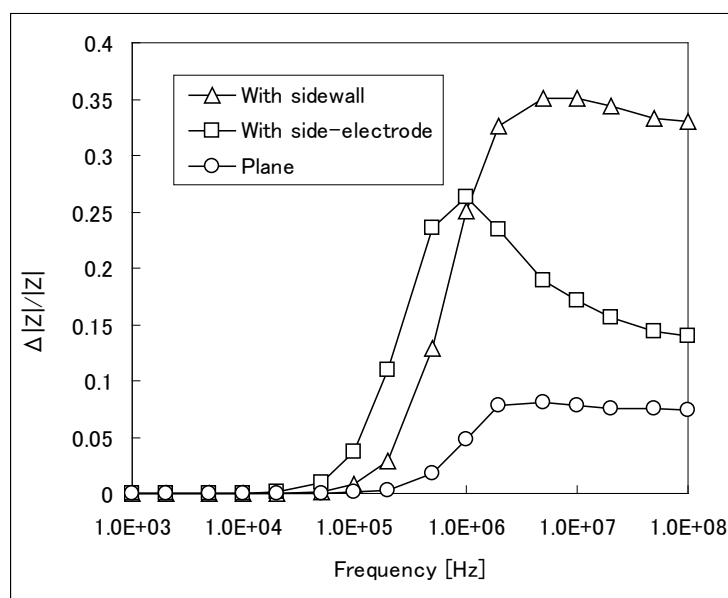


図 5.12 測定対象による側壁付き電極のインピーダンススペクトル変化.

今回は軸対象系を用いてシミュレーションを行ったため検証は行わなかったが、測定対象が電極の中心からずれた位置に結合すると、インピーダンス変化は小さくなると予想される。そのため、測定対象が電極の中心に結合することはインピーダンス変化のばらつきを抑制するために重要と考えられる。そこで、電極の中心部を絶縁物として、そこに抗体などの測定対象と結合する物質を固定するドーナツ型電極について検討した(図 5.15)。

中心部の大きさ直径 40nm と直径 80nm についてシミュレーションを行い、その結果であるインピーダンススペクトルと測定対象の存在によるインピーダンスの変化割合を図 5.13 と図 5.14 に示す。直径 150nm の電極の中心に直径 40nm の絶縁物を設けた場合、単純な円形の電極と比べて静電容量は微減であり、測定対象の結合によるインピーダンス変化も 10% とほとんど違いが見られなかった。これは、直径 40nm の絶縁物は面積にして電極の 7%程度でしかないこと、中心部がなくなったことで失われる電流パスは周囲の電極からの電流パスで補われることによると考えられる。

電極直径の半分以上の直径 80nm の絶縁物を設けた場合は、静電容量の増加とインピーダンス変化の減少(8%)が観測された。実際にどの程度の内径とすることができるかは、外乱要因や測定対象の結合確率などで最適化する必要がある。同様に、側壁付き電極についてもドーナツ型の電極が適用可能であるか調べたところ、円形電極と比較して内側に絶縁物を設けた影響は小さく、適用可能であることが分かった。

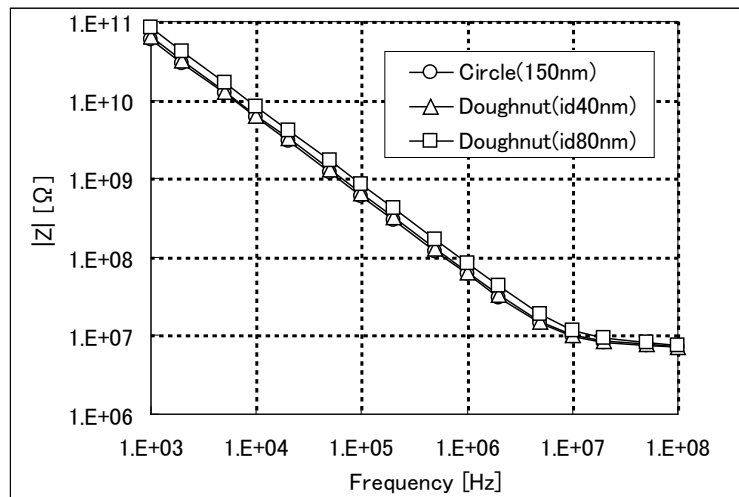


図 5.13 ドーナツ型電極のインピーダンススペクトル.

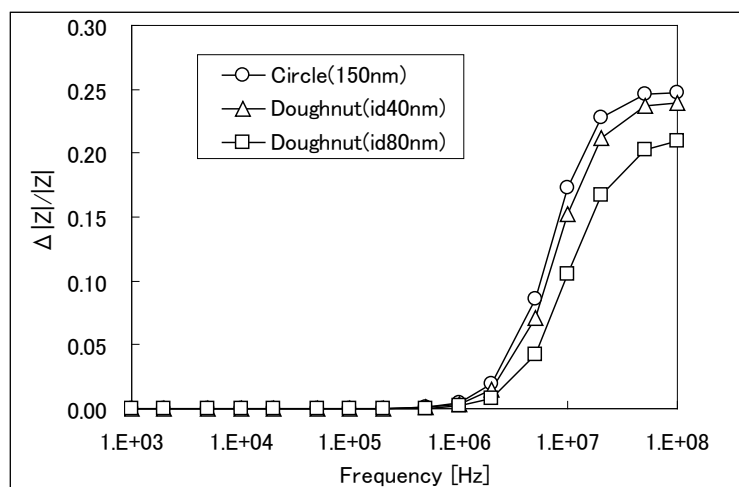


図 5.14 測定対象によるドーナツ型電極のインピーダンススペクトル変化.

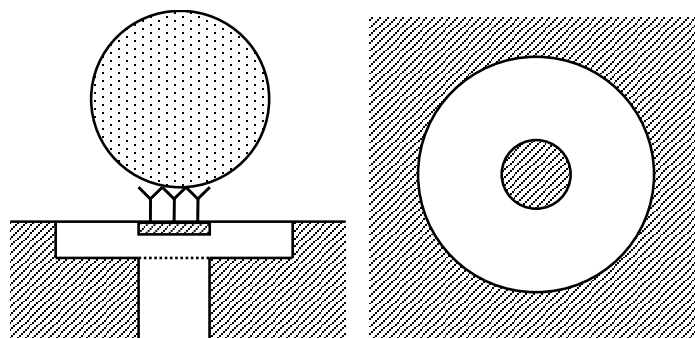


図 5.15 ドーナツ型電極模式図 (左)断面図 (右)平面図.

#### 5.2.4 モデル試料を用いたインピーダンス計測方式デジタル計測の実証

有限要素法を用いたシミュレーションによれば、円盤状の電極の中心に電極直径の  $2/3$  の大きさの球状の測定対象が存在すると、溶液抵抗成分が10%程度増加する。このことを実測により確かめるため、直径  $9\mu\text{m}$ ,  $37.5\mu\text{m}$ ,  $100\mu\text{m}$  の電極と直径  $6\mu\text{m}$ ,  $25\mu\text{m}$ ,  $90\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズを用いて、測定対象の有無によるインピーダンスの変化を測定した。

図 5.16 に実線で示したのが、測定対象が存在しないときのインピーダンススペクトルである。低周波数側から (A) 周波数に反比例する領域、(B) 周波数に依存しない領域、(C) 周波数に反比例する領域の 3 領域が明瞭に区別できた。(A), (B) は電気二重層容量と溶液抵抗の直列回路で表現可能な挙動である。(A), (B) それぞれから求まる容量成分と抵抗成分は表 5.3 の通りである。容量成分は数  $\sim 10\mu\text{F}/\text{cm}^2$  程度であり電気二重層に起因する容量成分と考えられる。ただ、後述する寄生容量を差し引く補正を行っても 3 倍弱の差があり、原因として、電気二重層は不安定であり特に個体差が大きいことと、電気二重層容量はタンパク質の吸着でも変化するように[82, 83]、電極表面状態に強く依存することが考えられる。

抵抗成分は理論的予測のとおり電極直径に反比例した。一方、(C) は容量と抵抗の直列回路ではあらわせない成分であり、等価回路としてはさらに容量を並列に接続した回路で表すことが出来る。新たな容量成分は配線間に生じる容量成分である寄生容量と推測される。以上をまとめると、(A) は電気二重層容量を、(B) は溶液抵抗を、(C) は寄生容量を反映した領域である。 $9\mu\text{m}$  の電極ではの電極では、(A) と (C) は明瞭に観察されたが (B) はやや不明瞭であった。これは、電極の微小化により電極表面の容量成分が減少し寄生容量と近くなり、(B) の境界が曖昧になったためと考えられる。



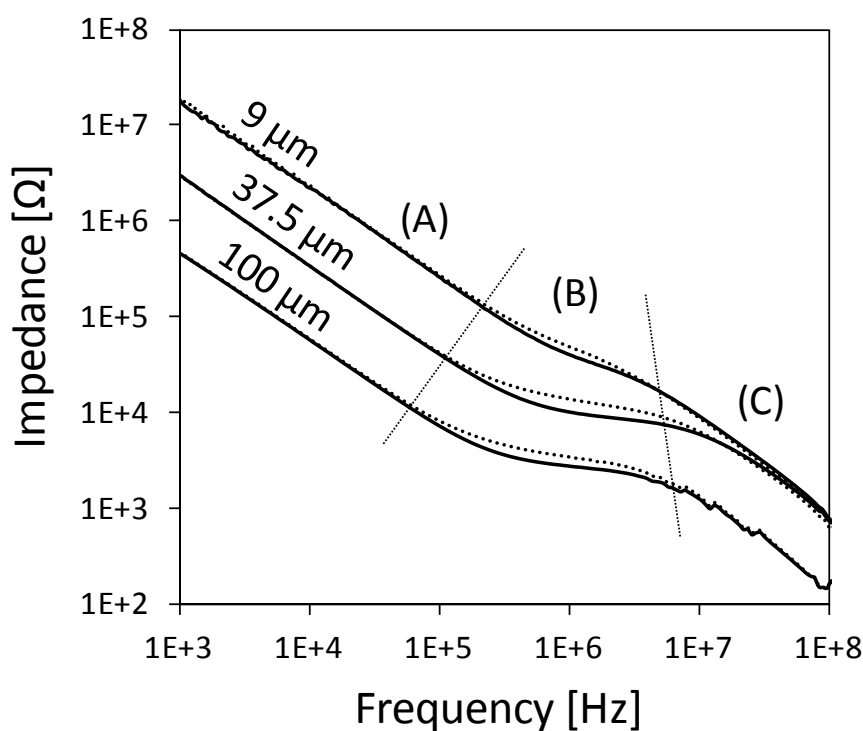


図 5.16 微小電極のインピーダンススペクトル.

表 5.3 微小電極の容量成分と抵抗成分.

電極直径	容量成分	寄生容量補正後	抵抗成分
9 $\mu\text{m}$	6.8 pF (12 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	4.9 pF (8.6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	30 k $\Omega$
37.5 $\mu\text{m}$	46 pF (4.2 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	46 pF (4.2 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	9 k $\Omega$
100 $\mu\text{m}$	280 pF (3.6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	268 pF (3.4 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )	3 k $\Omega$

直径  $6\mu\text{m}$ ,  $25\mu\text{m}$ ,  $90\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズを測定対象として、測定対象の存在によるインピーダンス変化を測定した。図 5.16 に示すように、いずれの電極においても (B) の領域でインピーダンスの増大がみられ、(A), (C) の領域ではほとんど変化が見られなかった。これは、シミュレーションで予測された、測定対象の存在による溶液抵抗成分の増大と一致する結果である。インピーダンスの変化率を図 5.17 に示した。やはり (B) の領域でインピーダンスが増大しており、最大値は 15~35%であった。シミュレーションによる予想の 10% よりも大きい原因は、シミュレーションでは電極と測定対象の間に 10nm 程度のギャップを設けたのに対し、実測では電極とポリスチレンビーズが接触していたことが一因として考えられる。また、直径  $6\mu\text{m}$  と  $25\mu\text{m}$  の電極では絶縁体による被覆で電極直径を規定したため、絶縁体の厚みの  $4.5\mu\text{m}$  の側壁が存在する状態となっていた。シミュレーションで検証したように側壁が存在すると測定対象によるインピーダンスの変化は増大するため、

この側壁の存在もインピーダンス変化の増大に寄与したと考えられる。シミュレーションとの整合性についてより詳細な検討は今後の課題である。

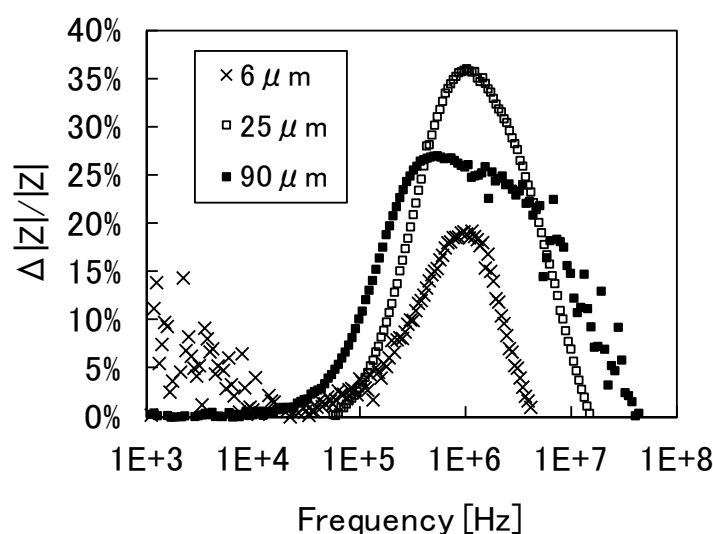


図 5.17 測定対象による微小電極のインピーダンススペクトル変化.

以上のように、実測においても溶液抵抗が支配的な (B) の領域においてのみ、測定対象によるインピーダンスの増大が観測された。一方、実測においては寄生容量の支配的な (C) の領域が出現することが分かった。この寄生容量の存在のため、電極の微小化に伴い (B) の領域が狭くなり、測定対象によるインピーダンスの変化の検出が困難となっていく。寄生容量は 1.7pF であり、電気二重層容量を  $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  とするとこれは直径  $4.6 \mu\text{m}$  の電極に相当し、測定対象は電極直径の  $2/3$  とすると  $3.1 \mu\text{m}$  が現状のインピーダンス測定系での測定限界と見積もられる。寄生容量成分は配線長を短くすることで低減できるため、測定回路を一体化した半導体チップにより測定限界を下げる可以降低。別の方法としては、電極の電気二重層容量を増大させることもありうる。シミュレーションを行ったように箱型電極により電気二重層容量を増大させ、 $f_r$  を約 1 桁低減することができる。

以上をまとめると、

- 1) 有限要素法を用いたシミュレーションで予想されたように、測定対象の存在により溶液抵抗成分が増大した。
- 2) 電極を微小化した場合、実測では寄生容量が測定を阻害する主要因となり、現状  $3 \mu\text{m}$  が測定限界と見積もられた。これはインピーダンス測定回路を一体化したチップや箱型形状の電極で解決できる可能性がある。

### 5.3 電流計測を用いたデジタル計数

交流インピーダンス測定法に代えて直流の測定法を用いることで、寄生容量の影響を排除できると考えた。直流の測定には、通常酸化還元物質を添加した溶液での酸化還元電流の測定が用いられ、本報告でもこの酸化還元電流計測法を採用した。交流インピーダンス計測法の場合と同様、まず有限要素法を用いたシミュレーションによる検討を行い、続いて実験による検証を行った。

#### 5.3.1 有限要素法を用いた電流計測方式デジタル計測のシミュレーション

有限要素法を用いた電流計測のシミュレーションには、図 5.18 のモデルを用いた。インピーダンス計測の場合と同様に、電極の直径を測定対象の直径の 1.5 倍、電極と測定対象のギャップは 10nm とした。溶液の拡散定数を代表的な酸化還元物質であるヘキサシアノ鉄の  $667 \mu\text{m}^2/\text{s}$  とした [84]。境界条件は、溶液最上部を一定濃度の  $10 \text{ mmol/L}$ 、電極では電極面積と酸化還元物質濃度の積に比例した酸化還元物質が消費されるものとした。

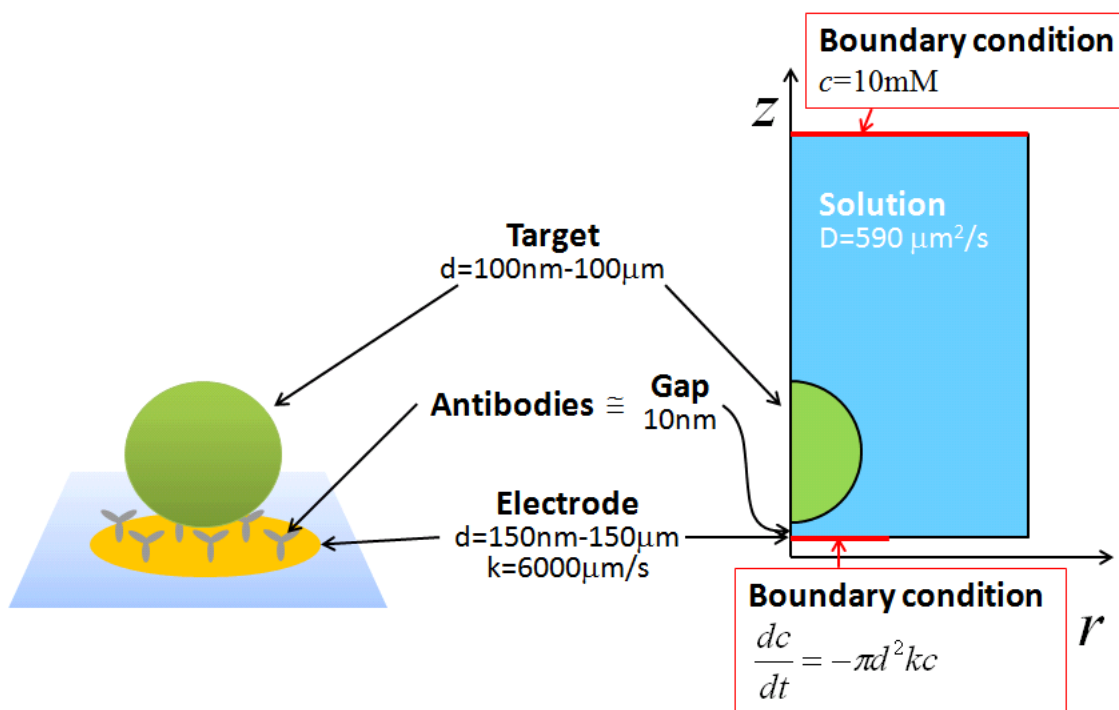


図 5.18 (左)電極上の測定対象のイメージ (右)有限要素法で解析したモデル.

図 5.19 に示したのが、測定対象が存在しない電極での酸化還元物質の消費速度である。実測の酸化還元電流値に相当する。対数プロットで傾き 1 であり、電流は電極直径に比例した。半径  $r$  の円形の電極における定常電流は

$$I = 4nFcDr$$

式 5.4

n: 移動電子数, F: ファラデー定数, c: 酸化還元物質濃度, D: 拡散定数

と半径の一乗に比例すると言われており [85], 整合性がある。式は酸化還元電流が酸化還元物質の拡散律速となっている状態を表しており, 今回のモデルにおいても酸化還元物質の拡散律速となっていることが分かる。

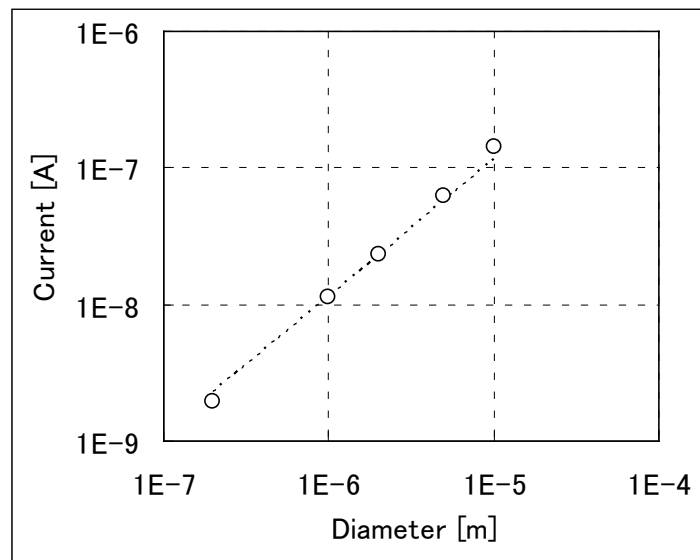


図 5.19 酸化還元電流の電極直径依存性.

測定対象が電極上にある場合の酸化還元電流を求めた。測定対象による酸化還元電流の減少率は電極直径に依存することなく 10%とほぼ一定であった。上記のように今回のモデルでは酸化還元電流は酸化還元物質の拡散律速であるため, 電極上に測定対象があることで酸化還元物質の拡散が阻害され, その結果酸化還元電流が減少したと考えられる。

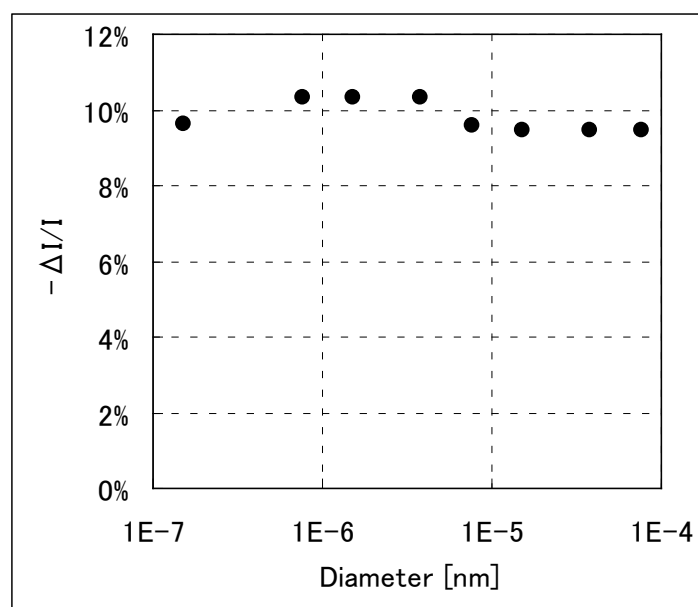


図 5.20 酸化還元電流減少率の電極直径依存性.

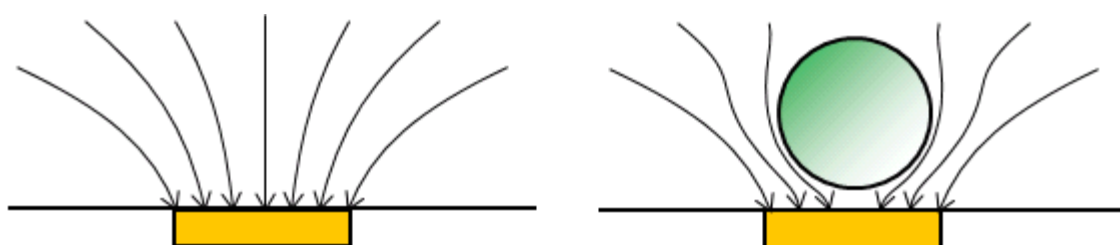


図 5.21 測定対象による酸化還元物質拡散の阻害の模式図.

### 5.3.2 モデル試料を用いた電流計測方式デジタル計測の実証

直径が  $1.5 \sim 135 \mu\text{m}$  の電極を用いて酸化還元電流値を測定した。電圧印加後の電流の時間プロファイルは、電圧印加直後で規格化したところ、図 5.22 のように減少傾向を示した。これは、電流印加直後は電極近傍の酸化還元物質濃度と沖合の酸化還元物質濃度が同じであるが、電極で酸化還元物質が消費されることで電極近傍の酸化還元物質濃度が減少するためである。電流値が安定した電圧印加 30 秒後の電流値を電極直径に対してプロットし、式 5.4 で表される理論値と比較したところ、実験値とよく一致した。式 5.4 は酸化還元電流が酸化還元物質の拡散律速となっている状態を表していることから、微小電極でも電流値が酸化還元物質の拡散律速となることが実験的に確認された。

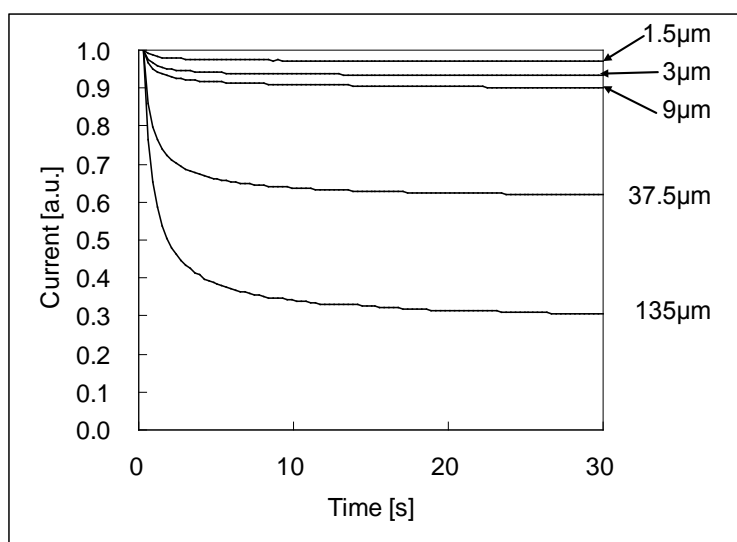


図 5.22 酸化還元電流の時間変化.

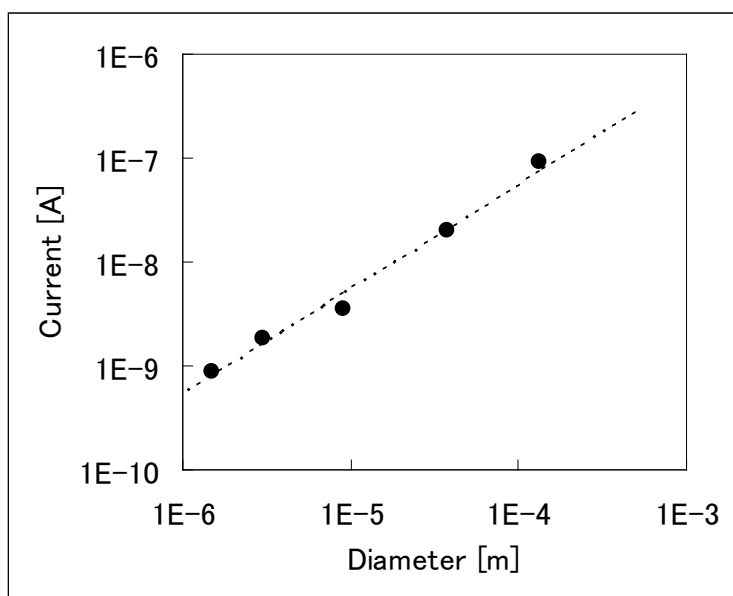


図 5.23 電圧印加 30 秒後の電流値.

続いて、電極上に測定対象を模擬したビーズがある場合、拡散が阻害されて電流が減少することを実験的に確認した。直径  $9\mu\text{m}$  の電極に直径  $6\mu\text{m}$  のビーズが載る場合と、直径  $1.5\mu\text{m}$  の電極に直径  $1\mu\text{m}$  のビーズが載る場合を観測した結果を図 5.24, 図 5.25 に示す。どちらもビーズが電極上に存在することを光学顕微鏡で確認した。直径  $9\mu\text{m}$  の電極周辺に 3 個の直径  $6\mu\text{m}$  ビーズがあるが、電極上にはビーズは存在していない(図 5.24 挿入写真左)。ここに電極上にビーズが配置されることで(図 5.24 挿入写真右), 電流が 15% 程度減少した。減少率はシミュレーションよりも大きな値であったが、これは、電極周辺にある別のビー

ズが壁の働きをしたためであると考えられる。直径  $1.5\ \mu\text{m}$  の電極の場合、測定時間 20 秒付近で電流が非連続的に 10%程度減少した。前後の光学顕微鏡写真を比較すると、不明瞭ではあるが電極近傍に雲のようなものが観測され、電流の減少率がシミュレーションと同じ 10%であったことも加味すると、ビーズが電極上に配置されたことが推測される。

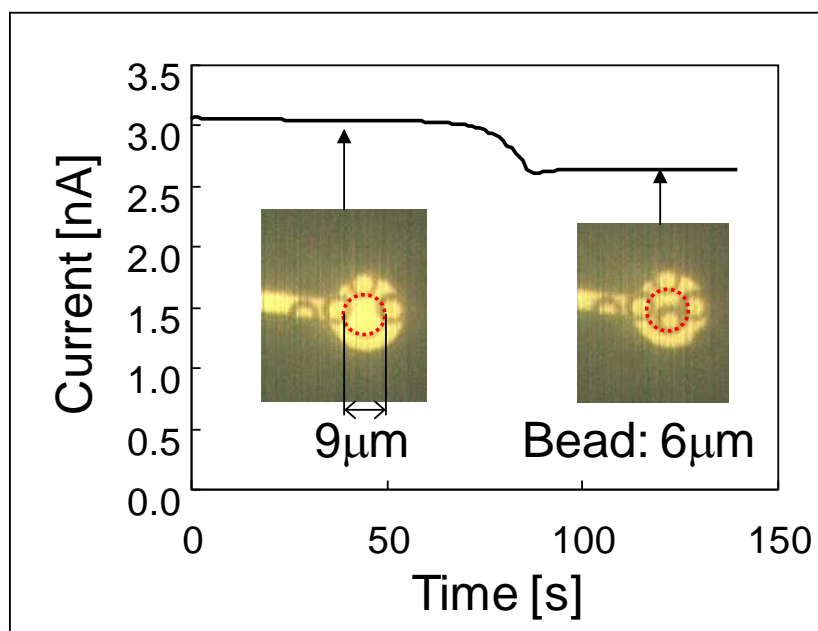


図 5.24 酸化還元電流検出を用いた  $6\ \mu\text{m}$  ビーズの検出.

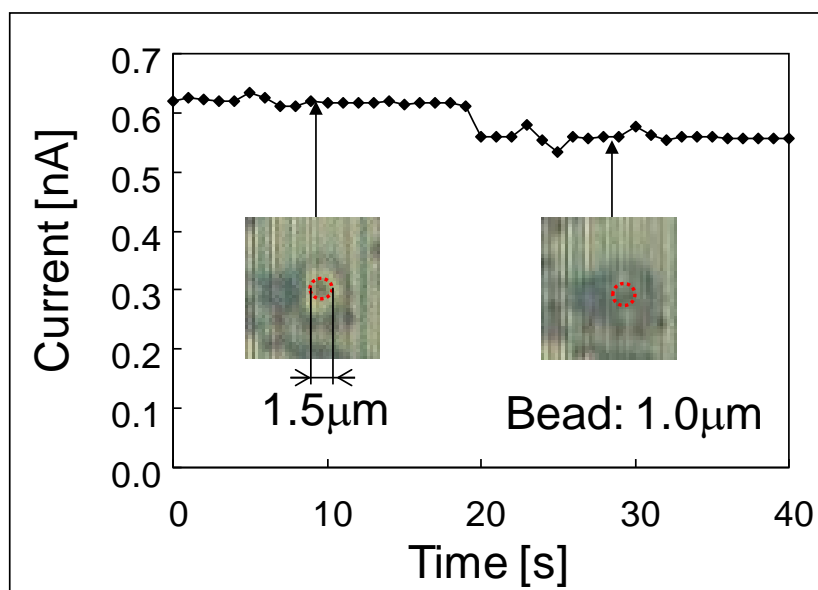


図 5.25 酸化還元電流検出を用いた  $1\ \mu\text{m}$  ビーズの検出.

以上のように、シミュレーションで予想したビーズによる酸化還元物質拡散の阻害効果を酸化還元電流の変化として検出できることが分かった。また、最終目標である直径 100nm の測定対象の場合、式 5.19 から求まる電流値が  $5.7 \times 10^{-11} \text{A}$  であるのに対し、測定装置のバックグラウンド電流が  $5 \times 10^{-12} \text{A}$  程度であるので、検出は可能と見積もられる。

## 5.4 まとめと今後の展望

ウイルス・細菌という 100nm～数  $\mu\text{m}$  の大きさの測定対象をデジタル検出する方式として、測定対象程度の大きさの微小電極を用いたインピーダンス計測法と酸化還元電流計測法を考案した。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(ポリスチレンビーズ)を測定対象として用いた実測による原理実証と課題の抽出を行った。その結果、以下のことを明らかにした。

- 1) インピーダンス計測のシミュレーションにより、微小電極から放射状に発生する電流パスが微小電極近傍に位置する測定対象により遮られることで抵抗値が 10%程度増加することが分かった。
- 2) 微小電極に直径と同程度の高さの側壁を設けることで、検出に寄与しない電流パスを低減(電流パス全体の 2/3)し、抵抗値増加率を 35%に増大させられることが分かった。
- 3) モデル試料を用いてインピーダンス計測を行い、15～35%の抵抗値変化として測定対象の有無を検出できることを実証した。シミュレーションとの差は、微小電極と測定対象のギャップがシミュレーションと実測で異なることが原因と推測した。
- 4) 寄生容量が検出可能な測定対象サイズの下限を決めており、寄生容量 1.7pF の現状では 3  $\mu\text{m}$  の測定対象が限界であることが分かった。
- 5) 酸化還元電流計測のシミュレーションにより、微小電極から放射状に広がる酸化還元物質の拡散が微小電極近傍に位置する測定対象により遮られることで酸化還元電流値が 10%程度減少することが分かった。
- 6) モデル試料を用いて酸化還元電流計測を行い、1  $\mu\text{m}$  の測定対象を 10%の電流値減少として検出し、測定原理を実証した。ノイズレベルからウイルスに相当する 100nm の測定対象が検出可能であることを見出した。

表 5.4 に測定法ごとに検出限界と利点欠点を比較した。インピーダンス計測法は試薬が不要であるため、幅広い環境に適用可能であるものの、配線による寄生容量が原因で検出限界が 3  $\mu\text{m}$  である。これに対し、酸化還元電流計測法は寄生容量の影響が無く、100nm まで測定できる見通しが得られている。但し、試薬を溶液に添加する必要があること、夾雑物の酸化還元の影響を受けることが課題である。インピーダンス計測法における寄生容量



の影響は、測定回路一体化により配線長を短くすることで低減でき、その場合検出限界を100nmまで小さくできる可能性がある。

表 5.4 デジタル検出方式の比較.

		インピーダンス計測法	酸化還元電流
検 出 限界	目標	100nm	100nm
	実測	6 $\mu$ m	1 $\mu$ m
	推定	3 $\mu$ m	<100nm
利点		試薬が不要	寄生容量の影響なし
欠点		寄生容量の影響あり	試薬が必要 夾雑物の反応が妨害要因
対策案		回路一体化による寄生容量の低減	微細流路技術を用いた試薬の供給

## 6 章 結論

本論文では、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、臨床医学的に重要性の高い生体物質であるイオン、タンパク質、DNA、細菌・ウイルスを測定対象として、光学系を用いない小型で耐久性のあるセンサである電気化学バイオセンサに関する研究を報告した。その際、現在主流である電流計測法を用いた電気化学バイオセンサでは電極面積のばらつきが測定ばらつきを生じることが課題であり、微細化によりその影響は増大すると考えた。そこで、電極面積のばらつきの影響を受けない電位差計測方式に取り組み、イオンセンサ、酵素センサ、DNA センサの研究に取り組んだ。また、電流計測法の課題をアナログ計測による測定ばらつきととらえ、デジタル計測を用いた細菌・ウイルス計測に向けた研究に取り組んだ。

2 章では、電位差計測法を用いるイオンセンサであるイオン選択電極において、微細化および集積化を実現する技術である固体接触型イオン選択電極(固体電極)では、電位の発生機構が不明確であるという課題に取り組んだ。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。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。

3 章では、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%に相当する 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。

4 章では、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定した。

5 章では、ウイルス・細菌の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  $\mu$  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  $\mu$  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、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と推定した。

## 7 章 今後の展望

電気化学センサは電極と測定溶液の界面における電気化学反応を用いたセンサであるため、電気化学センサの性能は界面の設計に大きく依存する。今回の研究を界面の観点で俯瞰すると、2章のイオン吸蔵物質を用いた固体イオン選択電極の研究では、イオン選択膜と内部電極の界面電位を安定化させるために、固有の電位でイオンを吸蔵放出するという性質を有するイオン吸蔵物質を内部電極に用いた。3章の酸化還元電位計測方式の酵素センサの研究では、電極と溶液の界面電位の変化として酵素反応産物である酸化還元物質を検出するために、金電極に酸化還元物質を固定化した。4章の延長ゲート型 FET センサを用いた DNA センサの研究では、DNA ハイブリダイズおよび伸長反応を電極の界面電位変化として検出するために、金電極表面に DNA を固定化した。すなわち、材料技術と表面修飾技術を活用して、電気化学センサの界面に所望の特性を付与することが、電気化学センサの研究において重要となる。

電気化学センサにおける材料技術の潮流の一つとして触媒材料が挙げられる。酵素センサは酵素の選択的触媒能力を活用した電気化学センサである。酵素は特に生体物質に対して高い選択性を有する利点がある一方、タンパク質であるため無機材料に比べて保存期間が短く、また熱により活性を失う。これらの欠点を補うことができれば、センサコストを低減でき、加熱滅菌によりセンサの生体埋め込みが可能になる。無機材料である貴金属(金、白金)や金属酸化物(酸化ニッケル、酸化銅)を用いたグルコースセンサの研究が行われており [86-89]、これが実現すれば前述した欠点を補った酵素センサとなり得る。現在の技術的な課題は、過電圧が大きい(酸化のために理論値よりも高い電圧を印加する必要がある)こと、酵素に比べて選択性が低いことである。このような材料探索を行う場合、大きな市場を対象とした電気化学関連の研究を参考にするのがよい。例えば、本研究においては、リチウムイオン二次電池という大きな市場に対して行われているイオン吸蔵物質の研究を参考にした。触媒の場合は、低炭素社会に向けた燃料電池や水素生成の研究を参考にするのがよいと考える。

半導体技術も電気化学センサの発展に寄与する技術である。本研究で用いた FET センサは言うまでもなく半導体技術を用いたセンサであり、ハンドヘルド型の血液分析装置 [22] や DNA シーケンサ [55] にも半導体センサが用いられている。このような半導体回路技術の側面以外にも、半導体プロセスを用いた微細加工技術も電気化学センサに貢献する技術である。5章のデジタル計数方式ウイルス細菌センサでは、測定対象であるウイルス(約 100nm)や細菌(約  $1\mu\text{m}$ )と同程度の大きさの電極を用いる必要がある。このような電極の作製には半導体プロセス技術を用いることを想定している。また、本論文で扱った電位差計測法は原理的に信号が電極面積に依存しないため、微細加工技術との相性は良い。微細化の利点

の一つは測定液量の微量化であり，例えばより少ない血液での血液検査に貢献できる。また，センサを微細化したうえでアレイ化することで，イメージングや多項目化が可能となる。3章でも述べたように，アレイ化の取り組みは既に開始している[54]。

生体試料の測定においては，今回の研究では対象としなかったものの，試料の前処理技術が必要となることが多い。例えば，血液検査を行う際は，血球と血漿に分離し，血漿中の成分を分析する。血球を分離する理由のひとつに血球の有する光の吸収があり，光を用いた計測ではこれが妨害要因となるためである。一方，電気化学バイオセンサは，センサ自身の有する選択性により前処理を不要もしくは低減することができる。実際，市販のグルコースセンサにおいて，血球の分離は不要である。そのため，電気化学バイオセンサを用いることで前処理の負担を減らし，システム全体を小型にすることができる。電気化学バイオセンサの応用においては，前処理まで考慮したシステムの設計が欠かせない。

以上のように，電気化学バイオセンサの今後の展望として，材料技術と表面修飾技術を用いて所望のセンサ特性を実現し，半導体技術と微細加工技術を用いて回路混載のアレイ化センサとし，前処理を含めたシステムとしてデバイス化していくことが見出された。これらの技術が進展していくことで，将来的には，血液一滴から，様々なイオン，低分子，タンパク質，遺伝子，ウイルス，細菌を一度に測定するようなデバイスも実現できる。

## 8 章(付録) 研究方法

### 8.1 イオン吸蔵物質を用いた固体接触型イオン選択電極

#### 8.1.1 試薬

イオン選択電極の実験に用いた試薬を表 8.1 に示す。

表 8.1 試薬リスト.

試薬	メーカー
Calcium chloride	2
Calcium hexacyanoferrate(II)	2
Carbon coated lithium iron phosphate	1
Copper(II) nitrate trihydrate	2
6,6-Dibenzyl-14-crown-4	2
Diethyl sebacate	2
Graphite powder (SFG6)	4
Iron(III) chloride	2
Lithium chloride	2
Magnesium nitrate	2
N,N-Dicyclohexyl-N',N'-dioctadecyl-3-oxapentanediamide	2
N-methylpyrrolidone	2
Nickel(II) nitrate hexahydrate	2
Nitronium tetrafluoroborate	2
2-nitrophenyl octyl ether	2
Poly(vinyl chloride)	2
Polyvinylidene difluoride (Solef S5130)	3
Potassium chloride	2
Potassium hexacyanoferrate(II)	2
Potassium hexacyanoferrate(III)	2
Potassium sulfate	2
Potassium tetrakis(4-chlorophenyl) borate	2
Sodium chloride	2
Sodium hexacyanoferrate(II)	2
Sodium sulfate	2
Sodium tetraphenyl borate	2
4-tert-Butylcalix[4]arene-tetraacetic acid tetraethyl ester	2
Tetrahydrofuran	2
Valinomycin	2

メーカーコード: 1. MTI (Richmond, U.S.A), 2. Sigma-Aldrich (Missouri, U.S.A.), 3. Solvay (Brussels, Belgium), 4. TIMCAL Graphite and Carbon (Bodio, Switzerland)

## 8.1.2 電極作製

### 8.1.2.1 リチウム選択電極

鉄リン酸リチウム (LFP) はリチウムイオンの吸蔵により  $\text{Li}_x\text{FePO}_4$  の  $x$  が 0~1 の間で変化する。電流印加により  $x=0.5$  とすることで IC-SC-ISE で高い電位安定性が得られることが報告されている[REF]。本研究では,  $x=0.5$  とした上, その個体差を低減することを目的に,  $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$  を化学的に調製した。10ml の乾燥アセトニトリルに真空乾燥させた 10mmol 相当の LFP 粉末 ( $\text{Li}_{1.0}\text{FePO}_4$ ) を分散させ, 酸化剤である 0.5M  $\text{NO}_2\text{BF}_4$  10ml を滴下して加え, 1 時間攪拌した後にアセトニトリルで 3 回洗浄し,  $110^\circ\text{C}$  で乾燥させた。

LFP を塗布した電極 (LFP 電極) は次の方法で作製した。 $\text{Li}_{0.5}\text{FePO}_4$ , Graphite, NMP に溶解した PVdF を重量比 LFP:Graphite:PVdF=85:10:5 となるように加え, ホモジナイザーで攪拌してペーストを得た。集電材であるグラファイトシートにペーストを  $90\mu\text{m}$  の厚みで塗布し,  $60^\circ\text{C}$  のオーブンで一晩乾燥させた。直径 10mm に打ち抜き油圧プレスを用いて  $1\times 10^5\text{N}/\text{cm}^2$  の圧力で圧縮した。

リチウム用イオン選択膜 (ISM) は 100mg PVC, 200mg NPOE, 3mg Li-ionophore, 2mg KTpClPB を 3ml THF に溶解し, 直径 34mm のペトリ皿に注いでから一晩乾燥させて作製した。イオン交換のため, 直径 6mm に打ち抜いた ISM を 10mM LiCl 水溶液に一晩浸漬し, その後乾燥させた。

リチウム用固体電極は次の方法で作製した。ISM の片面中央に直径 3mm に打ち抜いた LFP 電極を微量の THF で接着した。LFP 電極を接着した側の縁を外径 6mm の硬質 PVC パイプに微量の THF で接着し, 炭素繊維とエナメル線を用いて ISM に接着した LFP 電極と電気的に接続させた。図 8.1 に固体電極の概形を示す。

リチウム用 IF-ISE は ISM を外径 6mm の硬質 PVC パイプに微量の THF で接着し, 内部を 10mM LiCl 水溶液で満たしてから IRE として銀塩化銀電極を差し込んで作製した。

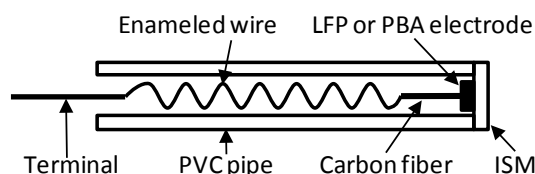


図 8.1 固体電極の概形.

#### 8.1.2.2 カリウム選択電極

カリウムを吸蔵したプルシアンブルー類似体 (PBA) である鉄ヘキサシアノ鉄カリウム (K-FeHCF), ニッケルヘキサシアノ鉄カリウム (K-NiHCF), 銅ヘキサシアノ鉄カリウム (K-CuHCF) は, 表 8.2 に記した 2 種の溶液から作製した。70°C のオイルバスに浸したフラスコに 100 mL の水を準備しておき, 攪拌および超音波印加しながら, ペリスタポンプを用いて各溶液 200 mL ずつを 2.5 mL/min で同時に滴下した。即座に結晶が得られ, 得られた結晶は 4000 rpm の遠心分離により回収し, 水およびメタノールで各 2 回洗浄した後に乾燥させた。

LFP 電極と同様の手順で各 PBA の電極を作製し, カリウム ISM (133 mg PVC, 267 mg DOS, 4 mg Valinomycin, 1 mg KTpClPB) を接着し, 同様の手順でカリウム用 IC-SC-ISE を得た。カリウム用 IF-ISE も同様の手順で作製した。

表 8.2 プルシアンブルー類似体合成の溶液組成。

目的化合物	溶液 1	溶液 2
K-FeHCF	50 mM $K_4[Fe(CN)_6]$	100 mM $FeCl_3$
K-NiHCF	50 mM $K_3[Fe(CN)_6]$	100 mM $Ni(NO_3)_2$
K-CuHCF	50 mM $K_3[Fe(CN)_6]$	100 mM $Cu(NO_3)_2$
Na-NiHCF	50 mM $Na_4[Fe(CN)_6]$	100 mM $Ni(NO_3)_2$
Ca-NiHCF	50 mM $Ca_2[Fe(CN)_6]$	100 mM $Ni(NO_3)_2$

#### 8.1.2.3 ナトリウム選択電極

ナトリウムを吸蔵した PBA であるニッケルヘキサシアノ鉄ナトリウム (Na-NiHCF) を Table 2.2 に記した 2 種の溶液から, 同様の手順で作製した。LFP 電極と同様の手順で Na-NiHCF の電極を作製し, ナトリウム ISM (100 mg PVC, 200 mg NPOE, 6 mg Na-ionophore, 1.4 mg NaTFP) を接着し, 同様の手順でナトリウム用 IC-SC-ISE を得た。ナトリウム用 IF-ISE も同様の手順で作製した。

#### 8.1.2.4 カルシウム選択電極

カルシウムを吸蔵した PBA であるニッケルヘキサシアノ鉄カルシウム (Ca-NiHCF) を Table 2.2 に記した 2 種の溶液から, 同様の手順で作製した。LFP 電極と同様の手順で Ca-NiHCF の電極を作製し, カルシウム ISM (133 mg PVC, 267 mg NPOE, 4 mg Ca-ionophore, 1.1 mg KTpClPB) を接着し, 同様の手順でカルシウム用 IC-SC-ISE を得た。カルシウム用 IF-ISE も同様の手順で作製した。



### 8.1.3 電極評価方法

#### 8.1.3.1 電位計測

ガラスセルに1M硝酸カリウムもしくは1M酢酸リチウム(カリウム測定時のみ)を外部液に充填したダブルジャンクション型銀塩化銀参照電極(Orion™ 900200 Sure-Flow™, Thermo Scientific)と共に評価したい ISE と試料液を入れ, 高入力インピーダンス電圧計(EMF-16 potentiometer, Lawson Labs, Inc.)で電位を計測した。リチウム, ナトリウム, カリウム, カルシウム ISE の応答カーブ測定にはそれぞれ LiCl, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> 水溶液を, 選択性の測定には 100 mM LiCl, NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> 水溶液を用いた。

#### 8.1.3.2 電流制御分極試験

ガラスセルに1M硝酸カリウムもしくは1M酢酸リチウム(カリウム測定時のみ)を外部液に充填したダブルジャンクション型銀塩化銀参照電極および白金電極と共に評価したい PBA 電極と試料液を入れ, ポテンシostat(Bio-Logic VMP-3 Potentiostat, Bio-Logic)で電流印加(±10μA)に対する電位応答を評価した。試料液は, K-FeHCF, K-NiHCF, K-CuHCF には 500 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を, Na-NiHCF には 500 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を, Ca-NiHCF には 1 M CaCl<sub>2</sub> を用いた。

## 8.2 酸化還元電位計測方式の酵素センサ

### 8.2.1 試薬

実験に使用した試薬及び酵素を表 8.3 に示す。また, 試薬溶液の調製には, 全て純水製造装置(Model WD500, ヤマト科学製)で処理した脱イオン水(18.2MΩ・cm 以上)を使用した。

表 8.3 試薬リスト.

試薬名	メーカー名
塩化カリウム(KCl)	和光純薬
りん酸二水素カリウム(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	和光純薬
りん酸水素二ナトリウム(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	和光純薬
塩化ナトリウム(NaCl)	和光純薬
炭酸水素ナトリウム(NaHCO <sub>3</sub> )	和光純薬
水酸化ナトリウム(NaOH)	和光純薬

硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	和光純薬
硫酸アンモニウム ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	和光純薬
水酸化カリウム (KOH)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
11-ヒドロキシ-1-ウンデカンチオール (11-HUT)	同仁化学
11-フェロセニル-1-ウンデカンチオール (11-FUT)	同仁化学
エタノール	和光純薬
フェリシアン化カリウム ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )	和光純薬
フェロシアン化カリウム ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )	和光純薬
コレステロール	Sigma-Aldrich
ジアホラーゼ	Sigma-Aldrich
コレステロール脱水素酵素	天野エンザイム
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)	和光純薬
OP/Carbamate 測定キット	米アブラクシス

### 8.2.2 修飾金電極の作製

金とチオールの反応を利用して、末端が酸化還元物質である 11-FUT を FET センサの金電極に固定化した。11-FUT のエタノール溶液 ( $100\ \mu\text{M}$ ) に FET センサを 1 時間浸漬し、エタノールで 2 回洗浄した。

### 8.2.3 FET センサを用いた酸化還元電位計測

FET センサを用いた電位計測は、半導体パラメータアナライザ (4155C, Agilent) を用いて行った。溶液中の測定は、ゲート側に銀塩化銀参照電極 (RE-1B, BAS) を接続し、FET センサを測定溶液に浸漬した状態でドレイン電流-ゲート電圧特性を測定した。

フェリシアン/フェロシアン比に対する電位応答では、 $100\text{mM}$  硫酸ナトリウムを含む合計濃度  $10\text{mM}$  のフェリシアン/フェロシアン水溶液 (フェリシアン/フェロシアン比=9999:1, 999:1, 99:1, 9:1, 1:1, 1:9, 1:99, 1:999, 1:9999) を測定溶液として用いた。

コレステロール測定では、参照電極を有する FET センサを用いた。コレステロール測定用の試薬は、2% Triton X-100, 4% ウシ血清アルブミン,  $38\ \text{mg/ml}$  コレステロール脱水素酵素,  $2.3\ \text{mg/ml}$  ジアホラーゼ,  $0.7\ \text{mg/ml}$  of NAD,  $60\ \text{mM}$  フェリシアン化カリウムを含む  $0.3\ \text{M}$  トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) とした。ウマ血清にコレステロール溶液を添加し、コレステロール濃度を 33, 58, 83, 133,  $233\ \text{mg/dL}$  とした資料を準備した。 $2.5\ \mu\text{L}$  の試料液と  $8\ \mu\text{L}$  の試薬を混合し 10 分反応させてから FET センサ上に滴下して電位計測を行った。

#### 8.2.4 アセチルコリンエステラーゼを用いた農薬測定

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を用いた農薬測定は、吸光度測定、FET センサによる測定共に OP/Carbamate 測定キット付属の試薬を用いた。測定キットには、以下の試薬が含まれている。

- ・測定用バッファー
- ・陰性コントロール (ダイアジンなし)
- ・陽性コントロール (5ppb ダイアジノン含有)
- ・酸化剤
- ・中和剤
- ・酵素 (AChE)
- ・基質 (アセチルチオコリン)
- ・発色剤 (DTNB)
- ・反応停止剤

これらの試薬を以下の手順で 200  $\mu$  l チューブ内にて反応させた。尚、反応は室温 (25°C) で行った。

測定用バッファー 50  $\mu$  l を準備。  
陰性コントロールまたは陽性コントロール 10  $\mu$  l を添加・攪拌。  
酸化剤 8  $\mu$  l を添加・攪拌し 5 分間インキュベート。  
中和剤 8  $\mu$  l を添加・攪拌し 5 分間インキュベート。  
酵素 8  $\mu$  l を添加・攪拌し 15 分間インキュベート。  
基質 8  $\mu$  l を添加・攪拌。発色剤 8  $\mu$  l を添加・攪拌し 15 分間インキュベート。但し、FET センサによる測定では発色剤は添加せずに 15 分間インキュベート。  
反応停止剤 8  $\mu$  l を添加・攪拌。

吸光度測定の場合、反応液の吸光度スペクトルを分光光度計 (U-1800, 日立ハイテクノロジーズ) で測定した。FET センサによる測定では次節の方法で測定を行った。

#### 8.2.5 FET センサを用いたチオール化合物測定法

金電極に 11-FUT を固定化した FET センサ (11-FUT 固定化 FET センサ) を用いて、チオコリン濃度の測定を行った。まず、11-FUT 固定化 FET センサを初期化液 (0.1M 硫酸ナトリウム, 10mM フェリシアン化カリウム, 0.1mM フェロシアン化カリウム) に 3 分間浸漬し、11-FUT のフェロセン基の酸化還元状態を一定の状態にした。純水で洗浄、エアブローをした後、測定液 10  $\mu$  l を金電極上に滴下し 5 分間反応させ、11-FUT のフェロセン基を測定液中のチオコリン濃度に応じた分だけ還元した。再び純水で洗浄して、0.1M 硫酸ナトリウム水溶液に 10 秒漬け共洗いし、10ml 0.1M 硫酸ナトリウム水溶液中でドレイン電流を 1 秒間隔で 60

秒間測定した。測定後、11-FUT 固定化 FET センサを再び初期化液に浸漬し、同一センサチップで反復測定を行った。

ドレイン電流の測定には半導体パラメータアナライザ(4155C, Agilent)を用いた。10ml 0.1M 硫酸ナトリウム水溶液に参照電極(RE-1C, ビーエーエス)と 11-FUT 固定化 FET センサを共に浸漬し、ファンクションジェネレータ(1940, エヌエフ回路設計ブロック)で周波数 1MHz 0.2Vp-p を重畳した直流成分 0.1V の電圧を参照電極に印加し、ドレインソース間電圧 ( $V_{DS}$ ) 1V におけるドレイン電流 ( $I_D$ ) を測定した。測定したドレイン電流はあらかじめ測定した  $V_{DS}=1V$  におけるゲート電圧ードレイン電流 ( $V_G-I_D$ ) 曲線から金電極の表面電位に変換した。

AChE を用いた農薬測定に先立って、チオール化合物に対する金電極表面電位の検量線を作成した。チオール化合物としてリン酸緩衝液に溶解した 6-HHT を用い、濃度は  $10^{-6} \sim 10^{-3}M$  まで一桁おきとした。検量線作成後、AChE を用いた農薬測定のために前節の方法で反応させた反応液を測定した。検量線作成から AChE を用いた農薬測定まで測定には同一の 11-FUT 固定化 FET センサを用いた。

## 8.3 延長ゲート型 FET センサを用いた DNA センサ

### 8.3.1 試薬

実験に使用した試薬及び酵素を表 8.4 に示す。また、試薬溶液の調製には、全て純水製造装置 (Model WD500, ヤマト科学製) で処理した脱イオン水 ( $18.2M\Omega \cdot cm$  以上) を使用した。

表 8.4 試薬リスト.

試薬名	メーカー名
塩化ナトリウム (NaCl)	和光純薬
硫酸ナトリウム ( $Na_2SO_4$ )	和光純薬
エチレンジアミンテトラ酢酸	
水酸化カリウム (KOH)	Sigma-Aldrich
6-フェロセニル-1-ヘキサチオール (6-FHT)	同仁化学
エタノール	和光純薬
トリス	Invitrogen
DNA ポリメラーゼ I, Klenow Fragment, EXO-, Cloned	フナコシ
ピロリン酸	Sigma-Aldrich
アピラーゼ	Sigma-Aldrich
酢酸マグネシウム	Sigma-Aldrich

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
2'-Depxyadenosine 5'-O-(1-Thiotriphosphate), Sodium	Amersham Biosciences
2'-Deoxythymidine 5'-Thiotriphosphate, Sodium	Amersham Biosciences
2'-Deoxyguanosine 5'-Thiotriphosphate, Sodium	Amersham Biosciences
2'-Deoxycytidine 5'-Thiotriphosphate, Sodium	Amersham Biosciences
ウシ血清アルブミン	タカラバイオ

### 8.3.2 評価用金電極

DNA プローブの金表面への固定化及び固定化 DNA プローブの一塩基伸長反応での評価は、自作した評価用金電極を使用した。評価用金電極は、SiO<sub>2</sub>/Si ウエハ上にスパッタ法で作成した。接着層としてニッケル・銅を 400nm, クロムを 70nm 積層した上に、100nm の金の膜を形成した。

### 8.3.3 固定化 DNA プローブの評価

#### 8.3.3.1 DNA プローブの精製

充填剤 (Sephadex G-10, Amersham Bioscience) をカラム (C10/10 column, Amersham Bioscience) に充填し、精製カラムとした。充填剤は 3.6g を約 20mL の溶離液 (10mM Tris-HCl, pH7.2) に分散し室温で 3 時間放置した後に、約 10mL の上清を 5 回交換し、微粒子やゴミを取り除いた。調製した充填剤をカラムにゆっくりと攪拌しながら加えた。30mL の溶離液を 2 回流してカラムを平衡化した。

DNA プローブ (5'-HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CACATCACAGTTTCACTT-3', ALDH2 遺伝子と相補的な配列) は、初期状態では保存中の酸化を防止するため保護基がついた状態である。DNA プローブとして使用するにはチオール基を活性化するための脱保護を行う必要がある。脱保護操作は次の通り行った。保護基のついた DNA プローブを TE バッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で 100 μM に調製し、調整した溶液に等量の 80mM DTT 溶液を加え、室温で 16 時間還元処理を進めた。還元処理後、溶離液で 2mL にメスアップし、準備しておいた精製カラムに添加して精製を行った。DNA プローブが溶出される 500 μL ~ 1250 μL の分画を回収し、DNA 由来の吸収である 260nm の吸光度を測定し濃度を求めた。

#### 8.3.3.2 DNA プローブの固定化

金とチオールの結合を利用し、アルカンチオール (HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-OH) および DNA プローブを金電極表面に固定化した。アルカンチオールのみの固定化は、アルカンチオールのエタノール溶液 (1mM) に金電極を 1 時間浸漬して行った。その後、エタノールで数回洗浄し、余分な

アルカンチオールを取り除いた。DNA プローブの固定化は、DNA プローブ  $2\mu\text{M}$  を含む固定化溶液 (10mM Tris-HCl, 5mM Mg, pH7.2) に金電極を 1 時間浸漬して行った。その後純水で数回洗浄した。DNA プローブの固定化密度を制御するため、DNA プローブとアルカンチオールを 1:2~1:100 のモル比で混合した液を用いて固定化を行った。DNA プローブの濃度は  $2\mu\text{M}$  に固定し、アルカンチオールの濃度を变化させた。金電極の浸漬時間は 1 時間とした。

### 8.3.3.3 サイクリックボルタンメトリによる DNA プローブの評価

結合したアルカンチオール分子の量は、アルカリ溶液中で負電位を印加することで生じる電気化学的な脱離反応により測定した。この脱離反応は、



のように電子の移動を伴うため、脱離によって生じる電流を積分することで、固定化されていたアルカンチオールの量を求めた。電流の積分値を  $Q[\text{C}]$ 、アボガドロ数を  $N_A[\text{molecule/mol}]$ 、ファラデー定数を  $F[\text{C/mol}]$ 、電極面積を  $A[\text{cm}^2]$  とて、金電極表面の固定化密度  $\Gamma[\text{molecule/cm}^2]$  を、

$$\Gamma = \frac{QN}{FA} \quad \text{式 8.2}$$

で求めた。0.5M 水酸化カリウム水溶液に測定する電極を作用電極として、白金電極 (BAS 製) を対向電極として、銀塩化銀参照電極 (RE-1C, BAS 製) を参照電極として配置し、ポテンシオスタット (ALS 611B, BAS 製) を用いて -0.1~-1.4V の区間を 0.1V/s の掃引速度で測定した。

### 8.3.3.4 生物発光法を用いた一塩基伸長反応

固定化した DNA プローブへのターゲット DNA のハイブリダイゼーションは、一塩基伸長反応を生物発光法で検出することで確認を行った。この方法はターゲット DNA の吸着では反応が起こらず、プローブ DNA とハイブリダイズした場合にのみ反応が起きる選択性の高い測定方法である。

#### (a) 反応基質調整法

基質溶液に含まれるピロリン酸は生物発光を生じるため取り除く必要がある。そこで、測定直前にピロフォスファターゼ酵素によりピロリン酸を分解し、ゲルろ過カラム (NAP-5 column, Amersham Biosciences) で取り除いた。

基質溶液 (50mM dNTP)  $50\mu\text{L}$  とピロフォスファターゼ溶液 ( $1\text{U}/\mu\text{L}$ )  $10\mu\text{L}$  とバッファー溶液 (100mM Tris-酢酸, 5mM Mg, 0.5mM EDTA, 1mM DTT, pH7.75)  $440\mu\text{L}$  を混合して室温で 5 分間反応させた。10mL のバッファー溶液で平衡化したゲルろ過カラムに反応溶液  $500\mu\text{L}$  を

添加し、その後バッファー溶液 2mL を追加で添加し、溶出液 1.3～2.0mL の文画を回収した。回収したピロリン酸を除去した基質溶液を以下の実験では使用した。

#### (b) 固定化 DNA プローブを用いた一塩基伸長反応

DNA プローブを固定化した金電極をターゲット DNA の溶液 ( $3.65 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{L}$ , 塩基配列:  $5' \text{-GCATACACTA AAGTGAAAAC TGTGAGTGTG-3'}$ ) に浸漬し、 $50^\circ\text{C}$  30 分でハイブリダイゼーションさせた。その後水冷してから、ハイブリダイゼーションバッファー ( $10\text{mM}$  Tris-HCl,  $5\text{mM}$  Mg,  $\text{pH} 7.2$ ) で洗浄 (3 分浸漬を 2 回) した。

一塩基伸長の発行測定は、ハイブリダイゼーションを行った金電極上に発光試薬 ( $100\text{mM}$  Tris-酢酸,  $\text{pH} 7.75$ ,  $0.5\text{mM}$  EDTA,  $5\text{mM}$  Mg,  $0.1\%$  ウシ血清アルブミン,  $1\text{mM}$  DTT,  $0.2\text{U}/\mu\text{L}$  DNA ポリメラーゼ,  $1.0\text{U}/\text{mL}$  ATP sulfurilase,  $2\text{mg}/\text{mL}$  Luciferase)  $8 \mu\text{L}$  を吐出して発光検出装置 (検出器 サイドオン型光電子増倍管, R6357, 浜松ホトニクス) で計測を行った。検出装置からの出力は電流・電圧変換増幅器 (C2719, 浜松ホトニクス) および AD コンバータ (ADC-16, Picotech) で測定した。

### 8.3.4 FET センサによる DNA 計測

DNA プローブ固定化 FET センサのゲート電圧に対する電流・電圧特性の測定は、半導体パラメータアナライザ (4155C, Agilent) を用いて行った。溶液中の測定は、ゲート側に銀塩化銀参照電極 (RE-1B, BAS) を接続し、ハイブリダイゼーションバッファー ( $10\text{mM}$  Tris-HCl,  $5\text{mM}$  Mg,  $\text{pH} 7.2$ ) 中で行った。FET センサを用いた場合のハイブリダイゼーションおよび伸長反応は、発光計測の場合と同様の条件で行った。

## 8.4 デジタル計数方式ウイルス細菌センサ

### 8.4.1 有限要素法を用いた溶液中微小電極の解析

計算機シミュレーションによる溶液中の微小電極の交流電場および酸化還元電流の解析には、有限要素法解析ソフトの ANSYS を用いた。交流電場解析においては、水、絶縁物、電極の電気的特性として表 8.5 の値を与えた。ただし、側壁付き電極の解析においては、水の抵抗率として  $0.1$  を用いた。境界条件として下部電極に  $1\text{V}$ 、上部電極に  $0\text{V}$  を与え、周波数 ( $1\text{kHz} \sim 10\text{MHz}$ ) をパラメータとして計算を行った。下部電極に流れた電流を求め、逆数を取って微小電極の交流インピーダンスを求めた。

酸化還元電流解析においては、溶液中の拡散定数として  $590 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、下部電極での反応速度として  $6000 \mu\text{m}/\text{s}$  を与え、境界条件として上部電極での酸化還元物質濃度を一定とし計算を行った。下部電極で消費された単位時間当たりの酸化還元物質量を電流に換算した。

表 8.5 シミュレーションパラメータ.

材料	抵抗率 [ $\Omega \cdot \text{m}$ ]	誘電率
水	1	80
絶縁物	$10^8$	1
電極 (電気二重層)	$10^8$	680

#### 8.4.2 試薬リスト

実験に使用した試薬を表 8.6 に示す。また, 試薬溶液の調製には, 全て純水製造装置 (Model WD500, ヤマト科学製) で処理した脱イオン水 ( $18.2 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$  以上) を使用した。

表 8.6 試薬リスト.

試薬名	メーカー名
シリコーンシーラント	東レダウコーニング
トリス (2, 2'-ビピリジル) ルテニウム ( $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ )	Sigma Aldrich
トリプロピルアミン	関東化学
フェリシアン化カリウム ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )	和光純薬
フェロシアン化カリウム ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ )	和光純薬
リン酸水素二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	和光純薬
リン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	和光純薬
塩化カリウム (KCl)	和光純薬
塩化ナトリウム (NaCl)	和光純薬
硫酸ナトリウム	和光純薬

#### 8.4.3 測定装置

実験に使用した測定装置を表 8.7 に示す。

表 8.7 装置リスト.

装置名	メーカー名
4294A プレシジョン・インピーダンス・アナライザ	Agilent
ALS600 電気化学アナライザー	BAS



#### 8.4.4 電極

微小電極として、BAS 製 MAUE 微小金電極、NTT-AT 製金電極チップ、およびシリコン基板金電極チップを用いた。BAS 製 MAUE 微小金電極(図 8.2)は、ガラスのジャケットの先端に直径(d)10~100 $\mu\text{m}$ の金電極が露出したものである。NTT-AT 製金電極チップ(図 8.3)は石英基板に Cr を接着層とした Au パターンが形成されており、所望の開口径の絶縁膜が積層されている。絶縁膜の厚み(h)は 0.75 $\mu\text{m}$ 、開口径(d)は 9~135 $\mu\text{m}$ とした。シリコン基板金電極チップ(同じく図 8.3)は、4 $\mu\text{m}$ 厚のシリコン酸化膜(p-TEOS)を有するシリコン基板に、Al を接着層とした Ti パターンが形成されている。さらに、500nm 厚(h)のシリコン酸化膜(p-TEOS)が積層され、電極部には直径 1.5 $\mu\text{m}$ もしくは 3.0 $\mu\text{m}$ の開口径(d)がある。開口部の Ti 電極には金メッキが施されている。

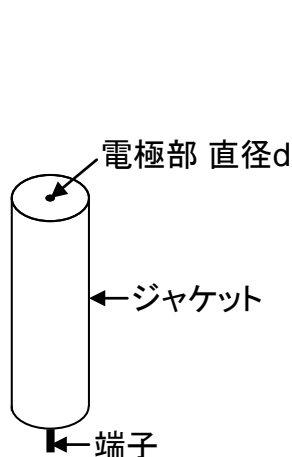


図 8.2 MAUE 微小金電極模式図.

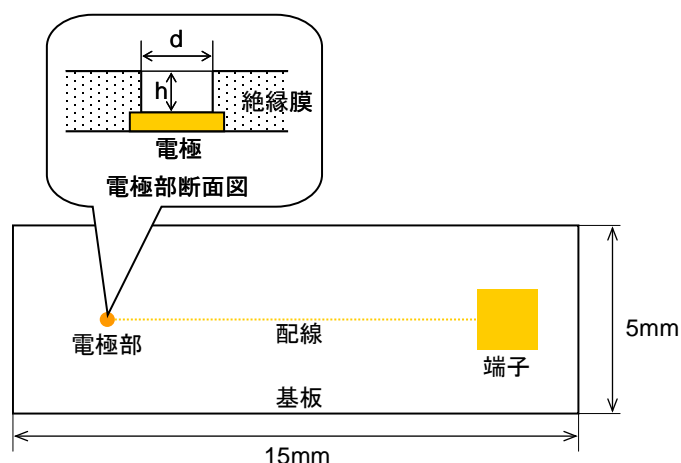


図 8.3 金電極チップ模式図.

#### 8.4.5 微小電極のインピーダンス測定

溶液として 100mM 硫酸ナトリウム水溶液、対向電極として白金線を用いて、室温(25 $^{\circ}\text{C}$ )で金電極チップ(開口径 9, 37.5, 135 $\mu\text{m}$ )の交流インピーダンスを測定した(図 8.4)。印加電圧の振幅( $V_{p-p}$ )を 100mV、オフセットを 0V とした。寄生容量を低減するため、金電極側の配線長はできる限り短く、5mmとした。

ビーズの有無によるインピーダンスの変化を計測するために、6, 25, 90 $\mu\text{m}$ のビーズを溶液中に添加しインピーダンスを計測した。その際、光学顕微鏡下で金電極上のビーズの有無を確認した。

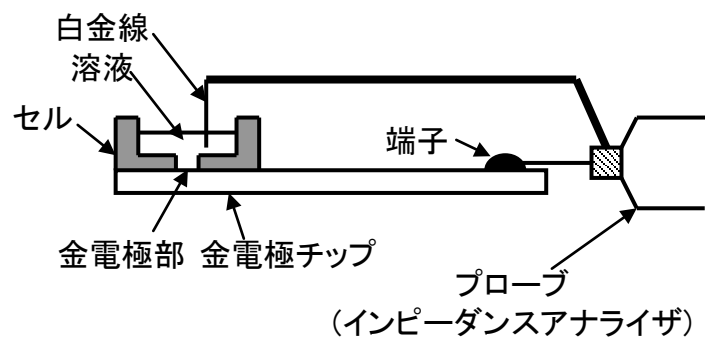


図 8.4 インピーダンス測定配置図.

#### 8.4.6 微小電極の酸化還元電流測定

溶液として 5mM フェリシアン化カリウムおよび 5mM フェロシアン化カリウムを含む 100mM 硫酸ナトリウム水溶液，参照電極として銀塩化銀参照電極，対向電極として白金線を用いて，室温 (25°C) で金電極チップ (開口径 1.5, 3.0, 9.0, 37.5, 135  $\mu\text{m}$ ) の酸化還元電流を測定した。印加電圧は 0.4V とした。

ビーズの有無によるインピーダンスの変化を計測するために，1  $\mu\text{m}$  もしくは 6  $\mu\text{m}$  のビーズを溶液中に添加しインピーダンスを計測した。その際，光学顕微鏡下で金電極上のビーズの有無を確認しながら測定した。

## 参考文献

### 1 章

1. illumina, HiSeq, <http://www.illumina.com/>
2. Thermofisher, Ion Torrent PGM,  
<https://www.thermofisher.com/jp/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-run-sequence/ion-pgm-system-for-next-generation-sequencing.html>
3. Roche, Roche 454, <http://454.com/products/gs-flx-system/>
4. Thermofisher , Solid,  
<https://www.thermofisher.com/jp/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/solid-next-generation-sequencing.html>
5. PacBio; <http://www.pacb.com/>
6. Thermofisher, 3730xl DNA Analyzer,  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/3730XL>
7. bioMerieux, VITEK 2,  
<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>
8. bioMerieux, VITEK MS, <http://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-ms>
9. Bruker, MALDI Biotyper,  
<https://www.bruker.com/jp/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper/overview.html>
10. Beckman Coulter, walkaway,  
[http://www.beckmancoulter.co.jp/product/product02/WalkAway\\_SI.html](http://www.beckmancoulter.co.jp/product/product02/WalkAway_SI.html)
11. Alere, Alere i Influenza A&B,  
<http://www.alere.com/en/home/product-details/alere-i-influenza-ab.html>
12. Fujifilm, FUJI Drychem ImunnoAG,  
<http://fujifilm.jp/business/healthcare/chemical/immuno/ag1/index.html?link=n2u>
13. Roche, Roche cobas series,  
<http://www.cobas.com/home/product/clinical-and-immunochemistry-analyzers.html>

14. Abbott, ARCHITECT series,  
<https://www.abbottdiagnostics.com/en-us/products/ARCHITECT-clinical-analyzers.html>
15. Siemens, ADVIA series, <https://www.healthcare.siemens.com/clinical-chemistry>
16. S.F. Clarke and J.R. Foster, Br. J. Biomed. Sci., 2012, 69, 83-93
17. W. Gao et al., Nature 2016, 529, 509
18. S.K. Vashist et al., Analytica Chimica Acta 2011, 703, 124
19. D.M. Bonnik and S. Dennison, US 5958779, Coulometric analysis

## 2 章

20. E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, Chem. Rev. 1997, 97, 3083
21. N. Oyama et al., Anal. Chem. 1987, 59, 258
22. Abbott, i-Stat,  
<https://www.abbottpointofcare.com/products-services/istat-handheld>
23. E. Lindner, R. Gyurcsányi, J. Solid State Electrochem. 2008, 13, 51
24. X.U. Zou, J.H. Cheong, B.J. Taitt, P. Bühlmann, Anal. Chem. 2013, 85, 9350
25. X.U. Zou, X.V. Zhen, J.H. Cheong, P. Bühlmann, Anal. Chem. 2014, 86, 8687
26. Cadogan et al., Anal. Chem. 1992, 64, 2496
27. C.Z. Lai et al., Anal. Chem. 2007, 79, 4621
28. M.A. Vorotyntsev, J. Heinze, Electrochimica Acta 2001, 46, 3309
29. U. Vanamo, J. Bobacka, Electrochimica Acta 2014, 122, 316
30. X.U. Zou et al., Anal. Chem, 2014, 86, 8687
31. A.K. Padhi, J. Electrochem. Soc. 1997, 144, 1188
32. S. Komaba et al., ECS Transactions 2013, 50, 279
33. J.M. Tarascon and M. Armand, Nature, 2001, 414, 359
34. SELECTPHORE Ion Sensor Materials, Sigma-Aldrich, p93
35. J. Sutter, A. Radu, S. Peper, E. Bakker, E. Pretsch, Anal. Chim. Acta 2004, 523, 53-59.
36. R. Gyurcsányi et al., Talanta 2004, 63, 89
37. M.H. Han et al., Energy Environ. Sci., 2015, 8, 81-102
38. Karyakin, Electroanalysis 2001, 13, 813
39. C.D. Wessells, Nano Lett. 2011, 11, 5421
40. A. Xidis and V.D. Neff, J. Electrochem. Soc. 1991, 138, 3637
41. H. Dussel, A. Dostal, F. Schloz, Fresenius J. Anal. Chem 1996, 355, 21

42. P. C. Meier, *Anal. Chim. Acta* 1982, 136, 363
43. SELECTPHORE Ion Sensor Materials, Sigma-Aldrich, p125
44. SELECTPHORE Ion Sensor Materials, Sigma-Aldrich, p146
45. SELECTPHORE Ion Sensor Materials, Sigma-Aldrich, p35
46. J. Hu et al., *Anal. Chem.* 2014, 86, 7111

### 3 章

47. Caras, S., Janata, J., *Anal. Chem.* 1980, 52, 1935-1937.
48. Dzyadevych, S. V., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., Jafferezic-Renault, N., *Analytica Chimica Acta* 2006, 568, 248-258
49. Miyahara, Y., Moriizumi, T., *Sens. Actuators* 1985, 7, 1-10
50. Bergveld, P., *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1972, 19, 342-351.
51. H.O. Finklea and D.D. Hanshew, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 3173
52. J.F. Smalley, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 2004
53. J.F. Smalley, et al., *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 13141
54. G.L. Ellman et al., *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7, 88-95
55. F. Galgani and G. Bocquenne: *Environm. Tech. Lett.* 1989, 10, 311
56. J-L. Marty et al., *Electroanalysis* 1991, 4, 249
57. M. Bernabei et al., *Analytical letters* 1991, 24, 1317
58. C. La Rosa et al., *Analytical Chimica Acta* 1995, 308, 129
59. H. Anan et al., *Sens. Actuators B: Chemical* 2013, 187, 254

### 4 章

60. J.M. Rothberg et al., *Nature* 2011, 475, 348
61. E. Souteyrand, J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Mikkelsen, and M. F. Lawrence: *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 2980.
62. T. Sakata and Y. Miyahara, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 2225
63. M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, and C. E. D. Chidsey: *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3559
64. C. E. D. Chidsey, G. -Y. Liu, P. Rowntree, and G. J. Scoles: *J. Chem. Phys.* 1989, 91, 4421
65. C. A. Widrig, C. Chung, and M. D. Porter: *J. Electroanal. Chem.* 1991, 310, 335
66. M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung, and M. D. Porter: *Langmuir* 1991, 7, 2687

67. M. Kamahori, K. Harada and H. Kambara, Meas. Sci. Technol. 2001, 13, 1779
68. C. Miller, P. Cuendet, and M. Gratzel, J. Phys. Chem. 1991, 95, 877

## 5 章

69. WHO, H1N1 in post-pandemic period,  
[http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1\\_vpc\\_20100810/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html)
70. H. Arai, et al., J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 367
71. WHO, Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases,  
[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/labtests/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/labtests/en/)
72. E.W. Chappelle, G.V. Levin, Biochem. Med. 1968, 2, 41
73. T. Sakakibara, S. Murakami, K. Imai, Anal. Biochem. 2003, 312, 48
74. S. Nie et al., Science, 1994, 266, 1018
75. T. Sun, H. Morgan, Microfluid Nanofluid, 2010, 8, 423
76. M. Thein, et al., Biosens. Bioelectron. 2010, 25, 1963
77. C.K. Choi, et al., Biosens. Bioelectron. 2007, 22, 2585
78. C. RoyChaudhuri, R D. Das, Sens. Actuators A, 2010, 157, 280
79. Y. Yun, et al., Nanotechnology, 2007, 18, 465505
80. M. S. Webster, et al., IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation, 2009, 16, 1356
81. M. Varshney, Y. Li, Biosens. Bioelectron. 2009, 24, 2951
82. P. Bataillard, et al., Anal. Chem. 1988, 60, 2374
83. C. Berggren, G. Johansson, Anal. Chem. 1997, 69, 3651
84. S.J. Konopka, B. McDuffie, Anal. Chem. 1970, 42, 1741
85. B.R. Scharifker, J. Electroanal. Chem. 1988, 240, 61

## 7 章

86. Y. Fu et al., Electrochim. Acta 2014, 120, 314
87. L.Q. Rong et al., Talanta 2007, 72, 819
88. W. Gao et al., Talanta 2013, 120, 484
89. E. Reitz et al., Electroanalysis 2008, 20, 2482



## 謝辞

本論文は、著者が株式会社日立製作所において行った研究の成果を、名古屋大学大学院工学研究科電子情報システム専攻教授である中里和郎先生の御指導の下、まとめたものです。中里和郎先生には、研究に対する幅広い視点からのご意見、ご提案をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本論文の執筆にあたり、学位審査委員の先生方からは論文の質を向上させるために多くのご意見、ご助言をいただきました。学位審査委員を引き受けてくださいました東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生命理工学系専攻教授の宮原裕二先生、名古屋大学未来社会創造機構教授の堀勝先生、名古屋大学未来材料・システム研究所未来エレクトロニクス集積研究センター教授の大野雄高先生、名古屋大学大学院工学研究科電子情報システム専攻講師の新津葵一先生に心より感謝いたします。

中里和郎先生との共同研究において研究および実験を進めていただきました名古屋大学大学院工学研究科電子情報システム専攻中里研究室の阿南裕穂氏、小森隼登氏に感謝の意を表します。

共同研究を進めさせていただき、ご指導、ご助言くださいました Ruhr 大学 Bochum 化学科教授の Wolfgang Schuhmann 先生、同博士研究員の Stefan Klink 氏に深く感謝いたします。加えて、Schuhmann 研究室の関係者各位に感謝の意を表します。

株式会社日立製作所中央研究所において、入社以来ご指導下さいました釜堀政男氏に深く感謝いたします。共同で研究を進めさせていただきました、武田志津氏、下田真岐氏、板橋直志氏、石田猛氏、柳至氏、後藤佑介氏、田中淳子氏、ならびに関係者各位に深く感謝いたします。

最後に、研究を影ながら支えてくれた家族に感謝いたします。



## 業績

### 論文

- ①. **Yu Ishige**, Maki Shimoda, and Masao Kamahori, "Immobilization of DNA Probes onto Gold Surface and its Application to Fully Electric Detection of DNA Hybridization using Field-Effect Transistor Sensor", Japanese Journal of Applied Physics 45 (2006) pp. 3776-3783
2. Masao Kamahori, **Yu Ishige**, Maki Shimoda, "DNA Detection by an Extended-Gate FET Sensor with a High-Frequency Voltage Superimposed onto a Reference Electrode", Analytical Sciences, 23 (2007) 75.
3. Masao Kamahori, **Yu Ishige**, Maki Shimoda, "Detection of DNA hybridization and extension reactions by an extended-gate field-effect transistor: Characterizations of immobilized DNA-probes and role of applying a superimposed high-frequency voltage onto a reference electrode", Biosensors and Bioelectronics 23 (2008) 1046
- ④. **Yu Ishige**, Maki Shimoda, and Masao Kamahori, "Extended-gate FET-based enzyme sensor with ferrocenyl-alkanethiol modified gold sensing electrode", Biosensors and Bioelectronics 24 (2009) 1096
- ⑤. **Yu Ishige**, Sizu Takeda, and Masao Kamahori, "Direct detection of enzyme-catalyzed products by FET sensor with ferrocene-modified electrode", Biosensors and Bioelectronics 26 (2010) 1366
- ⑥. **Yu Ishige**, Yusuke Goto, Itaru Yanagi, Takeshi Ishida, Naoshi Itabashi, and Masao Kamahori, "Feasibility Study on Direct Counting of Viruses and Bacteria by Using Microelectrode Array", Electroanalysis 24 (2012) 131-139
7. Hiroo Anan, Masao Kamahori, **Yu Ishige**, and Kazuo Nakazato, "Redox-potential sensor array based on extended-gate field-effect transistors with  $\omega$ -ferrocenylalkanethiol-modified gold electrodes" Sensors and Actuators B: Chemical, 187 (2013) 254-261

- ⑧. **Yu Ishige**, Stefan Klink, and Wolfgang Schuhmann, "Intercalation Compounds as Inner Reference Electrodes Enable Reproducible and Robust Solid-Contact Ion-Selective Electrodes", *Angewandte Chemie International Edition* 2016, 55, 4831-4835

## 国際学会

- ①. **Yu Ishige**, Maki Shimoda, and Masao Kamahori, "Immobilization of DNA Probes onto Gold Surface and its Application to Fully Electric Detection of DNA Hybridization using Field-Effect Transistor Sensor", 2006 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM), Kobe, Japan
- ②. **Yu Ishige**, Maki Shimoda, and Masao Kamahori, "Extended-gate FET-based enzyme sensor with ferrocenyl alkanethiol modified gold sensing electrode", *Biosensors* 2008, Shanghai, China
- ③. **Yu Ishige**, Sizu Takeda, and Masao Kamahori, "Direct detection of enzyme-catalyzed products by FET sensor with ferrocene-modified electrode", the World Congress on Biosensors, Glasgow, Scotland, UK, May 26-28, 2010
- ④. **Yu Ishige**, Yusuke Goto, Itaru Yanagi, Takeshi Ishida, Naoshi Itabashi, and Masao Kamahori, "Feasibility Study on Direct Counting of Viruses and Bacteria by Using Microelectrode Array", *Matrafured* 2011, Hungary
5. Hiroo Anan, Masao Kamahori, **Yu Ishige**, and Kazuo Nakazato, "Redox Potential Sensor Array by Extended-Gate FET with Ferrocenyl-Alkanethiol Modified Gold Electrode", 14th International Meeting on Chemical Sensors - IMCS 2012 Nuremberg, Germany
- ⑥. **Yu Ishige**, Yusuke Goto, and Masao Kamahori, "Potentiometric Cholesterol Sensor for Serum Samples Using Ferrocene-Modified Electrode", *Matrafured* 2014, Hungary
7. Hayato Komori, Kiichi Niitsu, Junko Tanaka, **Yu Ishige**, Masao Kamahori, and Kazuo Nakazato, "An extended-gate CMOS sensor array with enzyme-immobilized microbeads

for redox-potential glucose detection”, Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS), 2014 IEEE

- ⑧. **Yu Ishige**, Stefan Klink, and Wolfgang Schuhmann, “Predictable Standard Potential of Solid-Contact Ion-Selective Electrodes by using Prussian Blue Analogues as Solid Contacts”, PITTCON 2016, Atlanta, US

## 国内学会

1. 石毛悠, 下田真岐, 釜堀政男, 延長ゲート型FETセンサによる酸化還元反応検出とそれを利用した酵素センサ, 日本分析化学会第56年会
2. 石毛悠, 下田真岐, 釜堀政男, フェロセン固定化 FET センサによるアセチルコリンエステラーゼ活性阻害測定を用いた農薬簡易検査の基礎検討, 第70回分析化学討論会

