(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年10月3日(03.10.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/203970 A1

(51) 国際特許分類:
B32B 3/24 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
B32B 5/18 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/011524

(22) 国際出願日： 2024年3月23日(23.03.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-047649 2023年3月24日(24.03.2023) JP

(72) 発明者；および
(71) 出願人：渡辺 剛志 (**WATANABE Takeshi**) [JP/JP]；〒2525258 神奈川県相模原市中央区淵野辺５丁目１０番１号 青山学院大学 相模原キャンパス内 Kanagawa (JP).

(72) 発明者：黄 晋二(**KOH Shinji**)；〒2525258 神奈川県相模原市中央区淵野辺５丁目１０番１号 青山学院大学 相模原キャンパス内 Kanagawa (JP).

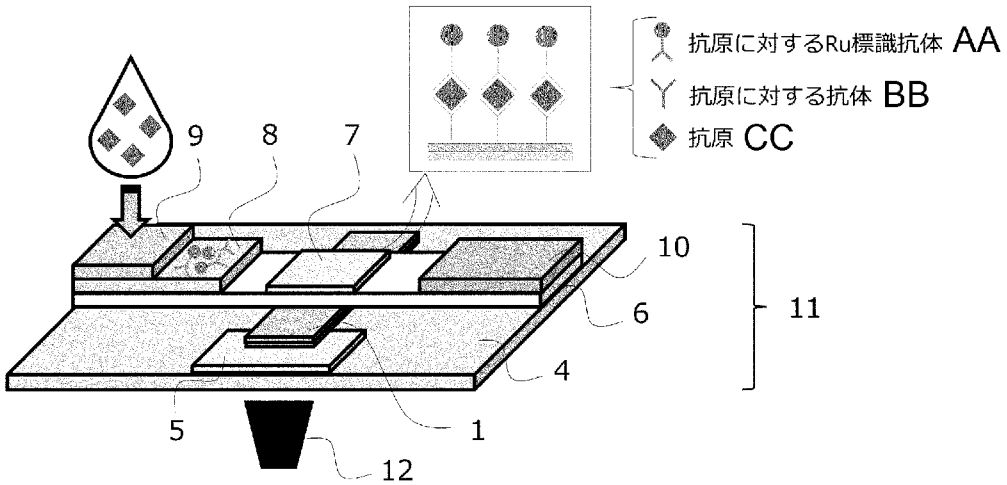
(74) 代理人：松 崎 隆 (**MATSUZAKI Takashi**)；〒1000014 東京都千代田区永田町２丁目１７番１７号アイオス永田町３１８ Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,

(54) **Title:** LAMINATE INCLUDING TRANSPARENT ELECTROCONDUCTIVE FILM AND POROUS FILM, BIOCHIP INCLUDING LAMINATE, AND METHOD FOR MANUFACTURING THESE

(54) 発明の名称：透明導電膜および多孔質膜を含む積層体、積層体を含むバイオチップ、および、それらの製造方法

[図 3]



AA Ru labeled antibody for antigen
BB Antibody for antigen
CC Antigen

(57) **Abstract:** [Problem] To provide a transparent electroconductive film that can be supplied for use in quick and simple inspection equipment, and a biochip in which the transparent electroconductive film is used. In particular, to provide a transparent electroconductive film that can be used for immunoassay utilizing electrochemical light emission, and a

WO 2024/203970 A1

[続葉有]

KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能):ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一　国際調査報告(条約第21条(3))

biochip in which the transparent electroconductive film is used. [Solution] The present invention provides a laminate comprising a transparent electroconductive film and a porous film that is laminated on the transparent electroconductive film, wherein the porous film is permeable with respect to an electrolyte solution.

(57) 要約:【課題】 本発明の課題は、迅速簡易検査機器の利用に供することのできる透明導電膜およびそれを用いたバイオチップの提供にある。特に電気化学発光を利用した免疫測定に利用可能な透明導電膜およびそれを用いたバイオチップの提供にある。 【解決手段】 本発明は、透明導電膜と透明導電膜上に積層した多孔質膜とからなる積層体であって、多孔質膜が電解液の透過性を有する積層体を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 透明導電膜および多孔質膜を含む積層体、積層体を含むバイオチップ、および、それらの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、微細孔を有する多孔質膜が積層された透明導電膜を含む積層体、当該積層体を含むバイオチップ、および、それらの製造方法に関する。また本発明は、当該積層体、当該バイオチップを用いる電気化学発光免疫測定方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、ＰＯＣＴ（Ｐｏｉｎｔ－ｏｆ－ｃａｒｅ　ｔｅｓｔｉｎｇ）と呼ばれる患者の近くで行う迅速で簡易な検査が、疾病予防や健康増進、さらに感染症対策の観点から重要視されている。特に新型コロナウイルスの感染拡大を契機に、簡易測定と高感度測定を両立する機器開発の需要が高まっている。代表的な迅速簡易検査の手法であるイムノクロマトグラフィー法は、検体中の抗原が金コロイド標識抗体と免疫複合体を形成しながらニトロセルロース膜中を移動し、この免疫複合体が捕捉抗体にトラップされることで発色し、それを目視により判定するものである。この手法は簡便性・迅速性に優れるが、目視判定のため高感度化が難しく、一般に定性検査の適用に限定される。

[0003] 高感度な免疫分析法として電気化学発光免疫分析法が知られている。電気化学発光とは電極反応を通して起こる発光現象であり、従来の蛍光あるいは吸光度測定を行う免疫測定法において必要となる励起光や入射光を必要としないため、安全・安価かつ低ノイズレベルでの測定が可能であり、高感度な分析が可能となる。一般に、電気化学発光標識試薬としてはトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）が使われ、共反応物としてトリプロピルアミンが利用され、これらの試薬を用いた免疫測定法も報告されている（特許文献１）。

特許文献１に記載の方法は、測定対象分子と特異的に結合する抗体にトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）を標識し、抗原抗体反応により

免疫複合体を形成させた後、トリプロピルアミン溶液中においてトリプロピルアミンを、またはトリプロピルアミンとトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）の両方を酸化して発光させることにより、測定対象物質と結合した抗体、あるいは結合しなかった抗体量を求めることで、測定対象分子の濃度を見積もる手法である。

[0004] 現在、電気化学発光免疫分析法はロシュ社の自動分析臨床検査装置に採用されている（非特許文献１）。当該自動分析臨床検査装置は、トリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）で標識された免疫複合体を磁性ビーズ上に形成後、当該磁性ビーズの性質を利用して複合体を白金電極表面に固定する。トリプロピルアミンを含む電解液を用いて白金電極付近で電気化学発光を生じさせ、その発光強度を測定する。しかしながら、電気化学発光免疫分析法は電極を必要とし、１枚の電極を利用して複数の検体を測定するような上記自動分析臨床検査装置では、異なる検体の測定間に電極の洗浄プロセスが必要となるため、装置の小型化や測定の簡便化が難しくＰＯＣＴに対応した測定装置開発の課題となっている。

[0005] ＰＯＣＴに対応した免疫分析法に関しては、イムノクロマトグラフィー法を蛍光法や化学発光法、化学発光酵素法と組み合わせた測定手法に関する報告例は多くあり、アークレイ株式会社の移動式免疫蛍光分析装置「スポットケムＦＬＯＲＡ」や栄研化学株式会社のＳＡＲＳコロナウイルス抗原キット「Ｅｘｄｉａ　ＥＫテスト　ＣＯＶＩＤ－１９　Ａｇ」など蛍光クロマトグラフィー法を測定原理とする装置やキットが実用化されている。

[0006] 一方、電気化学発光法とイムノクロマトグラフィー法を組み合わせた測定法に関する報告例はない。電気化学発光法は電極を必要とする手法であり、使い捨てることが一般的であるイムノクロマトグラフィー用測定チップと組み合わせるには、使い捨て電極を用いなければならないことが課題である。また一般にイムノクロマトグラフィー法に用いられるメンブレンの厚みは１００μｍ程度であり、実用化されている電気化学発光免疫分析装置で利用される磁性ビーズの直径は約３μｍである。この１００μｍという厚さは、電極反応により生

成した活性種がメンブレンに固定化された電気化学発光標識物質に到達する前に失活してしまう確率を高くし、発光効率を極端に低下させる可能性がある。これらがイムノクロマトグラフィー法と電気化学発光法の組み合わせを困難にしている原因であると考えられる。

[0007] 電気化学発光免疫分析を利用したＰＯＣＴ機器に関する研究については、紙ベースの電極やスクリーン印刷電極など低コストの電極を用いた研究が多く報告されているが臨床検査装置としての実用化には至っていない。

[0008] ＰＯＣＴに対応した電気化学発光免疫分析装置を開発する上では装置自体を小型化することが求められるが、透明導電膜を電極として利用することで装置構成に自由度が生まれ、装置の小型化が容易となる。しかしながら、代表的な透明導電膜である酸化インジウムスズ（ＩＴＯ）は希少元素であるインジウムを含んでおり使い捨て電極としての利用に適さない。またＩＴＯをはじめとした酸化物系の透明導電膜では、トリプロピルアミンなどの有機物の酸化反応が生じにくいため、免疫分析の測定系においては高い発光強度が得られないといった課題がある。

[0009] 希少元素を含まない透明導電膜を電気化学発光に応用している研究としては、フォトレジストを熱分解して作製された炭素系透明導電膜を用いた研究報告がある（非特許文献２）。しかし、そのような導電性ポリマーでは高い導電性と高い光透過性を両立することが課題となっている。

[0010] 本発明者らはこれまでに透明な炭素材料であるグラフェンを電気化学発光免疫分析法の使い捨て電極とすることで迅速簡易検査に適したシステムを構築できることを提案している。本発明者らは化学気相成長（ＣＶＤ）法により作製したグラフェン電極を用いて癌マーカーである癌胎児性抗原（ＣＥＡ）の免疫分析に成功し、グラフェン透明電極が電気化学発光免疫分析の電極として優れた特性を有することを実証し報告している（非特許文献３）。このような電気化学発光免疫分析応用に向けたグラフェン電極の利用に関する研究は本発明者ら以外に報告がなく独創的な唯一の技術である。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開平１０－１１１２９３号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：S. Parveen, M. S. Aslam, L. Hu, and, G. Xu, Electrogenerated Chemiluminescence. Protocols and Applications, Heidelberg, 2013, pp.39-44, “3.4 Commercial ECL Instruments”
非特許文献2：E. K. Walker et at., “Carbon Optically Transparent Electrodes for Electrogenerated Chemiluminescence”, Langmuir, 28, pp.1604-1610 (2012). https://doi.org/10.1021/la2042394.
非特許文献3：T. Watanabe et al., “Single-layer graphene as a transparent electrode for electrogenerated chemiluminescence biosensing”, Electrochemistry Communications, 138, 107290 (2022). https://doi.org/10.1016/j.elecom.2022.1

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の課題は、迅速簡易検査機器の利用に供することのできる透明導電膜およびそれを用いたバイオチップの提供にある。特に電気化学発光を利用した免疫測定に利用可能な透明な炭素導電膜およびそれを用いたバイオチップの提供にある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは上述のようにＣＶＤグラフェン電極が迅速簡易検査に対応した電気化学発光免疫分析に適した性質を持つことを実証していた。しかしながら、免疫測定の利用に供するためにはグラフェン電極への抗体修飾の課題を解決する必要があった。そこで本発明者らは、グラフェンと抗体分子を結合させるために、これまでにジアゾニウム塩還元による共有結合を用いた結合手法やピレン基とグラフェンのπ－π相互作用を利用した結合手法等の種々の手法を検討してきた。しかしながら、いずれの手法もグラフェンが２次元シートで

あることにより抗体修飾量が十分に確保できず、また共有結合を利用した修飾法ではグラフェンのπ共役系が破壊されシート抵抗が増加するなどの問題が生じ、グラフェン電極への抗体の固定化とグラフェン電極の特性の維持を両立することができなかった。そこで本発明者らはＣＶＤグラフェン電極の製造時に必要な転写工程において支持材として利用される高分子膜にタンパク質を固定する方法を着想した。従来のグラフェンの転写法では、支持材としてポリメチルメタクリレート（ＰＭＭＡ）が利用され、金属触媒基板上に成長させたグラフェン膜上にＰＭＭＡ膜を形成した後、金属触媒基板をエッチングしＰＭＭＡとグラフェン膜からなる積層体を任意の基板へ転写する。転写後または電極としての使用前にＰＭＭＡ膜を溶解し除去することでＣＶＤグラフェン電極が得られる。発明者らは、まず転写支持膜であるＰＭＭＡ膜を取り除くことなくタンパク質固定用の膜として利用することを検討したが、ＰＭＭＡ膜を積層したままのグラフェン電極ではそもそも電気化学発光物質を含む電解液がＰＭＭＡ膜を十分に透過せずに電気化学測定をすることができなかった。本発明者らは鋭意検討の結果、ＰＭＭＡ膜の代わりに電気化学発光反応物の膜中の輸送が十分に担保できる多孔質膜の利用を着想し、当該多孔質膜とグラフェン膜とからなる電極を用いることで電気化学発光による免疫測定に成功した。本発明は上記知見に基づき完成された発明であり、以下の態様を含む：

[0015] 本発明の一態様は、

〔１〕透明導電膜と前記透明導電膜上に積層した多孔質膜とからなる積層体であって、

前記多孔質膜が電解液の透過性を有する、積層体に関する。

ここで本発明の積層体は一実施の形態において、

〔２〕上記〔１〕に記載の積層体であって、

前記多孔質膜が平均孔径２０ｎｍ以上の細孔を有することを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔３〕上記〔１〕または〔２〕に記載の積層体であって、

多孔質膜の膜表面に対する孔の面積比が２０％以上であることを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔４〕上記〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記多孔質膜の膜厚が１００ｎｍ以上であることを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔５〕上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記積層体が透明絶縁基板をさらに含み、

前記透明導電膜の第一の表面上に前記多孔質膜が積層しており、

前記透明導電膜の第二の表面上に前記透明絶縁基板が積層していることを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔６〕上記〔５〕に記載の積層体であって、

前記積層体が電気伝導体をさらに含み、

前記電気伝導体が、前記多孔質膜の表面上であって、かつ、前記透明導電膜が積層している表面とは反対の表面上に積層しているか、または、

前記透明絶縁基板の表面上であって、かつ、前記透明導電膜が積層している表面と同じ表面上に積層していることを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔７〕上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記多孔質膜が圧縮された構造を少なくとも一部に有することを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔８〕上記〔５〕～〔７〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記透明絶縁基板が透明な導電助剤によりコートされたものである、積層体。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔９〕上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記積層体が電気伝導体をさらに含み、

前記多孔質膜の第一の表面上に前記透明導電膜が積層しており、

前記多孔質膜の第二の表面上に前記電気伝導体が積層していることを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔１０〕上記〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記多孔質膜が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリエーテルスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリアミド、ポリフッ化ビニリデン、再生セルロース、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン、酸化アルミニウム、グラスファイバー、石英ファイバー、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、および、セラミックからなる群より選択される材料からなる膜または前記群より選択される２種類以上の材料からなる混合膜であることを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔１１〕上記〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記透明導電膜が炭素導電膜であることを特徴とする。

また本発明の積層体は一実施の形態において、

〔１２〕上記〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の積層体であって、

前記透明導電膜がグラフェン膜であることを特徴とする。

[0016] また本発明の別の態様は、

〔１３〕上記〔５〕～〔１２〕のいずれかに記載の積層体を含む、バイオチップに関する。

また本発明の別の態様は、

〔１４〕上記〔１３〕に記載のバイオチップおよび電気化学発光物質を含む、キットに関する。

また本発明の別の態様は、

〔１５〕上記〔５〕に記載の積層体であって、

さらに透明導電膜と透明絶縁基板と電気伝導体とを含み、

前記積層体は透明絶縁基板、透明導電膜、多孔質膜、透明導電膜、透明絶縁基板の順に積層しており、

前記電気伝導体が前記透明導電膜と接触するように配置されている、積層体を提供する。

また本発明の別の態様は、

〔１６〕上記〔５〕に記載の積層体を透明化した電極として使用する方法であって、

前記多孔質膜の屈折率と同じ屈折率を有する溶媒を用いる、使用方法に関する。

また本発明の別の態様は、

〔１７〕上記〔５〕～〔１２〕のいずれかに記載の積層体または上記〔１３〕に記載のバイオチップを用いた電気化学発光免疫測定法により検出対象化合物を検出する方法であって、

（ａ）前記検出対象化合物と電気化学発光物質とを結合する工程と

（ｂ）前記積層体の多孔質膜内に前記検出対象化合物を捕捉する工程であって、前記多孔質膜内に固定された前記検出対象化合物に対する特異的結合物質により前記検出対象化合物を捕捉する工程と

（ｃ）前記工程（ａ）および（ｂ）の後、前記積層体に電位を印加して電気化学発光を測定する工程と

を含む、検出方法に関する。

また本発明の別の態様は、

〔１８〕透明絶縁基板と炭素導電膜と多孔質膜とが順に積層した積層体を製造する方法であって、

（ア）金属触媒基板上にＣＶＤ法により炭素導電膜を形成する工程と

（イ）炭素導電膜上に多孔質膜をさらに形成して積層体を作製する工程と

（ウ）前記金属触媒基板をエッチングにより除去し、透明絶縁基板上に炭素導電膜が接するように前記積層体を転写する工程をさらに含む、

積層体の製造方法に関する。

また本発明の積層体の製造方法は一実施の形態において、

〔１９〕上記〔１８〕に記載の積層体の製造方法であって、

前記工程（イ）において、多孔質膜の形成に用いるポリマーを溶解する溶媒が、前記ポリマーに対する良溶媒と貧溶媒とを含む混合溶媒であることを特徴とする。

発明の効果

[0017] 本発明に係る透明導電膜と多孔質膜と透明絶縁基板とからなる積層体によれば、多孔質膜に抗体等のタンパク質を固定することができるため、当該積層体を電極とした電気化学発光免疫測定を可能とする。本発明の透明導電膜と多孔質膜と透明基板とからなる積層体は希少元素を含まないために製造コストが安く使い捨て電極として用いることができ迅速簡易検査機器の利用に適している。

また本発明に係る積層体は電気化学発光免疫測定に用いたとき、多孔質膜内で生じた発光を減衰させることなく効率的に検出することを可能にするため、迅速簡易検査機器の高感度化に資する。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図１は本発明に係る積層体の一実施の形態を示す模式図である。積層体は多孔質膜と透明導電膜とからなる。

[図2]図２は本発明に係る積層体の一実施の形態を示す模式図である。積層体は多孔質膜と透明導電膜と透明絶縁基板とからなる。

[図3]図３は本発明のバイオチップの一実施の形態を示す模式図である。

[図4AB]図４ＡＢは本発明のバイオチップの一実施の形態である変形例を示す模式図である。

[図4CD]図４ＣＤは本発明のバイオチップの一実施の形態である変形例を示す模式図である。

[図4E]図４Ｅは本発明のバイオチップの一実施の形態である変形例を示す模式図である。

[図4F]図４Ｆは本発明のバイオチップの一実施の形態である変形例を示す模式図である。

[図4G]図４Ｇは本発明のバイオチップの一実施の形態である変形例を示す模式図である。

[図4H]図４Ｈは本発明のバイオチップの一実施の形態である変形例を示す模式図である。

[図5]図５は本発明に係る積層体の製造方法の一実施の形態におけるスキームを示す。

[図6]図６は従来の転写工程を含めたＣＶＤグラフェン電極の作製方法のスキームを示す。

[図7]図７は下記実施例１で作製した多孔質膜／グラフェン積層体の多孔質膜表面のＳＥＭ画像を示す。

[図8]図８は下記実施例１で作製した多孔質膜／グラフェン積層体の多孔質膜表面に存在する孔の孔径に関するヒストグラムを示す。

[図9]図９は下記実施例１で作製した多孔質膜／グラフェン積層体の多孔質膜表面に存在する孔の孔径に関するヒストグラムを示す。

[図10]図１０は下記実施例４において使用した電気化学発光測定セルの模式図を示す。

[図11]図１１は下記実施例４における、電気化学測定セル中の多孔質膜／グラフェン膜／透明絶縁基板積層体の写真図（図１１Ａ）および電気化学発光発生時の写真図（図１１Ｂ）を示す。

[図12]図１２は下記実施例４における多孔質膜／グラフェン膜／透明絶縁基板積層体を作用電極として用いたサイクリックボルタンメトリー（ＣＶ）による電気化学発光測定の結果を示すグラフである。

[図13]図１３は下記実施例５の電気化学発光測定に用いた３電極系測定チップの概要図を示す。

[図14]図１４は下記実施例５において、本発明に係る積層体を３電極系測定チップとして用いた電気化学発光測定の結果を示すグラフである。

[図15]図１５は下記実施例６において、本発明に係る積層体を用いた電気化学発光に基づく免疫測定の結果を示すグラフである。

[図16]図１６は下記実施例７において行った、本発明に係るセルロース膜／グラフェン膜からなる積層体を用いたＥＣＬ測定を複数回行った際のＥＣＬ強度を示すグラフである（図１６左）。比較としてグラフェン電極を用いたＥＣＬ測定の結果を示す（図１６右）。

[図17]図１７は下記実施例８においてキャスト法により作製した多孔質膜／グラフェン積膜層体の多孔質膜表面のＳＥＭ画像を示す。図１７（ａ）はアセトン溶媒を用いて多孔質膜を形成した際の画像を示し、図１７（ｂ）はアセトン／ホルムアミド混合溶媒を用いて多孔質膜を形成した際の画像を示す。

[図18]図１８は下記実施例８においてキャスト法により作製した６種類の多孔質膜／グラフェン積膜層体の多孔質膜表面のＳＥＭ画像を示す。図１８（ａ）～（ｆ）におけるセルロース混合エステル溶液の濃度と超純水への浸漬の有無の条件は以下のとおり：（ａ）４質量％・浸漬なし、（ｂ）は４質量％・浸漬あり（ｃ）８質量％・浸漬なし、（ｄ）８質量％・浸漬あり（ｅ）１２質量％・浸漬なし（ｆ）１２質量％・浸漬あり。

[図19]図１９は下記実施例８で作製した多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体の写真図を示す。

[図20]図２０（ａ）は下記実施例８で作製した多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体のラマンスペクトルを示す。図２０（ｂ）は、多孔質セルロース混合エステル膜を取り除いた石英ガラス基板上のグラフェン膜のラマンスペクトルを示す。

[図21]図２１は下記実施例８で作製した多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体の電気化学発光測定の結果を示すグラフである。図２１（ａ）は電流－電位曲線のグラフを示し、図２１（ｂ）はＥＣＬ強度―電位曲線のグラフを示す。

[図22]図２２は下記実施例９で作製した相転換法による多孔質セルロース膜／グラフェン膜積層体の作製プロセスを示す概要図である。

[図23]図２３は下記実施例９で作製した多孔質セルロース膜／グラフェン膜／銅箔からなる積層体におけるセルロース膜のＳＥＭ画像を示す。図２３（ａ）は積層体中のセルロース膜作製時のアプリケーターのギャップ高さが２５μｍのもののＳＥＭ画像を示す。また図２３（ｂ）～（ｄ）はそれぞれ、積層体中のセルロース膜作製時のアプリケーターのギャップ高さが５０μｍ、７５μｍ、１００μｍのもののＳＥＭ画像を示す。

[図24]図２４は下記実施例９で行ったタンパク質吸着量の測定手法を示す概略図である。

[図25]図２５は下記実施例９で行ったタンパク質吸着量の測定結果に基づき作図した検量線を示す。

[図26]図２６は下記実施例９で行った４種類のセルロース膜および市販のニトロセルロースメンブレンを用いて測定したタンパク質吸着量の定量結果を示す。

[図27]図２７は下記実施例１０で行った油圧フラスコプレスを用いた多孔質構造の圧縮手法の概略図を示す。

[図28]図２８は下記実施例１０に用いた両端に金／クロムが蒸着された石英基板上の多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜からなる積層体の写真図を示す。

[図29]図２９は下記実施例１０で行った石英基板上の多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜からなる積層体の多孔質構造を直径４ｍｍの穴のあいたアルミ材を用いて圧縮する前後の写真図を示す（図２９中左が圧縮前を示し、右が圧縮後を示す）。

[図30]図３０は下記実施例１０で作製した圧縮した多孔質構造を一部に有する積層体のセルロース表面のＳＥＭ画像を示す。図３０（ａ）が圧縮された多孔質構造部分のＳＥＭ画像を示し、図３０（ｂ）が圧縮されていない多孔質構造部分のＳＥＭ画像を示す。

[図31]図３１は下記実施例１０で行った圧縮された多孔質構造を一部に有する多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体の電気化学

発光測定の結果を示すグラフである（実線）。比較として、圧縮された多孔質構造を有しない多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体の測定結果（点線）を示す。

[図32]図３２は下記実施例１１で行った多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体のＥＣＬ免疫分析の結果であって、電流ー電位曲線のグラフを示す。

[図33]図３３は下記実施例１１で行った多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体のＥＣＬ免疫分析の結果であって、ＥＣＬ強度ー電位曲線のグラフを示す。

[図34]図３４は下記実施例１２で行ったグラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極、グラフェン電極、および、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極の透過率測定結果（左図）およびラマンスペクトル（右図）を示すグラフである。

[図35]図３５は下記実施例１２で行ったグラフェン、グラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ、グラッシーカーボンを電極としたＣＶによる電気化学測定の結果を示すグラフである。

[図36]図３６（ａ）は下記実施例１２で行ったグラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極、グラフェン電極、および、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極のＥＣＬ測定の結果であって、ＥＣＬ強度ー電位曲線のグラフを示す。図３６（ｂ）はクロノアンペロメトリ法によって得られた電位印加開始から３０秒間の総発光量を示すグラフである。

[図37]図３７は下記実施例１２で行ったグラフェンまたはグラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを電極としたＲｕ（ｂｐｙ）$_3$Ｃｌ$_2$（図３７（ａ））またはトリプロピルアミン（図３７（ｂ））のＣＶによる電気化学測定の結果を示すグラフである。

[図38]図３８は下記実施例１３で測定した水／グリセリン混合溶媒における屈折率とグリセリンの割合との関係を示すグラフを示す。

[図39]図３９は下記実施例１３で測定した様々な比率を有するグリセリン／水混合溶液における多孔質ＰＤＶＦ膜の透過率スペクトルを示すグラフである。

[図40]図４０は下記実施例１３で測定した水／グリセリン溶液中のＰＶＤＦ／グラフェン／石英基板積層体の透過率スペクトルを示すグラフである。

[図41]図４１は下記実施例１３で作製したフィルム状エレクトロクロミックデバイスの概略図を示す。

[図42]図４２は下記実施例１３で作製したフィルム状エレクトロクロミックデバイスの電流ー電圧曲線を示すグラフである。

[図43]図４３は下記実施例１３で作製したフィルム状エレクトロクロミックデバイスの着色状態と脱色状態との間の可逆的な色変化を示す写真図である。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明の一態様は、透明導電膜と前記透明導電膜上に積層した多孔質膜とからなる積層体であって、多孔質膜が電解液の透過性を有する積層体を提供する。

本態様に係る積層体の一実施の形態を図１に示す。図１に示すように、積層体１は、透明導電膜２と多孔質膜３とから構成される。

[0020] 透明導電膜２は高い電気伝導性と可視光透過性を兼ね備えた膜である。本発明に用いることのできる透明導電膜２としては、以下に限定されないが、酸化インジウムスズ、フッ素ドープ酸化スズ、酸化亜鉛、酸化スズ、酸化チタン、銀ナノワイヤの金属細線を、ポリエチレンジオキシチオフェン（ＰＥＤＯＴ）などの導電性ポリマー、カーボンナノチューブやグラフェンの炭素系透明導電膜などを挙げることができる。好ましい実施の形態において、透明導電膜２は電気化学発光免疫測定法における電極として用いることができる。このとき透明導電膜２は作用極として用いても良いし、対極として用いてもよい。

[0021] 透明導電膜２は可視光透過性を備えているため電気化学発光免疫測定に用いる際、積層体の透明導電膜側に光検出器を置くことができる。また積層体がさらに透明絶縁基板を有する実施の形態においては、積層体の透明絶縁基板側に光検出器を置くことができる。そのため発光界面近くでの電気化学発光の検出を可能にし、集光角を増加でき、溶液中成分による電気化学発光シグナルの再吸収を回避できるなど高感度化を可能とする。

また積層体を電気化学発光免疫分析法のバイオチップとして用いる場合においても、多孔質膜に固定化された電気化学発光物質からの発光を効率的に捕集できるため、高感度化が可能となる。積層体を含むバイオチップの電気化学発光過程においては、共反応物の電極反応により生成した活性種が失活する前に電気化学発光物質に到達することで発光が生じるため、透明導電膜近くの多孔質膜に固定化された電気化学発光物質からの発光が主となる。光透過性を有さない導電膜を用いたとすると、光検出器を導電膜と反対側の多孔質膜表面側に配置する必要があるため、電極近傍で生じた発光は光検出器に到達する前に多孔質膜内で減衰してしまう。一方、透明導電膜と多孔質膜からなる積層体を用いた場合には、発光サイトから光検出器までの距離が短いため、大きく減衰されずに電気化学発光を検出することが可能となる。

[0022] 本明細書において透明導電膜というとき、当該導電膜は少なくとも５０％以上の光透過率を有する。好ましくは７５％以上の光透過率を有し、より好ましくは９０％以上の光透過率を有する。光透過率は、例えば紫外可視分光光度計を用いて測定することができる。

[0023] 透明導電膜２としては電気抵抗が小さいものが好ましく、例えばシート抵抗が２０００Ω／ｓｑ以下であることが好ましい。シート抵抗が２０００Ω／ｓｑを超えると電気化学測定において透明導電膜に電流が流れた際に透明導電膜内に生じる電圧降下が大きくなるため、電流が制限され発光強度が小さくなり好ましくない。より好ましい実施の形態において透明導電膜２のシート抵抗は１０００Ω／ｓｑ以下であり、さらに好ましくは５００Ω／ｓｑ以下である。シート抵抗は、比抵抗／膜厚で定義される実質的な導電膜としての電気抵抗である。透明導電膜の比抵抗を小さくし膜厚を増加させることにより、シート抵抗を好ましい値にできる。ただし膜厚を増加させると光透過率が減少するため、電気化学発光測定で得られる電気化学発光シグナルの強度の低下を招く可能性がある。

好ましい実施の形態において、透明導電膜２は透明な炭素導電膜であり、さらに好ましい実施の形態において、透明導電膜２はグラフェン膜である。

[0024] 透明な炭素導電膜は、グラフェン、グラファイト、グラッシーカーボン、カーボンナノチューブ、フラーレンなどの炭素材料からなる光透過性を有する導電膜である。また透明な炭素導電膜は、非特許文献２に開示されるフォトレジストなどの高分子材料の熱分解により作製された透明導電膜を含む。

[0025] 透明な炭素導電膜の形成方法は当業者に公知である。各炭素導電膜に適した公知の形成方法を採用することができる。例えば以下を参照して実施することができる。

[0026] 透明な炭素導電膜としてグラフェン膜を用いる場合、グラフェン膜は単層であっても複数の層より形成されていても良い。グラフェン膜が複数の層より形成されている場合、光透過性の観点から２～３層からなることが好ましいがこれに限定されない。

またグラフェン膜は、グラフェンの炭素原子を窒素やホウ素などで置換することや分子吸着を用いてドープされていても良い。多層グラフェン膜においては、層間に金属塩化物等がインターカレーションされていても良い。

またグラフェン膜は連続膜であることが好ましい。連続膜とは膜に孔や破れがなく膜を構成する成分が連続的に連なっている状態にある膜をいう。グラフェン膜が連続膜であることにより均一な表面を有し、シート抵抗を低くできるため好ましい。

本明細書において単層グラフェン膜というとき、多層グラフェン膜を一部に含むが、実質的にグラフェン膜が単層グラフェン膜で形成されているものを含む。実質的にグラフェン膜が単層グラフェン膜で形成されているとは、例えば、グラフェン膜上の多層グラフェン被膜面積が１５％以下、１０％以下、５％以下、３％以下であるものをいう。グラフェン膜上の多層グラフェン被膜面積が３％以下であるというとき、グラフェン膜内の単層グラフェンによる被膜率は９７％以上である。

[0027] グラフェン膜の形成方法は当業者に公知であり（例えば非特許文献３参照）、例えば化学気相成長法（ＣＶＤ）により形成することが好ましい。なお積層体１が機能する限りにおいて公知の機械的剥離法、化学的剥離法、ＳｉＣ

熱分解法、酸化グラフェンの還元法などで形成したグラフェン膜を用いることもできる。

[0028] 多孔質膜３は、透明導電膜２の第一の表面上に積層している。多孔質膜３は、透明導電膜２の表面全体を覆うように積層していても良いし、表面の一部を覆うように積層していても良い。多孔質膜３は、電解液の透過性を有するものを使用することができる。

電解液の透過性とは、多孔質膜３に浸す電解液中に含まれる電気化学発光における検出対象化合物、電気化学発光用標識化合物、共反応物、ナトリウムイオンなどの陽イオン、塩化物イオンなどの陰イオン、および水分子が多孔質膜３内を通過して透明導電膜２表面上またはその付近まで浸透することができることをいう。電解液の透過性を有することで、電解液中の電気化学発光物質や共反応物が透明導電膜２表面付近まで近づくことができ、透明導電膜２に電位をかけた際にそれらの物質と透明導電膜２との間で電子の授受が可能となる。すなわち、多孔質膜３はその膜中を電気化学発光物質や共反応物が透過できるように、一方の表面から他方の表面に対して連続した孔を有するものである

[0029] 本発明に用いることのできる多孔質膜３としては、以下に限定されないが、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリエーテルスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリアミド、ポリフッ化ビニリデン、再生セルロース、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン、酸化アルミニウム、グラスファイバー、石英ファイバー、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、および、セラミックからなる群より選択される材料からなる膜または前記群より選択される２種類以上の材料からなる混合膜などを挙げることができる。さらに多孔質膜３は２種類以上の多孔質膜の積層物であってもよい。

[0030] 多孔質膜３の構造や孔径は適宜最適化することができる。例えば、本発明のバイオチップにおける他の構成材料との組み合わせを考慮して最適化することが望ましい。

以下に限定されないが、多孔質膜３の膜厚は１０ｎｍ～１００μｍとすること好ましい。１０ｎｍより薄いと抗体のサイズ以下となるため多孔質膜を利用して被修飾部位を立体的にすることによる修飾量増加の恩恵が得られないこととなり、１００μｍより厚いと電気化学発光過程において共反応物の電極反応により生じたラジカル種が多孔質膜に固定化された電気化学発光標識物質と反応するよりも早く失活し発光強度が減少することになり好ましくない。好ましい実施の形態において、多孔質膜３の膜厚下限は１００ｎｍ以上であり、より好ましい実施の形態において、３００ｎｍ以上である。また好ましい実施の形態において、多孔質膜３の膜厚上限は５０μｍ以下であり、より好ましい実施の形態において１０μｍ以下である。

[0031] 透明導電膜２としてＣＶＤ法により作製したグラフェン膜を用いる実施形態において、多孔質膜３は、金属触媒基板上に成長させたグラフェン膜を、所望の基板へ転写するために金属触媒基板をエッチングにより除去した後に、グラフェン膜を支持できるものであることが好ましい。多孔質膜３がこのような支持膜として機能するためには、多孔質膜３の膜厚を１００ｎｍ以上とすることが好ましい。膜厚が１００ｎｍより薄いとＣＶＤ法により形成したグラフェン膜の支持力が不十分となり転写時に破れが生じる可能性が高くなる。またガラス基板など親水性基板にグラフェン膜などの炭素導電膜を転写する際には、多孔質膜３の膜厚は２００μｍ以下であることが好ましい。膜厚の増加に伴い多孔質膜の内部応力も増加するため、膜厚が２００μｍより厚いと転写膜が基板から剥がれやすくなることがある。

[0032] 以下に限定されないが、多孔質膜３の平均孔径は２０ｎｍ～２０μｍとすることが好ましい。２０ｎｍ未満となると抗体等の保留粒子やブロッキング剤等のその他の成分が多孔質膜の細孔を塞ぎ溶液中の成分の移動を阻害することが考えらえる。２０μｍを超えると多孔質膜の密度が低くなりグラフェン膜を転写する際の支持力が弱くなり膜の破れが多くなると考えられ、好ましくない。好ましい実施の形態において、多孔質膜３の平均孔径は２００ｎｍ～１０μｍである。多孔質膜３の平均孔径とは、多孔質膜表面上に存在する細孔の孔径

の平均値とする。細孔の孔径の平均値は、多孔質膜の表面を走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）等により観察し、無作為に選択した数百程度（例えば、３００個）の孔の面積をそれぞれ測定する。各孔の面積から、孔が円であったと仮定したときの直径を孔径としてそれぞれ算出し、それらの平均値を、表面平均孔径とすることができる。

[0033] 以下に限定されないが、多孔質膜３は膜表面に対する孔の面積比が２０％以上であることが好ましい。膜表面に対する孔の面積比が２０％未満となると多孔質膜３の電解液の透過性が低下することとなり好ましくない。膜表面に対する孔の面積比の上限は、多孔質膜３が透明導電膜２を転写支持膜としての機能を果たす限り制限されないが、例えば６０％以下とすることができる。好ましい実施の形態において膜表面に対する孔の面積比は２５％以上であり、より好ましい実施の形態において膜表面に対する孔の面積比は３０％以上である。多孔質膜３の膜表面に対する孔の面積比とは、多孔質膜における一つの表面の幾何学的面積に対する当該表面上に存在する全ての細孔の面積の合計値の比を指す。細孔の面積は、多孔質膜の表面をＳＥＭ等を用いて観察することで測定する。

[0034] 一実施の形態において、多孔質膜３は電気化学発光物質の発光波長において光透過性を有するものである。特に、多孔質膜３は電気化学発光により生じた発光を吸収しないものであることが好ましい。多孔質膜３が光透過性を有するというとき、５０％以上の光透過率を有することをいう。好ましくは７５％以上の光透過率を有し、より好ましくは９０％以上の光透過率を有する。光透過率は、例えば紫外可視分光光度計を用いて測定することができる。

[0035] 一実施の形態において、多孔質膜３はタンパク質の吸着能を有するものである。タンパク質の吸着能とは、電気化学発光免疫測定のための抗体等のタンパク質を測定可能なように多孔質膜上に固定できることを意味する。タンパク質の吸着能は、多孔質膜３への吸着前後の溶液に含まれるタンパク質量をブラッドフォード試薬などで定量することで評価することができる。多孔質膜３がタンパク質の吸着能を有することで、電気化学発光免疫測定に必要なタンパク質

の固定が容易となる。ここでいうタンパク質とは、免疫測定に利用可能なものであれば限定されない。例えば抗体またはそのフラグメントもしくは改変体、レクチン、タンパク質の一部（ドメイン、ポリペプチド）を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0036] 一実施の形態において、多孔質膜３は固定化した化合物を含んでいても良い。本発明において多孔質膜３に固定する化合物は検出対象化合物と特異的に結合する物質である。このような特異的結合物質は、多孔質膜３に固定でき、かつ、検出対象化合物を特異的相互作用により多孔質膜３内に固定することができることができる限りにおいてタンパク質に限定されない。このような特異的結合物質としては、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、糖質、ＤＮＡ、ＲＮＡ、受容体、ハプテンなどが挙げられ、分子量の高低および天然、合成といった由来に特に制限はないが、例えば、免疫反応を利用する免疫学的測定法に使用され得る抗体または抗原が好適に挙げられる。その他、特異的結合物質は低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、多糖類、ポリマー、レクチン、ならびに、それらの組み合わせにより構成される化合物であってもよい。多孔質膜３へのこれらの化合物の固定方法も電気化学発光免疫測定ができる限りにおいて限定されず、物理吸着や化学結合の利用など、多孔質膜へ化合物を固定するための公知の方法を採用することができる。

また本明細書において電気化学発光免疫測定というとき、抗原抗体反応を利用した電気化学発光の測定に限定されず、上記するような化合物同士の結合を利用した電気化学発光の測定であってもよい。

[0037] 一実施の形態において、本発明に係る積層体は透明絶縁基板をさらに含み、透明導電膜の第一の表面上に多孔質膜が積層しており、透明導電膜の第二の表面上に透明絶縁基板が積層している。当該積層体の一実施の形態を図２に示す。図２に示すように、積層体１’は、透明導電膜２と多孔質膜３と透明絶縁基板４とから構成される。

透明絶縁基板４としては、透明導電膜２上で生じた電気化学発光の光を透過できる基板であれば限定されず公知の透明絶縁基板を用いることができる。

透明絶縁基板を用いることにより、電気化学発光により生じた光を積層体１の透明基板４側に設置した光検出器で捕捉することができる。積層体１の透明基板４側に光検出器を設置することで、発光する場所から光検出器までの距離を短くすることができ発光捕集効率を高めることができる。

本発明に用いることのできる透明絶縁基板としては、以下に限定されないが、石英、ガラス、その他の透明ガラス材、ポリエチレンテレフタレート、ポリエステル、アクリル樹脂、ポリエチレン、ナイロン類、ポリ塩化ビニル、ポリイミド等を挙げることができる。

[0038] 一実施の形態において、透明絶縁基板４上には導通用電極や導電助剤など電気化学発光の測定に用いる他の構成をさらに備えていても良い。導通用電極としては、透明導電膜に直接接触して電流を流せるものであれば良くその形態や原料は限定されない。例えば、クロムや金からなる導通用電極を用いることができる。

導電助剤は公知のものを用いることができる。透明な導電助剤としては例えばポリエチレンジオキシチオフェンとポリスチレンスルホン酸からなる複合物（ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ）を挙げることができる。透明絶縁基板４が導電助剤によりコートされる場合、導電助剤をコートした透明絶縁基板４の表面上に多孔質膜／透明導電膜積層体を積層する。

[0039] 本発明に係る積層体は一実施の形態において電気化学測定用の電極として用いることができる。電気化学測定に用いる際には作用極と対極とからなる２電極系もしくは作用極と対極と参照極とからなる３電極系、または４電極以上の電極系における作用極または対極として用いることができる。好ましい実施の形態においては、積層体を作用極として用いる。

[0040] 本発明に係る積層体を電気化学測定用の電極として用いるとき、溶液側に多孔質膜が形成されているため、通常の多孔質膜が積層されていないグラフェン電極等に比べて、基板からの剥がれや破れが起こりにくく優れた耐久性を有する。測定条件により異なるが本発明に係る積層体は電気化学測定用の電極とし

て複数回（２回、３回、４回、５回、６回、７回、８回、９回、１０回またはそれ以上）用いることができる。

[0041] 本発明の別の態様は、多孔質膜と透明導電膜と透明絶縁基板とが順に積層した積層体を含むバイオチップを提供する。本発明に係るバイオチップは、好ましくは電気化学測定用のバイオチップである。より好ましくは電気化学発光免疫測定用のバイオチップである。

本発明に係るバイオチップの一実施の形態における模式図を図３に示す。図３に示すように、バイオチップ１１は、透明導電膜２と多孔質膜３と透明絶縁基板４とが積層した積層体を含む。多孔質膜３には検出対象化合物に対する特異的結合物質が固定されている。また透明導電膜２と透明絶縁基板４との間には一部、導通用電極５が積層している。バイオチップ１１は、積層体１の多孔質膜３の表面にメンブレン６をさらに有し、メンブレン６の表面上にさらに電気伝導体７とコンジュゲートパッド８と吸収パッド１０とを備える。コンジュゲートパッド８はさらにサンプルパッド９を備える。このような構成を有するバイオチップ１１は、光検出器１２に対して透明基板４側を向けて設置することで電気化学発光免疫測定を可能とする。図３に示す模式図は一実施例を示すに過ぎず、本発明のバイオチップは電気化学発光免疫測定の利用に供することができる限りにおいて当該構成に限定されない。

[0042] このようなバイオチップのサンプルパッド９に、検出対象化合物および共反応物を予め混合したサンプルが供給されると、検出対象化合物はサンプルパッド９を通過して下流側のコンジュゲートパッド８へと流れる。コンジュゲートパッド８では、検出対象化合物と電気化学発光物質標識化合物が接触して複合体を形成しながら当該パッドを通過する。その後、複合体および共反応物はコンジュゲートパッドの下面に接触して配置されたメンブレン６へと展開される。メンブレン６へ展開した複合体および共反応物は積層体１の多孔質膜３へ浸潤する。多孔質膜３には、その一部に検出対象化合物に結合する特異的結合物質が固定化されているため、当該複合体がここで結合して固定化されることになる。固定化された複合体には電気化学発光物質標識化合物が結合している

ため、透明導電膜２と電気伝導体７との間に電圧を負荷すると、共反応物の電極反応が生じ、さらに電極反応生成物と電気化学発光物質が反応することに由来する電気化学発光が生じる。当該発光を光検出器１２により測定することで検出対象化合物を検出する。

[0043] 本発明のバイオチップは一実施の形態において、透明導電膜と多孔質膜と透明基板とが積層した積層体、および、メンブレンを含む。また本発明のバイオチップは一実施の形態において、透明導電膜と多孔質膜と透明絶縁基板とが積層した積層体、メンブレン、および、電気伝導体を含む。また本発明のバイオチップは別の実施の形態において、透明導電膜と多孔質膜と透明絶縁基板とが積層した積層体、メンブレン、電気伝導体、および、コンジュゲートパッドを含む。また本発明のバイオチップは別の実施の形態において、透明導電膜と多孔質膜と透明絶縁基板とが積層した積層体、メンブレン、電気伝導体、コンジュゲートパッド、および、サンプルパッドを含む。その他、公知のニトロセルロースメンブレン等の試験片を用いたラテラルフロー式のイムノクロマト検出法に用いる構成を備えることができる。そのような構成は例えば特許６４６４３０８号公報に開示されている。バイオチップに含まれる積層体と追加の電気伝導体とは、一方が作用極であり他方が対極である限り、どちらを作用極として用いても良い。

[0044] バイオチップの実施例の形態の一部を例示として図４Ａ～Ｆに示す。図４Ａは、積層体１と透明絶縁基板４との間の一部に導通用電極５を有するバイオチップを示す。図４Ｂは、透明絶縁基板４上に積層体１と電気伝導体７とが順に積層したバイオチップであって、積層体１と透明絶縁基板４との間の一部に導通用電極５を有するバイオチップを示す。図４Ｃは、透明絶縁基板４の同一面上に積層体１と電気伝導体７とが互いに独立して積層したバイオチップであって、積層体１と透明絶縁基板４との間の一部に導通用電極５を有するバイオチップを示す。図４Ｄは、透明絶縁基板４の同一面上に２つの積層体１と電気伝導体７とが互いに独立して積層したバイオチップであって、積層体１と透明絶縁基板４との間の一部に導通用電極５を有するバイオチップを示す。図

４Ｅは、透明絶縁基板４の同一面上に互いに独立して３つの透明導電膜と１つの電気伝導体７を有するバイオチップであって、３つの積層体１が透明絶縁基板４との間の一部に１つの導通用電極５を有するバイオチップを示す。図４Ｆは、図３に示すバイオチップの透明絶縁基板上にさらに参照極１３を備えるバイオチップを示す。図４Ｇおよび図４Ｈは、図４Ｆに示すバイオチップにおいて複数の積層体１を有するバイオチップを示す。また図４Ｇおよび図４Ｈは、光検出器１２の代わりにイメージセンサ１４により電気化学発光を測定する実施の形態を示す。

図４Ｃ～Ｅに示す実施の形態においては、積層体１および電気伝導体７の上にメンブレンを接触させ、電解液を浸潤させることで透明導電膜２と電気伝導体７とが２電極系を構成する。

[0045] メンブレン６としては、検出対象物、電気化学発光標識試薬、共反応物が浸透し展開できるものであれば任意の材質のものが使用できる。例えば、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ナイロン類、ガラス、セルロースやニトロセルロースなどのセルロース誘導体などの多糖類あるいはセラミックスなどの多孔性のメンブレンが挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施の形態において、メンブレン６は電気化学発光の発光波長の吸収を示さない。より好ましい実施の形態において、メンブレン６は電気化学発光の発光波長の光透過性を有する。

[0046] 電気伝導体７は、電気化学測定の２電極系もしくは３電極系または４電極以上を備える電極系における対極または作用極として使用する。電気伝導体７としては、電気化学発光の測定に利用される公知の電極を用いることができる。例えば、白金、金、銀、銅、ステンレス、ニケッル、アルミニウム、カーボン電極などを用いることができる。電気伝導体７は、接着剤や押付部材等によりメンブレン６上に固定することができる。好ましい実施の形態において、電気伝導体７は反射材としての機能を有する。バイオチップの透明導電膜２の表面近傍で生じた電気化学発光のうち透明絶縁基板と反対方向に放出された光子を電気伝導体７が反射することで光検出器での光の捕収効率を向上させること

ができる。このような電気伝導体７の材質としては以下に限定されないが、白金、金、銀、銅、ステンレス、ニケッル、アルミニウム、それら金属基板上に形成したグラフェン膜などが好ましい。

[0047] コンジュゲートパッド８は、検出対象物と特異的に反応する電気化学発光標識化試薬を含む。当該試薬を含むコンジュゲートパッドの製法は限定されず、例えば当該試薬をコンジュゲートパッドに含浸させて乾燥させることで作製することができる。コンジュゲートパッドに適した材料として、紙、セルロース混合物、ニトロセルロース、ポリエステル、アクリロニトリルコポリマー、ガラス繊維またはレーヨンのような不織繊維が挙げられるが、これらに限定されない。

[0048] サンプルパッド９は、サンプルを受け入れるサンプル供給部を担う部位であり、パッドに成型された状態で液体のサンプルを吸収し、液体と検出対象物の成分とが通り抜けることができる物質及び形態であればいずれのものをも含む。サンプルパッド９の材質としては、ガラス繊維（グラスファイバー）、アクリル繊維、親水性ポリエチレン材、乾燥紙、紙パルプ、織物等が含まれるが、これらに限定されない。サンプルパッド９は、コンジュゲートパッド８の機能を併せ持たせてもよい。サンプルパッド９には、赤血球凝集剤やブロッキング試薬など適宜好ましい試薬が追加で含まれていても良い。

[0049] メンブレン６、コンジュゲートパッド８、サンプルパッド９、および、吸収パッド１０の構成や形態、各部材の材質、ならびに、各部材同士の積層方法および保持方法は公知のイムノクロマトグラフィー法に用いられているものを適用することができる。

本発明のバイオチップは、上記構成の他、サンプルパッド９やコンジュゲートパッド８と多孔性メンブレンの間に配置させることで検出対象物の検出に不要な成分を除去するための追加のパッド、参照極、反射材などの構成を有していても良い。

[0050] 本発明の積層体またはバイオチップを用いた電気化学発光免疫測定法において、検出対象化合物は特異的結合物質により多孔質膜中に捕捉でき、電気

化学発光免疫測定により検出できる化合物であれば制限されない。このような検出対象化合物としては、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、多糖類、ポリマー、脂質、核酸およびその類似体、ポリペプチド、タンパク質、抗体、レクチン、ならびに、それらの組み合わせにより構成される化合物が含まれる。好ましい実施の形態において、検出対象化合物は生体試料中に存在するまたは存在する可能性のある化合物である。このような検出対象化合物としては細菌やウイルスなどの微生物、がんマーカーなどの疾患関連マーカーを好適に挙げることができる。より具体的には生体試料中に含まれるタンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ）、糖鎖などを挙げることができる。

[0051] 本明細書において生体試料とは、例えば、組織、細胞、体液又は腹腔洗浄液が該当する。ここでいう「体液」とは、生体から採取された液体状の生体試料をいう。例えば、血液（血清、血漿及び間質液を含む）、髄液（脳脊髄液）、尿、糞便、唾液、リンパ液、消化液、腹水、胸水、神経根周囲液、各組織若しくは細胞の抽出液等が挙げられる。好ましくは血液である。生体試料由来の化合物に応じて精製や濃縮などの前処理をしたものを用いてもよい。生体試料の精製や濃縮は目的の検出対象物に応じて適宜公知の方法を採用することができる。

[0052] 本発明の別の態様は、上記のバイオチップを含む電気化学発光免疫測定用キットを提供する。当該キットは、少なくともバイオチップを含み、その他に測定に必要な試薬（例えば電気化学発光物質を含む試薬、共反応物を含む試薬、電解液）、検体の希釈液、試験用チューブ、生体試料採取、保管、もしくは、移送用の器具、取扱い説明書などを含んでもよい。

[0053] 本発明の別の態様は、上記で説明した本発明に係る積層体またはバイオチップを用いた電気化学発光免疫測定法により検出対象化合物を検出する方法を提供する。当該検出方法は以下の工程を含む：

（ａ）検出対象化合物と電気化学発光物質とを結合する工程と

（ｂ）積層体の多孔質膜内に検出対象化合物を捕捉する工程であって、前記多孔質膜内に固定された前記検出対象化合物に対する特異的結合物質により前記検出対象化合物を捕捉する工程と

（ｃ）工程（ａ）および（ｂ）の後、前記積層体に電位を印加して電気化学発光を測定する工程。

本発明に係る検出方法において、（ａ）検出対象化合物と電気化学発光物質とを結合する工程と、（ｂ）積層体の多孔質膜内に検出対象化合物を捕捉する工程とはいずれの工程が先であっても良い。すなわち、本発明に係る検出方法は、工程（ａ）の後に工程（ｂ）を実施しても良く、また、工程（ｂ）の後に工程（ａ）を実施しても良く、いずれの実施形態も含む。

[0054] 電気化学発光免疫測定法は、抗原抗体反応や化合物同士の結合などを利用して検出対象化合物を作用電極上またはその付近に捕捉し、捕捉した検出対象化合物に対してさらに電気化学発光物質を結合させることで、作用電極上で電気化学発光を生じさせ、検出対象化合物を検出する方法である。

本発明の検出方法に用いる積層体は、透明導電膜と多孔質膜と透明絶縁基板とからなり希少元素を含まないために製造コストが安く使い捨てにすることができる。よって、迅速な簡易検査やＰＯＣＴ機器への応用に適している。

[0055] 本発明の積層体またはバイオチップを用いた電気化学発光免疫測定に用いることのできる電気化学発光物質としては公知のものを利用することができる。電気化学発光物質またはその共反応物は、例えばS. Parveen, M. S. Aslam, L. Hu, and, G. Xu, Electrogenerated Chemiluminescence. Protocols and Applications, Heidelberg, 2013, pp.18-31 and pp. 44-60.およびZ. Liu et al., “Recent advances in electrochemiluminescence”, Chemical Society Reviews, 44, pp.3117-3142 (2015). https://doi.org/10.1039/C5CS00086Fや特許第３５７４４５７号公報などに開示される化合物を用いることができる。以下に限定されないが、トリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）およびその共反応物であるトリプロピルアミンの組み合わせ、トリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）およびその共反応物である２－（ジ－ｎ

－ブチルアミノ）エタノールの組み合わせ、ルミノールおよびその共反応物である過酸化水素の組み合わせなどを挙げることができる。

[0056] 本発明に係る検出方法は、（ａ）検出対象化合物と電気化学発光物質とを結合する工程を含む。

電気化学発光物質は、検出対象化合物と特異的に結合する構成を介して検出対象化合物と結合する。そのような構成としては、好適には抗体を挙げることができるが、これに限定されない。すなわち、電気化学発光物質は電気化学発光物質標識化合物を含む。電気化学発光物質標識化合物としては、例えば、上記のトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）などの化合物が結合した抗体を挙げることができる。

検出対象化合物と電気化学発光物質とを結合させるには、溶液中で２つの化合物を混合すれば良い。溶液は検出対象化合物および使用する電気化学発光物質により適宜選択することができる。以下に限定されないが、リン酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、グッド緩衝液など通常使用される緩衝液を好適に用いることができる。緩衝液のｐＨは、６．０～９．５の範囲が好ましく、検出対象化合物および使用する電気化学発光物質の性質に応じ適宜設定すれば良い。混合する条件は例えば、３７℃で３０分間振盪器を用いて穏やかに混和すればよい。

工程（ｂ）の後に工程（ａ）を実施する場合には、多孔質膜内に捕捉された検出対象化合物と電気化学発光物質とが結合するように、多孔質膜内へ電気化学発光物質を含む溶液を添加すれば良い。このとき必要に応じて、検出対象化合物と結合しなかった電気化学発光物質を緩衝液などで洗い流してもよい。

[0057] 本発明に係る検出方法は、（ｂ）積層体の多孔質膜内に検出対象化合物を捕捉する工程であって、前記多孔質膜内に固定した前記検出対象化合物に対する特異的結合物質により前記検出対象化合物を捕捉する工程を含む。

多孔質膜内に検出対象化合物を捕捉するために、多孔質膜内には検出対象化合物に対する特異的結合物質を固定しておく。多孔質膜に特異的結合物質を

固定する手法は限定されず、物理吸着や化学結合の利用など、多孔質膜へ化合物を固定するための公知の方法を採用することができる。例えば、所望のタンパク質（抗原に対する抗体など）を含む溶液を所定の濃度（例えば、０．１～５ｍｇ／ｍＬ）に調整し、その液を一定量多孔質膜に塗布すればよい。このようにしてタンパク質を多孔質膜に固定することができる。

特異的結合物質を多孔質膜へ塗布するための溶液は、以下に限定されないが、リン酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、グッド緩衝液など通常使用される緩衝液を好適に用いることができる。緩衝液のｐＨは、６．０～９．５の範囲が好ましく、特異的結合物質の性質に応じ適宜設定すれば良い。緩衝液には、さらにＮａＣｌなどの塩類、スクロースなどの安定剤や保存剤、プロクリンなどの防腐剤等を含んでもよい。塩類はＮａＣｌなどのようにイオン強度の調整のために含ませるもののほか、水酸化ナトリウムなど緩衝液のｐＨを調整する工程で添加するようになるものも含まれる。多孔質膜に特異的結合性物質を固定化した後、さらに、通常使用されるブロッキング剤を溶液あるいは蒸気状にして特異的結合性物質固定化部位またはそれ以外の部分を被覆し、ブロッキングを行うこともできる。

[0058] 上記のようにして特異的結合物質が固定された多孔質膜内に検出対象化合物を含む溶液を浸潤させる。これにより、多孔質膜内に検出対象化合物を捕捉することができる。また一実施の形態において、多孔質膜内への検出対象化合物の捕捉工程の後、余分な検出対象化合物を洗い流す洗浄工程を含む。

[0059] 検出対象化合物を多孔質膜内に浸潤させるための溶液および洗浄用の溶液としては、特異的結合物質を多孔質膜へ塗布するための溶液と同様の溶液を用いることができる。または電気化学発光免疫測定に用いる電解液を用いても良い。

本発明の積層体を電極として用いた電気化学発光免疫測定に用いる電解液としては、以下に限定されないが、リン酸緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、グッド緩衝液など通常使用される緩衝液を好適に用いることができる。また電解液は共反応物を含む。共反応物の濃度は以下に限定されないが、例えば０．０１～

０．３ｍｏｌ／Ｌとすることができる。さらに電解液は界面活性剤などの他の成分を含んでいても良い。界面活性剤としては以下に限定されないが、例えばＴｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ８０、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００などを用いることができる。界面活性剤の濃度は以下に限定されないが、例えば０．０１～２質量％とすることができる。

[0060] 本発明に係る検出方法は、（ｃ）工程（ａ）および（ｂ）の後、積層体に電位を印加して電気化学発光を測定する工程を含む。

工程（ａ）および（ｂ）を経ることで、積層体の多孔質膜内には検出対象化合物が捕捉されており、かつ、当該検出対象化合物に電気化学発光物質が結合している。この積層体に対して共反応物を含む電解液を浸し、電位を印加することで多孔質膜内の電気化学発光物質が電気化学発光を生じる。生じた電気化学発光を測定することで、検出対象化合物を定性的または定量的に検出することができる。またこのとき電解液に接触するように追加の電極が用いられる。追加の電極の位置は透明導電膜との間に電流が流れる限りにおいて制限されない。また追加の電極と透明導電膜とはいずれが作用極であってもよい。

[0061] 作用極への電位印加は、電解液中に含まれる共反応物の電極反応が生じる電位に応じて、ポテンショスタットなどの電圧供給源を用いて行う。一例としてトリプロピルアミン（ＴＰｒＡ）を共反応物として含む電解液を用いる場合は、作用極の電位を銀／塩化銀参照極に対して０Ｖから１．６Ｖへと掃引する。この際に、０．８Ｖ付近、さらにより高い電位範囲でＴＰｒＡは作用極上で酸化されトリプロピルアミンラジカルカチオン（$TPrAH^{+}$）が作用極表面近傍に生成する。生成した$TPrAH^{+}$の一部は電解液中で水素イオン（H^{+}）を放出し、トリプロピルアミンラジカル（ＴＰｒＡ・）へと変化する。ＴＰｒＡ・が電解液中を移動し、検出対象化合物と特異的結合物質とを介して多孔質膜に固定化された電気化学発光物質であるトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）（$Ru(bpy)_3^{2+}$）と衝突またはその近傍に到達すると、$Ru(bpy)_3^{2+}$がＴＰｒＡ・により還元され$Ru(bpy)_3^{+}$となる。さらにH^{+}を放出していない$TPrAH^{+}$が$Ru(bpy)_3^{+}$に衝突またはそ

の近傍に到達すると、Ｒｕ（ｂｐｙ）$_3^{+}$が酸化され、励起状態のＲｕ（ｂｐｙ）$_3^{2+*}$が生成し、再び基底状態のＲｕ（ｂｐｙ）$_3^{2+}$に戻る際に、発光をする。発光強度の測定は、市販のフォトダイオードや光電子増倍管を用いて行うことが可能である。光電子増倍管では、フォトダイオードに比べより微弱光の測定が可能であるため、より高感度な測定が可能である。ＣＭＯＳイメージセンサのような撮像素子を用いて行うことも可能である。撮像素子を用いると、作用電極上の発光量分布を画像として取得可能となるため、多孔質膜の異なる位置に異なる種類の特異的結合物質を予め塗布しておくことで、イムノクロマトグラフィー法におけるテストラインとコントロールラインとしての機能の付与や多項目分析が可能となる。

[0062] 本発明の別の態様は、上記の積層体を透明化した電極として使用する方法を提供する。当該積層体を透明化した電極として使用する方法は、多孔質膜の屈折率と同じ屈折率を有する溶媒を用いることを特徴とする。

本使用方法によれば、例えばＥＣＬ免疫分析の際、ＥＣＬを多孔質膜内で散乱させることなく光検出器で捉えることが可能になる。これにより発光領域と非発光領域の境界を鮮明にできる。複数の検査項目を分析デバイスの発光位置と関連づけることを考えた場合に、検査項目の集積化に寄与するといえる。

当業者であれば、多孔質膜の屈折率に合わせて、積層体を電極として用いる際に使用する溶媒の屈折率を一致させるように調整することができる。このような溶媒としては、グリセリンと水の組み合わせのような屈折率の異なる溶媒を組み合わせて、その組成比率を多孔質膜の屈折率と一致するように調整すればよい。用いることのできる溶媒は積層体の電極としての使用を阻害するものでなければ限定されない。

[0063] また本発明の別の態様は、エレクトロクロミックデバイスとして用いることのできる積層体を提供する。当該積層体は透明絶縁基板、透明導電膜、多孔質膜、透明導電膜、透明絶縁基板を順に積層している。このとき、多孔質膜の屈折率と同じ屈折率を有する溶媒を当該多孔質膜に加えることで、２つの透明導

電膜を作用極と対極として用いたエレクトロクロミックデバイスとして機能することができる。

このような積層体は電気伝導体を透明導電膜と接触するように備えていても良い。また積層体中のグラフェン膜はプルシアンブルーや銀を電着させても良い。

[0064] 本発明の別の態様は、透明絶縁基板と炭素導電膜と多孔質膜とが順に積層した積層体の製造方法を提供する。当該積層体の製造方法は、以下の工程を含む：

（ア）金属触媒基板上にＣＶＤ法により炭素導電膜を形成する工程

（イ）炭素導電膜上に多孔質膜をさらに形成して積層体を形成する工程

（ウ）前記金属触媒基板をエッチングにより除去し、透明絶縁基板上に炭素導電膜が接するように積層体を転写する工程

本発明に係る製造方法のスキームを図５に示す。

[0065] 従来、炭素導電膜としてグラフェン膜を有する電極を製造する際、金属触媒基板に形成したグラフェン膜上に転写支持膜としてＰＭＭＡ膜を形成させ、金属触媒基板のエッチングおよび所望の基板への転写の後、ＰＭＭＡ膜を除去する工程を含んでいた。しかしながら上記工程を含む本発明の製造方法によれば、転写支持膜の代わりに多孔質膜を形成して転写支持膜の役割も担うことができるため、転写支持膜の除去工程を含まず、製造にかかる作業、時間、および、コストを抑えることを可能とする。

また従来のＰＭＭＡを転写支持膜とするグラフェン膜の転写方法では、ＰＭＭＡ除去後のグラフェン膜表面にＰＭＭＡ残渣が生じていた。このような残渣はグラフェン膜の特性に好ましくない影響を与える。一方、本発明の製造方法は転写支持膜の除去工程を含まないために上記問題を回避することができる。

従来の転写支持膜を用いるグラフェン電極の製造スキームを図６に示す。

[0066] 本発明に係る積層体の製造方法は、（ア）金属触媒基板上にＣＶＤ法によりグラフェン膜を形成する工程を含む。金属触媒基板１５上にＣＶＤ法により

グラフェン膜２’を形成する方法は公知であり、例えば非特許文献３を参照して実施することができる。本発明に用いることのできる金属触媒基板１５は限定されずグラフェン膜２’の形成に利用される公知の基板を用いることができる。好ましくは、銅基板、ニッケル基板、コバルト基板、イリジウム基板、白金基板、金基板、それらの合金基板を挙げることができる。また耐熱性基板にこれらの金属が蒸着された基板を用いてもよい。

[0067] 工程（ア）により金属触媒基板上にグラフェン膜を形成した後は、（イ）グラフェン膜上に多孔質膜をさらに形成する工程を行う。

多孔質膜３をグラフェン膜に形成する方法は限定されず、スピンコート法、スプレーコーティング法、アプリケーターやバーコーターを使用した塗膜形成法、蒸着などの公知の手法を用いることができる。以下、スピンコート法により多孔質膜を形成する方法について説明する。

[0068] 多孔質膜３の原料となるポリマーを溶媒に溶解し、多孔質膜形成用溶液を調製する。ポリマーは形成したい多孔質膜３に応じて適当なものを選択することができる。多孔質膜３の形成のために用いるポリマーは一種類でもよく、二種以上を用いてよい。

スピンコート法により多孔質膜３を形成する際には、溶媒の選択や溶媒中のポリマーの濃度、スピンコータの回転速度、溶液の粘度、ポリマーの平均分子量（粘度に影響）などの条件により多孔質膜の膜厚および平均孔径が変化することが知られている。当業者であれば、用いるポリマーや溶媒により所望の膜厚および平均孔径を有する多孔質膜を形成できるように適宜前記の条件を設定することができる。以下にスピンコート法により多孔質膜３を形成する条件を例示として記載するが、これらに限定されない。

[0069] 溶媒はポリマーを溶解でき、スピンコート法により多孔質膜を形成できるものであれば制限されない。溶媒としては例えば、アセトン、メタノール、ジエチルエーテル、酢酸エチルなどを用いることができる。溶媒は低沸点のものが好ましい。好ましい実施の形態において、溶媒は１００℃以下の沸点を有するものであり、より好ましい実施の形態において溶媒は８０℃以下の沸点を有す

るものである。一般に低沸点の溶媒の蒸発速度は速いため、低沸点の溶媒を用いると溶液中のポリマーの析出速度が高くなり、ポリマーがランダムに析出することで多孔質構造が形成されることとなり、好ましい。

また一実施の形態において、溶媒はポリマーに対して良溶媒と貧溶媒との混合溶媒とすることが好ましい。良溶媒と貧溶媒との混合溶媒では溶媒が蒸発する過程において、良溶媒の減少により混合溶媒は次第に悪溶媒に変化し相分離する。この相分離により、ポリマーの多孔質化が促進される。ポリマーに対する良溶媒と貧溶媒とは当業者であれば適宜選択することができる。例えば、ポリマーが酢酸セルロースである場合、アセトン／ホルムアミド混合溶媒を用いることができる。その他混合溶媒としては、アセトン／ジメチルスルホキシドを挙げることができる。しかしながら混合溶媒はこれらに限定されない。良溶媒と貧溶媒との混合比率は、多孔質化が促進される限り限定されないが、例えば良溶媒：貧溶媒の体積比は９９：１～１：１とすることができる。

溶媒中のポリマーの濃度は以下に限定されないが、例えば０．５～２０質量％とすることができる。

スピンコータのステージ上に金属触媒基板１５とグラフェン膜２’との積層体を固定し、グラフェン膜２’の表面かつ中心付近に調製した多孔質膜形成用溶液を滴下する。滴下する多孔質膜形成用溶液はグラフェン膜２’を十分に覆う量であればよい。スピンコータの回転速度や回転時間は所望の多孔質膜を形成できる限りにおいて制限されない。例えば回転速度を２００～５００Ｏｒｐｍとすることができ、またスピンコータの回転時間を１０～１２０秒とすることができる。その後、溶媒が残留している場合には加熱による乾燥を行う。

[0070] 好ましい実施の形態において、多孔質膜３はアプリケーターなどを用いてキャストし相転換法によりグラフェン膜上に形成することができる。

相転換法は、高分子などの材料をある制御された条件のもとで液相状態から固相状態に相転換する際に多孔化する方法である。代表的な相転換法には、非溶媒誘起相分離法と熱誘起相分離法がある。非溶媒誘起相分離法には、非溶

媒あるいは貧溶媒を含む高分子溶液中の溶媒が蒸発することによって高分子の溶液状態が不安定になり、非溶媒存在下で高分子が析出する現象と、非溶媒が高分子と接触して高分子溶液中の溶媒が非溶媒に抽出されると同時に非溶媒が高分子溶液中に進入することによって高分子溶液が不安定となり高分子が析出する現象がある。前者を乾式相転換法、後者を湿式相転換法とよぶ。また両者を組み合わせた乾湿式相転換法がある。相転換法による多孔質膜の形成手法は公知であり、例えばMasahiro Tamura, Tadashi Uragami, Mizuho Sugihara, “Permeation Characteristics on Cellulose Nitrate-Cellulose Acetate Blend Polymer Membranes,” Journal of the Japan Society of Colour Material Vol. 50 (6), 317-322 (1977)を参照することができる。

相転換法に用いる溶媒はスピンコート法と同様のものを用いることができる。また溶媒中のポリマーの濃度は０．５～２０質量％とすることができる。

[0071] 工程（イ）によりグラフェン膜上に多孔質膜を形成した後、（ウ）金属触媒基板をエッチングにより除去する工程を行う。金属触媒基板１５を除去する方法は公知の手法を採用することができる。例えば金属触媒基板１５に銅箔を用いる場合、硝酸鉄（III）水溶液でエッチングすることが可能である。金属触媒基板１５において多孔質膜３を形成していない裏面にもグラフェンが生成している場合には、金属触媒基板１５をエッチングする前に酸素プラズマ処理などを用いて裏面のグラフェン膜の除去を行う。グラフェン膜を除去した側の面をエッチング液に接触させるように多孔質膜３／グラフェン膜２’／金属触媒基板１５をエッチング液に浮かべて金属触媒基板１５を除去する。金属触媒基板１５の除去後、多孔質膜３とグラフェン膜２’とからなる積層体は純水プールの水面に移すことで洗浄する。洗浄工程は３回以上行うことが好ましい。この純水に浮かべた積層体１を任意の透明絶縁基板４で掬い上げる。掬い上げた後、積層体１を乾燥させてグラフェンの転写が完了となる。この掬い取りの前に、透明絶縁基板４にグラフェン導通用の導通用電極５を予め形成してくことが好ましい。この導通用電極５上にグラフェン膜２’の一部が載るように掬い

取る。このようにしてグラフェン膜２’と多孔質膜３と透明絶縁基板４からなる積層体１’を製造することができる。

[0072] 以下、実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施の形態に限定されない。

[0073]（実施例１．グラフェン膜および多孔質膜からなる積層体の製造）

本実施例では、単層グラフェン膜とセルロース膜（多孔質膜）とからなる積層体（以下、多孔質膜／グラフェン積層体」ともいう）を以下のようにして製造した。

グラフェンの化学気相成長（ＣＶＤ）の成長用の金属触媒基板として銅箔（３５μｍ）を用意した。ＣＶＤによるグラフェン膜形成の前に、銅箔を純水、エタノール、および、アセトンに順に浸漬し、超音波処理を行い、銅箔表面の洗浄を行った。その後、銅箔を熱ＣＶＤ炉に移し、水素を流入し、水素雰囲気全圧７００Ｐａ、１０００℃の条件で銅基板の水素アニール処理を３０分間行った。その後、メタンを流入し、メタン２ｓｃｃｍ及び水素２０ｓｃｃｍの流量で、１０００℃、全圧７５０Ｐａで１０分間グラフェンのＣＶＤ成長を実施した。

[0074] スピンコート法を用いて、銅箔上に形成されたグラフェン膜上に多孔質膜を作製した。

グラフェン転写の支持層には、ニトロセルロース（ＣＮ）、酢酸セルロース（ＣＡ）、またはニトロセルロースと酢酸セルロースの混合膜（セルロース混合エステル膜（ＭＣＥ））を用いた。多孔質膜形成用の溶液の原料として、ニトロセルロース（ナカライテスク、品番２４７２８－３４）、酢酸セルロース（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、品番４１９０２８）と溶媒であるアセトンとを用意した。酢酸セルロースまたはニトロセルロースの含有量が２質量％になるように、酢酸セルロースまたはニトロセルロースとアセトンとを混合して多孔質膜形成用の溶液を調製した。またニトロセルロースと酢酸セルロースの両方の合計含有量が２質量％であって、ニトロセルロースと酢酸セルロースの質量比が３：１、１：１、１：３となるように、ニトロセルロースと酢酸セル

ロースとアセトンとを混合して組成の異なる３種類のセルロース混合エステル溶液を調製した。比較用の試料として、従来のグラフェン転写の支持膜として利用されてきたＰＭＭＡ溶液を用意した。ＰＭＭＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、品番１８２２６５）の含有量が４質量％となるように、溶媒である乳酸エチルに溶解してＰＭＭＡ溶液を調製した。

次に、銅箔上に形成されたグラフェン膜上に多孔質膜形成用の溶液を滴下し、２０００ｒｐｍの条件にてスピンコートを行い、ニトロセルロース膜、酢酸セルロース膜、または、セルロース混合エステル膜を形成した。また同様の条件にて、銅箔上に形成されたグラフェン膜上に転写支持膜であるＰＭＭＡ膜を形成した。多孔質膜または転写支持膜を形成後、銅箔の裏側に形成された不要なグラフェン膜を酸素プラズマ処理により除去した。これにより多孔質膜／グラフェン膜／銅箔からなる積層体を得た。また比較例としてのＰＭＭＡ膜（転写支持膜）／グラフェン膜／銅箔からなる積層体を得た。

[0075] エッチング槽を用意し、槽内に２５℃、硝酸鉄（III）水溶液（０．５ｍｏｌ／Ｌ）の銅エッチング溶液を貯留した。銅エッチングを行う多孔質膜／グラフェン膜／銅箔からなる積層体のサイズは１５ｍｍ×１０ｍｍとした。銅エッチング溶液に積層体を銅箔が溶液と接触するように浮かべて、５時間のエッチングにより積層体の銅箔を除去した。これにより多孔質膜とグラフェン膜とを備える多孔質膜／グラフェン膜積層体を得た。また比較例としてのＰＭＭＡ膜（転写支持膜）／グラフェン膜積層体を得た。

[0076] 作製した多孔質膜／グラフェン膜積層体の多孔質膜表面をＳＥＭ（ＦＥ－ＳＥＭ、ＺＥＩＳＳ社製）を用いて観察し、撮影したＳＥＭ画像から孔径や孔が表面を占める割合を測定した。ＳＥＭ観察に用いた試料は、スピンコート後の銅箔上に形成された多孔質膜／グラフェン膜積層体の多孔質膜表面に白金を３ｎｍコートした試料である。同様に、比較例としてのＰＭＭＡ膜の表面の観察も行った。図７にＳＥＭ像を示す。ＰＭＭＡ膜は平滑な表面を有しており、孔のない緻密な膜構造を形成していた。ＣＮ膜とＣＡ膜は孔を有するが、孔径の小さなもので構成されており、１００ｎｍ以上のサイズの孔は見られなかっ

た。またＣＡ膜は孔の密度が低い表面を有していた。作製したすべてのセルロース混合エステル膜は多孔質構造を有しており、ニトロセルロースの質量比が高くなるほど孔直径が大きくなる傾向が観察された。ＳＥＭ画像で認識可能なすべての孔の直径を、スケールバーを基準にして見積もった。またその孔直径データより、ＣＮ膜における多孔質膜の膜表面に対する細孔の面積比である細孔の表面占有率を算出した。セルロース混合エステル膜については、ＳＥＭ画像を白黒画像に変換後に黒い面積が占める割合を細孔の表面占有率として算出した。図８および９に各試料の細孔径分布（ヒストグラム）を示す。ヒストグラムは、図７のＳＥＭ画像上で認識可能なすべての孔の直径の値から作成されたものである。そのため孔が観測されなかったＰＭＭＡ膜および孔密度の低いＣＡ膜以外のヒストグラムを示す。ＣＮ膜は４０ｎｍ以下の直径の孔のみを有し平均孔直径は１７ｎｍであった。またＣＮ膜における孔の表面占有率は２．１％であった。ＣＮ：ＣＡ＝１：３のセルロース混合エステル膜は１５０ｎｍ以下の孔のみを有しており、平均孔直径は４９ｎｍであった。ＣＮ：ＣＡ＝１：１およびＣＮ：ＣＡ＝３：１のセルロース混合エステル膜は１５０ｎｍ以上のサイズの孔を有しており、平均孔直径はそれぞれ１４０ｎｍ、８８０ｎｍであった。ＣＮ：ＣＡ＝３：１では、直径５５０ｎｍ程度の大きな孔を多く有しており、１．５μｍ以上のさらに大きい孔サイズの孔分布も有する膜構造であった。またＣＮ：ＣＡ＝１：３、ＣＮ：ＣＡ＝１：１およびＣＮ：ＣＡ＝３：１のセルロース混合エステル膜における孔の表面占有率はそれぞれ３８％、４０％、３２％であった。

[0077] （実施例２．多孔質膜、グラフェン膜、および、透明絶縁基板からなる積層体の製造）

本実施例では、実施例１で製造した多孔質膜／グラフェン膜積層体を透明絶縁基板上に転写し、多孔質膜、グラフェン膜、および、透明絶縁基板からなる積層体を製造した。

透明絶縁基板として、石英基板（厚さ１ｍｍ、２０ｍｍ×２０ｍｍ）を用意した。この石英基板の一部に、真空蒸着装置を用いて厚さ１０ｎｍのクロム

を蒸着し、さらにクロムの上に厚さ５０ｎｍの金を蒸着した。この金属蒸着膜は、石英基板上に多孔質膜／グラフェン膜積層体を積層させた際の、導通用電極として機能するものである。

超純水を満たした水槽を用意し、銅エッチング後の、エッチング液に浮いた状態の多孔質膜／グラフェン膜積層体を用意した水槽の水面に移して水洗した。さらに別の水槽に移すことで積層体の洗浄を繰り返した。この水洗工程を３回行った。超純水プールに浮かべた多孔質膜／グラフェン膜積層体を、予め導通用電極としてクロム及び金が蒸着された石英基板を用いて掬い上げた。この際、導通用電極の一部に多孔質膜／グラフェン膜積層体の一部が重なるように積層させた。このようにして、透明絶縁基板である石英基板、多孔質膜およびグラフェン膜からなる積層体を製造した。

[0078] 製造した積層体上の多孔質膜の厚みを、触針段差計（ＢＲＵＫＥＲ社製）により計測した。２質量％の酢酸セルロースとニトロセルロース混合溶液（ＣＮ：ＣＡ＝３：１）を用いて製造した石英基板上の積層体の厚みは、約４００ｎｍであった。一方、４質量％のＰＭＭＡを含む乳酸エチル溶液を用いて製造した積層体の厚みは約１５０ｎｍであった。

[0079]（実施例３．多孔質膜の転写支持能の検証）

本実施例では、金属触媒基板のエッチング工程またはその後の透明絶縁基板への転写工程における多孔質膜の転写支持能を検証した。

ニトロセルロースの濃度が１質量％のアセトン溶液を用いた以外は、実施例１と同様の条件でグラフェン膜上に多孔質膜を形成した。グラフェン膜上に形成した多孔質膜の厚さは１００ｎｍ未満であった。多孔質膜形成後に銅箔のエッチングを行ったところ、支持力の不足により膜の破れが生じた。

また、ニトロセルロースの濃度が６質量％または酢酸セルロースの濃度が４質量％のアセトン溶液を用いた以外は、実施例１と同様の条件でグラフェン膜上に多孔質膜を形成した。グラフェン膜上に形成した多孔質膜の厚さは１μｍ以上であった。多孔質膜形成後の銅箔のエッチング工程ではグラフェン膜を支持することができたが、石英ガラス基板への転写後に一部石英ガラス基板

からの剥離が見られた。これは膜厚の増加に伴い支持膜の内部応力が増加し、応力がグラフェンと石英基板との付着力を上回ったことを意味する。またこれらの支持膜形成条件では、応力を緩和するのに十分な多孔質構造が形成されなかったと考えられる。一方で、石英基板の代わりにＰＥＴ基板を用いた際には多孔質膜の厚さが１μｍ以上であっても剥離が生じなかった。１μｍ程度の厚みの支持膜を用いた場合には、膜のフレキシブル性が高いために、平滑な表面を有する石英基板よりもＰＥＴ基板との密着性が高くなると考えられる。

[0080] （実施例４．グラフェン膜および多孔質膜からなる積層体の評価と電気化学発光測定）

実施例２で製造した石英ガラス基板上に転写した多孔質膜／グラフェン膜積層体が電気化学発光測定に適用可能であるか検証した。

実施例２において、最終的に得た蒸着膜付きの石英基板および多孔質膜およびグラフェン膜からなる積層体を用いて電気化学発光測定を行った。電気化学発光測定には図１０に示す測定セルを用いた。作用極として実施例２で製造した石英基板上に積層された多孔質膜／単層グラフェン膜積層体を用いて、金／クロム蒸着膜を導通用電極として利用した。参照極としてＢＡＳ社製の銀／塩化銀電極を用い、対極としてニラコ製の白金線（Φ０．５ｍｍ）を用いた。本実施例においては、発光物質としてトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）を用い、共反応物としてトリプロピルアミンを用いた電気化学発光系を採用した。電解液には１０ｍｍｏｌ／Ｌの濃度のトリプロピルアミンと１ｍｍｏｌ／Ｌの濃度のトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）とを含む０．１５ｍｏｌ／Ｌのリン酸緩衝水溶液（ｐＨ７．４）を用いた。多孔質膜／グラフェン膜積層体の上にΦ４ｍｍのＯリングを置きＰＴＦＥ樹脂製のブロックで挟み込み測定セルを組んだ。電気化学発光の強度を測定するための光検出器として、光電子増倍管（Ｈ１２６９０－３００、浜松ホトニクス社製）を積層体の石英基板側に配置した。

[0081] サイクリックボルタンメトリー（ＣＶ）法により作用極である多孔質膜／グラフェン膜／透明絶縁基板からなる積層体の電位を参照極に対して０Ｖから

１．４Ｖへと掃引しながら、作用極と対極間に流れる電流および作用極表面で生じた電気化学発光量の計測を行った。

図１１は、ＣＮ：ＣＡ＝３：１のセルロース混合エステル膜からなる多孔質膜／グラフェン膜積層体を作用電極として測定した際の、電極表面の写真であり、電解液に接触している領域全体から発光が観察できたことを示す。これらの結果は、Ｏリングで囲まれた多孔質膜全体に電解液が浸透し、トリプロピルアミンおよびトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）がグラフェン膜上で反応し、電気化学発光が生じたことを示す。図１２は、ニトロセルロース膜／グラフェン膜積層体またはセルロース混合エステル多孔質膜／グラフェン膜積層体を作用極として行った電気化学発光測定の結果である。０．８Ｖからトリプロピルアミンの酸化反応に由来する電流増加が観測された。また１．０Ｖ付近からのトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）の酸化反応に由来する電流増加が観測された。同時に１．０Ｖ付近から電気化学発光が生じることを確認した。ＣＡ膜／グラフェン膜積層体では、ほとんど電流が流れず、電気化学発光を観測することができなかった。ＣＮ膜／グラフェン膜積層体では、セルロース混合エステル膜に比べて電流、電気化学発光強度ともに小さい結果となった。ＣＮ膜／グラフェン膜積層体の電流－電位曲線（ＣＶ曲線）において１．２Ｖから増加している電流は、溶媒である水の電気分解によるものと考えらえる。ＳＥＭ像よりＣＮ膜の表面の孔のサイズは小さく、孔の表面占有率も低かったことから、ＣＮ膜を透過しグラフェン膜まで到達する発光物質と共反応物が少ないために発光強度が低かったといえる。３種類のセルロース混合エステル多孔質膜／グラフェン膜積層体を比較すると、ＣＮ：ＣＡ＝１：３の質量比の試料を作用極とした場合が、他の２種の試料に比べて電流と電気化学発光強度が低い結果となった。ＳＥＭ像から、ＣＮ：ＣＡ＝１：３の試料の孔サイズが他の２種のセルロース混合エステル膜に比べて小さいことが原因と考えられる。ＣＮ：ＣＡ＝１：３の試料の平均孔サイズは約５０ｎｍであり、すべて１５０ｎｍ以下の孔で構成された多孔質構造であったのに対し、他の２種のセルロース混合エステル膜は１５０ｎｍ以上の孔を多く有して

いた。これらのことから電気化学発光強度を高める上で孔サイズがある程度大きいことが好ましいことがわかる。

[0082]（実施例５．３電極系測定チップの製造と電気化学発光測定）

透明絶縁基板上に積層した多孔質膜／グラフェン膜積層体上にニトロセルロースメンブレンを積層し、さらにそのメンブレン上に白金対向電極を積層した３電極系測定チップを作製し、電気化学発光測定に利用できるかを検証した。作製した電気化学発光測定の３電極チップの概要図を図１３に示す。透明絶縁基板４上には、多孔質膜／グラフェン膜積層体１とその導通用電極５の金／クロム蒸着膜とは別に、銀／金／クロム蒸着膜（銀電極）が形成されている。作製した電気化学発光測定チップは、作用極である多孔質膜／グラフェン膜積層体１と、参照極１３である銀電極と、対極として用いる白金対向電極（電気伝導体７）とからなる３電極系を備えている。

[0083] 実施例１と同様に多孔質膜／グラフェン膜積層体を作製し、実施例２と同様にクロムと金が蒸着された石英基板上に多孔質膜／グラフェン膜積層体を転写した。多孔質膜は、合わせて２質量％のニトロセルロースと酢酸セルロース（ＣＮ：ＣＡ＝３：１）を含むアセトン溶液を用いて、スピンコート法によりグラフェン膜上に形成された。本実施例では、石英基板上に金／クロムの蒸着膜に加えて銀／金／クロムの蒸着膜を形成した。多孔質膜／グラフェン膜積層体を石英基板に転写する際、金／クロム蒸着膜に重なり、銀／金／クロム蒸着膜には重ならないよう多孔質膜／グラフェン膜積層体を石英基板で掬い上げた。続いて多孔質膜／グラフェン膜積層体が転写された石英基板上に、ニトロセルロースメンブレン（Ｃｙｔｉｖａ、ＡＥ９８、バッキングシートなし、厚み：１０５－１４０μｍ）を多孔質膜／グラフェン膜積層体と銀／金／クロム蒸着膜の両方に重なるように積層した。さらにニトロセルロースメンブレンの上に対極として白金対向電極を積層することで３電極系測定チップを作製した。石英基板上に蒸着された銀／金／クロム蒸着膜は電気化学発光測定の参照極とした。ニトロセルロースメンブレンに濃度１０ｍｍｏｌ／Ｌのトリプロピルアミンと濃度１ｍｍｏｌ／Ｌのトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム

（II）とを含むリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）を含浸させ、ＣＶ測定を行った。測定に使用したセル構造以外の条件は、実施例４と同様である。作用極の面積は１ｃｍ^{2}とした。また比較として、従来の転写支持膜として使用していたＰＭＭＡ膜／グラフェン膜積層体を作用極とする３電極測定チップも同様に作製し、電気化学発光測定を行った。図１４は、電気化学発光測定の結果である。セルロース混合エステル多孔質膜／グラフェン膜積層体を作用極とする測定チップでは、０．６Ｖからトリプロピルアミンの酸化反応に由来する電流が観測され、０．８Ｖからトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）の酸化反応に由来する電流増加が確認された。それに伴い、０．８Ｖから発光強度の増加が確認された。一方で、ＰＭＭＡ／グラフェン膜積層体を作用電極とする測定チップを用いた場合には、電流も電気化学発光も観測されなかった。これは図７のＳＥＭ像に示されるように、作製したＰＭＭＡ膜が緻密な膜構造を有しており、電解液がＰＭＭＡ膜に浸透できず電極反応が生じなかったことが原因である。このように多孔質膜／グラフェン膜積層体を作用極とする３電極系測定チップが電気化学発光測定に適用できることが確かめられた。

[0084]（実施例６．多孔質膜／グラフェン膜積層体を用いた電気化学発光免疫測定）

本実施例では、本発明に係る多孔質膜／グラフェン膜積層体が電気化学発光免疫測定用の電極として用いることができるか検証するため、多孔質膜／グラフェン膜積層体を用いた電気化学発光免疫測定法によりがん胎児性抗原（ＣＥＡ）の検出を試みた。

具体的には、多孔質膜／グラフェン膜積層体の多孔質膜に抗ＣＥＡ抗体を固定化し、抗原であるＣＥＡと標識物質としてトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）が結合された抗ＣＥＡ抗体とを含む溶液を多孔質膜上に滴下して、多孔質膜／グラフェン膜積層体の多孔質膜上に抗原抗体反応によりサンドイッチ型免疫複合体を形成させた。電解液にはトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）の共反応物であるトリプロピルアミン１０ｍｍｏｌ／Ｌを含む０．１５ｍｏｌ／Ｌリン酸緩衝液を用いた。トリプロピルアミンが電極上で酸化され、免疫複合体に標識として結合しているトリス（２，２’－

ビピリジル）ルテニウム（II）と反応することで生じる電気化学発光を観測し免疫測定が可能であるか確認した。

[0085] ６－１．試薬

・エクルーシス試薬ＣＥＡII（ビオチン化抗ＣＥＡ抗体およびトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）標識抗ＣＥＡ抗体を含む）（ロシュダイアグノスティクス、品番５７０４４４－０１６）

・ＣＥＡキャリブレータ（ＣＥＡを含む）（ロシュダイアグノスティクス、品番３１６４５７）

・ブロッキング試薬Ｎ１０１（日油）

[0086] ６－２．積層体の作製

ニトロセルロース（ＣＮ）と酢酸セルロース（ＣＡ）を、質量比がＣＮ：ＣＡ＝３：１であって、かつ、２質量％の溶質濃度となるようにアセトンに溶解させて多孔質膜形成用溶液を調製した。

[0087] 調製した多孔質膜形成用溶液を用いて実施例１と同じ条件にて、グラフェン膜および多孔質膜からなる積層体を製造し、石英ガラス基板（２０ｍｍ×２０ｍｍ×１ｍｍ）に転写した。転写前に、ＣＶＤ形成用の銅箔の洗浄と同じ手順で石英ガラス基板を洗浄した。石英ガラス基板は導通用電極として予めクロムと金からなる蒸着電極を有するものを用いた。以下の電気化学発光免疫測定では石英ガラス基板に転写した積層体を作用極として用いた。

[0088] ６－３．電気化学発光免疫測定

石英基板上の多孔質膜／グラフェン膜積層体（以下、「電極」ともいう）の多孔質膜上へ３ｍｇ／Ｌのビオチン化抗ＣＥＡ抗体（以下、「捕捉抗体」ともいう）を含む溶液を２０μＬ滴下し、溶液が乾燥しないように密閉容器内に入れ、３７℃で６０分間静置した。６０分間の静置後、多孔質膜上の捕捉抗体を含む溶液を不織布で吸い取り、電極をブロッキング溶液に浸漬し、３７℃で３０分間静置した。ブロッキング溶液には、ブロッキング試薬Ｎ１０１を純水で５倍希釈した溶液を用いた。ブロッキング溶液から取り出した電極を純水に６０秒浸漬させる工程を２回行い、電極に付着したブロッキング溶液を洗い流

した。電極を自然乾燥させた後、４０ｎｇ／ＬのＣＥＡを含む溶液試料３μＬと４ｍｇ／Ｌのトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）標識抗ＣＥＡ抗体（以下、「標識抗体」ともいう）を含む溶液１５μＬを電極の多孔質膜上に滴下し、電極を密閉容器内に入れ、３７℃で９０分間静置し、抗原抗体反応により多孔質膜上にサンドイッチ型免疫複合体を形成させた。またネガティブコントロールとして、同様の手順で捕捉抗体の固定とブロッキング処理を行った後にＣＥＡを滴下せず標識抗体のみを滴下させて作製した電極を用意した。これらの電極を密閉容器から取り出した後、純水に６０秒間浸漬させる工程を２回行い、未反応の標識抗体およびＣＥＡを除去した。

実施例２と同一の装置を用いてサイクリックボルタンメトリー法により電極の電位を０Ｖから１．６Ｖまで掃引し電気化学発光測定を行った。なお電解液には濃度１０ｍｍｏｌ／Ｌのトリプロピルアミンを含む０．１５ｍｏｌ／Ｌのリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）を用いた。

[0089] ６－４．結果

電気化学発光による免疫測定結果を図１５に示す。図１５に示すように電位を高電位側に掃引することで、トリプロピルアミンの酸化反応に由来する電流増加を確認することができた。またＣＥＡ試料を滴下した試料においては、電流量の増加に伴った発光強度の増加が確認できた。

[0090] ６－５．比較試験およびその結果

上記免疫測定結果がＣＥＡと結合していない標識抗体による発光でなく、多孔質膜に固定化された捕捉抗体－ＣＥＡ－標識抗体の免疫複合体からの発光であることを確認するため、捕捉抗体が固定化された多孔質膜に標識抗体のみを滴下して作製した電極で上記条件と同様に電気化学発光測定を行い比較した。その結果を図１５の破線に示す。図１５に示すように複合体を固定していない電極では発光は観測されなかった。従って、発光は多孔質膜上の捕捉抗体にＣＥＡとともに結合した標識抗体由来のものであり、結合していない標識抗体由来の発光でないことが確認できた。

このように本発明に係る積層体は電気化学発光免疫測定に用いることができる。

[0091]（実施例７．多孔質膜／グラフェン膜積層体の耐久性の評価）

単層のグラフェンを電気化学分析用の電極として利用する場合、原子一層の厚みのグラフェンを支持する基板が必要となる。基板とグラフェンとの接着は、基板とグラフェンとの間に働くファンデルワールス力により貼り付いているだけであるため、グラフェンに接触する流体の流れが強い場合や、異なる組成の溶液に置換される場合に、基板とグラフェン間に溶液が侵入することで部分的なグラフェンの破れが生じることがある。単層のグラフェンに破れが生じると、電気伝導性が低下するため、電流値の低下につながる。ここで本発明に係る多孔質膜／グラフェン膜積層体は溶液側に多孔質膜が形成されているため、通常の多孔質膜が積層されていないグラフェン電極に比べて、基板からの剥がれや破れが起こりにくいと考えられる。そこで本実施例では、多孔質膜／グラフェン膜積層体の耐久性を評価することを目的とし、電気化学発光測定の繰り返し試験を行った。比較として、多孔質膜が積層されていないグラフェン電極でも同様に試験を行った。

[0092] ７－１．積層体の作製およびＥＣＬ測定

多孔質膜／グラフェン膜積層体には、スピンコート法により作製したＣＮ：ＣＡ＝３：１のセルロース混合エステル膜で転写したグラフェン電極を用いた。作製手法は、実施例２と同様である。グラフェン電極は実施例２と同様にＰＭＭＡ支持転写法により作製した。これらの電極を用いて１０ｍｍｏｌ／Ｌの濃度のトリプロピルアミンと０．１ｍｍｏｌ／Ｌの濃度のトリス（２，２’－ビピリジル）ルテニウム（II）とを含む０．１５ｍｏｌ／Ｌのリン酸緩衝水溶液（ｐＨ７．４）を電解液としてサイクリックボルタンメトリー（ＣＶ）法によるＥＣＬ測定を行った。両電極ともに１０回ずつ測定を繰り返し、測定ごとにＰＢＳで電極を洗浄して溶液交換を行った。また、測定前、５回目と１０回目の測定後に、電気化学インピーダンス分光法（ＥＩＳ）により溶液抵抗とグラフェンの抵抗の和（Ｒｓ）を測定した。

[0093] ７－２．結果

図１６に、ＥＣＬ測定をそれぞれの電極で１０回繰り返し行ったときの各回の１．２ＶにおけるＥＣＬ強度を示す。測定回数５回までにＥＣＬ強度が増加しており、これはグラフェンの表面が徐々に酸化され表面状態が変化したことに由来すると考えらえる。測定回数６回目以降にグラフェン電極のＥＣＬ強度が急激に減少したのは、グラフェン電極の一部に破れが生じたためと考えられる。一方、セルロース膜／グラフェン膜積層体を用いて作製した電極（セルロース／グラフェン電極）では、６回目に一時的にＥＣＬ強度が減少したものの、７回目以降は高いＥＣＬ強度を維持している。表１に、ＥＩＳによるＲｓの測定結果を示す。ＥＣＬ測定を繰り返し行うとＲｓが大きくなっているが、これはグラフェン膜の抵抗が増加しためである。副反応である水の酸化によりグラフェン膜の一部が酸化されたことや、溶液交換時に機械的に生じるグラフェンへのダメージが原因であると考えられる。セルロース／グラフェン電極の方がＲｓ増加の程度が小さいことからも、セルロース／グラフェン電極では破れによる機械的なダメージが生じていないことが示唆される。以上の結果より、セルロース混合エステル多孔質膜がグラフェンを保護し、耐久性が向上したと考えられる。

[0094] [表1]

表１　Rs の測定結果

電極	1回目の前	5回目の後	10回目の後
グラフェン	768 Ω	1420 Ω	3220 Ω
セルロース/グラフェン	459 Ω	682 Ω	901 Ω

[0095] （実施例８．キャスト法による多孔質膜／グラフェン積膜層体の作製）

ＥＣＬ免疫分析における多孔質膜／透明導電膜積層体電極を用いる場合、多孔質膜中への抗体の担持量が多いと好ましい。本実施例では、多孔質膜中への抗体の担持量を増加させるためにアプリケーターによるキャスト法を用いてセルロース混合エステル膜を製膜し、セルロース混合エステル膜の多孔質化方法を検討した。

[0096] ８－１．溶媒の検討

本実施例で使用したセルロース混合エステル膜はＣＡ：ＣＮ＝１：２の質量比で作製した。はじめに溶媒の検討を行った。アセトン、アセトンとホルムアミドの混合溶媒（質量比１：１）の２種類の溶媒に対し、４質量％のセルロース混合エステルを溶解して多孔質膜形成用溶液を調製した。ギャップ高さ７５μｍのアプリケーターを用いて手動で銅基板上に溶液をキャストした。図１７にキャスト後に乾燥させたセルロース混合エステル膜の表面のＳＥＭ像を示す（チャージアップ抑制のため白金コートした）。アセトン溶媒を使用したときは孔構造がみられなかったのに対して（図１７（ａ））、アセトン／ホルムアミド混合溶媒を使用したときは孔構造がみられた（図１７（ｂ））。アセトンはＣＡとＣＮに対して良溶媒であるのに対して、ホルムアミドがＣＮにのみ良溶媒でありＣＡに対しては貧溶媒である。アセトン／ホルムアミド混合溶媒では溶媒が蒸発する過程において、良溶媒であるアセトンが蒸発するにつれてキャスト液は次第に悪溶媒に変化し相分離される。この相分離により、アセトン／ホルムアミド混合溶媒では支持膜が多孔質化されたと考えられる。

[0097] ８－２．相転換法の検討およびＳＥＭ観察

つづいてキャスト後に超純水に浸漬させて相転換により多孔質化する手法を検討した。同時にセルロース混合エステル溶液の濃度が多孔質構造に与える影響についても評価した。セルロース混合エステルの濃度が４質量％、８質量％、１２質量％となるように、ＣＮとＣＡをアセトン／ホルムアミド混合溶媒（質量比１：１）に溶解し、多孔質膜形成用溶液を調製した。ギャップ高さ７５μｍのアプリケーターを用いて手動で銅基板上に溶液をキャストした。キャスト後に乾燥させた試料と、キャスト後すぐに超純水に２４時間浸漬させてから乾燥させた試料の２種類を各溶質濃度で用意した。作製したセルロース混合エステルの表面に白金コートし、その表面構造をＳＥＭにより観察した。図１８に作製した６種類のセルロース混合エステル膜表面のＳＥＭ像を示す（（ａ）４質量％浸漬なし（ｂ）４質量％浸漬あり（ｃ）８質量％浸漬なし、（ｄ）８質量％浸漬あり（ｅ）１２質量％浸漬なし（ｆ）１２質量％浸漬あり）。すべての溶質濃度においてキャスト後に水に浸漬させることで孔直径が

大きくなる傾向が観察された。これは、水への浸漬によりキャスト溶液をゲル化させることによりキャスト液中の溶存溶媒が水と交換され、相転換したためである。

[0098] ８－３．膜厚測定

ＤｅｋＴａｋにより測定した多孔質膜の膜厚を表２に示す。

[0099] [表2]

溶質濃度	水浸漬の有無	膜厚（μｍ）
４質量％	無	1.0
４質量％	有	2.7
８質量％	無	1.3
８質量％	有	5.5
１２質量％	無	3.5
１２質量％	有	16

[0100] 膜厚測定結果より、溶質濃度の増加および水へ浸漬することで膜厚が増加する傾向が観測された。水への浸漬により多孔質膜の厚みが顕著に増加していることから、水に浸漬した試料は空隙を多く含有していることを示している。溶質濃度の増加に伴いキャスト液に含まれる溶質量が増加するため、膜厚が増加したといえる。１２質量％の水に浸漬した試料で膜厚が顕著に増加しているのは、多孔質膜形成用溶液の粘度が関係していると考えらえる。粘度が高くなったことで、溶質の流動性が低下し溶質同士の凝集が抑えられた結果、アプリケーターのギャップに対する多孔質膜の厚みの収縮が抑えられたと考えられる。表３に粘度計（Ａｎｔｏｎ　Ｐａａｒ社，型番：ＶｉｓｃｏＱＣ１００，スピンドル：ＳＣ４－２１）で測定した多孔質形成用溶液の粘度を示す。

[0101] [表3]

溶液の溶質濃度	速度 /rpm	粘度 /mPa s	トルク /%
4質量%	50	37	23.1
8質量%	50	138	86.4
１２質量%	12	609	91.4

[0102] ８－４．基板への転写

次にこれらのセルロース混合エステルを用いて銅箔上に成長させたグラフェンを石英基板に転写できるかどうかを調べた。上記８－１．の試料と同様にアセトン溶媒の溶液を用いて作製したセルロース混合エステル膜を支持材として、実施例２と同様の手順でグラフェンを石英基板に転写を試みた。その結果、これらの積層体は転写後の乾燥過程で石英基板から剥離してしまい、石英基板に転写することができないことがわかった。一方で、ホルムアミド／アセトン混合溶媒で調製した多孔質形成用溶液から作製した試料は全て転写に成功した。アプリケーターを用いた試料ではスピンコート法に比べて厚みが増加した分、引張応力も増加すると考えらえる。アセトン溶媒の溶液から作製したセルロース混合エステル膜は多孔質構造が形成されなかったのに対し、アセトン／ホルムアミド混合溶媒では多孔質構造が形成されたため、この引張応力が緩和され、剥離が起きなかったと考えられる。水に浸漬させた溶質濃度１２質量％の支持膜を用いて石英基板上に転写した多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜／石英基板積層体の写真を図１９に示す。このように支持膜を多孔質化することで厚さが１０μｍ以上であっても多孔質膜／グラフェン膜積層体の剥離を起こさずに基板に転写できるようになることがわかった。

[0103] ８－４．ラマンスペクトル測定

図１９に示す試料のラマンスペクトルを図２０（ａ）に示す。１２８０ｃｍ$^{-1}$および２９５０ｃｍ$^{-1}$付近にあらわれるセルロースのCH_3およびＣ－Ｈ由来のピークが観測されたが、グラフェンに由来する２Ｄピークおよびｇピークは観測されなかった。これは、支持膜が多孔質かつ膜厚が厚いためレーザー光が支持膜で散乱され、レーザー光がグラフェンまで届かなかったためだと考えられる。そこで、セルロース混合エステル／グラフェン膜／石英基板積層体を熱アセトンに２０分浸漬させて支持膜であるセルロース混合エステル膜を除去してからラマン分光分析を行った。図２０（ｂ）に支持膜を除去した後のグラフェンのラマンスペクトルを示す。グラフェンに由来する２Ｄピークおよびｇピークが観測され、１３５０ｃｍ$^{-1}$付近にあらわれる欠陥を示すＤピークがほとんど観測されなかったことから、キャスト法により作製したセルロース

混合エステル膜を支持材とした場合でも高品質なグラフェンが作製できたといえる。さらに２９５０ｃｍ$^{-1}$付近にあらわれるセルロースのＣ－Ｈ由来のピークも観測されなかったことから、５０℃の熱アセトンに浸漬させることでセルロース混合エステルを除去できたことがわかる。

[0104] ８－５．電気抵抗測定

表４に図１９の試料と同様の手順で転写した多孔質セルロース混合エステル／グラフェン膜／石英基板積層体のシート抵抗をｖａｎ　ｄｅｒ　Ｐａｕｗ法により測定した結果、シート抵抗は５６０Ω／ｓｑであった。

[0105] 比較として行った従来のＰＭＭＡ支持転写法で転写して作製したＰＭＭＡ膜除去後のグラフェンのシート抵抗は約５５０Ω/ｓｑであった。このことからキャスト法により形成したセルロース混合エステルで転写したグラフェンはＰＭＭＡ支持転写法で作製したものと同様に高品質なグラフェンであるといえる。

[0106] ８－６．電気化学発光測定

図２１に図１９に示す試料と同様の手順で作製したセルロース混合エステル／グラフェン膜／石英基板積層体を電極として測定した電気化学発光測定の結果を示す。測定溶液には１０ｍｍｏｌ／Ｌのトリプロピルアミンと０．１ｍｍｏｌ／Ｌのルテニウムビピリジル錯体を含む０．１５Ｍのリン酸緩衝液（ｐＨ７．４）を用いた。図２１（ａ）の電流-電位曲線において、０．８Ｖ付近からトリプロピルアミンの酸化反応に伴う電流が流れ始め、図２１（ｂ）のＥＣＬ曲線において１．０Ｖ付近からＥＣＬの増加が観測された。このことから、セルロース混合エステルの孔構造がグラフェンまで続いており、電解液中の反応物が十分にグラフェンに到達して電気化学反応が生じていることがわかる。ＳＥＭ観察、ラマンスペクトル、電気抵抗測定およびＥＣＬ測定結果より、キャスト法を用いて作製したセルロース混合エステル膜は１０μｍ以上の膜厚であっても、表面から内部、グラフェン膜まで連続的に多孔質構造が形成されていることが示された。

[0107] （実施例９．キャスト法により形成した多孔質膜のタンパク質吸着量）

本実施例では、ＥＣＬ免疫測定における発光強度を向上させるため、セルロース混合エステル膜の膜厚を増加させることで多孔質セルロース混合エステル／グラフェン積層膜の抗体担持量を増加させることができるか検証した。

本実施例ではアプリケーターを使用することで多孔質膜の膜厚を増加させた。さらに、セルロース溶液を厚く塗布した際にセルロース膜が多孔質化しにくいことから、セルロース溶液塗布後に水に浸漬させ、溶媒を水で置換する湿式相転換法のプロセスを取り入れた。相転換法による多孔質セルロース膜／グラフェン膜積層体の作製プロセスを図２２に示す。多孔質セルロースの製膜に用いたセルロース溶液はアセトンとホルムアミドを１：１に混合した溶媒を用い、酢酸セルロースとニトロセルロースを質量比１：２で混合して１２質量％となるように調製したものを使用した。（６０９ｍＰａ・ｓ）。また、アプリケーターのギャップ高さを２５μｍ、５０μｍ、７５μｍ、１００μｍと変化させることで厚さの異なる４種類の多孔質セルロース混合エステル膜を製膜した。アプリケーターのギャップ幅は６０ｍｍであった。アプリケーターによる溶液の塗布には製膜時の走行速度を制御できるコーテック社の全自動リニアモーションコーターＡＬＣ－ｍｉｎｉ２を使用した。

[0108] ９－１．積層体の作製

具体的には以下のようにして積層体を作製した。実施例８と同様に銅箔上にグラフェンを成長させた。本実施例では、アプリケーターによる製膜時の走行速度を２ｍｍ／ｓに設定して上記４種類の厚さの異なる多孔質セルロース混合エステル膜をグラフェン上に製膜した。多孔質膜形成用溶液をグラフェン膜上に塗布後、得られた積層体を純水プールに移し、１時間浸漬させた。その後、積層体を純水から取り出し自然乾燥させ、多孔質セルロース膜／グラフェン膜／銅箔からなる積層体を得た。

[0109] ９－２．積層体の表面構造解析

銅箔上に形成した多孔質セルロース膜／グラフェン膜積層体の表面構造を解析するために、実施例１と同様に走査型電子顕微鏡による膜表面の観察し、撮影した画像から平均孔径、孔の表面占有率を算出した。アプリケーターの

ギャップ高さを変化させることで実際の膜厚がどのように変化するかを調査するため、レーザー顕微鏡による膜厚測定を行った。

図２３にＣＡ：ＣＮ＝１：２の条件で膜厚を変化させて作製したセルロース膜のＳＥＭ画像を示す（図２３（ａ）２５μｍ、（ｂ）５０μｍ、（ｃ）７５μｍ、（ｄ）１００μｍ）。４種類のサンプルはアプリケーターのギャップ高さを２５μｍ、５０ μｍ、７５μｍ、１００μｍに設定して製膜したものである。それぞれのサンプルを比較すると、膜厚が増加するほどセルロースの繊維構造が太くなることが観測された。表４に膜厚、膜表面における孔の平均孔径、孔の表面占有率を示す。

[0110] [表4]

試料	ギャップ高さ /μm	膜厚 /μm	平均孔直径 /nm	表面孔占有率 /%
(a)	25	2.6	270	26
(b)	50	6.5	270	24
(c)	75	11.0	250	21
(d)	100	18.5	210	11

[0111] ４種類のサンプルを比較すると、アプリケーターのギャップ高さに応じて膜厚が増加することが観測された。また、膜厚の増加に伴って平均孔径が小さくなり、孔の表面占有率も減少した。これは、アプリケーターでセルロース溶液を塗布して水に浸漬させる際に、厚い膜では溶媒の置換が行われにくく、乾燥させた際に空隙ができにくくなるためであると考えられる。

[0112] ９－３．タンパク質の吸着量測定

作製した積層体中の多孔質セルロース膜の抗体担持量を評価するため、多孔質セルロース膜のタンパク質吸着量の定量化を行った。タンパク質吸着量の測定は、タンパク質を含む溶液中に滴下することでタンパク質濃度に比例して波長５９５ｎｍでの吸光度が変化するブラッドフォード試薬（ＡＰＲＯサイエンス、品番：ＫＹ－１０２０）を用いた。まず、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、富士フィルム和光純薬、品番：０１７－１５１４６）を５ｍｍｏｌ／ＬのＰＢＳで溶解し、１０００μｇ／ｍＬ、５００μｇ／ｍＬ、２５０μｇ／ｍ

Ｌ、１２５μｇ／ｍＬ、１００μｇ／ｍＬの５種類の濃度既知のＢＳＡ溶液を調製してブラッドフォード試薬を滴下し、各濃度に対応する５９５ｎｍでの吸光度を測定して検量線を作成した。その後、図２４に示すようにセルロース膜を１０００μｇ／ｍＬのＢＳＡ溶液に浸漬させ、浸漬前後でのＢＳＡ溶液の濃度を吸光度測定によって得られた吸光度から検量線を用いて算出することで、セルロース膜の投影面積あたりに担持されるタンパク質吸着量を定量化した。また、タンパク質吸着量の比較のため、市販のイムノクロマトグラフィー用ニトロセルロースメンブレン（Ｃｙｔｉｖａ、ＡＥ９８、バッキングシートなし、厚み：１０５－１４０μ）でも同様の実験を行い、比較した。

[0113] 濃度既知のＢＳＡ溶液にブラッドフォード試薬を滴下して各濃度に対応する波長５９５ｎｍでの吸光度を測定した。その結果をもとに作成した検量線を図２５に示す。図２５より、各濃度での吸光度をグラフ上にプロットすると、直線性の高い検量線が得られた。この近似直線の式を用いて、ブラッドフォード試薬滴下後に吸光度測定を行い、濃度未知のＢＳＡ溶液の濃度を測定した。

[0114] アプリケーターのギャップ高さを変化させて作製した４種類のセルロース膜および市販のニトロセルロースメンブレンを用いて測定したタンパク質吸着量の定量結果を図２６に示す。アプリケーターのギャップ高さ２５μｍ、５０μｍ、７５μｍの膜を比較すると、膜厚の増加に伴ってＢＳＡ吸着量が増加した。一方で、アプリケーターのギャップ高さ１００μｍの膜ではＢＳＡ吸着量が減少した。これは、表４に示したように膜厚が増加するとセルロースの繊維構造が太くなり、膜内部の空隙が小さくなったため、ＢＳＡが吸着する内部の表面積が小さくなったことが原因であると考えられる。以上のことから、アプリケーターのギャップ高さ２５μｍから７５μｍの範囲の条件で作製された膜が、ＥＣＬ免疫分析用途としてのセルロース膜に好適であると結論づけた。また、それらの膜と市販のニトロセルロースメンブレン を比較すると、膜厚が１０分の１以下であることにも関わらず、タンパク質吸着量が２倍に達していることが確認できた。

[0115] （実施例１０．圧縮した多孔質構造部分を有する多孔質膜／グラフェン膜積層体の作製）

多孔質膜／透明導電膜からなる積層体電極をバイオチップなどの分析用電極として利用するには、溶液に接触するグラフェンの面積を規定することが望ましい。単層グラフェンのシート抵抗は数百Ω／ｓｑ程度であるため、高い電流が流れるとグラフェン電極内でオーミック損失が生じてしまい、電極反応がグラフェンの電気抵抗に制限されてしまうため、このオーミック損失が大きくならないような適切な電極面積にするべきである。またグラフェン電極を電極として利用するには、グラフェンシートの端部を導通用電極と積層させる必要がある。この導通用電極に電解液が接触するのを防ぐ必要があるため、電極面積を規定する方法としては、グラフェン電極表面の一部に絶縁物を積層することで電解液と接触する面積を一定にする方法が考えられる。しかしながら、多孔質膜／透明導電膜からなる積層体電極の多孔質膜の厚みが増加すると、多孔質膜上に絶縁物を配置しても多孔質膜内を電解液が浸透してしまうため、溶液と接触するグラフェン電極の面積を規定することが困難となる。そこで本実施例では、積層体電極表面に垂直な方向に圧力をかけることで、溶液に接触させる部分以外の多孔質膜を圧縮し多孔質構造を潰すことで、水平方向の電解液の移動を防ぎ、また圧縮された多孔質膜を電極面積規定のための絶縁物として利用できるかを調べた。多孔質膜／グラフェン膜からなる積層体電極を圧縮する際にグラフェンにダメージが生じないように、積層体電極の電気抵抗を指標として、多孔質構造を圧縮するのに適切な圧力を決定した。圧縮箇所と非圧縮箇所の多孔質膜の表面はＳＥＭにより観察した。

[0116] １０－１．圧縮した多孔質構造部分を有する多孔質膜／グラフェン膜積層体の作製

実施例９と同様の手順で、ギャップ高さ７５μｍの条件で、銅上に成長させたグラフェン上に多孔質セルロース混合エステル膜を形成した。同様に、実施例２に示した方法と同様に多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜からなる積層体を、石英基板上に転写した。これらの銅箔上または石英基板上

の２種類の積層体の一部の多孔質構造を、図２７のように油圧フラスコプレス（株式会社モリタ東京製作所、ＦＰ７）とアルミ材を用いて圧縮した。試料と接触するアルミ材の面は２０ｍｍ×２０ｍｍのサイズである。非圧縮部分を残す場合には、多孔質膜側のアルミ材には直径（Φ）４ｍｍまたは直径８ｍｍの穴が開けられた２０ｍｍ×２０ｍｍのものを使用した。

[0117] １０－２．積層体全体への圧力の負荷

まず図２８に示す両端に金/クロムが蒸着された石英基板上の多孔質セルロース混合エステル膜／グラフェン膜からなる積層体（１５ｍｍ×１０ｍｍ、石英基板２０ｍｍ×２０ｍｍ、チャネル部分１０ｍｍ×１０ｍｍ）に対して、２０ｍｍ×２０ｍｍのアルミ材（穴のないもの）を用いて圧力をかけ、両端の金／クロム電極間の電気抵抗の変化（グラフェン膜の抵抗の変化に相当）を調べた。積層体には計８回力を加えた。なお、加えた力は測定回数ごとに変化させた。表５に多孔質膜／グラフェン積層体へ加えた力と電気抵抗の関係を示す。

[0118] [表5]

潰した回数 [回]	0	1	4	6	8
MCE/グラフェン電極の抵抗 [Ω]	400	400	420	780	2200
加えた力 [N]	0	5×10^3	1×10^4	1×10^4	1.5×10^4

[0119] 表５の「加えた力［Ｎ］」は、油圧フラスコプレスを用いて多孔質膜/グラフェン電極に加えた力である。力を加える前の積層体電極の抵抗は４００Ωであり、１回目に５ｋNの力を加えたが、抵抗値の変化はなかった。さらに、４回目に１０ｋＮ（約１ｔ)の力で潰すと抵抗値は４２０Ωとなり、僅かな抵抗の増加が確認されたが、電極の性能が落ちるほどの抵抗値の変化ではない。このことから、上下から加えられる圧力に対する多孔質膜／グラフェン積層体電極の耐久性は高いと考えられる。１ｔの力を加えた程度（２５０ＭＰａ）では、電極の性能を損なわないとわかった。その後は、電極として機能しなくなるまで多孔質膜の圧縮を繰り返した。６回目に１ｔの力で潰すと抵抗値はさらに大きくなり、８回目に１．５ｔの力を加えると抵抗値は２２００Ωとなった

ため、電極の性能が大幅に悪化した。このとき石英ガラス基板に割れが生じたことから、石英基板の割れが大幅な抵抗増加の原因であると考えられる。

[0120] １０－３．積層体への部分的な圧力の負荷

次に、図２９に示すように、石英基板上の積層体電極に対して、直径４ｍｍの穴のあいたアルミ材を用いて、１ｔの力を３０秒間加えた。力を加える前の写真（図２９左図）では、セルロース混合エステル膜の多孔質構造により光が散乱されて白く見えたのに対し、力を加えた後の写真（図２９右図）では、アルミ材に接触した部分が透明化している。これは多孔質構造が圧縮され光が散乱されなくなったためと考えられる。

[0121] １０－４．ＳＥＭ観察

力を加えた後のセルロース膜の多孔質構造が潰されているかを調べるために、直径８ｍｍの穴のあいたアルミ材を用いて銅箔上に形成した積層体に１．２５ｔの力を加え、その表面をＳＥＭにより観察した。ＳＥＭ観察に際し、チャージアップ防止のため１０ｎｍの膜厚の白金をコートした。図３０にＳＥＭ像を示す。図３０（ａ）が力を加えられた部分であり、図３０（ｂ）が力を加えられていない部分（アルミ材の穴の部位に対応）である。どちらも倍率が１００００倍、加速電圧３ｋＶの条件で観察した結果である。これらより、油圧フラスコプレスとアルミ材を用いてセルロース混合エステル膜の多孔質構造を潰せていたことがわかった。また、アルミ材の穴の部分に対応する多孔質膜部分は潰れず、多孔質構造を確認することができた。

[0122] １０－５．圧縮した多孔質膜／グラフェン膜の転写

次に多孔質構造が圧縮されたセルロース混合エステル膜が転写支持材として機能するかを調べるため、力を加えて一部の多孔質構造が潰された後の銅箔上の積層体を実施例２と同様の手順で石英基板上に転写した。その結果、問題なく転写できることが確認され、多孔質部分を潰した後でも転写支持膜として機能することがわかった。

[0123] １０－６．圧縮した多孔質膜／グラフェン膜からなる積層体電極を用いた電気化学測定

１０－１と同様の手順で多孔質セルロース混合エステル膜を作製し、端部にクロム（１０ｎｍ）と銀（５０ｎｍ）が蒸着された石英基板に実施例２と同様に転写した。この積層体を２枚用意し、そのうちの１枚に対して、１０－３に示した手順と同様に直径（Φ）４ｍｍの穴のあいたアルミブロックを用いて１ｔの力を３０秒間加えた。この多孔質構造を圧縮した積層体電極と圧縮していない積層体電極を用いて、図１０に示す測定セルを用いてｐＨ７．４の０．１５ｍｏｌ／Ｌのリン酸緩衝液の０～１．４Ｖ　ｖｓ　Ａｇ／ＡｇＣｌの範囲でサイクリックボルタンメトリーを行った。走査速度は０．１Ｖ／ｓとした。参照極と対極は実施例４と同用のものを使用した。図３１に測定結果を示す。多孔質構造を圧縮していない積層体電極では０．１５Ｖ　ｖｓ　Ａｇ／ＡｇＣｌに酸化ピークが観測された。これは導通用電極の銀の酸化反応由来の酸化ピークである。従って、多孔質構造を圧縮していない積層体電極では、電解液であるリン酸緩衝液が導通用電極部分にまで水平方向にも浸透し測定結果に影響することがわかった。多孔質構造を圧縮した積層体電極では、導通用電極の銀の酸化ピークのないボルタモグラムを取得できたことから、グラフェンにダメージを与えずに測定部分以外の多孔質構造を圧縮でき、電解液の水平方向への浸透を防ぐことに成功したといえる。

[0124] このように、多孔質構造を圧縮することで導通用電極への溶液の接触を防ぎながら、電極面積を規定できることがわかった。また圧縮部分の下にあるグラフェンへのダメージもほとんどないため、非圧縮部分の電解液と接触する電極活性部への電荷輸送の観点からも利点があるといえる。圧縮部分と非圧縮部分をデザインすることで簡便なプロセスによる電極活性部のアレイ化ができると考えられる。従って、本手法は多項目検査用のバイオチップ作製の観点からも利点を有すると考えらえる。

[0125] （実施例１１．キャスト法より作製した多孔質膜／グラフェン膜からなる積層体電極を用いた免疫測定）

１１－１．積層体電極の作製およびＥＣＬ免疫分析

実施例９と同様の手順で、ギャップ高さ５０μｍの条件で、銅上に成長させたグラフェン上に多孔質セルロース混合エステル膜を形成した。この多孔質セルロース混合エステル／グラフェン膜からなる積層体電極に対して、実施例１０に示した手順と同様に直径（Φ）４ｍｍの穴のあいたアルミブロックを用いて１ｔの力を３０秒間加えた。この積層体電極を実施例２と同様に金／クロムが蒸着された石英基板に転写した。この積層体電極を用いて実施例６と同様の手順でＣＥＡのＥＣＬ免疫分析を行った。

[0126] １１－２．結果

図３２（電流ー電位曲線）および図３３（ＥＣＬ強度ー電位曲線）に測定結果を示す。グラフェン電極の電位が０．８Ｖ付近で電流が増加しており、トリプロピルアミンが電極で酸化されたことによる電流増加を確認した。また１Ｖ付近からのＥＣＬ強度の増加が確認された。これにより、キャスト法により作製したセルロース混合エステル多孔質膜／グラフェン膜からなる積層体電極がＥＣＬ免疫分析用の電極として利用できることが示された。

[0127] （実施例１２．ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを導電助剤とするグラフェン透明電極）

グラフェンは原子１層の物質であるため、従来のＥＣＬ測定の電極として使用されている白金などの電極よりも抵抗値が高く、サンプルごとの抵抗値にばらつきが生じやすい。この電極抵抗値がＥＣＬ測定の発光強度に影響を与える可能性がある。そこでグラフェン透明電極をより低抵抗な電極として用いるため、グラフェンと同じく透明電極材料であるＰＥＤＯＴ：ＰＳＳに注目した。

本実施例ではＣＶＤグラフェンを電気化学発光免疫分析の電極として応用することを見据え、バイオ分析に利用されるルテニウムビピリジル錯体/トリプロピルアミン （Ｒｕ（ｂｐｙ）$_3$Ｃｌ$_2$／ＴＰｒＡ）のＥＣＬ測定系にてＥＣＬ発光強度のばらつきを抑えるため、グラフェンとＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを積層しその電気化学特性を評価した。

[0128] １２－１．グラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極の作製

グラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極の作製は以下の通りである。２０ｍｍ×２０ｍｍの石英基板をグラフェン成膜時の銅基板と同様に洗浄を行った。その後、５ｎｍのＣｒ、５０ｎｍのＡｕを石英基板の端部に蒸着した。この基板にＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、品番７３９３１６－２５Ｇ）を滴下し、スピンコートした。この時のスピンコートは３０秒かけて２５００ｒｐｍまで回転速度を上昇させ、６０秒維持した後３０秒かけて停止させた。その後１４０℃で１時間焼成し、製膜した。これをＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極とする。このＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極表面に単層グラフェンをＰＭＭＡ支持転写法により転写した。ＰＭＭＡ／グラフェン積層膜をＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極上に転写後、十分に乾燥させてからアセトンに浸漬し、ＰＭＭＡを除去することでグラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極を作製した。

[0129] １２－２．透過率およびラマンスペクトル測定

図３４左図に作製した各電極の透過率測定の結果を示す。グラフェン電極は９０％程度の高い透過率で安定しているのに対し、グラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極では長波長側に向かうに従って透過率が低下しており、グラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極は青色に見える。また、本実施例で使用するＲｕビピリジル錯体の発光波長６２０ｎｍでの透過率に注目すると、グラフェン電極は約９０．６％、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極は約８９．７％グラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極は約８７．１％である。ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極とグラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極を比較すると２．６％程度透過率が低下している。ここで、グラフェン１層あたりの吸光度が２．３％であることから、適正な透過率の低下であると考えられる。また、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを用いたことでグラフェン電極よりも３．５％程度透過率は低下したものの、高い透過率を維持している。そのためＥＣＬ測定において、透明電極として十分利用可能であると考えられる。

[0130] また図３４右図にグラフェンとＰＥＤＯＴ：ＰＳＳとグラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳのラマンスペクトルを示す。グラフェンのラマンスペクトルにおいて２６８０ｃｍ$^{-1}$にグラフェン特有の２Ｄピーク、１５９０ｃｍ$^{-1}$にＧピー

クが観測された。２Ｄピークの半値全幅は３７ｃｍ$^{-1}$であり、強度比Ｉ（２Ｄ）／Ｉ（Ｇ）は１．２であった。また、２Ｄピークが単一のローレンツ関数でフィッティング可能であったことからＣＶＤ成長により得られたグラフェンは単層であると判断した。１３５０ｃｍ$^{-1}$付近にグラフェン欠陥由来のＤピークが観測されなかった。このことから、高品質な単層グラフェンを成長し、転写することができたと判断した。グラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳではグラフェンのＧピークが１５９８ｃｍ$^{-1}$、２Ｄピークが２６９０ｃｍ$^{-1}$に確認された。また、１５９０ｃｍ$^{-1}$よりも短波長側でＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ単体のラマンスペクトルと一致していることが確認できる。このことから、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳとグラフェンは積層構造となっていることが確認できる。よって透過率測定の結果と併せて、グラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極は高品質なグラフェンとＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを積層した高光透過率な電極であるといえる。

[0131] １２－３．シート抵抗値

グラフェンとＰＥＤＯＴ：ＰＳＳとグラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極のシート抵抗値を測定した。この測定は２０ｍｍ×２０ｍｍの石英基板上に２０ｍｍ×２０ｍｍのグラフェンを転写したものを用い、４角にインジウムの粒を接触させて行った。表６に４端子法を用いて測定した各サンプルのシート抵抗値を示す。

[表6]

sample	Sheet resistance [Ω/sq]
グラフェン	925
グラフェン/PEDOT:PSS	224
PEDOT:PSS	704

表６に示すように、グラフェンとＰＥＤＯＴ：ＰＳＳはそれぞれ単体では高いシート抵抗値を示していたが、積層することによって大幅にシート抵抗値が小さくなった。これはグラフェンとＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを積層することによって電極としての厚みが大きくなったことの他に、転写等のプロセスによりグラ

フェンに生じていた小さな破れがＰＥＤＯＴ：ＰＳＳにより補助されたためであると考えられる。

[0132] １２－４．ＣＶ測定１

図３５にグラフェン、グラフェン/ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ、グラッシーカーボンを電極とし、５ｍｍｏｌ／Ｌのヘキサアンミンルテニウムを含む０．１ｍｏｌ／ＬのＫＣｌ水溶液で行ったＣＶ測定の結果を示す。走査速度は０．１Ｖ／ｓとした。酸化ピークと還元ピークの電位の差であるピーク間電位差ΔＥｐを表７に示す。

[表7]

	グラフェン	グラフェン/PEDOT:PSS	グラッシーカーボン
酸化ピーク[V]	0.0681	−0.0027	−0.0030
還元ピーク[V]	−0.3860	−0.2493	−0.1566
ΔE_P[mV]	454	247	154

[0133] 電極反応が十分に速い反応系である可逆系の場合には、１電子移動反応であればΔＥｐは５９ｍＶとなるが、溶液抵抗や電極の内部抵抗が無視できない場合には、電流と抵抗の積のオーミック損失が生じΔＥｐが大きくなる。グラッシーカーボン電極の内部抵抗は溶液抵抗に比べて無視できるほど小さいことから、グラッシーカーボン電極と他の２種の電極とのΔＥｐの差は電極の内部抵抗によるものと考えられる。本測定条件のように比較的大きな電流が流れるような測定では、グラフェン電極のみでは電極の内部抵抗が大きくオーミック損失が大きくなることが分かる。グラフェン/ＰＥＤＯＴ:ＰＳＳ電極では、表７でシート抵抗が減少していることから、オーミック損失が小さくなりΔＥｐもグラッシーカーボンにより近い値を示したといえる。電気化学発光測定における発光強度は電流値に強く相関するため、電極の内部抵抗が大きい場合には高い発光強度が得られにくくなる恐れがある。

[0134] １２－５．ＥＣＬ測定

図３６（ａ）にＣＶ法でのＥＣＬ測定の結果を示す。図３６（ｂ）にクロノアンペロメトリ法によって得られた電位印加開始から３０秒間の総発光量を示す。溶液には１０ｍｍｏｌ／Ｌのトリプロピルアミンと０．１ｍｍｏｌ／

ＬのＲｕ（ｂｐｙ）$_3$Ｃｌ$_2$を含む０．１５ｍｏｌ／ＬのＰＢＳを用いた。比較として用いたＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを単体で作用極として用いた場合では、発光が観測されなかった。これはＰＥＤＯＴ：ＰＳＳが水に分散する性質を持つため、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳが測定溶液に再分散し、電極として機能しなくなったためであると考えられる。一方で、グラフェンをＰＥＤＯＴ：ＰＳＳの上に積層したグラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極では発光が確認されていることから、単体では電気化学測定を行うことができなかったＰＥＤＯＴ：ＰＳＳをグラフェンと積層することによって、グラフェンがＰＥＤＯＴ：ＰＳＳの測定溶液への再分散を防いでおり電気化学測定に用いることが可能となったといえる。

[0135] また、グラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極のＥＣＬ測定結果はグラフェン電極と比べて、より低い電位から発光が観測された。これは積層させることで電極反応が起きやすくなったことを表している。図３６（ｂ）の結果からもＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ／グラフェン電極の方がグラフェン電極よりも発光量が大きく、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳの存在がＥＣＬ強度の向上に寄与することがわかった。

[0136] １２－６．ＣＶ測定２

図３７（ａ）にＲｕ（ｂｐｙ）$_3$Ｃｌ$_2$の図３７（ｂ）にトリプロピルアミンのＣＶ測定の結果を示す。どちらの反応物においてもＰＥＤＯＴ：ＰＳＳが積層されているグラフェン電極のほうがより低い電位から電流が流れていることが分かる。特にＲｕ（ｂｐｙ）$_3$Ｃｌ$_2$の反応性に関しては、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳが存在することで著しい反応性の向上が観測された。従って、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳの積層によりグラフェン電極のＥＣＬ強度が増加したのは、電極の内部抵抗が低下したことに加えて、ＥＣＬ反応物の反応性が向上したからであるといえる。

[0137] 表８に各電極５サンプルずつＣＶ法で測定を行った際の発光量の平均値と、その標準誤差を示す。また表８中に、図３７（ｂ）のＥＣＬ測定結果より、１．３Ｖときの総発光量の変動係数も同様に示す。

[表8]

	グラフェン	グラフェン/PEDOT:PSS
平均発光量(CV)	26.1±2.3	34.1±1.3
変動係数(CA)	0.256	0.178

[0138] ＣＶ法での平均発光量は、グラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極のほうが約１．３倍大きくなった。またグラフェン電極では約８．８％のばらつきは、グラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極では約３．８％まで小さくなることが確認できた。ＣＡ法でも５サンプル測定を行い、１．３Ｖ印加時の発光量から算出した変動係数の値もグラフェン／ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極のほうが小さかった。そのため、グラフェンとＰＥＤＯＴ：ＰＳＳを積層することによってＥＣＬの発光量を増加させるとともに、より安定した誤差の小さい測定が可能となることが示された。これは、ＰＥＤＯＴ：ＰＳＳ電極を積層させることで、シート抵抗（内部抵抗）のバラつきの減少が、電気化学測定結果のバラつきの低下を導いたためである。

[0139] （実施例１３．多孔質膜／透明導電膜からなる積層体の透明化）

多孔質膜／透明導電膜からなる積層体はセパレータ付きの透明導電膜として利用することも可能である。セパレータは陽極と陰極の２電極の間に設置され、イオンを透過し、２電極同士が接触することを防ぐ役割をするものである。セパレータとしては、一般に多孔質構造をもつ樹脂材料や不織布などが利用される。本実施例の多孔質膜／グラフェン膜からなる積層体はセパレータ付きの透明電極として利用可能であり、多孔質膜／グラフェン膜積層体の多孔質膜の表面にもう一枚のグラフェン膜を積層することで、究極的に薄い透明性を有する薄層電気化学セルが作製可能である。

たとえば薄型のエレクトロクロミックデバイスを作製する場合には、陽極と陰極とからなる２枚の電極を対向させて配置させる必要があるが、電極間にセパレータを設置すれば内部短絡を防止することができ必要な積層構造を作製可能となる。しかしながら、透明状態（脱色状態）と着色状態を可逆的に制御

するには、セパレータ自体が透明である必要がある。一般に多孔質材料は光吸収が起きない波長の光であっても、光を散乱させるため白色を呈する。

[0140] そこで本実施例では、グラフェン電極間に設置させるセパレータとセパレータに含浸させる電解液の屈折率をマッチングさせることでデバイスを透明化させることを試みた。

具体的には、電解液とセパレータの屈折率を一致させるため、セパレータにはポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）を、電解液の溶媒には水とグリセリンの混合溶媒を用いた。水の屈折率は１．３３であり、水と混じり合う溶媒であるグリセリンの屈折率は１．４７である。ＰＶＤＦの屈折率は、この２種類の溶媒の屈折率の間の値１．４１であることから、セパレータとしてＰＶＤＦを選択した。はじめにＰＶＤＦに含浸させる電解液における水とグリセリンの最適な混合比率を決定するため、水／グリセリン混合溶媒の屈折率のグリセリン比率の依存性を調べた。屈折率の測定には、デジタル屈折計（ハンナインスツルメンツ、型番：ＨＩ９６８００）を用いた。図３８に混合溶媒の屈折率のグリセリン比率依存性を示す。グリセリンの比率が高くなると混合溶媒の屈折率が高くなり、グリセリンと水の比が、６：４のときＰＶＤＦの屈折率１．４２に近い値となった。

[0141] 次に、市販の多孔質ＰＤＶＦ膜（ＧＶＳ社、型番：１２１３９９２）をメタノールに３０秒間浸漬し親水化処理を行った後に、０．１Ｍの濃度の塩化カリウムを含む様々な比率のグリセリン／水の混合溶液を含浸させ、２枚のスライドグラス（松浪硝子株式会社、型番：Ｓ１１１１）に挟んだ状態で透過率測定を行った。図３９に透過率スペクトルを示す。グリセリンと水の比率が６：４の０．１ｍｏｌ／Ｌの塩化カリウム溶液を含浸させたＰＶＤＦ膜の透過率が最も高い値を示した。この値はスライドグラスのみの透過率と同等であったことから、１００％との差分は空気－ガラス界面の反射によるものであり、溶液を含浸させたＰＶＤＦの層ではほとんど散乱されておらず、この層の透過率はほぼ１００％であると考えられる。

[0142] 次に、実施例９と同様の手順で、ギャップ高さ１００μｍのアプリケーターを用いて、キャスト法によりＰＶＤＦ／グラフェン積層体電極を作製した。ＰＶＤＦ多孔質膜形成用溶液は、質量比１：１のアセトン／ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）混合溶媒にＰＶＤＦ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，品番：３４７０７８）を１２質量％となるように溶解して調製した。作製したＰＶＤＦ／グラフェン／石英基板積層体をメタノールに浸漬して親水化処理した後に、水または水／グリセリン溶液を含浸させカバーグラスを載せて透過率測定を行った。図４０に透過率スペクトルを示す。ＰＶＤＦ膜に水を含浸させた積層体の５５０ｎｍの透過率が３９％であったのに対し、質量比が水：グリセリン＝４：６の水／グリセリン溶液を含浸した積層体の透過率は８９％となり、ＰＶＤＦ多孔質膜／グラフェン積層体を透明化することに成功した。

[0143] 次に、水：グリセリン＝４：６の質量比の混合溶液を電解液としてＰＶＤＦをセパレータとするグラフェン電極２枚を利用したフィルム状のエレクトロクロミックデバイスを作製した。エレクトロクロミック材料としてプルシアンブルー（ＰＢ）を利用した。具体的には以下のようにしてエレクトロクロミックデバイスを作製した。まずＰＭＭＡを接着剤としてＰＥＴ基板へＣＶＤグラフェンの熱圧着転写を行い、グラフェン膜／ＰＭＭＡ／ＰＥＴ基板からなるグラフェン電極を作製した。作製したグラフェン電極を２つ用いてＰＢ電着グラフェン電と銀電着グラフェン電極を以下のように作製した。５ｍｍｏｌ／Ｌの塩化鉄（III）と５ｍｍｏｌ／Ｌのフェリシアン化カリウムと０．１ｍｏｌ／Ｌの塩酸と０．１ｍｏｌ／Ｌの塩化カリウムを含有する溶液を用いて、グラフェン電極を作用極として－２０ μＡ／ｃｍ^{2}の電流密度を５分間流すことで、グラフフェン電極上にＰＢを電着させた。もう一方のグラフェン電極ではプルシアンブルーの酸化還元と逆符号の反応を同量起こす必要があるため、銀を電着させて銀と塩化銀の酸化還元を利用した。グラフェン電極に銀を電着するため、０．１ｍｏｌ／Ｌの硝酸ナトリウムと１ｍｍｏｌ／Ｌの硝酸銀を含有する溶液を用いてグラフェン電極に－１００μＡ／ｃｍ^{2}の電流密度を４分間流した。このように作製したＰＢ電着グラフェン電極（酸化状態及び着色状

態）と銀電着グラフェン電極（還元状態、Ａｇ）との間に多孔質膜であるＰＶＤＦ膜をセパレータとして挟み、０．１ｍｏｌ／Ｌの塩化カリウムが溶解した水／グリセリン４：６の溶液をＰＶＤＦに含浸させ、２電極間（銀電着電極を基準として）の電圧を０Ｖから－１．０Ｖ～１．２Ｖに変化させてその時の電流とデバイスの色変化を観測した。図４１は作製したエレクトロクロミックデバイスの概要図を示す。図４２は電流ー電圧曲線であり、ＰＢの還元（同時に銀が塩化銀に酸化される）により青色（図４３左図が着色状態を示す）から透明（図４３右図が脱色状態を示す）に、ＰＢの酸化（同時に塩化銀の還元が起こる）により色が透明から青色に変化することが確認された（図４３）。

[0144] ＥＣＬ免疫分析をはじめＥＣＬを利用した応用例においても、電解液と多孔質膜の屈折率をマッチングする手法は有効であると考えられる。例えば、ＥＣＬ免疫分析の電解液の屈折率を調製しセルロース混合エステル膜の屈折率に合わせられれば、ＥＣＬを多孔質膜内で散乱させることなく光検出器で捉えることが可能になると考えられる。これにより発光領域と非発光領域の境界がぼやけずに鮮明になると考えられる。従って、複数の検査項目を分析デバイスの発光位置と関連づけることを考えた場合に、検査項目の集積化に寄与するといえる。

符号の説明

[0145] １　積層体（多孔質膜／透明導電膜）

１’　積層体（多孔質膜／透明導電膜／透明絶縁基板）

２　透明導電膜

２’　グラフェン膜

３　多孔質膜

４　透明絶縁基板

５　導通用電極

６　メンブレン

７　電気伝導体

８　コンジュゲートパッド

９　　サンプルパッド

１０　吸収パッド

１１　バイオチップ

１２　光検出器

１３　参照極

１４　イメージセンサ

１５　金属触媒基板

１６　電解液

１７　ＰＥＴ基板

１８　Ａｕ

１９　ＰＶＤＦ膜

２０　ＰＢ

２１　ＰＭＭＡ

請求の範囲

[請求項1] 透明導電膜と前記透明導電膜上に積層した多孔質膜とからなる積層体であって、

前記多孔質膜が電解液の透過性を有する、積層体。

[請求項2] 請求項１に記載の積層体であって、

前記多孔質膜が平均孔径２０ｎｍ以上の細孔を有する、積層体。

[請求項3] 請求項１に記載の積層体であって、

多孔質膜の膜表面に対する孔の面積比が２０％以上である、積層体。

[請求項4] 請求項１に記載の積層体であって、

前記多孔質膜の膜厚が１００ｎｍ以上である、積層体。

[請求項5] 請求項１に記載の積層体であって、

前記積層体が透明絶縁基板をさらに含み、

前記透明導電膜の第一の表面上に前記多孔質膜が積層しており、

前記透明導電膜の第二の表面上に前記透明絶縁基板が積層している、積層体。

[請求項6] 請求項５に記載の積層体であって、

前記積層体が電気伝導体をさらに含み、

前記電気伝導体が、前記多孔質膜の表面上であって、かつ、前記透明導電膜が積層している表面とは反対の表面上に積層しているか、または、

前記透明絶縁基板の表面上であって、かつ、前記透明導電膜が積層している表面と同じ表面上に積層している、積層体。

[請求項7] 請求項５に記載の積層体であって、

前記多孔質膜が圧縮した構造を少なくとも一部に有する、積層体。

[請求項8] 請求項５に記載の積層体であって、

前記透明絶縁基板が透明な導電助剤によりコートされたものである、積層体。

[請求項9] 請求項１に記載の積層体であって、

前記積層体が電気伝導体をさらに含み、

前記多孔質膜の第一の表面上に前記透明導電膜が積層しており、

前記多孔質膜の第二の表面上に前記電気伝導体が積層している、積層体。

[請求項10] 請求項１に記載の積層体であって、

前記多孔質膜が、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリエーテルスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリアミド、ポリフッ化ビニリデン、再生セルロース、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン、酸化アルミニウム、グラスファイバー、石英ファイバー、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、および、セラミックからなる群より選択される材料からなる膜または前記群より選択される２種類以上の材料からなる混合膜である、積層体。

[請求項11] 請求項１から１０のいずれか一項に記載の積層体であって、

前記透明導電膜が透明な炭素導電膜である、積層体。

[請求項12] 請求項１から１０のいずれか一項に記載の積層体であって、

前記透明導電膜がグラフェン膜である、積層体。

[請求項13] 請求項５から９のいずれか一項に記載の積層体を含む、バイオチップ。

[請求項14] 請求項１１に記載のバイオチップおよび電気化学発光物質を含む、キット。

[請求項15] 請求項５に記載の積層体であって、

さらに透明導電膜と透明絶縁基板と電気伝導体とを含み、

前記積層体は透明絶縁基板、透明導電膜、多孔質膜、透明導電膜、透明絶縁基板の順に積層しており、

前記電気伝導体が前記透明導電膜と接触するように配置されている、積層体。

[請求項16] 請求項５に記載の積層体を透明化した電極として使用する方法であって、

前記多孔質膜の屈折率と同じ屈折率を有する溶媒を用いる、使用方法。

[請求項17] 請求項５から９のいずれか一項に記載の積層体または請求項５から７のいずれか一項に記載の積層体を含むバイオチップを用いた電気化学発光免疫測定法により検出対象化合物を検出する方法であって、

（ａ）前記検出対象化合物と電気化学発光物質とを結合する工程と

（ｂ）前記積層体の多孔質膜内に前記検出対象化合物を捕捉する工程であって、前記多孔質膜内に固定された前記検出対象化合物に対する特異的結合物質により前記検出対象化合物を捕捉する工程と

（ｃ）前記工程（ａ）および（ｂ）の後、前記積層体に電位を印加して電気化学発光を測定する工程と

を含む、検出方法。

[請求項18] 透明絶縁基板と炭素導電膜と多孔質膜とが順に積層した積層体を製造する方法であって、

（ア）金属触媒基板上にＣＶＤ法により炭素導電膜を形成する工程と

（イ）炭素導電膜上に多孔質膜をさらに形成して積層体を作製する工程と

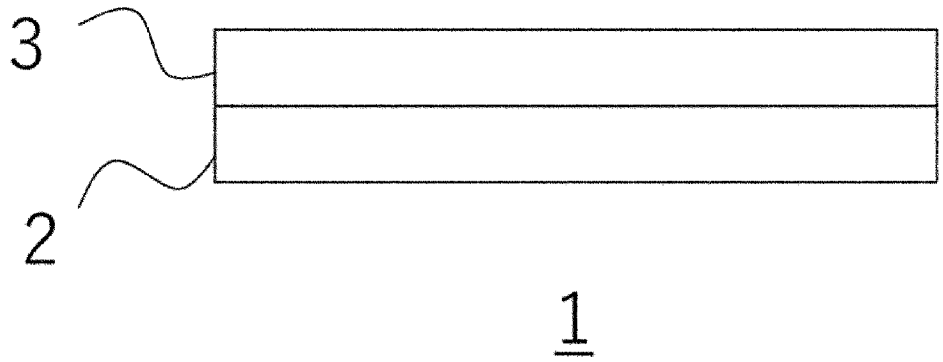
（ウ）前記金属触媒基板をエッチングにより除去し、透明絶縁基板上に炭素導電膜が接するように前記積層体を転写する工程をさらに含む、

積層体の製造方法。

[請求項19] 請求項１８に記載の製造方法であって、

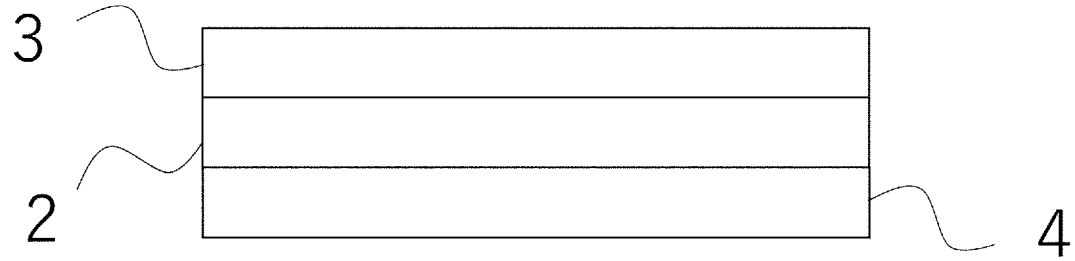
前記工程（イ）において、多孔質膜の形成に用いるポリマーを溶解する溶媒が、前記ポリマーに対する良溶媒と貧溶媒とを含む混合溶媒である、製造方法。

[図 1]



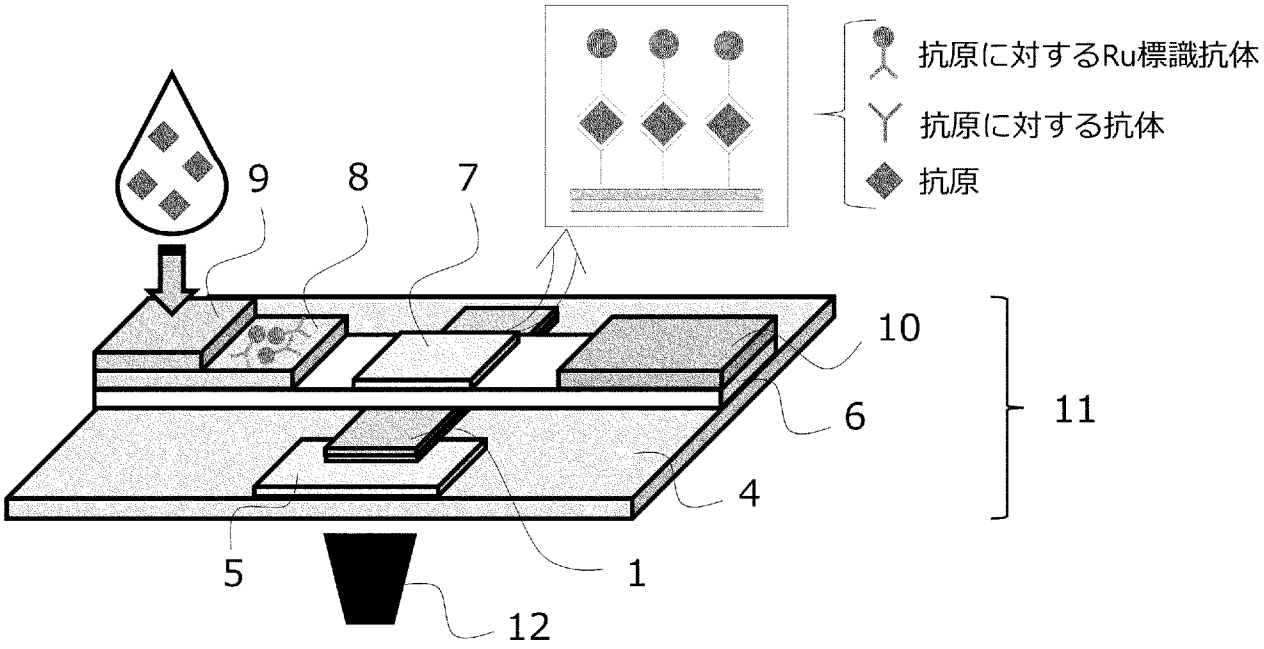
1

[図 2]

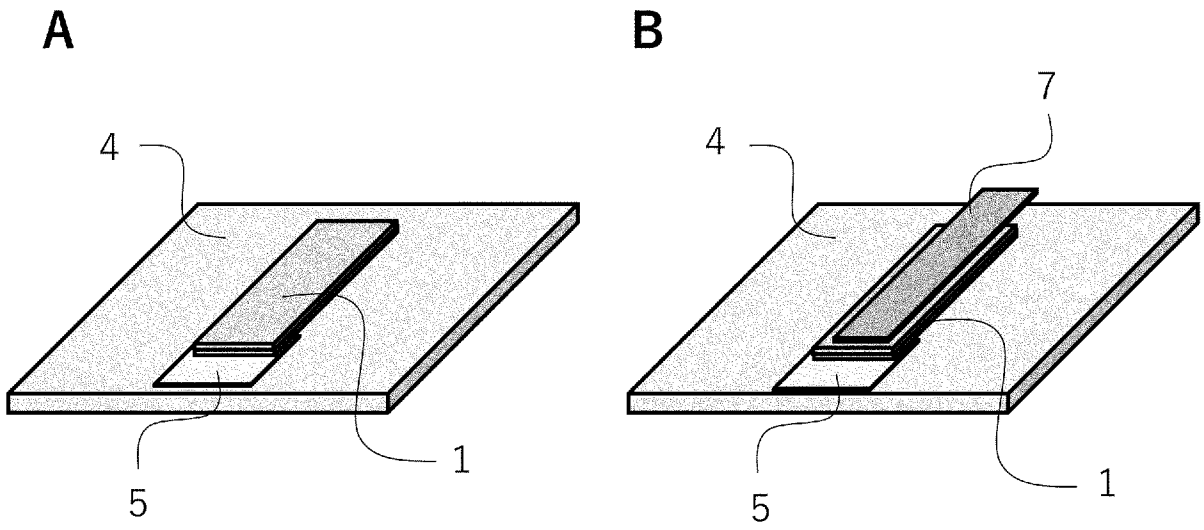


1'

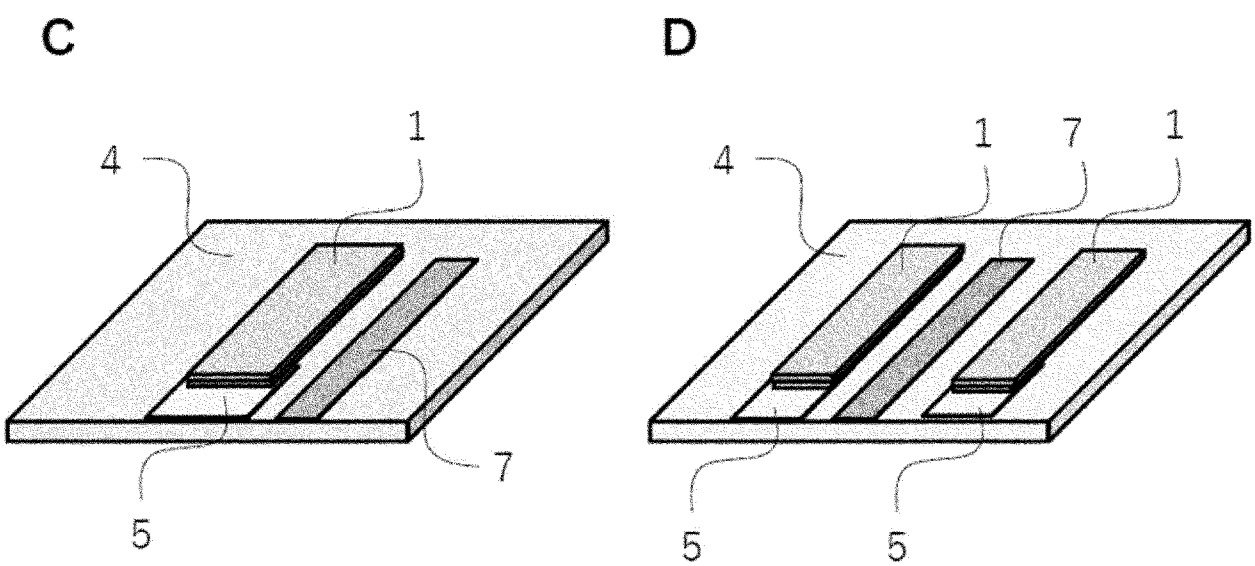
[図 3]



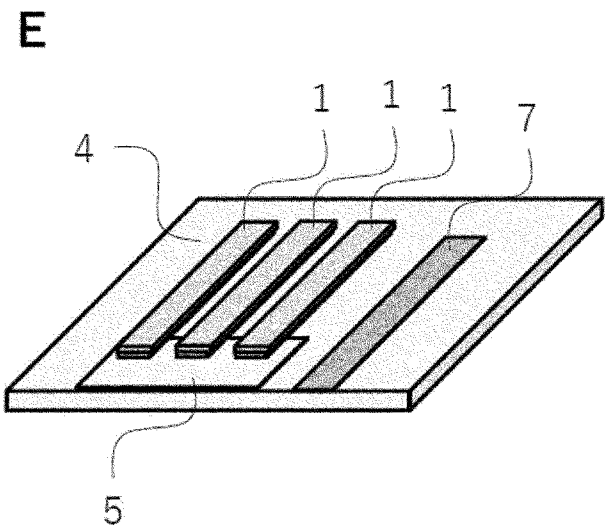
[図 4AB]



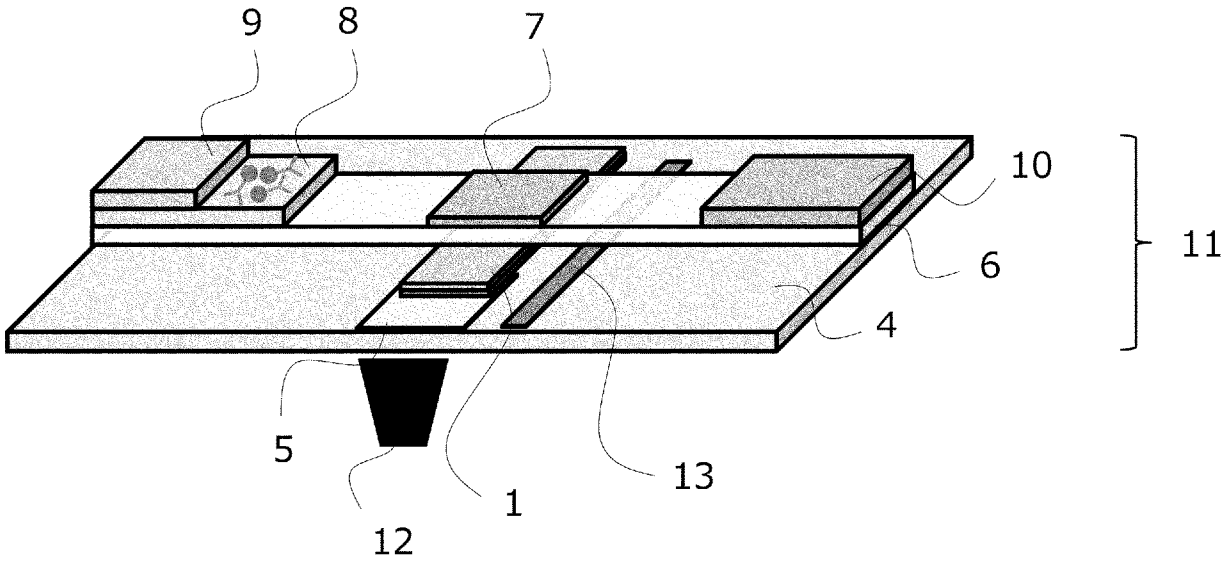
[図 4CD]



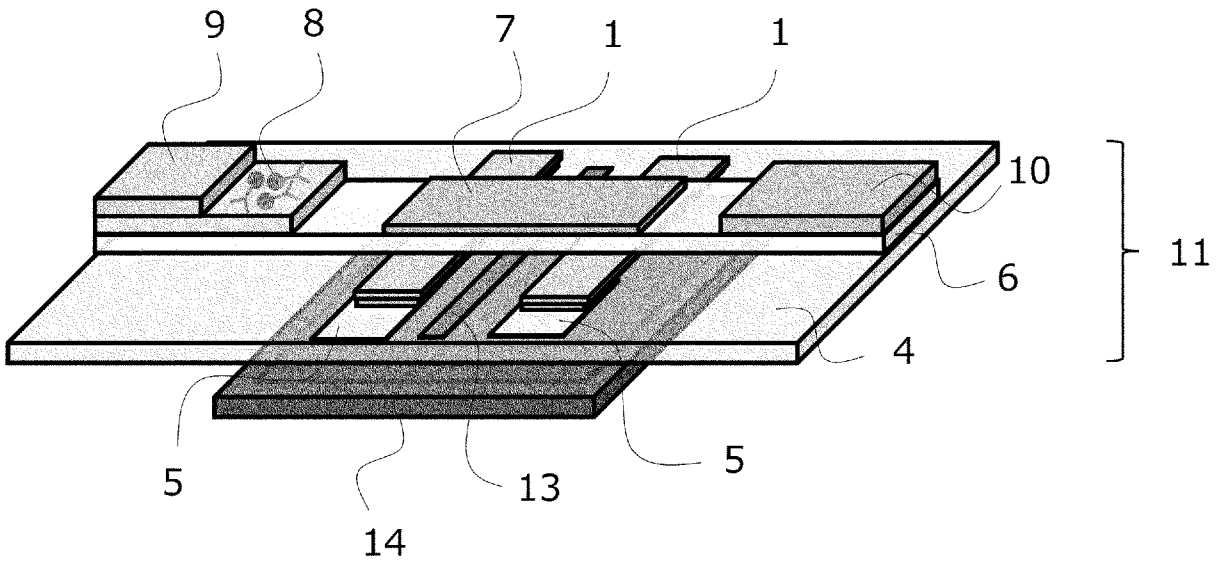
[図 4E]



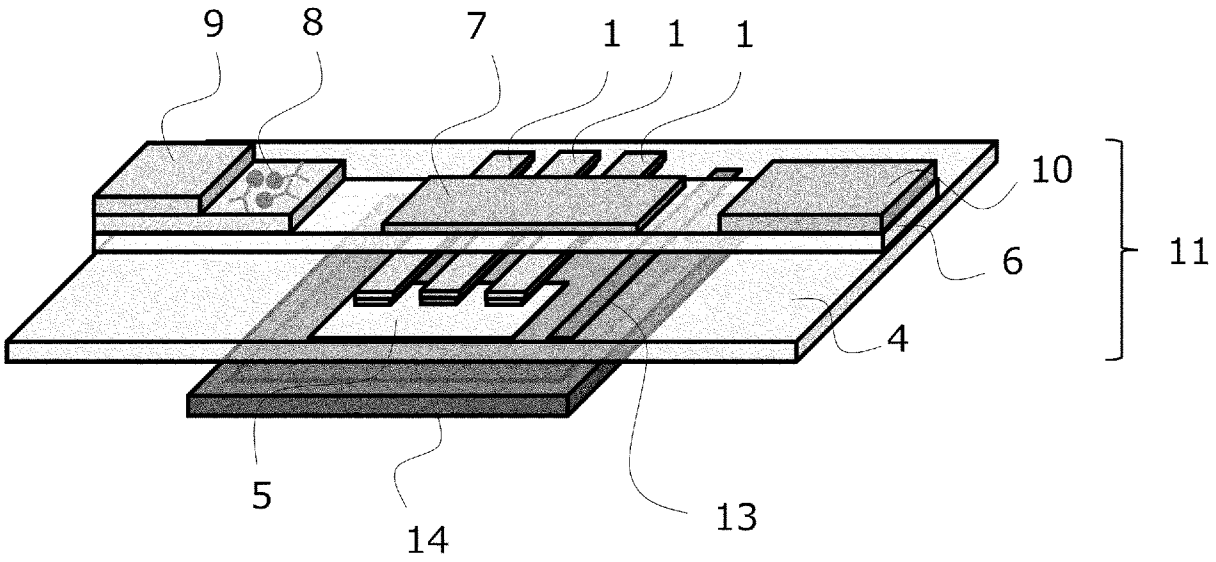
[図 4F]



[図 4G]

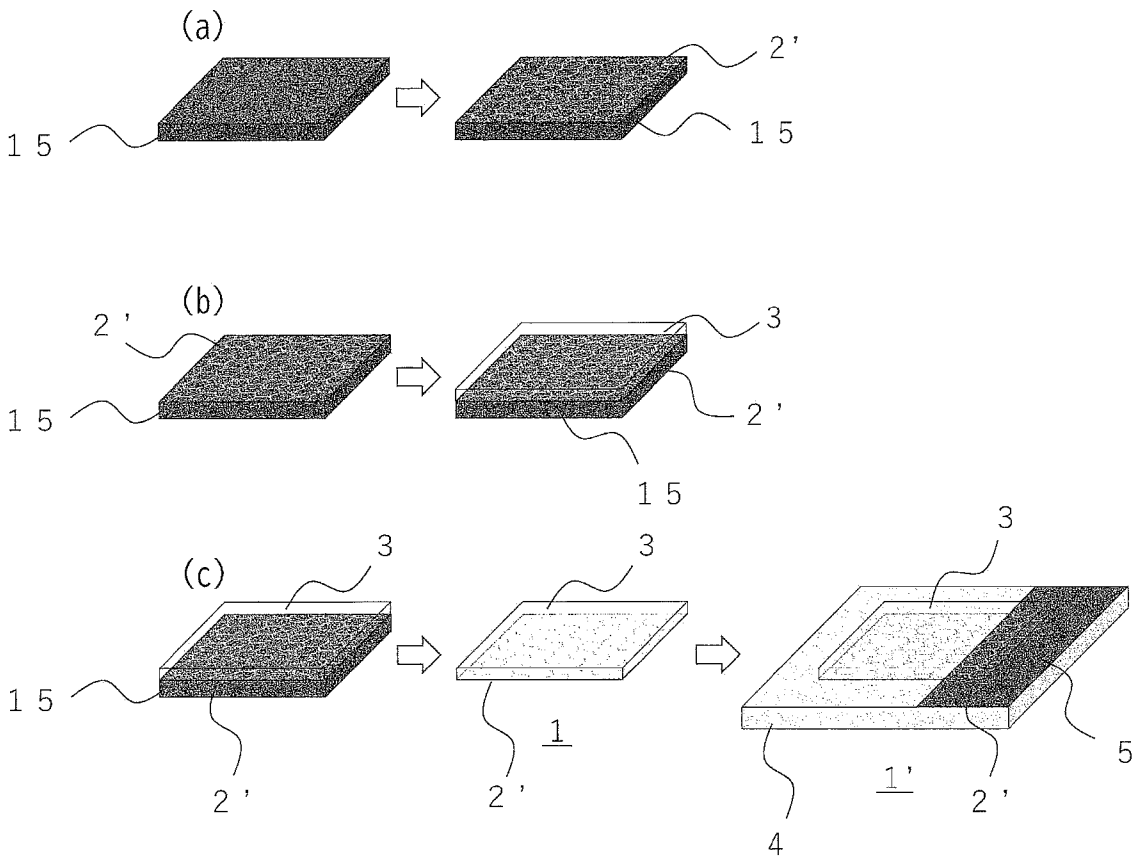


[図 4H]



[図 5]

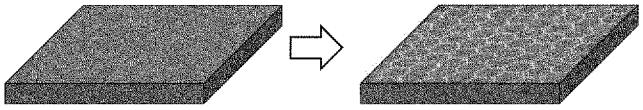
規則 26,
08.04.2024



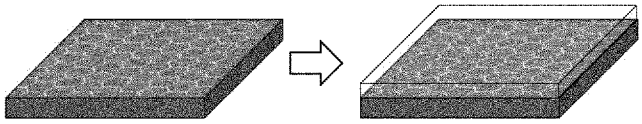
[図 6]

一般的なCVDグラフェンの作製プロセス

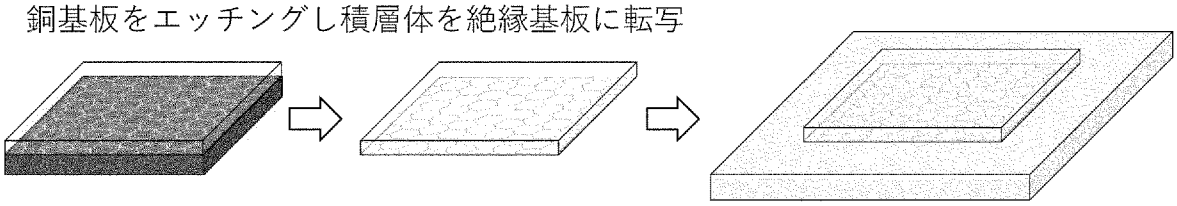
銅基板にグラフェン膜を成長



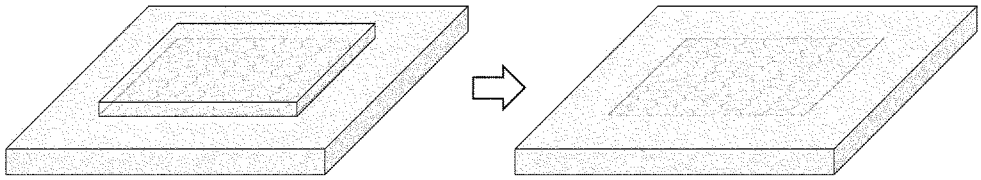
グラフェン上に転写支持膜PMMAをスピンコート



銅基板をエッチングし積層体を絶縁基板に転写

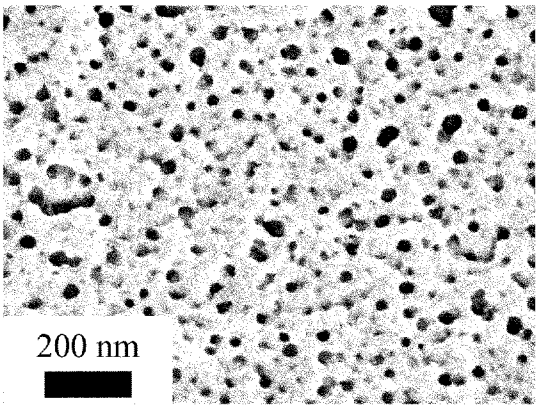


転写支持膜PMMAをアセトンで溶解

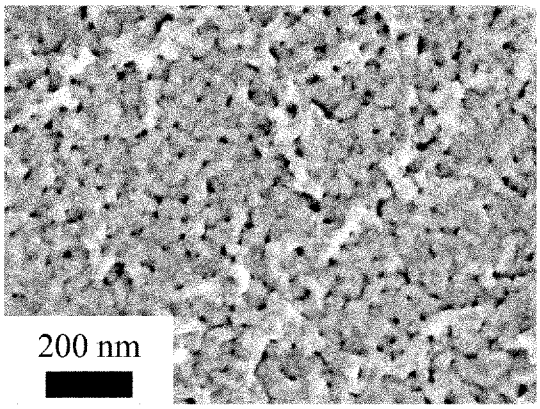


[図 7]

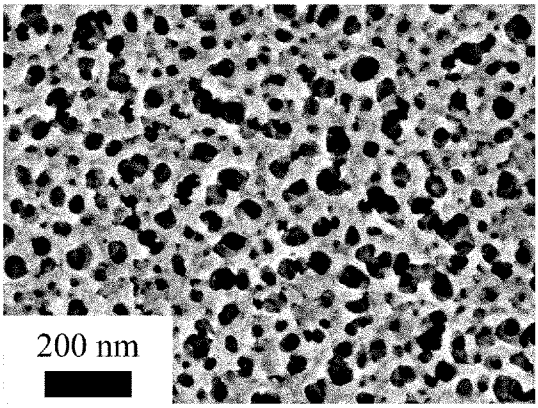
CA



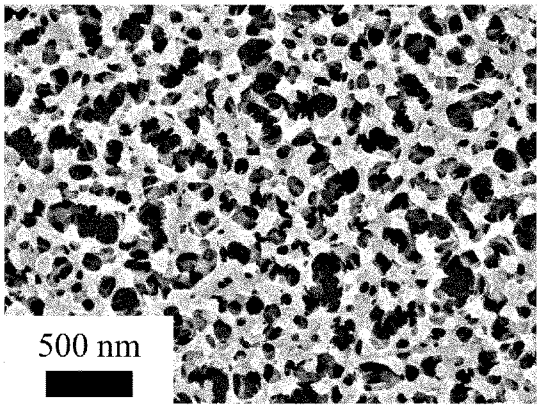
CN



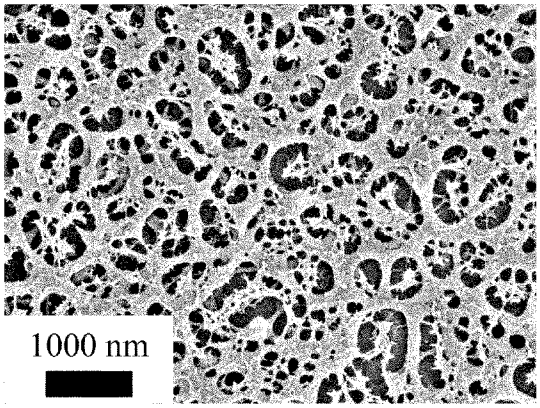
CA : CN = 1 : 3



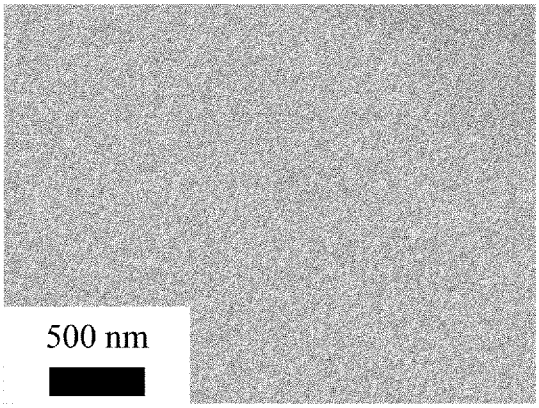
CA : CN = 1 : 1



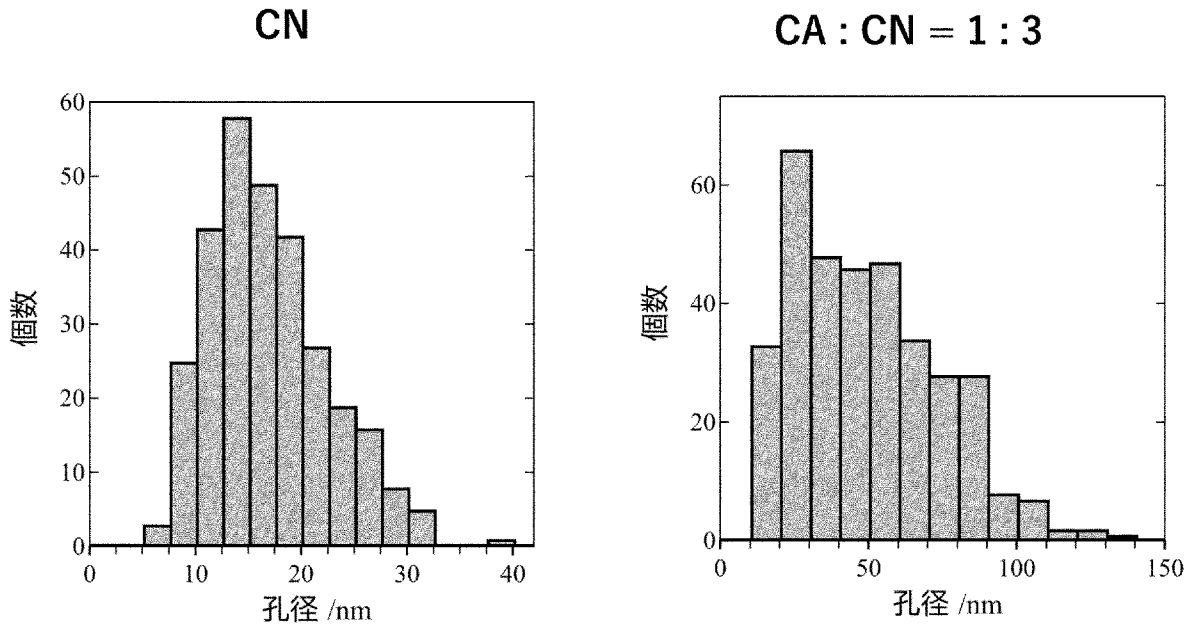
CA : CN = 3 : 1



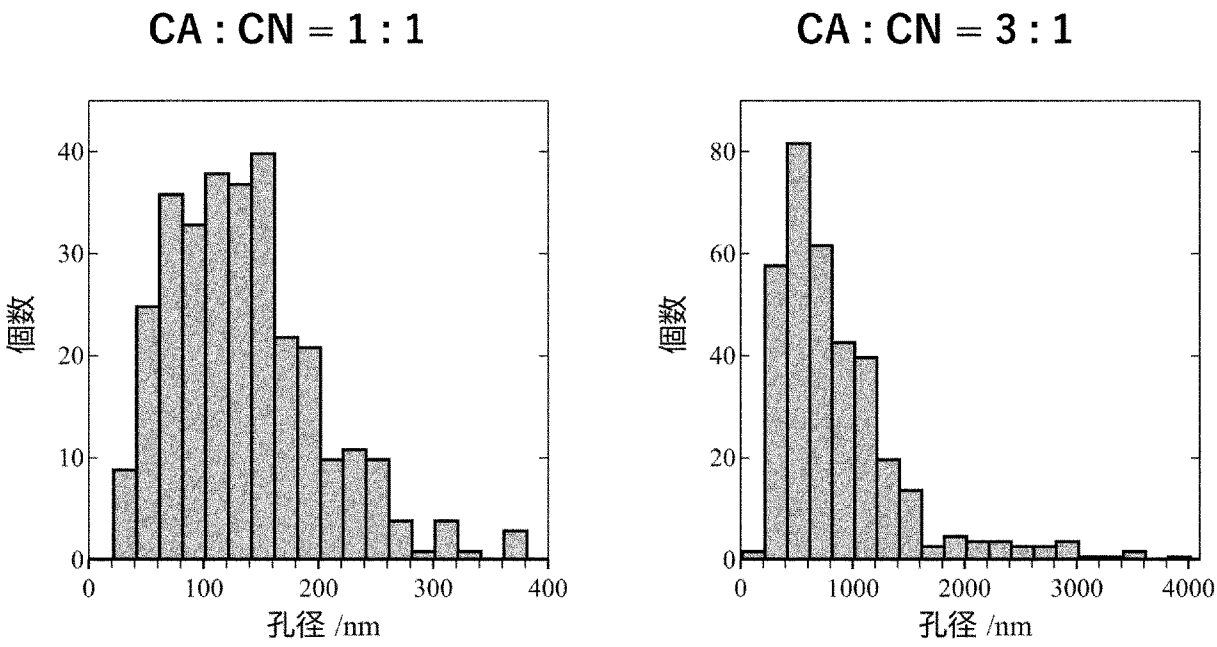
PMMA



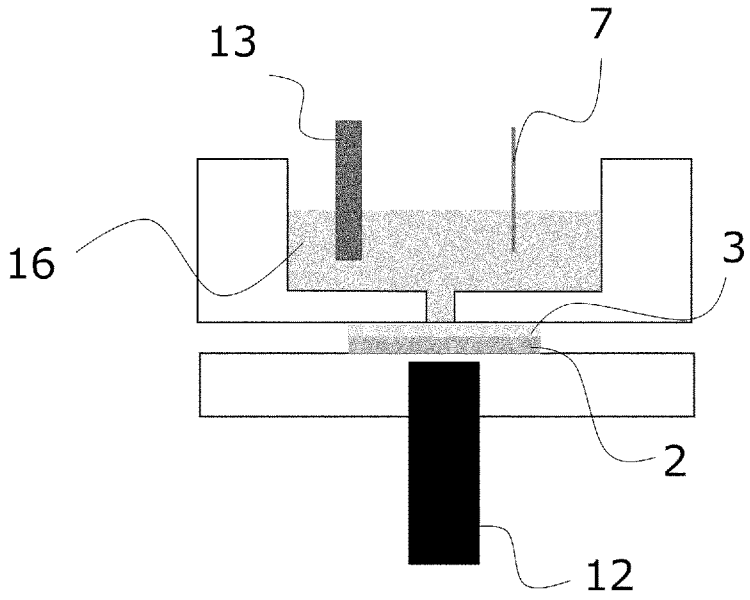
[図 8]


CN
CA : CN = 1 : 3
個数
孔径 /nm
0
10
20
30
40
50
60
0
50
100
150

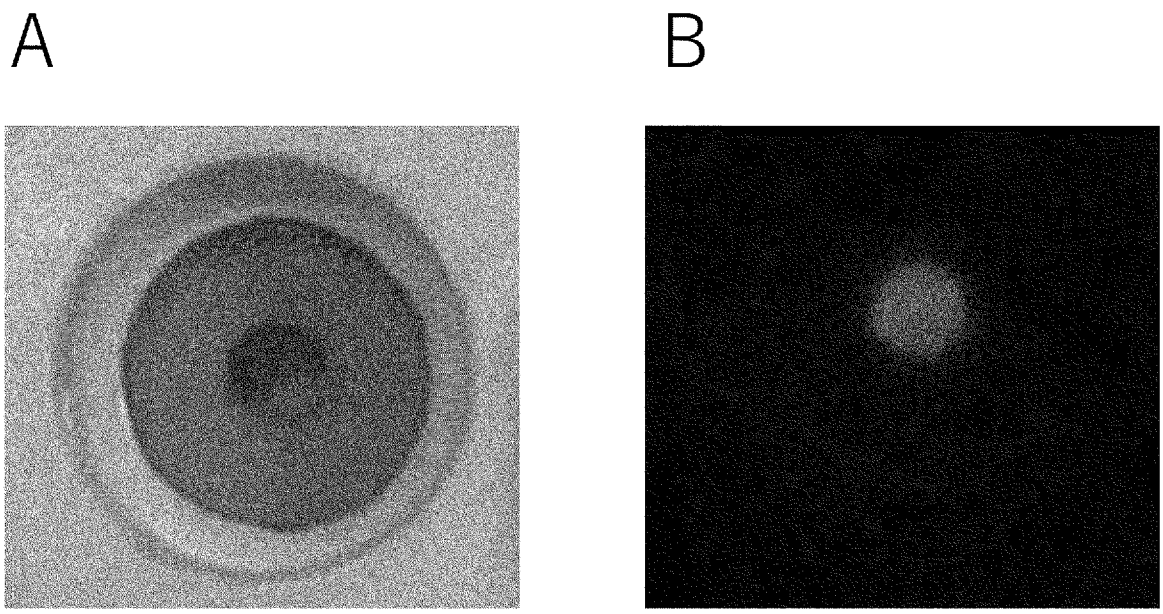
[図 9]


CA : CN = 1 : 1
CA : CN = 3 : 1
個数
孔径 /nm
0
10
20
30
40
100
200
300
400
60
80
1000
2000
3000
4000

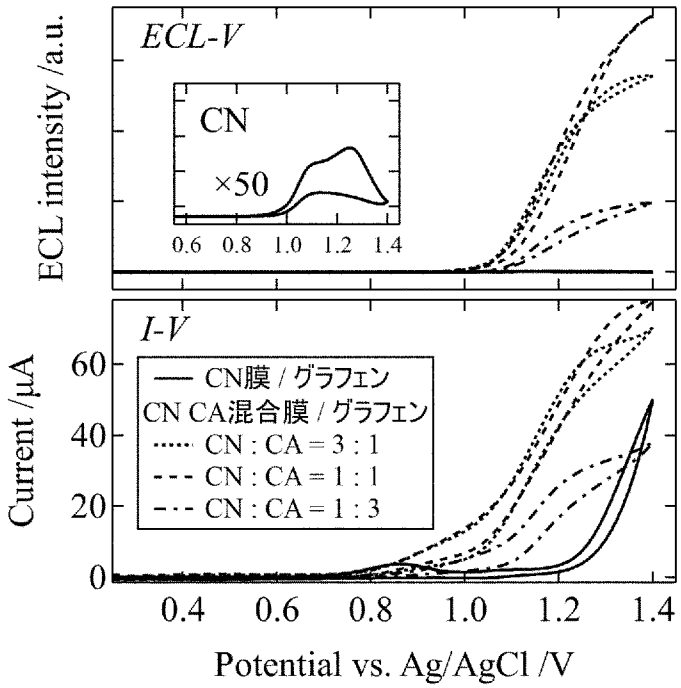
[図 10]



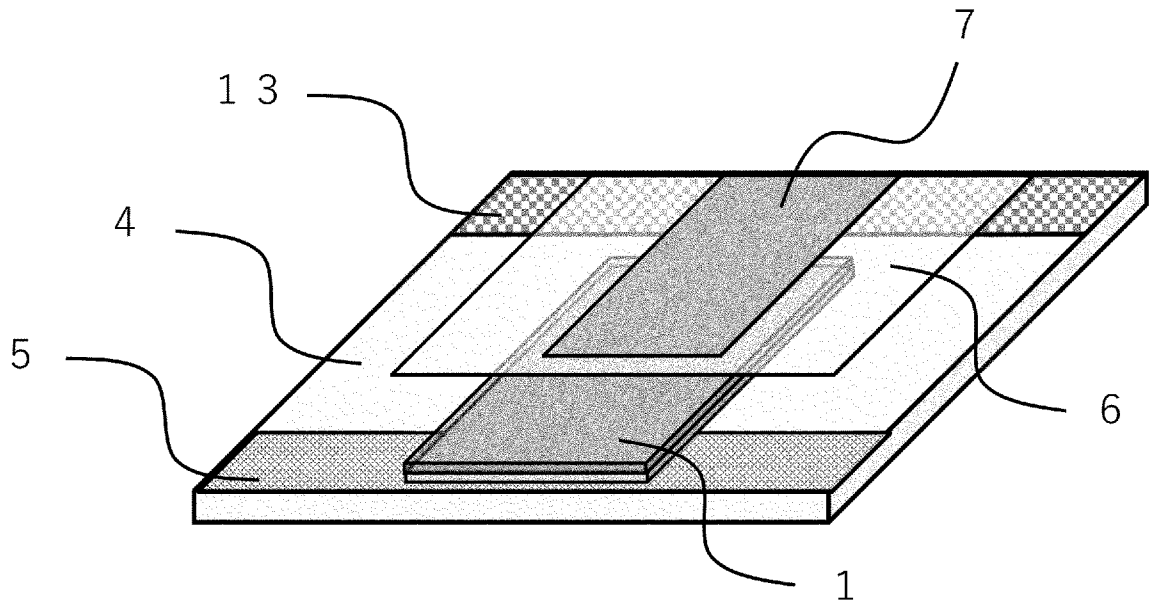
[図 11]



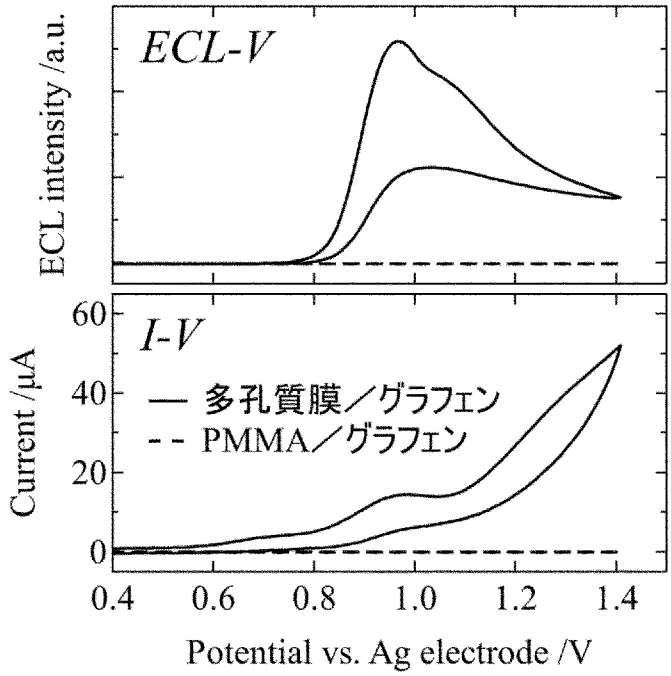
[図 12]


ECL-V
ECL intensity /a.u.
CN
×50
0.6 0.8 1.0 1.2 1.4
I-V
Current /μA
60
40
20
0
CN膜 / グラフェン
CN CA混合膜 / グラフェン
CN : CA = 3 : 1
CN : CA = 1 : 1
CN : CA = 1 : 3
0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4
Potential vs. Ag/AgCl /V

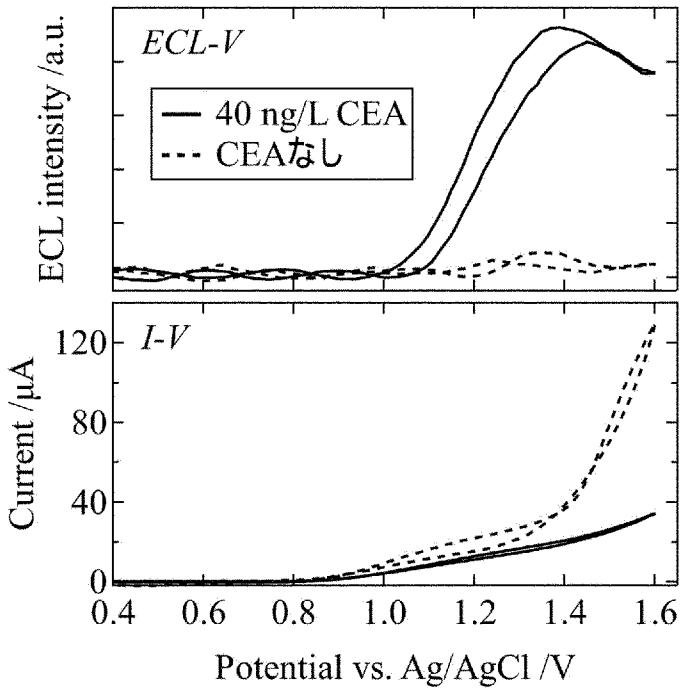
[図 13]


7
1 3
4
5
6
1

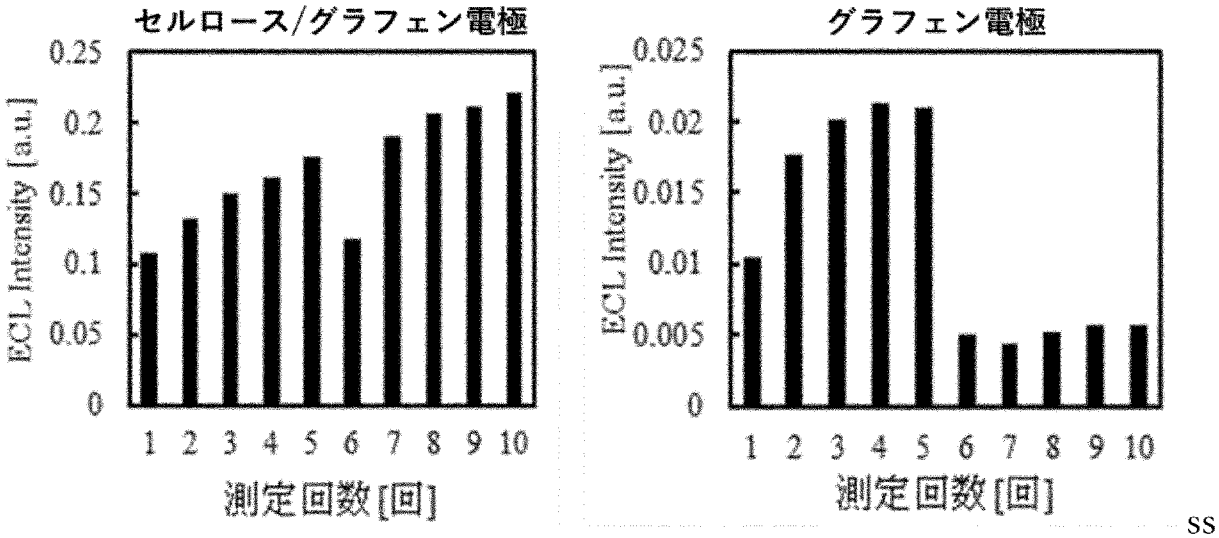
[図 14]


ECL-V
ECL intensity /a.u.
I-V
Current /μA
60
40
20
0
— 多孔質膜／グラフェン
- - PMMA／グラフェン
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
Potential vs. Ag electrode /V

[図 15]

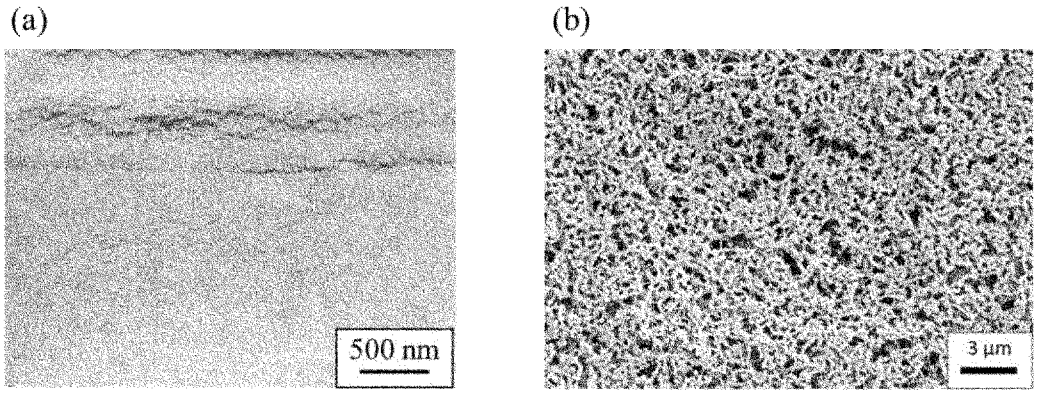

ECL-V
ECL intensity /a.u.
— 40 ng/L CEA
--- CEAなし
I-V
Current /μA
120
80
40
0
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
Potential vs. Ag/AgCl /V

[図 16]

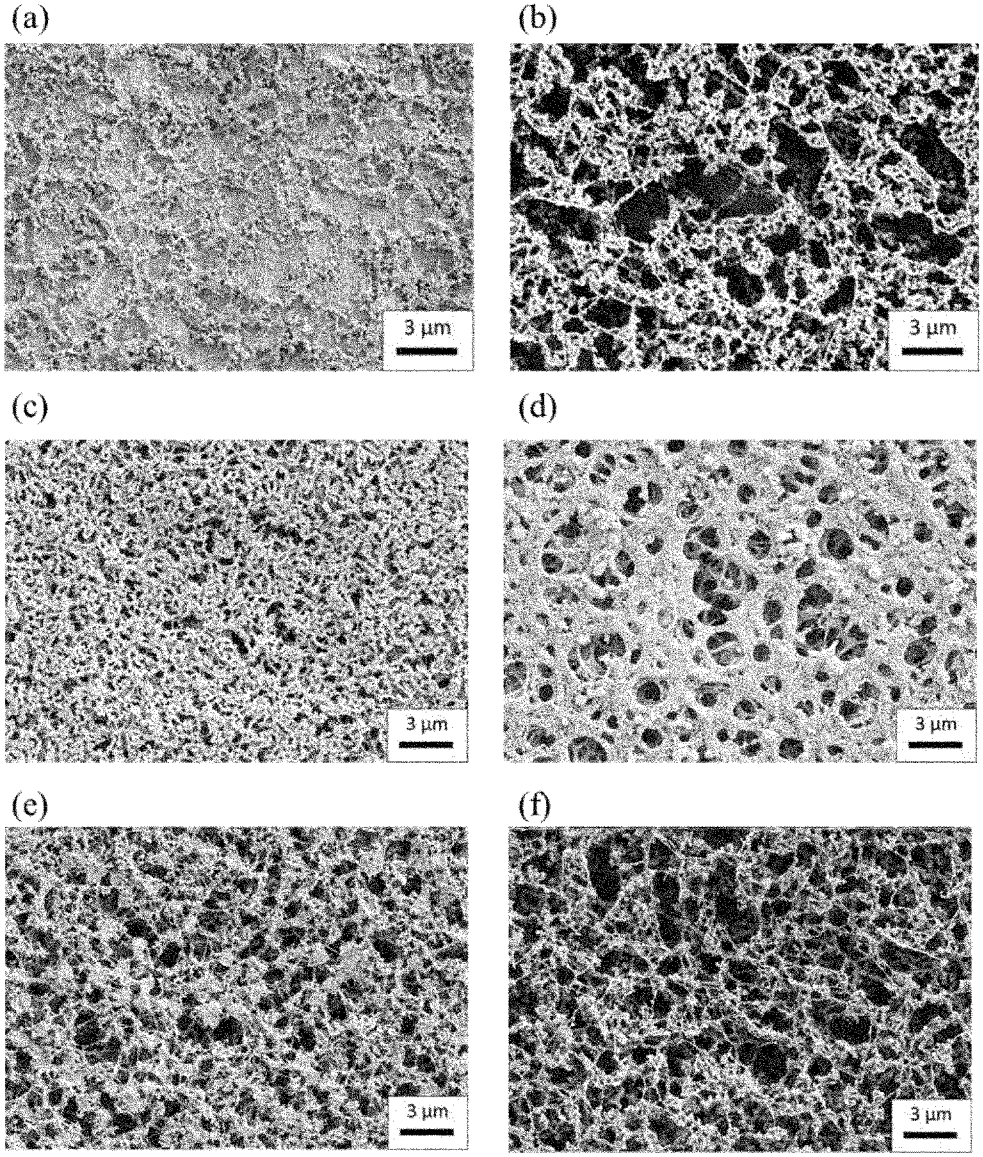

セルロース/グラフェン電極
ECL Intensity [a.u.]
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
測定回数 [回]
グラフェン電極
ECL Intensity [a.u.]
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
測定回数 [回]

SS

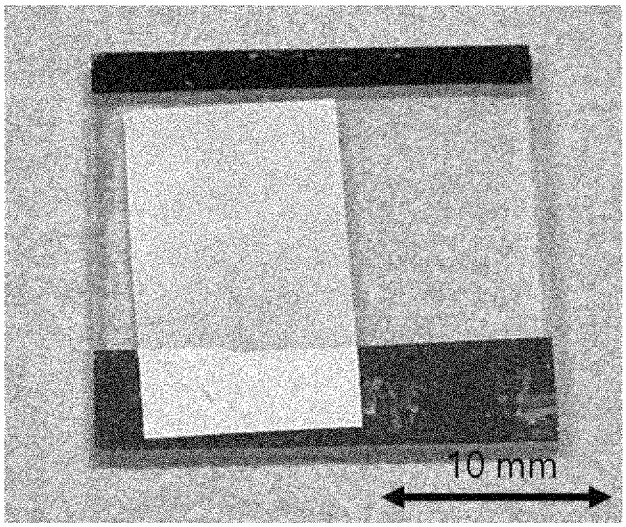
[図 17]


(a)
500 nm
(b)
3 μm

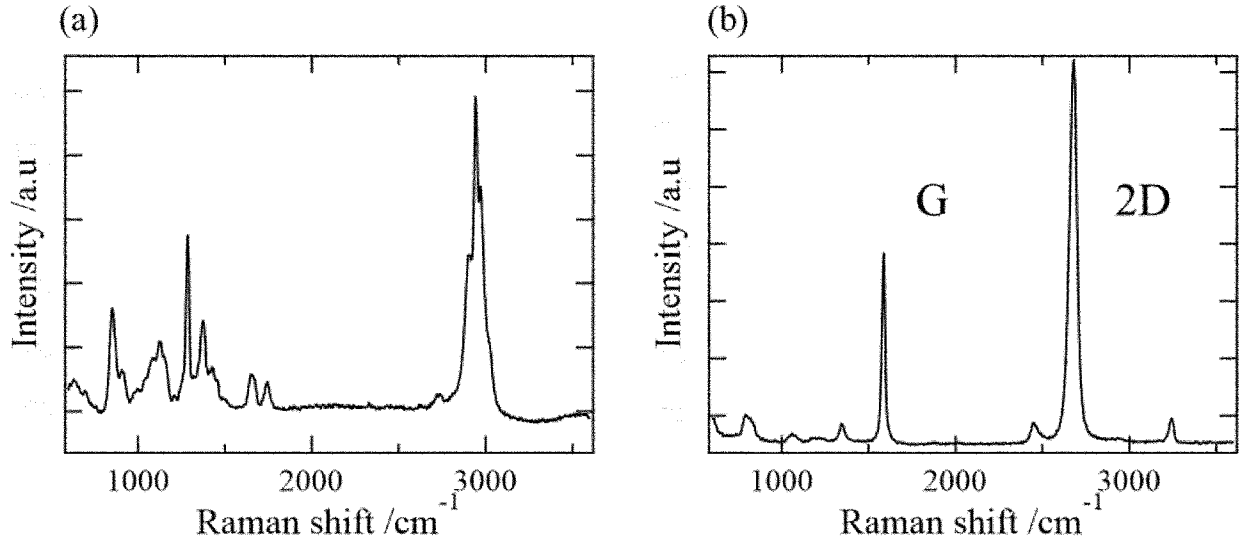
[図 18]



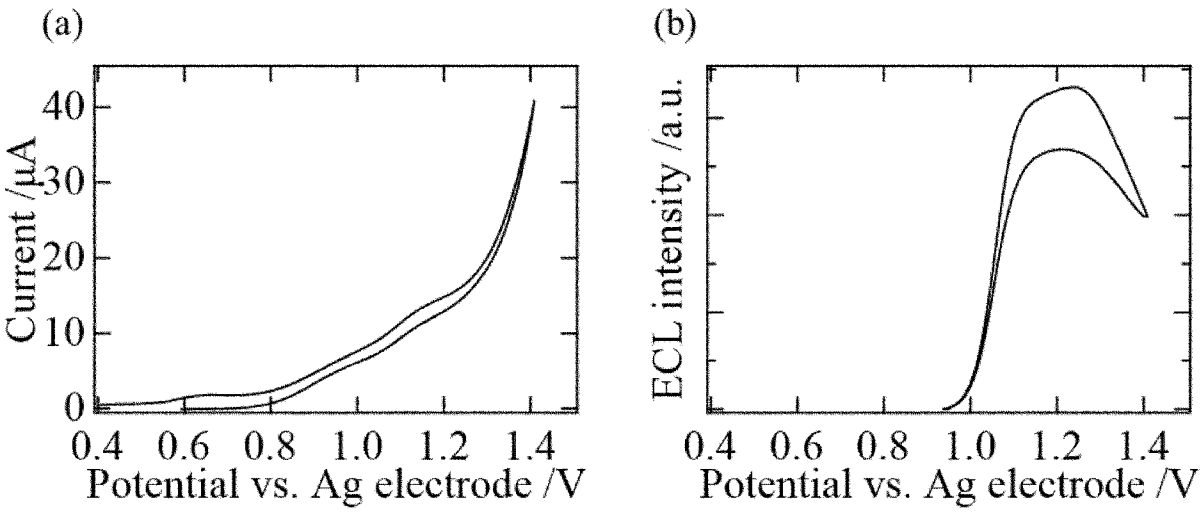
[図 19]



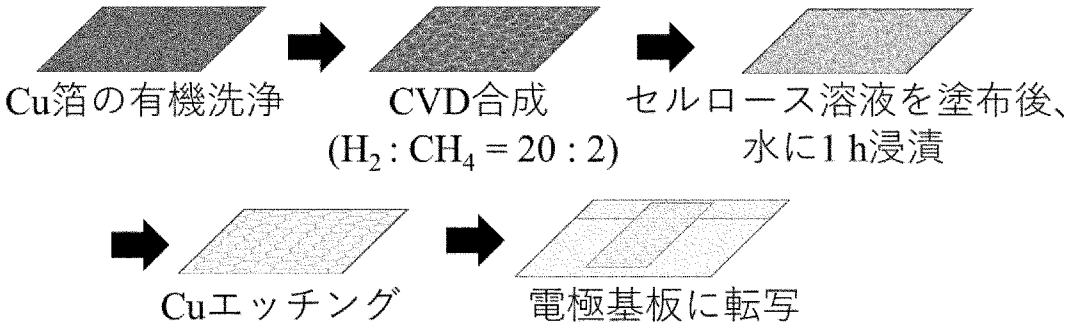
[図 20]


(a)
(b)
Intensity /a.u
Intensity /a.u
G
2D
1000
2000
3000
1000
2000
3000
Raman shift /cm-1
Raman shift /cm-1

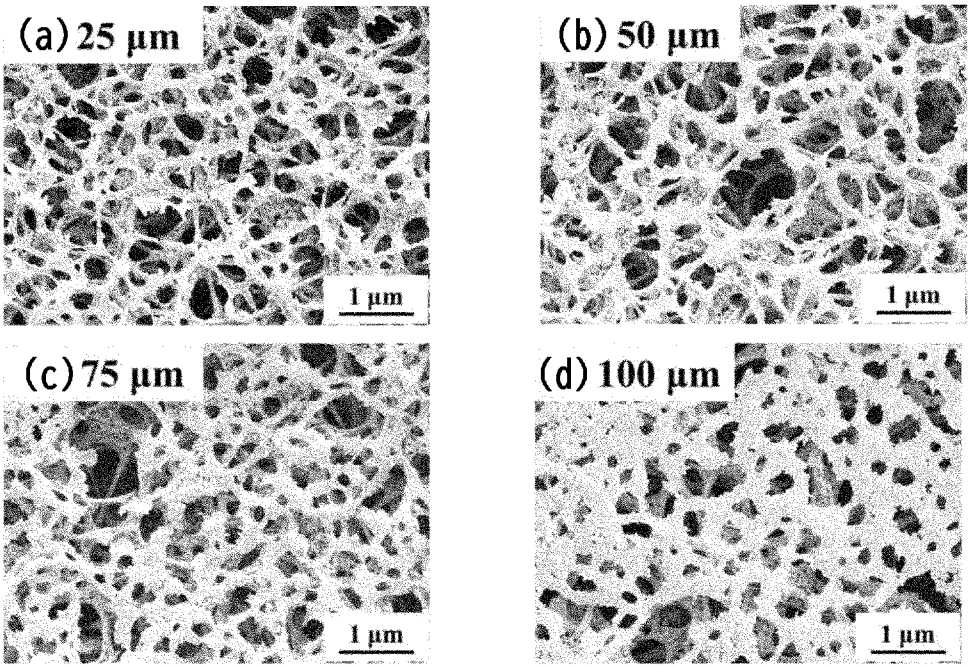
[図 21]


(a)
(b)
Current /μA
40
30
20
10
0
ECL intensity /a.u.
0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4
0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4
Potential vs. Ag electrode /V
Potential vs. Ag electrode /V

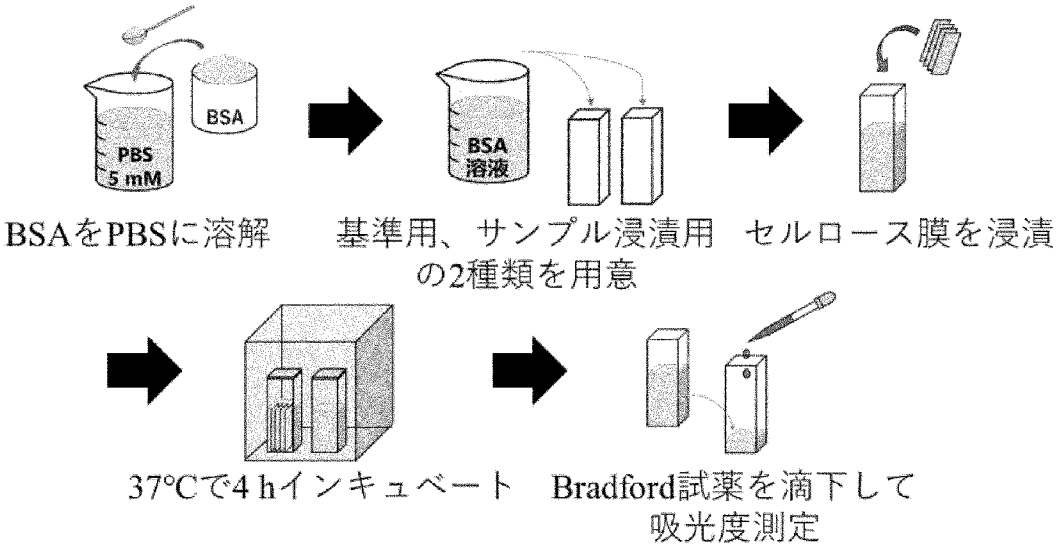
[図 22]


Cu箔の有機洗浄
CVD合成
(H2 : CH4 = 20 : 2)
セルロース溶液を塗布後、
水に1 h浸漬
Cuエッチング
電極基板に転写

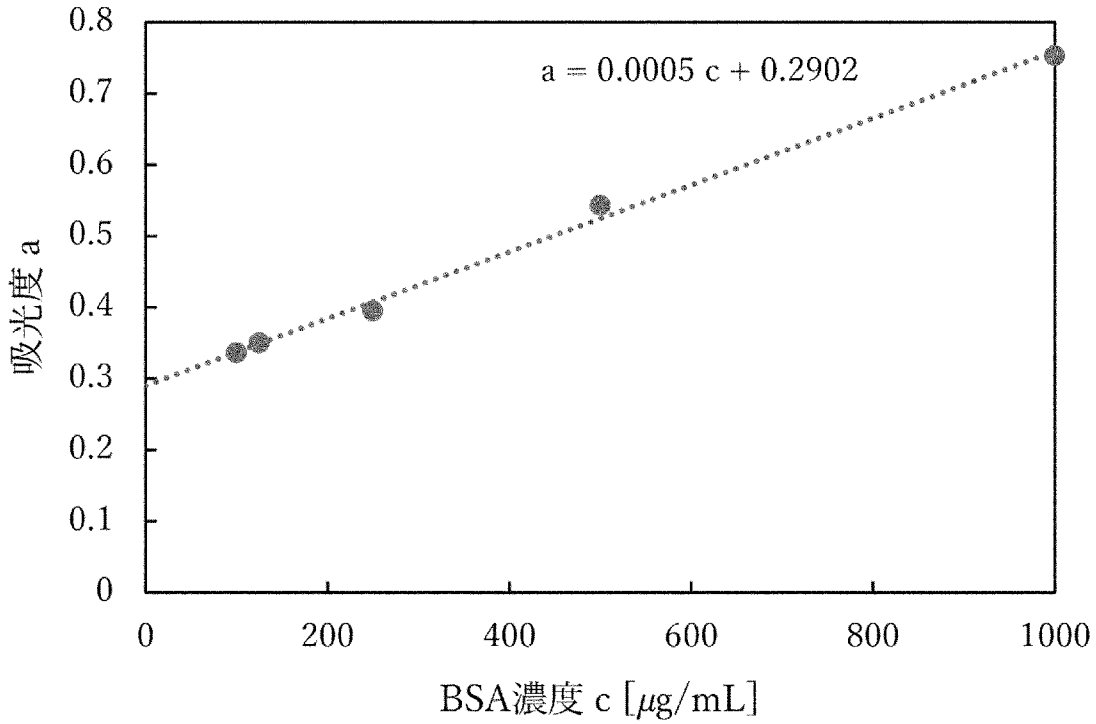
[図 23]


(a) 25 μm
1 μm
(b) 50 μm
1 μm
(c) 75 μm
1 μm
(d) 100 μm
1 μm

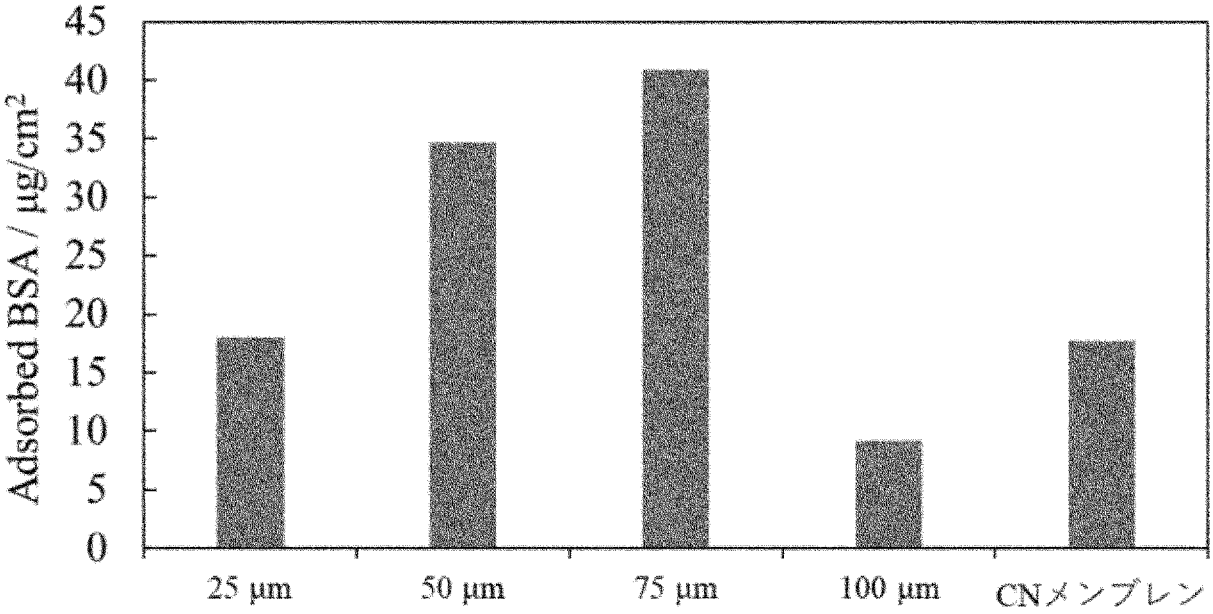
[図 24]


PBS
5 mM
BSA
BSA
溶液
BSAをPBSに溶解
基準用、サンプル浸漬用
の2種類を用意
セルロース膜を浸漬
37℃で4 hインキュベート
Bradford試薬を滴下して
吸光度測定

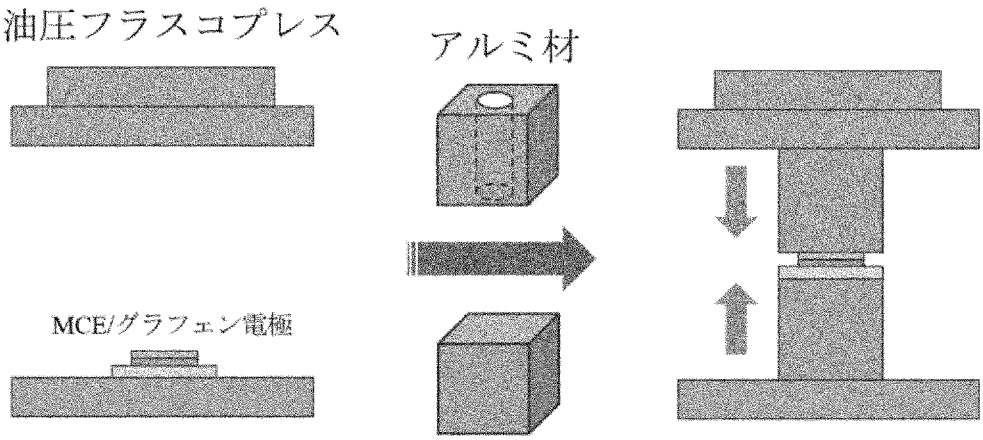
[図 25]


a = 0.0005 c + 0.2902
吸光度 a
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
200
400
600
800
1000
BSA濃度 c [μg/mL]

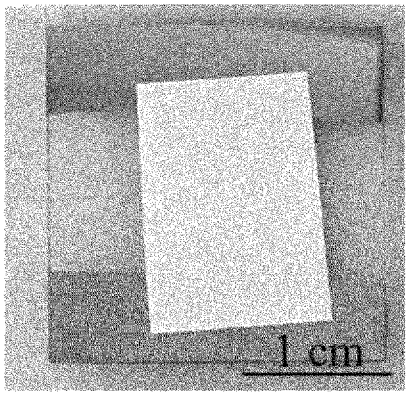
[図 26]


Adsorbed BSA / μg/cm²
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
25 μm
50 μm
75 μm
100 μm
CNメンブレン

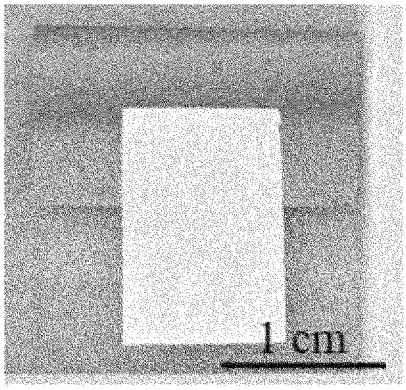
[図 27]

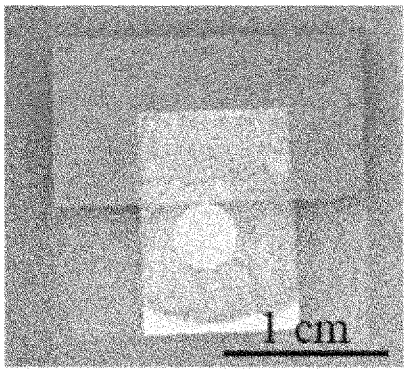


[図 28]



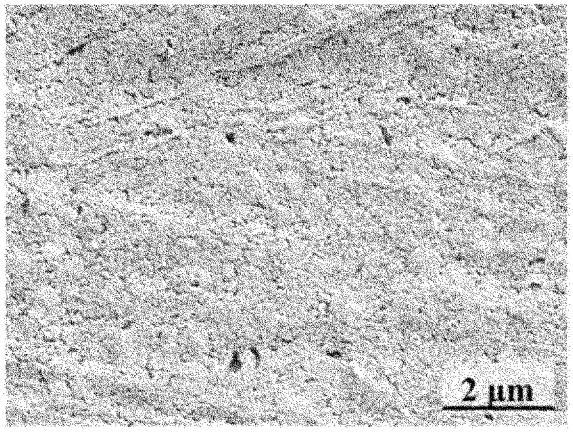
[図 29]



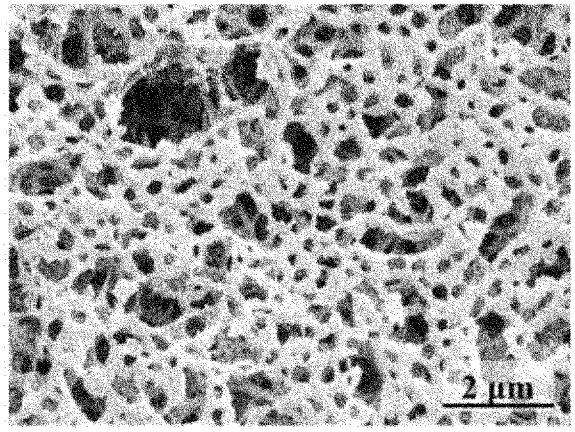


[図 30]

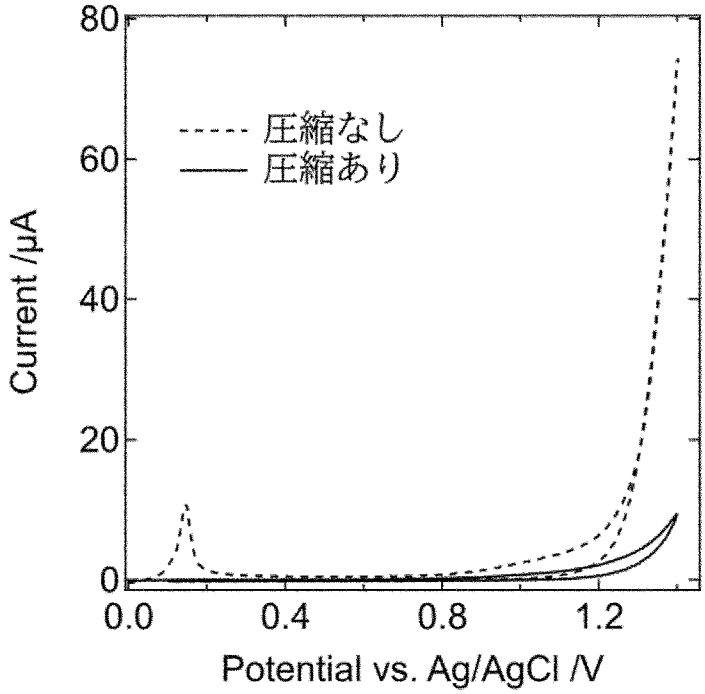
(a)



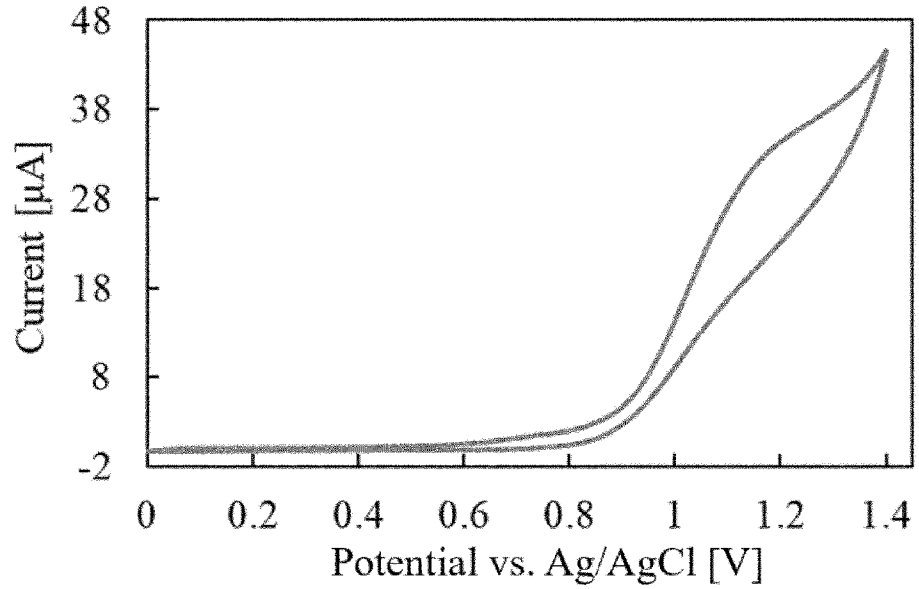
(b)



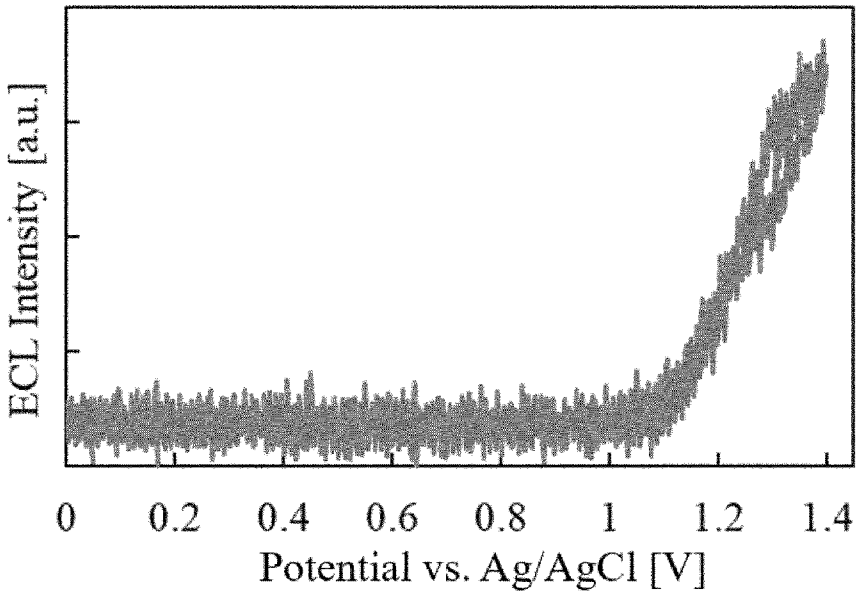
[図 31]


80
60
40
20
0
0.0
0.4
0.8
1.2
圧縮なし
圧縮あり
Current /μA
Potential vs. Ag/AgCl /V

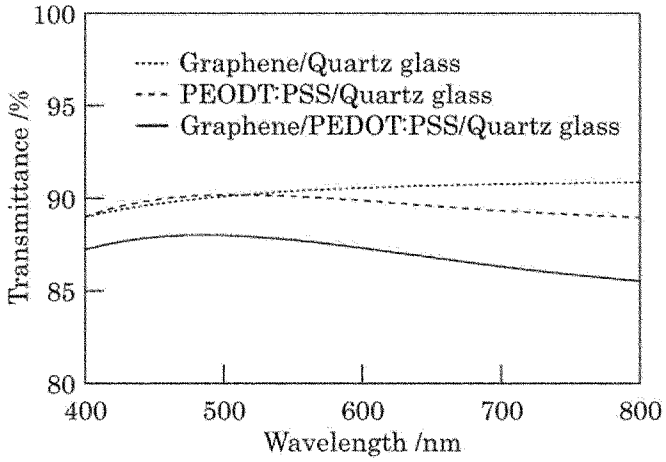
[図 32]

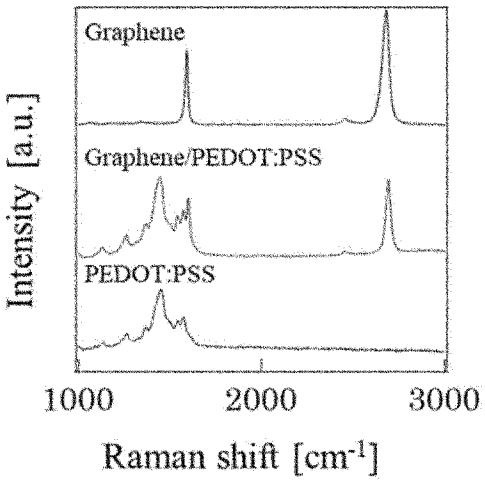

48
38
28
18
8
-2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
Current [μA]
Potential vs. Ag/AgCl [V]

[図 33]

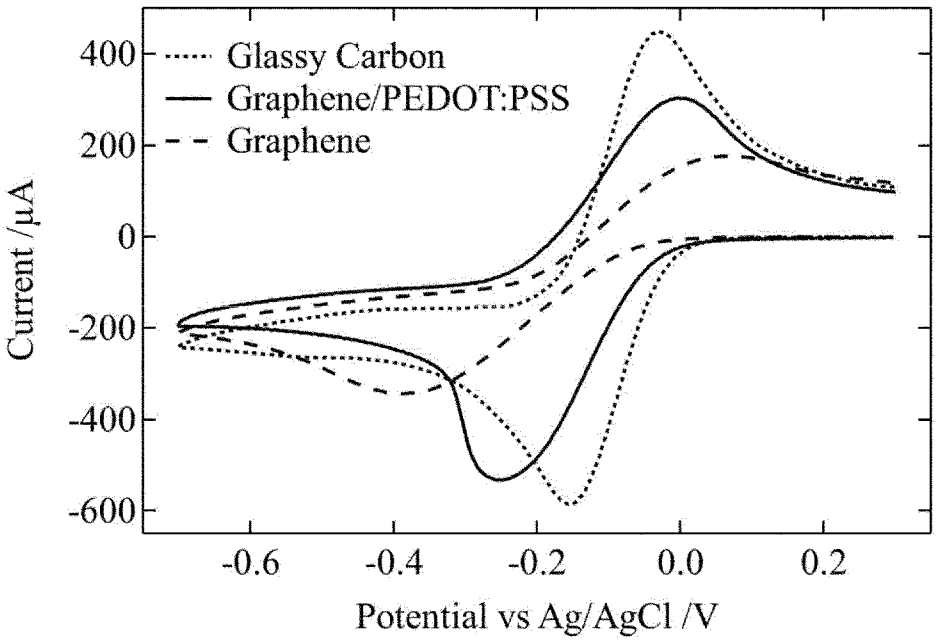

ECL Intensity [a.u.]
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
Potential vs. Ag/AgCl [V]

[図 34]

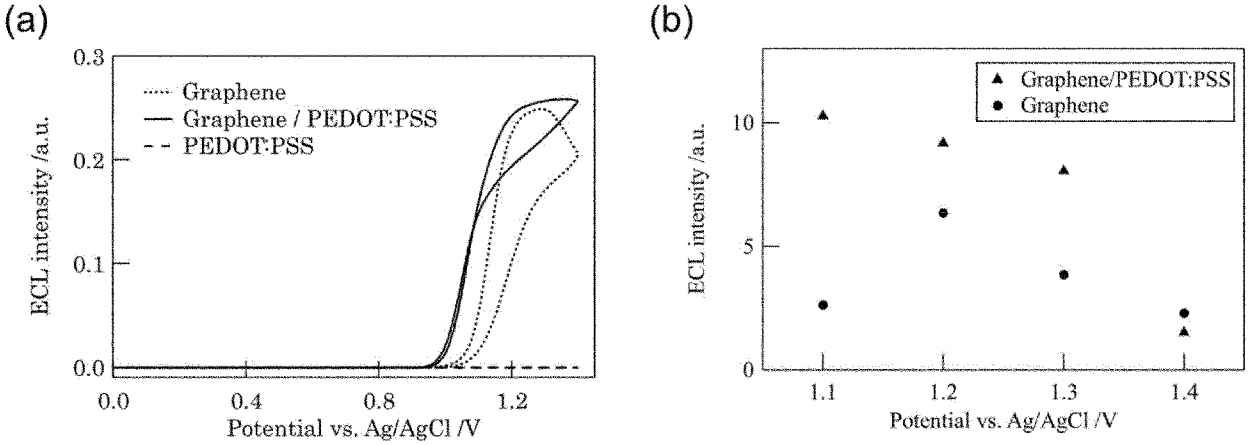

Graphene/Quartz glass
PEODT:PSS/Quartz glass
Graphene/PEDOT:PSS/Quartz glass
Transmittance /%
100
95
90
85
80
400
500
600
700
800
Wavelength /nm


Graphene
Graphene/PEDOT:PSS
PEDOT:PSS
Intensity [a.u.]
1000
2000
3000
Raman shift [cm-1]

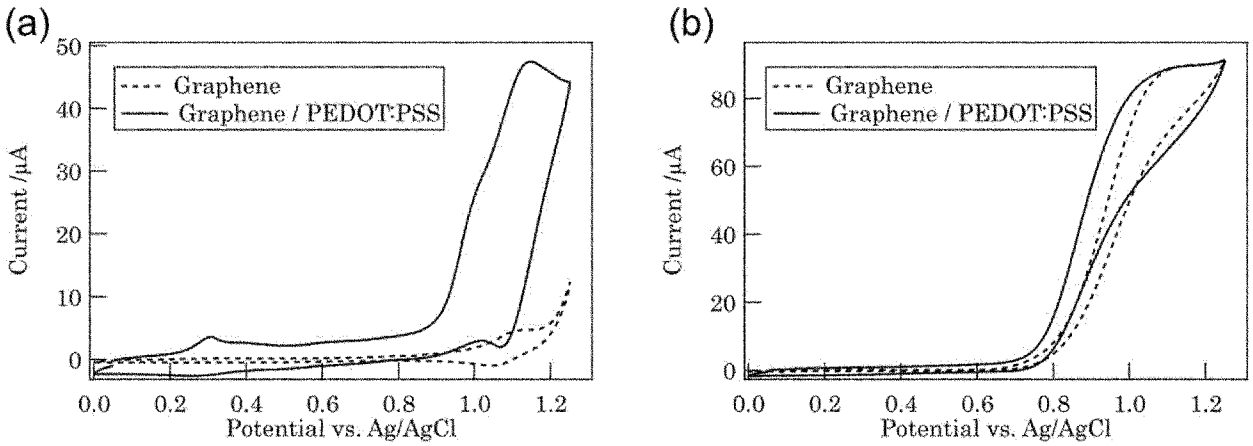
[図 35]


Glassy Carbon
Graphene/PEDOT:PSS
Graphene
Current /μA
Potential vs Ag/AgCl /V

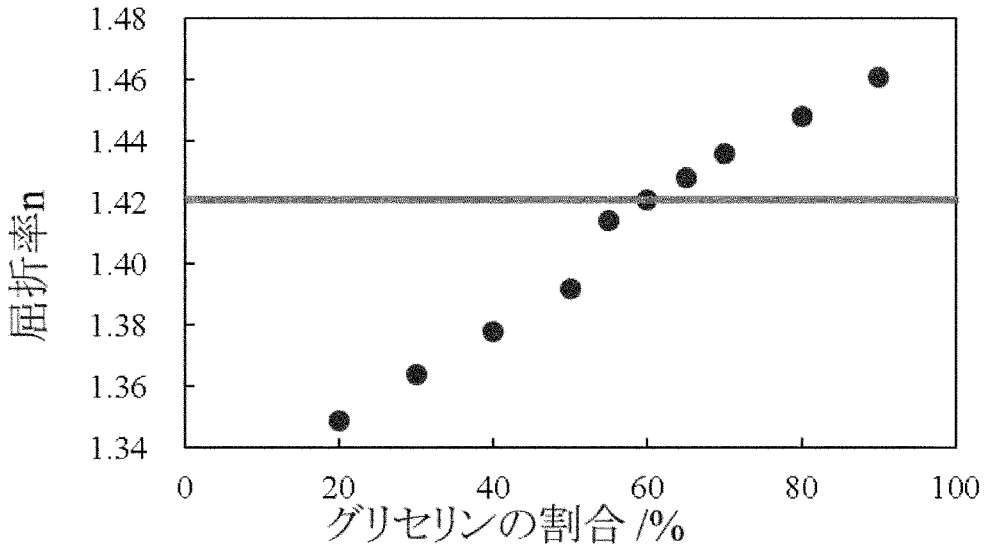
[図 36]


(a)
Graphene
Graphene / PEDOT:PSS
PEDOT:PSS
ECL intensity /a.u.
Potential vs. Ag/AgCl /V
(b)
Graphene/PEDOT:PSS
Graphene
ECL intensity /a.u.
Potential vs. Ag/AgCl /V

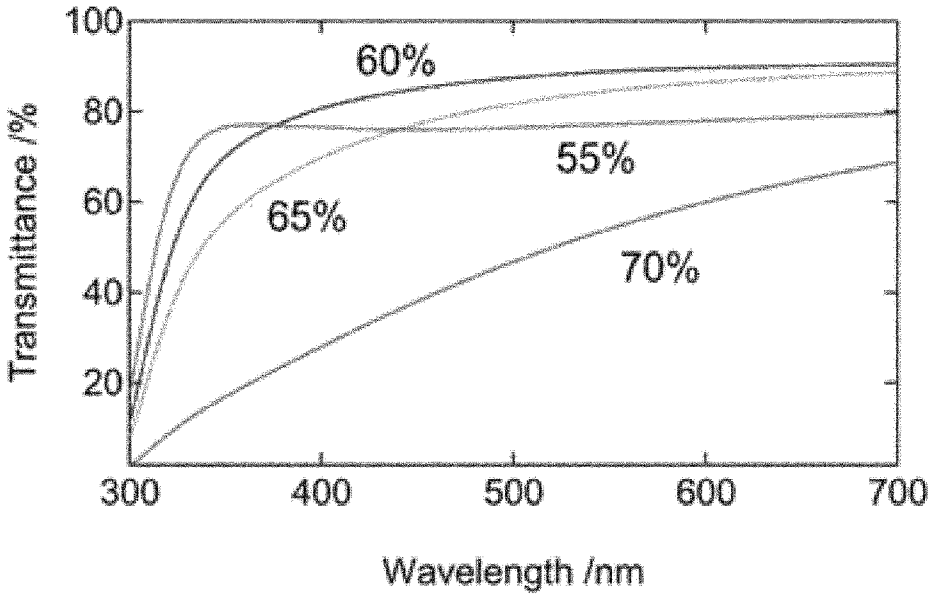
[図 37]


(a)
Graphene
Graphene / PEDOT:PSS
Current /μA
Potential vs. Ag/AgCl
(b)
Graphene
Graphene / PEDOT:PSS
Current /μA
Potential vs. Ag/AgCl

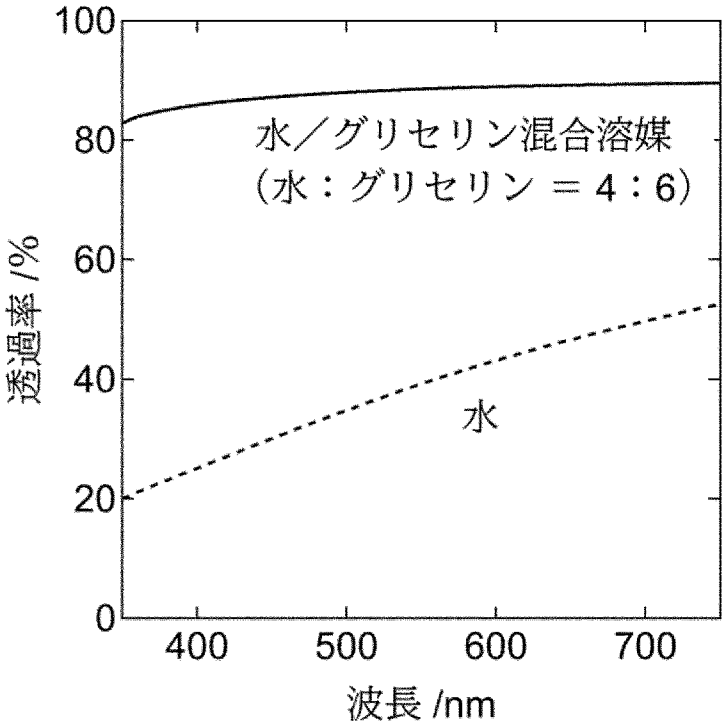
[図 38]


1.48
1.46
1.44
1.42
1.40
1.38
1.36
1.34
屈折率n
0
20
40
60
80
100
グリセリンの割合 /%

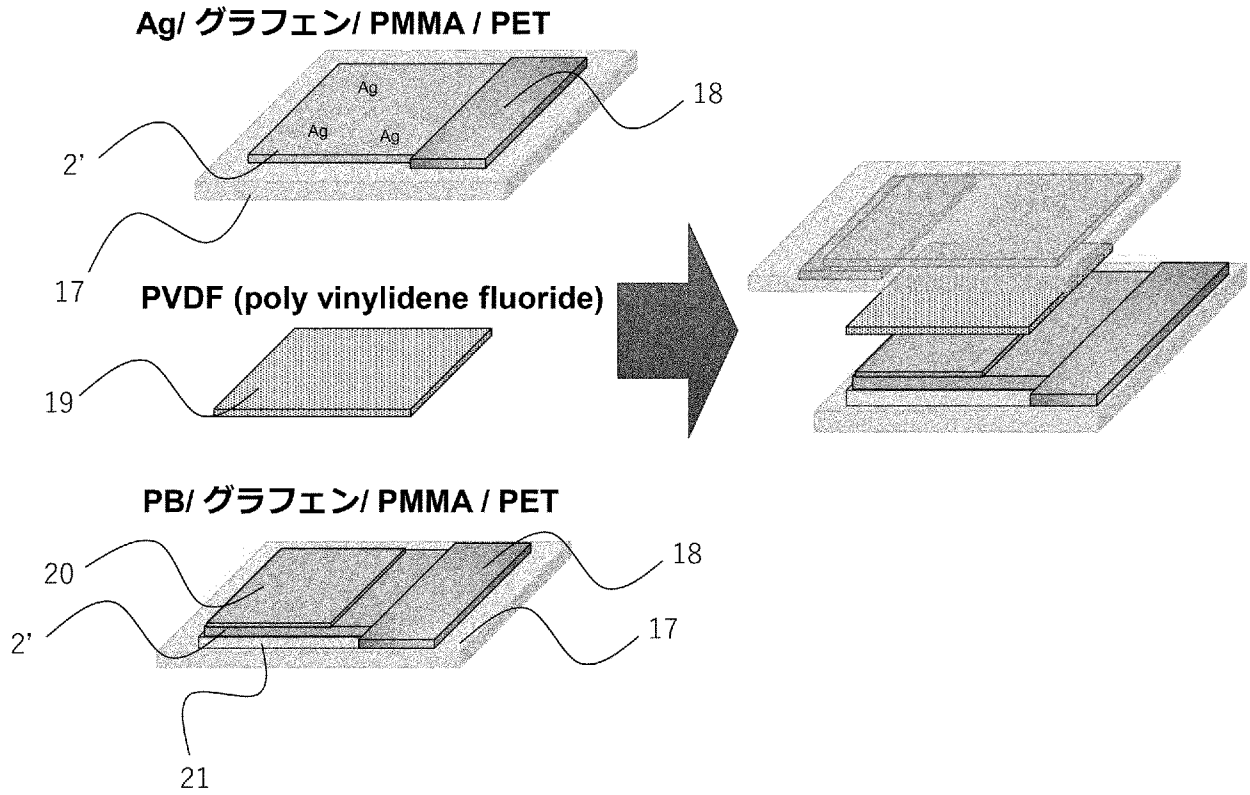
[図 39]


100
80
60
40
20
Transmittance /%
60%
55%
65%
70%
300
400
500
600
700
Wavelength /nm

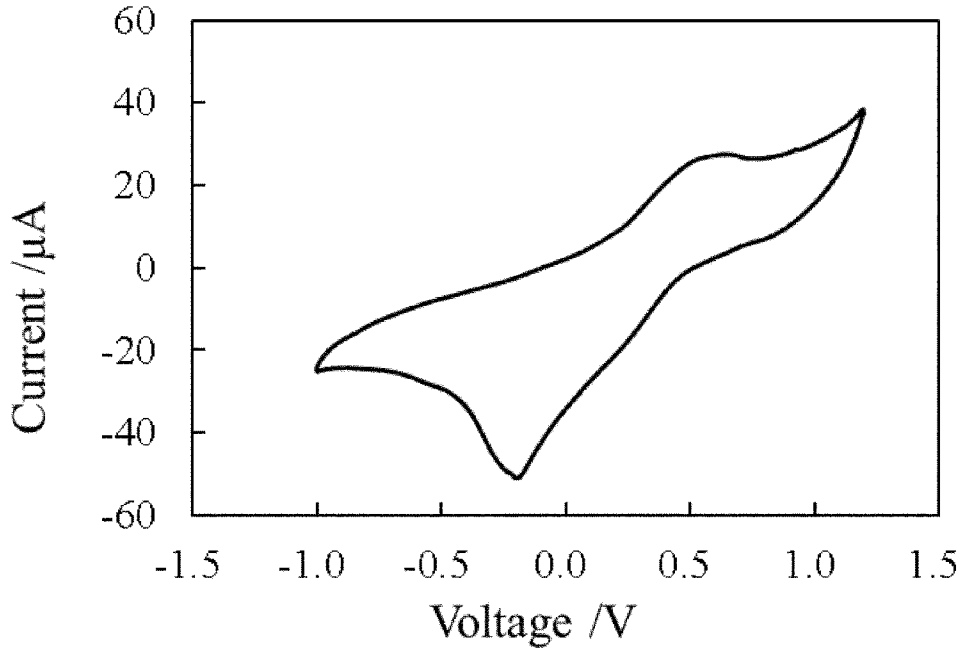
[図 40]


100
80
60
40
20
0
透過率 /%
水／グリセリン混合溶媒
（水：グリセリン ＝ 4：6）
水
400
500
600
700
波長 /nm

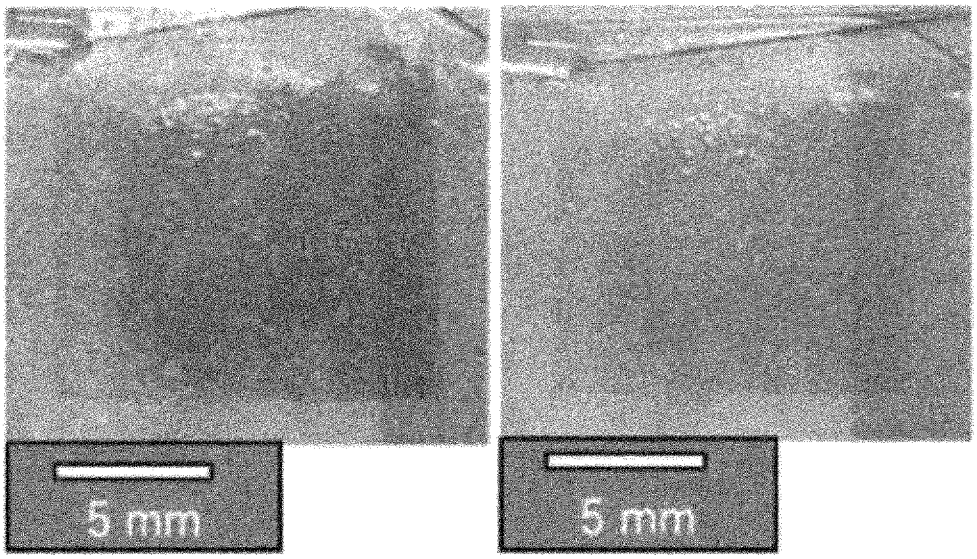
[図 41]


Ag/ グラフェン/ PMMA / PET
Ag
Ag
Ag
18
2'
17
PVDF (poly vinylidene fluoride)
19
PB/ グラフェン/ PMMA / PET
20
18
2'
17
21

[図 42]


60
40
20
0
-20
-40
-60
Current /μA
-1.5
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
Voltage /V

[図 43]


5 mm
5 mm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/011524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B32B 3/24(2006.01)i; ***B32B 5/18***(2006.01)i; ***G01N 33/543***(2006.01)i
FI: B32B3/24 Z; G01N33/543 575; G01N33/543 521; B32B5/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B32B3/24; B32B5/18; G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-136216 A (DAICEL CORP.) 11 July 2013 (2013-07-11) claims, paragraphs [0078]-[0080], [0095]-[0107], examples	1-9, 10, 16
X	JP 2019-087512 A (SHOWA DENKO K.K.) 06 June 2019 (2019-06-06) claims, paragraphs [0064]-[0085], examples	1-5, 7, 10
X	JP 2001-126539 A (JAPAN GORE TEX INC.) 11 May 2001 (2001-05-11) claims, paragraphs [0058]-[0106], examples	1-5, 8-10
X	JP 2017-520423 A (CELGARD LLC) 27 July 2017 (2017-07-27) claims, paragraphs [0041]-[0071], examples	1-4, 10
X	WO 2023/038997 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 16 March 2023 (2023-03-16) claims, p. 18, line 20 to p. 19, line 2, p. 23, line 12 to p. 24, line 5, p. 30, line 5 to p. 35, line 12, examples	1-4, 10-12, 18, 19

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 June 2024	**18 June 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/011524

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004/0219547 A1 (FREY, Alexander) 04 November 2004 (2004-11-04) claims, examples	1-19
A	JP 2018-006044 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 11 January 2018 (2018-01-11) claims, examples	1-19
A	US 2021/0278396 A1 (CARDEA BIO, INC.) 09 September 2021 (2021-09-09) claims, examples	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/011524

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2013-136216 A	11 July 2013	(Family: none)	
JP 2019-087512 A	06 June 2019	(Family: none)	
JP 2001-126539 A	11 May 2001	(Family: none)	
JP 2017-520423 A	27 July 2017	JP 2020-158770 A	
		US 2015/0291754 A1 claims, paragraphs [0051]-[0078], examples	
		JP 2022-105187 A	
		US 2018/0327612 A1	
		US 2021/0253878 A1	
		WO 2015/160908 A1	
		CN 106413864 A	
		CN 110479110 A	
WO 2023/038997 A1	16 March 2023	(Family: none)	
US 2004/0219547 A1	04 November 2004	WO 2002/090573 A2	
		EP 1385986 A1	
		DE 10122659 A	
JP 2018-006044 A	11 January 2018	(Family: none)	
US 2021/0278396 A1	09 September 2021	US 2020/0141931 A1	
		US 2019/0120830 A1	
		US 2017/0059514 A1	
		US 2017/0102358 A1	
		US 2017/0053908 A1	
		US 2017/0018626 A1	
		US 2016/0265047 A1	
		US 2016/0178569 A1	
		US 2022/0155289 A1	
		US 2023/0115797 A1	
		US 2023/0408510 A1	
		US 2018/0315750 A1	
		US 2017/0218442 A1	
		US 2020/0181695 A1	
		US 2021/0246501 A1	
		US 2019/0181273 A1	
		WO 2018/026830 A1	
		WO 2017/041056 A1	
		WO 2017/031254 A1	
		WO 2016/100049 A1	
		WO 2016/145110 A1	
		WO 2017/201081 A1	
		WO 2016/205253 A1	
		EP 3491370 A1	
		EP 3344980 A1	
		EP 3978913 A1	
		EP 3235010 A1	
		EP 3268496 A1	
		EP 3459115 A1	
		EP 3308153 A1	
		CA 2971589 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/011524

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

B32B 3/24(2006.01)i; B32B 5/18(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i
FI: B32B3/24 Z; G01N33/543 575; G01N33/543 521; B32B5/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

B32B3/24; B32B5/18; G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2013-136216 A (株式会社ダイセル) 11.07.2013 (2013-07-11) 特許請求の範囲、［００７８］－［００８０］、［００９５］－［０１０７］、実施例	1-9,10,16
X	JP 2019-087512 A (昭和電工株式会社) 06.06.2019 (2019-06-06) 特許請求の範囲、［００６４］－［００８５］、実施例	1-5,7,10
X	JP 2001-126539 A (ジャパンゴアテックス株式会社) 11.05.2001 (2001-05-11) 特許請求の範囲、［００５８］－［０１０６］、実施例	1-5,8-10
X	JP 2017-520423 A (セルガード エルエルシー) 27.07.2017 (2017-07-27) 特許請求の範囲、［００４１］－［００７１］、実施例	1-4,10
X	WO 2023/038997 A1 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 16.03.2023 (2023-03-16) 請求の範囲、第１８頁２０行－第１９頁２行、第２３頁１２行－第２４頁５行、第３０頁５行－第３５頁１２行、実施例	1-4,10-12,18,19

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
07.06.2024	18.06.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
大▲わき▼　弘子 4S 3346
電話番号 03-3581-1101 内線 3430

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	US 2004/0219547 A1 (FREY Alexander) 04.11.2004 (2004-11-04) 特許請求の範囲、実施例	1-19
A	JP 2018-006044 A (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 11.01.2018 (2018-01-11) 特許請求の範囲、実施例	1-19
A	US 2021/0278396 A1 (CARDEA BIO, INC.) 09.09.2021 (2021-09-09) 特許請求の範囲、実施例	1-19

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/011524

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2013-136216 A	11.07.2013	（ファミリーなし）	
JP 2019-087512 A	06.06.2019	（ファミリーなし）	
JP 2001-126539 A	11.05.2001	（ファミリーなし）	
JP 2017-520423 A	27.07.2017	JP 2020-158770 A US 2015/0291754 A1 特許請求の範囲、［００５１］－［００７８］、実施例 JP 2022-105187 A US 2018/0327612 A1 US 2021/0253878 A1 WO 2015/160908 A1 CN 106413864 A CN 110479110 A	
WO 2023/038997 A1	16.03.2023	（ファミリーなし）	
US 2004/0219547 A1	04.11.2004	WO 2002/090573 A2 EP 1385986 A1 DE 10122659 A	
JP 2018-006044 A	11.01.2018	（ファミリーなし）	
US 2021/0278396 A1	09.09.2021	US 2020/0141931 A1 US 2019/0120830 A1 US 2017/0059514 A1 US 2017/0102358 A1 US 2017/0053908 A1 US 2017/0018626 A1 US 2016/0265047 A1 US 2016/0178569 A1 US 2022/0155289 A1 US 2023/0115797 A1 US 2023/0408510 A1 US 2018/0315750 A1 US 2017/0218442 A1 US 2020/0181695 A1 US 2021/0246501 A1 US 2019/0181273 A1 WO 2018/026830 A1 WO 2017/041056 A1 WO 2017/031254 A1 WO 2016/100049 A1 WO 2016/145110 A1 WO 2017/201081 A1 WO 2016/205253 A1 EP 3491370 A1 EP 3344980 A1 EP 3978913 A1 EP 3235010 A1 EP 3268496 A1 EP 3459115 A1 EP 3308153 A1	

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/011524

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
		CA 2971589 A	