(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4873219号
(P4873219)
(45)発行日　平成24年2月8日(2012.2.8)　(24)登録日　平成23年12月2日(2011.12.2)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 27/416	(2006.01)	G01N	27/46	U
G01N 27/327	(2006.01)	G01N	27/30	351
G01N 27/28	(2006.01)	G01N	27/28	321F
G01N 27/30	(2006.01)	G01N	27/30	F
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	593

請求項の数 13　(全 28 頁)

(21)出願番号　特願2005-276497 (P2005-276497)
(22)出願日　平成17年9月22日 (2005.9.22)
(65)公開番号　特開2007-85941 (P2007-85941A)
(43)公開日　平成19年4月5日 (2007.4.5)
審査請求日　平成20年9月22日 (2008.9.22)

(73)特許権者　000010087
ＴＯＴＯ株式会社
福岡県北九州市小倉北区中島２丁目１番１号
(74)代理人　100094640
弁理士　紺野　昭男
(72)発明者　戸　次　　允
福岡県北九州市小倉北区中島２丁目１番１号　東陶機器株式会社内
(72)発明者　大　原　　仁
福岡県北九州市小倉北区中島２丁目１番１号　東陶機器株式会社内

審査官　柏木　一浩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられる電極ユニット、ならびにそれを用いたセンサセルおよび測定装置

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられる電極ユニットであって、
絶縁基板と、
前記絶縁基板上に局所的に設けられる、前記増感色素が光励起に応じて放出する電子を受容可能な電子受容物質を含んでなる電子受容層を備えた作用電極と、
前記絶縁基板の前記作用電極と同一面上に、前記作用電極と離間して設けられる対電極とを備えた電極ユニット。
【請求項２】
前記作用電極および前記対電極が、互いに分離された複数の領域毎に区分されたスポット状に形成されてなる、請求項１に記載の電極ユニット。
【請求項３】
前記作用電極が、前記電子受容層上に担持される、前記被検物質と直接または間接的に特異的に結合可能なプローブ物質をさらに備えた、請求項１または２に記載の電極ユニット。
【請求項４】
前記電子受容物質が、酸化チタン、酸化亜鉛、酸化スズ、酸化ニオブ、チタン酸ストロンチウム、酸化インジウム、インジウム-スズ複合酸化物（ＩＴＯ）、フッ素がドープされた酸化スズ（ＦＴＯ）からなる群から選択される少なくとも一種である、請求項１～３

のいずれか一項に記載の電極ユニット。
【請求項５】
増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられるセンサセルであって、
請求項１～４のいずれか一項に記載の電極ユニットと、
前記電極ユニットと対向して設けられる対向部材と、
前記電極ユニットおよび前記対向部材の間に挟持されることにより流路を構成する開口部を有するスペーサと、
前記電極ユニット、前記対向部材、および前記スペーサの少なくともいずれか一つに形成される、前記流路に連通する供給口と、
前記電極ユニット、前記対向部材、および前記スペーサの少なくともいずれか一つの、前記供給口と異なる位置に形成される、前記流路に連通する排出口と
を備えてなり、前記電子受容層および前記対電極が前記流路に露出してなる、センサセル。
【請求項６】
前記電極ユニット上に前記スペーサが配置され、かつ該スペーサ上に前記対向部材が配置されてなる、請求項５に記載のセンサセル。
【請求項７】
前記対向部材が、前記電極ユニットおよびスペーサを互いに密着させるように下方に押さえる押さえ部材である、請求項６に記載のセンサセル。
【請求項８】
前記対向部材が透明である、請求項６または７に記載のセンサセル。
【請求項９】
前記対向部材上に前記スペーサが配置され、かつ該スペーサ上に前記電極ユニットが配置されてなる、請求項５に記載のセンサセル。
【請求項１０】
その最上部に、前記作用電極、前記対向部材、および前記スペーサを互いに密着させるように下方に押さえる押さえ部材をさらに備えた、請求項５、６、８、および９のいずれか一項に記載のセンサセル。
【請求項１１】
前記押さえ部材が、光励起のための光を通すための開口部または透光部をさらに備えてなる、請求項７～１０のいずれか一項に記載のセンサセル。
【請求項１２】
増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出方法であって、
請求項５～１１のいずれか一項に記載のセンサセルと、
被検物質を含む試料液を用意し、
該被検物質と直接または間接的に特異的に結合可能なプローブ物質を、前記センサセルの電極ユニットが備える作用電極の表面に固定させ、
増感色素の共存下、前記試料液を前記作用電極に接触させて、前記プローブ物質に前記被検物質を直接または間接的に特異的に結合させ、該結合により前記増感色素を前記作用電極に固定させ、
前記作用電極と、前記センサセルの電極ユニットにおける対電極とを電解液に接触させ、そして、
前記作用電極に光を照射して前記増感色素を光励起させ、該光励起された増感色素から前記作用電極への電子移動に起因して前記作用電極と前記対電極との間に流れる光電流を検出すること
を含んでなることを特徴とする、被検物質の特異的検出方法。

【請求項１３】
増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられる測定

装置であって、
請求項５～１１のいずれか一項に記載されるセンサセルと、
前記作用電極と前記対電極との間を流れる電流を測定する電流計と
前記流路内への液の供給および停止を制御する送液手段と
を備えた、測定装置。
【発明の詳細な説明】
【発明の背景】
【０００１】
発明の分野
本発明は、光電流を用いて、核酸、外因性内分泌攪乱物質、抗原等の特異的結合性を有する被検物質を特異的に検出する方法に用いられる電極ユニット、ならびにそれを用いたセンサセルおよび測定装置に関する。
【０００２】
背景技術
生体試料中のＤＮＡを解析する遺伝子診断法が、各種病気の新たな予防および診断法として、有望視されている。このようなＤＮＡ解析を簡便かつ正確に行う技術として、以下のものが提案されている。
【０００３】
被検体ＤＮＡを、これと相補的な塩基配列を有し、かつ蛍光物質を標識されたＤＮＡプローブとハイブリダイズさせ、その際の蛍光シグナルを検出する、ＤＮＡの分析方法が知られている（例えば、特許文献１（特開平７－１０７９９９号公報）および特許文献２（特開平１１－３１５０９５号公報）参照）。この方法にあっては、ハイブリダイゼーションによる二本鎖ＤＮＡの形成を色素の蛍光により検出する。
【０００４】
また、一本鎖に変性された遺伝子サンプルを、これに相補性を有する一本鎖の核酸プローブとハイブリダイゼーションさせた後、インターカレータ等の二本鎖認識体を添加して電気化学的に検出する方法が知られている（例えば、特許文献３（特許公報第２５７３４４３号）および非特許文献１（表面科学Vol. 24, No. 11. Pp. 671-676, 2003）参照）。この方法に使用されるセルは、セル容器に試料溶液を注入した後に電極を浸漬させる等のセンサセルの構築が行われるため、構築されたセンサセル内を電解液が流れる、いわゆるフローセル構造を有するものではない。
【０００５】
ところで、増感色素を用いて光から電気エネルギーを発生させる太陽電池が知られている（例えば、特許文献４（特開平１－２２０３８０号公報）参照）。この太陽電池は、多結晶の金属酸化物半導体を有し、かつその表面積に広範囲にわたり増感色素の層が形成されてなるものである。しかしながら、このような電極を生物化学的な分析に応用しようとする試みは未だなされていない。
【特許文献１】特開平７－１０７９９９号公報
【特許文献２】特開平１１－３１５０９５号公報
【特許文献３】特許公報第２５７３４４３号
【特許文献４】特開平１－２２０３８０号公報
【非特許文献１】表面科学Vol. 24, No. 11. Pp. 671-676, 2003
【発明の概要】
【０００６】
本発明者らは、被検物質とプローブ物質との直接または間接的な特異的結合を介して作用電極に増感色素を固定させ、この増感色素を光励起させて発生する光電流を検出することにより、被検物質を高感度で簡便かつ正確に検出および定量出来るとの知見を得ている。そして、本発明者らは、今般、増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられる電極材料として、作用電極と対電極とを同一面上に併せ持つ電極ユニットを用いることにより、センサセルの設計および材料選択の自由度が格段に広が

り、センサセルの生産性、性能、および使い易さを大幅に改善できるとの知見を得た。

【０００７】

したがって、本発明は、増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられる、センサセルの設計および材料選択の自由度が格段に広がり、センサセルの生産性、性能、および使い易さを大幅に改善できる電極ユニット、ならびにそれを用いたセンサセルおよび測定装置を提供することをその目的としている。

【０００８】

そして、本発明による、増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられる電極ユニットは、

絶縁基板と、

前記絶縁基板上に局所的に設けられる、前記増感色素が光励起に応じて放出する電子を受容可能な電子受容物質を含んでなる電子受容層を備えた作用電極と、

前記絶縁基板の前記作用電極と同一面上に、前記作用電極と離間して設けられる対電極とを備えたものである。

【０００９】

また、本発明による、増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられるセンサセルは、

上記電極ユニットと、

前記電極ユニットと対向して設けられる対向部材と、

前記電極ユニットおよび前記対向部材の間に挟持されることにより流路を構成する開口部を有するスペーサと、

前記電極ユニット、前記対向部材、および前記スペーサの少なくともいずれか一つに形成される、前記流路に連通する供給口と、

前記電極ユニット、前記対向部材、および前記スペーサの少なくともいずれか一つの、前記供給口と異なる位置に形成される、前記流路に連通する排出口と

を備えてなり、前記電子受容層および前記対電極が前記流路に露出してなるものである。

【００１０】

また、本発明による、増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられる測定装置は、

上記センサセルと、

前記作用電極と前記対電極との間を流れる電流を測定する電流計と

前記流路内への液の供給および停止を制御する送液手段と

を備えたものである。

【発明の具体的説明】

【００１１】

電極ユニット

本発明による電極ユニットは、増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられるものである。図１に本発明の電極ユニットの一例を示す。図１に示されるように、本発明の電極ユニット１は、絶縁基板２と、作用電極３と、対電極４とを備えてなる。本発明に用いる絶縁基板２は、作用電極２と対電極３とを短絡させないように絶縁性を有する基板である。作用電極３は、絶縁基板２上に局所的に設けられ、増感色素が光励起に応じて放出する電子を受容可能な電子受容物質を含んでなる電子受容層を備えてなる。対電極４は、絶縁基板２の作用電極３と同一面上に、作用電極３と離間して設けられる。そして、作用電極２および対電極４の各々から延出するようにリード線２’，４’がそれぞれ設けられる。

【００１２】

このように、本発明による電極ユニットは、同一平面上に作用電極と対電極とを備えた一体型の電極部材であり、これを用いることにより、センサセルの設計および材料選択の自由度が格段に広がり、センサセルの生産性、性能、使い易さを大幅に改善できる。すなわち、作用電極および対電極の二枚の電極を対向させる一般的な電極配置を光電流を用い

た被検物質の特異的検出に採用しようとする場合、二枚の電極の存在のため光源の配置が容易ではなく、例えば作用電極の基材を透明な材料で構成してその裏面から光を照射するなどの対策をせざるを得ず、センサセルの設計および材料選択にかなりの制約がある。これに対して、本発明による電極ユニットは一体型の電極部材であり二枚の電極を対向させる必要が無いため、光源を電極ユニットの表面に対向させる構成を容易に採ることができる。その結果、作用電極を透明な材料に限らずセラミックスやプラスチック等の不透明な材料で構成することが可能となるので、電極材料の選択の自由度も広がる。また、光源からの作用電極表面の直接照射により、電極裏面から照射した際に起こる透明電極材料の透過度に起因する光の損失を無くすこともできるので、より精度の高い測定も期待できる。さらには、本発明による電極ユニットは一体型の電極部材であるため、作用電極、対電極、およびリード線を一工程の導通パターニングで形成することが可能となるため、電極の生産性が向上する。また、電極ユニットに対向させる材料は導電性を有する必要がないため、透明プラスチック、ガラスなどの汎用される材料を用いる事ができ、セルの生産性も向上する。

【００１３】

本発明の好ましい態様によれば、図１に示されるように、作用電極３および対電極４が、互いに分離された複数の領域毎に区分されたスポット状に形成されてなるのが好ましい。特に作用電極を複数設けることにより、複数のサンプルについての同時測定が可能となる。この態様にあっては、複数の作用電極３の各々からリード線３’が個別に設けられるのがスポット毎の個別検出ができる点で好ましい。

【００１４】

本発明に用いる絶縁基板は、作用電極と対電極とを短絡させないようにするための、絶縁性を有する基板であり、絶縁基板の例としては、ガラス、セラミックス、プラスチック等を挙げることができる。なお、本発明に用いる絶縁基板は、透明、不透明のいずれであってもよい。これは、本発明による電極ユニットを用いてセルを構築する場合、光源を直接電極ユニット表面に対向させて配置することができるため、絶縁基板が不透明であっても作用電極への光照射は可能であるためである。

【００１５】

本発明に用いる作用電極は、被検物質と直接または間接的に特異的に結合可能なプローブ物質を表面に備えることにより、プローブ物質を介して固定された増感色素が光励起に応じて放出する電子を受容可能な電極である。したがって、作用電極の構成および材料は、使用される増感色素との間で上記電子移動が生じるものであれば限定されず、種々の構成および材料であってよい。

【００１６】

本発明の好ましい態様によれば、作用電極が増感色素が光励起に応じて放出する電子を受容可能な電子受容物質を含んでなる電子受容層を有し、この電子受容層の表面にプローブ物質が備えられてなるのが好ましい。また、本発明のより好ましい態様によれば、作用電極が導電材層をさらに含んでなり、この導電材層上に電子受容層が形成されてなるのが好ましい。

【００１７】

本発明における電子受容層は、プローブ物質を介して固定された増感色素が光励起に応じて放出する電子を受容可能な電子受容物質を含んでなる。すなわち、電子受容物質は、光励起された標識色素からの電子注入が可能なエネルギー準位を取り得る物質であることができる。ここで、光励起された標識色素からの電子注入が可能なエネルギー準位（Ａ）とは、例えば、電子受容性材料として半導体を用いる場合には、伝導帯（コンダクションバンド：CB）を意味し、電子受容性材料として金属を用いる場合には、フェルミ準位を意味し、電子受容性材料として有機物もしくはＣ６０等の分子状無機物を用いる場合には、最低非占有分子軌道（Lowest Unoccupied Molecular Orbital:LUMO）を意味する。すなわち、本発明に用いる電子受容物質は、このＡの準位が、増感色素のLUMOのエネルギー準位よりも卑な準位、換言すれば、増感色素のＬＵＭＯのエネルギー準位よりも低いエネルギ

ー準位を有するものであればよい。

【００１８】

電子受容物質の好ましい例としては、シリコン、ゲルマニウムなどの単体半導体；チタン、スズ、亜鉛、鉄、タングステン、ジルコニウム、ハフニウム、ストロンチウム、インジウム、セリウム、イットリウム、ランタン、バナジウム、ニオブ、タンタル等の酸化物半導体；チタン酸ストロンチウム、チタン酸カルシウム、チタン酸ナトリウム、チタン酸バリウム、ニオブ酸カリウム等のペロブスカイト型半導体；カドミウム、亜鉛、鉛、銀、アンチモン、ビスマスの硫化物半導体；カドミウム、鉛のセレン化物半導体；カドミウムのテルル化物半導体；亜鉛、ガリウム、インジウム、カドミウム等のリン化物半導体；ガリウムヒ素、銅－インジウム－セレン化物、銅－インジウム－硫化物の化合物半導体；金、白金、銀、銅、アルミニウム、ロジウム、インジウム、ニッケル等の金属；ポリチオフェン、ポリアニリン、ポリアセチレン、ポリピロール等の有機物ポリマー；Ｃ６０、Ｃ７０等の分子状無機物が挙げられ、より好ましくは、シリコン、TiO_2、SnO_2、Fe_2O_3、WO_3、ZnO、Nb_2O_5、チタン酸ストロンチウム、酸化インジウム、CdS、ZnS、PbS、Bi_2S_3、CdSe、CdTe、GaP、InP、GaAs、$CuInS_2$、CuInSe、Ｃ６０であり、さらに好ましくは、TiO_2、ZnO、SnO_2、Fe_2O_3、WO_3、Nb_2O_5、チタン酸ストロンチウム、CdS、PbS、CdSe、InP、GaAs、$CuInS_2$、$CuInSe_2$であり、最も好ましくはTiO_2である。なお、上記の列挙した半導体は、真性半導体および不純物半導体のいずれであってもよい。

【００１９】

本発明の好ましい態様によれば、電子受容物質は半導体であるのが好ましく、より好ましくは酸化物半導体であり、さらに好ましくは金属酸化物半導体であり、最も好ましくはｎ型金属酸化物半導体である。この態様によれば、半導体のバンドギャップの利用により、色素から効率良く電子を取り出すことができる。また、多孔体あるいは表面の凹凸形状といった構造を有する半導体の使用により、表面積の大きい作用電極を作製することができ、プローブ固定化量を増加させることができる。

【００２０】

本発明の好ましい態様によれば、半導体の伝導帯の電位は、増感色素のＬＵＭＯの電位よりも低いことが好ましく、より好ましくは、増感色素のＬＵＭＯ＞半導体の伝導帯＞電解質の酸化還元電位＞増感色素のＨＯＭＯの関係を満たす電位である。このような関係にあることで、効率良く電子を取出すことが可能となる。

【００２１】

本発明の好ましい態様によれば、電子受容層が半導体からなる場合、層表面をカチオン化処理しても良い。カチオン化により、プローブ物質（ＤＮＡ，タンパク質など）を高い効率で電子受容層に吸着させることが可能となる。カチオン化は、例えばアミノシランなどのシランカップリング剤、カチオンポリマー、４級アンモニウム化合物、などを電子受容層表面に作用させることにより行うことができる。

【００２２】

また、本発明の別の好ましい態様によれば、電子受容物質として、インジウム-スズ複合酸化物（ＩＴＯ）またはフッ素がドープされた酸化スズ（ＦＴＯ）を用いることができる。ＩＴＯおよびＦＴＯは電子受容層のみならず導電材層としても機能する性質を有するため、これらの材料を使用することにより導電材層を用いることなく電子受容層のみで作用電極として機能させることができる。

【００２３】

電子受容物質として半導体または金属を用いる場合、その半導体または金属は単結晶および多結晶のいずれであってもよいが、多結晶体が好ましく、さらに緻密なものよりも多孔性を有するものが好ましい。これにより、比表面積が大きくなり、被検物質および増感色素を多く吸着させて、より高い感度で被検物質を検出することができる。したがって、本発明の好ましい態様によれば、電子受容層が多孔性を有しており、各孔の径が３～１０００ｎｍであるのが好ましく、より好ましくは、１０～１００ｎｍである。

【００２４】

本発明の好ましい態様によれば、電子受容層を導電材層上に形成した状態での表面積は、投影面積に対して１０倍以上であることが好ましく、さらに１００倍以上であることが好ましい。この表面積の上限には特に限定されないが、通常１０００倍程度であろう。電子受容層を構成する電子受容物質の微粒子の粒径は、投影面積を円に換算したときの直径を用いた平均粒径で一次粒子として５～２００ｎｍであることが好ましく、より好ましくは８～１００ｎｍであり、さらに好ましくは２０～６０ｎｍである。また、分散物中の電子受容性物質の微粒子（二次粒子）の平均粒径としては０．０１～１００μｍであることが好ましい。また、入射光を散乱させて光捕獲率を向上させる目的で、粒子サイズの大きな、例えば３００nm程度の電子受容物質の微粒子を併用して、電子受容層を形成してもよい。

【００２５】

本発明の好ましい態様によれば、作用電極が導電材層をさらに含んでなり、電子受容層が導電材層上に形成されてなるのが好ましい。導電材層を構成する導電材の例としては、白金、金、銀、銅、アルミニウム、ロジウム、インジウム等の金属；炭素、炭化物、窒化物等の導電性セラミックス；およびインジウム－スズ複合酸化物、酸化スズにフッ素をドープしたもの、酸化スズにアンチモンをドープしたもの、酸化亜鉛にガリウムをドープしたもの、または酸化亜鉛にアルミニウムをドープしたもの等の導電性の金属酸化物が挙げられ、より好ましくは、インジウム-スズ複合酸化物（ＩＴＯ）、酸化スズにフッ素をドープした金属酸化物（ＦＴＯ）である。ただし、前述した通り、電子受容層自体が導電材層としても機能する場合にあっては導電材層は省略可能である。

【００２６】

本発明の好ましい態様によれば、導電材層が実質的に透明、具体的には、光の透過率が１０％以上であるのが好ましく、より好ましくは５０％以上であり、さらに好ましくは７０％以上である。また、本発明の好ましい態様によれば、導電材層の厚みは、０．０２～１０μｍ程度であるのが好ましい。さらに、本発明の好ましい態様によれば、導電材層の表面抵抗が１００Ω／ｃｍ^{2}以下であり、さらに好ましくは４０Ω／ｃｍ^{2}以下であるのが好ましい。導電材層の表面抵抗の下限は特に限定されないが、通常０．１Ω／ｃｍ^{2}程度であろう。

【００２７】

電子受容層の好ましい形成方法の例としては、電子受容物質の分散液またはコロイド溶液を塗布する方法、半導体微粒子の前駆体を塗布し空気中の水分によって加水分解して微粒子膜を得る方法（ゾルーゲル法）、スパッタリング法、CVD法、PVD法、蒸着法などが挙げられる。電子受容物質としての半導体微粒子の分散液を作成する方法としては、前述のゾルーゲル法の他、乳鉢ですり潰す方法、ミルを使って粉砕しながら分散する方法、あるいは半導体を合成する際に溶媒中で微粒子として析出させそのまま使用する方法等が挙げられる。このときの分散媒としては水または各種の有機溶媒（例えばメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、ジクロロメタン、アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル等）が挙げられる。分散の際、必要に応じてポリマー、界面活性剤、酸、もしくはキレート剤などを分散助剤として使用してもよい。

【００２８】

電子受容物質の分散液またはコロイド溶液の塗布方法の好ましい例としては、アプリケーション系としてローラ法、ディップ法、メータリング系としてエアーナイフ法、ブレード法等、またアプリケーションとメータリングを同一部分でできるものとして、特公昭５８－４５８９号公報に開示されているワイヤーバー法、米国特許２６８１２９４号、同２７６１４１９号、同２７６１７９１号等に記載のスライドホッパ法、エクストルージョン法、カーテン法、スピン法、スプレー法が挙げられる。

【００２９】

本発明の好ましい態様によれば、電子受容層が半導体微粒子からなる場合、電子受容層の膜厚が０．１～２００μｍであるのが好ましく、より好ましくは０．１～１００μｍであり、さらに好ましくは１～３０μｍ、最も好ましくは２～２５μｍである。これにより

、単位投影面積当たりのプローブ物質および固定される増感色素量を増加して光電流量を多くするとともに、電荷再結合による生成した電子の損失をも低減することができる。また、１m^2当たりの半導体微粒子の塗布量は０．５～４００gであるのが好ましく、より好ましくは５～１００gである。

【００３０】

本発明の好ましい態様によれば、電子受容物質がインジウム-スズ複合酸化物（ＩＴＯ）または酸化スズにフッ素をドープした金属酸化物（ＦＴＯ）を含んでなる場合、電子受容層の膜厚が１ｎｍ以上であるのが好ましく、より好ましくは１０ｎｍ～１μｍである。

【００３１】

本発明の好ましい態様によれば、半導体微粒子を塗布した後に加熱処理を施すのが好ましい。これにより、粒子同士を電気的に接触させ、また、塗膜強度の向上や支持体との密着性を向上させることができる。好ましい加熱処理温度は、４０～７００℃であり、より好ましくは１００～６００℃である。また、好ましい加熱処理時間は１０分～１０時間程度である。

【００３２】

また、本発明の別の好ましい態様によれば、ポリマーフィルムなど融点や軟化点の低い導電材層を用いる場合にあっては、熱による劣化を防止するため、高温処理を用いない方法により膜形成を行うのが好ましく、そのような膜形成方法の例として、プレス、低温加熱、電子線照射、マイクロ波照射、電気泳動、スパッタリング、ＣＶＤ、ＰＶＤ、蒸着等の方法が挙げられる。

【００３３】

本発明の好ましい態様によれば、作用電極が導電材層を有しない場合にはリード線は電子受容性層と同じ材料で構成されるのが好ましく、作用電極が導電材層を有する場合にはリード線は導電材層と同じ材料で構成されるのが好ましい。この態様によれば、リード線を導電材層または電子受容性層と同じ材料で構成できるため、電極ユニットの製造時に電極およびリード線の導通パターンを一工程で形成することができ、電極の生産性が向上する。例えば、電子受容物質がインジウム-スズ複合酸化物（ＩＴＯ）または酸化スズにフッ素をドープした金属酸化物（ＦＴＯ）を含んでなる場合には、ＩＴＯまたはＦＴＯ膜が形成されたガラス基板を用意し、その表面をサンドブラスト等によりエッチングすることにより電極およびリード線の部分を残すように一工程で加工することにより、極めて高い生産性で導通パターンを形成することができる。

【００３４】

こうして得られた作用電極の電子受容層の表面にはプローブ物質が担持される。作用電極へのプローブ物質の担持は公知の方法に従い行うことができる。本発明の好ましい態様によれば、プローブ物質として一本鎖の核酸を用いる場合には、作用電極表面に酸化層を形成させておき、この酸化層を介して核酸プローブと作用電極とを結合させることにより行うことができる。このとき、核酸プローブの作用電極への固定化は、核酸の末端に官能基を導入することにより行うことができる。これにより、官能基が導入された核酸プローブはそのまま固定化反応により担体上に固定化されることができる。核酸末端への官能基の導入は、酵素反応もしくはＤＮＡ合成機を用いて行なうことができる。酵素反応において用いられる酵素としては、例えば、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ、ポリＡポリメラーゼ、ポリヌクレオチドカイネース、ＤＮＡポリメラーゼ、ポリヌクレオチドアデニルトランスフェラーゼ、ＲＮＡリガーゼを挙げることができる。また、ポリメラーゼチェインリアクション（ＰＣＲ法）、ニックトランスレーション、ランダムプライマー法により官能基を導入することもできる。官能基は、核酸のどの部分に導入されてもよく、3'末端、5'末端もしくはランダムな位置に導入することができる。

【００３５】

本発明の好ましい態様によれば、核酸プローブの作用電極への固定化のため官能基として、アミン、カルボン酸、スルホン酸、チオール、水酸基、リン酸等が好適に使用できる。また、本発明の好ましい態様によれば、拡散プローブを作用電極に強固に固定化するた

めには、作用電極と拡散プローブの間を架橋する材料を使用することも可能である。そのような架橋材料の好ましい例としては、シランカップリング剤、チタネートカップリング剤や、ポリチオフェン、ポリアセチレン、ポリピロール、ポリアニリン等の導電性ポリマーが挙げられる。

【００３６】

本発明の好ましい態様によれば、核酸プローブの固定化を物理吸着という、より簡単な操作で効率よく行うことも可能である。電極表面への核酸プローブの物理吸着は、例えば、以下のように行なうことができる。まず、電極表面を、超音波洗浄器を用いて蒸留水およびアルコールで洗浄する。その後、電極を核酸プローブを含有する緩衝液に挿入して核酸プローブを担体表面に吸着させる。

【００３７】

また、核酸プローブの吸着後、ブロッキング剤を添加することにより、非特異的な吸着を抑制することができる。使用可能なブロッキング剤としては、核酸プローブが吸着していない電子受容層表面のサイトを埋めることができ、かつ電子受容物質に対して化学吸着あるいは物理吸着等により吸着可能な物質であれば限定されないが、好ましくは化学結合を介して吸着可能な官能基を有する物質である。例えば、酸化チタンを電子受容層として用いる場合における好ましいブロッキング剤の例としては、カルボン酸基、リン酸基、スルホン酸基、水酸基、アミノ基、ピリジル基、アミド等の酸化チタンに吸着可能な官能基を有する物質が挙げられる。

【００３８】

本発明の好ましい態様によれば、作用電極が互いに分離された複数の領域毎に区分されたスポット状に形成されてなるか、あるいは一つの作用電極上にプローブ物質が互いに分離された複数の領域毎に区分されて担持されてなり、光源による光照射が各領域に対して個別に行われるのが好ましい。これにより、複数の試料を一枚の作用電極上で測定することができるので、ＤＮＡチップの集積化等が可能となる。本発明のより好ましい態様によれば、作用電極上にプローブ物質が担持された、互いに分離された複数の領域がパターニングされており、光源から照射される光でスキャニングしながら、各領域の試料について被検物質の検出または定量を一度の操作で連続的に行うことが好ましい。

【００３９】

本発明のより好ましい態様によれば、互いに分離された複数の領域毎に区分されたスポット状の各作用電極毎に、あるいは一つの作用電極上の互いに分離された複数の領域の各領域に複数種類のプローブ物質を担持させることができる。これにより、領域の個数に、各領域毎のプローブ物質の種類数を乗じた数の、多数のサンプルの測定を同時に行うことができる。

【００４０】

本発明のより好ましい態様によれば、互いに分離された複数の領域毎に区分されたスポット状の各作用電極毎に、あるいは一つの作用電極上の互いに分離された複数の領域の各領域毎に異なるプローブ物質を担持させることができる。これにより、区分された領域の数に相当する種類数のプローブ物質を担持させることができるので、多種類の被検物質の測定を同時に行うことができる。この態様は、各領域毎に異なる被検物質の分析が可能なため、一塩基多型の解析（ＳＮＰｓ）の多項目解析に好ましく利用することができる。

【００４１】

本発明に用いる対電極は、電解液に接触させた場合に作用電極との間に電流が流れることができるものであれば特に限定されず、金属もしくは導電性の酸化物の層であることができる。本発明の好ましい態様によれば、対電極としての金属薄膜を５μｍ以下、好ましくは３ｎｍ～３μｍの範囲の膜厚になるように、蒸着やスパッタリングなどの方法により形成して作成することもできる。対電極に使用可能な材料の好ましい例としては、白金、金、パラジウム、ニッケル、カーボン、ポリチオフェン等の導電性ポリマー、酸化物、炭化物、窒化物等の導電性セラミックス等が挙げられ、より好ましくは、白金、カーボンであり、最も好ましくは白金である。これらの材料は電子受容層の形成方法と同様の方法に

より薄膜形成が可能である。

【００４２】

センサセル

本発明によるセンサセルは、増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられるものである。図２および３に本発明のセンサセルの一例を示す。図２および３に示されるように、本発明のセンサセル１０は、電極ユニット１と、対向部材１１と、スペーサ１２を備えてなる。本発明においてスペーサ１２とは、電極ユニット１および対向部材１１の間に挟持されることにより流路を構成する開口部１２ａを有する部材である。すなわち、本発明において対向部材とは、電極ユニットと対向して設けられ、スペーサと共に流路の底面または上面を構成する部材である。ここで、流路とは、電解液等の液を流し、かつ収容するための空間である。本発明による電極ユニットは、電子受容層を備えた作用電極と対電極とを同一面上に備えたものであり、作用電極の電子受容層と対電極とが流路に露出するように配置される。そして、作用電極および対向部材は互いに対向して、なおかつ、スペーサとの組み合わせにより流路を形成するように設けられる。すなわち、図２に示されるように、流路１２ａは、スペーサ１２、電極ユニット１、および対向部材１１としての押さえ部材によって区画されてなる。上記構成によれば、作用電極の電子受容層および対電極が互いに流路内に露出するので、流路内が電解液で満たされることによりこの組立物は光電流測定用のセンサセルとして機能することができる。しかも、このセンサセルは容易に解体および再組立可能であるので、試料の交換等の作業を極めて簡便に行うことができる。

【００４３】

そして、電極ユニット、対向部材、およびスペーサの少なくともいずれか一つには、流路に連通する供給口および排出口とがそれぞれ形成されることにより、流路内に電解液等の各種処理液を流すことができるようにされてなる。これは、流路に連通する供給口および排出口はセンサセルの上面、側面、および底面のいずれに設けられてもよいことを意味する。例えば、図２に示されるように、電解液等の液が対向部材１１の供給口１１ａからセンサセル内に供給され、流路１２ａを流れた後、排出口１１ｂから排出されることができる。したがって、本発明のセンサセルによれば、センサセルを構築した後に、電気化学的測定のための電解液を流路に流し込むことができる。これにより、セル容器に電解液を注入した後に電極等の配置が行なわれる従来型のセンサセルにおいて起こりがちな、セル構築時における電解液の漏れを効果的に防止することが出来る。特に上記従来型のセンサセルにあっては、所定量の電解液を充填させたセル容器に電極を浸漬し、あるいは電極で電解液を挟持させなければならないため、電解液がこぼれたり、漏れたりする可能性がある。このような電解液の損失があると、測定毎にセンサセル内の電解液の量にばらつきが生じてしまい、測定精度を低下しかねない。これに対し、本発明のセンサセルによれば、セル内に電解液を隙間無く充填させ、かつ、セル内に充填された電解液の漏れを効果的に防止出来るので、セル内の電解液量を高い精度で一定に保つことができる。その結果、測定精度を向上させることが出来るものと考えられる。

【００４４】

さらに、本発明のセンサセルによれば、流路には電解液のみならず、センサセルに使用可能な各種処理液を流すことができる。例えば、被検物質を含む試料液、または試薬を含む試薬溶液を流路に流すことができる。また、測定後には洗浄液を流路に流すことができる。したがって、本発明のセンサセルによれば、サンプルの交換に伴う電解液の交換、被検物質を含む試料液の供給、試薬溶液の供給、洗浄液にセル内（特に作用電極）よる洗浄等の各種処理を、処理液を系内に流すだけという極めて簡単な手法により行うことが出来る。すなわち、測定に使用する試料液あるいは試薬溶液の電極への送液を自動的に行うことができるので、溶液と電極の接触時間の制御を容易に行うことができ、各測定間のバラツキを低減して測定精度を向上できる。

本発明の好ましい態様によれば、センサセルはフローセルとするのが好ましい。フローセルの採用により、容積を小さくすればするほど液交換が容易になり、溶液間の不要な混

合を低減することができる。本発明のより好ましい態様によれば、異なる溶液に交換する際にはエアセグメントを入れて異なる溶液間の混合を防止するのが好ましい。このエアセグメントの導入は、空気を採り入れる分岐管を送液手段に設ける等、バルブ機構を適宜工夫することにより行うことができる。

【００４５】

本発明に用いる対向部材は、電極ユニットと対向して設けられる部材であり、電極ではないため導電性は必要とされない。したがって、対向部材としては、プラスチック、ガラスなどの、センサセルに一般的に使用される材料等が使用可能であるため、センサセルの生産性を向上できる。本発明の好ましい態様によれば、対向部材は透明であることができる。これにより、対向部材の内部ないし外側に光源を設けることにより、作用電極表面側から光照射を行うことができる。

【００４６】

本発明に用いるスペーサは、電極ユニットおよび対向部材の間に挟持されることにより流路を構成する開口部を有する部材であり、電極ユニットと対向部材との間隔を規定する。したがって、スペーサとして効果的に液漏れを防止出来る部材を使用するのが好ましく、例えばパッキンが挙げられる。パッキンを構成する好ましい材料としては、シリコーンゴムシート、フッ素ゴム、天然ゴム、スチレン・ブタジエンゴム、ブタジエンゴム、エチレン・プロピレンゴム、ブチルゴム、ニトリルゴム、クロロプレンゴム、クロロスルフォン化ポリエチレンゴム、ウレタンゴム、アクリルゴム、ヒドリンゴム、水素化ニトリルゴム、多硫化ゴム、およびポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）が挙げられる。なお、本発明のセンサセルにおいて、対向部材およびスペーサは互いに容易に取り外し可能なものであってよいが、対向部材およびスペーサは同じまたは異なる材料を用いて一体化されたものであってもよい。

【００４７】

本発明の好ましい態様によれば、図２および３に示されるように、電極ユニット１上にスペーサ１２が配置され、かつスペーサ１２上に対向部材１１が配置されてなるのが好ましい。この態様にあっては、図２および３に示されるように、電極ユニット１を裏面から支持する支持部材１３をさらに設けることにより電極ユニットの強度を補強するのが好ましい。

【００４８】

本発明の好ましい態様によれば、図２および３に示されるように、対向部材１１が、流路を構成するための流路に連通する供給口１１ａおよび排出口１１ｂを備えるのが好ましい。すなわち、スペーサ１２の開口部１２ａが電極ユニット１および対向部材１１で挟まれることにより形成される空間が流路となり、供給口１１ａおよび排出口１１ｂを介して電解液等の液を流路１２ａ内に効率的に供給しかつ排出させることができる。

【００４９】

本発明の好ましい態様によれば、対向部材は透明であることができる。これにより、対向部材の内部または外側に光源を設けて、作用電極の表面を光照射することができる。

【００５０】

本発明の好ましい態様によれば、対向部材１１を、電極ユニットおよびスペーサを互いに密着させるように下方に押さえる押さえ部材とするのが好ましい。この押さえ部材を用いることにより、セルの各構成部材を押さえつけて密着させることができるので、電解液等の液の漏れを効果的に防止することができる。また、押さえ部材を設けることによって、作用電極を容易に着脱できるので、操作性やメンテナンス性に優れた装置を提供できる。対向部材を押さえ部材として機能させるためには、対向部材に電極ユニットおよびスペーサを互いに密着させるように下方に押さえるのに十分な重量をそれ自体でまたは光源等の他の部品により対向部材に与えてもよいし、あるいは電極ユニットおよびスペーサを互いに密着させるように下方に押さえる固定手段を対向部材に設けてもよい。

【００５１】

本発明の好ましい態様によれば、押さえ部材が、光励起のための光を通すための開口部

または透光部をさらに備えてなるものであることができる。本発明の好ましい態様によれば、開口部または透光部を複数個設けて、複数スポットの被検物質をスポット毎に個別に光照射できるようにしてもよく、この場合、他のスポットへの光の漏洩を防ぐために、押さえ部材は開口部および透光部を除いて遮光性を有してもよい。

【００５２】

本発明の好ましい態様によれば、図２および３に示されるように、押さえ部材１１に光源１４をさらに備えるのが好ましい。本発明に用いる光源としては、標識色素を光励起できる波長の光を照射できるものであれば限定されず、好ましい例としては、蛍光灯、ブラックライト、殺菌ランプ、白熱電球、低圧水銀ランプ、高圧水銀ランプ、キセノンランプ、水銀－キセノンランプ、ハロゲンランプ、メタルハライドランプ、ＬＥＤ（白色、青、緑、赤）、レーザー光、太陽光を用いることができ、より好ましくは、蛍光灯、白熱電球、キセノンランプ、ハロゲンランプ、メタルハライドランプ、ＬＥＤ（白色、青、緑、赤）、太陽光等を挙げることができる。また、必要に応じて、分光器やバンドパスフィルターを用いて特定波長領域の光のみを照射してもよい。本発明に用いる光源としては、光源位置が固定されたもののみならず、光源位置が作用電極の面に対して平行に移動可能なものも包含される。

【００５３】

図２および３に示される光源１４は、電極ユニット１に対して平行方向に移動させるためのモータ等の駆動手段（図示せず）を備えた移動型光源であり、電極ユニット上のスポット状の作用電極上を順次移動しながら個別に光照射可能とされてなる。これにより、複数スポットの被検物質についての正確な個別的測定を自動的に効率良く行うことができる。また、別の好適態様として、光源を移動型とする代わりに、作用電極が光源に対して相対移動するように、電極ユニットを作用電極に対して平行方向に移動させるための駆動手段をセンサセル中にさらに設けてもよい。さらに別の好適態様としては、光源を移動型とする代わりに、押さえ部材が、複数個の開口部または透光部の各々に対して、光照射が必要な時にのみ開放されるように制御される複数の遮光シャッターをさらに設けてもよい。あるいは別の好適態様として、光源を移動型とする代わりに、複数個の開口部または透光部の各々に対して複数個の光源を個別に設けてもよい。上記いずれの好適態様であっても、図２および３に示される態様と同様に、複数スポットの被検物質についての正確な個別的測定を自動的に効率良く行うことができる。

【００５４】

本発明の好ましい態様によれば、図３に示されるように、押さえ部材１１が、供給口１１ａおよび排出口１１ｂに対応する位置に送液手段１６，１６をさらに備えてなることができる。

【００５５】

本発明の好ましい態様によれば、対向基材１１に、作用電極３から延出されるリード線３’および対電極４から延出されるリード線４’の各々と電気的に接続可能に露出または突出して設けられ、対向基材１１外に延出されるコンタクトプローブ１５をさらに備えてなることにより、電気的な接続を容易に確保出来るように構成されることができる。この態様によれば、センサセルを組み立てるだけで作用電極および対電極の各々に電気的接続を確保することができるので、電極ユニットを交換する際、作用電極および対電極をリード線に配線する作業が不要となるので、電極の交換を極めて簡便に行うことができる。本態様に用いるコンタクトプローブは電気的に接続可能なものであれば限定されず、市販のコンタクトプローブ、スプリングプローブを好ましく使用することができる。

【００５６】

電極ユニット上にスペーサが配置され、かつスペーサ上に対向部材が配置されるセンサセルの他の一例を図４および５に示す。図４および５に示されるセンサセル２０は、作用電極１上にスペーサ２２が配置される点で図１および２に示されるセンサセルと同様であるが、スペーサ２２上に配置される対向部材２１が透明な板材であり、押さえ部材２７はその対向部材２１の上に別個設けられる。また、流路に連通する供給口１ａ，２３ａおよ

び排出口１ｂ，２３ｂが、対向部材ではなく、電極ユニット２１および支持部材２３に形成される。したがって、センサセル下方の送液手段２６から供給口１ａ，２３ａおよび排出口１ｂ，２３ｂを介して送液が行われる。この態様によれば、対向部材が透光性を有するので、対向部材の外側に光源２４を設けることにより、作用電極表面側からの光照射が可能としながら、セル内の優れた密閉性を確保できる。

【００５７】

本発明の好ましい態様によれば、図４および５に示されるように、センサセル２０の最上部には、作用電極、対向部材、およびスペーサを互いに密着させるように下方に押さえる押さえ部材２７がさらに備けられるのが好ましい。この押さえ部材２７の構成は、図２および３に示される対向部材としての押さえ部材１１と基本的に同様であり、光源２４およびコンタクトプローブ２５も備えてなる。ただし、図示例ではセンサセル下方から送液を行うため供給口および排出口を有していない。この押さえ部材を用いることにより、セルの各構成部材を押さえつけて密着させることができるので、電解液等の液の漏れを効果的に防止することができる。

【００５８】

本発明の好ましい態様によれば、図４に示されるように、押さえ部材２７が、ねじ、バネ、および磁石からなる群から選択される少なくとも１種の固定手段２８をさらに備えてなり、固定手段を介して押さえ部材、電極ユニット、対向部材、スペーサ、および／または支持基材に着脱可能に固定されてなるのが好ましい。この結合手段を用いることにより、セルの各構成部材をより強力に密着させることができるので、電解液の漏れをより一層効果的に防止することができる。しかも、上記結合手段は容易に取り外し可能なものであるため、サンプル交換およびメンテナンスも容易に行うことができる。

【００５９】

本発明の好ましい態様によれば、押さえ部材は遮光性を有するものであってよく、遮光性を有する公知の材料を用いて作製することができる。例えば、押さえ部材を、開口部を複数個有し、かつ開口部を除いて遮光性を有する部材とすることにより、一つの開口部に光源により光を照射した際に、他の開口部への光の漏洩による照射対象以外の被検物質に起因する光電流の発生を有効に防止することができる。つまり、複数の開口部に対応する作用電極上の位置に電子受容層および／または被検物質をスポット状に複数形成しておくことにより、一つのスポットのみを、他のスポットに影響を及ぼすことなく個別かつ正確に光照射することができる。

【００６０】

本発明の別の好ましい態様によれば、対向部材上にスペーサが配置され、かつスペーサ上に電極ユニットが配置されてなることができる。この態様のセンサセルの一例を図６および７に示す。図６および７に示されるセンサセルは、作用電極１がスペーサ３２の上に配置される点で図２～５に示される態様と異なるが、流路３２ａがスペーサ３２、電極ユニット１、および対向部材３１によって区画される点では同様である。この態様にあっては、対向部材３３は電極ではないため、支持部材を要することなく、それ自体で十分に強度の確保が可能である。

【００６１】

図６および図７に示される態様にあっては、対向部材３１に、流路に連通する供給口３１ａおよび排出口３１ｂとがそれぞれ形成されることにより、流路３２ａ内に電解液等の各種処理液を流すことができるようにされてなる。すなわち、図７に示されるように、電解液等の液が送液手段３６を介して供給口３１ａからセンサセル内に供給され、流路３２ａを流れた後、排出口３１ｂから排出されることができる。また、センサセル３０の最上部には、作用電極、対向部材、およびスペーサを互いに密着させるように下方に押さえる押さえ部材３７がさらに備けられる。この押さえ部材３７の構成は、図２および３に示される対向部材としての押さえ部材１１と基本的に同様であり、移動型光源３４も備えてなるが、図示例ではセンサセル下方から送液を行うため、供給口および排出口を有しておらず、また、コンタクトプローブも有しない。また、対向部材３１は、作用電極３から延出

されるリード線３’および対電極４から延出されるリード線４’の各々と電気的に接続可能に露出または突出して設けられ、対向基材３１外に延出されるコンタクトプローブ３５をさらに備えてなることにより、電気的な接続を容易に確保出来るように構成されている。

【００６２】

対向部材上にスペーサが配置され、かつスペーサ上に電極ユニットが配置されるセンサセルの他の一例を図８および９に示す。図８および９に示されるセンサセルは、センサセル上方から送液を行う構成としたこと以外は、図６および７に示されるセンサセルと基本的に同様である。すなわち、図８および９に示される態様にあっては、電極ユニット１および押さえ部材４７に、流路に連通する供給口１ａ，４７ａおよび排出口１ｂ，４７ｂとがそれぞれ形成されることにより、流路内に電解液等の各種処理液を流すことができるようにされてなる。すなわち、図９に示されるように、電解液等の液が送液手段４６を介して供給口４７ａ，１ａからセンサセル内に供給され、流路４２ａを流れた後、排出口１ｂ，４７ｂから排出されることができる。

【００６３】

対向部材上にスペーサが配置され、かつスペーサ上に電極ユニットが配置されるセンサセルの他の一例を図１０および１１に示す。図１０および１１に示されるセンサセルは、対向部材５１上に、その側面に供給口５２ａおよび排出口５２ｂを形成可能な程度の十分な高さを有するスペーサ５２とコンタクトプローブ５５とが設けられた一体型のカートリッジとして構成されており、このカートリッジ上に電極ユニット１が配置され、その電極ユニット１上に押さえ部材５７が配置される。対向部材５１には、その下方に設けられる光源からの光を透過させるための透光部５８が設けられており、さらに透光部５８上には液漏れ防止パッキン５９が設けられている。この態様によれば、スペーサおよび対向部材が一体化されたカートリッジ単位で取り扱うことができるので、サンプル交換の際には、電極ユニットを取り替えるだけで次の測定を行うことができ、操作が簡便となる。

【００６４】

本発明の好ましい態様によれば、図１０および１１に示されるように、対向部材５１の透光部５８の直下には光源５４を設けることができる。すなわち、この態様にあっては、光源は、透光性を有するセンサセルの下方に配置される。このように光源を下方に配置することにより、光源およびそれを制御する機構の重量および大きさの制約が緩和されるので、光源の設計の自由度が高まる。したがって、この態様は、縦横方向に移動させる移動型光源等、複雑な制御を要する光源の使用に適する。

【００６５】

光電流を用いた被検物質の特異的検出

前述の通り、本発明の電極ユニットおよびセンサセルは増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出に用いられるものである。この増感色素の光励起により生じる光電流を用いた被検物質の特異的検出方法について、以下に具体的に説明する。

【００６６】

この方法にあっては、まず、被検物質を含む試料液と、本発明による作用電極および対電極を備えた電極ユニットを用意する。本発明に用いる作用電極は、被検物質と直接または間接的に特異的に結合可能なプローブ物質を表面に備えた電極である。すなわち、プローブ物質は、被検物質と直接、特異的に結合する物質のみならず、被検物質を受容体蛋白質分子等の媒介物質に特異的に結合させて得られる結合体と特異的に結合可能な物質であってよい。次いで、増感色素の共存下、試料液を作用電極に接触させて、プローブ物質に被検物質を直接または間接的に特異的に結合させ、この結合により増感色素を作用電極に固定させる。増感色素は、光励起に応じて作用電極に電子を放出可能な物質であり、被検物質あるいは媒介物質に予め標識させておくか、あるいは被検物質およびプローブ物質の結合体にインターカレーション可能な増感色素を用いる場合には試料液に単に添加すればよい。

【００６７】
そして、作用電極と対電極とをセンサセル内において電解液に接触させた後、作用電極に光を照射して増感色素を光励起させると、光励起された増感色素から電子受容物質へ電子移動が起こる。この電子移動に起因して作用電極と対電極との間に流れる光電流を検出することにより、被検物質を高い感度で検出することができる。また、この検出電流は試料液中の被検試料濃度との高い相関関係を有しているので、測定された電流量または電気量に基づき被検試料の定量測定を行うことができる。
【００６８】
被検物質およびプローブ物質
本発明における被検物質としては、特異的な結合性を有する物質であれば限定されず、種々の物質であってよい。このような被検物質であれば、被検物質と直接または間接的に特異的に結合可能なプローブ物質を作用電極表面に担持させておくことにより、被検物質をプローブ物質に直接または間接的に特異的に結合させて検出することが可能となる。
【００６９】
すなわち、本発明にあっては、被検物質およびプローブ物質として互いに特異的に結合可能なものを選択することができる。すなわち、本発明の好ましい態様によれば、特異的な結合性を有する物質を被検物質とし、被検物質と特異的に結合する物質をプローブ物質として作用電極に担持させるのが好ましい。これにより、作用電極上に被検物質を直接、特異的に結合させて検出することができる。この態様における、被検物質およびプローブ物質の組合せの好ましい例としては、一本鎖の核酸および核酸に対して相補性を有する一本鎖の核酸の組合せ、ならびに抗原および抗体の組合せが挙げられる。
【００７０】
本発明のより好ましい態様によれば、被検物質を一本鎖の核酸とし、プローブ物質を核酸に対して相補性を有する一本鎖の核酸とするのが好ましい。プローブ物質は核酸に対して１５ｂｐ以上の相補性部分を有するのがより好ましい。この態様における被検物質の作用電極への特異的結合の工程を図１２（ａ）および（ｂ）に示す。これらの図に示されるように、被検物質としての一本鎖の核酸１２１は、作用電極１２３上に担持されたプローブ物質としての相補性を有する一本鎖の核酸１２４とハイブリダイズされて、二本鎖の核酸１２７を形成する。
【００７１】
被検物質としての一本鎖の核酸を含む試料液は、末梢静脈血のような血液、白血球、血清、尿、糞便、精液、唾液、培養細胞、各種臓器細胞のような組織細胞等の、核酸を含有する各種検体試料から、公知の方法により核酸を抽出して作製することができる。このとき、検体試料中の細胞の破壊は、例えば、振とう、超音波等の物理的作用を外部から加えて担体を振動させることにより行なうことができる。また、核酸抽出溶液を用いて、細胞から核酸を遊離させることもできる。核酸溶出溶液の例としては、ＳＤＳ、Triton-X、Tween-20のような界面活性剤、サポニン、ＥＤＴＡ、プロテアーゼ等を含む溶液が挙げられる。これらの溶液を用いて核酸を溶出する場合、37℃以上の温度でインキュベートすることにより反応を促進することができる。
【００７２】
本発明のより好ましい態様によれば、被検物質とする遺伝子の含有量が微量である場合には、公知の方法により遺伝子を増幅した後検出を行なうのが好ましい。遺伝子を増幅する方法としては、ポリメラーゼチェインリアクション（ＰＣＲ）等の酵素を用いる方法が代表的であろう。ここで、遺伝子増幅法に用いられる酵素の例としては、ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔａｑポリメラーゼのような ＤＮＡ依存型ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼＩのようなＤＮＡ依存型ＲＮＡポリメラーゼ、Ｑβレプリカーゼのような ＲＮＡ依存型ＲＮＡポリメラーゼが挙げられ、好ましくは温度を調節するだけで連続して増幅を繰り返すことができる点で、Ｔａｑポリメラーゼを用いるＰＣＲ法である。
【００７３】
本発明の好ましい態様によれば、上記増幅時に特異的に核酸を増感色素で標識すること

が出来る。一般的には、ＤＮＡにアミノアリル修飾ｄUTPを取り込ませることにより行うことができる。この分子は未修飾の dUTP と同じ効率で取り込まれる。次のカップリング段階において、Ｎ－ヒドロキシサクシンイミド（N-hydroxysuccinimide）により活性化された蛍光色素が修飾 dUTP と特異的に反応し、均一に増感色素で標識された被検物質が得られる。

【００７４】

本発明の好ましい態様によれば、上記のようにして得られた核酸の粗抽出液あるいは精製した核酸溶液をまず90～98℃、好ましくは95℃以上の温度で熱変性を施し、一本鎖核酸を調製することができる。

【００７５】

本発明にあっては、被検物質とプローブ物質が間接的に特異的に結合するものであってもよい。すなわち、本発明の別の好ましい態様によれば、特異的な結合性を有する物質を被検物質とし、この被検物質と特異的に結合する物質を媒介物質として共存させ、この媒介物質と特異的に結合可能な物質をプローブ物質として作用電極に担持させるのが好ましい。これにより、プローブ物質に特異的に結合できない物質であっても、媒介物質を介して作用電極上に間接的に特異的に結合させて検出することができる。この態様における、被検物質、媒介物質、およびプローブ物質の組合せの好ましい例としては、リガンド、このリガンドを受容可能な受容体蛋白質分子、およびこの受容体蛋白質分子と特異的に結合可能な二本鎖の核酸の組合せが挙げられる。リガンドの好ましい例としては、外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）が挙げられる。外因性内分泌撹乱物質とは、受容体蛋白質分子を介してＤＮＡに結合し、その遺伝子発現に影響して毒性を生じる物質であるが、本発明の方法によれば、被検物質によりもたらされる受容体等のタンパク質のＤＮＡに対する結合性を簡便にモニタリングすることができる。この態様における被検物質の作用電極への特異的結合の工程を図１３に示す。図１３に示されるように、被検物質としてのリガンド１３０は、まず、媒介物質である受容体蛋白質分子１３１に特異的に結合する。そして、リガンドが結合された受容体蛋白質分子１３３が、プローブ物質としての二本鎖の核酸１３４に特異的に結合する。

【００７６】

本発明の好ましい態様によれば、被検物質は二種以上であることができる。本発明の方法によれば、複数の増感色素を用いて、各増感色素毎に異なる励起波長の光を照射することにより、複数種類の被検物質を個別に検出することが可能である。

【００７７】

増感色素

本発明にあっては、被検物質の存在を光電流で検出するために、増感色素の共存下、プローブ物質に被検物質を直接または間接的に特異的に結合させて、該結合により増感色素を作用電極に固定させる。そのために、本発明にあっては、図１２（ａ）および図１３に示されるように被検物質１２１あるいは媒介物質１３１に予め増感色素１２２，１３２で標識しておくことができる。また、図１２（ｂ）に示されるように被検物質およびプローブ物質の結合体１２７（例えばハイブリダイゼーション後の二本鎖核酸）にインターカレーション可能な増感色素１２８を用いる場合には、試料液に増感色素を添加することにより、プローブ物質に増感色素を固定させることができる。

【００７８】

本発明に用いる増感色素は、光励起に応じて作用電極に電子を放出可能な物質であり、光源の照射による光励起状態への遷移が可能であり、かつ励起状態から作用電極に電子注入できる電子状態を採りうるものであればよい。したがって、用いる増感色素は、作用電極、特に電子受容層との間において上記電子状態をとることができるものであればよいことから、多種の増感色素が使用可能であり、高価な色素を使用する必要がない。

【００７９】

増感色素の具体例としては、金属錯体や有機色素が挙げられる。金属錯体の好ましい例としては、銅フタロシアニン、チタニルフタロシアニン等の金属フタロシアニン；クロロ

フィルまたはその誘導体；ヘミン、特開平１－２２０３８０ 号公報や特表平５－５０４０２３ 号公報に記載のルテニウム、オスミウム、鉄及び亜鉛の錯体（例えばシス－ジシアネート－ビス（２、２ ’－ビピリジル－４、４ ’－ジカルボキシレート）ルテニウム（II））があげられる。有機色素の好ましい例としては、メタルフリーフタロシアニン、９－フェニルキサンテン系色素、シアニン系色素、メタロシアニン系色素、キサンテン系色素、トリフェニルメタン系色素、アクリジン系色素、オキサジン系色素、クマリン系色素、メロシアニン系色素、ロダシアニン系色素、ポリメチン系色素、インジゴ系色素等が挙げられる。

【００８０】

二本鎖核酸にインターカレーション可能な増感色素の好ましい例としては、アクリジンオレンジ、エチジウムブロマイドが挙げられる。このような増感色素を用いる場合、核酸のハイブリダイゼーション後に試料液に添加するだけで増感色素で標識された二本鎖核酸が形成されるので、予め一本鎖の核酸を標識する必要が無い。

【００８１】

測定方法および装置

本発明の電極ユニットまたはセンサセルを用いた測定方法にあっては、先ず、増感色素の共存下、試料液を作用電極に接触させて、プローブ物質に被検物質を直接または間接的に特異的に結合させ、この結合により増感色素を前記作用電極に固定させる。

【００８２】

本発明の好ましい態様によれば、増感色素で予め標識された一本鎖の核酸を被検物質とする場合、プローブ物質である一本鎖核酸との間でハイブリダイゼーション反応を行なうことができる。ハイブリダイゼーション反応の好ましい温度は３７～７２℃の範囲であるが、その最適温度は使用するプローブの塩基配列や長さ等により異なる。

【００８３】

本発明の別の好ましい態様によれば、被検物質およびプローブ物質の結合体（例えばハイブリダイゼーション後の二本鎖核酸）にインターカレーション可能な増感色素を用いる場合には、試料液に増感色素を添加することにより結合体を特異的に増感色素で標識することができる。

【００８４】

こうして被検物質が増感色素と共に固定された作用電極を、対電極と共に電解液に接触させ、作用電極に光を照射して増感色素を光励起させ、光励起された増感色素から作用電極への電子移動に起因して作用電極と対電極との間に流れる光電流を検出する。その際のセンサセルとして、本発明のセンサセルを使用する。

【００８５】

図２および３に示されるセンサセルを用いた測定方法の一例について説明する。先ず、被検物質が増感色素と共に固定された作用電極３および対電極４を備えた電極ユニット１、対向部材１１、およびスペーサ１２を用いて、図２に示されるセル構造となるように組み立てる。このとき、電極ユニット１は、作用電極３の電子受容層側が電解液に接触させるように配置される。こうして、スペーサ１２の開口部１２ａが電極ユニット１および対向部材１１で挟まれることにより形成される空間が流路となり、対向部材１１の供給口１１ａおよび排出口１１ｂを介して電解液等の液を流路１２ａ内に効率的に供給しかつ排出させることができる。すなわち、供給口１２ｂおよび排出口１２ｃには送液ポンプおよび逆止弁等の送液手段１６が設けられ、測定に先立ち、電解液が流路内に充填された後、送液を停止する。その結果、測定時には、流路内に一定量の電解液が確実に充填されていることになる。すなわち、本発明のセンサセルによれば、セル内に電解液を隙間無く充填させ、かつ、セル内に充填された電解液の漏れを効果的に防止出来るので、セル内の電解液量を高い精度で一定に保つことができ、測定精度を向上させることが出来る。

【００８６】

本発明において用いる電解液は、電解質、溶媒、および所望により添加物を含んでなるものであることができる。電解質の好ましい例としては、ヨウ化物単独、あるいはI_2と

ヨウ化物の組み合わせ（ヨウ化物としてはＬｉＩ、ＮａＩ、ＫＩ、ＣｓＩ、CaI_2などの金属ヨウ化物、あるいはテトラアルキルアンモニウムヨーダイド、ピリジニウムヨーダイド、イミダゾリウムヨーダイドなど４級アンモニウム化合物のヨウ素塩など）；臭化物単独、あるいはBr_2と臭化物の組み合わせ（臭化物としてはＬｉＢｒ、ＮａＢｒ、ＫＢｒ、ＣｓＢｒ、$CaBr_2$などの金属臭化物、あるいはテトラアルキルアンモニウムブロマイド、ピリジニウムブロマイドなど４級アンモニウム化合物の臭素塩など）；フェロシアン酸塩－フェリシアン酸塩やフェロセン－フェリシニウムイオンなどの金属錯体；ポリ硫化ナトリウム、アルキルチオール－アルキルジスルフィドなどのイオウ化合物；ビオロゲン色素；ヒドロキノン－キノン等が挙げられ、より好ましくは、I_2とＬｉＩやピリジニウムヨーダイド、イミダゾリウムヨーダイドなど４級アンモニウム化合物のヨウ素塩を組み合わせた電解質である。上述した電解質は混合して用いてもよい。また、電解質は、酸化還元電位が増感色素のＨＯＭＯよりも高いことが好ましい。

【００８７】

本発明の好ましい態様によれば、電解液の電解質濃度は０．１～１５Ｍであるのが好ましく、より好ましくは０．２～１０Ｍである。また、電解質にヨウ素を添加する場合における、好ましいヨウ素の添加濃度は０．０１～０．５Ｍである。

【００８８】

好ましい溶媒の例としては、水、アルコール（メタノール、エタノール等）、非プロトン性の極性溶媒（例えばアセトニトリルなどのニトリル類、炭酸プロピレンや炭酸エチレンなどのカーボネート類、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、スルホラン、１，３－ジメチルイミダゾリノンや３－メチルオキサゾリジノン、ジアルキルイミダゾリウム塩などの複素環化合物、等）が挙げられる。電子受容層に酸化物半導体を用いた系において、電解質にヨウ化物、溶媒に非プロトン性の極性溶媒を用いた場合、検知精度が高くなり、ＤＮＡの一塩基多型（ＳＮＰｓ）の解析を行なうことが可能となる。

【００８９】

図２に示されるように電極ユニット１の上方には光源１４が対向部材としての押さえ部材１１を介して配置される。本発明に用いる光源については、既に述べた通りである。

【００９０】

本発明の好ましい態様によれば、互いに異なる光波長で励起可能な二種以上の増感色素を用いて複数種類の被検物質を個別に検出する場合、光源から波長選択手段を介して特定波長の光を照射することにより、複数の色素を個別に励起することが可能である。波長選択手段の例としては、分光器、色ガラスフィルター、干渉フィルター、バンドパスフィルター等が挙げられる。また、増感色素の種類に応じて異なる波長の光を照射可能な複数の光源を用いてもよく、この場合の好ましい光源の例としては、特定波長の光が照射されるレーザー光やLEDを用いてもよい。また、作用極に光を効率よく照射するため、石英、ガラス、液体ライトガイドを用いて導光してもよい。

【００９１】

図１および２に示されるように、作用電極３および対電極４からそれぞれ延出されるリード線３ａおよび４ａにコンタクトプローブ４５が接続され、コンタクトプローブ１５が電流計に接続されることで、光照射により系内を流れる光電流が電流計により測定される。これにより、被検物質を検出することができる。その際の電流値は作用電極上にトラップされた増感色素の量を反映する。例えば、被検物質が核酸の場合、相補性のある核酸間で形成された二本鎖の量が、電流値となり反映される。したがって、得られた電流値から被検物質を定量することができる。したがって、本発明の好ましい態様によれば、電流計が、得られた電流量または電気量から試料液中の被検物質濃度を算出する手段をさらに備えてなるのが好ましい。

【００９２】

本発明の好ましい態様によれば、光電流を検出する工程が、電流値を測定し、得られた電流値または電気量から試料液中の被検物質濃度を算出することができる。この被検物質濃度の算出は、予め作成された被検物質濃度と電流値または電気量との検量線と、得られ

た電流値または電気量とを対比することにより行うことができる。本発明の方法にあっては、電流値は作用電極上にトラップされた増感色素の量が反映されるので、被検物質濃度に対応した正確な電流値が得られるため、定量測定に適する。

【００９３】

本発明の別の好ましい態様によれば、予め増感色素で標識された被検物質を競合物質として用いて、増感色素で標識されていない、プローブ物質に特異的に結合可能な第二の被検物質を定量することができる。第二の被検物質はプローブ物質に標識済被検物質よりも特異的に結合しやすい性質を有するのが好ましい。これら二種類の被検物質を競合させてプローブ物質に特異的に結合させると、検出される電流値と第二の被検物質の濃度との間に相関関係が得られる。つまり、色素標識されていない第二の被検物質の数が増加するにつれ、プローブ物質に特異的に結合する競合物質の数が減少するため、第二の被検物質濃度の増加につれて、検出電流値が減少する検量線を得ることができる。したがって、増感色素で標識されていない第二の被検物質の検出および定量が可能となる。

【００９４】

本発明のより好ましい態様によれば、被検物質および第二の被検物質が抗原であり、プローブ物質が抗体であるのが好ましい。この態様における被検物質および第二の被検物質のプローブ物質への固定化工程を図１４に示す。図１４に示されるように、増感色素で標識された抗原１４１と、色素標識されていない抗原１４２とが競合して抗体１４３に特異的に結合する。したがって、色素標識されていない抗原１４２が増加するにつれ、抗体に特異的に結合する色素標識された抗原１４３が減少するため、第二の被検物質濃度の増加につれて、検出電流値が減少する検量線を得ることができる。

【実施例】

【００９５】

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。なお、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【００９６】

例１：作用電極の作製

まず、以下の配合を有する原料を自動乳鉢を用いて充分に混合した後、１５０℃で６時間乾燥させて混合物を得た。

α－テルピネオール	６０重量％
２－（２－ブトキシエトキシ）エタノール	１５重量％
エチルセルロース	２５重量％

【００９７】

得られた混合物０．５ｇに粒状酸化チタン（日本エアロゾル社製Ｐ２５、平均粒径２０～２５ｎｍ）１ｇを添加して混合した後、先に得られた混合物０．５ｇをさらに添加して混合した。その後、α－テルピネオールを加えて再度混合して、ペーストを得た。これら一連の混合は自動乳鉢を用いて合計３時間行った。

【００９８】

フッ素ドープされたSnO_2膜が形成されたガラス基板（旭硝子製）の縁枠を幅約６３μｍのテープでマスキングし、上記ペーストをスキージ印刷した後、６０℃で２時間乾燥させた。得られたガラス基板を焼成炉内に入れ、約１７分間かけて５００℃まで炉内温度を上昇させ、この温度で３０分間保持した後、放冷した。炉内温度が１００℃に達した時点でガラス基板をエタノールに浸漬した。こうして、酸化チタンを含んでなる電子受容層が形成された作用電極を得た。

【００９９】

次いで、１０５－NH_2－ＡＡＣＧＴＣＧＴＧＡＣＴＧＧＧの塩基配列を有するNH_2修飾ＤＮＡをバッファ（３Ｘ　ＳＳＣ）に溶解して、２８６μＭのNH_2修飾ＤＮＡ溶液を調製した。この溶液を、予め９５℃で３分間保持した後、氷上で冷却させることにより、変性させておいた。

【０１００】

先に得られた作用電極の電子受容層上に、５ｍｍ×５ｍｍ角の大きさの開口部が形成された、厚さ７００μｍのシリコンシールを載置した。この開口部に２８６μＭのＮＨ$_2$修飾ＤＮＡ溶液３５μｌ注入した。このとき、ピペットチップの先端を用いて、シリコンシールの開口部の四隅まで充分にＤＮＡ溶液が行き渡るようにした。続いて、ＤＮＡ溶液中に気泡が極力入らないようにガラス板で真上から覆い、湿らせた紙等で蒸気圧が調整されたプラスチック容器に収容した。この容器中に６０℃で２時間保持して、ＮＨ$_2$修飾ＤＮＡをインキュベートした。その後、ＤＮＡ溶液を除去し、流水で軽く電極表面を洗浄した後、空気を吹き付けて残水を飛散させた。こうして、プローブ物質が担持された作用電極を得た。

【０１０１】

例２：ローダミン修飾ＤＮＡの検出

１０５－Ｒｈｏ－ＣＣＣＡＧＴＣＡＣＧＡＣＧＴＴの塩基配列を有するローダミン修飾ＤＮＡをバッファ（２Ｘ　ＳＳＣ、０．０３％　ＳＤＳ）に溶解して、２８．６μＭおよび２８６μＭの各濃度を有するローダミン修飾ＤＮＡ溶液を作製した。

例１で使用したものと同様のシリコンシールを作用電極表面に載置し、各濃度のローダミン修飾ＤＮＡ溶液を３５μｌずつ、開口部に注入した。溶液中に気泡が極力入らないようにガラス板で真上から覆い、湿らせた紙等で蒸気圧を調整したプラスチック容器に入れた。こうして、６０℃で一晩（１２時間）インキュベートさせて、ハイブリダイゼーションを行った。

【０１０２】

こうしてハイブリダイゼーションが施された作用電極を洗浄液に浸し、ゆっくりと揺らしながら洗浄した。洗浄液としては下記表に示されるものを使用し、各洗浄液について下記表に示される洗浄時間、洗浄回数、および温度で洗浄を行った。なお、洗浄液を変更する毎に洗浄容器を交換した。

表　１

洗浄液	１回当たりの洗浄時間	洗浄回数	温度
２Ｘ　ＳＳＣ、０．２％　ＳＤＳ	６分間	３回	室温
０．２Ｘ　ＳＳＣ、０．２％　ＳＤＳ	６分間	３回	室温
０．２Ｘ　ＳＳＣ、０．２％　ＳＤＳ	１３分間	１回	６０℃
０．２Ｘ　ＳＳＣ、０．２％　ＳＤＳ	６分間	２回	室温
０．２Ｘ　ＳＳＣ	６分間	１回	室温

注）２Ｘ　ＳＳＣ：０．３Ｍ塩化ナトリウムおよび０．０３Ｍクエン酸ナトリウム含有水溶液（ｐＨ７．０）

ＳＤＳ：硫酸ドデシルナトリウム

【０１０３】

さらに、作用電極をエタノールで軽く液中で上下させることにより、２回洗浄を行った。２回目の洗浄後は紙等で拭き取らずに、素早く空気を吹き付けて残水を飛散させた。

【０１０４】

こうして得られた作用電極と、対電極としての白金電極とを用いて、センサセルを以下のようにして組み立てた。

まず、白金電極として、ガラス基板上に白金薄膜をスパッタリングにより形成したものを用意した。白金電極の白金膜上に、厚さ５００μｍのシリコンシートを載置した。このシリコンシートは作用電極と対電極との接触による短絡を防ぐためのスペーサーである。このとき、白金電極の白金で被膜された端部にリード線を接続して、電流を取り出し可能に構成した。作用電極もリード線を介して電流計と接続した。

電解液として、体積比が８：２のエチレンカーボネートとアセトニトリルの混合溶媒にヨウ素０．０５Ｍとテトラプロピルアンモニウムヨーダイド０．５Ｍを溶解した混合液を用意した。この電解液を白金電極に５μＬ滴下した後、作用電極をその電子受容層が白金電極と対向するように、載置した。こうして、スペーサーおよび電解液を作用電極および

対電極とで挟持されてなる、サンドイッチ型のセンサセルを得た。

【０１０５】

作用電極のリード線と対電極のリード線とを電流計（ＡＬＳモデル８３２Ａ、ディアル電気化学アナライザー）に接続した。光源（林時計社製、ＬＡ－２５０ＸＥ）から液体ライトガイドを用いて導光し、紫外線カットフィルター（Y-43、旭テクノグラス）を介して作用電極表面の１．５ｃｍ上方から白色光を３０秒間作用電極表面に照射した。このとき、作用電極と対電極との間に流れる電流値を電流計により経時的に測定した。

【０１０６】

図１５に２８．６μＭローダミン修飾ＤＮＡ溶液を用いた場合の検出電流の経時変化を、図１６に２８６μＭローダミン修飾ＤＮＡ溶液を用いた場合の検出電流の経時変化を示す。これらの図に示されるように、増感色素で標識づけられたＤＮＡと、これと相補性を有するＤＮＡとをハイブリダイゼーションさせると、光の照射により大きな電流が流れることが分かる。

【０１０７】

また、２８．６μＭおよび２８６μＭの各ローダミン修飾ＤＮＡ溶液を用いた場合について、電流値が定常状態になった時点における電流値を別途測定したところ、図１３に示される通りの結果が得られた。また、参照のため、ローダミン修飾ＤＮＡの固定化を行わなかった場合についても同様にして測定を行った。その結果も図１７に併せて示す。図１７に示されるように、ローダミン修飾ＤＮＡの濃度に依存して電流値が変化した。したがって、本発明の方法によれば定量分析が可能なことが分かる。

【０１０８】

例３：プローブ物質を担持させない作用電極を使用した測定

また、比較のため、例１で作製された、NH_2修飾ＤＮＡを担持させる前の、酸化チタンを含んでなる電子受容層のみが形成された作用電極を用いてセンサセルを構成して、例２と同様に測定を行った。図１５に２８．６μＭローダミン修飾ＤＮＡ溶液を用いた場合の検出電流の経時変化を、図１６に２８６μＭローダミン修飾ＤＮＡ溶液を用いた場合の検出電流の経時変化を示す。これらの図に示されるように、紫外線カットフィルターで除去できなかった若干量の紫外線によって酸化チタン自身が励起され、光電流が観測されるものの、ローダミン修飾ＤＮＡ溶液を用いた例２の場合と比べて、光電流は著しく低かった。

【０１０９】

例４：作用電極にブロッキングを施した場合の測定

例１と同様にして、プローブ物質が担持された作用電極を得た。この電極表面に例１で使用したものと同様のシリコンシールを再度載置して、開口部にブロッキング剤として１０μＭのジエタノールアミン３５μｌを注入した。ブロッキング剤中に気泡が極力入らないようにガラス板で真上から覆い、湿らせた紙等で蒸気圧を調整したプラスチック容器に入れた。そして、６０℃で３０分間保持して、ブロッキング剤をインキュベートした。電極表面を再度流水で軽く洗浄した後、空気を吹き付けて残水を飛散させた。

【０１１０】

こうしてプローブ物質がブロッキングされた作用電極を用いて、例２と同様にして、ローダミン修飾ＤＮＡのインキュベーションによるハイブリダイゼーション、および光電流測定を行った。その結果は図１５および図１６に示される通りであった。これらの図に示されるように、ブロッキングが施された作用電極を用いた場合には、それが施されない例２の場合と比べて、著しく電流値が低下した。

【０１１１】

例５：競合物質ＰＮＡとの共存下におけるローダミン修飾ＤＮＡの検出

１０５－Ｒｈｏ－ＣＣＣＡＧＴＣＡＣＧＡＣＧＴＴの塩基配列を有するローダミン修飾ＤＮＡと、競合物質として１０５－ＣＣＣＡＧＴＣＡＣＧＡＣＧＴＴＴの塩基配列を有するＰＮＡとをバッファ（２Ｘ　ＳＳＣ、０．０３％　ＳＤＳ）に溶解して、２８．６μＭローダミン修飾および２００μＭ　ＰＮＡ含有溶液と、２８６μＭローダミン修飾および

２００μＭ　ＰＮＡ含有溶液とを作製した。
この試料溶液を用いたこと以外は、例２と同様にして、ローダミン修飾ＤＮＡのインキュベーションによるハイブリダイゼーション、および光電流測定を行った。その結果は図１５および図１６に示される通りであった。これらの図に示されるように、ハイブリダイゼーション時に競合すると考えられる塩基配列を有するＰＮＡを共存させた場合、ＰＮＡが共存しない例２の場合と比べて、電流値が低下した。

【０１１２】

例６：電極ユニットを用いた複数スポットにおける被検物質の個別測定

（１）　色素標識プローブＤＮＡの準備

色素標識されたプローブＤＮＡとして、３’末端をＣｙ５で標識された、以下の塩基配列を有する１５塩基の核酸塩基（Ｃｙ５標識ｓｓＤＮＡ、プロリゴ社製）を用意した。

色素標識プローブＤＮＡ（Ｃｙ５標識ｓｓＤＮＡ）：

５’NH_2－ＡＡＣＧＴＣＧＴＧＡＣＴＧＧＧ－Ｃｙ５－３’

【０１１３】

（２）　電極ユニットの作製および色素標識プローブＤＮＡの担持

まず、チタニア微粉末（昭和タイタニウム社製、Ｆ２、平均粒径６０ｎｍ、アナターゼ：ルチル＝４：６）１ｇと、以下の配合を有する有機ビヒクル１ｇとを自動乳鉢で混練しながら、徐々に溶媒（αテルピネオール：ブチルカルビトール＝重量比６０：４０）１ｇを添加して、酸化チタンペーストを得た。これら一連の混合は合計５時間行われた。

α－テルピネオール	６５重量％
ブチルカルビトール	１５重量％
ポリビニルブチラール	２０重量％

【０１１４】

フッ素ドープされた酸化スズ（Ｆ－SnO_2：ＦＴＯ）コートガラス（エイアイ特殊硝子社製、Ｕ膜、シート抵抗：１５Ω／□）の導電面を、図１に示されるように直径３ｍｍの円形スポットを２ｍｍ間隔で６箇所残し、かつ各スポットから延出されるリード線を残すように、サンドブラストによりエッチング処理を行った。こうして形成された円形スポットのうち５箇所を、ＦＴＯ膜を電子受容層として備えた作用電極とした。一方、残りの１箇所の円形スポットに白金膜を蒸着により形成して、対電極とした。こうして、絶縁基材であるＦＴＯコートガラスのガラス基材上に、作用電極および対電極を備えた電極ユニットを得た。

【０１１５】

次いで、色素標識プローブＤＮＡとしてＣｙ５標識ｓｓＤＮＡを５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．０）に溶解させて、Ｃｙ５標識ｓｓＤＮＡ濃度が０μＭ、１μＭ、および１０μＭの水溶液を調製した。この溶液を、予め９５℃で５分間保持した後、直ちに氷上で１０分間以上冷却させることにより、熱変性させておいた。

【０１１６】

先に得られた作用電極の電子受容層上に、スペーサー用穴あきテープ（穴の直径：３ｍｍ、スポット数；６、厚さ：５０μｍ）を貼り、ピンセットの先を用いてテープ接着面に残存する空気を除去した。このテープ上に、直径３ｍｍの大きさの開口部が６箇所形成されたシリコンシート（厚さ：１ｍｍ）を載置して密着させた。この開口部に先に調製した各濃度のＣｙ５標識ｓｓＤＮＡ溶液を３μｌ装填した。なお、図１に示されるように６箇所のスポットには番号がそれぞれ付されており、各スポットに装填したＣｙ５標識ｓｓＤＮＡ溶液の濃度は下記表２の通りとした。

表　２

スポット番号	Ｉ	ＩＩ	ＩＩＩ	ＩＶ	Ｖ
ＤＮＡ濃度	０Ｍ	１ｎＭ	１０ｎＭ	１００ｎＭ	１μＭ

【０１１７】

このとき、ピペットチップの先端を用いて、シリコンシールの開口部の隅々まで充分にＤＮＡ溶液が行き渡るようにした。続いて、ＤＮＡ溶液中に気泡が極力入らないようにガ

ラス板で真上から蓋をして、湿らせた紙等で蒸気圧が調整されたプラスチック容器に収容した。この容器中に５０℃で一晩保持して、Ｃｙ５標識ｓｓＤＮＡをインキュベートした。その後、ＤＮＡ溶液を除去し、流水で軽く電極表面を洗浄した後、空気を吹き付けて残水を飛散させた。こうして、色素標識プローブＤＮＡが担持された作用電極を得た。

【０１１８】

こうして色素標識プローブＤＮＡが担持された作用電極を洗浄液に浸し、ゆっくりと揺らしながら洗浄した。洗浄液としては下記表３に示されるものを使用し、各洗浄液について下記表に示される洗浄時間、洗浄回数、および温度で洗浄を行った。なお、洗浄液を変更する毎に洗浄容器を交換した。さらに、作用電極を水で５秒間洗い流し、素早く空気を吹き付けて残水を飛散させた。

表　３

洗浄液	１回当たりの洗浄時間	洗浄回数	温度
ＨＥＰＥＳ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０	６分間	６回	室温
ＨＥＰＥＳ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０	１３分間	１回	６０℃
ＨＥＰＥＳ	６分間	２回	室温
超純水	１５分間	１回	室温

注）ＨＥＰＥＳ：２－[４－（２－ヒドロキシエチル）－１－ピペラジニル]エタンスルホン酸（同仁化学研究所製）の５０ｍＭ、ｐＨ７．０の溶液

０．１％Ｔｗｅｅｎ２０：ＳＥＲＶＡ社製の界面活性剤を超純水に０．１ｖｏｌ％で希釈したもの

【０１１９】

（４）測定用セルの組み立て

こうして得られた電極ユニットを用いて、図２および図３に示されるような測定用セルを以下のようにして組み立てた。

まず、電極ユニットと押さえ部材と対向させ、その間に膜厚が５００μｍのシリコンシートを挿入した。シリコンシートは、電解液を充填するための空間を作り出すためのものであり、全スポットを包含するのに十分な大きさの開口部を有しており、この開口部が送液された電解液が溜まる流路を構成する。各作用電極および対電極から延出されるリード線は電気的に接触しているスプリングプローブを介してそれぞれポテンシオスタット（ビー・エー・エス株式会社　ALS Modl832A）に接続された。電極ユニット上には、押さえ部材を配置して、この押さえ部材に光源移動用アリ式ステージ（駿河精機社製、B05-41M）を介して赤色レーザー光源（オーディオテクニカ製、SU-31：波長635nm）を取り付けた。こうして、スペーサーおよび電解液を電極ユニットおよび押さえ部材とで挟持されてなる、サンドイッチ型の測定用セルを得た。

次いで、電解液として、体積比が４：６のアセトニトリルと炭酸エチレンの混合溶媒にヨウ素０．０６Ｍとテトラプロピルアンモニウムヨーダイド０．６Ｍを溶解した混合液を用意した。この電解液が作用電極と押さえ部材との間に充填させた。

【０１２０】

（５）光電流の測定

光源移動用アリ式ステージに固定した赤色レーザーからなる移動型光源を用いて作用電極表面の３ｃｍ上方から、各スポット毎に個別に光を照射して、作用電極と白金対電極の間に流れる電流を経時的に測定した。電流値の測定は１８０秒間行ったが、光の照射は電流の測定開始６０秒後から６０秒間のみ行った。観測した光電流は１２０秒後の光電流値から１８０秒後の光電流値を差し引くことで補正を行った。

【０１２１】

その結果、各スポット毎の光照射の際に検出した光電流は図１８に示される通りであった。図１８に示されるように、各スポットを光照射した際に検出された光電流の値は、光照射したスポットに装填したＣｙ５標識ｓｓＤＮＡ水溶液の濃度と高い相関性を有していることが分かる。すなわち、同一面上に作用電極および対電極を備えた電極ユニットを用

いて、被検試料の濃度に依存した光電流を測定できることが分かる。

【図面の簡単な説明】

【０１２２】

【図１】本発明の作用電極の一例を示す図である。

【図２】本発明のセンサセルの一例を示す図であり、組み立て前の状態を示す図である。

【図３】図２に示されるセンサセルの組み立て後の状態を示す図である。

【図４】本発明のセンサセルの他の一例を示す図であり、組み立て前の状態を示す図である。

【図５】図４に示されるセンサセルの組み立て後の状態を示す図である。

【図６】本発明のセンサセルの他の一例を示す図であり、組み立て前の状態を示す図である。

【図７】図６に示されるセンサセルの組み立て後の状態を示す図である。

【図８】本発明のセンサセルの他の一例を示す図であり、組み立て前の状態を示す図である。

【図９】図８に示されるセンサセルの組み立て後の状態を示す図である。

【図１０】本発明のセンサセルの他の一例を示す図であり、組み立て前の状態を示す図である。

【図１１】図１０に示されるセンサセルの組み立て後の状態を示す図である。

【図１２】被検物質が一本鎖の核酸であり、プローブ物質が前記核酸に対して相補性を有する一本鎖の核酸である場合における、被検物質のプローブ物質への固定化工程を示す図であり、（ａ）は被検物質が予め増感色素で標識されてなる場合を、（ｂ）は二本鎖の核酸にインターカレーション可能な増感色素を添加した場合をそれぞれ示す。

【図１３】被検物質がリガンドであり、媒介物質が受容体蛋白質分子であり、プローブ物質が二本鎖の核酸である場合における、被検物質のプローブ物質への固定化工程を示す図である。

【図１４】互いに競合する特異的結合性を有する被検物質および第二の被検物質が抗原であり、プローブ物質が抗体である場合の、被検物質のプローブ物質への固定化工程を示す図である。

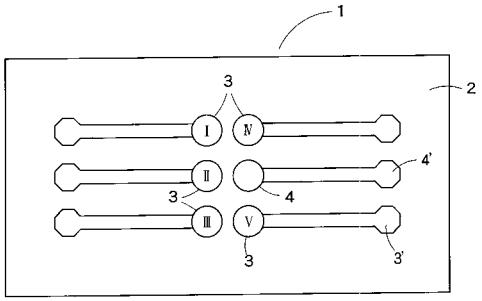
【図１５】例２～５において得られた、２８．６μＭローダミン修飾ＤＮＡ溶液を試料液とし手用いた場合の検出電流の経時変化を示す図である。

【図１６】例２～５において得られた、２８６μＭローダミン修飾ＤＮＡ溶液を試料液として用いた場合の検出電流の経時変化を示す。

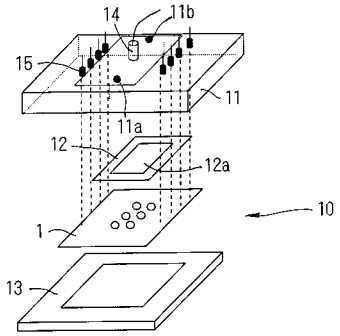
【図１７】例２において得られた、０μＭ、２８．６μＭ、および２８６μＭの各濃度のローダミン修飾ＤＮＡ溶液を試料液として用いた場合の、定常状態にある検出電流を示す図である。

【図１８】例６において得られた、各スポット作用電極における、検出電流の値を示す図である。

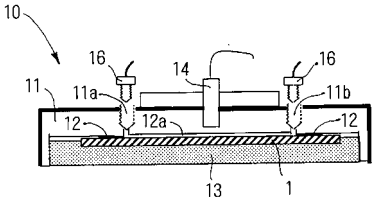
【図１】



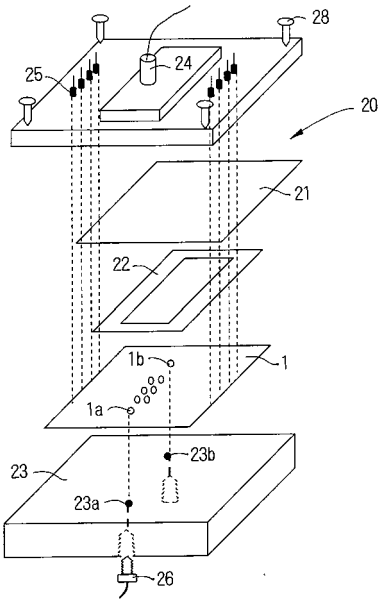
【図２】



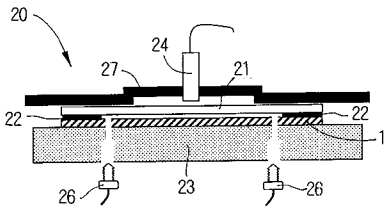
【図３】



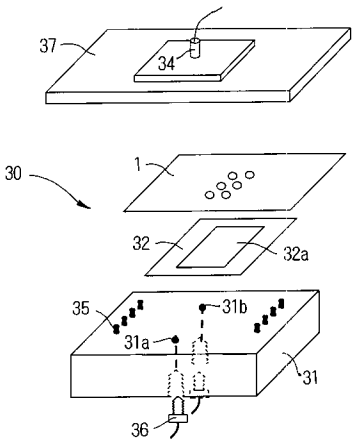
【図４】



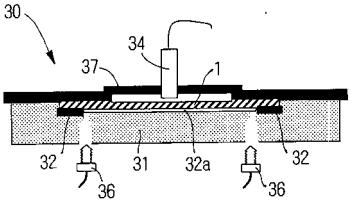
【図５】



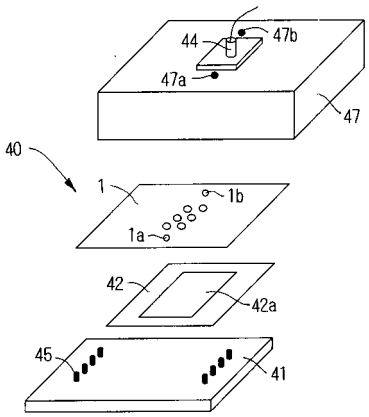
【図６】



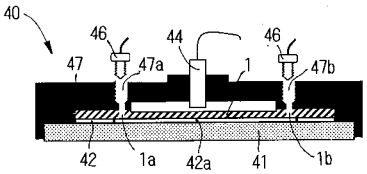
【図７】



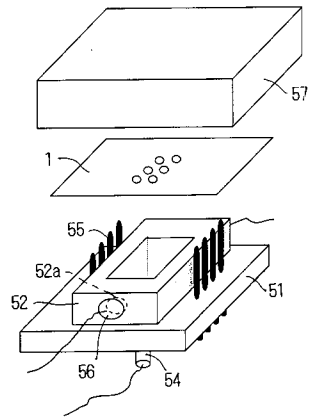
【図８】



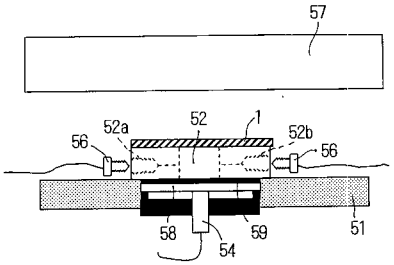
【図９】



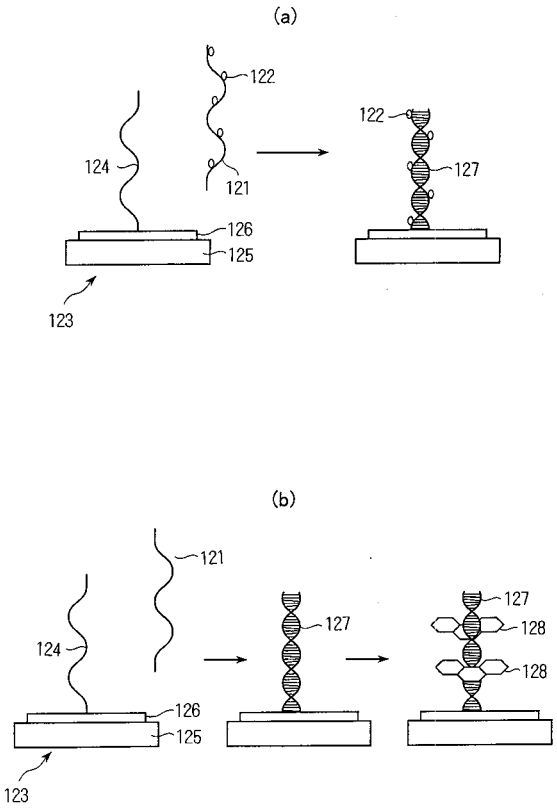
【図１０】



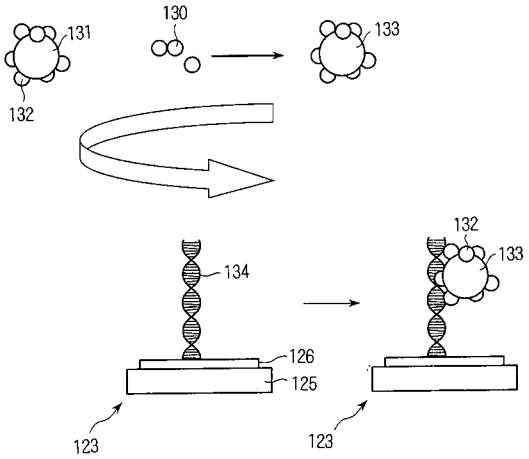
【図１１】



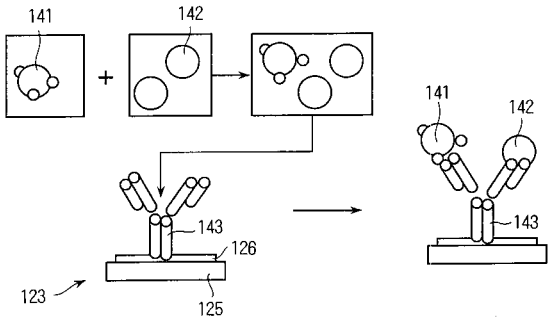
【図１２】



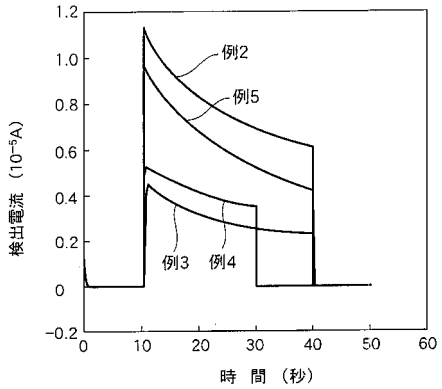
【図１３】



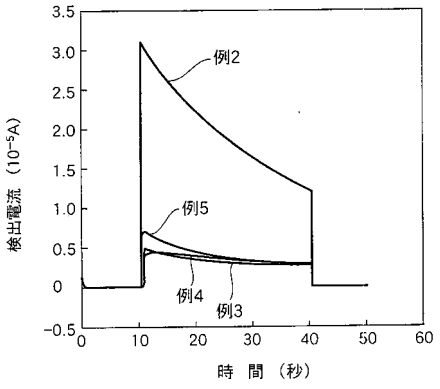
【図１４】



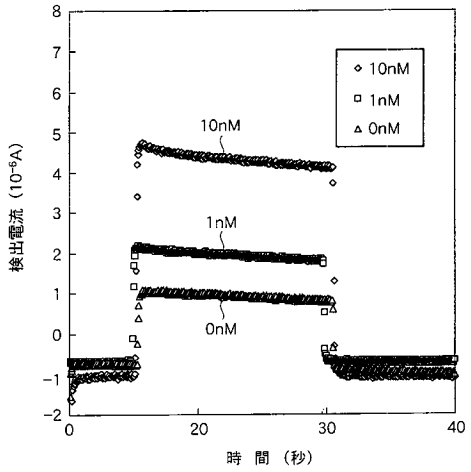
【図１５】



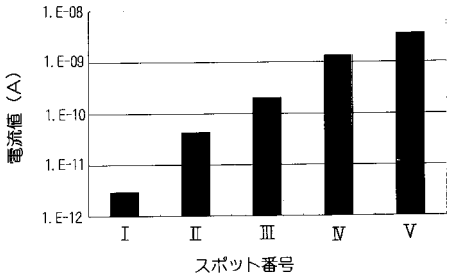
【図１６】



【図１７】


10nM
1nM
0nM
検出電流（10⁻⁶A）
時 間（秒）

【図１８】


1.E-08
1.E-09
1.E-10
1.E-11
1.E-12
電流値（A）
Ⅰ
Ⅱ
Ⅲ
Ⅳ
Ⅴ
スポット番号

フロントページの続き

(56)参考文献　特開２００４－１０１２５３（ＪＰ，Ａ）
特開２００５－０２４２８６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　２７／４１６
Ｇ０１Ｎ　２７／２８
Ｇ０１Ｎ　２７／３０
Ｇ０１Ｎ　２７／３２７
Ｇ０１Ｎ　３３／５４３