

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7202563号  
(P7202563)

(45)発行日 令和5年1月12日(2023.1.12)

(24)登録日 令和4年12月28日(2022.12.28)

(51)国際特許分類	F I
G 0 1 N 27/327 (2006.01)	G 0 1 N 27/327
G 0 1 N 27/28 (2006.01)	G 0 1 N 27/28 3 0 1 B
G 0 1 N 27/416 (2006.01)	G 0 1 N 27/416 3 3 6 G
G 0 1 N 27/403 (2006.01)	G 0 1 N 27/416 3 8 6 G
	G 0 1 N 27/403 3 7 1 Z

請求項の数 7 (全15頁)

(21)出願番号	特願2018-206584(P2018-206584)	(73)特許権者	304020292 国立大学法人徳島大学 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地
(22)出願日	平成30年11月1日(2018.11.1)	(73)特許権者	000245531 野村マイクロ・サイエンス株式会社 神奈川県厚木市岡田二丁目9番8号
(65)公開番号	特開2020-71172(P2020-71172A)	(74)代理人	110001092 弁理士法人サクラ国際特許事務所
(43)公開日	令和2年5月7日(2020.5.7)	(72)発明者	水口 仁志 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内
審査請求日	令和3年10月11日(2021.10.11)	(72)発明者	飯山 真充 神奈川県厚木市岡田2丁目9番8号 野村マイクロ・サイエンス株式会社内
		審査官	大瀧 真理

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 電気化学センサー用電極、電気化学センサー、及び電気化学的検出装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、  
前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、  
前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、  
を有し、

前記ろ過膜がトラックエッチメンブレンフィルターであることを特徴とする電気化学センサー用電極。

【請求項2】

前記ろ過膜の孔径が、0.01~20.0 μmである請求項1に記載の電気化学センサー用電極。

【請求項3】

前記アプタマーが、特定のタンパク質を捕捉可能なアプタマーである請求項1又は2に記載の電気化学センサー用電極。

【請求項4】

前記アプタマーが、トロンピンアプタマー又はリゾチームアプタマーである請求項3に記載の電気化学センサー用電極。

【請求項5】

孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有する作用極となる電気

化学センサー用電極と、

孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜の表面に導電膜を形成した対極となる電気化学センサー用電極と、を有し、

前記作用極及び前記対極となる電気化学センサー用電極が短絡しないように重ねられていることを特徴とする電気化学センサー。

## 【請求項 6】

孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有する作用極となる電気化学センサー用電極を複数有することを特徴とする電気化学センサー。

## 【請求項 7】

孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有する作用極となる電気化学センサー用電極、対極及び参照極を有する電気化学センサーと、

前記作用極及び前記対極間の電位差を一定にする電位制御手段と、

前記電気化学センサー用電極において、検出対象物質の捕捉に起因する酸化又は還元による電流値の変化を測定する電流測定手段と、

を有し、

前記対極が、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜の表面に導電膜を形成した電気化学センサー用電極であり、

前記作用極及び前記対極となる電気化学センサー用電極が短絡しないように重ねられていることを特徴とする電気化学的検出装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、電気化学センサー用電極、電気化学センサー、電気化学的検出装置及び電気化学的検出方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒトの健康状態の指標となる物質を可能なかぎり簡便な方法で検出することは、疾病の早期発見と適切な処置のためには極めて重要である。そのため、そのような物質の測定方法が種々検討され、中でも、電気化学的な分析法には簡便かつ小型化が容易であるという利点があり、これまで多くの手法が開発され、実用化されてきている。

## 【0003】

今日では、生理学的に関連のある物質を簡易な操作で検出することがさらに重要視されており、核酸アプタマーや分子インプリンティングを用いた測定も提案されている（例えば、特許文献1, 2参照）。ところで、核酸アプタマーや分子インプリンティングによる電極の修飾は、標的分子に対する選択性の確保において有用であるが、認識した物質を検出するにはフェロセンやアントラキノンなどの酸化還元プローブを用いることが多い。この場合、多項目を分析するには、分離された電気化学シグナルを得る必要があり、その戦略として（1）酸化還元電位が大きく離れた物質をプローブとして用いること、（2）それぞれ独立した電極から別々のシグナルを取得すること、に大別される。

## 【0004】

ところで、前者の場合、電流検出において互いに干渉しないほどに酸化還元電位が大きく離れた物質を用いる必要があり、水溶液の電位窓という制限のもとでは、現状では2種類のプローブを使った同時測定が事実上の限界である。一方、後者の場合、先に集積化した複数の微小電極に対してそれぞれ異なる修飾を施す必要があり、特にマイクロチップのような狭小流路を用いる場合はその作成方法が極めて煩雑であった。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

10

20

30

40

50

【文献】特開 2010 - 60375 号公報

特開 2011 - 242387 号公報

特開 2011 - 980773 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明においては、多項目の測定操作を簡便にでき、検出感度を維持しつつ、その検出を簡便、かつ正確に行うことができる電気化学センサー用電極、電気化学センサー、電気化学的検出装置及び電気化学的検出方法を提供することを目的とする。

【0007】

なお、物質を電気化学的に検出する際に、検出感度を維持しつつ、検出対象物質の検出を簡便、かつ正確に行うことができる電気化学的検出装置及び方法について、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するフィルター表面に導電膜を形成した電極を用いた電気化学センサーを本出願人は特許出願し、公知の技術となっている（特許文献3参照）。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の電気化学センサー用電極は、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有することを特徴とするものである。

【0009】

本発明の電気化学センサーは、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有する作用極となる電気化学センサー用電極を有することを特徴とするものである。

【0010】

本発明の電気化学的検出装置は、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有する作用極となる電気化学センサー用電極、対極及び参照極を有する電気化学センサーと、前記作用極及び前記対極間の電位差を一定にする電位制御手段と、前記電気化学センサー用電極において、検出対象物質の捕捉に起因する酸化又は還元による電流値の変化を測定する電流測定手段と、を有することを特徴とするものである。

【0011】

本発明の電気化学的検出方法は、サイクリックボルタンメトリーや交流インピーダンス法を用いる電気化学的検出方法において、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜と、前記ろ過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有する作用極となる電気化学センサー用電極、対極及び参照極を有する電気化学センサーに、前記作用極及び前記対極間の電位差を一定にし、前記電気化学センサー用電極における電流値又は抵抗値の変化を測定することを特徴とするものである。

【発明の効果】

【0012】

本発明の電気化学センサー用電極は、その電極となる導電膜が、フィルターの細孔内部まで導電膜でコーティングされているため電極としての表面積が大きく、さらに測定に用いる際に、フィルター細孔への電解液の強制流によって反応物質の電極表面への輸送を促すことができる。また、導電膜の表面に特定の物質と結合可能なアプタマーを固定しているため、特定の物質の有無を測定できる。

【0013】

そして、このような電気化学センサー用電極を用いた電気化学センサー、電気化学的検出装置及び検出方法は、検出対象物質の電極表面への輸送が促され、検出対象物質をアプタマーで捕捉することで、検出漏れを抑制しながら測定を行うことができ、高感度に検出対象物質を検出することができる。

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】電気化学センサー用電極の構成を示した概略断面図

【図2】本発明の一実施形態における電気化学的検出装置の概略構成図

【図3】本発明の他の実施形態における電気化学的検出装置の概略構成図

【図4】本発明のさらに他の実施形態における電気化学的検出装置の概略構成図

【図5】実施例1において、トロンピン検出時のサイクリックボルタンメトリーの変化を示した図

【図6】実施例2において、リゾチーム検出時のサイクリックボルタンメトリーの変化を示した図

10

## 【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明について、実施形態を参照しながら詳細に説明する。

本実施形態の電気化学的検出装置及び方法は、その電気化学センサーに特徴があるものであって、特に、そのセンサーには新規な電気化学センサー用電極を用いることにより、検出対象物質を簡便、かつ正確に検出することができるものである。

【0016】

## &lt;電気化学センサー用電極&gt;

まず、本実施形態の電気化学センサー用電極について説明する。この電気化学センサー用電極は、例えば、図1に示したような構造を有するものであり、図1は電気化学センサー用電極の構成を示した概略断面図である。

20

【0017】

すなわち、この電気化学センサー用電極1は、基材となっている孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するろ過膜2と、その表面に形成された導電膜3と、さらに導電膜3の表面に固定されたアプタマー4と、で構成されたものである。

【0018】

本発明に用いられるろ過膜2は、その形成された孔に特徴を有するものであり、その孔構造について、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するという物理的な特徴を有している。

【0019】

このろ過膜2は、例えば、ポリカーボネートやポリエステル等のポリマー製のフィルムに、高エネルギーの重イオンでトラッキング（軌跡付け）するプロセスと、円筒状の孔構造を作るエッチングのプロセスによるトラックエッチングにより製造することができる。

30

【0020】

トラッキングプロセスでは、ポリマーフィルムにアクセラレーターで加速した高エネルギーの重イオンを貫通させ、トラック（軌跡）を形成させ、このとき、重イオンの数量とフィルムの巻き取りスピードにより単位面積当たりのトラック数（孔密度）をコントロールする。次いで、エッチングプロセスでは、トラックしたフィルムをエッチング液へ浸漬し、トラック部分を優先的に溶解し孔を形成させ、このとき、エッチング条件により孔径をコントロールする。このときろ過膜の孔径は均一なものとして得られ、その孔道はフィルムの厚さ方向（フィルムの表面に対して垂直又は略垂直）に形成される。

40

【0021】

そして、この孔道について、例えば、公称孔径が1  $\mu\text{m}$ である場合、本発明のろ過膜のように、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な特徴を有するものは孔径分布が0.8 ~ 1  $\mu\text{m}$ （-20% ~ +0%）と非常にシャープなものとなる。また、本発明で用いられるろ過膜2の開孔率は15%未満と小さい。

【0022】

検出感度の観点から、本発明で用いられるろ過膜2の孔径は、0.01 ~ 20.0  $\mu\text{m}$ が好ましく、0.05 ~ 5.0  $\mu\text{m}$ がより好ましく、0.4 ~ 1.0  $\mu\text{m}$ がさらに好ましい。この傾向の理由は、孔内への水や検出対象物質の拡散し易さ、膜の透水性、アプタマ

50

一の検出対象物質の捕捉の際の立体障害などが関連するものと思われる。

検出対象物質が細菌の場合、孔径は、たとえば、 $1.0\ \mu\text{m} \sim 20.0\ \mu\text{m}$ が好ましい。

【0023】

本発明で用いるろ過膜2としては、その厚みが $6 \sim 11\ \mu\text{m}$ 、開孔率が15%未満、孔密度が $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^8$ 個/cm<sup>2</sup>、のものが好ましい。

【0024】

また、このろ過膜2は、上記したようにポリマー製のフィルムとして形成されるようにその表面が平滑度、すなわち表面粗さ $R_a = 1\ \mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。なお、ここでの $R_a$ は、算術平均高さを示すものであり、JIS B 0601-2001に準拠するものである。

【0025】

本発明で用いる導電膜3は、このろ過膜2の表面に形成される導電性を有する膜であり、電気化学センサー用電極として作用する。この導電膜3としては、白金、金等の金属膜や、グラファイトカーボン、ポロンドープダイヤモンド等の膜、ポリアニリン、ポリチオフェン等の導電性ポリマーによる高分子膜を形成するようにすればよい。

【0026】

このような導電膜3をろ過膜2上に形成するには、金属膜であれば、スパッタリング、気相合成法等、高分子膜であれば、化学修飾等により形成することができる。

【0027】

また、この電気化学センサー用電極における、ろ過膜の厚さは $1 \sim 500\ \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $1 \sim 100\ \mu\text{m}$ であることがより好ましく、 $1 \sim 10\ \mu\text{m}$ であることが特に好ましい。また、導電膜の厚さは $0.001 \sim 0.5\ \mu\text{m}$ であることが好ましいが、安定的に導電性を保つことができれば特に限定されるものではない。

【0028】

また、このろ過膜は、その構造が検出対象物質を検出できるものであれば特に限定されるものではなく、例えば、通常の平膜状であってもよいし、ろ過面積を稼ぐためにプリーツ状に加工したフィルターカートリッジとしてもよいが、平膜状であることが好ましい。

【0029】

本発明で用いるアプタマー4は、特定の物質と結合、捕捉できる核酸分子やペプチドであり、公知のアプタマーを特に限定することなく用いることができる。このアプタマー4としては、検出対象物質と結合することができるものであればよく、例えば、重金属イオン、低分子有機化合物、タンパク質をはじめとする高分子有機化合物、アプタマーと相補的な塩基配列を持つ分子、金等の金属原子、ウイルス、大腸菌等の細菌などと結合可能なものが挙げられる。

【0030】

疾病等の診断に用いる場合には、生体内の物質、例えば、タンパク質、と結合可能なアプタマーが好ましく、例えば、トロンピン、リゾチーム、 $\alpha$ -フェトプロテイン、c反応性タンパク質、免疫グロブリン、ATP等と結合できるアプタマーが好ましいものとして挙げられる。

【0031】

アプタマー4は、導電膜3の表面に複数固定されており、電気化学センサー用電極1と検出対象物質を含有する溶液とを接触させることで、検出対象物質と結合し、捕捉できる。この結合、捕捉により、後述する電気化学測定において、ピーク電流の減少や、電荷移動抵抗の増加等の電気化学的な変動が生じ、検出対象物質の測定が可能となる。

【0032】

このとき、アプタマー4は、導電膜3の表面に固定されるが、その密度が低すぎると検出対象物質の捕捉量が少ないため測定感度が十分に向上せず、その密度が高すぎると隣接するアプタマーにより検出対象物質の捕捉が阻害され、やはり測定感度が十分に向上しないと考えられる。そのため、導電膜3の表面に固定されるアプタマー4の密度は、例えば、 $1 \times 10^{-15} \sim 1 \times 10^{-8}$  mol/cm<sup>2</sup>が好ましく、 $1 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-1}$

10

20

30

40

50

$0 \text{ mol/cm}^2$  がより好ましく、 $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$  がさらに好ましく、 $1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$  が特に好ましい。

#### 【0033】

(アプタマーの固定方法)

表面に導電膜3が設けられたる過膜2に対して、固定するアプタマー4を導電膜3上に固定するには、導電膜3上に直接アプタマー4を固定してもよいし、間接的にアプタマー4を固定してもよい。

#### 【0034】

直接固定する場合、例えば、導電膜3が貴金属で形成されている場合、核酸断片であるアプタマー4の有する原子、例えば硫黄原子、を利用することで、固定できる。この固定の方法は、従来公知の方法により行うことができ、貴金属とチオール(-SH)やジスルフィド(-S-S-)等の硫黄化合物を接触させ、貴金属表面に硫黄化合物を化学吸着させることで容易に固定できる。このとき、導電膜3上に、貴金属の微粒子(ナノ粒子)を配列して固定し、その微粒子にアプタマーを固定させることもできる。

#### 【0035】

また、間接的に固定する場合、導電膜3と結合する部分とアプタマー4と結合する部分を併せ持つ物質を用いることで、固定できる。この固定の方法は、例えば、Kenzo Maehashi, et al., "Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors", Analytical Chemistry, Vol.79, No.2, 2007, p782-787に記載されているようなピレン誘導体等の物質を用いればよく、このときカーボン膜上にアプタマーを固定できる。

#### 【0036】

なお、アプタマーを固定する際には、その電気化学センサー用電極としての機能を確保するために、固定する前に導電膜3の表面を前処理することが好ましい。この前処理としては、紫外線照射、強力な酸化剤を用いる処理、熱処理等が挙げられ、紫外線照射が好ましく、特にエキシマ光照射が好ましい。前処理をしない場合、従来の導電金属板と同様の固定では測定感度が十分に上がらない場合があったが、前処理をすることで、る過膜上に形成した導電膜上に、測定に寄与するアプタマーを増加させ、効率的な測定を可能とできる。

#### 【0037】

また、本実施形態の電気化学センサー用電極は、上記した構成を必須の要素としているが、アプタマー4を固定した後、電極表面に検出対象物質以外のタンパク質等による非特異反応が起こらないように、表面処理を行うことが好ましい。この表面処理としては、メルカプトヘキサノール、メルカプトヘキサン、アミノエタンチオール等のメルカプトン類のように、測定に影響を及ぼさない物質を、アプタマー4の結合していない電極表面に吸着させることで容易に行うことができる。

#### 【0038】

なお、この表面処理は、後述する対極となる電気化学センサー用電極(導電膜表面にアプタマー4が固定されていない)に対しても行うことが好ましい。

#### 【0039】

次に、この電気化学センサー用電極を用いた電気化学センサー、その電気化学センサーを用いた電気化学的検出装置及び検出方法について説明する。

#### 【0040】

<電気化学センサー>

本発明の電気化学センサーは、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するる過膜と、前記る過膜の表面に形成された導電膜と、前記導電膜の表面に固定されたアプタマーと、を有する作用極となる電気化学センサー用電極と、孔道が円筒状かつ真直であり、均一な孔径を有するる過膜の表面に導電膜を形成した対極となる電気化学センサー用電極と、を有し、これらの電気化学センサー用電極を短絡しないように重ねてなるものである。

#### 【0041】

すなわち、この電気化学センサーは、本発明の電気化学センサー用電極と、アプタマーが結合されていないこと以外は本発明の電気化学センサー用電極と同一の構成を有する電気化学センサー用電極を重ねて構成されるものであり、その際に電極が短絡しないようにしたものである。例えば、図2及び図3には、電気化学的検出装置の概略構成図を示しているが、電気化学センサーはそのうち、図2における11、図3における12で表されるものである。

【0042】

例えば、図2に示した電気化学センサー11は、作用極となる電気化学センサー用電極11Aと、対極となる電気化学センサー用電極11Bと、から構成されるものである。

【0043】

このとき、電気化学センサー用電極11Aと11Bは、互いの電極が短絡しないように、上から電気化学センサー用電極11Aを上向き（導電膜が検出対象溶液供給部25側）に、電気化学センサー用電極11Bを下向き（導電膜が吸引部26側）にして重ねることが好ましい。その他にも電極の孔道を塞ぐことなく、電極同士が短絡しないようにするものであれば特に限定されずに適用することができ、例えば、電気化学センサー用電極11Aと11Bの間に孔の空いた絶縁膜などをスペーサーとして挿入する方法等が挙げられる。なお、この図2では、電気化学センサー用電極として、片面に導電膜を形成したものを例示しているが、両面に導電膜を形成してもよい。

【0044】

そして、図3に示した電気化学センサー12は、第1の作用極となる電気化学センサー用電極12Aと、第2の作用極となる電気化学センサー用電極12Bと、対極となる電気化学センサー用電極12Cと、から構成されるものである。

【0045】

このとき、電気化学センサー用電極12A、12B及び12Cは、互いの電極が短絡しないように、上から電気化学センサー用電極12Aを上向き（導電膜が検出対象溶液供給部35側）に、電気化学センサー用電極12Bを上向き（導電膜が検出対象溶液供給部35側）に、電気化学センサー用電極12Cを下向き（導電膜が吸引部36側）に、して重ね、さらに、電気化学センサー12Aと12Bとの間にスペーサー12Dを挟んで重ねるようにすることで、短絡を防止するようにしている。このスペーサー12Dとしては、本発明の電気化学センサー用電極において基材として用いるる過膜を用いることが好ましい。

【0046】

このとき、作用極となる電気化学センサー用電極12Aと12Bにおいて、それぞれアプタマー4の種類を異なるものとするすることで、2種類の検出対象物質について一度の通液操作で検出対象物質の有無を検知できる電気化学センサーとできる。

【0047】

さらに、作用極となる電気化学センサー用電極として、異なるアプタマー4を固定したものを用意し、これらを積層して電気化学センサーとすることで、多数の検出対象物質に対して一度の通液操作で測定が可能となる。この電気化学センサーは、従来、電気化学的測定としては2種類程度の同時測定がせいぜいであったものが、3種類以上の測定も可能とするものであり、そのセンサーの構成が簡易で、製造も容易なものである。

【0048】

<電気化学的検出装置及び方法>

本発明の電気化学的検出装置は、上記したように、例えば、図2及び図3に示した構成のものが挙げられる。なお、この図2及び図3は、構成を説明するために、積層体を展開して示したものである。

【0049】

まず、図2に示した電気化学的検出装置21について説明する。この電気化学的検出装置21は、電気化学センサー11と、電位制御手段22と、電流測定手段23と、参照極24と、検出対象溶液供給部25と、吸引部26と、から構成されるものである。

【0050】

10

20

30

40

50

電気化学センサー 11 は、上記説明したとおりのものである。そして、この電気化学センサー 11 は、11 A 及び 11 B の各電極が電位制御手段 22 に接続されている。電位制御手段 22 は、このように接続した電極に電位を与えるものであり、さらにこの電位差を一定にする機能を有するものであり、例えば、ポテンショスタットが挙げられる。ポテンショスタットには、ファンクションジェネレーターを用いるようにしてもよい。また、このようにポテンショスタットからなるような電位制御手段 22 には、電流測定手段 23 が接続され、作用極上における電流値の変化を測定し、記録することができるようになっている。また、電位制御手段 22 には参照極 24 が接続され、参照極 24 は、作用極の電位を決定する際の基準となる電極として働き、飽和カロメル（水銀）電極や銀電極、銀/塩化銀電極等が用いられる。

10

**【0051】**

そして、この電気化学的検出装置 21 は、検出対象溶液を電気化学センサー 11 に供給しながら電気化学センサー 11 を通過させることができるように、作用極側に検出対象溶液供給部 25 が、対極側に吸引部 26 が電気化学センサー 11 を挟むようにして設けられている。

**【0052】**

この電気化学的検出装置 21 を用いた電気化学的検出方法は、電気化学センサー 11 の作用極となる電気化学センサー用電極 11 A 及び対極となる電気化学センサー用電極 11 B 間に電位制御手段 22 により所定の電圧を印加し、電位差を設けるようにする。このとき、参照極 24 の電位を参照しながら所定の電位に設定するようにする。

20

**【0053】**

このように所定の電位が設けられた状態で、検出対象物質を含む検出対象溶液の通水の前後において、電気化学的測定を行う。検出対象物質が、作用極となる電気化学センサー用電極 11 A の導電膜の表面や孔道の側面に接近してアプタマー 4 に捕捉されると、アプタマー 4 に捕捉された検出対象物質により、導電膜上で行われる電子の授受による酸化又は還元反応が阻害されるため、通水前に測定した電流値や抵抗値等の電気化学的な変化が測定され検出対象物質の有無の判断や存在量の算出等を行うことができる。そして、この作用極となる電気化学センサー用電極 11 A は電気化学センサー用電極 1 で構成されており、その基材となっているろ過膜 2 の表面が平滑で孔道が円筒状かつ真直であり、孔径が均一であるという特徴を有しているため、検出対象溶液中の検出対象物質がそのろ過膜の孔道に強制的に流されるようになり、簡便かつ正確に検出操作を行うことができるものである。

30

**【0054】**

また、その表面に形成された導電膜 3 は、ろ過膜 2 の表面に加え、その孔道の側面にも導電膜 3 が形成されるものと考えられる（図 1 参照）。このことも、作用極となる電気化学センサー用電極 11 A を用いてろ過操作を行った場合に、検出対象物質は孔道を通る際に、ろ過膜の表面又は孔道の側面に固定されたアプタマー 4 と接近することとなるため効果的に検出対象物質の有無を検出することができると考えられる。

**【0055】**

また、このように微小な孔道を通過させるようにして検出を行うため、溶液中の検出対象物質の電極表面までの拡散距離が小さくなり、効果的にアプタマー 4 に捕捉させることができるため、特にサイクリックボルタンメトリーにおいて、大きな電流変化を伴い迅速かつ正確に検出結果を得ることができる。なお、ここで、検出対象物質は、導電膜 3 上に固定されたアプタマー 4 に捕捉される物質である。

40

**【0056】**

また、測定時における溶液は電気化学的測定であるサイクリックボルタンメトリーや交流インピーダンス法により測定することが可能なものであればよく、通常は電解質を用いるものであり、例えば、フェリシアン化カリウム/フェロシアン化カリウム水溶液、塩化ヘキサアンミンルテニウム錯体水溶液、アントラキノン誘導体の水溶液、メチレンブルー水溶液等が挙げられる。

50

## 【 0 0 5 7 】

次に、図 3 に示した電気化学的検出装置 3 1 について説明する。この電気化学的検出装置 3 1 は、電気化学センサー 1 2 と、電位制御手段 3 2 と、電流測定手段 3 3 と、参照極 3 4 と、検出対象溶液供給部 3 5 と、吸引部 3 6 と、から構成されるものである。

## 【 0 0 5 8 】

電気化学センサー 1 2 は、上記説明したとおりのものである。そして、この電気化学センサー 1 2 は、1 2 A、1 2 B 及び 1 2 C の各電極が電位制御手段 3 2 に接続されている。電位制御手段 3 2 は、このように接続した電極に電位を与えるものであり、さらにこの電位差を一定にする機能を有するものであり、例えば、バイポテンシオスタットが挙げられる。バイポテンシオスタットには、ファンクションジェネレーターを用いるようにしてもよい。また、このようにバイポテンシオスタットからなるような電位制御手段 3 2 には、電流測定手段 3 3 が接続され、作用極上における検出対象物質の捕捉に起因する酸化又は還元による電流値の変化を測定し、記録することができるようになっている。また、電位制御手段 3 2 には参照極 3 4 が接続され、参照極 3 4 は、作用極の電位を決定する際の基準となる電極として働き、飽和カロメル（水銀）電極や銀電極、銀 / 塩化銀電極等が用いられる。

10

## 【 0 0 5 9 】

そして、この電気化学的検出装置 3 1 は、検出対象溶液を電気化学センサー 1 2 に供給しながら電気化学センサー 1 2 を通過させることができるように、作用極側に検出対象溶液供給部 3 5 が、対極側に吸引部 3 6 が電気化学センサー 1 2 を挟むようにして設けられている。このとき、第 1 の作用極となる電気化学センサー用電極 1 2 A と検出対象溶液供給部 3 5 との間に目詰まり等による電極劣化の防止のためカバー 3 7、またはガードカラム等を設けてもよい。

20

## 【 0 0 6 0 】

この電気化学的検出装置 3 1 を用いた電気化学的検出方法は、第 1 の作用極となる電気化学センサー用電極 1 2 A 及び対極となる電気化学センサー用電極 1 2 C、第 2 の作用極 1 2 B となる電気化学センサー用電極及び対極となる電気化学センサー用電極 1 2 C 間に電位制御手段 3 2 により所定の電位差を設けるようにする。このとき、参照極 3 4 の電位を参照しながら所定の電位に設定するようにする。

## 【 0 0 6 1 】

ここでも基本的には電気化学的検出装置 2 1 と同様の操作により検出操作を行うものであり、異なるのは作用極を 2 つ設けている点である。このように複数の作用極を設けることにより、異なる電位差を有する作用極を作ることができる。そして、異なる電位差の作用極を利用することで、同一溶液中の複数の検出対象物質を一度の通液操作で検出することを可能としている。

30

## 【 0 0 6 2 】

以上で説明したように、本実施形態の電気化学センサー用電極は、表面に特定のアプタマーが固定され、数十ナノメートル～マイクロメートルオーダーの均一な円筒型直孔を持ち、表面が平滑で、かつ厚さが数マイクロメートル～十マイクロメートル前後と極めて薄いという特徴を持つものであり、これを複数枚重ねてモジュール化して電気化学センサーとし、これを用いて検出対象物質を測定することで従来の構造的限界を超えた新しい電気化学的検出装置及び方法を提供することができる。

40

## 【 0 0 6 3 】

そして、作用極となる電気化学センサー用電極を複数枚重ねて用い、それぞれ独立して電位を設定することによって、極めて高い検出感度を有する多重電極が実現する。この電極の間に必要に応じて適当なスペーサーを挿入し、さらに電解液の流速をコントロールして、作用極から対極への反応物質の輸送時間を制御しながら検出対象物質を検出する。

## 【 0 0 6 4 】

本実施形態の電気化学センサー用電極は、ろ過膜の細孔内部まで導電膜でコーティングされているため電極としての表面積が大きく、さらにろ過膜細孔への電解液の強制流によ

50

って反応物質の電極表面への輸送が促されるため優れた反応効率を示し、高感度に検出対象物質を検出することができる。またこの電極は極めて薄いという特長を持つことから、複数枚重ねて作製した多重電極では、それぞれ異なるアプタマーを固定しておくことで、多項目の測定が簡便かつ容易な操作で可能となる。

#### 【0065】

また、図4は、電気化学的検出装置を小型の簡易測定を可能とする装置の一例、電気化学的検出装置41、を示している。この電気化学的検出装置41は、第1の作用極となる電気化学センサー用電極12A、第2の作用極となる電気化学センサー用電極12B、対極42と、参照極43と、検出対象溶液供給部44と、電気化学センサー用電極を挟み込む上基材45及び下基材46と、から構成されるものである。なお、電位制御手段および電流測定手段は、図示は省略しているが、図3に示した電気化学的検出装置31と同様の構成とすればよい。なお、この図4も、図2及び3と同様、構成を説明するために、積層体を展開して示したものである。

10

#### 【0066】

このように薄い基材を用い本実施形態の電気化学センサー用電極を挟み込むことで、装置の薄型化が可能となる。ここで、上基材45には検出対象溶液の導入流路45a、下基材46には検出対象溶液の排出流路46aが、それぞれ設けられており、検出対象溶液を、検出対象溶液供給部44から導入流路45aに供給し、次いで排出流路46aから排出することで測定が可能である。このとき、排出にあたっては、吸引して排出を促進することが好ましく、シリンジ等を使用することで微小な流路の吸引を容易に行うこともできる。

20

#### 【0067】

また、このように基材で挟む場合には、基材間の流路の周囲に、ゴム等の弾性部材を設けることで、その検出対象溶液の流路を密閉して、検出対象溶液が漏れないようにすることが好ましい。

#### 【0068】

ここで用いる基材としては、プレート状でも、フィルム状でもよい。密閉性を考慮すると、プレート状であることが好ましい。また、薄型化を考慮するとフィルム状であることが好ましい。ここで用いる材料としては、特に限定されるものではないが、軽量で加工性が良好であることから、アクリル、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリオレフィン、ポリイミド、ポリエーテルイミド、ポリエチレン、ポリプロピレン等の樹脂製であることが好ましい。

30

#### 【実施例】

#### 【0069】

次に、本発明の実施例について説明する。

#### (実施例1)

孔径が $20.0\ \mu\text{m}$ 、厚さ $9.5\ \mu\text{m}$ 、直径 $47\ \text{mm}$ のトラックエッチドメンブレンフィルター(GVS社製)の両表面に、イオンスパッター装置(日立製作所製、商品名:E-1030型)を用いて、スパッタリング電流 $40\ \text{mA}$ の条件で金を $200$ 秒間真空蒸着した。

#### 【0070】

得られた金層を有するメンブレンフィルターの表裏両面に、それぞれ $30$ 分間エキシマ光(ウシオ電機株式会社製、商品名:Min-Excimer)を照射し、表面処理を行い、次いで、濃度 $2 \times 10^{-7}\ \text{M}$ でトロンピンアプタマーを含有するリン酸緩衝生理食塩水( $\text{pH}\ 6.8$ )に $14$ 時間浸漬した後、そのまま $90^\circ\text{C}$ まで加熱して $6$ 分間保持し、 $90$ 分かけて常温まで徐冷した。

40

#### 【0071】

さらに、このメンブレンフィルターを $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝生理食塩水( $\text{pH}\ 6.8$ )に $10$ 分間漬け置きして洗浄し、 $1\ \text{mM}$ メルカプトヘキサノール溶液に $1$ 時間浸漬した後、再度 $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝生理食塩水( $\text{pH}\ 6.8$ )に $10$ 分間漬け置きして洗浄して、アプタマー密度 $2 \times 10^{-11}\ \text{mol}/\text{cm}^2$ 以下の電気化学センサー用電極を作製した

50

## 【 0 0 7 2 】

また、 $20.0\ \mu\text{m}$ 、直径 $47\ \text{mm}$ のトラックエッチドメンブレンフィルター（GVS社製）の両表面に、イオンスパッター装置（日立製作所製、商品名：E-1030型）を用いて、スパッタリング電流 $40\ \text{mA}$ の条件で白金を $200$ 秒間真空蒸着して、電気化学センサー用電極を作製した。

## 【 0 0 7 3 】

金電極を基盤として形成した電気化学センサー用電極を作用極とし、白金電極を形成した電気化学センサー用電極を対極とし、また両電極の間に孔径 $20.0\ \mu\text{m}$ のトラックエッチドメンブレンフィルター（GVS社製）をスペーサーとして挟んで重ね、径 $4\ \text{mm}$ の試料挿入口および排出口を備えた厚さ $5\ \text{mm}$ のアクリル樹脂製の上下基材の間に挟み（図4）、それぞれの電極をポテンショスタット（Bio-Logic製、商品名：SP-150型）に接続した。参照極には銀/塩化銀を用い、液絡部の先を作用極の上部、約 $10\ \text{mm}$ の位置にセットした（図4参照）。

## 【 0 0 7 4 】

電解液として、 $1\ \text{mM}$ フェリシアン化カリウム/フェロシアン化カリウム水溶液（支持電解質として $0.1\ \text{M}$ 濃度の $\text{KCl}$ を含む）を用い、初期電位  $0.200\ \text{V}$  vs. 参照極（ $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ）、測定範囲  $0 \sim 0.500\ \text{V}$ 、スキャン速度  $50\ \text{mV}/\text{s}$ 、サイクル数 $5$ で、電気化学測定を行った。

## 【 0 0 7 5 】

次いで、作用極として得られた電気化学センサー用電極を、濃度 $1.2 \times 10^{-7}\ \text{M}$ のトロンピンを含むリン酸緩衝生理食塩水（ $\text{pH}\ 6.8$ ）に、 $37^\circ\text{C}$ で $30$ 分間浸漬させた後、 $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝生理食塩水（ $\text{pH}\ 6.8$ ）に $10$ 分間漬け置きして洗浄し、トロンピンを捕捉した電極を得た。この電極を、上記と同条件で電気化学測定を行った。

## 【 0 0 7 6 】

電気化学センサー用電極において、トロンピンとの浸漬処理の前後における上記電気化学測定で得られた結果をそれぞれ図5に示す。図5（a）はトロンピンアプタマーで修飾した後のサイクリックボルタモグラムであり、図5（b）は、トロンピンを捕捉した後のサイクリックボルタモグラムである。この図から、トロンピンを捕捉した電極においては、捕捉していないものと比べて、フェリシアン化カリウム/フェロシアン化カリウムの酸化/還元に伴う電流が低下し、トロンピンを捕捉したこと、すなわち検出対象溶液中に検出対象物質が含まれていると判断できる。

## 【 0 0 7 7 】

（実施例2）

実施例1において、トロンピンアプタマーを含有するリン酸緩衝液の代わりに濃度 $1 \times 10^{-6}\ \text{M}$ でリゾチームアプタマーを含有するリン酸緩衝生理食塩水（ $\text{pH}\ 6.8$ ）を用いて、導電層の表面に密度 $1 \times 10^{-10}\ \text{mol}/\text{cm}^2$ 以下のリゾチームアプタマーが固定された電気化学センサー用電極を製造した。

## 【 0 0 7 8 】

次いで、作用極として得られた電気化学センサー用電極を、濃度 $2.3 \times 10^{-4}\ \text{M}$ のリゾチームを含むリン酸緩衝生理食塩水（ $\text{pH}\ 6.8$ ）に、 $37^\circ\text{C}$ で $30$ 分間浸漬させた後、 $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝生理食塩水（ $\text{pH}\ 6.8$ ）に $10$ 分間漬け置きして洗浄し、リゾチームを捕捉した電極を得た。この電極を、実施例1と同条件で電気化学測定を行った。

## 【 0 0 7 9 】

電気化学センサー用電極において、リゾチームとの浸漬処理の前後における上記電気化学測定で得られた結果をそれぞれ図6に示す。図6（a）はリゾチームアプタマーで修飾した後のサイクリックボルタモグラムであり、図6（b）は、リゾチームを捕捉した後のサイクリックボルタモグラムである。この図から、リゾチームを捕捉した電極においては、捕捉していないものと比べて、フェリシアン化カリウム/フェロシアン化カリウムの酸

化 / 還元に伴う電流が低下し、リゾチームを捕捉したこと、すなわち検出対象溶液中に検出対象物質が含まれていると判断できる。

【 0 0 8 0 】

以上より、本発明の電気化学センサー用電極を用いた電気化学センサーにより測定を行うことで、特定の物質の存在の有無を、簡便かつ容易な操作で検出、判断できることが確認できた。

【符号の説明】

【 0 0 8 1 】

1 ... 電気化学センサー用電極、 2 ... ろ過膜、 3 ... 導電膜、 4 ... アプタマー、 1 1 , 1 2 ... 電気化学センサー、 1 1 A ... 作用極となる電気化学センサー用電極、 1 1 B ... 対極となる電気化学センサー用電極、 1 2 A ... 第 1 の作用極となる電気化学センサー用電極、 1 2 B ... 第 2 の作用極となる電気化学センサー用電極、 1 2 C ... 対極となる電気化学センサー用電極、 1 2 D ... スペース、 2 1 ... 電気化学的検出装置、 2 2 ... 電位制御手段、 2 3 ... 電流測定手段、 2 4 ... 参照極、 2 5 ... 検出対象溶液供給部、 2 6 ... 吸引部

10

20

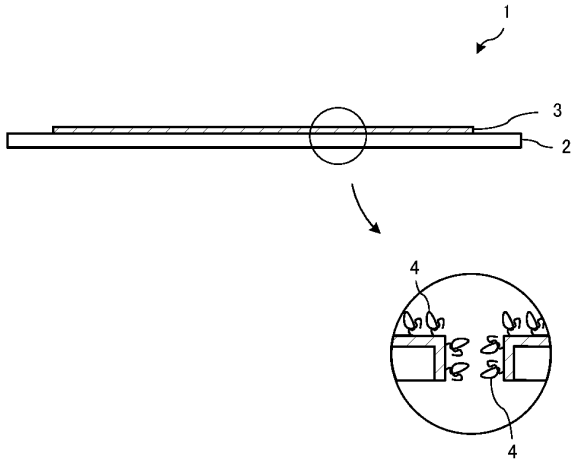
30

40

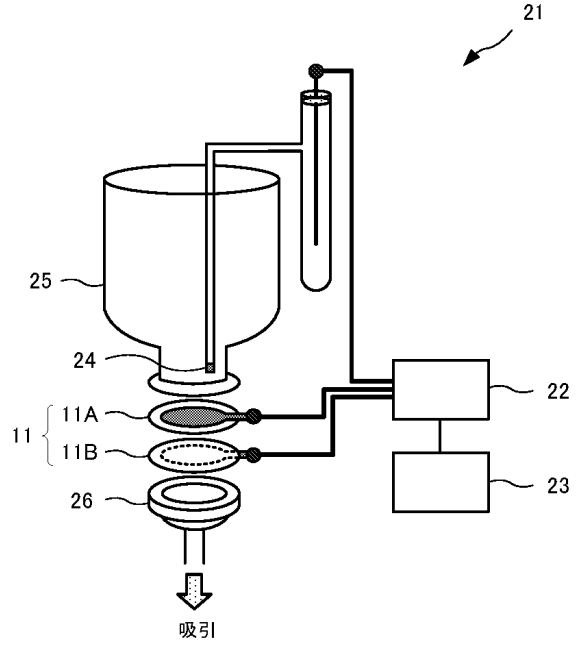
50

【 図面 】

【 図 1 】



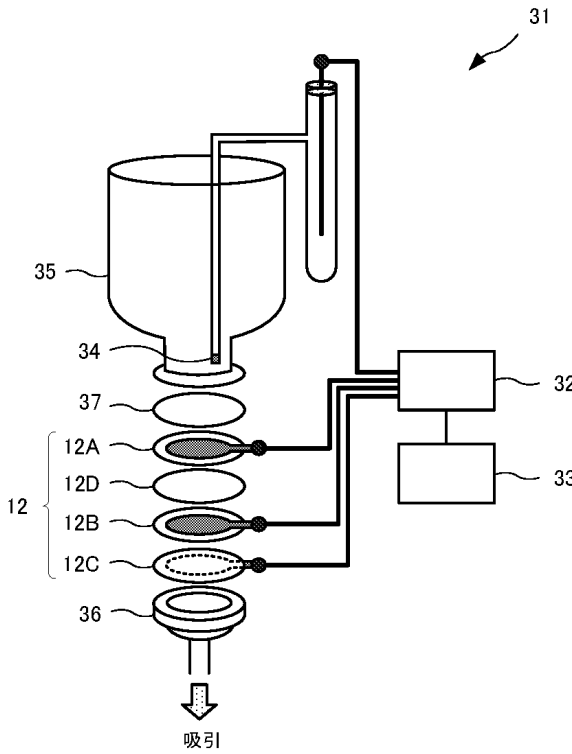
【 図 2 】



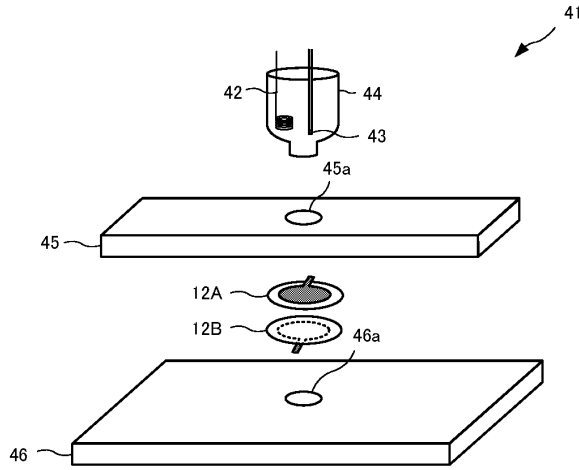
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

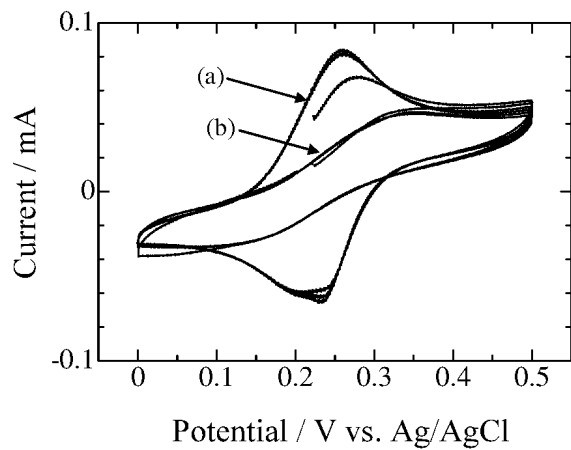


30

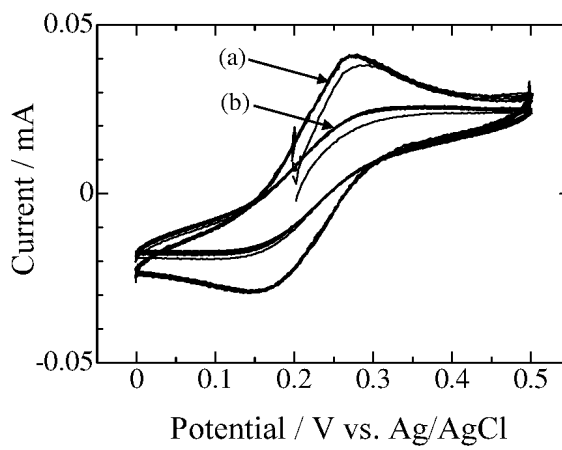
40

50

【 5 】



【 6 】



10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0283424 (US, A1)  
特表2014-518567 (JP, A)  
特開2011-080773 (JP, A)  
特開2015-081843 (JP, A)  
特開2002-207026 (JP, A)  
米国特許出願公開第2013/0264221 (US, A1)  
特開2001-091512 (JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
G01N 27/26 - 27/49