

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-60375

(P2010-60375A)

(43) 公開日 平成22年3月18日(2010.3.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/30 (2006.01)	GO 1 N 27/30 B	
GO 1 N 27/327 (2006.01)	GO 1 N 27/30 3 5 1	
GO 1 N 27/416 (2006.01)	GO 1 N 27/30 3 5 3 J	
	GO 1 N 27/46 3 3 6 G	
	GO 1 N 27/46 3 3 8	
審査請求 未請求 請求項の数 31 O L (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-224938 (P2008-224938)	(71) 出願人	000004237
(22) 出願日	平成20年9月2日 (2008.9.2)		日本電気株式会社
			東京都港区芝五丁目7番1号
		(71) 出願人	301023238
			独立行政法人物質・材料研究機構
			茨城県つくば市千現一丁目2番地1
		(74) 代理人	100077838
			弁理士 池田 憲保
		(74) 代理人	100082924
			弁理士 福田 修一
		(74) 代理人	100129023
			弁理士 佐々木 敬
		(72) 発明者	松本 達
			東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内
		最終頁に続く	

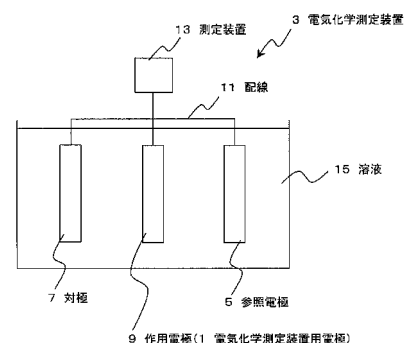
(54) 【発明の名称】 電気化学測定装置用電極およびバイオセンサ用電極

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】金、白金ならびにイリジウムと同様に溶液に含まれる特定成分に対して電流出力を生じさせることができ、安価でかつ耐久性に優れた安価な電極を提供する。

【解決手段】溶液中の特定成分の濃度を測定する電気化学測定装置3に用いられる作用電極9(電気化学測定装置用電極1)は、イリジウムとニッケルを含む合金が用いられており、作用電極9は溶液に含まれる特定成分を検出可能に構成されている。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

溶液中に含まれる特定成分を検出可能な組成となるようにイリジウムとニッケルを含有していることを特徴とする電気化学測定装置用電極。

【請求項 2】

イリジウムとニッケルとを、過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能な組成となるように含有した合金で構成されていることを特徴とする請求項 1 記載の電気化学測定装置用電極。

【請求項 3】

前記合金は、イリジウムとニッケルの原子比率が 50 : 50 ~ 5 : 95 の範囲であることを特徴とする請求項 1 または 2 のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極。

10

【請求項 4】

前記合金は、イリジウムとニッケルの原子比率が 40 : 60 ~ 10 : 90 の範囲であることを特徴とする請求項 1 または 2 のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極。

【請求項 5】

前記合金は、
イリジウム - ニッケル合金であることを特徴とする請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極を有することを特徴とする電気化学測定装置。

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極の表面に、固定化触媒層を設けてなることを特徴とするバイオセンサ用電極。

【請求項 8】

前記固定化触媒層は、固定化酵素層であり、
前記固定化酵素層は、
前記特定成分を、過酸化水素に変換可能な少なくとも 1 つの種類の酵素を有し、
前記固定化酵素層が変換した過酸化水素を前記電気化学測定装置用電極が検出することにより、前記特定成分を検出することを特徴とする請求項 7 記載のバイオセンサ用電極。

30

【請求項 9】

前記酵素は、
乳酸酸化酵素、グルコース酸化酵素、尿酸酸化酵素、尿素酸化酵素、アルコール酸化酵素、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼのうちの少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 8 記載のバイオセンサ用電極。

【請求項 10】

前記固定化触媒層は、固定化抗体層であり、
前記固定化抗体層は、
前記特定成分と反応可能な少なくとも 1 つの種類の抗体を有し、
前記固定化抗体層中の前記抗体と前記特定成分との反応により生じる電流を、前記電気化学測定装置用電極が検出することにより、前記特定成分を検出することを特徴とする請求項 7 記載のバイオセンサ用電極。

40

【請求項 11】

前記抗体は、
ダイオキシシン抗体、内分泌攪乱物質の抗体、残留農薬の抗体のいずれかであることを特徴とする請求項 10 記載のバイオセンサ用電極。

【請求項 12】

前記固定化触媒層は、アプタマーを有する層であることを特徴とする、請求項 7 記載のバイオセンサ用電極。

【請求項 13】

50

前記アプタマーは、DNAアプタマー、RNAアプタマー、ペプチドアプタマーのいずれかであることを特徴とする請求項12記載のバイオセンサ用電極。

【請求項14】

前記アプタマーは、コカインアプタマー、トロピンアプタマー、トリニトロトルエンアプタマーのいずれかであることを特徴とする請求項12記載のバイオセンサ用電極。

【請求項15】

前記電気化学測定装置用電極を保持する絶縁基板と、

前記電気化学測定装置用電極と前記固定化触媒層の間に設けられ、かつ前記電気化学測定装置用電極を覆うように、前記絶縁基板および電気化学測定装置用電極上に設けられた結合層と、

10

をさらに有することを特徴とする請求項7記載のバイオセンサ用電極。

【請求項16】

請求項7～15のいずれかに記載のバイオセンサ用電極を有することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項17】

溶液中に含まれる特定成分を検出可能な組成となるようにイリジウムとニッケルを含む合金を、アーク放電法、蒸着法、スパッタリング法のいずれかで製造する工程を有することを特徴とする電気化学測定装置用電極の製造方法。

【請求項18】

前記工程は、イリジウムとニッケルとを、過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能な組成となるように含有した合金を製造する工程であることを特徴とする請求項17記載の電気化学測定装置用電極の製造方法。

20

【請求項19】

前記工程は、イリジウムとニッケルの原子比率が50:50～5:95の範囲である合金を製造する工程であることを特徴とする請求項17または18のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極の製造方法。

【請求項20】

前記合金は、イリジウムとニッケルの原子比率が40:60～10:90の範囲である合金を製造する工程であることを特徴とする請求項17または18のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極の製造方法。

30

【請求項21】

請求項1～5のいずれかに記載の電気化学測定装置用電極の表面に固定化触媒層を設ける工程を有することを特徴とするバイオセンサ用電極の製造方法。

【請求項22】

前記工程は、

固定化触媒層として、前記特定成分を、過酸化水素に変換可能な少なくとも1つの酵素を前記電気化学測定装置用電極の表面に固定して固定化酵素層を設ける工程であることを特徴とする請求項21記載のバイオセンサ用電極の製造方法。

【請求項23】

前記工程は、

乳酸酸化酵素、グルコース酸化酵素、尿酸酸化酵素、尿素酸化酵素、アルコール酸化酵素、クレアチナーゼ、クレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼのうち、少なくとも1つを前記電気化学測定装置用電極の表面に固定して固定化酵素層を設ける工程であることを特徴とする請求項22記載のバイオセンサ用電極の製造方法。

40

【請求項24】

前記工程は、

固定化触媒層として、前記特定成分と反応可能な少なくとも1つの抗体を前記電気化学測定装置用電極の表面に固定して固定化抗体層を設ける工程であることを特徴とする請求項21記載のバイオセンサ用電極の製造方法。

【請求項25】

50

前記工程は、

ダイオキシン抗体、内分泌攪乱物質の抗体、残留農薬の抗体のうちのいずれかを前記電気化学測定装置用電極の表面に固定して固定化抗体層を設ける工程であることを特徴とする請求項 2 4 記載のバイオセンサ用電極の製造方法。

【請求項 2 6】

前記工程は、

固定化触媒層として、前記特定成分と反応可能な少なくとも 1 つのアプタマーを前記電気化学測定装置用電極の表面に固定する工程であることを特徴とする請求項 2 1 記載のバイオセンサ用電極の製造方法。

【請求項 2 7】

前記工程は、コカインアプタマー、トロンピンアプタマー、トリニトロトルエンアプタマーのうちのいずれかを前記電気化学測定装置用電極の表面に固定する工程であることを特徴とする請求項 2 6 記載のバイオセンサ用電極の製造方法。

【請求項 2 8】

請求項 6 記載の電気化学測定装置を用い、電流検出方式により、溶液中の過酸化水素の濃度を測定することを特徴とする測定方法。

【請求項 2 9】

請求項 1 6 記載のバイオセンサを用い、電流検出方式により、溶液中の特定成分の濃度を測定することを特徴とする測定方法。

【請求項 3 0】

少なくともサイクリックボルタンメトリ法とパルスボルタンメトリ法のいずれか一方の測定方法を実施することを特徴とする請求項 2 8 または 2 9 記載の測定方法。

【請求項 3 1】

前記パルスボルタンメトリ法は、ノーマルパルスボルタンメトリ法、微分パルスボルタンメトリ法、方形波ボルタンメトリ法のいずれかであることを特徴とする請求項 3 0 記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、電気化学測定装置用電極および電気化学測定装置用電極を用いた電気化学測定装置、バイオセンサ用電極およびバイオセンサ用電極を用いたバイオセンサ、電気化学測定装置用電極の製造方法、バイオセンサ用電極の製造方法、電気化学測定装置を用いた測定方法、バイオセンサを用いた測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

多種多様な溶液に含まれる各種成分の分析は、電極表面で生じる電気化学反応を測定する方法や、同反応と特定のタンパク質が持つ触媒反応とを組み合わせた測定方法が広く用いられている。

【0003】

前述の例としては、洗浄液等に使用されている溶液中の過酸化水素濃度は、カーボン電極、あるいは白金等の貴金属電極を用い、印加時に得られる過酸化水素の酸化電流値を測定することによって算出することができる。

【0004】

この理由は印加時に過酸化水素の濃度に応じた酸化電流が発生するためである。

【0005】

後述の例としては、溶液中の化学物質を酵素の触媒機能により、過酸化水素に変換し、この過酸化水素を酸化還元反応により計測するバイオセンサが汎用化している。

【0006】

具体的には、グルコースバイオセンサの場合、グルコースをグルコースオキシダーゼによって酸化すると、グルコノラクトンと過酸化水素が生成される。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

生成される過酸化水素はグルコース濃度に比例することから、この過酸化水素の生成量を測定することによって試料中のグルコース量を定量することが可能になる。

【 0 0 0 8 】

この過酸化水素の生成量は、前述したように電極表面で生じる電気化学反応を測定することによって算出されている。

【 0 0 0 9 】

ここで、この種の電極においては、過酸化水素に対する酸化能力の高い材料として貴金属が使用される場合が多い。

【 0 0 1 0 】

例えば特許文献 1 の図 1 に示されている電極材料は、白金が好ましく用いられると記載されている（特許文献 1）。

【 0 0 1 1 】

また、非特許文献 1 の Figure 2 に示されている作用極の材料は白金であり、両電極共に、過酸化水素に対する印加後の電流値を測定することによってグルコース量を測定するものであった（非特許文献 1）。

【 0 0 1 2 】

さらに、非特許文献 2 で公開されている電極材料は酸化イリジウムである（非特許文献 2）。

【 0 0 1 3 】

一方、貴金属以外の電極としては、例えば特許文献 2 に記載されているカーボン電極がある（特許文献 2）。

【 0 0 1 4 】

また、この種の電極としてはアプタマーを用いたバイオセンサ用の電極として金が使用されている。

【 0 0 1 5 】

例えば、非特許文献 3 の図 1 には、コカインセンサーの電極として金を使用した旨記載されている。

【 0 0 1 6 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 1 - 1 1 6 7 1 6 号公報

【特許文献 2】実開平 6 - 7 0 5 7 号公報

【非特許文献 1】G.Piechotta, J. Albers and R. Hintsche, "Novel micromachined silicon sensor for continuous glucose monitoring", Biosensors and Bioelectronics, Volume 21, Issue 5, Elsevier B.V., (Netherlands), 15 November 2005, p. 802-808

【非特許文献 2】Faming Tian and Guoyi Zhu, "Sol-gel derived iridium composite glucose biosensor", Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier B.V., (Netherlands), Volume 86, September 2002, p. 266-270

【非特許文献 3】Brian R. Baker, Rebecca Y. Lai, McCall S. Wood, Elaine H. Doctor, Alan J. Heeger, and Kevin W. Plaxco, "An Electronic, Aptamer-Based Small-Molecule Sensor for the Rapid, Label-Free Detection of Cocaine in Adulterated Samples and Biological Fluids", Journal of the American Chemical Society 128, 2006, p. 3138-3139

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 7 】

特許文献 1、非特許文献 1、3 のような金や白金を用いた電極は、過酸化水素の検出用電極およびそれを用いた電気化学測定装置やバイオセンサ用の電極としては有用である。

【 0 0 1 8 】

しかしながら、金や白金を電極材料に用いて製作された電流検出型の過酸化水素センサーの場合においては、金や白金は希少金属であるために、非常に高価になってしまうという

10

20

30

40

50

問題があった。

【００１９】

一方で、非特許文献２のように、イリジウムを電極材料に用いた場合、金や白金よりも安価であるものの、さらにコストを下げる工夫が要求されている。

【００２０】

他方で、特許文献２のようなカーボン電極材料を用いて製作された同センサの場合においては、材料費が安価であるが、電極の安定性が低く、長期間の使用に耐えられないという問題があった。

【００２１】

この傾向は特に酵素電極に用いた場合顕著に認められ、安定して高い測定精度を維持することは極めて困難であった。

10

【００２２】

また、カーボン電極は貴金属と比べて損傷しやすいため、カーボンが剥離するなどの損傷が生じないような、慎重な取り扱いが要求されるという問題もあった。

【００２３】

本発明は上記理由に鑑みてなされたものであり、その目的は、金、白金、イリジウムならびにカーボンの代替材料を用いた電気化学測定装置用電極を提供することである。

【００２４】

より詳しくは、白金ならびにイリジウムと同様に溶液に含まれる特定成分に対して電流出力を生じさせることができ、安価でかつカーボンよりも耐久性に優れた安価な電気化学測定装置用電極、およびこれを用いて製作される電気化学測定装置、並びに電気化学測定装置用電極を用いたバイオセンサ用電極、バイオセンサ用電極を用いたバイオセンサを提供することである。

20

【００２５】

もしくはこれらと同様に抗体およびアプタマーが光源と反応する際の電子の授受を電流値として効率的に検出できるバイオセンサを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００２６】

前述した目的を達成するために、第１の発明は、溶液に含まれる特定成分を検出可能な組成となるようにイリジウムとニッケルを含有していることを特徴とする電気化学測定装置用電極である。

30

【００２７】

第２の発明は、第１の発明に記載の電気化学測定装置用電極を有することを特徴とする電気化学測定装置である。

【００２８】

第３の発明は、第１の発明に記載の電気化学測定装置用電極の表面に、固定化触媒層を設けてなることを特徴とするバイオセンサ用電極である。

【００２９】

第４の発明は、第３の発明に記載のバイオセンサ用電極を有することを特徴とするバイオセンサである。

40

【００３０】

第５の発明は、溶液に含まれる特定成分を検出可能な組成となるようにイリジウムとニッケルを含む合金を、アーク放電法、蒸着法、スパッタリング法のいずれかで製造する工程を有することを特徴とする電気化学測定装置用電極の製造方法である。

【００３１】

第６の発明は、第１の発明に記載の電気化学測定装置用電極の表面に固定化触媒層を設ける工程を有することを特徴とするバイオセンサ用電極の製造方法である。

【００３２】

第７の発明は、第２の発明に記載の電気化学測定装置を用い、電流検出方式により、溶液中の過酸化水素の濃度を測定することを特徴とする測定方法である。

50

【 0 0 3 3 】

第 8 の発明は、第 4 の発明に記載のバイオセンサを用い、電流検出方式により、溶液中の特定成分の濃度を測定することを特徴とする測定方法である。

【発明の効果】

【 0 0 3 4 】

本発明によれば、金、白金、イリジウムならびにカーボンの代替材料を用いた電気化学測定装置用電極を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 3 5 】

以下、図面に基づいて本発明に好適な実施形態を詳細に説明する。

10

【 0 0 3 6 】

まず、図 1 を参照して、本発明の第 1 の実施形態に係る電気化学測定装置用電極 1 を有する電気化学測定装置 3 の構成を説明する。

【 0 0 3 7 】

ここでは、電気化学測定装置 3 として、溶液 1 5 中に含まれる特定成分としての過酸化水素の濃度を測定する電気化学測定装置が例示されている。

【 0 0 3 8 】

図 1 に示された電気化学測定装置 3 は、溶液 1 5 中の過酸化水素を酸化する作用電極 9 (電気化学測定装置用電極 1)、電位の基準となる電極である参照電極 5、および必要に応じて設けられる対極 7 を有している。

20

【 0 0 3 9 】

さらに、電気化学測定装置 3 は、測定の際の電位の印加等の制御および酸化電流を計測して過酸化水素濃度の測定を行う測定装置 1 3、各電極と測定装置 1 3 を接続する配線 1 1 を有している。

【 0 0 4 0 】

電気化学測定装置 3 は、作用電極 9、対極 7、参照電極 5 を過酸化水素を含む溶液 1 5 中に浸漬し、測定装置 1 3 を介して定電位を印加し、作用電極 9 の表面で過酸化水素が酸化される際に得られる酸化電流の値を測定することにより、溶液 1 5 中の過酸化水素濃度を測定する装置である。

【 0 0 4 1 】

30

即ち、電気化学測定装置 3 は、電流検出方式により、溶液中の過酸化水素の濃度を測定する。

【 0 0 4 2 】

ここで、前述の通り、作用電極 9 は、金、白金ならびにイリジウムと同様に過酸化水素に対して効率よく電流出力を生じさせることができ、安価で、かつ、カーボンよりも耐久性に優れた構造、材料であることが望ましい。

【 0 0 4 3 】

上記問題に対して、発明者らは鋭意検討の結果、電極に、少なくともイリジウムとニッケルを含み、かつ、イリジウムとニッケルとを、過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能な組成となるように含有した合金を用いることにより、白金やイリジウムのみを用いた電極よりも安価で、かつ、カーボンを用いた電極よりも耐久性に優れた電極とすることが可能であることを見出した。

40

【 0 0 4 4 】

以下、合金中の各物質についてより詳細に説明する。

【 0 0 4 5 】

イリジウムは、過酸化水素に対する高い酸化力を有し、かつ従来の作用電極の材料として用いられる白金と比べて、安価で加工性に優れた材料であり、かつカーボンよりも耐久性があり、溶液 1 5 中の過酸化水素を酸化するために必須である。

【 0 0 4 6 】

ニッケルは白金やイリジウムと比べて安価な元素であり、かつ、カーボンよりも耐久性

50

があり、必須である。

【 0 0 4 7 】

ここで、合金中のニッケルの含有率は、合金中のイリジウムとニッケルの原子比率が 50 : 50 ~ 5 : 95 の範囲であることが望ましく、40 : 60 ~ 10 : 90 の範囲であることがより望ましい。

【 0 0 4 8 】

上記組成範囲外では、十分な過酸化水素に対する選択性が得られなくなり、電位窓が狭まるという問題を生じる。

【 0 0 4 9 】

これは、イリジウムとニッケルの比率によって、酸化性や電位窓が影響を受けるためであると考えられる。

【 0 0 5 0 】

なお、合金をイリジウムとニッケルのみで構成してもよい。

【 0 0 5 1 】

上記合金は、例えばアーク放電法、蒸着法、スパッタリング法によって製造されるが、材料を無駄なく利用できる点において、アーク放電法によって製造されるのが好ましい。

【 0 0 5 2 】

なお、参照電極 5 としては公知の電極を用いることができ、例えばガラス複合電極が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

また、対極 7 としても公知の電極を用いることができ、例えば白金電極が挙げられる。

【 0 0 5 4 】

ここで、電気化学測定装置 3 を用いた、溶液 15 中の過酸化水素の濃度の測定方法について詳細に説明する。

【 0 0 5 5 】

まず、作用電極 9、対極 7、参照電極 5 を、過酸化水素を含まない溶液 15 中に浸漬する。

【 0 0 5 6 】

各電極が溶液 15 中に浸漬されると、測定装置 13 を用いて定電位を印加し、電流値が定常状態になってから過酸化水素を添加する。

【 0 0 5 7 】

電位の印加により、作用電極 9 の表面では過酸化水素が酸化され、酸化電流が生じる。

【 0 0 5 8 】

測定装置 13 は定常状態の電流値から酸化電流の差を元に、溶液 15 中の過酸化水素濃度を算出する。

【 0 0 5 9 】

溶液 15 に過酸化水素が添加された溶液としては、例えば食品製造に用いられる洗浄液が該当する。

【 0 0 6 0 】

なお、測定方法は上記方法に限定されるものではない。

【 0 0 6 1 】

測定法としては、サイクリックボルタンメトリ法、パルスボルタンメトリ法（ノーマルパルスボルタンメトリ法、微分パルスボルタンメトリ法、方形波ボルタンメトリ法を含む）等、種々の測定法を使用してもよい。好ましくは最も測定精度に優れた方形波ボルタンメトリ法が好ましい。

【 0 0 6 2 】

このように、第 1 の実施形態によれば、電気化学測定装置 3 は、作用電極 9、対極 7、参照電極 5、測定装置 13 を有し、作用電極 9 は、イリジウムとニッケルを含み、かつ、イリジウムとニッケルとを、過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能な組成となるように含有した合金が用いられている。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

そのため、作用電極 9 は、金、白金やイリジウムのみを用いた電極よりも安価で、かつ、カーボンを用いた電極よりも耐久性に優れており、金、白金、イリジウム、カーボン電極の代替電極として用いることができる。

【 0 0 6 4 】

次に、第 2 の実施形態について、図 2 を参照して説明する。

【 0 0 6 5 】

第 2 の実施形態は、第 1 の実施形態において、作用電極 9 a を、表面が触媒機能を有する生体高分子を固定化した固定化触媒層 6 で覆われたバイオセンサ用電極 4 とし、装置全体をバイオセンサ 3 a としたものである。

10

【 0 0 6 6 】

なお、第 2 の実施形態において、第 1 の実施形態と同様の効果を奏する要素については同一の番号を付し、説明を省略する。

【 0 0 6 7 】

図 2 (a) に示すように、バイオセンサ 3 a の構成は電気化学測定装置 3 と同様であるが、表面が固定化触媒層 6 で覆われた作用電極 9 a (バイオセンサ用電極 4) を有している。

【 0 0 6 8 】

さらに、バイオセンサ 3 a は、測定の際の電位の印加等の制御および酸化電流を計測して、測定対象物質の濃度を測定する測定装置 1 3 a を有している。

20

【 0 0 6 9 】

図 2 (b) に示すように、バイオセンサ用電極 4 は、電気化学測定装置用電極 1 と、電気化学測定装置用電極 1 の表面に設けられた固定化触媒層 6 を有している。

【 0 0 7 0 】

電気化学測定装置用電極 1 の構造、組成は、第 1 の実施形態に係る電気化学測定装置用電極 1 と同様であり、イリジウムとニッケルを含み、かつ、イリジウムとニッケルとを、過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能な組成となるように含有した合金が用いられている。

【 0 0 7 1 】

固定化触媒層 6 は、例えば固定化酵素層または固定化抗体層である。

30

【 0 0 7 2 】

固定化酵素層は、測定対象物質を過酸化水素に変換する酵素を含む層である。

【 0 0 7 3 】

固定化触媒層 6 が固定化酵素層の場合、バイオセンサ 3 a は、固定化触媒層 6 の酵素が測定対象物質を過酸化水素に変換し、得られた過酸化水素が電気化学測定装置用電極 1 の表面で酸化される際に生じる酸化電流を測定することにより、溶液 1 5 a 中の測定対象物質の濃度を測定することができる。

【 0 0 7 4 】

即ち、バイオセンサ 3 a は、電流検出方式により、溶液中の過酸化水素の濃度を測定することにより、溶液中の測定対象物質の濃度を測定することができる。

40

【 0 0 7 5 】

酵素としては、測定対象物質の触媒反応の生成物として過酸化水素を生成する、または酸素を消費する酵素である必要があり、測定対象物質に応じて乳酸酸化酵素、グルコース酸化酵素、尿酸酸化酵素、尿素酸化酵素、アルコール酸化酵素等が用いられる。

【 0 0 7 6 】

また、2 種類以上の酵素を同時に用いてもよい。例えば、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、およびサルコシンオキシダーゼがこれに該当する。

【 0 0 7 7 】

これらの酵素を用いることによってクレアチニンの検出が可能になる。

【 0 0 7 8 】

50

さらに、酵素と補酵素を含んでいてもよい。

【0079】

酵素を電気化学測定装置用電極1の表面に固定する方法としては、公知の方法を用いることができるが、例えば架橋反応を利用したものが挙げられる。

【0080】

具体的には、酵素溶液、グルタルアルデヒド等の蛋白質の架橋剤、およびアルブミン等のタンパク質を含む溶液を、電気化学測定装置用電極1の表面に滴下することにより電気化学測定装置用電極1の表面に酵素が固定され、固定化触媒層6としての固定化酵素層が形成される。

【0081】

一方、固定化触媒層6が固定化抗体層の場合、抗体と溶液中の抗原とが反応する際に電子の授受が行われるため、バイオセンサ3aは、その際に例えば方形波ボルタンメトリ測定を行うことにより、この電子の授受に起因して生じる電流を測定することができ、溶液中の特定物質の濃度を測定することができる。

【0082】

抗体としては、測定対象物質に応じて、ダイオキシシン抗体としてポリ塩化ジベンゾパラジオキシシンの抗体、内分泌攪乱物質の抗体としてビスフェノールAの抗体、残留農薬の抗体等としてジクロルホスの抗体が好ましく用いられる。

【0083】

また、固定化触媒層6はアプタマーを有しても良い。

【0084】

アプタマーはDNAアプタマー、RNAアプタマー、ペプチドアプタマー等が挙げられる。

【0085】

具体的にはコカインアプタマー、トロンピンアプタマー、トリニトロトルエンアプタマーなどが好ましく用いられる。

【0086】

また、抗体やアプタマーの固定方法としては、例えば、電気化学測定装置用電極1の表面にチオール基を導入してから両者を固定する方法や、電気化学測定装置用電極1の表面にカルボキシル基を導入後、アミノカップリング薬処理後に抗体を固定化して、固定化抗体層を形成する方法が挙げられる。

【0087】

なお、アプタマーを用いる場合はアプタマーの合成時にチオール基を導入してもよい。

【0088】

このように合成することにより、合金表面にチオール基を形成する行程を省くことが可能になる。

【0089】

なお、固定化触媒層6は酵素を含む場合、測定対象物質を過酸化水素に変換する機能を持つ構成、抗体やアプタマーを含む場合、特定の印加電位において電子の授受が発生し、出力として電流値を生じる構成であれば、特に限定されない。

【0090】

ここで、バイオセンサ3aを用いた溶液15a中の測定対象物質の濃度の測定方法について詳細に説明する。

【0091】

まず、作用電極9a、対極7、参照電極5を、測定対象物質を含まない溶液15a中に浸漬する。

【0092】

ここで、固定化触媒層6が固定化酵素層の場合は、各電極が溶液15a中に浸漬されると、測定装置13aを介して定電位を印加し、定常状態になってから測定対象物質を添加する。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

各電極が測定対象物質が添加された溶液 1 5 a 中に浸漬されると、溶液 1 5 a 中の測定対象物質は作用電極 9 a の固定化酵素層と接触し、触媒反応により、過酸化水素に変換される。

【 0 0 9 4 】

得られた過酸化水素は、電位の印加により、作用電極 9 a の電気化学測定装置用電極 1 の表面で酸化され、酸化電流が生じる。

【 0 0 9 5 】

測定装置 1 3 a は酸化電流から定常状態の電流値の差から過酸化水素濃度を算出する。

【 0 0 9 6 】

さらに、測定装置 1 3 a は測定した過酸化水素濃度をもとに、溶液 1 5 a 中の測定対象物質の濃度を測定する。

【 0 0 9 7 】

固定化触媒層 2 が固定化抗体層の場合は、各電極が溶液 1 5 a 中に浸漬されると、抗体と測定対象物質が反応するため、測定装置 1 3 a を介して、例えば方形波ボルタンメトリ法にて、反応により得られる電流値を測定し、電流値をもとに、溶液 1 5 a 中の測定対象物質の濃度を測定する。

【 0 0 9 8 】

なお、測定法は方形波ボルタンメトリ法に限定されるものではない。

【 0 0 9 9 】

例えばボルタンメトリ法としてはノーマルパルスボルタンメトリ法、微分パルスボルタンメトリ法等を用いても良いし、あるいはサイクリックボルタンメトリ法を用いてもよいが、高い測定精度を得られるという点で方形波ボルタンメトリ法が好ましい。

【 0 1 0 0 】

このように、第 2 の実施形態によれば、バイオセンサ 3 a は、作用電極 9 a 、対極 7 、参照電極 5 、測定装置 1 3 a を有し、作用電極 9 a の電気化学測定装置用電極 1 は、イリジウムとニッケルを含む合金が用いられており、上記合金は過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能な組成となっている。

【 0 1 0 1 】

そのため、第 1 の実施形態と同様の効果を奏する。

【 0 1 0 2 】

次に、第 3 の実施形態について図 3 および図 4 を参照して説明する。

【 0 1 0 3 】

第 3 の実施形態におけるバイオセンサ 3 b は、第 2 の実施形態において、電気化学測定装置用電極 1 を絶縁基板 2 3 上に設け、電気化学測定装置用電極 1 と固定化触媒層 6 の間に結合層 2 4 をさらに設けて作用電極 2 5 a (バイオセンサ用電極 4 a) を構成したものである。

【 0 1 0 4 】

図 3 および図 4 に示すように、作用電極 2 5 a (バイオセンサ用電極 4 a) は絶縁基板 2 3 、絶縁基板 2 3 の表面に設けられた電気化学測定装置用電極 1 を有している。

【 0 1 0 5 】

また、図 4 に示すように、作用電極 2 5 a (バイオセンサ用電極 4 a) は、図 4 における電気化学測定装置用電極 1 の上方に固定化触媒層 6 が設けられている。

【 0 1 0 6 】

さらに、作用電極 2 5 a は、電気化学測定装置用電極 1 と固定化触媒層 6 の間に設けられ、かつ電気化学測定装置用電極 1 を覆うように絶縁基板 2 3 および電気化学測定装置用電極 1 上に設けられた結合層 2 4 を有している。

【 0 1 0 7 】

結合層 2 4 上には、固定化触媒層 6 が設けられている。

【 0 1 0 8 】

10

20

30

40

50

なお、電気化学測定装置用電極 1、固定化触媒層 6、結合層 2 4 で電極部 1 0 を構成している。

【0109】

絶縁基板 2 3 は電極部 1 0 を保持する部材であり、耐水性、耐熱性、耐薬品性、絶縁性および電気化学測定装置用電極 1 との密着性に優れた材料であることが好ましい。

【0110】

このような要件を満たす材料としては、例えばセラミックス、ガラス、石英、プラスチックが挙げられる。

【0111】

結合層 2 4 は、固定化触媒層 6 と絶縁基板 2 3 および電気化学測定装置用電極 1 との密着性（結合性）を向上させるために設けられるものである。

【0112】

また、結合層 2 4 は、絶縁基板 2 3 の表面のぬれ性を改善し、固定化触媒層 6 を形成する際の膜厚の均一性を向上させる効果も有している。

【0113】

結合層 2 4 を構成する材料としては、例えばシランカップリング剤が挙げられる。

【0114】

シランカップリング剤の種類としては、アミノシラン、ビニルシラン、エポキシシランが挙げられるが、このうち、密着性の観点から、アミノシランの一種である γ -アミノプロピルトリエトキシシランがより好ましい。

【0115】

結合層 2 4 は例えばシランカップリング剤溶液をスピンコートすることにより絶縁基板 2 3 および電気化学測定装置用電極 1 上に形成することができる。

【0116】

この際、シランカップリング剤濃度は 1 v / v %（体積 / 体積 %）程度とすることが好ましい。この濃度であれば、アルコキシル基が十分に水和し、十分な密着性が発揮されるからである。

【0117】

なお、図 4 では一枚の絶縁基板 2 3 上に 1 つの電極部 1 0 が設けられているが、一枚の絶縁基板 2 3 上に複数の電極部 1 0 を設けてもよい。

【0118】

また、図 3 では対極 7 および参照電極 5 も別々の絶縁基板 2 3 上に形成されているが、全ての電極を一枚の絶縁基板 2 3 上に形成してもよい。

【0119】

ここで、作用電極 2 5 a の製造方法について、簡単に説明する。

【0120】

まず、絶縁基板 2 3 上に、電気化学測定装置用電極 1 を蒸着法、またはスパッタリング法等を用いて設ける。

【0121】

次に、絶縁基板 2 3 および電気化学測定装置用電極 1 上に、電気化学測定装置用電極 1 を覆うようにして結合層 2 4 をスピンコートにより設ける。

【0122】

次に、結合層 2 4 上に、酵素溶液、グルタルアルデヒド等の蛋白質の架橋剤、およびアルブミンを含む溶液を、滴下することにより固定化触媒層 6 としての固定化酵素層が形成され、作用電極 2 5 a が完成する。

【0123】

なお、バイオセンサ 3 b を用いた、溶液中 1 5 a 中の測定対象物質の濃度の測定方法については、第 2 の実施形態と同様であるため、説明を省略する。

【0124】

このように、第 3 の実施形態によれば、バイオセンサ 3 b は、作用電極 2 5 a、対極 7

10

20

30

40

50

、参照電極 5、測定装置 13 a を有し、作用電極 25 a の電気化学測定装置用電極 1 は、イリジウムとニッケルを含む合金が用いられており、上記合金は過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能な組成となっている。

【0125】

そのため、第 2 の実施形態と同様の効果を奏する。

【0126】

また、第 3 の実施形態によれば、作用電極 25 a は、電気化学測定装置用電極 1 を絶縁基板 23 上に設け、電気化学測定装置用電極 1 と固定化触媒層 6 の間に結合層 24 をさらに設けた構造を有している。

【0127】

そのため、第 2 の実施形態と比較して、固定化触媒層 6 と電気化学測定装置用電極 1 との密着性（結合性）を向上させることができ、また、固定化触媒層 6 を形成する際の膜厚の均一性を向上させることができる。

【実施例】

【0128】

次に、具体的な実施例に基づき、本発明をさらに詳細に説明する。

【0129】

（実施例 1）

図 1 に示す電気化学測定装置 3 をイリジウム - ニッケル合金の電極を用いて作製し、指示電解質溶液に対するサイクリックボルタンメトリ測定を行い、イリジウムおよびニッケルのみで構成された電極を用いた場合と比較した。

【0130】

まず、作用電極 9（電気化学測定装置用電極 1）の製作を以下のように行った。

【0131】

はじめに、イリジウムパウダとニッケル（共にフルウチ化学社製）を用意し、アーク放電によってイリジウム - ニッケル合金およびイリジウム、ニッケル単体のサンプルを製造した。

【0132】

具体的には、イリジウムとニッケルの原子比率が 100 : 0、95 : 5、75 : 25、50 : 50、25 : 75、0 : 100 の 6 種類のサンプルを製造した。

【0133】

次に、製造したサンプルを、プリント配線が施されたフレキシブル基板に接着剤を用いて固定化し、ワイヤボンディングによって結線した後、信越化学社製のシリコーン封止剤で防水処理を施し、作用電極 9（電気化学測定装置用電極 1）とした。

【0134】

なお、作用電極 9 の電極面積は 8 mm^2 ($8 \times 10^{-6} \text{ m}^2$) とした。

【0135】

次に、参照電極 5 として既存のガラス複合電極（東亜ディーケーケー（株）社製、GST-5741C）を用意し、対極 7 として既存の白金電極（BAS 社製、002233）を用意した。

【0136】

次に、溶液 15 として、指示電解質溶液（100 mM（100 mol / m³）のエヌ - トリス（ハイドロキシ - メチル） - メチル - 2 - アミノエタンサルフォニックアシッド（同仁化学研究所製 pH 緩衝液、pH を 7 に調整済み、150 mM（150 mol / m³）の塩化ナトリウム（和光純薬工業社製）を含む）を用意し、溶液 15 に作用電極 9、参照電極 5、対極 7 を浸漬し、配線 11 を通じてこれらの電極を測定装置 13 としての I v i u m 社製 C o m p a c t S t a t に接続し、電気化学測定装置 3 を作製した。

【0137】

測定は指示電解質溶液に対するサイクリックボルタンメトリ測定を行った。

【0138】

10

20

30

40

50

測定条件は - 0 . 3 V ~ + 1 . 2 V の範囲を 0 . 0 1 V / s で 1 回掃引するものである。

【 0 1 3 9 】

得られた結果を図 5 に示す。

【 0 1 4 0 】

図 5 に示すように、イリジウムとニッケルの原子比率が 2 5 : 7 5 のときに電位窓が最も拡大することが確認された。

【 0 1 4 1 】

以上の結果から、イリジウムの含有量を減らし、その分、価格の安いニッケルを添加できるため低コストで過酸化水素を検出可能（過酸化水素に対して電流出力を生じさせることが可能）な電極を提供できることがわかった。

10

【 0 1 4 2 】

（実施例 2）

イリジウムとニッケルの原子比率が 1 0 0 : 0（イリジウム単体）、2 5 : 7 5、および白金単体の電極をそれぞれ実施例 1 と同様に製作し、同様に作用電極 9 として実験に供試した。なお、白金電極の白金はフルウチ社製の白金ワイヤを用いた。

【 0 1 4 3 】

次に、参照電極として既存のガラス複合電極（東亜ディーケーケー（株）社製、G S T - 5 7 4 1 C）、と対極として既存の白金電極（B A S 社製、0 0 2 2 3 3）を用意した。

20

【 0 1 4 4 】

続いて、実施例 1 の指示電解質に終濃度として 2 . 4 7 m M（2 . 4 7 m o l / m³）の過酸化水素（関東化学社製）および 1 0 m M（1 0 m o l / m³）のアスコルビン酸（和光純薬工業社製）に対する定電位測定を行った。測定は前述の作用電極 9 を前述の指示電解質に浸漬し、0 . 7 V の電位を印加後、定常状態となるまで放置した（約 5 分間）。

【 0 1 4 5 】

その後、終濃度として前述の濃度となるように過酸化水素ならびにアスコルビン酸をそれぞれ添加した。

【 0 1 4 6 】

応答電流値は過酸化水素ならびにアスコルビン酸から得られる電流値から定常状態の電流値の差とした。結果を図 6 に示す。

30

【 0 1 4 7 】

図 6 のグラフは縦軸にマイクロアンペアの応答電流値が、横軸に作用電極 9 の組成がそれぞれ示されている。

【 0 1 4 8 】

その結果、本実施例のイリジウム - ニッケル合金の作用電極 9 は、イリジウム単体および白金単体と同様に過酸化水素とアスコルビン酸に反応することがわかった。

【 0 1 4 9 】

即ち、ニッケルを添加することにより、過酸化水素およびアスコルビン酸の応答電流値が増加することがわかった。

40

【 0 1 5 0 】

以上の結果から、イリジウムとニッケルの合金が、アンペロメトリック型のバイオセンサの電極として白金を用いた電極と同等に好適に使用できることがわかった。

【 0 1 5 1 】

（実施例 3）

実施例 2 で用いた電極のうち、イリジウムとニッケルの原子比率が 2 5 : 7 5 の電極を用意し、0 . 1 M（1 0 0 m o l / m³）の硫酸ナトリウム溶液中で電気化学クリーニングを行った。

【 0 1 5 2 】

クリーニング条件は - 1 . 5 V ~ + 1 . 5 V の範囲を 0 . 5 V / s で 1 0 0 回掃引する

50

ものである。

【0153】

続いて、純水で1 v / v %に希釈したガンマ - アミノプロピルトリエトキシシラン（信越化学社製）を電極表面にスピンコートし、110 で乾燥させた。

【0154】

続いて、前出した指示電解質溶液で調整した牛アルブミン溶液（和光純薬工業社製）と純水で0.5 v / v %に調整したグルタルアルデヒド溶液（アルドリッチ社製）、および376.7 U / μlに調整したグルコース酸化酵素を混合し、すみやかに同様にスピンコートし、グルコース酵素センサ（バイオセンサ用電極）を製作した。

【0155】

続いて、終濃度として10 mg / dl (0.1×10^{-3} kg / l) グルコース（和光純薬工業社製）に対する定電位測定を行った。

【0156】

測定はグルコース酵素センサを作用極、既存のガラス複合電極（東亜ディーケーケー（株）社製、GST-5741C）を参照電極、そして既存の白金電極（BAS社製、002233）を対極とする3電極法で実施した。

【0157】

具体的には、これらの電極を指示電解質に浸漬し、0.7 Vの電位を印加後、定常状態となるまで放置した（約5分間）。

【0158】

その後、終濃度として前述の濃度となるようにグルコース溶液を添加した。

【0159】

グルコースの添加後に得られる電流値から定常状態の電流値の差とした。

【0160】

なお、印加電位は0.7 Vとした。

【0161】

上記測定を10回繰り返し、以下の式を用いて繰り返し再現性の値を計算し、比較を行った。

【0162】

繰り返し再現性の値（%）=（電流値の標準偏差 / 電流値の平均値）× 100 ...（式）

【0163】

その結果、繰り返し再現性は、4%以下を示し、酵素が電極表面に強固に固定され、酵素のセンサ特性の低下が全く生じないことが示された。

【0164】

（実施例4）

初めに実施例2で記載したイリジウムとニッケル比が25：75の電極を用意し、0.1 Mの硫酸ナトリウム溶液中で電気化学クリーニングを行った。

【0165】

クリーニング条件は-1.5 V ~ +1.5 Vの範囲を0.5 V / sで100回掃引するものである。

【0166】

続いて、シグマ（株）製の、以下の配列のアプタマーを用意した。

【0167】

配列：5' -HS- (CH₂)₆ -TAAGTTCATCTCCCCGGTTGGTGTGGTTGGT- (CH₂)₃ -MB-3'

【0168】

このアプタマーはトロンピンに応答するアプタマーである。

【0169】

続いて、pHを7.4に調整した100 mM (100 mol / m³) のトリスバッファー中に0.1 μM (0.1 mol / m³) の前述のアプタマーと0.1 μM (0.1 mol

10

20

30

40

50

$/\text{m}^3$) のトリス - (2 - カルボキシメチル) ホスフィンハイドロクロライドを溶解させた溶液に、前述の電極を約 20 時間の浸漬させた。

【0170】

続いて、 1mM ($1\text{mol}/\text{m}^3$) の 6 - メルカプトヘキサノールに前述の電極を 3 時間浸漬し、その後トリスバッファーで十分に洗浄し、トロンプンアプタマー電極とした。

【0171】

測定はこのアプタマー電極を作用極、実施例 3 の参照極と対極とした 3 電極による AC ボルタンメトリ法で行った。

【0172】

その結果、実施例 3 の指示電解質に溶解させたトロンプンに対し、 -0.26V 付近に電流値のピークを持つ電流電位曲線を示した。

10

【0173】

また、得られる電流値はトロンプン濃度と比例することもわかった。

【0174】

以上の結果から、イリジウム - ニッケル電極はアプタマー電極のトランスデューサとして適用できる材料であることがわかった。

【0175】

(実施例 5)

初めにイリジウムとニッケルの原子比率が 25 : 75 の電極をアーク放電法で製作し、ガラス基板上に接着剤で固定した。次に、電極基板と結線し、シリコンシール材で封止した。

20

【0176】

電極面積は 4.9mm^2 ($4.9 \times 10^{-6}\text{m}^2$) であった。

【0177】

続いて、 0.1M ($100\text{mol}/\text{m}^3$) の硫酸ナトリウム溶液中で電気化学クリーニングを行った。

【0178】

クリーニング条件は $-1.5\text{V} \sim +1.5\text{V}$ の範囲を $0.5\text{V}/\text{s}$ で 100 回掃引するものである。

【0179】

30

続いて、自己組織化単分子膜用のチオール分子として MUA (11-メルカプトウンデカン酸) を少量のエタノールに溶解させ、最終濃度が 1mM となるように蒸留水で調製した。

【0180】

次に、この溶液の 1ml を電極表面に滴下し、約 1 時間静置後、エタノールで洗浄した。

【0181】

続いて、内乱攪乱物質の一つであるビスフェノール A のモノクローナル抗体 (コスモ・バイオ (株) 社製) を $200\text{マイクログラム}/\text{ml}$ ($\text{pH} 7.4$ の 10mM ($10\text{mol}/\text{m}^3$) のリン酸緩衝液と、 $0.2\text{w}/\text{v}\%$ の牛血清アルブミンと、 $0.09\text{w}/\text{v}\%$ アジ化ナトリウムを含む) を 40マイクロリットル 分注し、電極表面に滴下した。

40

【0182】

そして、1 時間室温下で乾燥させた後、 $1\text{w}/\text{v}\%$ のポリビニルアルコール中に 1 時間浸漬し、さらに、1 時間室温下で乾燥させた。

【0183】

この電極を作用極とし、実施例 3 の参照極と対極とした 3 電極による方形波ボルタンメトリ法で溶液中のビスフェノール A に対する応答電流を測定した。

【0184】

測定条件は $0.1 - 1.2\text{V}$ 掃引範囲、 40mV のパルス電位、 4Hz の周波数、 10mV のステップ電位である。

【0185】

50

その結果、1 p p b のビスフェノール A に対して μ A オーダーの応答電流が得られることを確認した。

【0186】

以上のように、本発明によれば、金、白金電極またはイリジウム単体の電極（もしくはカーボン電極）の代替材料としてイリジウム - ニッケル合金の電極が適用できることがわかった。

【0187】

また、この電極を用いてバイオセンサ用電極を製作した場合、金、白金電極またはイリジウム単体の電極（もしくはカーボン電極）と同様に測定できるバイオセンサを提供できることもわかった。

【産業上の利用可能性】

【0188】

上記した実施形態および実施例では、イリジウムとニッケルを含有する電極を、過酸化水素濃度を測定する電気化学測定装置 3 に適用した場合について説明したが、本発明は、何等、これに限定されることなく、イリジウムとニッケルを含有する電極に対して選択的酸化性を有する全ての物質の濃度の測定装置に適用できる。

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図 1】電気化学測定装置 3 を示す模式図である。

【図 2】図 2 (a) は、バイオセンサ 3 a を示す模式図であって、図 2 (b) は、図 2 (a) の作用電極 9 a (バイオセンサ用電極 4) の縦断面図を示す図である。

【図 3】バイオセンサ 3 b を示す模式図である。

【図 4】図 3 のバイオセンサ用電極 4 a の A 方向から見た断面図である。

【図 5】実施例 1 の実験結果を示す図である。

【図 6】実施例 2 の実験結果を示す図である。

【符号の説明】

【0190】

1 電気化学測定装置用電極

3 電気化学測定装置

3 a バイオセンサ

3 b バイオセンサ

4 バイオセンサ用電極

5 参照電極

6 固定化触媒層

7 対極

9 作用電極

1 1 配線

1 3 測定装置

1 5 溶液

2 3 絶縁基板

2 4 結合層

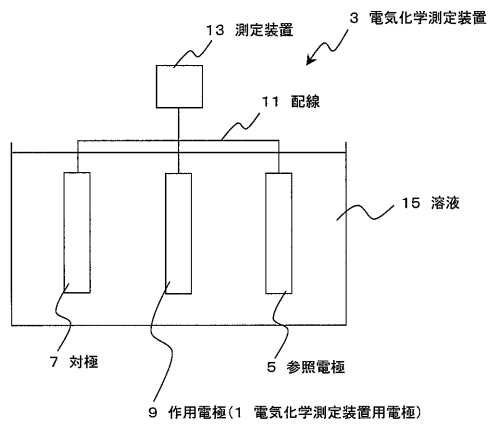
10

20

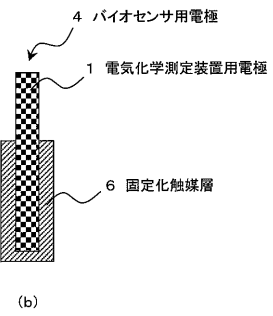
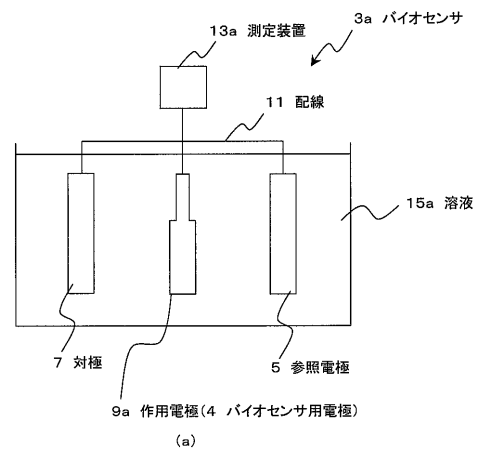
30

40

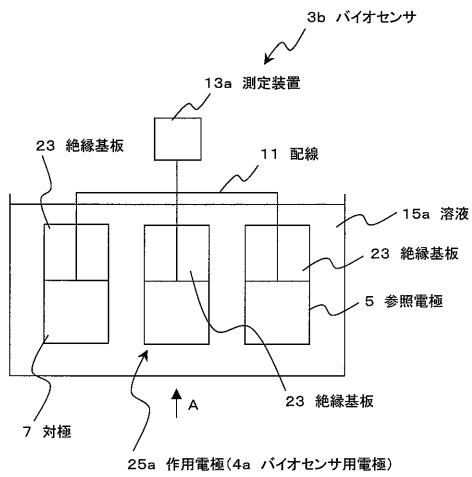
【図 1】



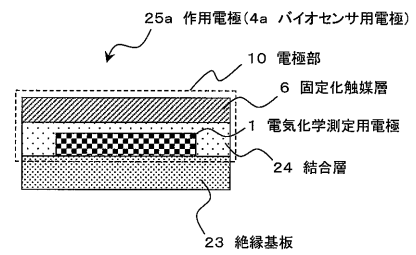
【図 2】



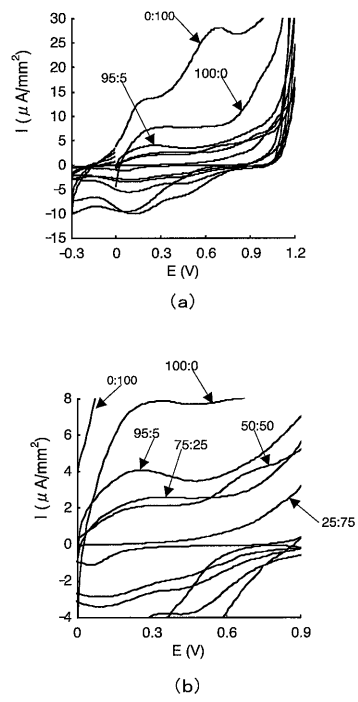
【図 3】



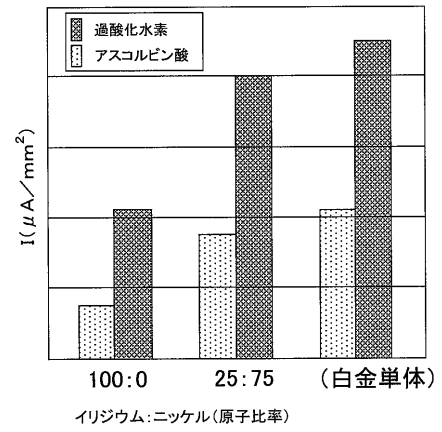
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	G 0 1 N 27/30	3 5 7
	G 0 1 N 27/46	3 3 6 M

(72)発明者 佐多 直明
東京都港区芝五丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

(72)発明者 御手洗 容子
茨城県つくば市千現一丁目 2 番地 1 独立行政法人物質・材料研究機構内