

令和2年度 博士論文

電流計測法を用いた
二次元電気化学センサの研究

令和2年度修了

埼玉大学大学院

理工学研究科 数理電子情報系専攻

電気電子システム工学コース

18DM002 小杉 恵太

指導教員：内田秀和 教授

【要旨】

医療の高度化と共にこれまで治療が困難だった疾病などについて多くの新薬が開発されるようになってきている。新薬の種類の一つに、毒性が少ないことが特徴に挙げられる酵素阻害剤がある。新薬の開発において数多くの試行錯誤を繰り返すための費用と時間が問題になっており、初期段階の候補化合物を見つけるためのスクリーニング過程の効率化が重要となっている。本研究では近年多くの新薬が開発されている酵素阻害剤に着目し、酵素阻害剤のスクリーニングに応用可能な計測技術の研究を行った。酵素阻害を評価するために必要な酵素反応の検出機構として、現在多く利用されている蛍光測定法に代わり、電気化学測定法を検討した。

効率的な測定方法の一つである電気化学測定法は、高速測定が可能や測定の手順が簡易などの特性が挙げられるが、測定数が増えると配線数が増えるため測定環境が制限されることにより同時測定が難しいという問題点があった。本研究室で開発されたセンサである Light Addressable Amperometric Sensor (LAAS)は、従来の電気化学測定方法に比べて、配線数が少なくハイスループットに測定できることが特徴である。しかし、このセンサ構造により、センサの表面積が小さくなり、感度が低下してしまう問題点があった。この問題を解決するために、本研究は測定システムやデバイス構造などの異なる観点のアプローチから高感度法に取り組み、高感度化手法を明らかにすることを目的とした。

本研究では LAAS の挙動を解明して性能を改善するため、以下の5つの項目について研究を行った。

○LAAS によるグルコースオキシダーゼを用いたグルコース濃度測定の研究(本論文 4 章)
本章は酸化還元酵素の一つであるグルコースオキシダーゼを用いて、種々のグルコース濃度に対する電流値を測定した。その結果、40 mM ~ 1 μ M のグルコースに対して電流値の濃度依存性があることが判明した。また、グルコースとグルコース以外の単糖類も測定した結果を比較すると、グルコースの電流値は他の単糖類と比べ約 8 倍から 10 倍の電流値を示した。これにより本章の測定システムはグルコースに対しての選択性を持つことも明らかにした。グルコースオキシダーゼを適用できたことより、他の酸化還元酵素に対しても応用が可能であることが期待される。

○金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の研究(本論文 5 章)
酸化還元物質が電子を与える系の酵素反応の測定に適した系として、金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作方法の検討及び性能の確認を行った。Cu/Si ショットキー接合、Al/Si ショットキー接合を用いた 2 種類の LAAS を測定した結果、検出限界は Al/Si ショットキー接合を用いた LAAS は 6.2 μ M と Cu/Si ショットキー接合を用いたデバイスは 74 μ M を示した。Al/Si ショットキー接合を用いた LAAS の方が高い検出限界を示す結果となった。これは Al の仕事関数が Cu に比べて低いため、より広い空乏層を形成し、

変換効率が上昇した結果であると想定した。そのため仕事関数の低い金属電極を選定は高い検出限界を持つデバイスの製作につながる事が期待される。

○非水溶液系溶媒を用いた LAAS 測定の研究(本論文 6 章)

LAAS に限らずセンサを高感度化するためにはノイズを排除して信号を抽出することが重要であり、得られた測定値を構成する要素を適切に把握する必要がある。ここでは LAAS のノイズ成分と推察されるサンプル溶液の水の電気分解の影響を調べるために、非水溶液溶媒を用いて種々の酸化還元物質濃度に対する電流値を測定して検証を行った。その結果、非水溶液溶媒のブランクのサンプル溶液測定時の電流値が存在することから LAAS のノイズ成分は水の電気分解の影響でないことが判明した。

○裏面電界を用いた LAAS デバイスの研究(本論文 7 章)

他の電気化学センサの報告にある電流値の増大が検出限界向上につながるという考え方を基に、太陽光電池の分野で用いられる電流値を増大させる技術について本研究のデバイスへの適用を試みた。光励起電流値の向上に用いられる裏面電界を導入した LAAS デバイスの製作方法の検討及び性能の確認を行い、裏面電界を用いた LAAS デバイスが製作可能でありセンサとして $10 \text{ mM} \sim 1 \text{ }\mu\text{M}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ に濃度特性を持つことより十分な機能を持つことを明らかにした。また、裏面電界適用 LAAS と裏面電界適用無 LAAS を比較すると、裏面電界適用 LAAS の検出限界が $17 \text{ }\mu\text{M}$ を示した。これは裏面電界適用無 LAAS の $270 \text{ }\mu\text{M}$ に比べて高い検出限界を示すことから、裏面電界は高感度化に有効な手法であることを示した。

○対極と作用極を同素材とした LAAS 測定方法の研究(本論文 8 章)

第 6 章と同様にノイズ成分を特定して排除する試みとして、酸化還元物質濃度に依存する電極電位変動について検討した。ネルンストの式によると酸化還元物質が存在する状態では、酸化還元物質が電極電位を決定しているため、本研究のような二電極系において電極電位差は無いとされてきた。しかし、電極電位が異なる状態において酸化還元物質が低濃度の時($10 \text{ nM} \sim 100 \text{ pM}$)に電極電位を測定した結果、 $250 \text{ mV} \sim 200 \text{ mV}$ ほどの電位差があることが判明した。またこの電位差を打ち消すため、対極と作用極が異なる素材を用いる方法に対して同素材を用いる新しい方法を提案した。種々の酸化還元物質濃度の測定において、同素材の方法と異素材の方法を比較した結果、同素材の方法は低濃度時の電流値の上昇が抑制され、 17 nM の検出限界を示した。これは異素材時の方法の $210 \text{ }\mu\text{M}$ より高い検出限界である。これにより、対極と作用極をそろえる方法は高感度化に有効であることが判明した。

以上より、本研究では LAAS の動作原理を含めた高感度化への手法を明らかにした。その結果、LAAS の高感度化に有用な手法を統合することで検出限界は 17 nM と推定され、本研究の目的は達成されたと考えられる。

目次

【要旨】	2
第1章. 序論	7
1.1 酵素阻害剤	7
1.2 スクリーニング	8
1.3 電気化学測定	9
1.4 本研究の目的	13
1.5 本論文の構成	14
第2章. 測定原理	16
2.1 LAAS の測定原理	16
2.2 酵素測定の原理	18
2.3 測定システム	21
2.3.1 測定システムの構成	21
2.3.2 データの処理方法	21
2.3.3 実験式の定義	23
2.3.3.1 反応モデル	23
2.3.3.2 実験式	24
2.3.4 検出限界	25
2.4 I-V 測定	27
2.5 光励起電流値測定	28
第3章. 予備実験	29
3.1 測定点の性能差について	29
3.2 励起光強度について	31
第4章. LAAS によるグルコースオキシダーゼを用いたグルコース濃度測定の研究	33
4.1 グルコースオキシダーゼについて	33
4.2 実験方法	34
4.2.1 デバイス製作方法	34
4.2.2 測定環境	35
4.3 結果	36
4.3.1 メディエータのみの濃度依存特性	36
4.3.2 基質の濃度依存特性	37
4.3.3 選択性について	38
4.4 考察	39
第5章. 金属/p型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の研究	40
5.1 酸化還元酵素の反応について	40
5.2 実験方法	42

5.2.1	メディエータのみの濃度依存特性	42
5.2.2	測定環境.....	42
5.3	結果.....	43
5.3.1	I-V 特性.....	43
5.3.2	2 種類のデバイスの濃度依存特性	44
5.3.3	酸化型メディエータに対する濃度依存特性.....	45
5.3.4	二次元測定.....	46
5.4	考察.....	47
第 6 章.	非水溶液系溶媒を用いた LAAS 測定の研究.....	49
6.1	非水溶液溶媒について.....	49
6.2	測定環境.....	50
6.3	結果.....	51
6.4	考察.....	52
第 7 章.	裏面電界を用いた LAAS デバイスの研究.....	53
7.1	裏面電界について	53
7.2	実験方法.....	55
7.2.1	デバイス製作方法.....	55
7.2.2	測定環境.....	56
7.3	結果.....	57
7.3.1	I-V 特性.....	57
7.3.2	光励起電流値	57
7.3.3	二次元測定.....	58
7.3.4	濃度依存特性	59
7.4	考察.....	60
第 8 章.	対極と作用極を同素材とした LAAS 測定方法の研究	63
8.1	電極電位について	63
8.2	測定方法.....	64
8.2.1	電位差測定.....	64
8.2.2	実験条件.....	65
8.3	結果.....	66
8.3.1	電位差測定.....	66
8.3.2	I-V 特性.....	67
8.3.3	濃度依存特性	68
8.4	考察.....	70
第 9 章.	結論	72
	【参考文献】	74

【謝辭】	82
【研究業績】	83

第1章. 序論

1.1 酵素阻害剤

内閣の健康・医療戦略[1]によると、20年ほど前に高齢化が着目されたことをきっかけに、世界保健機関(WHO)は「健康寿命」という概念を定義した。この定義をはじめとして、どうやって健康的に長生きするかということが着目され始めた。現在の日本では高齢化に伴う要介護者が増加する問題がある。介護が必要になった原因として認知症 18.0% 脳血管疾患(脳卒中) 16.6% 高齢による衰弱 13.3%[2]であり、これらの疾患や生活機能の維持や向上に関する有効な治療法が求められている。加えて、日本は世界でも稀な超高齢社会であるため、今後更に高齢化が進むことに伴い介護者の増加が予測される[3]。この要介護者が増加する問題に対して、有効な解決法の一つとして薬物治療が挙げられ、これまで薬物治療が困難と見られていた疾病でも新薬の開発により治療や症状の軽減が可能となってきたことから、大きな期待が寄せられている。

創薬の分野の中で、開発される治療薬の種類は代謝拮抗薬、細胞壁合成阻害薬、タンパク質合成阻害薬などがあるが、その中でも特に酵素阻害薬はペプチドやDNAを用いることで毒性が低く抑えることが可能なことから注目されている。酵素とは生体内に生じる化学反応に、触媒として働く分子である。加えて、特定の物質の反応にのみ作用する基質特異性を持つ。酵素は生命活動に不可欠なものである反面、過剰な酵素活性は疾患の原因となるケースもあり、過剰となった酵素活性を失活させることで代謝経路の調整が行われる[4-6]。酵素阻害剤とは、酵素分子に結合して酵素活性を失活させる物質であり、疾患の治療や緩和を目的とした医薬品として利用されるものも多い。酵素と同様に、酵素阻害剤にも特異性がある場合が多く、人体に対しての毒性や副作用が少なく抑えられる可能性がある。酵素阻害剤の具体例として、アルツハイマー病などの認知症治療薬で塩酸ドネペジルはアセチルコリンエステラーゼ阻害剤、抗インフルエンザ薬であるザナビル(商品名リレンザ)やリン酸オセルタミビル(商品名タミフル)はノイラミニダーゼ阻害剤などが実用化されている[7-8]。

1.2 スクリーニング

創薬には探索研究、非臨床試験、臨床試験、審査のプロセスを経て実現される。新規創薬のステップを図 1-1 に示した。新薬の開発には 10～15 年の長い期間や数百億円の高額の経費などが必要なことに加えて、成功確率は約 1/10000 とも言われている[8]。この一連のプロセスの中で、探索研究において極めて多数の化合物の中から候補となる物質を選び出すスクリーニングの過程に時間がかかるため、創薬全体の中のボトルネックの一つになっている。そのため、スクリーニングの技術は微量な反応を検出できる測定感度を備え（高感度）、多数のサンプルを短時間で評価できる処理能力を持つこと（ハイスループット）が要求される。現在用いられているスクリーニング技術である蛍光測定を用いた酵素結合免疫吸着法（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay、ELISA）[9-11]やフローサイトメトリー[12-14]は、感度やスループットで優れており、主流となっている。しかし、これらの測定方法は特殊な蛍光分子の設計が必要であり、ターゲットでない分子からの発光による妨害や、濁ったサンプル溶液の場合に観測光を遮蔽してしまう、細胞などに用いる場合に蛍光色素が毒性を示す場合があるなどの欠点がある[15-17]。

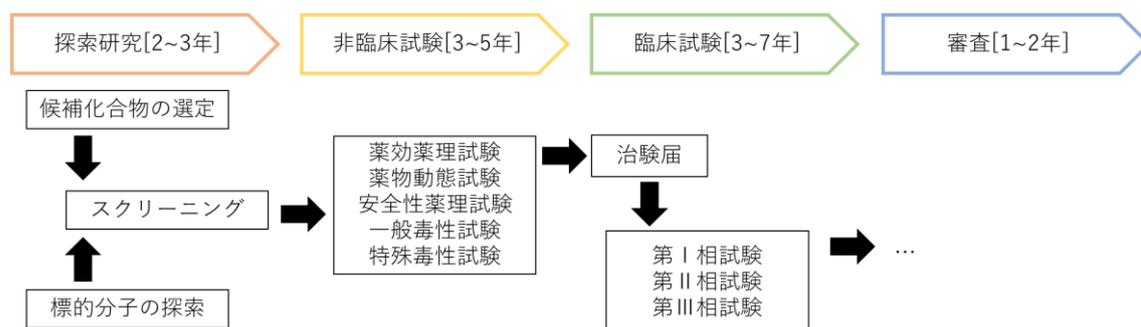


図 1-1. 新薬研究開発のプロセスの概念図：探索研究から始まり実際に認可されて治療に届くまでに複数のステップを踏む必要がある。[8]を基に製作。

1.3 電気化学測定

前節で示した蛍光測定法の代替案として電気化学測定法をスクリーニング技術に利用することが提案されている。電気化学測定法には、放射性物質が不要[19]、蛍光分子などの特殊な分子の開発が不要であることや、応答速度が速い、測定方法が簡易、電極アレイが可能ななどの特徴がある[15,20-24, 26]。また、スクリーニングの低コスト化のために1サンプル当たりの容量を小さく($\mu\text{L} \sim \text{nL}$)することも求められるが、液滴微小流体(droplet-based microfluidics)測定技術を用いることで、電気化学測定法でも実現できる可能性がある[17-18]。

電気化学測定法はポテンショメトリーとアンペロメトリーに分かれる。ポテンショメトリーは濃度平衡状態の電極電位を測定し、イオノフォアやイオン結合サイトを用意すればプロトン、カリウム、ナトリウム、カルシウムなど多様なイオン濃度を測定することが可能な測定方法である[24-27]。電位応答はネルンストの式に従って対数圧縮されるため、広い濃度範囲について実用的な電位範囲の応答が得られる。具体例として ISFET(Ion Sensitive Field Effect Transistor)などの電界効果トランジスタ(FET)を用いた pH 測定がある。高い信頼性と耐久性からプロトンセンサが広く用いられているが、酵素活性や細胞の解析に使う場合には、活性を維持できるように反応系の至適 pH を維持する必要がある。そのため、pH 干渉溶液によって至適 pH を維持することにより酵素の活性を維持する測定系においては、わずかなプロトン濃度変化を測定するポテンショメトリーは難しい場合がある。

一方、アンペロメトリーは化学反応の過程の電荷移動を測定するため、化学反応量に比例した電流として時間経過を追って記録することができる [26, 28-32]。観測したい反応系が H^+ を含まないように設計してあれば pH が一定の環境が好ましい酵素反応や細胞代謝を測定する応用に適している測定方法である。微小電極を用いてパルス電圧で測定するなど微量分析に適した測定系を用いることで pM から fM の濃度で高感度測定も可能であり[33]、センサ構造がシンプルなため大量生産に向いていることから広いアプリケーションに用いられている[34]。数多く種類がある酵素の中でも特に酸化還元酵素の一群は電荷の授受が発生する酸化還元反応を触媒するため、アンペロメトリーの測定対象に適している。酸化還元酵素の一例として糖尿病の指標であるグルコースを基質とするグルコースオキシダーゼなどがある。

また、図 1-2 にセンサを集積化するアレイセンサの概念図を示す。一般的に電気化学測定では単一のサンプルを測定対象とする単一センサ(図 1-2(a))を構成しているが、電極対を同一デバイス上に複数用意することで、多数の測定対象を同時に測定することが可能な電極アレイセンサを構成する事も可能である(図 1-2(b))。電極アレイの例として、Matue らは 360 個の測定電極を集積化し、1つの電極につき 4 ~ 200 ms の時間で 25 ~ 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のグルコース測定が可能な LSI ベースセンサを構築し、幹細胞の活性状態の判定ができることを示した[15, 20-22]。

しかし大規模なアレイ化のデメリットとして測定対象数の増加に伴い電極のペアに接続する配線数も増加するため、複雑な電極配置を構築したりマルチプレクサを基板上に作り込む必要がある[21]。また、微小な電極アレイを形成するためには、各電極への配線を 50 μm ~ 数 μm 程度の幅で形成するための高精度な MEMS 技術が必要になる[15, 35]。

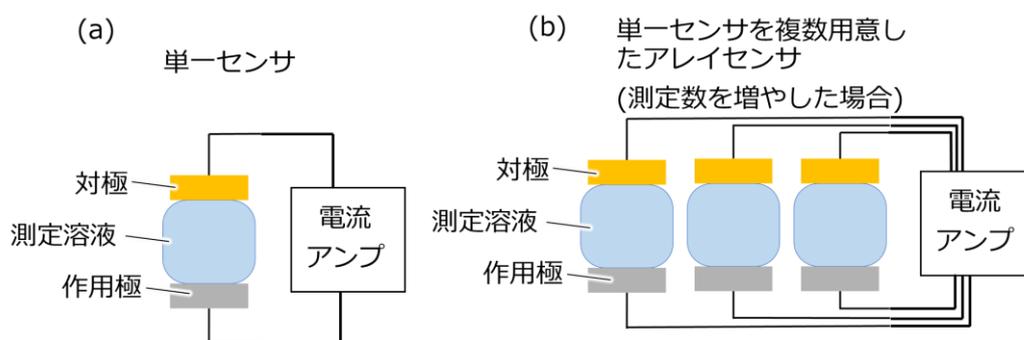


図 1-2. 各センサの測定数による概念図：(a)単一センサの場合。電気化学センサで多く用いられる形式である。(b)単一センサを複数用意したアレイセンサ。同時測定が可能な反面、配線数が測定数に伴い増加するデメリットがある。

一方、配線数を削減可能なセンサとして Light Addressable Potentiometric Sensor (LAPS) が報告されている。LAPS はポテンシオメトリーデバイスであるが、励起光照射によって測定位置を決定する内部光電効果を用いたセンサである。観測電流は全ての領域を共通の 1 組の電極で観測するため、各測定点に配線する必要が無く、少ない配線数でシステムの構築が可能である[25, 36-38]。図 1-3 に LAPS のセンサ構造と測定原理について述べていく。センサ構造は電解質(測定対象)/絶縁層/半導体である。これらに直流電圧をかけることにより電界による絶縁層/半導体界面に空乏層が現れる。また、水溶液中の電荷を持った検出対象が絶縁層表面に付着すると電荷量に応じてバイアス電圧の変化と等価な空乏層の厚さの変化が生じる [25, 39, 40]。その静電容量の変化により光励起電流値が変化する。この直流電圧を変化させることに対する観測電流値の特性が、付着物によって変化する。この特性を観測することで、付着物量を測定できる原理である。この LAPS のように光励起を用いて測定箇所を指定し、共通の電極で電流を検出するデバイスをアペロメトリーで実現できれば、pH を維持したまま酵素や細胞の活性を測定する系への応用が容易となる。そこで、本研究室では内部光電効果を用いたアンペロメトリー型二次元電気化学センサ (Light Addressable Amperometric Sensor, LAAS)[41-46]を開発した。動作原理やセンサ構造は 2 章で詳述する。

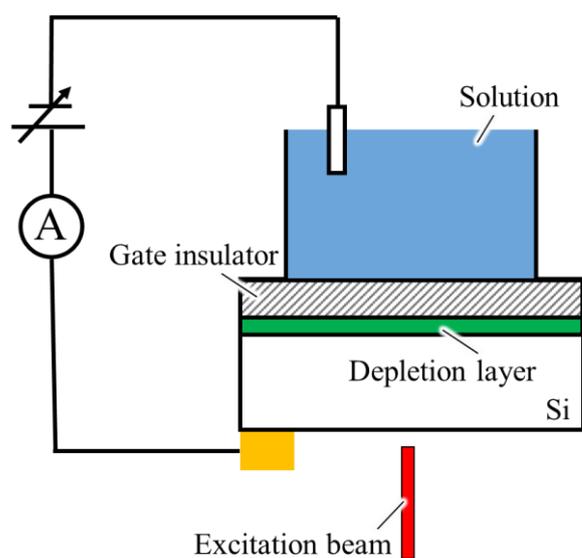


図 1-3. LAPS の測定原理図 : [38]を基に製作

電気化学センサにおける他研究の一例を表 1-1 に示す。表 1-1(a)はアレイセンサについてまとめたものであり、測定点数と検出限界に着目した。測定対象は様々であるが mM から nM のオーダーの検出限界を持ち、数百測定点を持つ。表 1-1(b)は単一センサについてまとめたものであり、本研究で測定したグルコースやフェリシアン化物イオンなどの同一の物質を測定対象とした研究である。これらは単一センサであることから本研究のアレイセンサとは異なるが、測定対象に対しては μM のオーダーの検出限界を持つ。

表 1-1. 電気化学測定のための研究例

(a)アレイセンサの比較

名前	特徴	対象や検出限界
LSI-based Chip Devices [15,22]	アンペロメトリー 電極アレイ	p-amino phenol 10 μ M 以下 H ₂ O ₂ 0.5 mM 以下 400 サンプル
LAPS [25, 47]	ポテンショメトリー 二次元センサ	AFP 1.3 nM 94×64pixel
eDMA [35]	ポテンショメトリー 電極アレイ	H ₂ O ₂ 0.5 ~ 25 mM 600 測定点
Addressable redox cycling electrode array [48]	サイクリックボルタ ンメトリー	Ferricyanide ion 1 mM 以下 16 測定点

(b)単一センサの比較

名前	特徴	対象や検出限界
Modified CPE [49]	ポテンショメトリー	Ferricyanide ion 100 μ M
Modified CPE [50-51]	アンペロメトリー	Glucose 11 μ M Glucose 330 μ M
Modified GCE [52]	サイクリックボルタ ンメトリー	Glucose 40.8 μ M

LSI : Large scale integration

AFP: α -fetoprotein

LAPS : Light-addressable potentiometric sensor

eDMA : electrochemical droplet micro array

CPE : Carbon paste electrode

GCE : Glassy carbon electrode

これらの研究の他に、創薬で用いられる分子機能の評価指標の一つに 50%阻害濃度(IC₅₀)がある。IC₅₀はある酵素の働きを 50%阻害する阻害剤の濃度のことであり、実用的には μ M や nM のオーダーの阻害剤の評価が行われている[7]。また、実用的な創薬スクリーニングを行うためには適合化合物の判定に 10 μ M 以下の検出限界濃度が必要とされる[53]。

1.4 本研究の目的

本研究室で開発した LAAS はセンサ構造により電極面積が減少し、検出限界が 100 μM 程度である。表 1-1 の他の電気化学センサと比較して、LAAS は検出限界が高濃度で、感度が不足しているという問題点がある。この問題を解決するために、本研究は測定システムやデバイス構造などの異なる観点から高感度法に取り組み、高感度化手法を明らかにすることを目標に研究を行った。具体的な数値として、10 μM 以下の検出限界を持つ測定システムの構成を目指した。

1.5 本論文の構成

本論文の構成を以下に示す。

第1章 序論

本章では、本研究の意義と位置づけ、目的について述べた。酵素測定的重要性から始まり、酵素の測定方法の選択肢の一つに電気化学測定が有用であることを示した。また、電気化学測定の種類の利点と欠点を述べ、他研究と比較し本研究の目的を述べた。

第2章 測定原理

本研究の研究対象である LAAS デバイスの構造から測定原理について述べる。また、本研究における測定システムからデータの処理方法や評価方法についても同章で述べる。

第3章 予備実験

本研究における予備実験を行った結果を示し、それに基づく本研究の前提について述べる。

第4章 LAAS を用いたグルコースオキシダーゼを用いたグルコース濃度測定の研究

酸化還元酵素の一つであるグルコースオキシダーゼを用いて、種々のグルコース濃度に対する電流値を測定した結果を示し、酵素と酸化還元物質を用いた反応系について適切な測定条件について考察した結果を述べる。

第5章 金属/p型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作

酸化還元物質が電子を与える系の酵素反応の測定に適した系として、金属/p型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作方法の検討及び性能の確認を行った結果を示し、スクリーニング用センサとして十分な機能を持つことを明らかにする。また、ショットキー接合を形成する金属がセンサ感度に影響し、適切な金属の選択が高感度化に有効であることを示す。

第6章 非水溶液系溶媒を用いた LAAS 測定の研究

LAAS に限らずセンサを高感度化するためにはノイズを排除して信号を抽出することが重要であり、得られた測定値を構成する要素を適切に把握する必要がある。ここでは LAAS のノイズ成分と推察されるサンプル溶液の水の電気分解の影響を調べるために、非水溶液溶媒を用いて種々の酸化還元物質濃度に対する電流値を測定して検証を行った結果を示す。

第7章 裏面電界を用いた LAAS デバイスの研究

感度向上につながる光励起電流値の増大を可能とすると考えられる裏面電界の技術を導入した LAAS デバイスの製作方法の検討及び性能の確認を行った結果を示し、スクリーニング用センサとして十分な機能を持つことを明らかにする。また、裏面電界によるセンサ感度への効果と解像度への影響について考察を示す。

第8章 対極と作用極を同素材とした LAAS 測定方法の研究

第6章と同様にノイズ成分を特定して排除する試みとして、酸化還元物質濃度に依存する電極電位変動について検討した。従来の対極と作用極が異なる素材を用いる方法に対して同素材を用いる新しい方法を提案し、種々の酸化還元物質濃度で測定して比較した結果を示す。その結果に基づき、対極と作用極の素材の組み合わせによって系の安定性が変わるメカニズムについての考察を示す。

第9章 結論

この章では本研究の結論を述べる。

第2章. 測定原理

2.1 LAAS の測定原理

図 2-1 に LAAS のデバイス構造と動作原理の概念図を示す。図 2-1(a)に示した LAAS のデバイス構造として、半導体上に電極をアレイ状に形成する。半導体と電極の各界面にはショットキー接合が形成されている。このショットキー接合の形成に伴い空乏層が形成される。図 2-1(b)(c)は LAAS デバイス内の想定しているバンド図を示す((b)は金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS、(c)は金属/n 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の場合)。デバイス裏面から局所的な励起光を照射することにより、半導体内でキャリアが励起される。空乏層から離れた位置で励起されたキャリアは等方的に拡散し、寿命を迎えるか半導体裏面に到達することで再結合して消滅するため、光励起電流に寄与しない。一方、半導体内の空乏層付近で励起されたキャリアは空乏層の電界を受けてドリフトし、光励起電流に寄与する。この空乏層内に落ち込んだ少数キャリアはデバイス表面の作用極に移動し、(金属/n 型半導体ショットキー接合の場合には)励起されたキャリア対のホールが作用極に到達して作用極の電子のポテンシャルを下げ、電極電位は上昇する。これにより電極表面における還元体(Red)の酸化反応が進み、酸化種(Ox)になる際に発生する電子を電極表面が受け取ることで電流が発生する。このようにして生じる酸化還元反応の量に応じた電流値を観測信号として外部回路で観測する。アレイ状に形成した電極は個別のショットキー接合フォトダイオードを構成し、励起光を照射したフォトダイオードだけで酸化還元電流を測定できるため、測定する電極を光照射で選ぶことが可能である。各フォトダイオードの共通端子として裏面電極を 1 つ設置し、対極を水溶液中に 1 つだけ設置して共有することで、電流を観測する測定機器との接続は 2 本だけで良い。微小な電極を配列する従来法では測定電極を同じ数の配線数が必要であり、LAAS 測定システムは大幅に配線数を減らすことができる。また、デバイスの製作方法については各章で述べる。

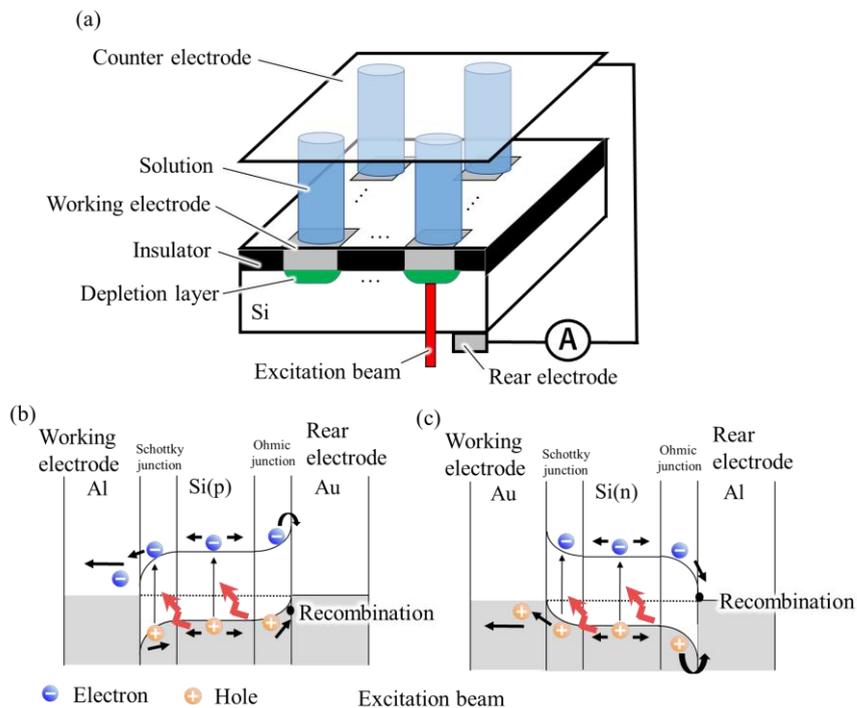


図 2-1. LAAS の測定原理図 : (a)LAAS のデバイス構造と測定原理図。半導体上にアレイ状の電極を形成する。半導体と電極の間には空乏層が形成されている。デバイス裏面から励起光を照射することにより、半導体内でキャリアが励起される。特に、空乏層付近で励起されたキャリアが作用極に移動し、電極表面付近の酸化還元物質と酸化還元反応を起こす。この酸化還元反応に依る電流が外部回路で観測される。(b)(c)LAAS 内の想定しているバンド図 ((b)は p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS、(c)は n 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の場合) : 励起光の照射により半導体内でキャリアが励起される。裏面電極付近で励起されたキャリアは再結合により消滅する。一方、空乏層付近で励起されたキャリアは作用極付近に移動し、電流値に寄与する。

2.2 酵素測定 の原理

一般的に電気化学測定法で酵素を測定する手法は、原理によって3世代に分けられる[24]。図 2-2 に世代ごとの測定原理の概念図を示した。第1世代が酵素反応の電子受容体として酸素を用い、生成した過酸化水素を電気化学的に測定する。第2世代は酵素反応と酸化還元反応を起こす酸化還元物質(メディエータ)を用い、酸化還元物質を電極で測定する[54-55]。第3世代はメディエータも酸素も必要とせず、電極に酵素を固定化し、直接電子を伝達する[56]。第3世代はメディエータや酸素[57-60]のような中間電子受容体なしに分析物を測定できるので妨害を受けにくく、安定した測定が期待できる理想的な手法である。酵素がセンサに固定化されているため、高価な酵素も繰り返し再利用できるメリットがある。しかし、電極表面に直接固定化できる酵素の種類は限られていることや、表面に固定化された酵素の活性が低下するという報告[61]もあることから、必ずしも万能な手法とは言えない。

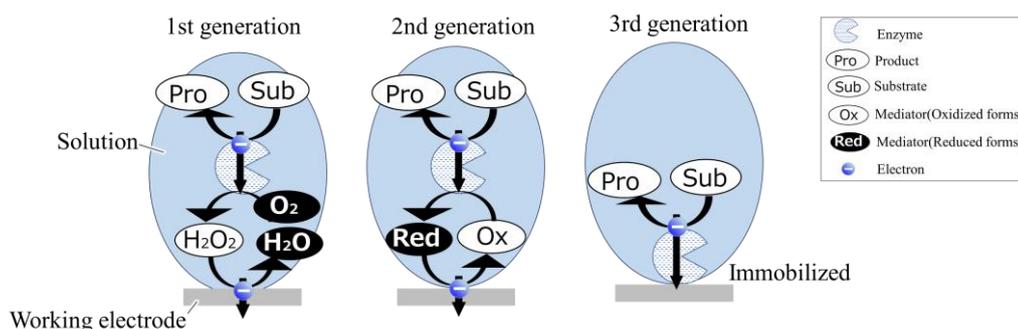


図 2-2. 酵素測定 の3つの世代の概念図：第1世代は酵素活性によって生成された過酸化水素を測定する。第2世代は酵素活性に伴う人工的な電子受容体(メディエータ)を用い、酵素活性により変化したメディエータを測定する。第3世代は酵素を直接電極に固定化することにより、電極と直接電子の授受を行う。この図は[65]を基に作成した。

一方で、第2世代は商業目的のための一般的な方法として実績があり、反応の条件を整えれば安定した測定が可能という特徴がある。また、固定化プロセスが不要で簡便なこと、酵素の活性を維持したまま測定できるというメリットがある。酵素が高価でも使い捨てにする必要があるが、極めて少量で分析ができれば試薬消費量を低減することが可能であり、酵素の繰り返し使用に依存しない信頼性の高い分析プロセスを低コストで実現できる可能性がある。また、近年は単独の酵素だけでなく細胞を評価単位として創薬が行われる場合もあり、細胞機能を明らかにするための単一細胞分析が注目を集めている[63-66]。単一細胞分析は、細胞に適合する小さな容積で実施することが必要であり、微量分析技術が重要となっている。以上のように酵素測定技術は多くの手法が存在しているが、本研究では第2世代の測定手法を採用し、汎用性の高いシステムの構築を目指すものとした。

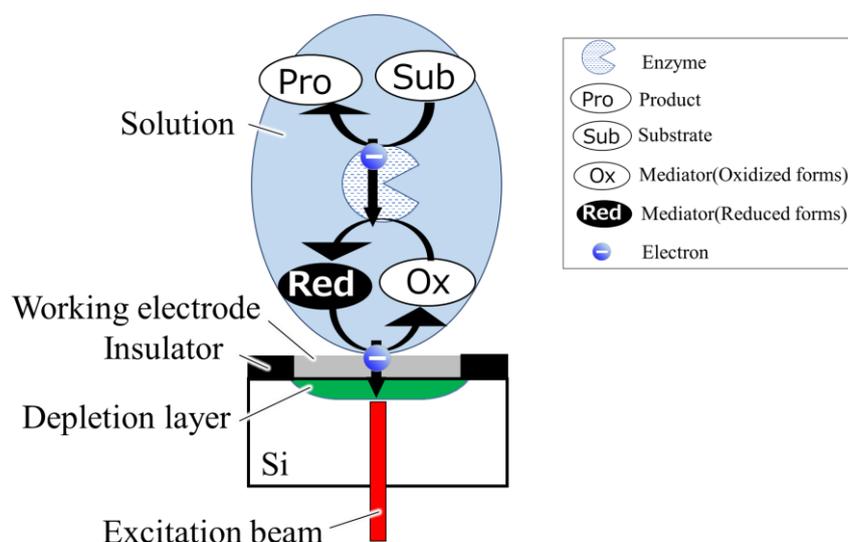
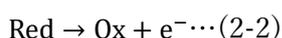


図 2-3. LAAS の酵素測定原理の概念図：第 2 世代の測定原理を基にしている。図は n 型ショットキー接合を用いている LAAS のため、励起されたキャリアとして正孔が電極表面に移動している。

第 2 世代の酵素測定法に基づいた金属/n 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の測定原理について概念図を図 2-3 に示す。図 2-3 は金属/n 型半導体ショットキー接合を用いるため作用極表面に光励起されたキャリアとして正孔が移動している。溶液内では酵素が触媒する基質から生成物に変わる反応とメディエーターを介した式(2-1)の反応が起きている。



溶液内には酵素反応に伴い電子の授受をするメディエーターを用いる。光励起された正孔は Si 内部を移動して金電極の電子と再結合して金属の自由電子を減少させ、電極のポテンシャルを下げる。水溶液/電極界面の還元型メディエーターから電子を受け取って電極ポテンシャルは回復し、還元型メディエーターは酸化型メディエーターへ変化する酸化還元反応を生じる。この反応を式(2-2)に示す。



このメディエーターと光励起されたキャリアの酸化還元反応量に依存する電流値が外部回路で観測される。本研究の測定系は、メディエーターを介することにより酵素反応を測定している。そのため、メディエーターと電極間の感度を向上させることは酵素反応測定において重要である。また、図 2-3 については金属/n 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の場合を示している。そのため、金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の光励起

時は光励起されたキャリアとして電子が作用極に移動し、酸化還元反応の向きや電流値の向きが金属/n型半導体ショットキー接合を用いた LAAS と逆になる。

2.3 測定システム

2.3.1 測定システムの構成

図 2-4 は LAAS の二次元測定システムの概念図を表している。LAAS デバイスの表面は作用極として用いた。ITO 電極は対極として用いる。ITO 電極はガラス基板上的透明な電極である。そのため、溶液と対極の接触が直接視認でき、実験時の溶液/対極間が導通していない失敗を防ぎやすい。また、半導体レーザー(S1 FC 980、THORLABS)を励起光として用いた。励起光の照射位置は PC で制御されたガルバノミラーで決まり、 $f-\theta$ レンズを通じて光路を形成する。励起光のスポットの直径は $136\ \mu\text{m}$ である。裏面電極を通じた出力信号は CV アンプ(DDPCA-300、FEMTO Messtechnik GmbH)により増幅され、PC に得られる。デバイスと ITO の距離は 1.7mm 。溶液量は $5\ \mu\text{l}$ である。

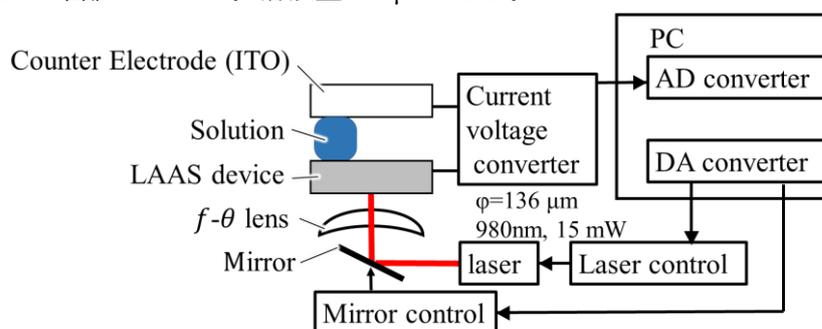


図 2-4. 濃度依存特性の測定システムの概念図 : LAAS デバイスからのセンサ出力は CV アンプにより増幅され、pc に記録される。レーザー(波長 980nm 、出力 15mW 、スポット径 $\phi=136\ \mu\text{m}$)のオンオフは PC により制御される。またレーザーの照射位置はガルバノミラーの角度を制御することにより決定される。

2.3.2 データの処理方法

図 2-5 は励起光を照射/非照射した際の LAAS 電流値の観測信号と酸化還元反応の量を示すセンサ信号の定義を示している。励起光の変化(照射→非照射、非照射→照射)直後は、電極界面の電気二重層の充放電による非定常電流が流れる。その後、充放電が収まり定常電流に収束する。クロノアンペロメトリーでは定常電流区間に酸化還元電流が含まれていることが確認されているため[67-68]、本研究もその区間を参考にする。本研究では、光が変化する前の 5 秒間の平均値の差(図 2-5 の I_{ON} と I_{OFF} の差分)をセンサ信号と定義している。

励起光照射点を $30\text{点} \times 30\text{点}$ で測定することにより二次元のデータ分布が得られる。上位 6 点の平均値を測定要素(1つの電極)の電流値として測定した。そのため、同一電極における 1つの濃度に対して 1つの電流値が決まる図 2-6 のようなグラフが観測される。提案した測定システムにはポーラログラフイーに用いている電圧を走査することはできないが、LAAS はパルスボルタンメトリーのような高感度になる可能性があると思定している。

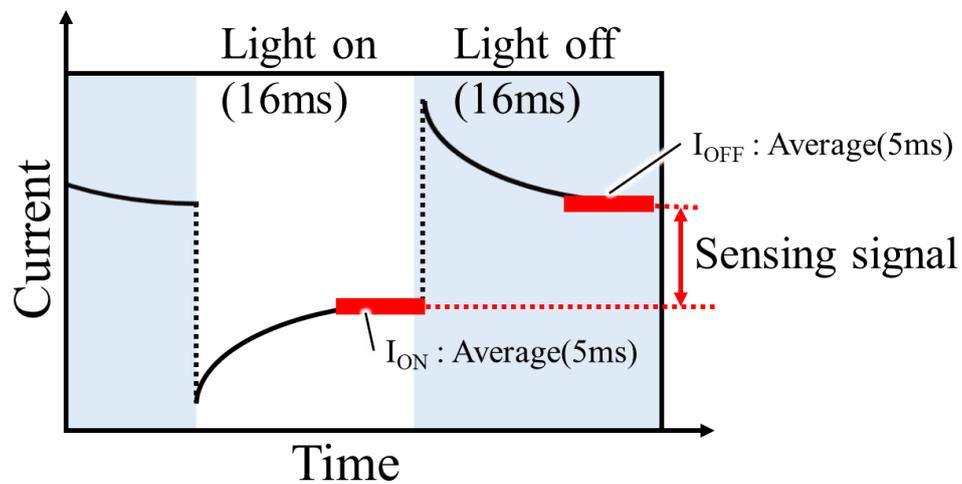


図 2-5. センサの観測信号とセンサ信号の定義の概念図 : 励起光を 32 ms(ON: 16 ms、OFF:16 ms)で周期的に点滅させた時の LAAS センサの出力を示す。励起光変化直後は電気二重層の充放電などの非ファラデー電流が含まれているため、変化の少ない励起光変化直前 5 ms の電流値の平均値の差分をセンサ信号と定義する。

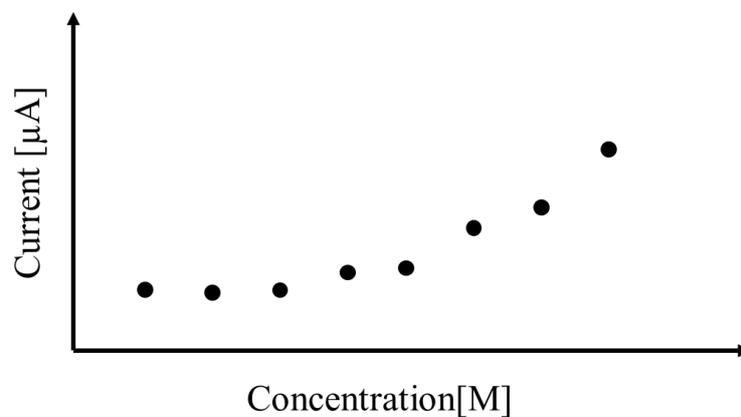


図 2-6 種々の測定対象濃度における電流値の概念図 : 一種の濃度の測定につき、一つの平均値が算出される。

2.3.3 実験式の定義

2.3.3.1 反応モデル

本研究では、測定する対象物質の濃度の高低によって、作用極付近の分子の分布が次の2つの状態に変化することを想定している。これらは電荷交換の速度と物質輸送(拡散)の速度に依存する状態であり、電極反応の速度つまり電流を決めている因子となるため、状態を想定することが前提として必要である[69]。

(i)電荷交換律速状態

溶液内で拡散によりバルクから電極表面に運ばれてくるメディエータ量が電極表面の酸化還元反応により電荷が交換されるメディエータ量より多い場合を想定する。これは「バルク内の拡散速度>作用電極における電荷交換速度」の状態であるため、電荷交換速度が系全体の律速である状態(電荷交換律速状態)となる。この状態の時は、作用電極における電荷交換速度が主に電流値に影響する。これは対象物質の濃度が高い時に起こりやすい状態である。

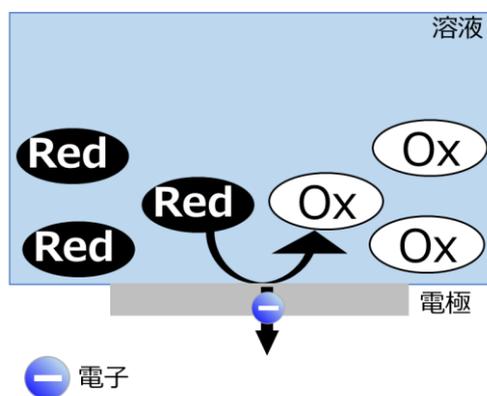


図 2-7. 電荷交換律速状態の概念図 : 拡散による電極表面にあるメディエータ量の供給量が電極表面で電荷交換を行うメディエータ量より多い状態。電流値は主に電荷交換速度に依存する。

(ii)拡散律速状態

溶液内で拡散によりバルクから電極表面に運ばれてくるメディエータ量が電極表面の酸化還元反応により電荷が交換されるメディエータ量より低い場合を想定する。これは「バルク内の拡散速度<作用電極における電荷交換速度」の状態であるため、拡散速度が系全体の律速である状態(拡散律速状態)となる。この状態の時は、作用電極における拡散速度が主に電流値に影響する。これは対象物質の濃度が低い時に起こりやすい状態である。

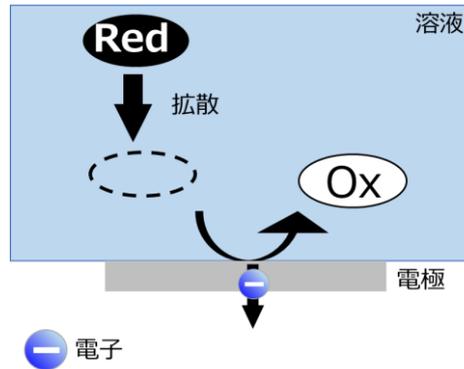
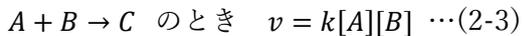


図 2-8. 拡散律速状態の概念図 : 拡散による電極表面にあるメディエータ量の供給量が電極表面で電荷交換を行うメディエータ量より少ない状態。電流値は主に拡散速度に依存する。

2.3.3.2 実験式

本研究では実験式の候補を述べていく。まず、化学反応の速度の関係を表した反応速度式については(2-3)式で示される。



v は反応速度、 k は速度定数、 $[A][B]$ はA、Bの濃度を示す。本研究の測定系では、作用極においてメディエータの酸化還元反応($Red \leftrightarrow Ox + e^-$)を想定している。また、電流は電荷の移動を測定しているために、この反応速度の式は有効な式の一つである。

次に同じ電極上における酸化反応と還元反応を考慮した化学反応速度の式であるバトラーボルマー式を(2-4)に示す。

$$j = j_0 \left\{ \exp \left[\frac{\alpha_a z F \eta}{RT} \right] - \exp \left[- \frac{\alpha_c z F \eta}{RT} \right] \right\} \cdots(2-4)$$

j は電極電流密度、 j_0 は交換電流密度、 α_a と α_c はアノードとカソードの電荷移動係数、 z は電極反応に関わる電子数、 F はファラデー定数、 η は過電圧、 R は気体定数、 T は絶対温度を示している。流れる電流は電極電位に依存することが示される。また、このバトラーボルマー式は電極上の表面において濃度が一定の場合が前提である。そのため、表面濃度の変化が多い拡散律速状態には適用できず、電荷交換律速状態の場合に適用可能である。

また、拡散律速状態時の電流値を表すコットレルの式を(2-5)に示す。

$$j = \frac{zFAD\sqrt{c}}{\sqrt{\pi^2 t^2}} \dots (2-5)$$

j は電流、 z は電極反応に関わる電子数、 F はファラデー定数、 A は電極表面積、 D は拡散係数、 t は時間を示している。このコットレルの式は時間による電流の関数であり、時間 $t^{\frac{1}{2}}$ で減衰していく。電流を流すために電圧をかけた直後は、電気二重層による充放電などの影響で、ファラデー電流と非ファラデー電流が混在している。非ファラデー電流の収束後は、このコットレルの式に準じたファラデー電流が観測される。また、この式は拡散律速の状態を前提としている。

本研究では電荷律速状態と拡散律速状態との判別を付けることが困難なため、反応速度を基にした実験式として下記の式(2-6)を用いる。

$$I = \alpha C^\beta + \gamma \dots (2-6)$$

I は電流、 α は定数、 C は測定対象物の濃度、 β は定数、 γ はオフセットを示している。

2.3.4 検出限界

JISK0211「分析科学用語」によると、検出限界とは検出できる最小量(値)である。図 2-9 に検出限界(Limit Of Detection, LOD)の概念図を示す。ブランク時の電流の平均値を a 、標準偏差を σ とする。この $a+3\sigma$ の範囲はブランク時の電流値の取りうる値の 99.7%が含まれていると想定している。そのため、検出限界の定義としてブランク時の電流値に測定対象が検出されないとされる実験式の電流の最小値($a+3\sigma$)に値する濃度とする。

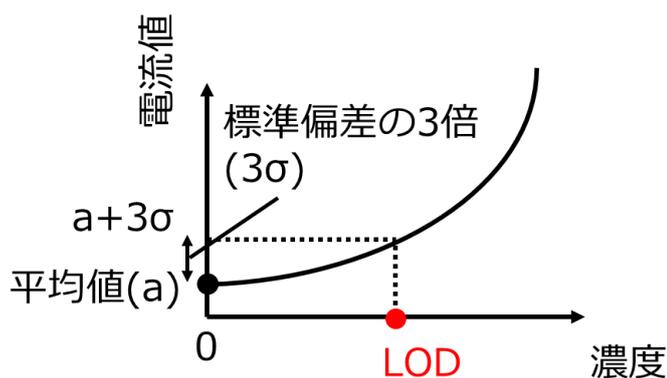
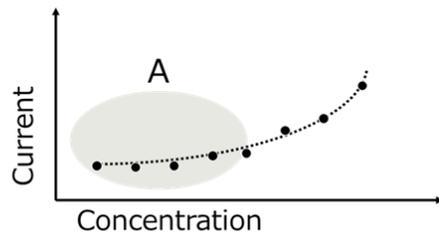
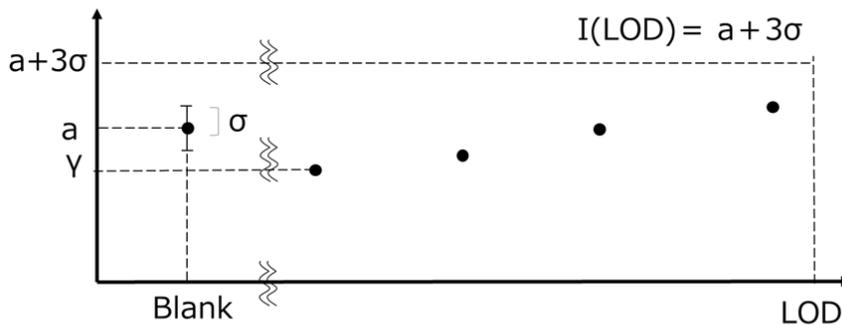


図 2-9. 検出限界(LOD)の定義の概念図 : ブランク時の電流の平均値 a 、標準偏差 σ とする。 $a+3\sigma$ の範囲はブランク時の電流の 99.7%が含まれている。測定対象が検出されないとされる電流の最小値を検出限界と定義する。

(a)



(b) $a+3\sigma > \gamma$



(c) $a+3\sigma < \gamma$

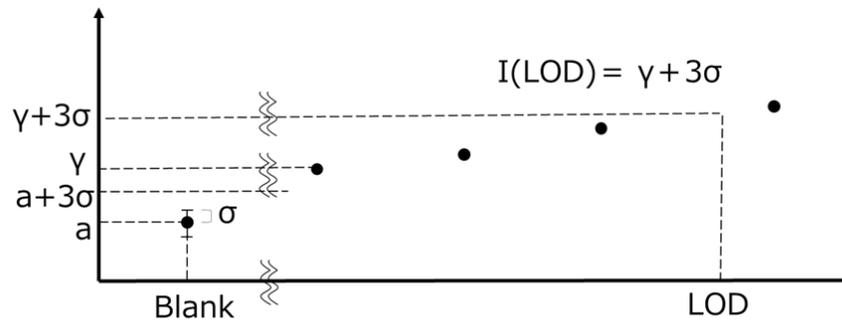


図 2-10 検出限界の算出時の定義の詳細の概念図 : (a)濃度依存特性の概念図。A の拡大箇所を(b)(c)に示す。(b) $a+3\sigma > \gamma$ の場合: $I(\text{LOD})=a+3\sigma$ で検出限界を算出した。(c) $a+3\sigma < \gamma$ の場合: $I(\text{LOD})=\gamma+3\sigma$ で検出限界を算出した。

また、実際に計算をすると図 2-10 のように 2 つのケースが生じる。図 2-10(b)(c)は(a)の A の箇所(低濃度の電流値)の拡大図である。ブランク時の平均値とブランク時の標準偏差の 3 倍の和($a+3\sigma$)が実験式のオフセット γ を上回る場合(図 2-10(b))と下回る場合(図 2-10(c))である。上回る場合(図 2-10(b))は先述したとおりに $I(\text{LOD})=a+3\sigma$ で算出することが可能である。しかし、下回る場合(図 2-10(c))は $I(\text{LOD})=a+3\sigma$ で算出することが難しいため、 $I(\text{LOD})=\gamma+3\sigma$ で検出限界を算出した。検出限界を上述のように定義したため、ブランク時の電流値(a)を下げることや実験式の傾き(α)を上げることが検出限界向上につながる。

2.4 I-V 測定

図 2-11 に I-V 測定 の 概念 図 を 示 す 。 LAAS デバイス の ショットキー接合 の 形成 を 確認 する ため に I-V 測定 を 行 っ た 。 LAAS の 裏面電極 は アルミプレート に 接触 さ せ 、 表面 の 電極 に 金ワイヤー を 接触 さ せ た 。 測定 に は 電気化学測定システム (HZ5000, 北斗電工株式会社) を 用い て 、 電圧 は 100mV/s で 掃引 し た 。

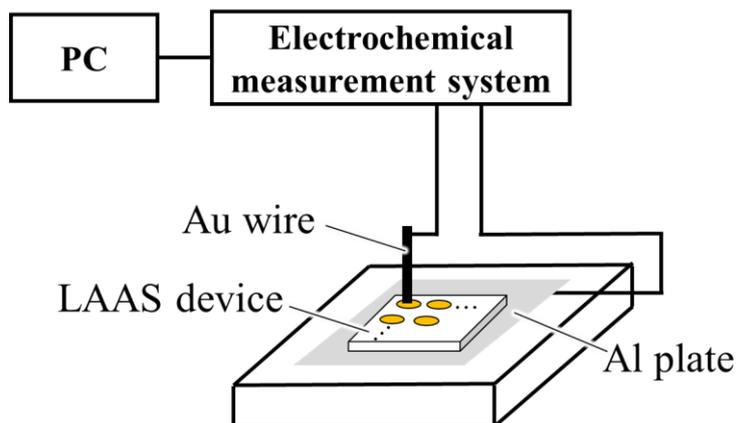


図 2-11. I-V 測定 の 概念 図 : LAAS デバイス の 表面 の 作用極 と 金ワイヤー の 接触 と LAAS デバイス 裏面 の 裏面電極 と アルミプレート の 接触 に よ り 電気化学測定システム と LAAS デバイス の 電気的接触 を 取 っ て い る 。

また 図 2-12 に オーミック接合測定 の 概念 図 を 示 す 。 LAAS デバイス の 裏面電極 の オーミック接合 の 形成 を 確認 する ため に 行 っ た 。 デバイス の 裏面電極 蒸着 時 に 電極 を 二つ に 分け る よう に 形成 し 、 その 両端 に 電圧 を かけ て 流 れ る 電流値 を 測定 する 。

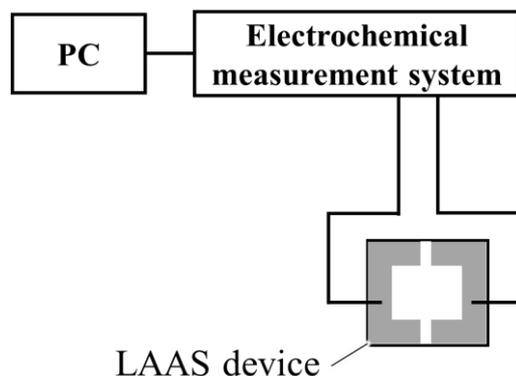


図 2-12. オーミック接合測定 の 概念 図 : デバイス 裏面 の 電極 形成 時 に 二つ に 分離 し た 。 その 二か所 は デバイス 内 の 半導体部 を 通 じ て 導通 し て い る ため 、 半導体 / 裏面電極 の 界面 が オーミック接合 な ら オーミック接合 の 特性 が 測定 さ れ る 。

2.5 光励起電流値測定

図 2-13 に光励起電流値測定のプロットを示す。励起光の位置制御や ON/OFF の制御は 2.3 と同様である。デバイスの作用極表面に Au ワイヤを直接接触させることにより電氣的接触を取った。レーザーの照射位置や ON/OFF の制御、観測電流の記録などは 2.3.1 ~ 2.3.2 の手法と同様である。

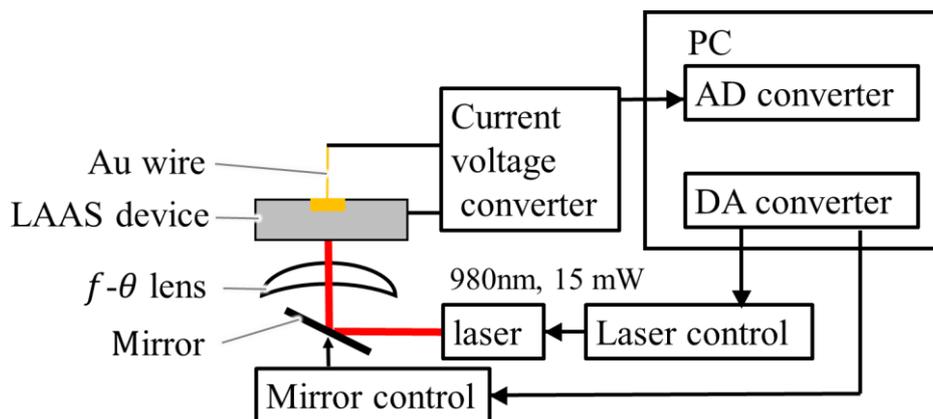


図 2-13. 光励起電流値測定のプロット：表の電極に直接 Au ワイヤを電氣的接触させることにより、溶液の影響を排除した。また、レーザーにおける ON/OFF 制御や照射位置制御は 2.3 と同一の方法である。

第3章. 予備実験

3.1 測定点の性能差について

本研究のデバイスは複数の測定点(電極)を有している。本項目では、同デバイス上の複数の測定点の性能の差について検討した。溶液はフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)が同割合で 10 nM ~ 40 mM (10 nM、100 nM、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1 mM、10 mM、40 mM)用意した。2.3 の方法でデバイス上の3つの測定点(Element1 ~ Element3)の電流値を測定した。

図 3-1 は測定結果を示している。 $C_{\text{feri/fero}}$ をフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出される。

$$\text{Element1} : I = 1.5 C_{\text{feri/fero}}^{0.32} + 0.059 \quad (R^2=0.99, \text{LOD}=1.2 \mu\text{M})$$

$$\text{Element2} : I = 0.92 C_{\text{feri/fero}}^{0.40} + 0.39 \quad (R^2=0.97, \text{LOD}=5.1 \mu\text{M})$$

$$\text{Element3} : I = 0.55 C_{\text{feri/fero}}^{0.57} + 0.47 \quad (R^2=0.99, \text{LOD}=1.4 \mu\text{M})$$

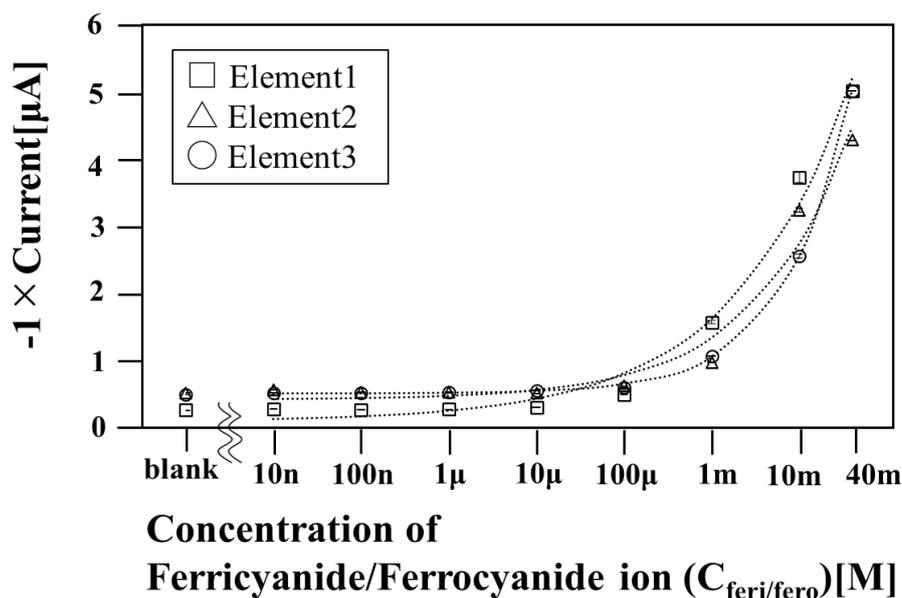


図 3-1. 同デバイスの各測定点におけるフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)の濃度ごとの電流値 : Element1(\square)の時の点線は実験式($I = 1.5 C_{\text{feri/fero}}^{0.32} + 0.059$ ($R^2=0.99$, $\text{LOD}=1.2 \mu\text{M}$))、Element2(\triangle)の時の点線は実験式($I = 0.92 C_{\text{feri/fero}}^{0.40} + 0.39$ ($R^2=0.97$, $\text{LOD}=5.1 \mu\text{M}$))、Element3(\circ)の時の点線は実験式($I = 0.55 C_{\text{feri/fero}}^{0.57} + 0.47$ ($R^2=0.99$, $\text{LOD}=1.4 \mu\text{M}$))を示している。エラーバーは標準偏差を示している($n=4$)。

測定点により実験式の傾き($I = \alpha C^\beta + \gamma$ の α)に差がある理由は、測定点間の干渉や、測定点電極において蒸着した金やアルミの厚さなどの表面状態が異なること、各測定点のショットキー接合の完成度が異なることが原因として考えられる。これらの問題に対しては、リーク電流を軽減する手法やクロストークの解析、デバイスの校正方法などのアプローチをすることが測定点間の性能差を減らすことにつながると考えられる。しかし、図 3-1 より各測定点を比較しても特性が類似しているため、本研究は 1 つの測定点を対象にして議論をする。

3.2 励起光強度について

本研究で用いる励起光強度について調査を行った。金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた BSF 付き LAAS を用いた。溶液はフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) が同割合で 10 nM ~ 40 mM (10 nM、100 nM、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1 mM、10 mM、40 mM) 用意した。2.3 の方法で、励起光強度は 15 mW、3 mW、1.5 mW の 3 種類を用いた。

図 3-2 が測定結果である。 $C_{\text{feri/fero}}$ をフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出される。

$$15 \text{ mW}(\triangle) : I = 0.033 C_{\text{feri/fero}}^{0.91} + 0.0029 \quad (R^2 = 0.99, \text{ LOD} = 30 \mu\text{M})$$

$$3 \text{ mW}(\square) : I = 0.0098 C_{\text{feri/fero}}^{1.0} + 0.00072 \quad (R^2 = 0.99, \text{ LOD} = 250 \mu\text{M})$$

$$1.5 \text{ mW}(\circ) : I = 0.005 C_{\text{feri/fero}}^{0.99} + 0.00035 \quad (R^2 = 0.99, \text{ LOD} = 284 \mu\text{M})$$

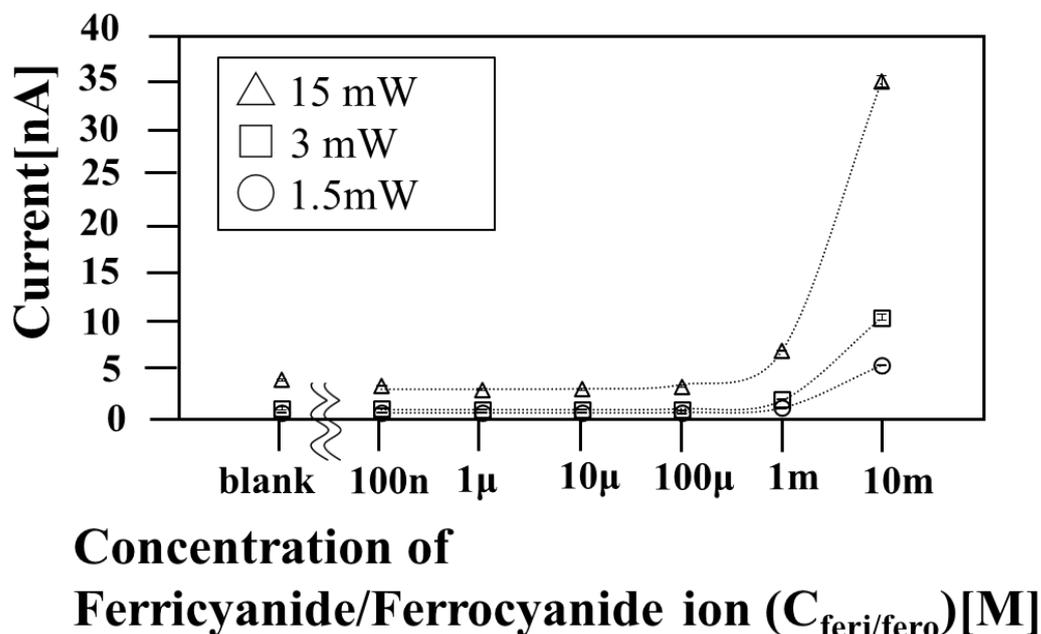


図 3-2. 各励起光強度におけるフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) の濃度ごとの電流値 : 15 mW (\triangle) の時の点線は実験式 ($I = 0.033 C_{\text{feri/fero}}^{0.91} + 0.0029$ ($R^2 = 0.99$, $\text{LOD} = 30 \mu\text{M}$)), 3 mW (\square) の時の点線は実験式 ($I = 0.0098 C_{\text{feri/fero}}^{1.0} + 0.00072$ ($R^2 = 0.99$, $\text{LOD} = 250 \mu\text{M}$)), 1.5 mW (\circ) の時の点線は実験式 ($I = 0.005 C_{\text{feri/fero}}^{0.99} + 0.00035$ ($R^2 = 0.99$, $\text{LOD} = 284 \mu\text{M}$)) を示している。エラーバーは標準偏差を示している ($n=4$)。

励起光強度を上げると電流値増大に伴いノイズも増大する。しかし、ノイズの増大よりも実験式の傾き($I = \alpha C^\beta + \gamma$ の α)の増大の方が高いため、センサの検出感度は向上すると考えられる。そのため本研究では現システムの励起光強度の最大値である 15 mW の励起光出力を用いた。

第4章. LAAS によるグルコースオキシダーゼを用いたグルコース濃度測定の研究

4.1 グルコースオキシダーゼについて

酵素とは生体内で生じる化学反応に対して、触媒として機能するタンパク質である。更に基質特異性という反応する物質に対して選択性を持つ。国際生化学連合によると、酵素の基質特異性により触媒する反応によって、酵素の種類は7種類に分類されている。その種類の一つである酸化還元酵素は、酸化還元反応を触媒する酵素である。生体内において多く使われる酸化還元反応は水素原子の移動や酸素原子の付加や電子の移動が生じるために、これらの反応を検出可能な電気化学センサと酸化還元酵素は相性が良い。

酸化還元酵素の1つであるグルコースオキシダーゼはグルコースを基質とする。グルコースは細胞の呼吸などに使われる重要な単糖類の一つであり、用途として糖尿病の指標や食品衛生にも使われている[23, 29, 70-71]ためグルコースの測定は重要である。グルコースオキシダーゼはグルコースからグルコノラクトンと過酸化水素に分解する反応を触媒する。電気化学センサによるグルコースの検出できる報告が多くある[23, 29, 70-71]。これらの有用性や先行研究に加えて、酵素自体が熱や pH の変化にも強く研究が多くなされているため、本章は酸化還元酵素のモデル酵素としてグルコースオキシダーゼを用いた。

本章は LAAS でグルコースオキシダーゼを用いてグルコースの検出を行った。まず、酵素と電極の反応を仲介する酸化還元物質(メディエーター)に対する感度を測定した。その後、グルコースオキシダーゼを用いて、グルコースへの感度を測定する。最後に、他の単糖類の電流値を測定と比較して選択性を確認する。これらの測定を通じて LAAS がグルコースを検出できることを論証した。

4.2 実験方法

4.2.1 デバイス製作方法

図 4-1 に LAAS デバイスの製作過程を示す。2 cm×2 cm にカットしたシリコン(n 型、0.5 ~ 10 Ωcm)を 1000° C、90 分間 O₂ 雰囲気中で熱酸化した。スピコートを用いて、表面にフォトリソist (OFPR、東京応化工業株式会社)を 500 rpm で 10 秒間、3000 rpm で 30 秒間塗布し、ハードベイクを 120° C で 40 分間行った。マスク(φ=1.0 mm ピッチ間 2.54 mm)を用いて露光・現像後、ハードベイクを 120° C で 40 分間行った(図 4-1 (a))。フッ酸(東京応化工業株式会社)で酸化膜除去後(図 4-1 (b))、表面には Au、裏面には Al を抵抗式加熱真空蒸着気で蒸着した(図 4-1 (c))。

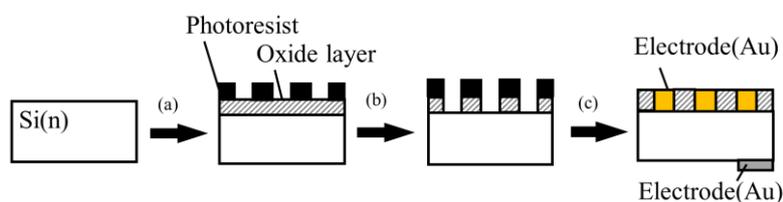


図 4-1. 金属/n 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS デバイスの製作図 : (a)酸化、パターンニング(b)エッチング(c)電極製作

4.2.2 測定環境

濃度依存特性測定には 2.3 の方法を用いた。測定対象として用いた溶液の組成は表 4-1 に示した。ヘキサシアニド鉄(III)カリウム(フェリシアン化カリウム)とヘキサシアニド鉄(II)酸カリウム(フェロシアン化カリウム)は Sigma-Aldrich から購入した。硫酸ナトリウム、グルコース、フラクトース、ラクトースは和光純薬株式会社(当時)から購入した。ガラクトースは東京応化工業株式会社から購入した。

表 4-1 溶液の組成

(a)メディエーター測定時の溶液

	[Fe(CN) ₆] ³⁻	[Fe(CN) ₆] ⁴⁻
1a	10 mM	1 μM ~ 40 mM (1 μM、 10 μM、 100 μM、 1 mM、 10 mM、 40 mM)
1b	100 μM	同上
1c	0 M	同上

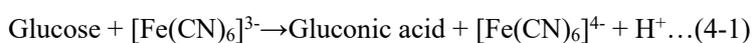
(b)グルコース測定時の溶液

	[Fe(CN) ₆] ³⁻	[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	Glucose
2a	20 mM	20 mM	10 nM ~ 10 mM (10 nM、 100 nM、 1 μM、 10 μM、 100 μM、 1 mM、 10 mM)
2b	20 mM	0 M	同上

(c)単糖類測定時の溶液

	[Fe(CN) ₆] ³⁻	[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	Monosaccharides
3a	20 mM	20 mM	No substrate(negative control)
3b	同上	同上	Glucose 10 mM
3c	同上	同上	Galactose 10 mM
3d	同上	同上	Fructose 10 mM
3e	同上	同上	Lactose 10 mM

グルコースオキシダーゼを介してグルコースとフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン([Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻)は式(4-1)の反応を起こすことが報告されている [59]ため、本章でも式(4-1)の反応を想定している。



4.3 結果

4.3.1 メディエータのみの濃度依存特性

図 4-2 は、フェリシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$)濃度を固定(10 mM、100 μM 、0 M)させた時のフェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)の濃度の変化に対する電流値である。1a~1c は表 4-1 に書いた組成の異なる溶液を示している。 C_{fero} をフェロシアン化物イオン濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出される。

10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1a)のとき

$$I = 1.2 C_{\text{fero}}^{0.33} + 0.041 \quad (R^2=0.99) \quad \text{.....(4-2)}$$

100 μM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1b)のとき

$$I = 0.33 C_{\text{fero}}^{0.23} + 0.096 \quad (R^2=0.99) \quad \text{.....(4-3)}$$

0 M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1c)のとき

$$I = 0.0078 C_{\text{fero}}^{0.74} + 0.091 \quad (R^2=0.71) \quad \text{.....(4-4)}$$

これらの結果は、図 4-2 より決定係数も高い実験式が適用できているため、LAAS のメディエーターに対する電流値は反応速度に類似した実験式が適用できることが確認された。

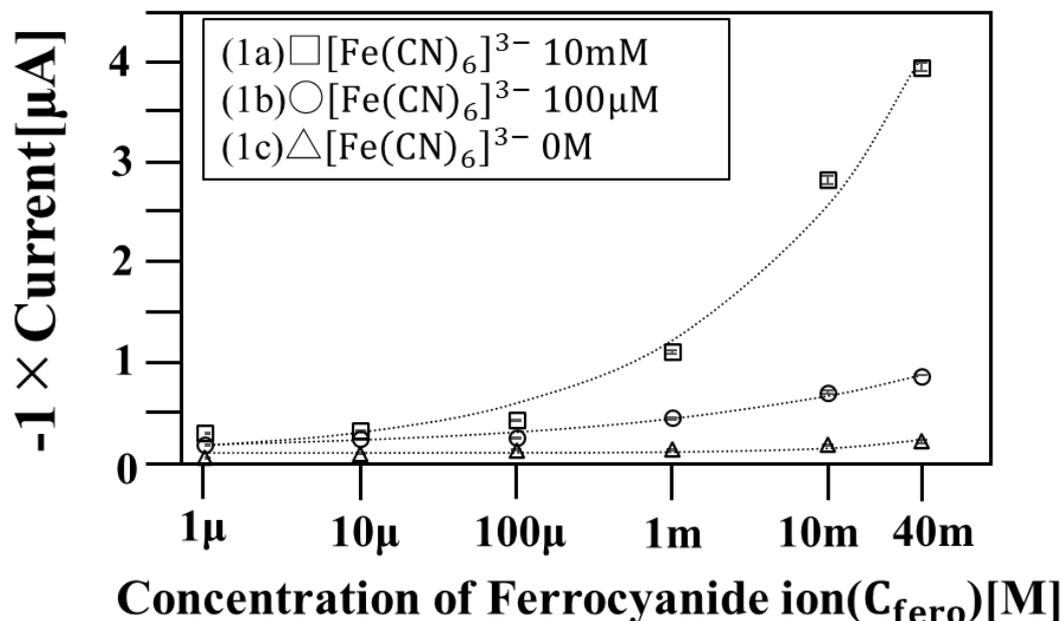


図 4-2. フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)の種々の濃度に対する電流値 : 10 mM フェリシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) (\square)の時の点線は実験式($I = 1.2 C_{\text{fero}}^{0.33} + 0.041$ ($R^2=0.99$))、100 μM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (\circ)の時の点線は実験式($I = 0.33 C_{\text{fero}}^{0.23} + 0.096$ ($R^2=0.99$))、0 M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (\triangle)の時の点線は実験式($I = 0.0078 C_{\text{fero}}^{0.74} + 0.091$ ($R^2=0.71$))、を示している。エラーバーは標準偏差を示している($n=4$)。

4.3.2 基質の濃度依存特性

図 4-3 には、グルコースオキシダーゼを用いて、グルコースの濃度を変化させ測定した電流値の結果を示す。2a ~ 2b は表 4-1 に書いた組成の異なる溶液を示している。C_{glu} をグルコース濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出される。

10 mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ (2a) のとき

$$I = 2.3 C_{\text{glu}}^{0.048} + 1.86 \quad (R^2=0.99, \text{LOD}=13 \mu\text{M}) \quad \cdots(4-5)$$

10 mM [Fe(CN)₆]³⁻ (2b) のとき

$$I = 0.53 C_{\text{glu}}^{0.94} + 0.30 \quad (R^2=0.99, \text{LOD}=37 \mu\text{M}) \quad \cdots(4-6)$$

これらの結果は図 4-3 より実験式が適用できている箇所が多く、決定係数も高いため、LAAS のグルコースに対する電流値は反応速度に類似した実験式が適用できることが示された。

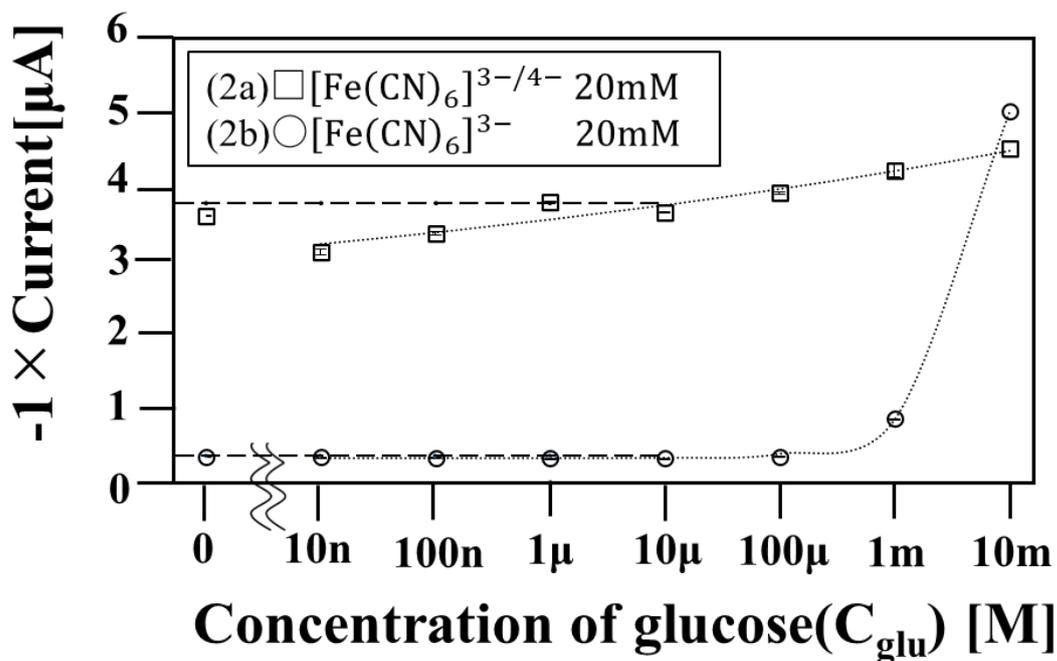


図 4-3. グルコースの種々の濃度に対する電流値 : 10 mM フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン([Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻) (□)の時の点線は実験式($I = 2.3 C_{\text{glu}}^{0.048} + 1.86$ ($R^2=0.99$, $\text{LOD}=13 \mu\text{M}$))、10 mM [Fe(CN)₆]³⁻ (○)の時の点線は実験式($I = 0.53 C_{\text{glu}}^{0.94} + 0.30$ ($R^2=0.99$, $\text{LOD}=37 \mu\text{M}$))を示している。破線はブランクの電流値と標準偏差の 3 倍の和を示す。エラーバーは標準偏差を示す(n=4)。

4.3.3 選択性について

図 4-4 には他の単糖類(ガラクトース、フラクトース、ラクトース)10 mM の電流値を示す。結果より、グルコースの電流値は他の単糖類の電流値に対して約 8 倍~10 倍の電流値を示した。

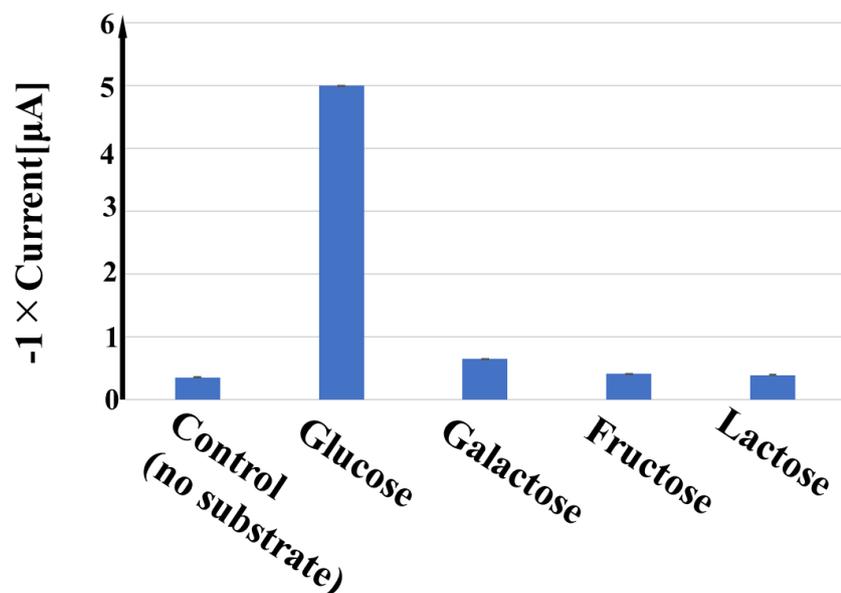


図 4-4. 単糖類に対する電流値 : 基質が無い溶液と、グルコースを含んだ溶液、グルコース以外の単糖類(ガラクトース、フラクトース、ラクトース)10 mM を含んだ時の電流値を示している。エラーバーは標準偏差を示している(n=4)。

4.4 考察

図 4-2 のフェリシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$)濃度を固定(10 mM、100 μM 、0 M)させ、フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)の濃度の変化に対する電流値について述べる。図 4-2 より実験式が適用できているため、LAAS はメディエーターであるフェロシアン化物イオンに依存することが確認された。また、作用極で酸化されるフェロシアン化物イオン以外にフェリシアン化物イオンに依存する実験式で表現できることが確認された。これは、フェリシアン化物イオンが作用極から対極にキャリアを輸送する役割を担っていることや、フェリシアン化物イオン自体が対極で反応していることが原因と考えられる。

図 4-3 のグルコースオキシダーゼを用いて、グルコースの濃度を変化させ測定した電流値の結果について述べる。図 4-3 より実験式が適用できているため、LAAS グルコースに依存する実験式で表現できることが確認された。またメディエーターの含有量における電流値の傾向の違いとして以下のように考察した。式(4-2)に基づき 10 mM グルコースが 2a の溶液内で反応すると、0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 40 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ のようになる。これは図 4-2 より、式(4-4)の状況に近いので、式(4-4)を用いて電流値を計算すると、0.21 μA になる。しかしこれは実測値である図 4-3 の 4.5 μA と桁が異なり一致しない。式(4-2)を用いて電流値を計算すると、4.1 μA になり、これは実測値と似た値になる。これにより、フェリシアン化物イオンは全て反応せず一部残っている状態であると考えられる。そのため、実際の電流値はフェリシアン化物イオンが一定残っている状態でのフェロシアン化物イオンの変化している状況が想定される。溶液 2b の場合も似た傾向の結果になる。そのため、今後はフェリシアン化物イオンの反応や濃度平衡も考慮した電流値の実験式を構築していくことが、グルコースの測定範囲に適したメディエーターの比率を構成できると考える。また今回の場合については、検出感度が高いため、10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ の方が高感度になる割合であると考えられる。

図 4-4 には他の単糖類(ガラクトース、フラクトース、ラクトース)10 mM の電流値について。グルコースオキシダーゼは主にグルコースに反応するが、他の単糖類についても微量に反応することが報告されており[72-73]、図 4-4 の結果は報告と一致する。そのため微量の反応は本測定系では問題にならず、LAAS デバイスでグルコースオキシダーゼを用いた本測定系は選択性を持つことが確認できた。

以上より LAAS デバイスでグルコースオキシダーゼを用いて、基質であるグルコースの量に依存する電流値が測定できた。これにより他の酸化還元酵素にも応用が可能であると考えられる。この研究については、メディエーターのレドックスサイクルの輸送速度や反応速度を考慮した測定系の構築や他の酸化還元酵素への実際の応用、酵素阻害剤の評価、酵素活性化因子の評価などが今後の課題として挙げられる。

5.1 酸化還元酵素の反応について

創薬や臨床に用いられる酵素の分類の一つに酸化還元反応を触媒する酸化還元酵素がある。図 5-1 には酸化還元酵素におけるメディエータとの反応の概念図を示した。酸化還元酵素には様々な種類があるが、グルコースオキシダーゼ[23, 70]やアルコールデヒドロゲナーゼ[74]などの酵素反応に伴いメディエータが電子を受け取る系(図 5-1(a))とアルドースレダクターゼ[75]や HMG-CoA レダクターゼ[76]、アゾ還元酵素[77-78]などの酵素反応に伴いメディエータが電子を与える系(図 5-1(b))がある。

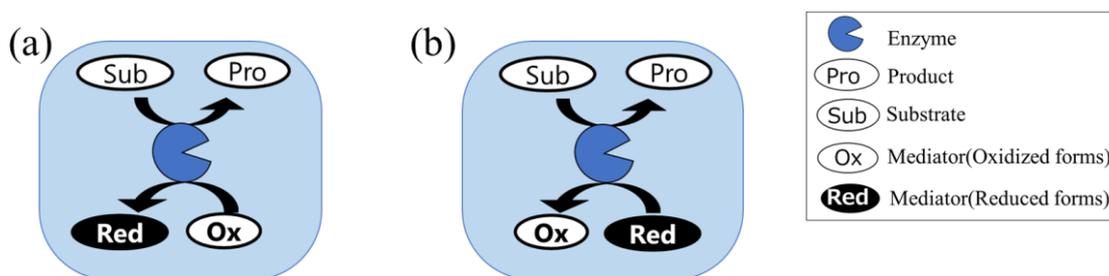


図 5-1. 酸化還元酵素におけるメディエータとの反応の概念図 : (a) メディエータが電子を受け取る系の場合。酵素が触媒する反応に伴いメディエータが電子を受け取る反応が起きる。(b) メディエータが電子を与える系の場合。酵素が触媒する反応に伴いメディエータが電子を与える反応が起きる。

図 5-2 は酸化還元酵素に伴い反応するメディエータを LAAS 測定する際の想定している原理図を示す。メディエータが電子を受け取る系の酵素は、酵素反応の触媒に伴い還元型メディエータを生成する。これまで製作されてきた金属/n型半導体ショットキー接合を用いた LAAS は励起時に作用極にホールが移動し、作用極表面上の還元型メディエータと電荷の授受による電流値が観測されると想定している(図 5-2(a))。そのため、金属/n型半導体ショットキー接合を用いた LAAS はメディエータが電子を受け取る系の酵素測定に適していると考えられる。一方、メディエータが電子を与える系の酵素測定は、励起時に作用極に電子が移動し、作用極表面上の酸化型メディエータと電荷の授受による電流値が観測されると想定しているため、金属/p型半導体ショットキー接合を用いた LAAS 測定が適していると考えられる(図 5-2(b))。しかし、まだ金属/p型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作方法は確立されていない。

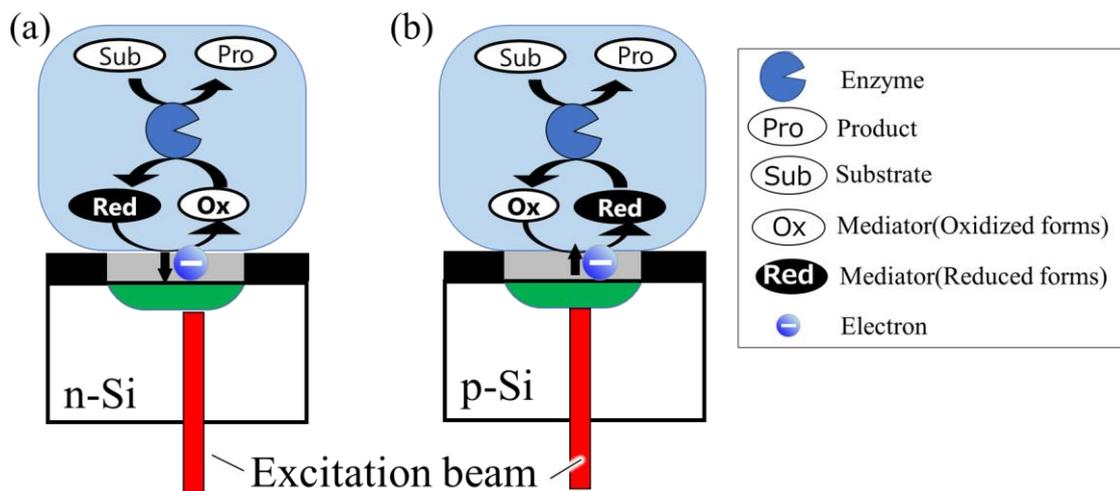


図 5-2. 酸化還元酵素の触媒する反応に対して、メディエータを用いて LAAS 測定する原理図：(a) メディエータが電子を受け取る系の場合。金属/n 型半導体ショットキー接合によりキャリアが励起されるので正孔が電極表面に移動する。移動した電子は溶液内の酸化型メディエータと酸化還元反応を生じる。(b) メディエータが電子を与える系の場合。金属/p 型半導体ショットキー接合によりキャリアが励起されるので電子が電極表面に移動する。移動した電子は溶液内の酸化型メディエータと酸化還元反応を生じる。

本章では金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作方法の検討と性能の確認を行った。p 型シリコンと金属/p 型半導体ショットキー接合を作る 2 種類の金属(Al と Cu)を用いて LAAS デバイスを製作した。次に LAAS デバイス内において金属/p 型半導体ショットキー接合が形成されているか確認のために I-V 測定を行った。その後、二種類の別々の金属を用いて作る金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の性能を比較するため、酸化型メディエータの還元電流を測定し、濃度依存特性の計測を行い、濃度に対する電流値の変化を調べた。最後に二次元測定の性能に関して考察を行った。

5.2 実験方法

5.2.1 メディエータのみの濃度依存特性

図 5-3 にデバイスの製作過程を示す。2 cm×2 cm にカットしたシリコン(p 型、40-60 Ωcm) を 1000° C、90 分間 O₂ 雰囲気中で熱酸化した。スピコートを用いて、デバイス表面に HMDS を 700 rpm で 30 秒間塗布し、プレベイクを 100° C で 10 分間行った。次にスピコートを用いて、表面にフォトレジスト(OFPR、東京応化工業株式会社)を 500 rpm で 10 秒間、3000 rpm で 30 秒間塗布し、プレベイクを 80° C で 10 分間行った。マスク(φ=1.0 mm ピッチ間 2.54 mm)を用いて露光・現像後、ハードベイクを 120° C で 40 分間行った。(図 5-3. (a))フッ酸(東京応化工業株式会社)で酸化膜除去後(図 5-3. (b))、裏面には Au、表面には Au/Al と Au/Cu を抵抗式加熱真空蒸着気で蒸着した 2 種類のデバイスを製作した(図 5-3. (c))。

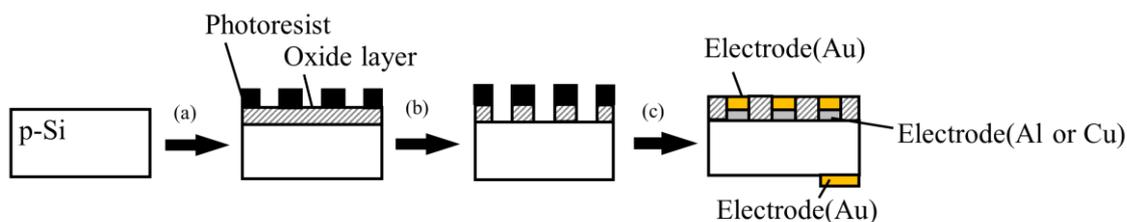


図 5-3. 金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作方法 : (a)酸化・露光・現像(b)エッチング(c)電極形成

5.2.2 測定環境

I-V 特性測定には 2.4 の方法を用いた。濃度依存特性測定には 2.3 の方法を用いた。測定対象として、フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン([Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻, Sigma-Aldrich)は同じ割合で 10 mM ~ 1 μM (10 μM、100 μM、1 mM、10 mM)、支持塩として硫酸ナトリウム(和光純薬)0.1 M を混合した溶液を用意した。

5.3 結果

5.3.1 I-V 特性

図 5-4(a)にデバイス内の I-V 特性を取得している箇所の概念図を示す。(b)は金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の I-V 測定の結果を示す。電圧値の上昇に対して電流値が比例的に上昇するオーミック接合が確認できる。そのためデバイス裏面はオーミック接合になっていることが確認できる。

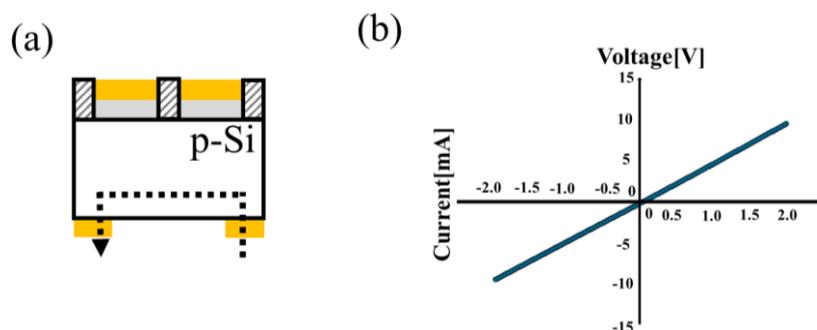


図 5-4. (a)LAAS デバイス内の I-V 特性を取得している箇所の概念図。(b)金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の裏面の I-V 特性。

図 5-5(a)にデバイス内の I-V 特性を取得している箇所の概念図を示す。(b)は Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS、(c) Cu/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の I-V 測定の結果を示す。(b)(c)ともに電圧が負の領域で急激な上昇がみられる。また電圧が正の領域で電流値の抑制がみられることから整流性が確認できる。整流性の方向に関しては、金属/n 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS と逆方向であるため、想定通りの向きである。図 5-4 より裏面電極はオーミック接合であること、図 5-5 より I-V 特性から整流性が確認できたことから、Cu/p-Si or Al/p-Si 間はショットキー接合、p-Si/Au 間はオーミック接合の想定した通りの構造になっていることが確認された。

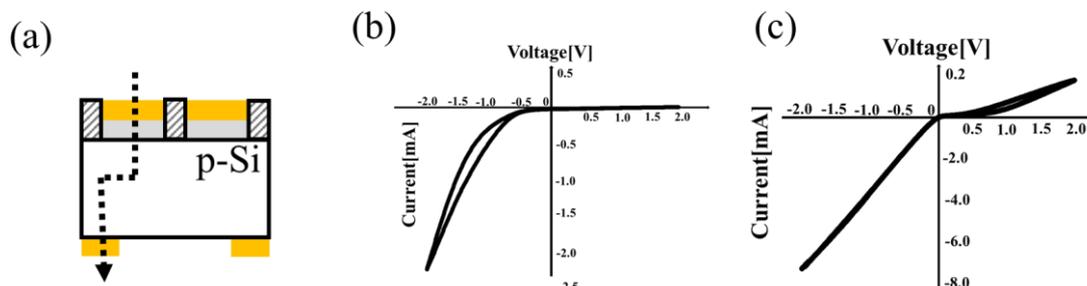


図 5-5. (a)LAAS デバイス内の I-V 特性を取得している箇所の概念図。(b)Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の表面の I-V 特性。(c)Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の表面の I-V 特性。

5.3.2 2種類のデバイスの濃度依存特性

図 5-6 には 2 種類の金属 (Al or Cu) による金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の各フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオンの濃度における電流値の結果を示した。C_{feri/fero} をフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出される。

$$\text{Au/Al/Si} : I = 0.28 C_{\text{feri/fero}}^{1.3} + 0.023 \quad (R^2=0.99, \text{ LOD} = 6.2 \mu\text{M})$$

$$\text{Au/Cu/Si} : I = 0.010 C_{\text{feri/fero}}^{1.0} + 0.0012 \quad (R^2=0.99, \text{ LOD} = 74 \mu\text{M})$$

これらの結果より、金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS はフェリシアン化物イオンの変化に依存することが示された。また検出感度の観点から Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の性能の方が良い事が確認できる。

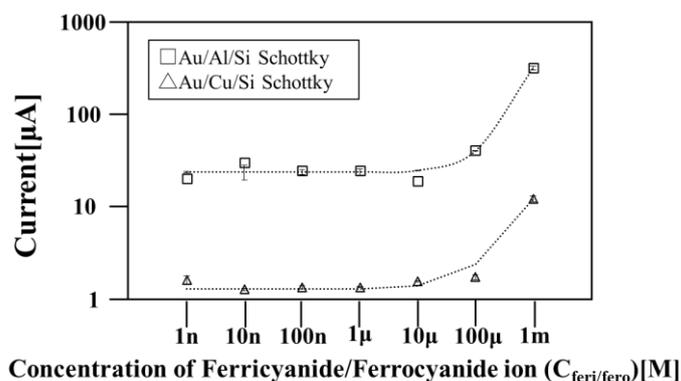


図 5-6. 金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS によるフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) の濃度ごとの電流値 : Au/Al/Si ショットキー接合を用いた LAAS (□) の時の点線は実験式 ($I = 0.28 C_{\text{feri/fero}}^{1.3} + 0.023$ ($R^2=0.99$, $\text{LOD} = 6.2 \mu\text{M}$)), Au/Cu/Si ショットキー接合を用いた LAAS (△) の時の点線は実験式 ($0.010 C_{\text{feri/fero}}^{1.0} + 0.0012$ ($R^2=0.99$, $\text{LOD} = 74 \mu\text{M}$)) を示している。エラーバーは標準偏差を示している ($n=3$)。

5.3.3 酸化型メディエータに対する濃度依存特性

また、電流値の高い Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS でフェロシアン化物イオン濃度を固定し、フェリシアン化物イオン濃度を変更した場合で測定した結果を図 4-7 に示す。また C_{feri} をフェリシアン化物イオン濃度として定義した場合、実験式は以下の様に算出された。

$$\text{Au/Al/Si} : I = 0.016 C_{\text{feri}}^{0.44} + 0.0027 \quad (R^2=0.96)$$

決定関数の高い実験式が適用できたことから、Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS は酸化型メディエータであるフェリシアン化物イオンの変化に依存することが示された。

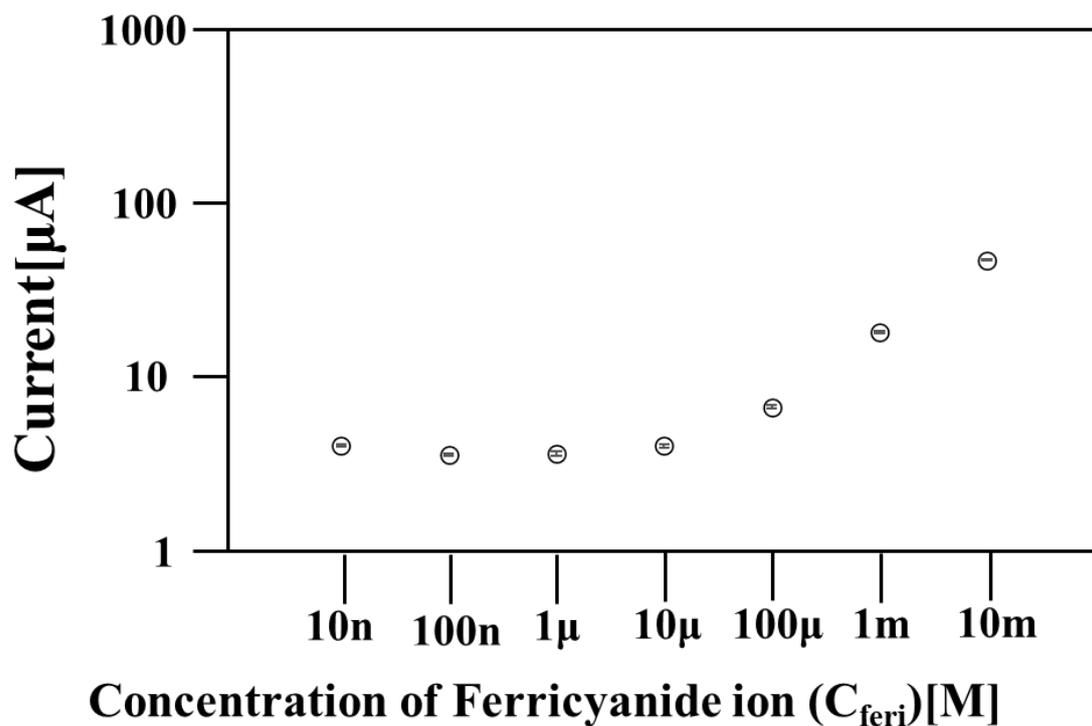


図 5-7. Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS におけるフェリシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) の濃度ごとの電流値：エラーバーは標準偏差を示している ($n=3$)。

5.3.4 二次元測定

二次元測定についての結果を述べる。フェリシアン化物/フェロシアン化物イオン 10 mM の溶液を 2 か所に滴下した二次元測定の結果を図 4-8 に示した。(a)は溶液をデバイスと対極で挟んだ状態の光学写真である。白い破線の箇所溶液が展開されている。(b)は励起光をスキャンして電流値を測定した結果である。

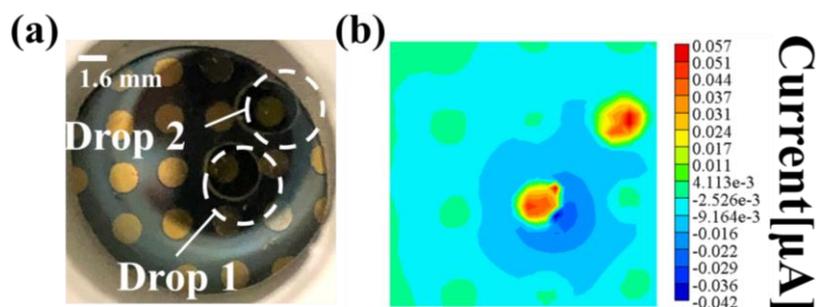


図 5-8. フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) 10 mM を 2 か所に展開した際の二次元測定結果 : (a)光学写真(b)測定電流値。二次元測定した電流値。電流値の大きさによって色を割り振った。

5.4 考察

図 4-6 の 2 種類の金属 (Al or Cu) による金属/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS 種々のフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン濃度 ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) における電流値の結果について述べる。Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の電流値が高くなった原因について考察する。電流値に関しては金属/p-Si ショットキー接合を形成する金属が大きく関わりと想定している。今回は金属/p-Si ショットキー接合を形成するため Al と Cu を用いた。参考文献[79]に記載されている、Al の仕事関数は 4.20 [eV]、Cu 仕事関数は 5.1 [eV] である。金属の仕事関数が低いと内蔵電位が大きくなる。また、内蔵電位による空乏層の距離は次式(5-1)で表される。

$$d = \left[\frac{2\epsilon_r\epsilon_0}{qN_A} (V_D - V) \right]^{\frac{1}{2}} \dots (5-1)$$

d は空乏層の距離、 ϵ_0 は真空誘電率、 ϵ_r は比誘電率、 N_A はアクセプタ密度、 V_D は p 領域を基準とした拡散電位、q は電荷素量を示している。式(5-1)より内蔵電位差が大きいうことは空乏層が広いということである。空乏層が広いと励起光により励起される電子の確率が向上するため、空乏層が広がると光励起による電流値は向上する。そのため、Cu/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS と比較すると、Al/p 型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の電流値が高くなったと想定される。

また、図 5-7 のフェリシアン化物イオン濃度を固定し、フェロシアン化物イオン濃度を変更した溶液の測定結果について、酸化型メディエータの濃度に依存した電流値が観測されるため、図 5-2 で述べた測定原理通りになっていると想定される。

次に二次元測定について、図 4-8 ににじみのような漏れ電流が観測される。この原因についての考察を述べていく。原因として、図 4-9 に示したような(a)シリコン内での励起されたキャリアが拡散し、測定対象としている空乏層以外の空乏層に到達してしまうこと(b)照射された励起光がシリコン内で散乱、乱反射が起こり測定対象としている空乏層以外の空乏層にも照射されていること(c)過剰なキャリア生成により測定対象の空乏層から測定対象としている空乏層以外の空乏層にキャリアが拡散してしまうことが考えられる。もしこれらのにじみの様な漏れ電流が少ないと、デバイス上の電極間距離を少なくすることができ、集積率の向上が可能になる。LAAS をハイスループットなスクリーニングの方法として用いるときは、にじみの距離以上の電極を形成すれば、測定点間の干渉は問題にならないと考えている。

以上より本章の研究は金属/p-Si ショットキー接合を用いた LAAS の製作が可能になり、性能や高感度化につながる原理を考察した。この研究については、酸化還元酵素を用いて測定を行うことや、より仕事関数が低く p 型シリコンと金属/p 型半導体ショットキー接合を形成し LAAS に用いることのできる金属の選定が今後の課題として挙げられる。

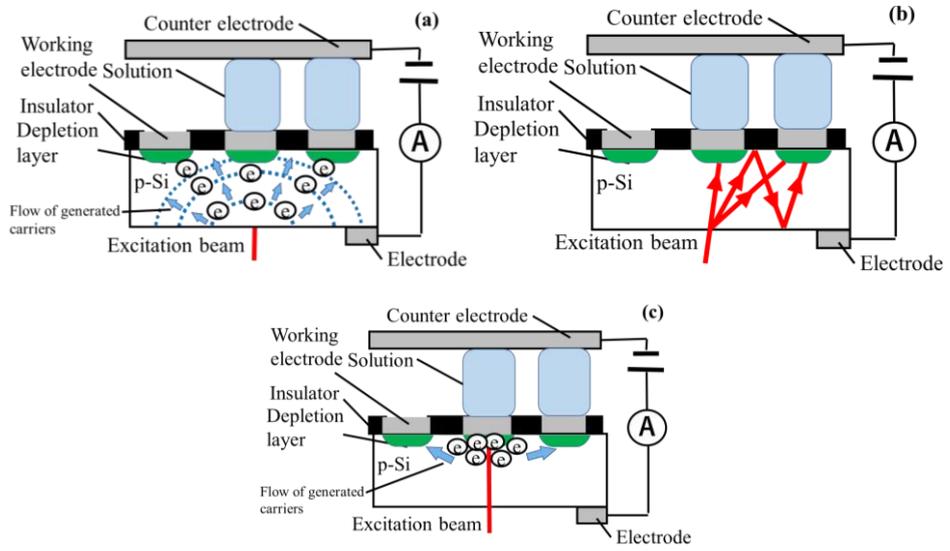


図 5-9. 電流値に影響していると想定されるメカニズム : (a)生成されたキャリアが拡散している場合(b)励起光が散乱・乱反射している場合(c)キャリアが過剰に生成されている場合

第6章. 非水溶液系溶媒を用いた LAAS 測定の研究

6.1 非水溶液溶媒について

本研究では、検出限界を向上させるためにブランク時の平均値(a)を下げる必要がある。 a の要因は酸化還元物質濃度や励起光強度などの複数のパラメータが想定されるが、その候補の一つとして、水の電気分解が挙げられる。これらの要因の a への影響を明らかにすることは a を下げることに貢献すると考えられる。

本章では水の電気分解による a への影響の有無を確認するために、非水溶液系で実験を行った。非水溶液系とは水以外溶媒を用いた系を意味する。本章では非水溶液を用いて LAAS 測定を行い、その性能について調査を行った。非水溶液として、代表的であるフェロセンをアセトニトリルに溶かした系を用いた。[80-82]。また、 a の要因として水の電気分解以外の可能性についても考察を行った。

6.2 測定環境

濃度依存特性測定には2.3の方法を用いた。対極としてAuを用いた。測定対象として、フェロセン(東京応化工業株式会社)を溶媒としてアセトニトリル(富士フィルム 和光純薬株式会社)を10 nM ~ 10 mM (10 nM、100 nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM、10 mM)溶かした溶液を用意した。フェロセンはレドックスカップルとして用いられることが多く、電子の授受に伴い以下の図6-1のように反応する[82-83]

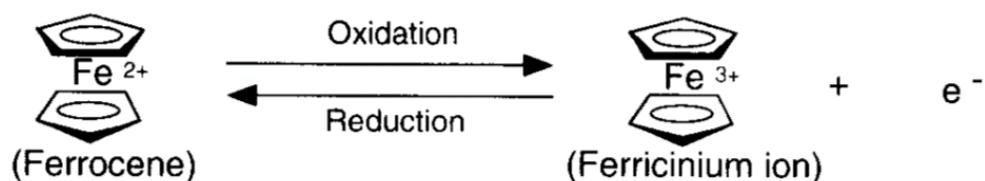


図 6-1. フェロセンとフェリシニウムイオンの酸化還元反応する概念図 : [83]より引用

6.3 結果

図 6-2 は種々のフェロセンの濃度における電流値を示している。 $C_{\text{ferrocene}}$ をフェロセン濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出される。

$$I = 0.26 C_{\text{ferrocene}}^{0.14} + 0.15 \quad (R^2=0.96, \text{ LOD}=4.7 \mu\text{M})$$

決定係数も高いため、フェロセン濃度に対する電流値は反応速度に類似した実験式が適用できることが確認された。

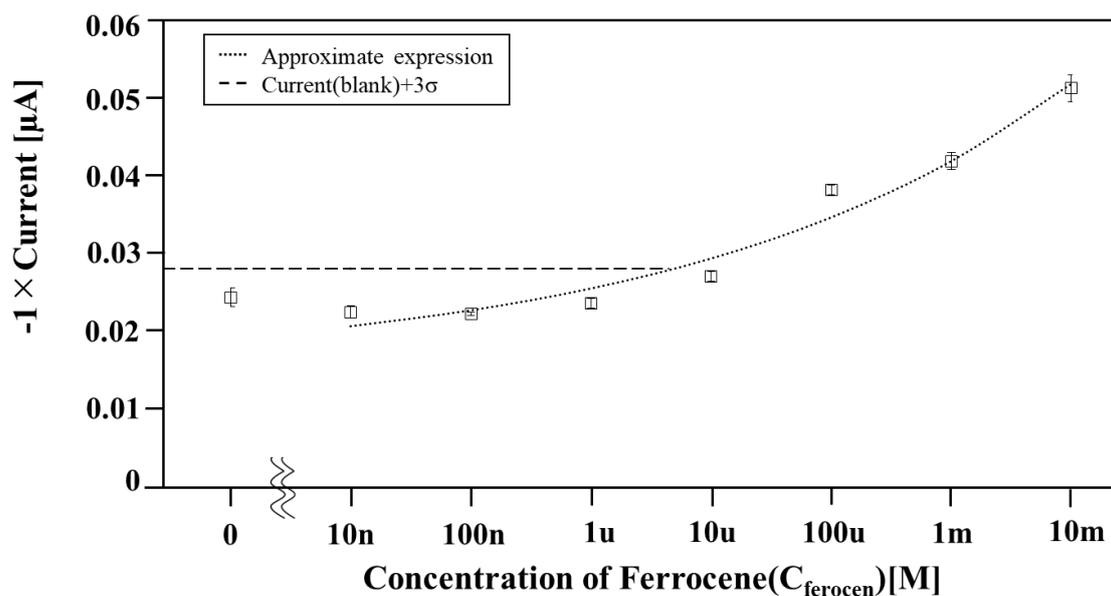


図 6-2. 種々のフェロセンの濃度ごとの電流値：点線は実験式($I = 0.26 C_{\text{ferrocene}}^{0.14} + 0.15$ ($R^2=0.96$, $\text{LOD}=4.7 \mu\text{M}$))を示している。エラーバーは標準偏差を示している ($n=4$)。

6.4 考察

図 6-2 について、実験式に着目する。反応速度に基づいた実験式が適用できることにより、水溶液系の実験式と同じ特性を持つと想定される。また、ブランク時の電流値が $0.024 \mu\text{A}$ ほど残っていることから実験式のオフセットは水の電気分解によるものである可能性は低いことが示される。このオフセットは他の二電極法の測定系からもブランク時の電流は存在することが報告されている [84] ため、本研究の測定系独自の問題に限らない可能性がある。推測になるが、ブランク時の電流の要因として LAAS デバイス表面を流れる漏れ電流の可能性はある。

また、オフセットの要素以外に判明したこととして、非水溶液系のフェロセンを LAAS で測定可能なことが示せた。フェロセンは極めて安定な酸化還元特性を示すため電気化学の酸化還元反応に使用される。また、フェロセンは芳香族と独特の反応を示すことから、様々な誘導体の合成に用いられる。フェロセンをアセトニトリルに溶かす非水溶液系はバッテリーの分野などでレッドクスフロー電池と呼ばれる長寿命特性をもつバッテリーなどにも利用される [82]。これらの電池の機能を更に向上させる新規化合物探索のためにもフェロセンの測定は有効である。

第7章. 裏面電界を用いた LAAS デバイスの研究

7.1 裏面電界について

LAAS と同じ電気化学センサであり内部光電効果を用いる LAPS の検出限界向上の方法として、センサ表面に酵素を固定化する方法[85]、ナノ粒子を利用した方法[29, 86]などが用いられている。しかし、酵素を直接固定化する方法は酵素活性の低下を招くことや、ナノ粒子を用いる方法は製作プロセスの複雑化や微小面積にナノ粒子を修飾するときの凝集を防ぐための制御が難しいなどの欠点がある。別の方法として、光励起電流を上げることにより、感度が上がることが報告されている[25, 40]。

太陽光電池の空乏層に励起光を照射して電流を発生させる原理は、LAAS にも用いられているため太陽光電池の分野の技術は LAAS に有効であることが予測される。光励起電流を上昇されるために、太陽光電池の分野では 1) 光の吸収量を増やす、2) 光励起により生成された少数キャリアの多くを発電に寄与させること[87]が挙げられる。1) 励起光源の光量を増やす方法の一つとして、本研究の励起光の光量については 3 章で詳述した。また、照射される物質側の光吸収量を増やす方法として、GaAs や他の材料の選定もある。しかしシリコンは大量生産への技術が習熟しているためコストが安い、解析物や分子が付着する距離を短くできる、微細加工が可能[19, 88]などの理由から、本研究ではシリコンを用いた。2) 光励起により生成された少数キャリアの多くを発電に寄与させる方法の一つとして、裏面電界が挙げられる。裏面電界(Back Surface Field、BSF)とは裏面電極と半導体界面にバンドギャップを製作し、光励起されたキャリアが裏面電極で再結合することを防ぐ技術であり、太陽光発電の分野で変換効率を向上させるために用いられる [89-90]。本章では、製作プロセスの扱いやすさ、また測定プロセスへの影響が少ない事からこの裏面電界を LAAS に用いる。

図 7-1 には裏面電界を適用した LAAS(以下 BSF 有 LAAS)と適用していない LAAS(以下 BSF 無 LAAS)の構造とバンド図を比較した概念図を示す。図 7-1 (a)は BSF 無 LAAS の構造を示しており、2.1 で述べた内容と同じものになる。一方、図 7-1 (c)は BSF 有 LAAS の構造を示しており、裏面側に p⁺領域(裏面電界)が形成されている。これらをバンド図の観点から見ると、図 7-1 (b)に示す BSF 無 LAAS では、裏面から照射された励起光が半導体内全面でキャリアを励起させる。空乏層付近で励起された電流値に寄与するが、バルク内や裏面電極付近で励起されたキャリアは裏面電極で再結合してしまうため、電流値に寄与しない。一方、図 7-1 (d)に示した BSF 有 LAAS において、裏面電極付近で励起されたキャリアは裏面電界により裏面電極に流れるのを防ぎ、再結合されることを防ぐ。これらの再結合しなかったキャリアが電流値に寄与することにより光励起電流値が増大する。このような理論を想定し、光励起電流値を増大させることによる感度の向上を図った。

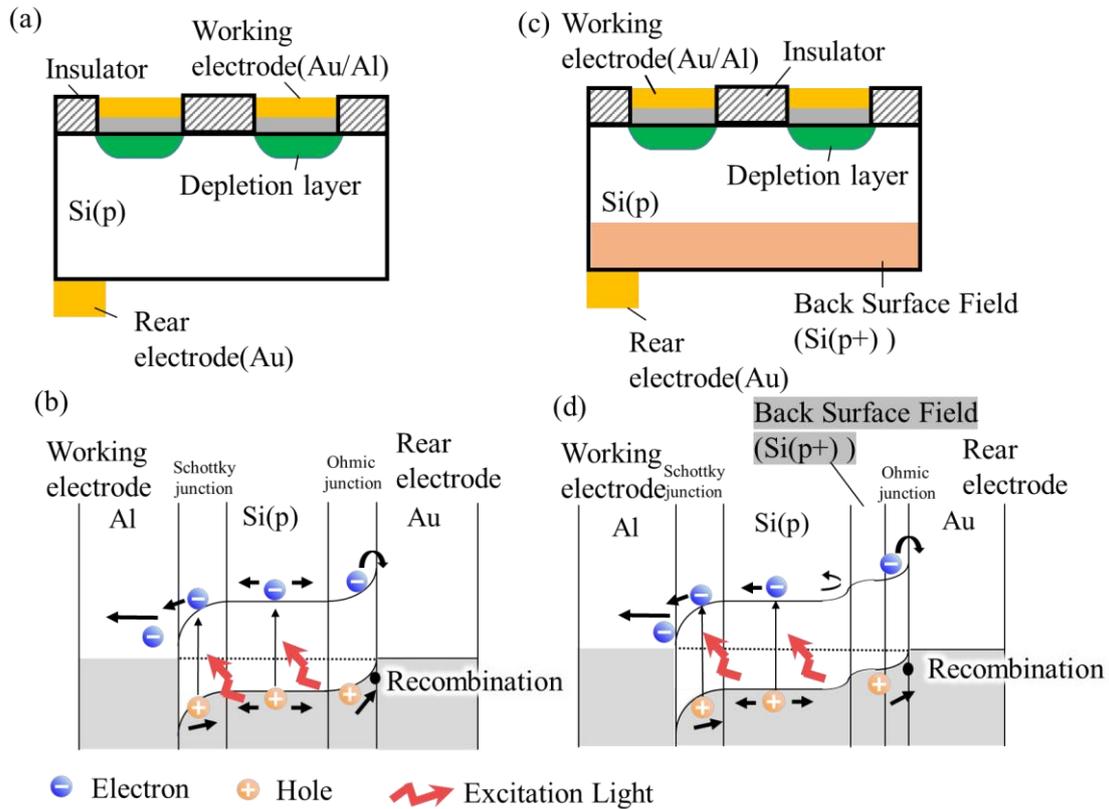


図7-1. BSF有LAASデバイスの場合とBSF無LAASデバイスの場合の比較：(a)BSF無LAASデバイスの構造図。(b)BSF無LAASデバイスのバンド図。(c)BSF有LAASデバイスの構造図。裏面電極と半導体の界面に p^+ 領域が形成されている。(d)BSF有LAASデバイスのバンド図。バルクや裏面付近で励起されたキャリアが流れる再結合する事を、 p^+ 領域が防ぐ。

本章は、まずI-V測定と光励起電流値を確認することにより、裏面電界を形成したデバイスのショットキー接合が機能していることと裏面電界の形成を確認した。次に、BSF無LAASとBSF有LAASの二次元測定を行い、解像度を計算し、性能を比較した。最後に、濃度依存特性を測定し検出限界を比較した。

7.2 実験方法

7.2.1 デバイス製作方法

図 7-2 に BSF 有 LAAS デバイスの製作過程を示す。2 cm×2 cm にカットしたシリコン(p型、40-60 Ωcm)を 1000° C、90 分間 O₂ 雰囲気中で熱酸化した。スピコートを用いて、表面にフォトレジスト(OFPR、東京応化工業株式会社)を 500 rpm で 10 秒間、3000 rpm で 30 秒間塗布し、ハードベイクを 120° C で 40 分間行った。フッ酸(和光純薬株式会社)で裏面の酸化膜除去後、フォトレジストをリフトオフした。スピコートを用いて、裏面にボロンドープ剤(PBF3M-31、東京応化工業株式会社)を 500 rpm で 10 秒間、4500 rpm で 30 秒間塗布し、プレベイクを 180° C で 60 分間行った。600° C において 30 分間 O₂ 雰囲気中で酸化、1000° C において 60 分間 N₂ 雰囲気中で熱拡散を行った(図 7-2. (a))。スピコートを用いて、表面にフォトレジストを 500 rpm で 10 秒間、3000 rpm で 30 秒間塗布し、プレベイクを 80° C で 10 分間行った。マスク(φ=1.0 mm ピッチ間 2.54 mm)を用いて露光・現像後、ハードベイクを 120° C で 40 分間行った(図 7-2. (b))。フッ酸で酸化膜除去後(図 7-2. (c))、表面には Au/Al、裏面には Au を抵抗式加熱真空蒸着気で蒸着した(図 7-2. (d))。

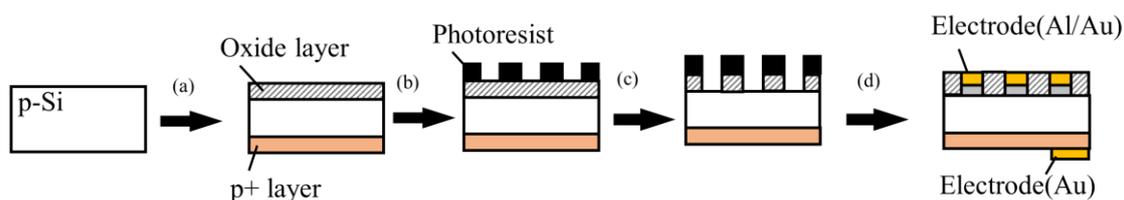


図 7-2. BSF 有 LAAS デバイスの製作図 : (a)酸化・P ドープ(b)露光・現像・ (c) エッチング(d)電極形成

7.2.2 測定環境

光励起電流値測定は 2.5 の方法を用いた。濃度依存特性測定には 2.3 の方法を用いた。測定対象として、フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) は同じ割合で 100 pM ~ 10 mM (100 pM、1 nM、10 nM、100 nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM、10 mM)、支持塩として硫酸ナトリウム 0.1 M を混合した溶液を用意した。

7.3 結果

7.3.1 I-V 特性

図 7-3 に I-V 測定の結果を示す。電圧が正の領域では、電流値の上昇が抑えられているのに対して、電圧が負の領域では、電流値の上昇が確認される。これらの特徴から整流性が確認されるため、両デバイスにはダイオードが形成されていることが確認できる。

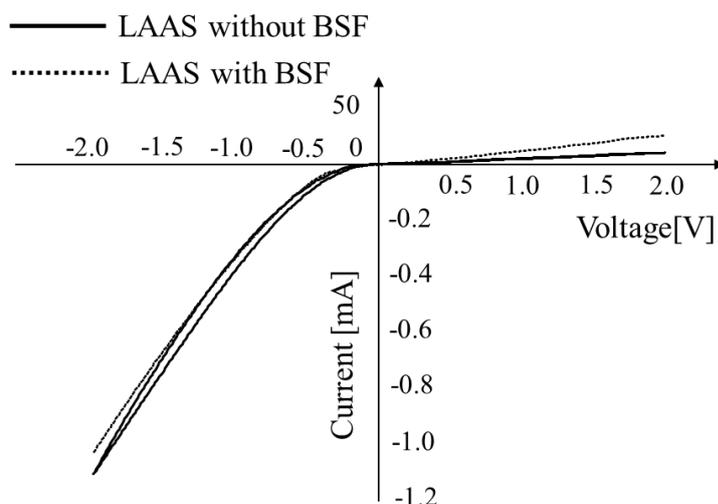


図 7-3. I-V 特性：BSF 無 LAAS を実線、BSF 有 LAAS を破線で示している。

7.3.2 光励起電流値

図 7-4 に光励起電流値の結果を示す。BSF 有 LAAS デバイスは $2.4 \mu\text{A}$ 、BSF 無 LAAS デバイスは $0.045 \mu\text{A}$ と、裏面電界によって 2 桁ほど光励起電流値が増加した。この増加により、LAAS に裏面電界が形成されていることを確認した。

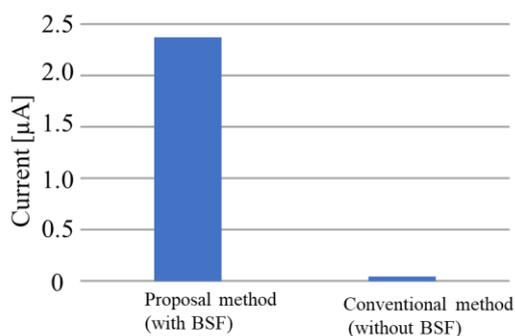


図 7-4. 提案手法と従来手法の光励起電流値

7.3.3 二次元測定

図 7-5 に二次元測定の電流値に濃淡を割り振ったデータを示す。両データとも、フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)10mM を電極 1 箇所を展開した状況である。図 7-5(a)は BSF 無 LAAS デバイスのとき、図 7-5(b)は BSF 有 LAAS デバイスの時を示す。点 A と B はそれぞれ図 7-6 で解像度について測定するとき用いた箇所を示している。

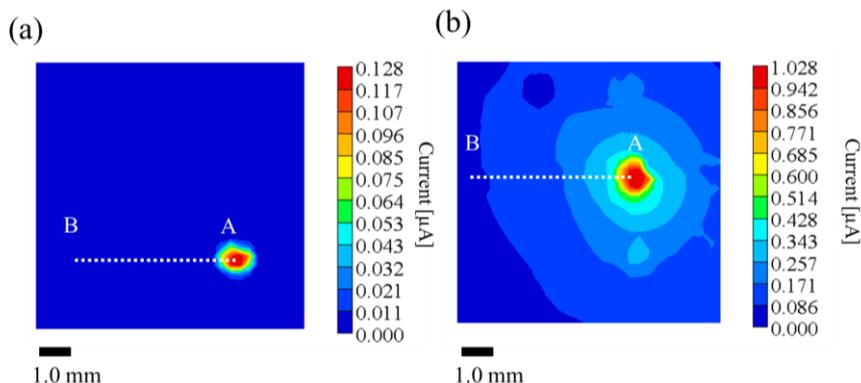


図 7-5. 電流値の値に色を割り振った二次元画像図 : フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)10 mM を電極の上に展開した時 (a)BSF 無 LAAS の場合(b)BSF 有 LAAS の場合。点 A と B はそれぞれ図 7-6 で解像度について測定するとき用いた箇所を示している。

図 7-6 は電極の中央と推定される箇所の電流値を 1 とした時の距離に対する正規化された電流値を示す。点 A、B はそれぞれ図 7-5 の点 A、B を示す。点 A から点 B までの 1 次元の電流値を電極の中央(図 7-5 の点 A)の最大値を基準として正規化した。

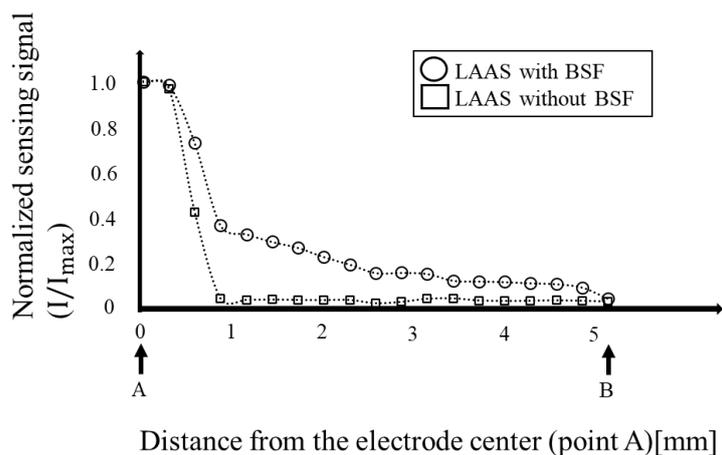


図 7-6. 電流の中央と推定される箇所の電流値を最大電流値とした距離ごとの正規化された電流値 : 電極の中央(図 7-5 の点 A)の最大値を基準として正規化した。点 B は図 7-5 の点 B を示す。最大電流値は BSF 有 LAAS 1.0 μA 、BSF 無 LAAS 0.12 μA 。推定分解能 (半値幅については BSF 有 LAAS デバイス 1.5 mm、BSF 無 LAAS デバイス 1.0 mm)。

7.3.4 濃度依存特性

図 7-7 にフェロシアン化物イオン/フェロシアン化物イオンの各濃度についての電流値の濃度依存特性を示す。BSF 有 LAAS デバイスと BSF 無 LAAS デバイス比較をすると、BSF 有 LAAS デバイスの方は電流値が全体的に上昇している。 $C_{\text{feri/fero}}$ をフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出された。

$$\text{BSF 無 LAAS : } I = 0.024 C_{\text{feri/fero}}^{0.60} + 0.0094 \quad (R^2=0.99, \text{ LOD}=17 \mu\text{M}) \quad \cdots(5-1)$$

$$\text{BSF 有 LAAS : } I = 0.30 C_{\text{feri/fero}}^{0.47} + 0.059 \quad (R^2=0.99, \text{ LOD}=270 \mu\text{M}) \quad \cdots(5-2)$$

検出限界について述べる。BSF 有 LAAS デバイスは $17 \mu\text{M}$ 、BSF 無 LAAS デバイスは $270 \mu\text{M}$ となった。検出限界の観点から、BSF 有 LAAS デバイスの感度は向上した。

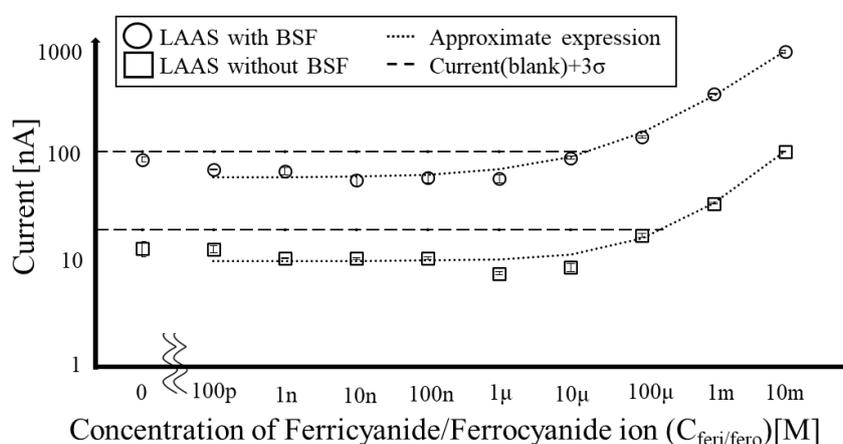


図 7-7. フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) の濃度ごとの電流値 : BSF 無 LAAS デバイスは□、BSF 有 LAAS デバイスは○で示される。実験式は、BSF 無 LAAS デバイスのとき $I = 0.024 C_{\text{feri/fero}}^{0.60} + 0.0094$ ($R^2=0.99$ 、 $\text{LOD}=270 \mu\text{M}$)、BSF 有 LAAS デバイスのとき $I = 0.30 C_{\text{feri/fero}}^{0.47} + 0.059$ ($R^2=0.99$ 、 $\text{LOD}=17 \mu\text{M}$) と計算された。

7.4 考察

BSF 有 LAAS デバイスのショットキー接合の形成について述べる。図 7-3 より両デバイスの I-V 特性において、電圧の片側は電流が流れて、もう一方の電圧の片側は電流が流れない整流性を示すことにより、ショットキー接合ダイオードが形成されていることが確認される。また、裏面電界の形成についての考察を述べる。図 7-4 より BSF 有 LAAS デバイスの方が光励起電流値の著しい上昇が確認される。これは裏面電界により励起キャリア量が向上したためと想定される。これにより裏面電界が形成されていることが確認される。また推測の範囲でバンドギャップを計算すると、0.14 ~ 0.16 eV となる。他の報告の値(0.1 ~ 0.5 eV)[91-92]を参照にすると、本研究で製作した LAAS は裏面電界が形成されていることが想定される。

濃度依存特性について、BSF 無 LAAS と BSF 有 LAAS を比較した考察を述べる。図 7-7 より BSF 無 LAAS デバイスに比べて、BSF 有 LAAS デバイスは全体的に電流値が上昇している。実験式(式(7-1)、(7-2))の観点から見ても、指数 β はほぼ等しく、係数 α が 0.024 から 0.30 へ明らかな増加が確認できた。LAAS はアンペロメトリにより観測電流が反応量に比例すると考えられることから、適用した実験式(2-6)の α は反応速度定数、 β は反応次数に由来した界面における反応の状態を反映した定数である可能性が高いと考えられる。係数 α の増加は裏面電界により電極表面に供給されるキャリア量が向上し、イオンの酸化還元反応が促進されたことに起因すると考えられる。また検出限界については、BSF 無 LAAS デバイスが 270 μM 、BSF 有 LAAS デバイスが 17 μM となった。BSF 有 LAAS デバイスの方が、検出限界は向上した。電流値の上昇に伴い、ブランク時の電流値も上昇しているが、ブランク時の電流値の上昇より実験式の傾き α の上昇が大きかったため、結果として検出限界が向上したと考えられる。

また、1 μM 以下における平均値の変動について考察する。図 7-7 の標準偏差 σ は溶液を 1 回セットした時の 5 回スキャンした値である。溶液のセット回数に対する偏差を測定したところ、ブランク時の溶液を 5 回セットした時の BSF 有 LAAS デバイスの変動係数(平均値に対しての標準偏差)は 0.0029 であり、平均値に対しての低濃度領域の変動範囲は 0.63 であった。また、BSF 無 LAAS デバイスの場合は変動係数が 0.2、平均値に対しての低濃度領域の変動範囲が 0.58 となる。これらの結果から、低濃度の変動範囲は測定プロセス(セットやスキャン回数)の偏差による可能性が低い事が想定される。

二次元測定における BSF 有 LAAS と BSF 無 LAAS を比較した考察を述べる。図 7-5(b) より BSF 有 LAAS デバイスは反応している溶液の箇所の周辺ににじんだように電流値が広がっている様子が確認できる。図 7-6 においても、BSF 無 LAAS デバイスはピークまでシャープなカーブに対して BSF 無 LAAS デバイスは緩やかなカーブになっている。図 7-6 より解像度として定義している半値幅について、BSF 無 LAAS デバイスは 1.0 mm、BSF 有 LAAS は 1.5 mm と計算される。解像度については、似た構造の LAPS でも光励起電流の増

加が、解像度の増加を引き起こすことは報告されている[25]ため、解像度が増加することを期待したが、実際の測定は増加しなかった。この理由を以下のように考察する。図 7-8(a)(b)に LAAS 内の想定している励起キャリアが拡散する概念図を示した。図 7-8(c)に半導体内における、減衰した励起光の強度を示した。Lambert-Beer 測によると励起光の強度は式(7-3)のように表される。

$$I(d)=I_0 \exp[-ad] \cdots(7-3)$$

d は裏面の半導体を 0 とした時の厚さ、 $I(d)$ は厚さ d の時の励起光強度、 I_0 は減衰していない励起光強度、 a は光吸収係数を表している。励起光の強度は励起するキャリア量に影響する。励起光の強度は指数干涉的に減少していくため、励起されるキャリア量も指数関数的に減少していく。図 7-8 (a)に示したように BSF 無 LAAS デバイスは照射された励起光は、半導体内で全体的に励起をする。その中の裏面電極付近で励起されたキャリアは再結合により失われる。一方、空乏層付近で励起されたキャリアは電流値に寄与する。図 7-8 (b) に示した BSF 有 LAAS デバイスの場合は、同様に照射された励起光は半導体内で全体的に励起をする。裏面電極付近で励起されたキャリアは裏面電界となっている $\text{Si}(p)/\text{Si}(p^+)$ で再結合が防がれて、電流値に寄与する。空乏層付近で励起されたキャリアと比べると、 $\text{Si}(p)/\text{Si}(p^+)$ 付近の励起されたキャリアは励起光強度が強く、励起されるキャリア量が多い。励起光強度が強い $\text{Si}(p)/\text{Si}(p^+)$ 付近で励起されたキャリアは電流値に大きく寄与する。キャリアは励起された箇所から電極や空乏層へ拡散していくため、 $\text{Si}(p)/\text{Si}(p^+)$ 付近で励起されたキャリアは空乏層付近で励起されたキャリアに比べ広く拡散していき、解像度の低下を引き起こす。二次元測定における画像の解像度の向上によって、チップ上に搭載可能な測定点の集積率を上げる。これはセンサにおけるスループットの向上につながると考えられる[93]。解像度向上には薄い半導体の成膜や高濃度ドーピングにおけるキャリアの拡散距離を短くする方法が挙げられている[94-95]。しかし、本章のような裏面電界は太陽光電池の分野における光励起電流向上の方法としてキャリアの拡散距離を延ばす考え方である。そのため裏面電界による検出限界向上の方法は検出限界と解像度のトレードオフの関係が存在すると想定される。

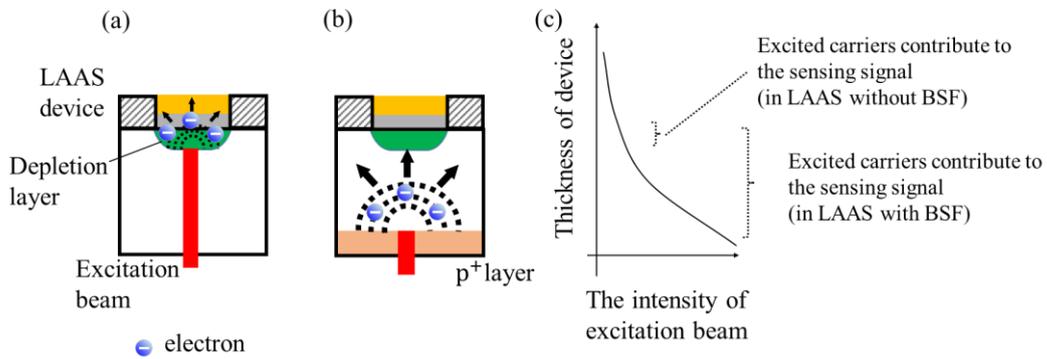


図 7-8. LAAS 内の想定しているキャリア拡散の概念図：(a)BSF 無 LAAS デバイスの場合 (b)BSF 有 LAAS デバイスの場合(c) デバイス内の半導体の励起光入射距離における励起光の強度の概念図

BSF 有 LAAS デバイスをハイスループットアレイセンサとして使う場合、裏面電界を形成するドープ領域を表面電極の配置に合わせて制限する方法も考えられるが、通常は表面電極の形成位置にのみ励起光を照射するため、拡散距離よりも電極間隔が十分にあるアレイ構造であれば、空間分解能の低下は問題にならないと考えられる。この研究については、理論的なキャリア輸送のシミュレーションを行うとともに、SN 比を確保できる範囲で濃度依存特性が最大になるように、光強度や裏面電界の厚さなどの励起キャリア量に関わる裏面電界のパラメータを最適化していくことが今後の課題として挙げられる。

以上より、裏面電界は感度向上に有効なアプローチである。

第8章. 対極と作用極を同素材とした LAAS 測定方法の研究

8.1 電極電位について

本研究では、検出限界を向上させるためにブランク時の平均値(a)を下げる必要がある。aの要因は複数のパラメータあるが、その一つとして電極の素材による溶液界面と電極の電位差の変動があげられる。溶液に2種類の素材の異なる電極を浸すと電池のようにガルバニ電流が発生し、電極表面の反応種の濃度は減少し、それにより電極と水溶液の界面に電位差が発生し、変動する[58]。この変動を防ぐために、電気化学測定では一定の参照電圧を保つための参照電極、作用極、対極から構成される三電極法が一般的に使われる。この方法はネルンストの式による塩素イオン濃度に強く依存する中の参照電極を常にメンテナンスする必要がある。加えて、塩橋やイオン交換膜などを設置することから構造として複雑になりやすく、本研究で想定しているような微小電極の測定にはスケールの観点から使用が難しい。

一方、二電極法は作用極と対極から構成される簡易な構造であるメリットを持つため、本研究で想定している微小電極の測定に用いることが容易である。本研究の測定系の電極素材については、測定時の腐食を防げることや、デバイス製作時に簡易に蒸着できるため、溶液に接触する LAAS デバイスの電極(作用極)は Au を用いている。一方、対極と溶液の接触を視認し実験時の失敗を防ぐため、溶液を挟み込んでいる電極(対極)は、透明性の ITO 電極を用いている。これらの2種類の素材の異なる電極を用いている測定系であることから電位差が発生もしくは変動することが想定される。この変動に対して、本研究の測定系は溶液内の酸化還元物質がネルンストの式に従い電位を決定しているため、常に電位差は一定であり変動しないと考えていた。そのため、本来ならば、バトラーボルマーやコットレルの式に従い、濃度の減少に伴い電流値の単調減少が確認できるはずである。しかし、実際の酸化還元物質が低濃度の時、単調減少を示す実験式が適用できない問題があった。二電極法には対極付近の溶液/電極界面の電気二重層のポテンシャルの不安定さが電流値に影響するデメリットが存在する[28]ことが報告されている。そのため、本研究の測定系にもこの電位変動に着目したアプローチが電流値の安定につながり、実験式が適用できるようになり検出感度向上につながると考えた。

本章では、酸化還元物質が低濃度時に、メディエータの電位を規制する働きが弱くなり実際に電位差が生じることによる電流値が不安定化するメカニズムを論証した。更に作用極と対極を同じ素材にすることにより、電位差を打ち消し低濃度における電流値が安定し検出限界が向上することを示した。

8.2 測定方法

8.2.1 電位差測定

図 8-1 に電位差測定のご概念図を示す。参照極には Ag/AgCl 系を用いた。Au と ITO を電極として用いた。素材の選定理由として、Au は作用極の表面電極、ITO は対極として実際の LAAS 測定システムで用いているためである。電極を浸してから 20 分後の電位の値を測定対象濃度時の電位と定義した。溶液はフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, Sigma-Ardrich) が 100 pM ~ 10 mM (100 pM、1 nM、10 nM、100 nM、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1 mM、10 mM) を用意した。

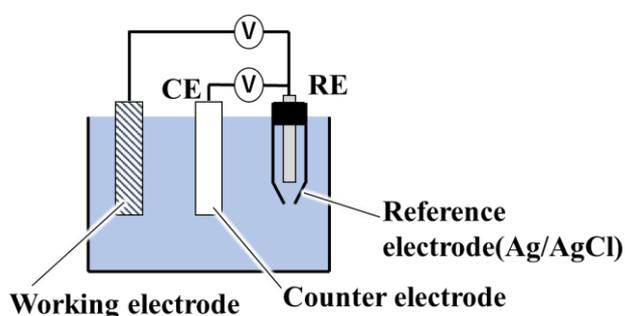


図 8-1. 電位差測定のご概念図：参照極には Ag/AgCl 系を用いた。Au と ITO を電極として用いた。溶液にはフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオンが 100 pM ~ 10 mM (100 pM、1 nM、10 nM、100 nM、1 μM 、10 μM 、100 μM 、1 mM、10 mM) を用意した。

図 8-2 に本研究の LAAS の測定系と電位差測定のご比較を示す。LAAS の場合は測定溶液を挟み込んでいる状態であり、金が作用極、ITO が対極の役割をしている。この測定系は微小であることで塩橋などを用いる構造が難しい事や、塩化物イオンを支持塩に含んでいないことから参照電極を用いることが難しい。そこで、図 6-2(b)に示したように、金電極と ITO 電極を用いて LAAS の測定系を模擬した。更に各電極に参照電極をつなぐことにより各電極の電位変動が測定できる。

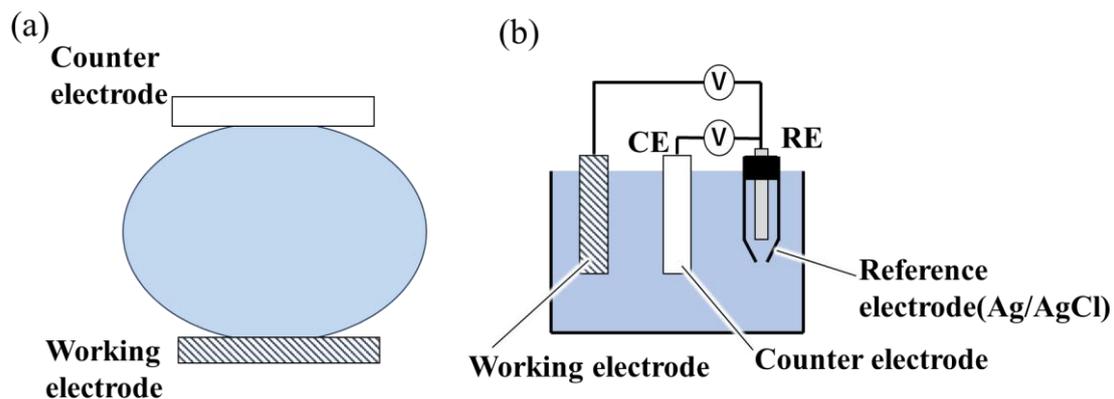


図 8-2. 測定状態の比較の概念図：(a)実際の LAAS の測定環境。作用極と対極で溶液を挟み込んでいる。(b)LAAS の測定状態を模擬した電位差測定の測定環境。作用極と対極を溶液に浸している。また、参照電極を各電極につなぎ電位差を測ることにより、電極自体の電位変動を測定できる。

8.2.2 実験条件

I-V 測定は 2.5 の方法を用いた。また、光が照射されたことを確認するために赤外線カメラ (AnMo Electronics Corporation、DINOAM4113FI2T) を用いて、測定した電極の接合面の空乏層に励起光が照射されていることを確認した。濃度依存特性測定には 2.3 の方法を用いた。測定対象として、フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, Sigma-Aldrich) は同じ割合で 100 pM ~ 10 mM (100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM, 10 mM)、支持塩として硫酸ナトリウム (和光純薬) 0.1 M を混合した溶液を用意した。作用極として用いた LAAS デバイスの表面は Au である。本章については、対極に Au を用いた作用極と対極が同じ素材の測定環境と ITO を用いた作用極と対極が異なる素材の測定環境の 2 通りの実験条件を用意した。

8.3 結果

8.3.1 電位差測定

図 8-3 に電位差測定の結果を示す。□と○は Ag/AgCl 電極に対する各電極 Au・ITO の電位を示している。Au の電位は 1 μM 付近から徐々に変化している。一方 ITO の電位は Au に比べ比較的安定している。

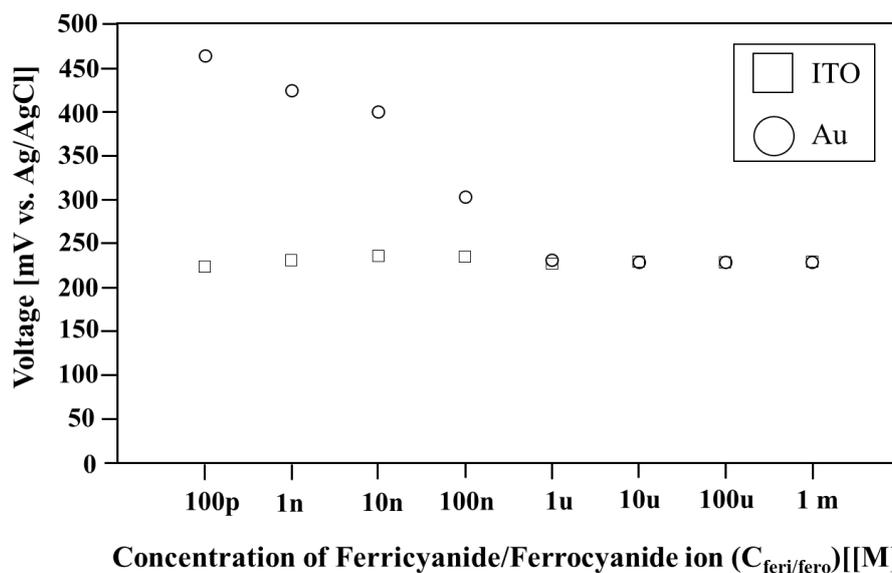


図 8-3 フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオンの濃度 ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) ごとの各電極電位 : □は ITO 電極の電位変動、○は Au 電極の電位変動を示す。

8.3.2 I-V 特性

図 8-4 に LAAS デバイスの I-V 特性を示す。(a)は全体の範囲の I-V 特性、(b)は原点付近の拡大図を示す。点線は励起光照射時の特性、実線は非照射時の特性を示す。非照射時の I-V 特性が照射時には下にシフトしている挙動が確認される。これはフォトダイオードの光照射時の特性と同じ挙動を示すため、製作した LAAS デバイスはフォトダイオードとして機能していることが確認できる。また、図 8-4(a)のように本研究の LAAS デバイスには逆バイアス時のリーク電流が確認される。また暗記の電流が原点を通過していない理由として、測定器のオフセットがかかっていることが考えられる。

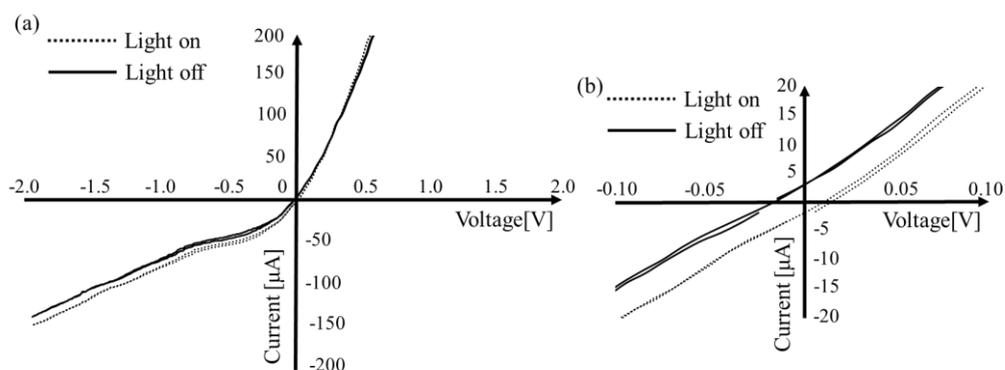


図 8-4. LAAS デバイスの励起光照射時と非照射時の I-V 特性 : 破線は励起光照射時の I-V 測定、実線は励起光非照射時の I-V 測定を示す。(a)は全体図、(b)は(a)の原点付近の拡大図を示す。

8.3.3 濃度依存特性

図 8-5 にフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオンの各濃度についての電流値の濃度依存特性を示す。また、 $C_{\text{feri/fero}}$ をフェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン濃度として定義した場合、下記のような実験式が算出される。

作用極と対極が異なる素材の測定環境：

$$I = 0.024 C_{\text{feri/fero}} + 0.0095 \quad (R^2=0.99, \text{ LOD}=210 \mu\text{M}) \quad \dots(8-1)$$

作用極と対極が同じ素材の測定環境：

$$I = 0.016 C_{\text{feri/fero}} + 0.0056 \quad (R^2=0.99, \text{ LOD}=17 \text{ nM}) \quad \dots(8-2)$$

作用極と対極が異なる素材の測定環境の方は $10 \mu\text{M}$ ほどから実験式が適用できない結果となった。一方 Au の方は $100 \text{ pM} \sim 10\text{mM}$ で実験式が適用可能である。

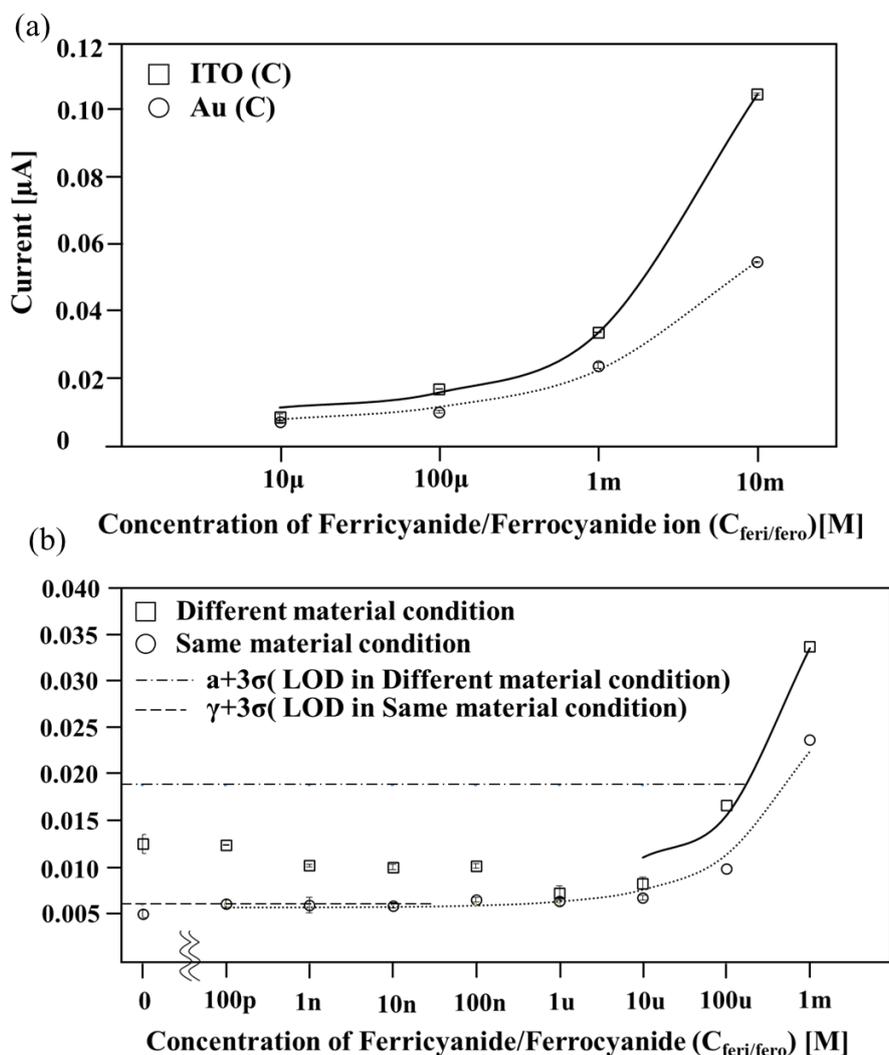


図 8-5. フェリシアン化物イオン/フェロシアン化物イオン ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) の濃度ごとの電流値：□は対極が ITO 電極のとき(作用極と対極が異なる素材の測定環境)、○

は対極が Au 電極のとき(作用極と対極が同じ素材の測定環境)を示している。点線は実験式(作用極と対極が異なる素材の測定環境 : $I = 0.024 C_{\text{feri/fero}} + 0.0095$ ($R^2=0.99$ 、LOD=210 μM)、作用極と対極が同じ素材の測定環境 : $I = 0.016 C_{\text{feri/fero}} + 0.0056$ ($R^2=0.99$ 、LOD=17 nM))を示す。(a)高濃度領域(10 mM ~ 10 μM)を拡大、(b)低濃度領域(100 μM ~ 100 pM)を拡大した図を示す。

8.4 考察

本研究の測定系の想定していた前提について述べる。本研究の測定系では電極電位は式(8-3)に示すネルンストの式を想定していた。

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_O}{a_R} \right) \quad \dots(8-3)$$

E は電極電位、 E^0 は標準電極電位、 R は気体定数、 T は温度、 n は移動電子数、 F はファラデー定数、 a_O は酸化物質濃度、 a_R は還元物質濃度を示す。図 8-3 より高濃度領域(10 mM ~ 10 μ M)では Au 電極と ITO 電極の差はほとんどなく、電極電位が酸化還元物質により規制されており、ネルンストの式は成立していることが確認できる。しかし、低濃度領域(100 μ M ~ 100 pM)では、酸化還元物質の電極電位を規制する能力が弱くなり、ネルンストの式は成立しない。この原因をネルンストの式の観点から見ると、酸化還元物質の項は濃度が低くなると、 $\frac{a_O}{a_R}$ 項の比率は同じでも、少しの変化が項の値を大きく変化させるためと考えられる。低濃度領域では電位の規制する能力が弱くなるため、電極の素材や表面状態に依存する電位差が確認されると想定される。

ここから LAAS の測定系に着目する。図 8-6(a)は測定時の電極と溶液の位置を示す。本研究の測定系では溶液と電極の界面に電位差が発生すると想定している(図 8-6 (a) の点線部)。この電位差は電極の電位は素材の電気化学ポテンシャルと仕事関数に依存する。図 8-6 (b) は作用極と対極が異なる素材の測定環境下での図 8-6 (a) の等価回路を示す。電界の方向と強度は、素材の種類と溶液によって異なる。電界の方向については互いに打ち消し合う方向に発生し、大きさについては作用極と対極が異なる素材の測定環境下のため、図 6-6 (b) に示すように LAAS の測定系にかかる一定の電圧として残っていると考えられ

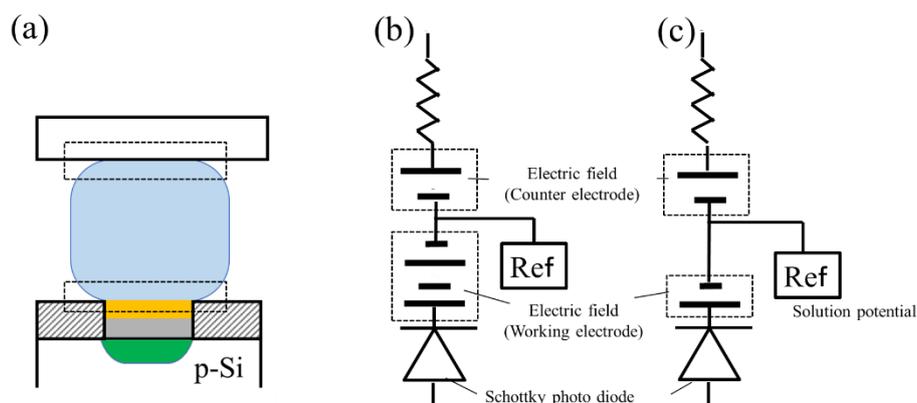


図 8-6 (a) LAAS 測定の電極配置の概念図。(b)異なる素材の測定環境下における(a)の等価回路。(c) 同じ素材の測定環境下における(a)の等価回路。

る。この一定の電圧が LAAS の測定系に及ぼす影響として以下の 2 つのメカニズムを想定している。1) LAAS デバイスのフォトダイオード部分に逆バイアスとして電位差が影響している可能性と 2) 電圧が過電圧として重畳し、酸化還元電流に影響している可能性である。

1) LAAS デバイスのフォトダイオード部分に逆バイアスとして電位差が影響している可能性については、一定の電圧が LAAS デバイスのフォトダイオードに適用される逆バイアスとして機能したと考えられる。図 8-4 に示すように、LAAS デバイスのフォトダイオードのリーク電流は、逆バイアス時に増加することが確認できる。したがって、低濃度において酸化還元物質の電極電位規制が弱くなり、逆バイアスがかかった結果、LAAS デバイスのフォトダイオード部のリーク電流によって、電流値の不安定性が引き起こされ、この不安定性は検出限界を悪化させたと考えられる。この現象への対策として、LAAS デバイスのフォトダイオード部分のショットキー接合が不完全なことによるリーク電流が発生しているため、ショットキー接合の精度を上げていくことが挙げられる。また 2) 電圧が過電圧として重畳し、酸化還元電流に影響している可能性については、高濃度時は LAAS デバイスのフォトダイオード部分の光励起電圧のみが過電圧としてかかっていることに対して、低濃度時は光励起電圧に加えて一定の電圧が重畳している。そのため酸化還元電流値は酸化還元物質濃度と電極電位の変動に依存する。そのため、低濃度時に電流の不安定性が引き起こされ、検出感度が悪化したと考えられる。これら二つの可能性は総じて、電流値は増加するが、電極の素材やイオン濃度に依存し電流値の柔軟性が低いため、感度の向上には適していないと考えられる。

一方、図 8-6 (c) は作用極と対極が同じ素材の測定環境下で図 8-6 (a) の等価回路を示す。電極素材が等しいため、測定システムの溶液と電極の界面付近の電界は反対方向に生成され、それによって互いに打ち消し合うため、一定の電圧が残らないことが想定される。そのため低濃度時も逆バイアスもしくは過電圧が重畳されておらず、電流値は低濃度で安定したと考えられる。この結果、同じ素材の測定環境の方法は検出限界を改善に至ったと考えられる。

この研究については、より電位変動が少なく LAAS に用いることのできる金属の選定などが今後の課題として挙げられる。以上より対極と作用極を同素材とする測定方法は高感度化に有効である。

また(8-2)について。本章のデバイスは、7 章の裏面電界を用いたデバイスを用いているため、“裏面電界”と“対極と作用極を同素材とする測定方法”の各高感度な手法を統合した測定手法である。その統合した測定手法により検出限界は 17 nM を実現できた。これにより本研究の目標である 10 μ M 以下の検出限界を持つ測定システムの構成を達成できたと考えられる。

第9章. 結論

本研究室では酵素阻害剤の新規薬剤探索に用いることを想定した電気化学アレイセンサ (Light Addressable Amperometric Sensor、LAAS)を開発した。しかし、他研究と比較して、現場で用いるためには検出限界が低い問題点がある。本研究は測定システムやデバイス構造などの異なるアプローチから LAAS の高感度法に取り組み、高感度化手法を明らかにする複数の研究を実施した。

第4章 LAAS を用いたグルコースオキシダーゼを用いたグルコース濃度測定の研究

酸化還元酵素の一つであるグルコースオキシダーゼを用いて、種々のグルコース濃度に対する電流値を測定した結果を示し、酵素と酸化還元物質を用いた反応系について適切な測定条件について考察した結果を述べた。

第5章 金属/p型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作

酸化還元物質が電子を与える系の酵素反応の測定に適した系として、金属/p型半導体ショットキー接合を用いた LAAS の製作方法の検討及び性能の確認を行った結果を示し、スクリーニング用センサとして十分な機能を持つことを明らかにした。また、ショットキー接合を形成する金属素材がセンサ感度に影響し、適切な素材選択が高感度化に有効であることを示した。

第6章 非水溶液系溶媒を用いた LAAS 測定の研究

LAAS に限らずセンサを高感度化するためにはノイズを排除して信号を抽出することが重要であり、得られた測定値を構成する要素を適切に把握する必要がある。ここでは LAAS のノイズ成分と推察されるサンプル溶液の水の電気分解の影響を調べるために、非水溶液溶媒を用いて種々の酸化還元物質濃度に対する電流値を測定して検証を行った結果を示した。

第7章 裏面電界を用いた LAAS デバイスの研究

感度向上につながる光励起電流値の増大を可能とすると考えられる裏面電界の技術を導入した LAAS デバイスの製作方法の検討及び性能の確認を行った結果を示し、スクリーニング用センサとして十分な機能を持つことを明らかにした。また、裏面電界によるセンサ感度への効果と解像度への影響について考察を示した。

第8章 対極と作用極を同素材とした LAAS 測定方法の研究

第6章と同様にノイズ成分を特定して排除する試みとして、酸化還元物質濃度に依存する電極電位変動について検討した。従来の対極と作用極が異なる素材を用いる方法に対して同素材を用いる新しい方法を提案し、種々の酸化還元物質濃度で測定して比較した結果を

示した。その結果に基づき、対極と作用極の素材の組み合わせによって系の安定性が変わるメカニズムについての考察を示した。

また 8 章の実験で、統合した測定手法により検出限界は 17 nM を実現できた。これにより本研究の目標である 10 μ M 以下の検出限界を持つ測定システムの構成を達成できたと考える。まとめとして、本研究では、LAAS の動作原理を含めた高感度化への手法を明らかにした。

【参考文献】

- [1] 内閣官房 健康医療戦略推進本部, “健康医療戦略,” 2014
- [2] 国民生活基礎調査, 厚生労働省(2016)
- [3] 平成 28 年版厚生労働白書、厚生労働省(2016)
- [4] Shunsuke TAWARA, Hiroaki SHIMOKAWA, Progress of the Study of Rho-kinase and Future Perspective of the Inhibitor, YAKUGAKU ZASSHI 127(3) 501-514 (2007)
- [5] Lim, K. H., Joo, J. Y., & Baek, K. H. (2020). The potential roles of deubiquitinating enzymes in brain diseases. *Ageing Research Reviews*, 61(April), 101088.
- [6] Zhao, H. H., Liu, Y. Q., & Chen, J. (2020). Screening acetylcholinesterase inhibitors from traditional Chinese medicines by paper-immobilized enzyme combined with capillary electrophoresis analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190, 1
- [7] 佐藤健太郎, 創薬入門, オーム社(2011)
- [8] 赤路 健一, 津田 裕子, 林 良雄 ベーシック創薬科学, 化学同人(2014)
- [9] Pegoraro, G., & Misteli, T. (2017). High-Throughput Imaging for the Discovery of Cellular Mechanisms of Disease. *Trends in Genetics*, 33(9), 604–615.
- [10] Heng, S., Dynon, K., Li, Y., Edgell, T., Walton, K., Rombauts, L. J., Vollenhoven, B., & Nie, G. (2015). Development of a high-throughput assay for human proprotein convertase 5/6 for detecting uterine receptivity. *Analytical Biochemistry*, 475, 14–21.
- [11] Pinho, A. R., Fortuna, A., Falcão, A., Santos, A. C., Seica, R., Estevens, C., Veiga, F., & Ribeiro, A. J. (2019). Comparison of ELISA and HPLC-MS methods for the determination of exenatide in biological and biotechnology-based formulation matrices. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 9(3), 143–155.
- [12] Van Nguyen, T., & Alfaro, A. C. (2019). Applications of flow cytometry in molluscan immunology: Current status and trends. *Fish and Shellfish Immunology*, 94(September), 239–248.
- [13] Cheswick, R., Cartmell, E., Lee, S., Upton, A., Weir, P., Moore, G., Nocker, A., Jefferson, B., & Jarvis, P. (2019). Comparing flow cytometry with culture-based methods for microbial monitoring and as a diagnostic tool for assessing drinking water treatment processes. *Environment International*, 130(April).
- [14] Coggins, L. X., Larma, I., Hinchliffe, A., Props, R., & Ghadouani, A. (2020). Flow cytometry for rapid characterisation of microbial community dynamics in waste stabilisation ponds. *Water Research*, 169, 115243.
- [15] Şen, M., Ino, K., Inoue, K. Y., Arai, T., Nishijo, T., Suda, A., Kunikata, R., Shiku, H., & Matsue, T. (2013). LSI-based amperometric sensor for real-time monitoring of embryoid bodies. *Biosensors and Bioelectronics*, 48, 12–18.

- [16] Bonazza, G., Tartaglia, S., Toffoli, G., Polo, F., & Daniele, S. (2018). Voltammetric behaviour of the anticancer drug irinotecan and its metabolites in acetonitrile. Implications for electrochemical therapeutic drug monitoring. *Electrochimica Acta*, 289, 483–493.
- [17] Liu, N., Liu, Y., Yang, Y. H., He, L., & Ouyang, J. (2016). A simpler sampling interface of venturi easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry for high-throughput screening enzyme inhibitors. *Analytica Chimica Acta*, 913, 86–93.
- [18] Liu, W. wen, & Zhu, Y. (2020). “Development and application of analytical detection techniques for droplet-based microfluidics”-A review. *Analytica Chimica Acta*, 1113, 66–84.
- [19] Chapman, E., & Wong, C. H. (2002). A pH sensitive colorimetric assay for the high-throughput screening of enzyme inhibitors and substrates: A case study using kinases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10(3), 551–555.
- [20] Kanno, Y., Ino, K., Inoue, K. Y., Şen, M., Suda, A., Kunikata, R., Matsudaira, M., Abe, H., Li, C. Z., Shiku, H., & Matsue, T. (2015). Feedback mode-based electrochemical imaging of conductivity and topography for large substrate surfaces using an LSI-based amperometric chip device with 400 sensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 741, 109–113.
- [21] Kanno, Y., Ino, K., Sakamoto, C., Inoue, K. Y., Matsudaira, M., Suda, A., Kunikata, R., Ishikawa, T., Abe, H., Shiku, H., & Matsue, T. (2016). Potentiometric bioimaging with a large-scale integration (LSI)-based electrochemical device for detection of enzyme activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 709–714.
- [22] Ino, K., Terauchi, M., Gakumasawa, M., Taira, N., Suda, A., Kunikata, R., Matsue, T., & Shiku, H. (2018). Local hydrogel fabrication based on electrodeposition with a large-scale integration (LSI)-based amperometric device. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 277(March), 95–101.
- [23] Kurbanoglu, S., Erkmen, C., & Uslu, B. (2020). Frontiers in electrochemical enzyme based biosensors for food and drug analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115809.
- [24] Poghossian, A., Thust, M., Schöning, M. J., Müller-Veggian, M., Kordos, P., & Lüth, H. (2000). Cross-sensitivity of a capacitive penicillin sensor combined with a diffusion barrier. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 68(1), 260–265.
- [25] Werner, C. F., Groebel, S., Krumbe, C., Wagner, T., Selmer, T., Yoshinobu, T., Baumann, M. E. M., Keusgen, M., & Schöning, M. J. (2012). Nutrient concentration-sensitive microorganism-based biosensor. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, 209(5), 900–904.
- [26] Juhera, E., Colominas, S., & Abellà, J. (2017). Amperometric hydrogen sensors for application in fusion reactors. *Fusion Engineering and Design*, 124, 901–904.
- [27] Liu, K., Song, Y., Song, D., & Liang, R. (2020). Plasticizer-free polymer membrane

potentiometric sensors based on molecularly imprinted polymers for determination of neutral phenols. *Analytica Chimica Acta*, 1121, 50–56.

[28] Quynh, B. T. P., Byun, J. Y., & Kim, S. H. (2015). Non-enzymatic amperometric detection of phenol and catechol using nanoporous gold. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 221, 191–200.

[29] Artigues, M., Oh, S., Gilabert-Porres, J., Abellà, J., Borrós, S., & Colominas, S. (2019). Novel grafted electrochemical interface for covalent glucose oxidase immobilization using reactive pentafluorophenyl methacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175(October 2018), 1–9.

[30] Kimmel, D. W., Leblanc, G., Meschievitz, M. E., & Cliffel, D. E. (2012). Electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*, 84(2), 685–707.

[31] Shervedani, R. K., Mehrjardi, A. H., & Zamiri, N. (2006). A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. *Bioelectrochemistry*, 69(2), 201–208.

[32] Tang, Z., Fu, Y., & Ma, Z. (2017). Bovine serum albumin as an effective sensitivity enhancer for peptide-based amperometric biosensor for ultrasensitive detection of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 94(January), 394–399.

[33] Menon, S., Mathew, M. R., Sam, S., Keerthi, K., & Kumar, K. G. (2020). Recent advances and challenges in electrochemical biosensors for emerging and re-emerging infectious diseases. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 878, 114596.

[34] Pohanka, M., & Skládal, P. (2008). Electrochemical biosensors - Principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 6(2), 57–64.

[35] Zhang, H., Oellers, T., Feng, W., Abdulazim, T., Saw, E. N., Ludwig, A., Levkin, P. A., & Plumeré, N. (2017). High-Density Droplet Microarray of Individually Addressable Electrochemical Cells. *Analytical Chemistry*, 89(11), 5832–5839.

[36] Wang, P., Liu, Q., Xu, Y., Cai, H., & Li, Y. (2007). Olfactory and taste cell sensor and its applications in biomedicine. *Sensors and Actuators, A: Physical*, 139(1-2 SPEC. ISS.), 131–138.

[37] Miyamoto, K. ichiro, Seki, K., Suto, T., Werner, C. F., Wagner, T., Schöning, M. J., & Yoshinobu, T. (2018). Improved spatial resolution of the chemical imaging sensor with a hybrid illumination that suppresses lateral diffusion of photocarriers. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 273(July), 1328–1333.

[38] Hafeman, D. G., Parce, J. W., & McConnell, H. M. (n.d.). Light-Addressable Potentiometric. 240.

[39] Schöning, M. J., & Poghossian, A. (2006). Bio FEDs (Field-Effect Devices): State-of-the-art and new directions. *Electroanalysis*, 18(19–20), 1893–1900.

- [40] Yang, C. M., Liao, Y. H., Chen, C. H., Chen, T. C., Lai, C. S., & Pijanowska, D. G. (2016). P-I-N amorphous silicon for thin-film light-addressable potentiometric sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 236, 1005–1010.
- [41] 小杉恵太, 長谷川有貴, 内田秀和, “無機半導体 pn 接合を用いたアレイ化電気化学センサの研究”, 2018 年 138 巻 5 号 p. 204-207
- [42] 関戸 秀隆, 長谷川 有貴, 内田秀和, “無機半導体を用いた二次元電気化学センサの研究”, 電気学会論文誌 E(センサ・マイクロマシン部門誌), 2016 年 136 巻 5 号 p. 203-207
- [43] 塚田 貴一, 長谷川 有貴, 内田秀和, “LAAS マイクロアレイを用いたスクリーニング技術の研究”, 電気学会論文誌 E(センサ・マイクロマシン部門誌), 2017 年 137 巻 9 号 p. 272-277
- [44] Arai, H., Goto, D., Hasegawa, Y., & Uchida, H. (2013). Study on the two-dimensional chemical sensor using a photoconductive polymer film. *IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines*, 133(7), 290–296.
- [45] 前島 和真, 長谷川 有貴, 内田秀和, “二次元電気化学センサ (LAAS) によるコラゲナーゼの反応検出の研究”, 電気学会論文誌 E(センサ・マイクロマシン部門誌), 2020 年 140 巻 5 号 p. 98-102
- [46] 七條 雅人, 長谷川 有貴, 内田秀和, “二次元電気化学センサ (LAAS) によるコラゲナーゼの反応検出の研究”, 電気学会論文誌 E(センサ・マイクロマシン部門誌), 2020 年 140 巻 5 号 p. 98-102
- [47] Li, G., Li, W., Li, S., Shi, X., Liang, J., Lai, J., & Zhou, Z. (2020). A novel aptasensor based on light-addressable potentiometric sensor for the determination of Alpha-fetoprotein. *Biochemical Engineering Journal*, 164(May), 107780.
- [48] Kätelhön, E., Mayer, D., Banzet, M., Offenhäusser, A., & Wolfrum, B. (2014). Nanocavity crossbar arrays for parallel electrochemical sensing on a chip. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5(1), 1137–1143.
- [49] Niranjana, E., Kumara Swamy, B. E., Raghavendra Naik, R., Sherigara, B. S., & Jayadevappa, H. (2009). Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by sodium dodecyl sulphate modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 631(1–2), 1–9.
- [50] Lamas-Ardisana, P. J., Martínez-Paredes, G., Añorga, L., & Grande, H. J. (2018). Glucose biosensor based on disposable electrochemical paper-based transducers fully fabricated by screen-printing. *Biosensors and Bioelectronics*, 109(February), 8–12.
- [51] Diouf, A., Bouchikhi, B., & El Bari, N. (2019). A nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on molecularly imprinted polymer and its application in measuring saliva glucose. *Materials Science and Engineering C*, 98(January), 1196–1209.
- [52] Shamsipur, M., & Amouzadeh Tabrizi, M. (2014). Achieving direct electrochemistry of

glucose oxidase by one step electrochemical reduction of graphene oxide and its use in glucose sensing. *Materials Science and Engineering C*, 45, 103–108.

[53] 理化学研究所, 創薬医療技術パイプライン,

<http://www2.riken.jp/dmp/contents3b.html>

[54] Yamaoka, H., & Sode, K. (2007). SPCE based glucose sensor employing novel thermostable glucose dehydrogenase, FADGDH: Blood glucose measurement with 150nL sample in one second. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 1(1), 28–35.

[55] Kirthiga, M., Rajendran, L., & Fernandez, C. (2017). Theoretical treatment of diffusion and kinetics of osmium redox polymer mediated glucose oxidase enzyme electrodes: Analytical expression of current density for varying potential. *Electrochimica Acta*, 230, 89–97.

[56] Sode, K., Loew, N., Ohnishi, Y., Tsuruta, H., Mori, K., Kojima, K., Tsugawa, W., LaBelle, J. T., & Klonoff, D. C. (2017). Novel fungal FAD glucose dehydrogenase derived from *Aspergillus niger* for glucose enzyme sensor strips. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 305–311.

[57] Zhao, W. W., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2017). Photoelectrochemical enzymatic biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 92(November 2016), 294–304.

[58] Fu, L., Wang, A., Lyv, F., Lai, G., Zhang, H., Yu, J., Lin, C. Te, Yu, A., & Su, W. (2018). Electrochemical antioxidant screening based on a chitosan hydrogel. *Bioelectrochemistry*, 121, 7–10.

[59] Sharma, D., Lim, Y., Lee, Y., & Shin, H. (2015). Glucose sensor based on redox-cycling between selectively modified and unmodified combs of carbon interdigitated array nanoelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 889, 194–202.

[60] Lawal, A. T., & Adeloju, S. B. (2010). Comparison of polypyrrole-based xanthine oxidase amperometric and potentiometric biosensors for hypoxanthine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(3–4), 270–275.

[61] Yu, Y. Y., Wang, J. X., Si, R. W., Yang, Y., Zhang, C. L., & Yong, Y. C. (2017). Sensitive amperometric detection of riboflavin with a whole-cell electrochemical sensor. *Analytica Chimica Acta*, 985, 148–154.

[62] Hatada, M., Loew, N., Inose-Takahashi, Y., Okuda-Shimazaki, J., Tsugawa, W., Mulchandani, A., & Sode, K. (2018). Development of a glucose sensor employing quick and easy modification method with mediator for altering electron acceptor preference. *Bioelectrochemistry*, 121, 185–190.

[63] Okuno, D., Nishiyama, M., & Noji, H. (2013). Single-molecule analysis of the rotation of F1-ATPase under high hydrostatic pressure. *Biophysical Journal*, 105(7), 1635–1642.

[64] Muneyuki, E., Watanabe-Nakayama, T., Suzuki, T., Yoshida, M., Nishizaka, T., & Noji, H. (2007). Single molecule energetics of F1-ATPase motor. *Biophysical Journal*, 92(5), 1806–1812.

[65] Lee, S. W., Yamamoto, T., Noji, H., & Fujii, T. (2006). Chemical delivery microsystem for single-molecule analysis using multilaminar continuous flow. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 519–525.

- [66] Benjamin L Wang, Adel Ghaderi, Hang Zhou, Jeremy Agresti, David A Weitz, Gerald R Fink, and Gregory Stephanopoulos.(2015). Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption. *Nat Biotechnol*, 32(5): 473–478.
- [67] Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, *Electrochemical methods*, John Wiley & Sons(2000)
- [68] 逢坂 哲彌, 小山 昇, 大坂 武男, 電気化学測定法 基礎測定マニュアル, 講談社サイエンティフィク(1992)
- [69] 藤嶋 昭, 相澤 益男, 井上 徹, 電気化学測定法 上, 技法堂出版株式会社(2010)
- [70] Kowalewska, B., & Jakubow, K. (2017). The impact of immobilization process on the electrochemical performance, bioactivity and conformation of glucose oxidase enzyme. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 238, 852–861.
- [71] Xiao, X., Ulstrup, J., Li, H., Wang, M., Zhang, J., & Si, P. (2014). Nanoporous gold assembly of glucose oxidase for electrochemical biosensing. *Electrochimica Acta*, 130, 559–567.
- [72] Su, F., Zhang, L., Kong, X., Lee, F., Tian, Y., & Meldrum, D. R. (2017). Ratiometric glucose sensing based on fluorescent oxygen films and glucose oxidase. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 14, 1–6.
- [73] Gong, Y. T., Wu, X., Dong, Y., Liu, Q., Li, Z., & Wang, G. L. (2018). Cathodic photoelectrochemical immunoassay based on glucose-oxidase mediated biocatalysis to inhibit the exciton trapping of cupric ions for PbS quantum dots. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 266, 408–415.
- [74] Liu, X., Zhao, L., Liu, F., Astruc, D., & Gu, H. (2020). Supramolecular redox-responsive ferrocene hydrogels and microgels. *Coordination Chemistry Reviews*, 419, 213406.
- [75] Kozuka, A., Petrou, A., Lavrentaki, V., Fesatidou, M., Nicolaou, I., & Geronikaki, A. (2020). Aldose reductase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as a promising therapeutic approach for diabetes mellitus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112742.
- [76] Kozuka, M., Yamane, T., Imai, M., Handa, S., Takenaka, S., Sakamoto, T., Ishida, T., Inui, H., Yamamoto, Y., Nakagaki, T., & Nakano, Y. (2020). Isolation of HMG-CoA reductase inhibitors from aronia juice. *Food Bioscience*, 34(January),
- [77] 伊東 孝祐, 田之倉 優 : “アゾ還元酵素の反応機構”, 生化学, 第 80 卷, 第 6 号, pp550-559(2008)
- [78] 米田 英伸, 原田 裕之, 浅野 泰久, : “アゾ化合物、4,6-ビスフェニルアゾレゾルシノール(4,6-Bis)の分解微生物の探索”, 富山県立大学紀要, pp96-102(2000)
- [79] 日本化学会 : “化学便覧”, 改正 5 版, 表 14.6(2004)
- [80] Flores-Leonar, M. M., Moreno-Esparza, R., Ugalde-Saldívar, V. M., & Amador-Bedolla, C. (2017). Further insights in DFT calculations of redox potential for iron complexes: The ferrocenium/ferrocene system. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1099, 167–173.

- [81] Moharram, Y. I. (2006). Extraction of electrode kinetics and transport parameters of ferrocene at a platinum electrode from semiintegral electroanalysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 587(1), 115–126.
- [82] Nagy, L., Gyetvai, G., Kollár, L., & Nagy, G. (2006). Electrochemical behavior of ferrocene in ionic liquid media. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69(1–2), 121–132.
- [83] Sakai, H., Matsumi, T., Kakizawa, Y., Imamura, H., Takei, T., Tsuchiya, K., Kwon, K., Yamaguchi, A., & Abe, M. (2001). Electrochemical Behavior of Ferrocene Solubilized in Surfactant Micelles: Electrostatic Interaction between Ferricinium Ion and Anionic Micelles. In *Journal of Oleo Science* (Vol. 50, Issue 12, pp. 937–943).
- [84] Li, Y., Wang, G., Jin, J., & Wang, X. (2013). Using active carbon as counter electrodes: A two-electrode configuration for pulse amperometric detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 705, 13–18.
- [85] Wang, H., & Ma, Z. (2018). A cascade reaction signal-amplified amperometric immunosensor platform for ultrasensitive detection of tumour marker. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 254, 642–647.
- [86] Yoshinobu, T., Ecken, H., Poghossian, A., Lüth, H., Iwasaki, H., & Schöning, M. J. (2001). Alternative sensor materials for light-addressable potentiometric sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 76(1–3), 388–392.
- [87] 神岡武文, 立花福久, 大下祥雄. 結晶シリコン太陽電池におけるパッシベーション技術, *J. Plasma Fusion Res.* Vol.91, No.5 (2015) 354-359.
- [88] Libertino, S., Conoci, S., Scandurra, A., & Spinella, C. (2013). Biosensor integration on Si-based devices: Feasibility studies and examples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 179, 240–251.
- [89] MA, X. B., Zhang, W. J., Zhang, W., MA, Q., Fan, Z. Q., MA, D. H., Jiang, Z. Y., & Zhang, Y. L. (2017). A novel strategy for preparing a selective back surface field of n-type emitter wrap through solar cells. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 61(January), 93–98.
- [90] Ryu, K., Madani, K., Rohatgi, A., & Ok, Y. W. (2018). High efficiency screen-printed n-type silicon solar cell using co-diffusion of APCVD boron emitter and POC13 back surface field. *Current Applied Physics*, 18(2), 231–235.
- [91] Li, Q., Tao, K., Sun, Y., Jia, R., Wang, S. M., Jin, Z., & Liu, X. Y. (2016). Two dimensional simulation studies on amorphous silicon stack as front surface field for interdigitated back contact solar cells. *Vacuum*, 125, 56–64.
- [92] Bashiri, H., Karami, M. A., & Nejad, S. M. (2020). An analytical approach for modeling of high-efficiency crystalline silicon solar cells with homo–hetero junctions. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 111(October 2019), 104960.
- [93] de Rond, T., Danielewicz, M., & Northen, T. (2015). High throughput screening of enzyme activity with mass spectrometry imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 31, 1–9.

- [94] Q. Zhang, Theoretical analysis and design of submicron-LAPS, *Sens. Actuators B Chem.* 105 (2005) 304–311.
- [95] Y. Guo, K. Miyamoto, T. Wagner, M.J. Schöning, T. Yoshinobu, Device simulation of the light-addressable potentiometric sensor for the investigation of the spatial resolution, *Sens. Actuators B Chem.* 204 (2014) 659–665.

【謝辞】

本研究を進めるにあたり非常に多くの方に御指導、御助言また御協力頂きましたことをこの場を借りて深くお礼を申し上げます。

長谷川有貴准教授、清水麻希助教には普段から議論や御指導していただき、本研究の研鑽にご助力いただきましたことを感謝いたします。

著者の所属していた内田・清水・長谷川(有)研究室のメンバーの皆様も日頃からの議論・研究にご助力いただきましたことにお礼申し上げます。

博士課程後期への進学に理解・御協力いただいた母、小杉康子氏に深く感謝を申し上げます。

本論文を作成するにあたり、学位論文審査委員である内田秀和教授、矢口裕之教授、白井肇教授、長谷川有貴准教授に深くお礼を申し上げます。

最後に、主指導教員である内田秀和教授には終始丁寧にご指導いただきとてもお世話になりました。心より感謝いたします。ありがとうございました。

【研究業績】

○学会発表

[1] 小杉恵太, 内田秀和, “内部光電効果を用いた二次元電気化学アレイセンサによるグルコース測定”, 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 27P3-SSP-22 (2020)

[2] 小杉恵太, 内田秀和, “感度向上のための裏面電界を用いた二次元電気化学アレイセンサの研究”, 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 20pm3-PS3-52 (2019)

[3] 小杉恵太, 長谷川有貴, 内田秀和, “光電効果を用いた電気化学センサによる酸化体メデイエータ濃度測定の研究”, 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 30pm4-PS-62 (2018)

○学術論文

[1] Keita Kosugi, Yuki Hasegawa, Hidekazu Uchida, “Light-Addressable Amperometric Sensor with Counter and Working Electrodes of the Same Materials”, IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering, Vol. 16 No. 3, pp478-485. (2021)

[2] Keita Kosugi, Hidekazu Uchida, “Study of LAAS Sensitivity Using Back Surface Electric Field”, IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, Vol. 141 No. 1, pp14-20. (2021)

[3] 小杉恵太, 内田秀和, “内部光電効果を用いた電気化学アレイセンサによる酸化体メデイエータの還元電流測定の研究”, IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, vol. 139, No. 12, pp400-405 (2019)