

氏名(本籍)	せき おか なお ゆき 関 岡 直 行 (埼玉県)		
学位の種類	博 士 (工 学)		
学位記番号	博 甲 第 4925 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	バイオセンシング素子応用へ向けたスパッタナノカーボン薄膜の研究		
主 査	筑波大学連携大学院教授	工学博士	丹 羽 修
副 査	筑波大学教授	博士(工学)	鈴 木 博 章
副 査	筑波大学教授	工学博士	長 崎 幸 夫
副 査	筑波大学准教授	理学博士	木 島 正 志

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は、5章から構成されており、第1章を緒言とし、第2章から第4章を実験項、第5章を総括としている。電子サイクロトロン共鳴 (ECR) スパッタ法により作製したナノカーボン薄膜電極は、従来の電極に比べ、低い容量電流や広い電位窓などの優れた電気化学特性を示し、かつ低温での薄膜形成が可能のためバイオセンサやバイオチップ用の電極へと応用できる可能性がある。しかしながら、スパッタで作製した後、未処理の ECR ナノカーボン薄膜電極は、いくつかの電気化学的活性種に対して、グラファイト電極よりも電極活性が低い場合がある。また、いくつかの吸着性の高い分子の吸着による電極活性の低下も見られる。そこで本研究では、ECR ナノカーボン薄膜の表面改質を行い、生体分子に対する電極活性と安定性を向上させることを目的とした。特に処理電位や時間を制御することで表面の酸化状態を制御可能であり、処理後に電気化学測定用電極として用いる場合、電気化学測定装置のみで処理と測定の両方を行える、電気化学的酸化処理により表面改質を行い、いくつかの生体分子検出に適した電極表面を構築できることを確認している。また、表面改質を行った ECR ナノカーボン薄膜電極のバイオセンシング応用として、脱水素酵素を用いた酵素センサと、核酸塩基の直接酸化による DNA の 1 塩基多型 (SNP) 検出と DNA のメチル化検出について検討・評価を行い、従来の電極では測定困難な、低い検出限界および高酸化電位を示す測定対象を定量的に検出可能であることを確認している。

第1章では、医療などの分野で電気化学バイオセンサが求められている背景をまとめ、これに対して電極材料が与える影響、および新規電極材料とその特性について整理した。この背景および既往の研究をふまえ、本研究の目的を示した。さらに、本研究における特徴および論文の構成を示した。

第2章では、電気化学的処理による ECR ナノカーボン薄膜表面の構造と電気化学特性の変化について、X線光電子分光測定、原子間力顕微鏡による測定、接触角測定、および電気化学的測定により評価を行い、他のカーボン電極と比較し検討した。ECR ナノカーボン電極は、電気化学的酸化に対して高い安定性を示す  $sp^2$  結合と  $sp^3$  結合がハイブリッドしたナノ結晶構造を有するため、表面の平坦性と  $sp^2$  結合量を維持したまま、表面の酸素を含む官能基の量が増加し、その結果、広い電位窓と低い容量電流を維持したまま、電極活性が向上した。さらにこの変化は、生体分子である酸化型グルタチオン (GSSG) とセロトニン測定の検

出限界と安定性を向上させた。この結果から、処理により GSSG やセロトニンなどの生体分子検出に適した表面へ、ECR ナノカーボン薄膜電極表面を制御可能であることを示している。

第3章では、電気化学的処理後の ECR ナノカーボン薄膜電極では、表面の平坦性と低いバックグラウンド電流をほぼ維持したまま、表面の酸素を含む官能基の量が増加するため、電気化学的な酸化により安定に測定を行うことが困難なニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を、安定かつ高感度に測定可能であることを示している。また、ECR ナノカーボン薄膜電極と gabase を組み合わせたオンライン  $\gamma$ -アミノ酪酸センサ (GABA) を作製し、30 nM という低い検出限界を達成した。この結果から、NAD(P)H 検出を原理とするバイオセンサに、処理後の ECR ナノカーボン薄膜電極を用いることで、センサの安定性と検出限界を向上可能であることを示している。

第4章では、処理後の ECR ナノカーボン薄膜電極の電位窓の広さと、芳香族環を有する生体分子に対する電極活性の高さにより、DNA を構成する4塩基全てを定量性良く測定可能なことを見出し、1塩基の違いを各塩基の電流値の大きさの差から、定量的に検出可能であることを明らかにしている。また、この特性を利用することで、非標識な電気化学的 SNP 検出を実現し、かつオリゴヌクレオチドに対して 6.25 pmol (S/N = 3, 体積: 5  $\mu$ L) という低い検出限界と、再現性の高い安定な測定を実現している。さらに、シトシン (C) とメチルシトシン (mC) の酸化電位が異なることを見出し、その差を利用した非標識 mC 検出について検討を行い、亜硫酸水素塩や標識を必要としない、簡便な C のメチル化計測が可能であることを示している。

第5章では各実験項で得られた結果に関して総括を行い、処理後の ECR ナノカーボン薄膜電極のバイオセンシング素子としての可能性について提案している。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

現在、バイオセンシング素子応用を見据えた、新規カーボン電極材料の研究が盛んに行われており、本論文では、この新規カーボン材料の1つである ECR ナノカーボン薄膜電極の表面制御を行い、生体分子検出に適した表面の構築を目的とした研究を行っている。また、表面制御を行った ECR ナノカーボン薄膜電極をバイオセンサに応用し、現在のバイオセンサの応用範囲をさらに拡大できる可能性を示すことを目指したものである。著者は初めに、低い容量電流や広い電位窓などの優れた電気化学特性を示し、かつ低温での薄膜形成が可能な ECR ナノカーボン薄膜電極を電気化学的に酸化処理し、いくつかの生体分子に対する感度と安定性を向上させた。本研究は、それまで電気化学測定の問題として挙げられていた、直接測定可能な分子の種類に限られることや、吸着性の高い分子の電極表面への吸着により電流シグナルが低下する等という問題を解決する材料及びその処理法として期待できる。また、表面制御を行った ECR ナノカーボン薄膜電極を用いて、GABA を検出する酵素センサと、電気化学的直接酸化による DNA 計測法に関する評価・検討を行い、バイオセンシング素子としての価値を示した。GABA は生体中の濃度が低く、かつ直接酸化する酵素が存在しないため、電気化学法により低濃度の GABA を検出可能なセンサの作製が困難という問題があった。そのため著者は、その問題を解決する方法として、表面制御を行った ECR ナノカーボン薄膜電極の低い容量電流と、NADPH 測定に対する高い安定性に着目し、酵素と組み合わせた NADPH 検出型 GABA センサを作製することで、従来のセンサに比べ1桁以上低い検出限界を実現している。電気化学的直接酸化による DNA 計測法では、従来の電極は、狭い電位窓や低い電極活性により全ての核酸塩基を電気化学的な直接酸化により定量できないという問題があった。そこで著者は、表面制御を行った ECR ナノカーボン薄膜電極の広い電位窓と高い電極活性に着目し、全ての核酸塩基を定量的に検出することでこの問題を解決し、非標識な SNP 検出法を確立している。また、塩基対挙動からでは識別できないため、簡便に検出すること

が困難な mC を，mC と C の電気化学的な酸化電位の違いに着目することで，直接酸化による非標識かつ定量的な mC の検出を実現しており，従来検出が困難な分子を電気化学法で直接検出可能なことを始めて示し，本研究の目的を達成している。

よって，著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。