

氏名	柳澤 博幸			
学位の種類	博士 (工学)			
学位記番号	博甲第 7673 号			
学位授与年月日	平成 28 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	スパッタカーボン薄膜を用いた重金属の電気化学検出とその応用に関する研究			
主査	筑波大学教授	工学博士	長崎 幸夫	
副査	筑波大学教授	理学博士	木島 正志	
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	辻村 清也	
副査	埼玉工業大学教授	工学博士	丹羽 修	

論 文 の 要 旨

審査請求論文は、主として sp^2 と sp^3 結合が複合したカーボン電極に注目し、重金属分析の性能の最適化を目的とした論文である。適切な前処理法を選択することで実試料に模した試料溶液の測定を実現し、その後、開発した重金属分析法を環境分析のみならず、生体物質であるメチルシトシンの検出に応用した内容である。

まず、第 1 章では、重金属の産業への応用例とその毒性についてまとめ、課題を明らかにすると共に、現状で用いられている ICP-MS などの機器分析法の性能を示している。さらに水銀電極を利用したアノードリックストリッピング (ASV) 法について、その性能と電極の課題を説明している。第 2 章では、重金属の ASV 測定に要求される条件として、毒性がなく、取り扱いが容易な固体電極として、従来用いられているグラッシーカーボン電極をはじめとして、ホウ素ドーパダイヤモンド、ダイヤモンドライクカーボンなどの様々なカーボン電極について整理している。その中で、電子サイクロトロン共鳴スパッタ法やアンバランストマグネトロンスパッタ法で作製した sp^2 結合と sp^3 結合が複合したカーボン薄膜は、重金属分析において、汎用性が広いこと及び重金属測定用の電極として有用なカーボン薄膜素材である事を示している。 sp^2 結合と sp^3 結合が複合したカーボン電極において、 sp^2 結合と sp^3 結合がどのように重金属分析に影響しているかの先行研究はなく、本研究で明らかにしようとした論文である。まずは、測定条件の最適化を行い、得られたデータから、カーボン薄膜中の sp^2/sp^3 比が、感度、ノイズ、検出限界に影響しているかを考察している。

第3章では、第2章で検討したカーボン薄膜電極を用いた重金属分析法で、工場排水のモニタリングで使用できる前処理法の開発を目的としている。まずは、工場排水における処理技術についてまとめており、排水中に存在する妨害物質とその濃度を想定している。2章で開発した最適化したカーボン薄膜電極を用いた ASV 法を検出に用い、将来現場で使用できる簡便性を考慮して、試薬添加なしで、有機物を分解除去する UV 照射装置、銅イオンを除去できるキレックスカラムを選択している。工場排水に模した人工排水を用いて、本 ASV 法の実証実験を行っている。

第4章では、第2章までに実現した重金属測定法を DNA メチル化分析に応用している。まず、メチルシトシンの生体内における役割、測定意義、従来法について述べ課題を述べている。その後ゲノム DNA 中の単一のメチルシトシンを直接検出する方法は難しく、直接検出では増幅が足りないことを示し、二つの増幅法を取り入れている。これらの増幅機構を分析法に取り入れることで、従来の電気泳動のような分離手法は必要としない、ピンポイントで簡便にメチル化状態を解析できる新規電気化学的検出法を考案し実証実験を行ったものである。

以上のような調査、分析及び検討に基づいて、本論文では、以下のような結論を付けている。 sp^3 結合が 50% 複合したカーボン薄膜が Cd^{2+} と Pb^{2+} の分析に最も適していることを明らかにしている。具体的には、従来電極と比較すると、1桁低い検出下限を達成でき、(検出下限 Cd^{2+} : 0.25 ppb、 Pb : 1.0 ppb)、WHO 飲料水水質ガイドラインの基準 (検出下限 Cd^{2+} : 3 ppb、 Pb : 10 ppb) に対して十分担保できる性能を達成できていることを示している。また、適切な前処理法を用いる事によって、妨害物質 (EDTA、銅イオン) が存在しても、低い検出下限 (検出下限 Cd^{2+} : 1 ppb、 Pb : 10 ppb) ができ、排出基準 (検出下限 Cd^{2+} : 30 ppb、 Pb : 100 ppb) のみならず、WHO の飲料水の基準 (検出下限 Cd^{2+} : 3 ppb、 Pb : 10 ppb) に対して担保できる性能を達成でき、前処理法とカーボン薄膜電極を組み合わせた重金属分析法の有用性を実証している。

さらに、この重金属を高感度に測定する技術を、生体物質であるメチルシトシンを測定する技術に応用した結果、単一のメチルシトシンの検出限界は 0.5 nM であり、蛍光測定法の検出限界である 2.5 nM よりも低い事に成功している。更に、その結果は最も広く使用されている手法である電気泳動測定の結果 (2 nM) よりも優れていたことを示している。これは、第2章で行った ASV 測定におけるカーボン電極中の sp^2/sp^3 比の最適化と ASV 法によるカドミウムイオンの高感度検出によって達成できたことによるものであると主張し、 sp^2/sp^3 複合ナノカーボン薄膜は、環境重金属分析のみならず、DNA 中のメチル化分析にも有益であることを示した論文である。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

柳澤博幸は、筑波大学大学院博士後期課程において三年間の中で2つの研究成果を得ている。1つは、新規開発したカーボン薄膜電極を重金属測定に応用した研究成果であり、もう1つは、高感度のカドミウム測定法を遺伝子のメチル化の検出に応用した研究成果である。前者の成果は、査読付きの英文誌である *Electrochemistry* と *Analytical Science* の2報の論文(IF 1.03 と 1.39)にまとめられている。具体的には、カーボン薄膜をアノード stripping ボルタンメトリ法という電気化学測定に適用し、毒性が高い重金属イオン（カドミウム、および、鉛イオン）の検出に関し、 sp^2 結合と sp^3 結合が複合したカーボン薄膜に注目している。これまで炭素材料のエッジ面が、重金属に対して高い還元作用を示すことは知られていた。しかし、エッジ面が多く存在するカーボン電極では、バックグラウンド電流が高く、S/N が低下する課題もあった。近年 sp^2 と sp^3 が複合したカーボン薄膜は、電位窓が広く、低ノイズで重金属を測定することが報告されている。しかしながら、 sp^2 結合と sp^3 結合が複合したカーボン中の sp^2 と sp^3 結合が、重金属分析にどのように影響するかにはついては明らかにはされていない。柳澤氏は、本研究で、様々な割合で sp^2 と sp^3 結合が複合したカーボン薄膜を作製し、それらの重金属分析における性能を比較解析した。その結果、カドミウムと鉛の分析には sp^3 結合が 50% のカーボン薄膜は最も適している事を結論付けている。以上の最適化により、従来の電極を凌駕する検出限界（検出下限 Cd^{2+} : 3 ppb、 Pb : 10 ppb）を達成している。

更に、論文レベルでの基礎的な検討にとどまることなく、試薬を使用しない紫外線照射と簡便な前処理法であるキレックスカラムによる前処理法を検討し、実際の水分析で課題となる有機物や他の金属イオン(銅が主要な妨害イオン)の存在下でも WHO の基準濃度より低い検出限界を達成している。本成果は、工学的に外部からも注目され、実際に水分析機器を製造販売している企業との共同研究に発展している。

後者の研究においては、高感度のカドミウムイオン測定法を遺伝子のメチル化の検出に応用し、査読付き英文誌 *Sensors and Actuators B* (IF 3.84)に受理された。柳澤氏は本論文で、従来の方法の利点と欠点をまとめ課題を明らかにし、ゲノム中に存在する単一のメチルシトシンを検出する為に、二つの観点から考察を行っている。一つは検出における増幅、もう一つは測定サンプルの増幅が必要であると考え、分かり易くまとめている。それぞれの増幅法は既に報告された方法であるが、二つの増幅を組み合わせたメチルシトシン検出法の報告例はなく、その実証実験を行っている。従来は、電気泳動分析などの大型装置を利用して遺伝子のメチル化を決定していたが、本論文では、制限酵素による切断とハイブリダイゼーションアッセイを組み合わせ、その結果をアノード stripping ボルタンメトリ法で得ることに成功した。本法は、工学的にも実用化が期待できる方法であり、簡便・迅速なエピゲノム検出法として注目されている。

彼は学会活動において、二年半の間に6件筆頭発表者として発表し、その成果で分析化学会の支部シンポジウムでポスター賞を受賞するなど外部評価も得ている。また現職である産業技術総

合研究所の職員として9件の学会活動に貢献している。博士課程の学生として、柳澤氏は、研究室内で学位論文と関係したプロジェクトを中核として担当し、熱心に後輩の学生の指導にも当たっております。

これらの研究活動に加えて、本学在学中にも、産業技術総合研究所の職員として平成24年4月から平成27年8月末まで勤務し、*Analytical chemistry* に1報(IF 5.78)、*sensors and Bioelectronics* (IF 6.409) に2報に共著者として計3論文報告している。一つは、ゲノムDNA中の目的塩基がシトシンであるかメチルシトシンであるかを判定できる簡便な方法の開発、もう一つはダニ由来アレルゲンを簡易に測定できる方法の開発の為の実験を中心的に行った。またゲノムDNA中のメチルシトシンの検出法に関しては、この業績をベースに特許出願中である。以上のように、柳澤氏は、本学大学院数理物質科学研究科の社会人大学院生として重金属の測定と、その遺伝子解析への応用に対して、実際に応用が可能なレベルまでの完成度の高い研究成果をあげると共に、勤務先である公的研究機関における業績も豊富であり、これらの業績を総合的に評価して、博士課程に求められている水準を十分に足る能力があると判断する。

〔最終試験結果〕

平成28年2月12日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、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。