

ダイヤモンド電極を基盤とした  
生体内バイオセンシングに向けた  
電気化学測定システムの開発

2019 年度

浅井 開

# 目次

第1章	序論	1
1.1	バイオセンシング	1
1.1.1	分子レベルのバイオセンシング	1
1.1.2	センシング対象の時間的・空間的な階層性	2
1.1.3	測定手法の適材適所	3
1.1.4	論文で目指すバイオセンシング	5
1.2	電気化学	6
1.2.1	測定手法としての利点	6
1.2.2	電気化学バイオセンシング	8
1.3	ダイヤモンド電極	10
1.3.1	電極材料としてのダイヤモンド	10
1.3.2	ダイヤモンド電極によるバイオセンシング	13
1.4	本論文の目的および構成	15
第2章	ダイヤモンド電極の作製と評価	17
2.1	平板電極	17
2.1.1	マイクロ波プラズマ化学気相成長法	17
2.1.2	評価	17
2.2	針状微小電極	23
2.2.1	電解研磨	23
2.2.2	ダイヤモンド成膜	25
2.2.3	絶縁	26
2.2.4	評価	26
2.3	まとめ	29
第3章	オキシトシンおよびバソプレシンの選択的な連続測定 [100]	30
3.1	はじめに	30
3.1.1	オキシトシンとバソプレシン	30
3.1.2	概要	31
3.2	オキシトシンおよびバソプレシンの電気化学特性評価	32
3.3	酸素終端化による選択性の付与	34
3.4	針状微小電極を用いた連続測定	39
3.5	まとめ	41

第 4 章	ダイヤモンド電極を基盤とした電気化学アプタマーセンサーの開発 [139]	42
4.1	はじめに . . . . .	42
4.1.1	電気化学アプタマーセンサー . . . . .	42
4.1.2	ダイヤモンド電極上への DNA の吸着 . . . . .	42
4.1.3	概要 . . . . .	43
4.2	DNA アプタマーのダイヤモンド電極上への吸着 . . . . .	44
4.3	電気化学アプタマーセンサーとしての性能評価 . . . . .	49
4.4	まとめ . . . . .	51
第 5 章	オールダイヤモンド針状微小電極の開発 [158]	52
5.1	はじめに . . . . .	52
5.1.1	ダイヤモンド針状微小電極作製における課題 . . . . .	52
5.1.2	新規作製手法の提案 . . . . .	52
5.2	Step 0: マスク材料の選定 . . . . .	54
5.3	Step 1: 電気めっきによる導電性ダイヤモンド上へのクロムマスクの作製 . . . . .	55
5.4	Step 2: 絶縁性ダイヤモンドの追加成長 . . . . .	56
5.5	Step 3: クロムマスクの除去 . . . . .	58
5.6	電気化学特性の評価 . . . . .	59
5.7	まとめ . . . . .	60
第 6 章	総括および今後の展望	61
6.1	総括 . . . . .	61
6.2	今後の展望 . . . . .	62
	謝辞	64
	研究業績一覧	66
付録 A	CVD プロセスにおける液体原料導入量の計算	70
付録 B	Raman 分光によるダイヤモンド電極中のホウ素濃度の見積もり	73
付録 C	BDD の接触抵抗	80
付録 D	タングステンの電解研磨について	82
	参考文献	83

# 目次

1.1	An illustration of functional hierarchy in size and time scale of biological elements in our body. . . . .	2
1.2	Major route in electrochemical reactions. . . . .	7
1.3	The relationship between boron-concentration and electrical characteristics of BDD. . . . .	10
1.4	Examples of BDD needle-shape microelectrodes made by other groups. . . . .	16
2.1	An illustration of CVD system used in this research. . . . .	18
2.2	Scanning electron micrograph of a diamond electrode. . . . .	18
2.3	Raman spectrum of diamond electrode. . . . .	18
2.4	An illustration of the electrochemical cell used in the present work. . . . .	19
2.5	Cyclic voltammogram of BDD plate electrode in 0.1 M 0.1 M HClO <sub>4</sub> . . . . .	20
2.6	Cyclic voltammogram of BDD electrode in 1 mM potassium ferrocyanide of 0.1 M KCl solution. . . . .	21
2.7	Scan rate dependence of peak current in Figure 2.6. . . . .	22
2.8	General steps for the fabrication of BDD needle-shape microelectrodes. . . . .	23
2.9	The electrochemical cell used for electropolishing of tungsten wires. . . . .	24
2.10	Automatic electropolishing system . . . . .	24
2.11	Tungsten needle holders for seeding and CVD process. . . . .	25
2.12	Glass insulation system for BDD microneedle. . . . .	26
2.13	Scanning electron micrograph of BDD microneedles. . . . .	27
2.14	Raman spectra of BDD microneedles. . . . .	27
2.15	Comparison of BDD microneedles insulated with epoxy resin and glass. . . . .	28
2.16	Cyclic voltammograms of a BDD microneedle before and after electrochemical treatments. . . . .	29
3.1	Chemical structure of oxytocin and vasopressin. . . . .	30
3.2	The study of electrochemical behavior of oxytocin by cyclic voltammetry . . . . .	32
3.3	The study of electrochemical signals of oxytocin except for tyrosine oxidation. . . . .	33
3.4	Electrochemical behavior of oxytocin on other electrodes. . . . .	34
3.5	Cyclic voltammograms of oxytocin and vasopressin on AD-BDD and AO-BDD . . . . .	35
3.6	Linear sweep voltammograms of oxytocin and vasopressin on an AO-BDD microneedle in Tris buffer. . . . .	38
3.7	A flow system used for continuous measurement of oxytocin and vasopressin. . . . .	38

3.8	Flow injection analysis for oxytocin on BDD microelectrode using chronoamperometry. . . . .	39
3.9	Selective detection of vasopressin and oxytocin on BDD microelectrode. . . . .	40
4.1	Preparation of a BDD electrochemical aptamer sensor. . . . .	44
4.2	SWV measurements on BDD electrodes treated by dipping into an aptamer solution. . . . .	45
4.3	Frequency dependence of SWV signals of redox molecules immobilized on electrodes via DNA aptamer. . . . .	46
4.4	Comparison of an SWV signal in PBS at H-BDD and O-BDD. . . . .	47
4.5	SWV on Au and GC electrodes treated by dipping into aptamer solution for 1 h. . . . .	48
4.6	Sensor performance of BDD aptamer sensor. . . . .	48
4.7	Overview of the flow measurement setup for the kinetic study of BDD aptamer sensor. . . . .	49
4.8	Detection of mitomycin C (MTC) adsorption on BDD. . . . .	50
5.1	Schematic illustration of the fabrication process of diamond microelectrodes. . . . .	53
5.2	Ni masking on a BDD microelectrode. . . . .	55
5.3	Resulted Cr deposition on BDD needles. . . . .	56
5.4	Improvements in Cr electrodeposition. . . . .	56
5.5	SEM and EDS image of a Cr-deposited BDD microneedle. . . . .	57
5.6	Improvements in applying current step for the Cr deposition. . . . .	57
5.7	Evaluation by SEM and Raman spectroscopy at each step of the electrode fabrication process. . . . .	57
5.8	Electrochemical evaluation of UDD insulation. . . . .	58
5.9	Cyclic voltammograms of 1 mM $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$ . . . . .	59
A.1	Gas line of liquid carbon source CVD system. . . . .	70
B.1	General Raman spectra of BDD. . . . .	74
B.2	Fitting of Raman spectra of BDD. . . . .	76
B.3	SIMS analysis of 4 BDDs with different boron doping level. . . . .	77
B.4	Fitting results by Equation B.4. . . . .	78
C.1	Current–voltage plot for BDD–clip connection. . . . .	81
D.1	Comparison of the stability of 2 and 3 electrode system for electropolishing. . . . .	82

# 表目次

1.1	A comparison of major techniques appropriate for in vivo biosensing. . . . .	5
2.1	Major potentiostats used in the present work. . . . .	20
2.2	Peak separations ( $\Delta E_p$ ) in Figure 2.6. . . . .	21
3.1	Acid dissociation constant ( $pK_a$ ) of the phenolic group of oxytocin, vasopressin, and tyrosine and isoelectric point (pI) of the three molecules. . . . .	35
3.2	Shift in CV peak separations for several redox molecules on O-BDD. . . . .	36
3.3	Shift in CV peak potential for catechols with different charges. . . . .	36
5.1	List of metals having high melting points enough for CVD process. . . . .	54
B.1	Fitting result for 0.5 % BDD ( $n = 20$ ). . . . .	78
B.2	Fitting result for 1.0 % BDD ( $n = 20$ ) . . . . .	79
B.3	Fitting result for 2.0 % BDD ( $n = 20$ ) . . . . .	79
B.4	Comparison of boron concentrations of 4 BDDs obtained by SIMS analysis and Raman fitting. . . . .	79

# 第 1 章

## 序論

### 1.1 バイオセンシング

本論文において、バイオセンシングを生体情報を得ること [1] と定義する。バイオセンシングは、我々の体の仕組み、変化、異常、治療などの状態を把握するために必要不可欠な技術である。最も身近でパーソナライゼーションに富んでいるバイオセンシングの例の一つが定期健康診断であろう。身長や体重に始まり、血圧や心拍数、血液や尿の成分検査などが行われる。健康診断は労働安全衛生法の定める労働安全衛生規則の第 44 条において、事業者が労働者に対して受診させることが義務付けられており、人々の病気の予防と発見、健康の維持のためにバイオセンシングが用いられていることがわかる。しかしながら健康診断の始まりは 1947 年の労働基準法の制定であり、その歴史は 100 年足らずのものだ。研究や医療の分野においては様々なバイオセンシング技術が用いられているものの、少なくとも私たちの一般的な生活を見るとバイオセンシングの種類は少なく、まだ浸透する余地があることは容易に察することができるだろう。

本論文の大きな目的は、バイオセンシング技術の開発である。本節では、バイオセンシングの種類と課題を俯瞰しながら、本論文がどのようなバイオセンシング技術を目指すのかを明確にする。

#### 1.1.1 分子レベルのバイオセンシング

一重にバイオセンシングと言っても、測定の対象とする生体情報には様々な種類がある。最もわかりやすいものは、巨視的な物理量である。例えば、長さ (身長)、動き (行動)、重量 (体重)、圧力 (血圧)、温度 (体温)、色 (血液)、電気信号 (脳波) などである。これらの測定は古くから行われており、体温計や体重計、血圧計など私たちが日常的に使用しているものも多い。こうしたセンサーは半導体技術の発展に伴い小型化が進み、例えばスマートウォッチなどに組み込まれてさらなる応用へと発展している。今後はさらにセンサーの小型化・低コスト化が進み、より人々の生活に溶け込み、データの蓄積と利用が進んでいくことと思われる。

一方で、量子力学に代表される物理学の進歩により、20 世紀の生物学においては分子レベルの微視的な発見がなされてきた。走査型プローブ顕微鏡や電子顕微鏡、X 線分光など、nm オーダーから単原子オーダーまでのミクロな観察が可能になり、並行して生物学においても分子レベルでの理解が飛躍的に進んだ。最も大きな発見は、DNA の構造 [2] に端を発する生命活動維持システムの根源的な理解であろう。遺伝情報が DNA から mRNA へ転写され、さらにタンパク質へと翻訳され種々の生命現象の維持・調整が生み出されていると言うセントラルドグマの上に生物学が大きな進歩を果たしてきた。こうした分子レベルから生物学を理解しようとする分子生物学のこの 100 年あまり [3] の進歩に伴い、バ

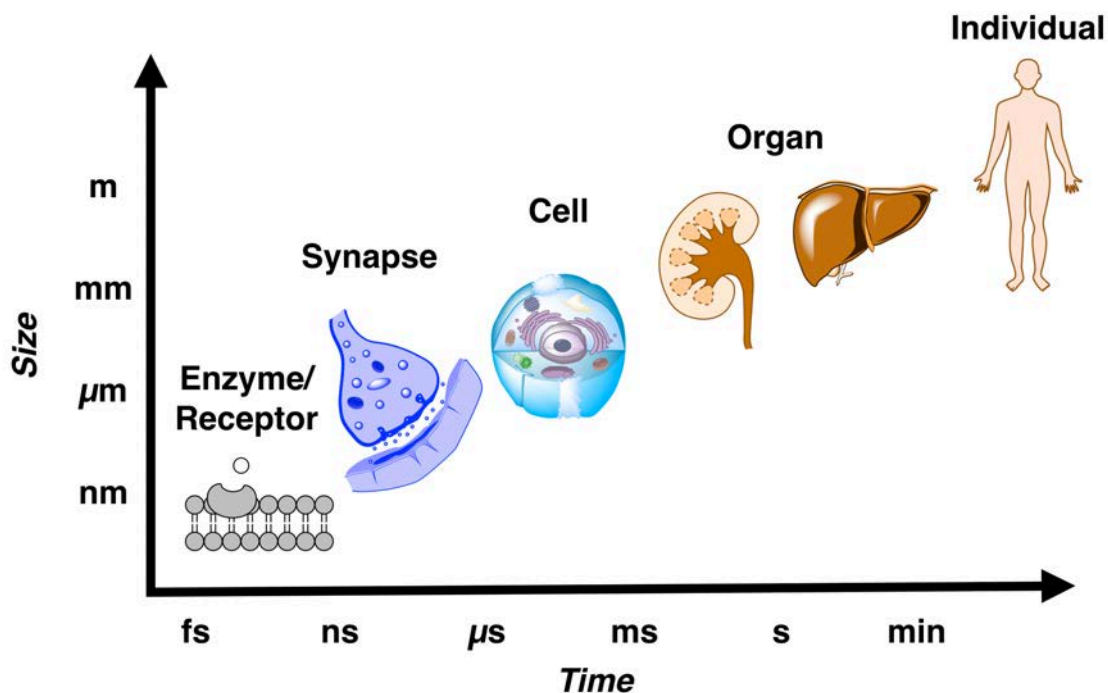


Figure 1.1 An illustration of functional hierarchy in size and time scale of biological elements in our body.

イオセンシングにおいても分子レベルでのアプローチが重要になることは自明であろう。

### 1.1.2 センシング対象の時間的・空間的な階層性

本論文においては、こうした分子レベルでのバイオセンシングを大きな目標に置く。それにあたり、はじめにバイオセンシングの対象を把握する。必要なセンシング技術は測定対象に強く依存するからである。測定対象には血液中の分子、神経伝達物質、あるいは排泄物中の分子など様々なものが存在するが、それらをセンシングするにあたって重要な視点が二つ存在する。一つ目が時間的なスケールである。例えば、私たちの身長の変化を測定しようとしたときに、1秒間隔で身長を測定することは無意味なことは誰もがわかるだろう。成長の速い成長期には1ヶ月、あるいは1週間間隔でも変化が見られるだろうし、20歳を過ぎれば1年に一度確認する程度で十分だ。こうした感覚は誰もが共通して持つものだが、それは私たちが成長による身長の変化のタイムスケールを知っているからである。一方で、血圧を測定しようと思ったときに、1年に一度だけ単発で測定しても意味がないことも誰もが納得することだ。1秒間に1回程度の脈拍と同期して変動する血圧の測定には、その脈拍よりも十分に速く測定する必要がある。ただ、1秒間に1万回もの測定は過剰であるだろう。このように、測定の対象となる現象の変化を追うのに必要十分な時間のスケールで測定することが重要になる。

センシングにおいて同様に重要となるのが空間的なスケールである。再度身長の測定を例に出すと、人間の身長を測定しようとして顕微鏡を取り出す人はいないだろう。10 cm から 3 m 程度まで測れる定規があれば過不足ない。逆に、細胞を観察する場合には顕微鏡でなければ見ることもすらできない。時間的なスケールが十分な測定技術であっても、空間的なスケールが満たされなければ目的の情報を得ることはできない。



このように、時間と空間の二つの側面において階層性が存在することは、センシングを行う上で初めに認識しておくべき事項だ。バイオセンシングで対象とする生体情報について、時間的な分解能と空間的な分解能の二つの軸から大まかに分類したものを Figure 1.1 に示した。身長や体重など、私たちの身体で一番巨視的变化は 1 日以上長い時間スケールで起こる。その変化を生じさせている臓器、細胞、分子は、サイズが小さくなるにつれて変化のスピードを早くする。臓器の機能は秒から時間の単位で生じる。それと同様、あるいは速いスピードで分子のやりとりをする細胞の働きの結果として、そうした臓器の機能が生じる。さらに、そうした細胞の働きは、分子同士の相互作用の上に成り立っている。細胞の多くの機能の根幹をなしているのはタンパク質であるが、イオンチャネルなど迅速に動作するのは、fs のオーダーで水やイオンとの相互作用によりタンパク質の立体構造に変化が生じている [4]。

このようにしてみると、対象によってセンシングに必要な時間・空間分解能が必然的に決定されることがわかる。ただ、まだ明らかになっていない生命現象は存在するはずであり、この図を書き換えると言う意味においても、センシング技術としては両軸における分解能は小さい方が優れていることは言うまでもない。

一方で、時間と空間の分解能は用いられるセンシング技術の測定手法とセンサー形状によって決定される。例えば nm オーダーの微小な環境におけるある分子の量を測定したい場合、例えばセンサーが nm サイズの十分な小ささを持っていたとしても、その小ささだと理論的にも信号が小さすぎて取得することができない測定手法であれば、測定はできない。目的の現象の時間・空間スケールを観察するのに十分な測定手法とセンサー形状を用いる必要がある。次項では、現在存在するバイオセンシングの要素技術に関して、適用可能な測定対象に注目して大まかに分類しながら、本論文で目指すバイオセンシングを明確にする。

### 1.1.3 測定手法の適材適所

バイオセンシングに用いられる技術は様々である。一番直感的にわかりやすいのは、比色分析だろう。比色分析では、対象の物質との反応で色を変化させる物質の現象を利用する。身近なものだと、pH 試験紙や尿試験紙などがある。人の目で見て判断できる分析の簡便性が大きな利点である。同じく光情報として得られるものとして、赤外・可視・紫外光分光、蛍光分光、Raman 分光などの分光測定がある。これらは用いる光の波長により得られる情報が異なるため、組み合わせることで多くの情報が得られる。一方、そうした光は生体表層のみの測定に限定されるのが弱点である。CT などの X 線撮影や陽電子断層撮影 (PET) などの、より高エネルギーの短波長光を用いることで、生体深部の情報も得ることができるようになるものの、これら装置は大型かつ高価であるため、病院や大学などの大型機関のみが所有できる。

特に生体試料などのような様々な物質が混ざった試料を分析するにあっては、その中から目的の物質のみを測定できるような工夫が必要になる。そうした物質の分離を分析に組み込める手法がクロマトグラフィーである。質量分析、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、あるいはそれら同士やその他の手法と組み合わせることで、混合試料を含むあらゆる物質の測定が可能になる。この手法における欠点は、原理上試料のサンプリングが必要になるため、時間分解能と空間分解能に制限がかかることだ。

一方、nm の小さなプローブを用いて試料表面にアプローチする走査型プローブ顕微鏡 (SPM) を用いると、そうしたサンプリングをすることなく細胞膜表面のその場の情報が得られる。SPM には用いるプローブの種類によって様々な手法が存在する。例えば、原子間力顕微鏡 (AMF) を用いると表面の

凹凸や吸着エネルギーなどの物理的・化学的な相互作用を得ることができる。導電性のプローブを用いることで走査型トンネル顕微鏡 (STM) や走査型電気化学顕微鏡 (SECM) になり、試料表面の導電性や電気化学活性の評価が可能になる。

その他、水晶振動子の発振を利用して ng オーダーの質量変化を測定可能な水晶振動子マイクロバラン (QCM) や、金などの表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用した高感度測定方法など様々な手法があるが、全てを網羅することはできないためこれ以上は省略することとする。

なお、これまで「バイオセンシング」として話をすすめてきたが、似た言葉として「バイオセンサー」がある。両者は似た言葉だが大きく意味合いが異なる。バイオセンサーとは、バイオセンシングの一種で、ターゲット分子の認識機構に生体関連物質を用いる方法である。大まかに分類すると、酵素を用いる酵素センサーと、抗体や受容体、アプタマーなどのターゲット分子と特異的に結合する分子を利用した親和性センサー (affinity sensor) がある。しかしこれらはバイオセンシングの要素技術というよりは、要素技術をベースに生体関連物質との組み合わせにより機能を追加したセンサーと言えるため、ここではバイオセンサーをセンシング技術として並列に議論することは控えることとする。

以上、バイオセンシングの要素技術を見てきた。ここで、センシング「対象」に視点を移して、それに適用可能な技術を考えてみる。

血液や尿、唾液などのサンプリングできる生体液については、様々なセンシング技術が適用できる。サンプリングできるということは、サンプルに対して処理を行うことが可能であることを指し、現在ある技術を総動員すれば実に多くの情報が得られることだろう。この方向性のバイオセンシングでは、マイクロ・ナノ流路を使って多段階のサンプルの分離・精製・反応を行う  $\mu$ TAS (micro Total Analysis Systems) や Lab on a Chip として盛んに研究がなされている。

一方で身体の中の多くの臓器は生体表面から深い場所に位置しており、こうした場所でのバイオセンシングも同様に重要である。しかし、深度の深い部分でセンシング可能な技術というのは非常に限られている。通常の光の届かない深い部分に位置しているだけでなく、血液のような色のついた生体液中での測定を行う必要があるため、多くの分光学的な測定手法が適用できない。また、QCM や SPR などのような測定原理として非常に制限された条件が必要な測定手法も適用は難しい。AFM や SECM などの各種 SPM は nm オーダーの空間分解能で高速 (s-min) に形状や電気化学活性などの可視化が可能になる手法であるものの、シャーレ上に固定化された細胞などの観察にとどまり、in vivo (生きたまま) ではあるものの in situ (その場) の生体情報を得ることができない。同じ細胞であっても、単体で培養されている場合と、実際の生体内に位置している状態では大きく性質が異なることも明らかになりつつある [5, 6]。

本論文における “in vivo” は、in situ を含めた生体内を指すこととするが、こうした in vivo かつ in situ の測定を可能とする技術としては、陽電子断層撮影 (PET)、X 線撮影、マイクロダイアリス、電気化学などが挙げられる。それら測定手法を表 1.1 で比較した。これを見てわかるように、電気化学による測定は時間分解能・空間分解能の両者が高く、生体内における連続的な物質モニタリングに適した手法と言える。また、その名前からもわかるように得られるシグナルが電気信号なのでコンピューターを用いた測定システムへの組み込みが極めて容易であり、装置の簡便性においても優れている。

以上をまとめると、バイオセンシングにおいて重要な課題は以下の 2 点に分類できる。

1. 血液、尿、便、唾液などのサンプリングしやすい生体液からいかに多くの情報を得るか
2. 生体内における連続的な局所測定

Table 1.1 A comparison of major techniques appropriate for in vivo biosensing.

Technique	Time resolution	Spacial resolution	Quantitativity
Microdialysis[7]	>2 min	2–5 mm	Quantitative
PET[8]	1–30 min	1–2 mm	Quantitative
Electrochemistry[9]	5 sec	<500 $\mu\text{m}$	Semi-quantitative

1. に関しては、最大の課題は測定感度であろう。例えば特定のがんが特異的に出すタンパク質、酵素、ホルモンなどのがんマーカーの濃度は極めて微量なことも多く、いかに微量なそれらの分子を検出するかが一番の問題となる。有用な測定対象物の発見とそれを容易に測定できる技術の開発を進めていくことで、大きく進歩していくことと思われる。実際、株式会社サリバテックの唾液がんリスク検査など、一般向けの検査に用いられる段階まで実用化されている技術も少なくない。生体試料のサンプリングが可能のため、既存の技術をうまく組み合わせることで、多くの物質の測定が可能になっていくだろう。

1. とともに重要でさらに難易度が高いのが 2. の課題である。生き物を考えたときに、時々刻々と体の様々な場所で物質の相互作用が生じている。その物質の流れを生きのまま、その場で、リアルタイムかつ連続的に可視化することは、バイオセンシングの最大の目的とも言えるだろう。さらに言えば、同じ臓器内でも細胞の機能はある分布を持って分化していることが知られており、ときには 1 mm 以下になるとも言われている細胞集団 [6] の出す情報を局所的に捉えることが重要になる。本論文においては、この課題に主眼を置く。

#### 1.1.4 論文で目指すバイオセンシング

以上で見てきたように、バイオセンシングにおいては物質の濃度変化を生体内、リアルタイム、連続的、そして局所にて測定することが課題の一つである。これを踏まえ、本論文では現状達成されていない中で最も条件の容易な、

- 時間分解能：1 min 以内
- 空間分解能：1 mm 以内

を目安に置き、これ生体内にてリアルタイムかつ連続的に達成可能なセンシング技術の開発を目指す。(ただ、測定対象によってこの目標値は変化することに注意されたい。) 上記条件を満たす手法としては、前節での情報を踏まえると電気化学測定が最も適すると思われる。次項では、電気化学によるバイオセンシング技術を大まかにまとめ、上記目標のための電気化学バイオセンシングにおける課題を挙げる。

## 1.2 電気化学

ここでは、電気化学反応の原理を概観しながら、物質濃度の測定においてどのように優れているのか説明する。また、電気化学を用いたバイオセンシングを例示し、現状の課題を挙げる。

### 1.2.1 測定手法としての利点

電気化学はその名前の通り、電気が関与する化学反応一般を言う。注目する系（ここでは電極-溶液系に限定する）の化学エネルギーが高く、そこから電気エネルギーを取り出す場合は、電池やキャパシタとなり得る。逆に、系に電気エネルギーを投入して物質の変換をすることも可能である。いずれの場合においても、電気化学反応は電極表面で生じる。その概要を Figure 1.2 に示す。

電気化学では電気エネルギーのやりとりをするための電極が、主な反応の場となる。したがって、まず注目する反応物が電極表面に移動する必要がある。改めて言うと当然のように思えるかもしれないが、この物質輸送 (mass transfer) は多くの場合、電極反応の律速過程となる重要な過程だ。物質輸送には主に以下の 3 種類存在する。

- 拡散 (diffusion)
- 泳動 (migration)
- 対流 (convection)

拡散は物質濃度に偏りがある場合に、その濃度差をなくすように物質が動く現象である。一つ一つの分子はランダムに動いているが、統計的なマクロな視点から見ると、濃度差をなくす方向に物質が動くように見える。水にインクを垂らしてしばらくすると、全体の色が均一になるのが、この拡散の一例である。一方、その分子が電荷を持つ場合、電場の存在下で輸送が生じる。これは泳動 (migration) と呼ばれ、電気化学反応に大きく関与する。物質輸送の 3 つ目は、熱や外部からの力による分子の動きであり、対流と言われる。こうした物質輸送は後々の電気化学反応に大きく影響することとなる。

物質輸送を経て分子が電極表面領域に来ると、電気化学反応が生じ得るようになる。電気化学反応の主役は電極-分子間の電子移動であるが、それが生じる過程は非常に迅速かつ複雑である。電極表面での分子の吸着、表面拡散、表面での化学反応、電子移動、脱着、溶液中での化学反応、あるいはこれらが並行して生じる。バイオセンシングで対象にする物質は多くの場合有機分子であり、これらの過程が複雑に絡んだ電気化学反応を相手にすることになる。ただ、水の電気分解ですらその全体像をつかむことは困難だと言われており [10]、本研究もこうしたメカニズムの追求は目的の範囲外とした。いずれにしても、電子授受を果たした分子が電極表面からバルク溶液に拡散することで、電気化学反応の一連の流れが完了する。

電気化学ではこの流れを俯瞰的に捉えることが重要になる。例えば、表面における反応物の濃度が常に一定と仮定すると、下の Tafel の式 (298 K の場合) より、電位を 0.5 V ずらすだけで電子移動が 1 億倍もの速度で生じる ( $\alpha = 0.5, n = 2$  の場合)。

$$\log i = \log i_0 + \frac{\alpha n \eta}{0.059} \quad (1.1)$$

ここで、 $i_0$  は交換電流密度、 $\alpha$  は電荷移動係数、 $\eta$  は過電圧である。しかし、実際の電気化学反応ではそんなにも電流が流れることはない。それは、物質輸送によって反応速度が制限されるからである。一般的には拡散速度が電子移動速度よりも十分遅いので、拡散過程が反応の律速となる。

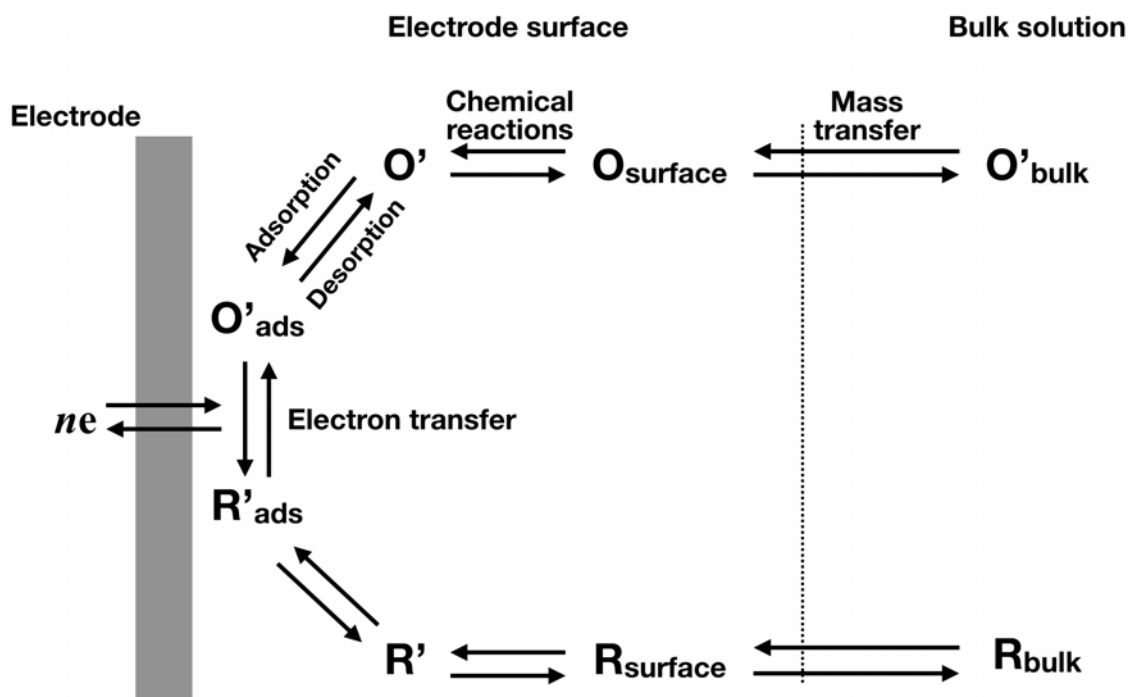


Figure 1.2 Major route in electrochemical reactions. O and R represents oxidant and reductant, and bulk, surface, and ads explains their location in electrode-solution interface. Made referring to [11].

拡散による物質輸送だけではなく、イオンの移動も電子移動に大きく影響を与える。電子移動は電極表面に生じる電場をエネルギー源として生じるが、その電場を作り出しているのが、電極表面に集まったイオンである。例えば電極の電位を正に変化させることを考える。電位の変化の程度に応じて電極表面の電子が減少する、つまり電極表面が正に帯電する。すると、この電荷を打ち消すように溶液中のイオンが移動し、全体的に見ると負電荷の多い層が電極表面に形成される。このように、イオンが集まった電極表面近傍の領域は電気二重層と呼ばれる。この電気二重層があるからこそ、電極表面のみに電場が集中し、電子移動の駆動力となる。もしも溶液中の電解質濃度が低くイオン伝導性が低い場合、この電気二重層の厚みが厚くなり、電子移動に十分な電場が形成されなくなる。このように、電解質濃度も電気化学反応において重要な要素であり、イオンの移動も電気化学反応の一部だと言える。ただ、血液や細胞間質液など生体内液のイオン濃度は 0.14 程度と十分に高いため、バイオセンシングにおける電解質濃度の懸念は少ない。

以上、電気化学反応の主要な過程を見たが、電子移動は fs-ps のオーダーで生じる迅速な過程であるため、本研究の目的である連続測定に適した手法である。また、そうした反応は電極表面で生じるため、電極を目的の部位に設置できさえすれば、原理的にはその場測定が容易にできる。さらに、電気の制御を原理にしているため電子回路との相性が高く、装置を小型化・低コスト化できる点でも優れている。近年の小型化した電子部品を用いることで、十分な機能を持つ測定器を数 mm 程度で作製可能になる [12]。数 mm 程度とはいかなくとも、手のひらサイズのものであれば 1 万円程度で基本的な動作をするポテンショスタットの自作も可能である [13]。小型化・低コスト化は、多くの人々に測定の間を与えるという意味において測定技術の重要な課題の一つであり、電気化学はこの面においても魅力的な測定

技術であると言える。

## 1.2.2 電気化学バイオセンシング

以上のように、電気化学は非常に早いタイムスケールで生じる電子移動を原理にしており、時間分解の高い測定を可能とする。さらに、光や試薬の添加は不要なため、電極がターゲット部位に設置できれば、例えばその部位が光の届かない臓器のような場所であっても測定が可能である。電気化学は高い時間分解能でその場測定を可能とするポテンシャルを持っており、本研究で目指すバイオセンシングのための有効な手段と言える。本項では、電気化学バイオセンシングの流れを俯瞰しながら、現在の課題を考察する。

電気化学バイオセンシングは遡ると 1950 年代から行われていたと言える [14–16]。これら初期の研究において、ドーパミンやアドレナリンなど電気化学的に活性な分子の基礎的な電気化学応答への理解が始まった。しかしこの段階では、分子がどの電位で酸化・還元し、それがどのような反応に由来するかに注目しており、「センシング」までは至っていない。このような、直接的な酸化還元による電気化学応答のセンシングへの応用は 1980 年代から大きく発展する。数  $\mu\text{m}$  の細さのカーボンファイバーを 1 本のみ使用して微小な電極に加工する技術の開発 [17] とともに、生体内バイオセンシングが行われた。特に、fast scan cyclic voltammetry (FSCV) という測定手法が盛んに研究されるようになった。FSCV は 1980 年にイギリスの Armstrong と Millar [18]、および 1984 年にアメリカの Wightmann ら [19] によって開発されて以来、今日に至るまで直接的な電気化学バイオセンシングで最も成功した手法となっている。FSCV は名前の通り、高速にスキャンを行うサイクリックボルタンメトリー (CV) のことである。400 V/s といった高速で電位の走査を行うことで、1 回の CV 測定が ms オーダーで完了することになる。それを連続的に繰り返し行うことで、ms の時間分解能を持った連続測定が可能になる。同時に、定電位測定クロノアンペロメトリーで失われる物質選択性を CV 測定の波形解析により担保することができる。また、このように高速で走査することにより、有機物質の電気化学反応で副次的に生じる化学反応によるポリマー化と、その電極表面への吸着による電極感度の低下を抑えられる [20]。FSCV は主に電気化学的に活性な神経伝達物質の脳内測定に応用され、ms 以下のタイムスケールで生じるそれら物質の分泌・再取り込み・拡散などの現象を直接的に観察する手法として広く研究が進んでいる。

このような電気化学活性分子の直接的な電気化学バイオセンシングと並行して、電気化学バイオセンサーが発展した。電気化学バイオセンサーの歴史はむしろ上記の直接的な手法よりも古く、1962 年にまで遡る。Clark らは、酸素選択性電極とグルコースオキシダーゼの組み合わせを用いてグルコースの測定を行った [21]。これがバイオセンサーの始まりだと言われており、こうした酵素センサーにとどまらず、抗体・受容体・アプタマーなどを用いたバイオセンサー (affinity sensor) へと、電気化学バイオセンサーが広がっていく [22, 23]。

このように電気化学バイオセンシングは 1960 年代から今日に至るまで発展を見せてきたが、課題は残っている。最も大きな課題として考えられるのが、電極の安定性である。生体試料はおしなべてタンパク質や細胞が含まれており、こうした大きな分子が電極上に吸着することで、電極感度が低下する。得られるシグナルには多くの場合ドリフトが生じ、測定が短時間に限定されてしまう。電気化学バイオセンシングとして最も広まったグルコースセンサーは 1 週間程度の測定が可能となったものの [24]、このような例は他にないと言って過言ではなく、多くの場合長くても数時間程度の生体内連続測定が限界となっている [25]。

一般的に用いられている主な電極には、白金、金、グラッシーカーボンなどがある。直接的な電気化学バイオセンシングの場合、これら電極はどれもタンパク質の吸着などの影響により、致命的な感度低下を生じることが経験的に知られている。この、とても単純ではあるもののセンシングにとっては致命的な問題が、直接的なバイオセンシングが主に FSCV のみに限定されている原因と筆者は考えている。生体試料においてもタンパク質などの吸着が少なく、安定した応答を示す電極材料が求められる。

一方、酵素やターゲット認識分子の修飾を必要とするバイオセンサーの場合には、電極表面における修飾の安定性が鍵となる。金-チオールの特異的な結合を利用し、DNA アプタマーを制御して金表面に修飾したアプタマーセンサーは、本研究で目指している生体内バイオセンシングを達成しうる技術の一つであるが、4 時間ほどの測定に限定されている [26]。これには、金-チオール結合の安定性 [27] も影響していると筆者は推測している。もちろん、DNA アプタマー自体がタンパク質などと相互作用したり、酵素による分解を受けたりする影響もあるだろうが、酸化による金-チオール結合の不安定化も原因のひとつとなっているだろう。DNA アプタマーなどの分子修飾をより強い結合、例えば炭素-炭素結合などで達成できれば、より安定性の高いセンサーが実現できるはずだ。そうした修飾が可能な表面を持つ電極材料が求められる。

このように、電気化学バイオセンシングにあたっては、電極自体の安定性が課題と言える。具体的には、

- 直接的な生体関連物質の電気化学測定において、タンパク質などの吸着が少ない電極表面
- 酵素やターゲット認識分子を修飾した電気化学バイオセンサーにおいて、安定した修飾を達成できる電極表面

を持つ電極材料が求められる。本研究では、そうした電極材料として期待されるダイヤモンド電極に注目する。これまで一般的な電極を用いて様々なアイデアで電気化学バイオセンシングに関する研究がなされてきたが、ダイヤモンド電極の歴史はまだ浅く、電気化学バイオセンシングへの応用はそうしたバイオセンシング一般の技術に大きく遅れをとっている。物理的・化学的に安定した表面をもつダイヤモンド電極においても同様の技術が応用できれば、他電極を凌駕する性能が引き出されるはずであり、ダイヤモンド電極を基盤としたバイオセンシングシステムの開発は、安定した生体内バイオセンシングを達成するために急務だと考える。

次節では、ダイヤモンド電極の歴史から電気化学バイオセンシングへの応用までを俯瞰し、その課題を挙げる。

### 1.3 ダイヤモンド電極

ダイヤモンド電極とは、金属様の電子伝導性を持つダイヤモンドのことである。ダイヤモンド合成時に、炭素に対してホウ素を 1 % 程度と高濃度にドーピングすることで得られる。ダイヤモンド電極はダイヤモンドに由来する物理的・化学的安定性を持つだけでなく、水に対する電位窓が広いことや、その電位窓領域内でのバックグラウンド電流が小さいことから、安定かつ高感度な測定を可能とする。また、生体の主要構成元素である炭素で構成されていることから生体適合性も高く、高感度かつ安定なバイオセンシングのための新たな電極材料として発展してきた。

本節では、ダイヤモンド電極の歴史と特徴を俯瞰したのち、バイオセンシングに用いる電極としての優位性を述べる。それを踏まえ、ダイヤモンド電極によるバイオセンシングにおける課題を測定手法と電極作製の観点から述べ、そこから導かれた本論文の目的を明記する。

#### 1.3.1 電極材料としてのダイヤモンド

特に情報通信技術の発展が目覚ましい近年では、広いバンドギャップ、高い降伏電圧、高い熱伝導性、小さい比誘電率、そして高い放射線に対する耐久性から、ダイヤモンドの電子デバイス応用などへの期待が高まっている。具体的には、不純物として主にホウ素やリンをドーピングし、半導体材料としてのダイヤモンドの応用が期待されている。一方、ホウ素のドーピング率を半導体からさらに増やしていくことで、このホウ素ドーピングダイヤモンド (boron-doped diamond, BDD) は金属的な電気伝導性を示すようになる (Figure 1.3)。電気伝導性が半導体から金属的になるホウ素のドーピング率はおよそ  $4.0 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ 、ホウ素-炭素原子数比で約 0.2 % である [28]。本研究ではこの高濃度 BDD の電極材料としての応用に着目し、BDD を用いた電気化学測定に取り組んだ。

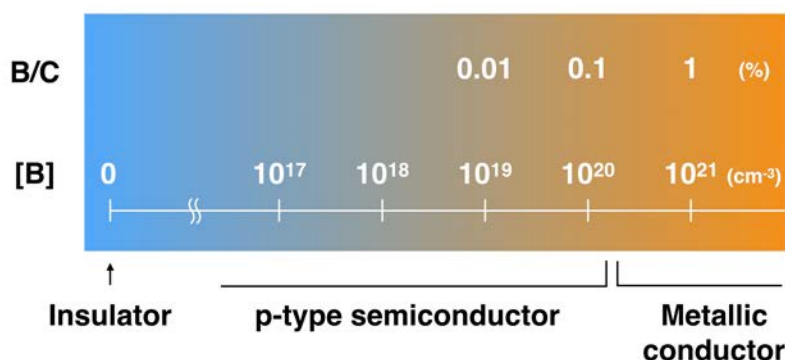


Figure 1.3 The relationship between boron-concentration and electrical characteristics of BDD.

ダイヤモンドの合成法は大きく分けて 2 種類ある。高温高压法と化学気相成長法である。まずはじめに考案されたのが高温高压法である。この方法はダイヤモンドが地球の地下深く、高温高压下で合成される自然界の仕組みを真似たもので、金属触媒とともに炭素を 2000 K 以上、10,000 気圧の条件に置くことでダイヤモンドの結晶を成長させる。高温高压法で合成されるダイヤモンドは mm から cm オーダーの大きさの単結晶であり形状が限定されていることから、その応用は限定される。一方で化学気相成長法は、数十 cm の大きさまでの基板上にダイヤモンド膜を合成することが可能であり、応用



の幅を広げる。現在、電子デバイスや本研究で扱う電極への応用における主流はこの化学気相成長法である。

ダイヤモンド合成のための化学気相成長法 (CVD 法) の始まりは 1960 年代初頭である。減圧下において炭素を含むガスを熱で分解することにより、900 °C に加熱されたナチュラルダイヤモンド上にダイヤモンドを成長させる方法が報告された [29, 30]。その方法ではグラファイト成分の成長も同時に生じるため、得られるダイヤモンドの純度は低かった。しかし 1960 年代後半になると Angus らが、水素原子の存在によりグラファイトの選択的なエッチングが進み、高純度のダイヤモンドが合成できることを報告した [31, 32]。1970 年代後半になると、ロシアのグループらによってダイヤモンド以外の表面上にも CVD 法を用いてダイヤモンドの合成が可能であることが明らかになった [30, 33]。そして 1982 年、日本の無機材質研究所 (National Institute for Research in Inorganic Materials, NIRIM) が上記の CVD 法を統合し、ダイヤモンド合成のための熱フィラメント反応炉を開発した [34]。同グループは続けて、マイクロ波プラズマ反応炉によるダイヤモンドの CVD 法による合成手法を確立した [35, 36]。この方法では熱フィラメントで問題であったフィラメントの加熱による金属の混入が起こらないため、高純度なダイヤモンド合成が必要となる電子デバイスなどへの応用において主流となっていった。

様々な反応炉がデザインされてきたがどの手法にも共通しているのは、含カーボン前駆体ガスを活性化させる必要があるということである。逆に言えば、すべてこの点において共通しているため CVD 法としてひとくりに分類される。現在に用いられている CVD 反応炉は主に 4 種類に分類される。[37]。熱フィラメント CVD 法では、2000 °C 以上に熱したフィラメントを基板の数 mm 上に設置し、そこにガスを流し込む。マイクロ波プラズマ CVD (microwave plasma CVD, MPCVD) では前駆体ガスの活性化にマイクロ波を用いて基板の上にプラズマを起こす。製膜チャンバーに対するマイクロ波の照射方法によって、チャンバー真横からマイクロ波を照射する NIRIM 型と、真上から照射する ASTeX 型に分類される。熱フィラメント CVD および MPCVD は減圧下で製膜が行われるためその製膜速度が 10  $\mu\text{m h}^{-1}$  程度に制限されてしまうのに対して、1980 年代後半に発表されたプラズマジェット、アークジェット、あるいはプラズマトーチ法は、反応ガスを高圧で導入するため 100  $\mu\text{m h}^{-1}$  以上、時には 900  $\mu\text{m h}^{-1}$  以上の製膜速度を与える。しかしながら、製膜速度の向上と引き換えにして製膜面積が 1  $\text{cm}^2$  程度に限定されてしまう。

上記の他にも、combustion flame CVD, lase-assisted CVD, pulsed laser deposition, あるいは hydrothermal growth, 液中プラズマ CVD など様々な手法が存在するが、製膜速度、製膜面積、および純度の観点で MPCVD 法がダイヤモンド薄膜合成の主流となっている。BDD の合成においても同様な理由で主に MPCVD 法が用いられる。BDD を合成するには反応ガスにホウ素源を加え、チャンバーに導入されるガス中のホウ素濃度によりホウ素ドーパ率をコントロールすることができる。ホウ素源として最も扱いが容易なものは気体のトリメチルホウ素が用いられるが高価なため、メタノールやアセトンに酸化ホウ素やトリメトキシボランを溶解し、水素ガスによるバブリングを行うことでこれらのガスをチャンバー中に導入する方法が用いられる。本研究においても、この液体の炭素・ホウ素源を用いた MPCVD 法による BDD 薄膜の合成を行っている。

以上のように、1990 年代までにダイヤモンドの人工合成に関する研究が発展し、同時にダイヤモンドの物性の制御とその応用も研究が進んだ。その中の 1 分野が電気化学である。ダイヤモンドの電気化学に関する研究は 1983 年の岩木らにより始まった [38]。彼らは窒素、アルゴン、亜鉛などのダイヤモンドへのイオン注入による電気化学特性の評価を行った。しかしながらイオン注入によりダイヤモンド表面はダメージを受け、電気伝導性の変化はその効果によるものと思われる。この方法によるダイアモン

ドの電極としての応用研究はその後続くことがなかった。研究が進んだのは半導体的なダイヤモンドを用いた光電気化学への応用である。1987年にロシアの Pleskov らによる基礎的な評価が行われた [39]。1990年代に入ると、本格的にダイヤモンドの電気化学に関する研究が始まる。1993年に藤嶋らのグループが硝酸イオンの還元によるアンモニアの生成を発表した後 [40]、Swain らが同年にホウ素ドーパダイヤモンド電極を用いた電気化学測定への応用の可能性を報告した [41]。Swain らにより BDD 電極の小さなバックグラウンド電流および電極の安定性が示されて以降 20 年余りにわたって、広い電位窓、ヒドロキシラジカルやオゾンなど高化学活性種の特異的生成能力、生体内物質の吸着への耐性、表面終端の電気化学測定に与える影響など、様々な特徴が報告されそのメカニズムに関する研究がなされると同時に、そうした特徴を生かした測定、分析、污水浄化、化合物合成など多方面への応用研究に発展した [42-47]。

BDD の高い物理的・化学的な安定性はダイヤモンドに由来する。この特徴は数日、数ヶ月、あるいは数年という単位の長期的な測定・分析においては非常に重要な条件となる。製膜されたままの BDD 表面は水素で覆われた表面になっている。この水素終端 BDD は他の電極に比べて広い電位窓を示す。これは水中に存在するプロトンやヒドロニウムイオンなどあらゆるイオン種の BDD 表面への吸着が弱く、活性でないことが影響していると考えられている [48]。このことから、BDD 電極を用いることで他の電極では測定が困難な物質の測定が可能となる。そうした表面における反応性が低いことに加えて、電気二重層容量が数  $\mu\text{F cm}^{-2}$  ほどと小さいため [49]、サイクリックボルタメトリーなどの電位走査測定におけるバックグラウンド電流が小さく高感度な測定が可能になる。

製膜されたままの BDD は水素終端化していると先ほど述べたが、その終端は酸化処理を施すことにより酸素終端化させられる。表面酸化の方法には酸素プラズマ、加熱、酸、紫外線照射、オゾン酸化、また陽極酸化などによる処理がある。水素終端 BDD (H-BDD) から酸素終端 BDD (O-BDD) への変換により、高濃度ホウ素ドーパダイヤモンドの場合は、表面の電気伝導性は大きくは変化しないものの ( $\sim 10^{-3} \Omega \text{ cm}$  程度)、電気化学的な性質が変化する。[50] では、フェロシアン化カリウムおよび過塩素酸鉄水溶液中における H-BDD および O-BDD のサイクリックボルタモグラムの比較が行われた。フェロシアン化カリウムは酸素終端化したことにより電子移動速度の低下により酸化還元ピークセパレーションの広がり観測された一方、過塩素酸鉄ではそれとは逆の傾向となり、酸素終端化したことによりピークセパレーションが狭まった。これは静電相互作用による効果と考えられている。ダイヤモンドの結晶表面は原子が配向しているが、その表面終端が酸素に置き換わることにより、酸素表面官能基が配向することになる。このように配向した酸素官能基からなる O-BDD 表面は、酸素原子の電気陰性度を考慮すると、負に分極した表面になっていると考えられる。一方、反応分子を見るとフェロシアン化カリウムは負に、過塩素酸鉄は正に荷電したイオンである。したがって、負に分極した表面とそれらイオンの電荷との間には静電相互作用 (双極子-イオン相互作用) が生じる。この静電相互作用の効果によって、電極表面から反発力を受けやすいフェロシアン化カリウムでは電子移動速度の低下が、また、電極表面への引力を受けやすい過塩素酸鉄では電子移動速度の増加が見られたのだと考えられる。それら可逆・準可逆な redox 種に加え、ドーパミンやアスコルビン酸 [51, 52]、シュウ酸 [53]、あるいはアデノシンリン酸 [54] などの不可逆な酸化反応により電気活性を示す生体内分子についても同様の現象が確認されており、静電相互作用の効果をサポートしている。特に論文 [51, 52] では、O-BDD におけるドーパミンとアスコルビン酸のピークセパレーションの広がり方が異なることを利用して、生体内に広く高濃度で存在するアスコルビン酸共存下におけるアスコルビン酸の選択的な測定を可能とした。なお、O-BDD 表面の官能基を特定する研究もなされている [55, 56]。カルボニル基と DNPH

(2,4-dinitrophenylhydrazine), ヒドロキシル基と APTES (3-aminopropyl)triethoxysilan) の特異的な反応を利用することで, 表面に存在するカルボニル基やヒドロキシル基の存在を定性的に評価した. 表面に主に存在する官能基はカルボニル基, ヒドロキシル基, そしてエステルであり, それらの割合は表面酸化の手法に依存することがわかる. なお, カルボキシル基の存在は少ないと見られている.

以上のように, BDD の表面は水素終端から酸素終端へと変化させることが可能であり, 酸素終端表面と分子の間の静電相互作用により分子に応じて様々な電気化学的挙動を与えうる. この効果により, 電気化学測定 of 弱点である選択性を付与することが可能となる場合がある. また, 表面官能基の同定という目的で用いられた方法であるが, そうした表面官能基と DNPH や APTES といった分子との特異的な反応を積極的に活用することで, さらに表面変換が可能である [57, 58]. これらのことから, BDD 表面の終端の変換は BDD 電極の応用の幅を広げる可能性を持っており, この点も BDD の電極としての特徴と言える.

### 1.3.2 ダイヤモンド電極によるバイオセンシング

上記特徴の他にも BDD 電極は多くの特徴をもつ. BDD は炭素をベースにした材料であるため, 高い生体適合性をもつ [59, 60]. また前章でも述べたが, BDD の表面は物質を吸着しにくい. 生体内にはタンパク質に代表されるようにあらゆる物質表面へ吸着しやすい高分子が存在するが, BDD は生体内物質に対しても吸着しにくい表面をもつため [61], 生体内における安定した測定への展開が期待できる. このように, 高い生体適合性と吸着しにくい表面を有する BDD 電極は, バイオセンシングに適した電極材料であると言える.

BDD 電極を用いたバイオセンシングは, BDD 電極研究の開始当初から行われてきた. まずはじめに, *in vitro* における種々の生体関連物質の BDD 電極上での電気化学特性が多く研究された. ドーパミン, アスコルビン酸, アミノ酸, DNA などに始まり, 数多くの生体関連物質の測定が行われてきた [62-66].

上記のように, 電気化学的に活性な分子の直接的な測定と並行して, 電気化学的に反応しない分子にも適用可能な測定手法の開発も行われてきた. その場合, 酵素やアプタマー, 抗体などターゲット認識分子の BDD 電極への修飾が必要となる.

例えば当研究グループは, インフルエンザウイルス特異的に吸着するペプチドを BDD 電極に固定化することで, インフルエンザウイルスの高感度測定を達成した [67]. 他には, DNA の固定化とそれを利用した DNA 測定が報告されてきた. しかし, [68] では DNA の固定化の基板としてのみ BDD 電極が用いられ, DNA の測定は電気化学的に行われていない. 一方, [69] 同様に DNA の固定化を BDD 電極上に行い, インピーダンス測定を用いることで相補 DNA の検出を達成している. また, BDD 電極を用いた酵素センサーの評価も行われてきた. 例えば, [70] ではグルコースオキシダーゼを固定化したグルコースの測定を報告した. グルコースオキシダーゼの  $-0.4\text{ V vs. Ag/AgCl}$  における酸化還元反応がグルコースの量に逆比例することを利用したセンシングが行われた. しかしながら, 一般的な酵素センサーに対する優位点はなく, その後の研究に発展が見られていない.

このように, いずれのバイオセンサー的な手法もサンプリングや試薬添加などの処理工程が必要であり, *in situ* でリアルタイムに測定可能な手法は達成されていない.

同時に, 以上のような測定を *in vivo* 測定に応用すべく, 微小な針状の BDD センサーが開発された. ダイヤモンドの加工上の問題からフォトリソグラフィーなどによるトップダウン式の作製手法の適用が

難しく、針状基材に BDD を成膜し、最後に電極面積を規定するための絶縁処理を施す、といったボトムアップ式の作製手法が主に用いられてきた。以下、その絶縁方法によって分類しながら BDD 針状微小電極の作製手法をまとめる [71]。

最初の BDD マイクロ電極に関する報告は 1998 年に Cooper らによってなされた [72] (Figure 1.4a)。先端を引いたガラスキャピラリーの中に BDD を製膜したタングステン針を入れ、エポキシ樹脂で封入する。その後、注意しながら先端をフッ化水素に漬けて先端のガラスを溶かし電極を露出させる方法である。似た方法は Sarada らによっても報告されているが、こちらの例では電極露出の際に研磨器による研磨が用いられている [73]。その他、フォトレジスト [74] (Figure 1.4b)、nail varnish (マニキュア)、エポキシ樹脂、electrophoretic paint (電気塗装) [75, 76] (Figure 1.4c)、そしてパリレン [77, 78] (Figure 1.4d) を用いた絶縁方法が報告されてきた。なお電気塗装による絶縁法ではピンホールが空いてしまい、耐久性に問題があることが報告されている [75]。

上記で見たきたように電極をすべて覆ったあとで露出させる方法の他に、あらかじめ任意の長さの電極が露出するように加工された絶縁材を用いる方法も提案された。ガラスキャピラリーをカットしたうえで電極本体を入れ、そこにエポキシ樹脂を流し入れる方法である [52, 79] (Figure 1.4e)。また 2003 年に Cvačka らは、それ以前のガラスキャピラリーによる絶縁ではなく、ポリプロピレン (融点約 130–170 度) を熱で溶かすことで BDD 表面を覆った [80] (Figure 1.4f)。

以上まではすべて、BDD 製膜後に絶縁が行われていたが、製膜前に製膜面を規定しておく方法も考案された。CVD 法における熱にも耐えられるよう石英キャピラリーが用いられ、あらかじめタングステン線封入済みの石英キャピラリーの先端を研磨し製膜面積を規定したうえで、石英キャピラリーごと CVD 装置に入れて製膜をすることで、電極面積が制御された BDD マイクロ電極が作製された [81] (Figure 1.4g)。

これまでに上記のような方法が報告されてきたが、それらには問題がある。まずエポキシ樹脂による絶縁は、数年前より当研究室内でその耐久性が問題点として挙がっていた。特に BDD 電極を用いる際は、表面の終端変換や吸着物による低下した感度の回復のための電極処理として高電圧印加処理が有用であるが、その際に発生する気泡により物理的にエポキシ樹脂が剥離してしまう問題があった。また、高電圧印加に対するエポキシ樹脂そのものの耐久性にも不安は拭き切れない。

こうした問題はパリレン、フォトレジスト、ポリプロピレン、マニキュアといった高分子ポリマー系の物質による絶縁方法全般について言えることである。パリレンおよびフォトレジストを用いた方法は処理工程が多いことや高価な大型装置が必要になることもまたデメリットといえる。ポリプロピレンを用いた方法は Figure 1.4f を見れば明らかのように、電極先端全体を針状にすることが困難である。

BDD 針状微小電極の絶縁方法には、より強固かつ容易な絶縁手法を用いることが重要だといえる。特に BDD 電極のもつ高い化学的・物理的な耐久性を活かすためには、絶縁材の安定性が重要となる。絶縁材の有力な候補は、古くから用いられているガラスキャピラリーである。無機材料のガラスは多くのポリマーよりも固いため、電極表面との間で強固な密着を維持できるはずである。また多くの電気生理学実験でガラスキャピラリーが用いられることから分かる通り、生体適合性も十分であり、生体内測定における問題点もないと言えるだろう。本研究では、測定手法の開発と並行して、in vivo バイオセンシングに必要な電極形状である BDD 針状微小電極の開発にも取り組んだ。

以上、ダイヤモンド電極の歴史からはじまり、主に電気化学バイオセンシングへの応用に注目して研究の流れを俯瞰してきた。ダイヤモンド電極は高感度測定を可能とし、安定性や生体適合性などを持ち合わせるため電気化学バイオセンシングの電極材料として有用である。しかしながら、ダイヤモンド電極を用いたバイオセンシング向けのセンサーが研究の分野においても一般にも普及していないことから

も分かるように、研究はまだ発展途上であると言える。ダイヤモンド電極によるバイオセンシング、特に in vivo バイオセンシングにおける現状の課題をまとめると以下の 2 点になる。

- 血液などの複雑系における連続的かつ選択的な測定、特に電気化学的に不活性な分子の測定
- in vivo における局所測定を可能とする BDD 針状微小電極の作製手法、特に BDD 電極の耐久性を妨害しない絶縁手法

## 1.4 本論文の目的および構成

本論文では、バイオセンシングの中でも、生体内にてその場でリアルタイムかつ連続的に生体関連物質の量を測定することのできるセンシング技術の開発を目的とする。それに適した技術の一つである電気化学に着目した。特に、電極自体の物理的・化学的な安定性と生体適合性を兼ね備え、水溶液系における電位窓が広く高感度測定を可能とするダイヤモンド電極を基盤とし、ターゲット選択的な測定手法と、生体内測定を可能とする針状微小電極作製技術の開発を行った。

第 2 章では、ダイヤモンド電極の作製と評価について述べた。特に、ダイヤモンド針状微小電極の新たな作製手法として、ガラスキャピラリーのみを用いた絶縁手法の開発を行った。その結果、長時間の高電圧印加にも耐えうる針状微小電極の作製に成功した。

第 3 章では、ペプチドホルモン、オキシトシンの選択的かつ連続的な測定手法の開発を目指した。オキシトシンは、構造中のフェノールの酸化に由来する酸化シグナルを  $+0.7\text{ V vs. Ag/AgCl}$  に与えることがわかった。オキシトシンと酷似した構造を持つバソプレシンも同様のシグナルを与えたものの、陽極酸化処理を施したダイヤモンド電極を用いることで両者の酸化電位に明瞭な違いが生じることが明らかになった。陽極酸化したダイヤモンド針状微小電極を用いることで、オキシトシンとバソプレシンの選択的かつ連続的な測定を達成した。

続いて、電気化学的に反応し得ない分子にも適用可能な測定を目指し、電気化学アプタマーセンサーの開発を第 4 章にて行った。ダイヤモンド表面への DNA の吸着現象を利用し、電極表面に吸着した DNA アプタマーがセンサーとして動作することを見出した。アプタマーの吸着は、繰り返しの測定および超音波洗浄にも耐えうる安定性を持つことがわかった。白金およびグラッシーカーボン電極においても DNA アプタマーの吸着現象は見られたが、それら電極はセンサーとしての機能は見せなかった。したがって、再現良いセンサーとしての挙動は、ダイヤモンドと DNA アプタマーの組み合わせに特有な現象であると言える。

第 5 章では、針状微小電極の新たな作製手法として、ダイヤモンドのみが露出した“オールダイヤモンド”小電極の開発を行った。クロムめっきの技術を応用して針状電極の先端のみにクロムを電着させ、マスクとして用いた。続く絶縁性ダイヤモンドの成膜、およびマスクの除去の手順を踏むことで、絶縁性ダイヤモンドで面積が規定されたダイヤモンド針状微小電極の作製に成功した。この手法は、どの工程も自動化可能であるため、ダイヤモンド微小電極の製造に適した手法と言える。

第 6 章に、本研究の成果を要約し、本研究で扱った課題に対する今後の展望を考察した。

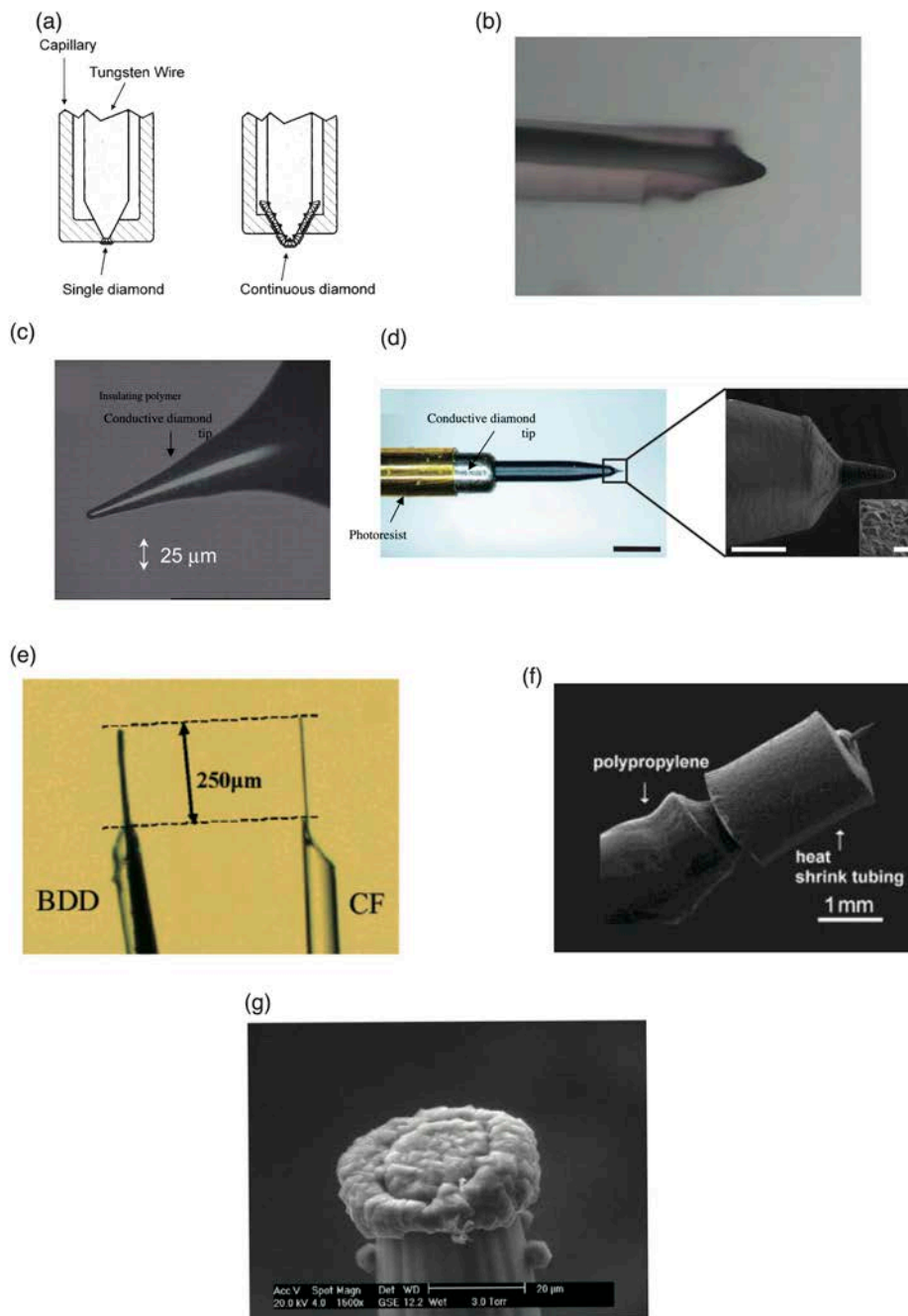


Figure 1.4 Examples of BDD needle-shape microelectrodes made by other groups. Each examples correspond to the references as follows: (a) [72], (b) [74], (c) [75], (d) [77], (e) [52], (f) [80], (g) [81].

[72] Adapted with permission. Copyright (1998) American Chemical Society. [74, 81] Reprinted with permission from Elsevier. [75] Republished with permission. Permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc. [52, 80] Reprinted with permission. Copyright 2003, 2007 American Chemical Society.

## 第 2 章

# ダイヤモンド電極の作製と評価

本章では、本論文で使用したダイヤモンド電極の作製方法および評価方法について述べる。使用したダイヤモンド電極の形状は平板と針状の 2 種類である。

### 2.1 平板電極

まずは、平板型のダイヤモンド電極の作製と評価について説明する。後半で紹介する針状微小電極は作製と取扱いに時間・手間を要するため、基礎的な電気化学実験はこの平板電極で行った。

#### 2.1.1 マイクロ波プラズマ化学気相成長法

ダイヤモンドの成膜は、単結晶シリコン基板 (直径 50 mm, 厚さ 750  $\mu\text{m}$ , 抵抗率 5-10  $\text{m}\Omega\ \text{cm}$ , 片面鏡面処理) 上に行った。まず、基板に対して核付け処理を行った。ダイヤモンドパウダー (0-1  $\mu\text{m}$ , Lot# 603064, Kemet, UK) を研磨パッド (H1000, Nitta Haas Inc., Japan) 上にまぶし、その上でシリコン基板の鏡面側を 3 分間程度研磨した。その後、エタノール中で 10 分間超音波洗浄を行い、窒素ブローでエタノールを吹き飛ばして基板の前処理とした。この前処理をして数時間以内に続くダイヤモンド成膜を行った。

ダイヤモンドの成膜にはマイクロ波プラズマ化学気相成長法 (MPCVD) を用いた。主に使用した MPCVD 装置は、ASTeX 社製の AX2520M である。使用したガスラインの概略を Figure 2.1 に示す。炭素源にはトリメトキシボランとアセトンの混合液を用い、水素をキャリアガスとしてチャンバーに導入した。不純物ホウ素の濃度は、上記混合液の調整により制御した。本論文で使用したダイヤモンド電極は、チャンバーに導入される気相中での仕込みホウ素/炭素比を 1% に固定して行った。炭素源の導入量は、上記バブラーの圧力をニードルバルブで変化させることにより制御した (詳細は付録 A を参照)。一方、別のガスラインから水素を導入することで、炭素/水素比ができる。成膜時の主な条件は、チャンバー内圧力 105-115 Torr, 水素流量 530 sccm, 水素キャリアガス流量 1.5 sccm, 炭素源圧力 33 kPa, 基板温度 950-1100 度, 成膜時間 2-6 h であった。

#### 2.1.2 評価

成膜後のダイヤモンド電極表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を Figure 2.2 に示す。数  $\mu\text{m}$  程度の結晶から構成された多結晶体構造であることがわかる。Figure 2.3 には、Raman スペクトルを示した。1332  $\text{cm}^{-1}$  のダイヤモンドの zone-center optical phonon に帰属されるピーク、および 500  $\text{cm}^{-1}$  と

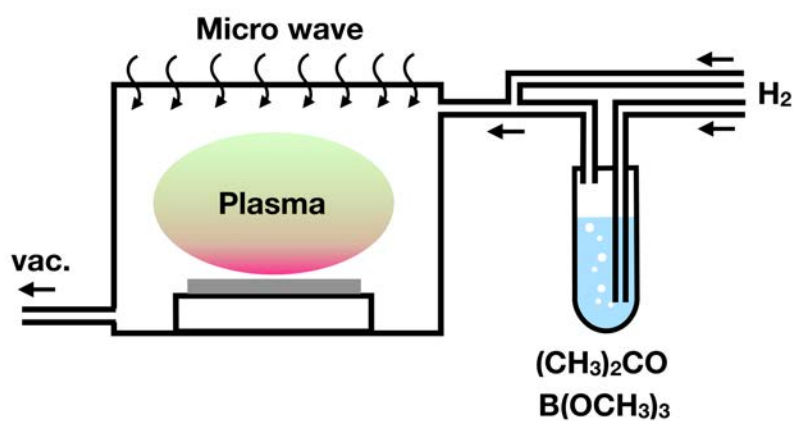


Figure 2.1 An illustration of CVD system used in this research.

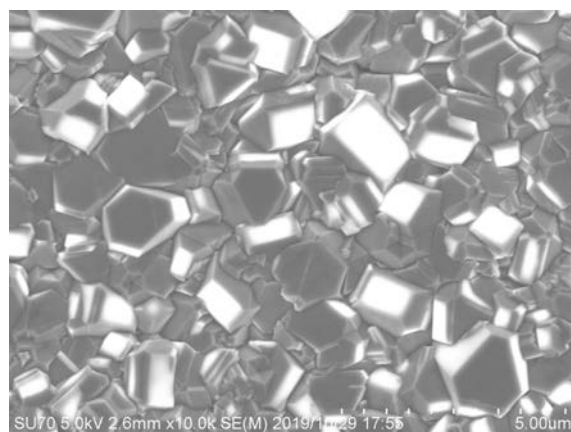


Figure 2.2 Scanning electron micrograph of a diamond electrode. (SU-70, HITACHI)

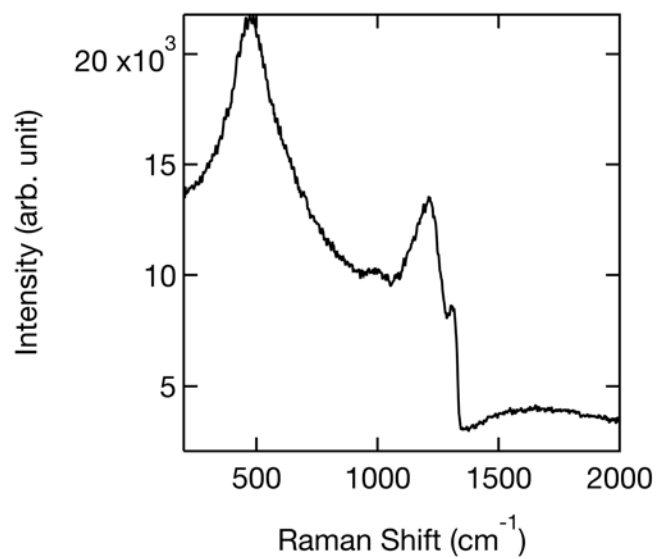


Figure 2.3 Raman spectrum of diamond electrode. (Acton SP2500, Princeton Instruments, USA, excitation wavelength: 532 nm. Same condition for Raman spectroscopy in the present work. )



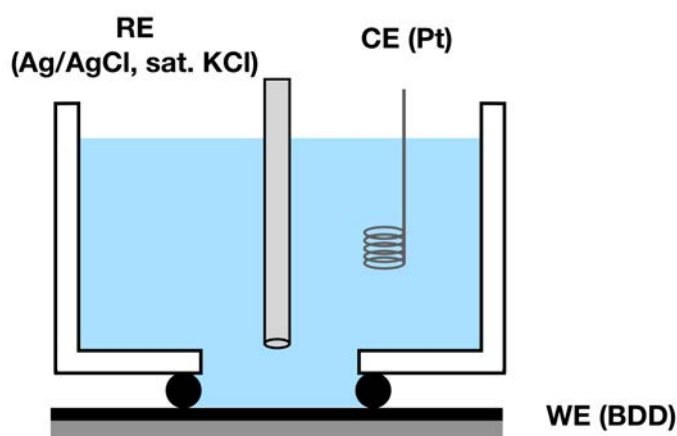


Figure 2.4 An illustration of the electrochemical cell used in the present work.

1200  $\text{cm}^{-1}$  に見られる高ホウ素濃度ダイヤモンドに特徴的なバンドが見られたことから、BDD の合成を確認した [82, 83]. なお、1590  $\text{cm}^{-1}$  に現れるグラファイト由来のシグナルが見られないことから、純度の高い BDD が合成できたことがわかる. なお、Raman スペクトルから推定したホウ素濃度は 0.5 % 以上で (B), 金属的な電子伝導性を持ち始めると言われている 0.2 % よりも大きい.

続いて、BDD の電気化学特性の評価を行った. 測定に用いた電気化学セルの模式図を Figure 2.4 に示した. 容量 1 mL の 3 電極式の 1 室型セルで、作用極 (WE) となる BDD 電極は O-リング (JIS P-7 規格, 露出電極面積 0.363  $\text{cm}^2$ , バイトン製) で固定されている. 参照極 (RE) には Ag/AgCl (飽和 KCl), 対極 (CE) には白金線を用いた. セル溶液の参照極内部液へのコンタミネーションを防ぐため、KCl を含んだ寒天で満たされたテフロン製チューブを塩橋として用い、RE はその塩橋を介してセルと電気的に導通を取った. なお対極に関して、特に陰極還元する際に白金が溶け出して作用極に白金が電着する現象が見られたため、 $\pm 3$  V 以上を印加するなど大電流を流す際には対極に BDD を用いた. なお、BDD への導通はワニ口クリップで BDD を直接つかむことで行った (付録 C).

Figure 2.5 は、0.1 M  $\text{HClO}_4$  水溶液中における BDD 電極のサイクリックボルタメトリー (CV) の結果である (窒素による溶存酸素の脱気などは特に行っていない). スキャンは 0 V から開始し、約  $\pm 300 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  に達したところでスキャンを折り返す設定にて測定を行った. この条件を電位窓とすると、BDD 電極は約 2.5 V と広い電位窓を持つことがわかる. また、電位窓領域におけるバックグラウンド電流を見ると、電極由来の酸化還元電流は極めて小さい. 実際に、0–+0.5 V での電流値から電気二重層容量を概算すると  $10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  であり、一般的な金属 ( $10\text{--}40 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) [11] と比較して小さいことがわかる. なお、この値は報告されている BDD の電気二重層容量  $3\text{--}7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  [41] と同程度である.

なお本論文においては、リニアスキャンの CV と階段状ステップの CV は特に区別せず CV と表記する. 両者が与えるシグナルに大きな違いはないためである [84, 85]. ただ、吸着種の反応など、1 ms 以下の短時間の電流推移が重要になる系においては、リニアスキャンの CV 測定を行うように注意した. 表 2.1 に本論文で使用したポテンシostatについて、測定可能な CV の種類をまとめた. PC によるデータ入出力の簡便さから、低価格・コンパクトタイプのポテンシostatでは階段状ステップの CV 測定しか行えないものが多い. ポテンシostatは研究室共用のものなので、表に示した複数のポテンシostatを使用せざるを得ない状況であった. CV 測定がリニアスキャンか階段状ステップか明確にするため、使用したポテンシostat、および CV 測定がどちらの種類か図のキャプション中に明記するように統一した.

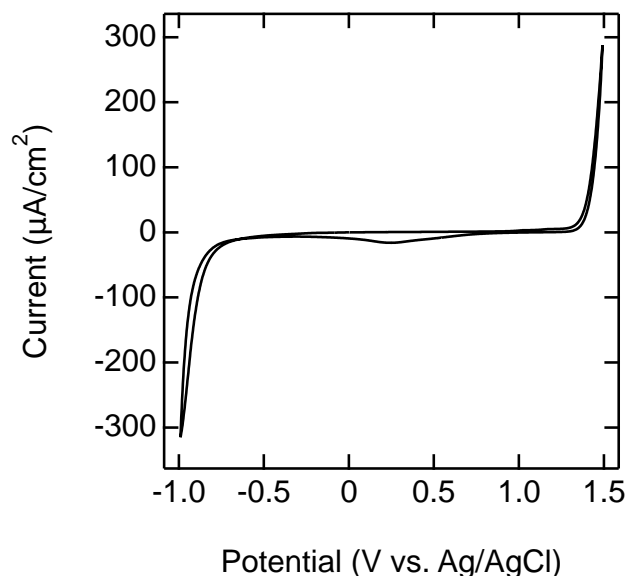


Figure 2.5 Cyclic voltammogram of BDD plate electrode in 0.1 M  $\text{HClO}_4$ . CV staircase, scan rate 0.1 V/s, by PGSTAT204.

Table 2.1 Major potentiostats used in the present work and their type of CV measurement. Current range was also added.

Potentiostat	Type of CV	Current range
PGSTAT204, Metrohm Autolab	Staircase	10nA–100mA
EmStat3+, PalmSens	Staircase	1nA–100mA
ALS852Cs, CH Instruments	Linear	1pA–1mA

続いて、一般的に可逆な電子移動を示すフェロシアン化カリウム水溶液 (1 mM) 中での CV 測定を行い、BDD 電極の可逆性の評価を行った (Figure 2.6). 走査速度を 2–1000 mV/s と変化させたところ、ピーク間電位差 ( $\Delta E_p$ ) に変化が見られた (Table 2.2). 本実験では酸化還元電位と折り返し電位の差が 0.4 V 以上あるが、このような場合は可逆反応系におけるピーク間電位差の理論値は 57 mV となる。したがって、おおよそ 20 mV/s 以下の走査速度において可逆に近い電子移動が得られていることがわかる。ここで、次式を用いる Nicholson 法により電子移動定数 ( $k_0$ ) の推定を行う。

$$\psi = \frac{k_0}{\sqrt{\frac{\pi D F v}{RT}}} \quad (2.1)$$

$\psi$  は  $\Delta E_p$  に依存して決まる無次元量であり、例えば  $\Delta E_p = 121$  mV のときは  $\psi = 0.35$  をとる。本実験において 1000 mV/s の  $\Delta E_p$  は同程度の値をとったためこの  $\psi$  の値を用いると、 $k_0 = 0.01$  cm/s と見積もられる。なお、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  の拡散係数には  $0.667 \times 10^{-5}$  cm s<sup>-1</sup> [86] を用いた。BDD における  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  系の  $k_0$  は 0.01–0.1 cm/s 程度が報告されており [87]、同様の挙動が観測されたと言える。白金などの金属電極が示す 1 cm/s オーダー以上の電子移動速度定数よりも 10–100 倍程度低い値を持つが、これは BDD の低いキャリア密度 ( $10^{20}$ /cm<sup>3</sup>) のためだと考えられている [88–94].

一方、上記のように CV 測定におけるピーク電位を用いて、反応の可逆性の評価を行う場合には、溶

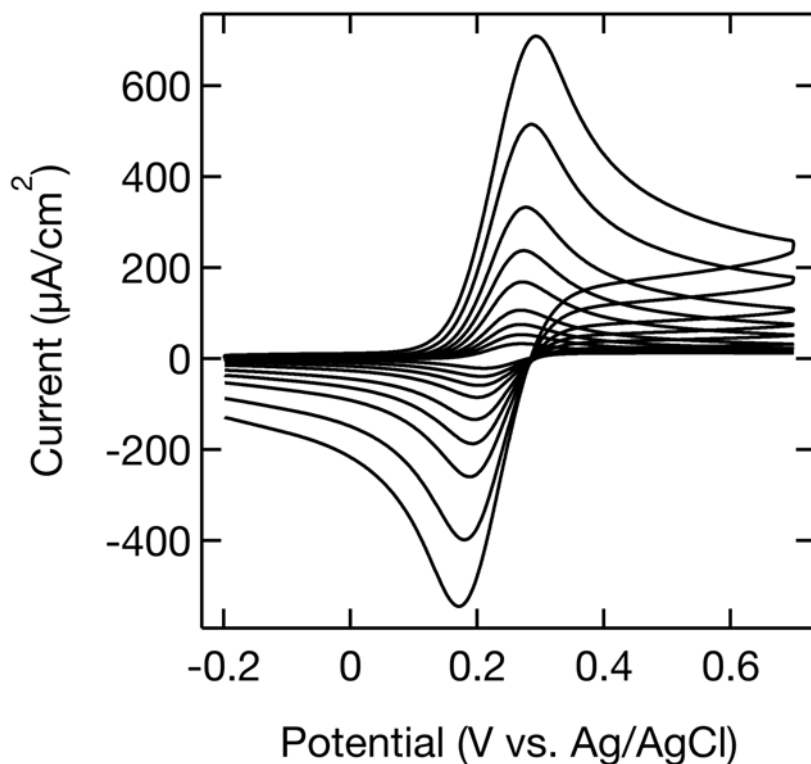


Figure 2.6 Cyclic voltammogram of BDD electrode in 1 mM potassium ferrocyanide of 0.1 M KCl solution. CV linear scan, scan rate ( $v$ ) 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 mV/s, by ALS852Cs.

Table 2.2 Peak separations ( $\Delta E_p$ ) in Figure 2.6.

$v / \text{mVs}^{-1}$	$\Delta E_p / \text{mV}$
1000	122
500	107
200	89
100	81
50	75
20	68
10	61
5	64
2	58

液抵抗による電圧降下に注意しなければならない。別の実験により、用いているセルの溶液抵抗は 10  $\Omega$  程度であることがわかっている。本実験で観測されている最大の電流値 248  $\mu\text{A}$  (1000 mV/s の場合のピーク電流値, Figure 2.6 では電流密度に直してあることに注意のこと) の測定時には、したがって、2.5 mV ほどの電圧降下が生じていることがわかる。しかしながら、20 mV/s 以上における  $\Delta E_p$  の 57 mV からのずれは、明らかにこの溶液抵抗の程度よりも大きい。したがって、 $\Delta E_p$  は主に BDD 電極の  $k_0$  に依存し、溶液抵抗の寄与は無視できると言える。

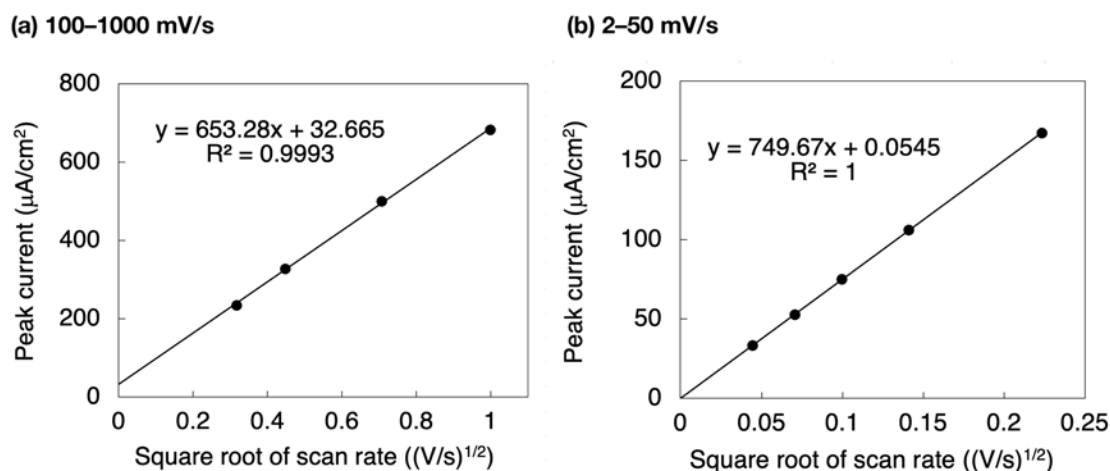


Figure 2.7 Scan rate dependence of peak current in Figure 2.6. Plots were fitted by linear regression. Non-zero section was obtained for higher scan rate range (a, 100–1000 mV/s) and lower scan rates showed reversible behavior with small sectional value (b, 2–50 mV/s).

続いて、ピーク電流値の評価を行う。可逆なレドックス対の CV における 298 K でのピーク電流 ( $i_p$  (A)) は下記の Randles-Sevcik 式で与えられる。

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2.2)$$

ここで、 $n$  は酸化還元電位反応に使われる電子の数 (equiv mol<sup>-1</sup>)、 $A$  は電極面積 (cm<sup>2</sup>)、 $D$  は拡散係数 (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>)、 $c$  はバルクの濃度 (mol cm<sup>-3</sup>)、 $v$  はスキャン速度 (V s<sup>-1</sup>) である。Figure 2.6 で得られたピーク電流と走査速度の平方根のプロットを Figure 2.7 に示す。100 mV/s 以上の走査速度においては (Figure 2.6a)、一次線形回帰の  $y$  切片の値が大ききな値を持っており、原点に収束していないことが見て取れる。これは、反応の可逆性が低く準可逆領域に分類されることを示している。一方で、50 mV/s 以下のより遅い走査速度での同様のプロットを見ると (Figure 2.6b)、 $y$  切片の値が 0 に近づいており、Equation 2.2 で示される可逆な反応系に近づいていることがわかる。Table 2.2 で見たピーク間電位差の走査速度依存性の傾向と一致している。最後に、得られている電流値の妥当性を検討する。例えば 10 mV/s においては、Equation 2.2 から 25  $\mu$ A が理論的なピーク電流値として得られる。一方で実測値は 27  $\mu$ A であり、両者の間に良い一致が得られた。

以上より、高純度の BDD が合成でき、BDD 特有の広い電位窓と小さなバックグラウンド電流、電極応答を確認できた。

## 2.2 針状微小電極

1.3.2 で述べたように、針状微小電極は、臓器中の特定の組織など局所の情報を得る際に重要な電極形状である。そうした生体内局所でのセンシングを目指すに当たり、平板電極と同時に BDD 針状微小電極の作製にも取り組んだ。本節では、BDD 針状微小電極の作製について述べる。

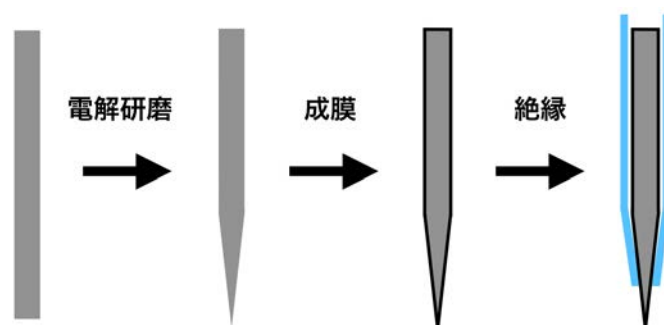


Figure 2.8 General steps for the fabrication of BDD needle-shape microelectrodes.

BDD 電極作製のステップは大きく分けて 3 段階ある (Figure 2.8)。まず、針状で微小な基材が必要になる。その上に CVD 法により BDD を成膜する。最後に、電極面積を規定するための絶縁処理をすることで、測定に用いることのできる電極になる。以下、BDD 針状微小電極の作製方法について順を追って説明する。

### 2.2.1 電解研磨

まず、針状の基材を準備する必要がある。BDD 針状微小電極も平板電極と同様に MPCVD 法による BDD の成膜を行うが、それを踏まえると基材には以下の条件が望まれる。

- CVD プロセス温度に耐えうる (約 1100 度)
- $\mu\text{m}$  オーダーの針状に加工が可能
- 安価

これらの条件を満たすものとして、タングステンが挙げられる。タングステンは融点が 3422 度と非常に高く、高価ではない。また、走査型プローブ顕微鏡などの探針として用いる際にも、タングステンを基材とした針状微細構造の作製は頻繁に行われており、BDD 針状微小電極のための基材として適すると考えた。そこでタングステン線を針状に加工する必要があるが、nm オーダーまでの加工を見越すと機械研磨は限界があるだろう。一方で電解研磨は、電圧や電流、通電量を変化させることで形状制御が可能である [95]。そこで、[96] の手法を参考にした電解研磨に取り組んだ。この手法は、二電極系における定電圧電解を行い、印加電圧と電解停止電流の制御により、直径が  $10 \mu\text{m}$  で長さが  $100 \mu\text{m}$  オーダーの針形状を作ることのできるものである。皮膚や筋肉に突き刺して生体内局所にアプローチすることを踏まえると、テーパ部分の長さを制御できる本手法が適する。

Figure 2.9 が作製した電解研磨装置の概略である。はじめは文献 [96] にのっとり二電極系で行っていたが、1 ヶ月のオーダーで電解条件の変化が見られた。二電極系における電圧は対極の状態 (電極面積、表面状態、位置など) に依存する。対極には当初金線を用いていたが、度重なる電解研磨を行う中

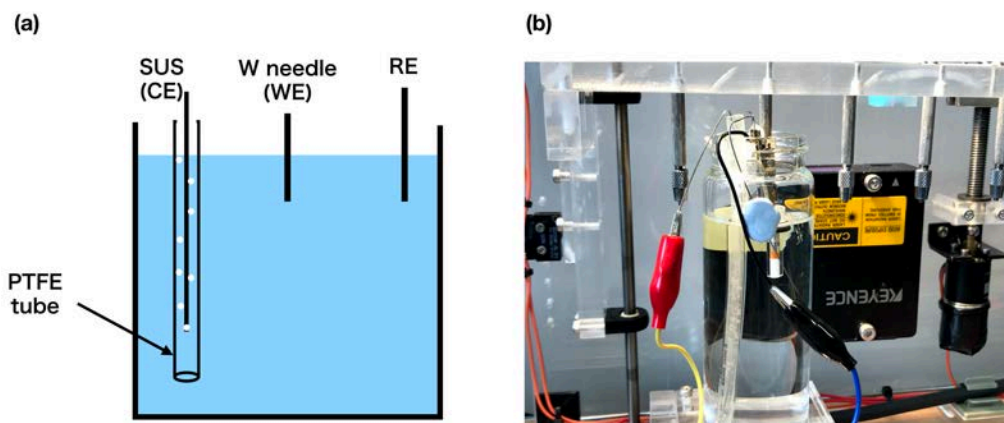


Figure 2.9 An illustration of the electrochemical cell used for electropolishing of tungsten wires (a) and the actual photograph (b).

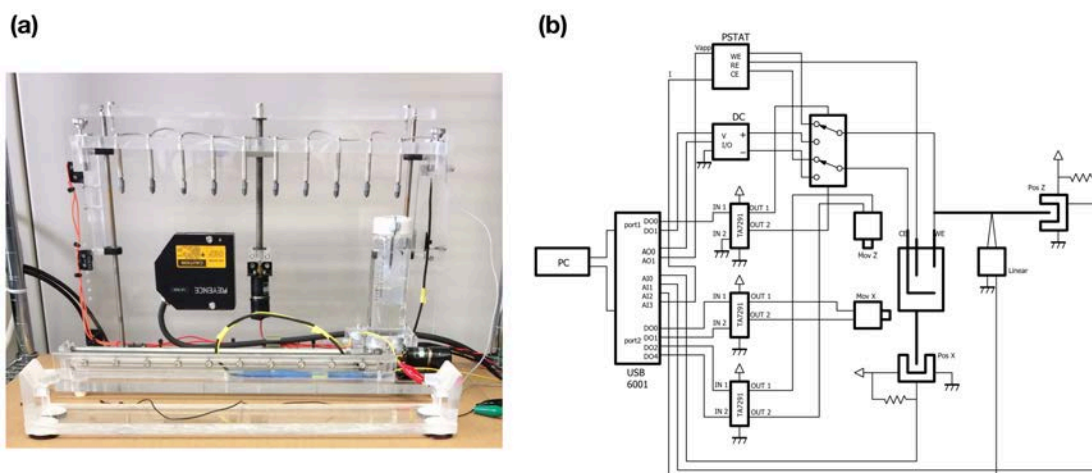


Figure 2.10 The micrograph of automatic electropolishing system (a) and its illustrated overview (b).

でその表面状態が変化したことで、作用極であるタングステン線にかかる電位がシフトし、同一条件であっても異なった形状が得られたのだと考えられる。

そこで、三電極系での電解研磨を採用した。タングステンの電解研磨は強塩基性（この場合は 2 M KOH 水溶液）で行うため、参照電極には強塩基性に適用可能な Hg/HgO 系参照極 (RE-61AP, BAS) を用いた。対極には SUS を用いたが、ここから発生する水素ガスの気泡がタングステン線に吸着すると電解に影響を与える。そこで対極は PTFE 製のチューブで覆うこととした。

一本当たりの電解研磨には 5 分間程度を要する。10 本の電解研磨を行うのには約 1 時間を要するため、Figure 2.10a のような電解研磨装置を作製し、自動化を試みた。Figure 2.9a で示したセルのタングステン線が上下に、その他のものが左右に動くことで、連続して研磨が行える仕組みである。タングステン線は金属製ピンバイスで固定し、それが 10 本ぶら下がっている。研磨装置のシステム全体は Figure 2.10b のようになっている。タングステン線とセルの動作はモーターによって行われ (Mov x, z)、定位置につけられた赤外線センサ (Pos x, z) からの信号でそれぞれの電解研磨位置で停止する。z 方向の位置検出にはレーザー変位計 (Linear) を用い、ポテンショスタットは文献 [97] を参考にして作

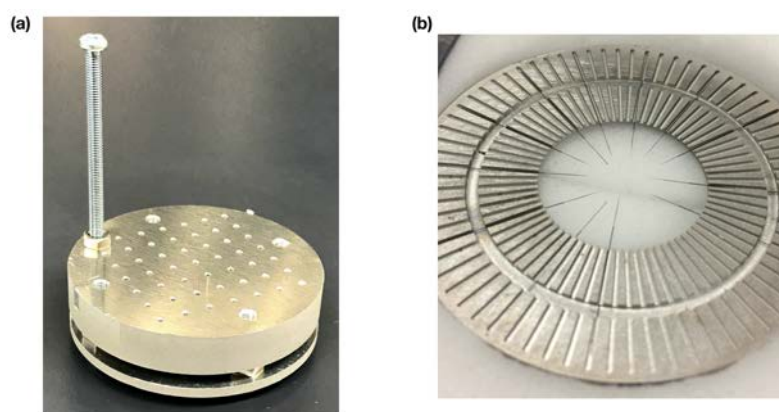


Figure 2.11 Tungsten needle holders for seeding (a) and CVD (b) process.

製した。これら主要なモジュールは、データ収録ボード (USB-6001, National Instruments) を介して PC 上の LabVIEW で書かれたプログラムにより制御した。プログラムの概要をまとめると下記のようになる。

- WE に電圧印加
- WE を降下
- WE に電流が流れたところ (WE が電解研磨浴に接触したところ) から 5 mm のところで WE を停止
- WE に研磨電圧を印加
- 所定の電流値を下回ったら、あるいは所定の通電量を上回ったら電圧印加停止
- WE を上昇
- セルを次の WE まで移動

このように自動電解研磨装置を導入することで、再現性の高い針状タングステン線が得られるようになった。

## 2.2.2 ダイヤモンド成膜

電解研磨により針状基材の準備が整ったので、続いてダイヤモンドの成膜を行なった。成膜に先立ちダイヤモンドの核付けを行う必要がある。10 分間のアセトンへの浸漬後、0.05 wt% ナノダイヤモンド水溶液 (ナノアマンド, ナノ炭素研究所) へ 60 分間浸漬することで核付けとした。核付けには、バッチ処理を行えるように Figure 2.11a に示したホルダーを作製し、タングステン針を剣山のように突き立てた状態でナノダイヤモンド水溶液への出し入れを行なった。60 分間の浸漬後はすぐに成膜用のホルダー (Figure 2.11b) に移し、これを平板電極を成膜したものと同様のホルダーに乗せて CVD プロセスにかけた。標準的な成膜条件はマイクロ波出力 3.0 kW, チャンバー内圧力 60–65 Torr, 水素 400 sccm, アセトン/水素流量比 1.5 %, 成膜時間 2–4 h であった。

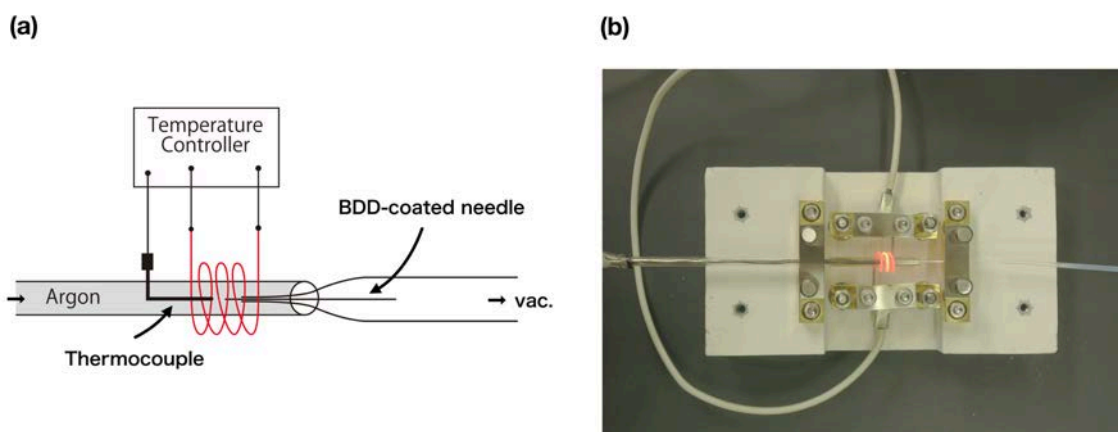


Figure 2.12 An illustration (a) and photograph (b) of glass insulation system for BDD microneedles.

### 2.2.3 絶縁

平板電極の場合は O-リングで固定することにより電極面積を規定したが，針状微小電極の場合には先端を  $100\ \mu\text{m}$  程度だけ露出する形で絶縁を行う必要がある．筆者以前は，先端をカットしたガラスキャピラリー中にエポキシ樹脂を流し込むことで絶縁処理としていた [52]．しかしながら，

- エポキシ樹脂が濡れ広がり，どこまで絶縁されているのかが不明確
- エポキシ樹脂中の成分が測定を妨害
- 繰り返し使用すると BDD 表面からエポキシ樹脂が剥がれる

などの問題があった．

そこで本研究では，ガラスキャピラリーのみによる絶縁手法を取り入れた．ガラスキャピラリーを熱しながら真空引きすることで，BDD に密着させるという手法である．用いた絶縁処理装置の概略図を Figure 2.12 に示した．ガラスキャピラリーが熔融する  $700$  度前後の温度を与える必要があるので，ダイヤモンドの酸化を防ぐために石英管をアルゴンで満たして不活性ガス雰囲気を作った．その中にガラスキャピラリーを被せた BDD 針状微小電極を設置しキャピラリー内を真空引きし，温度調節器 (TR-K, アズワン) により約  $700$  度で  $60$  秒間の加熱を行なった．最後に，銀ペースト (D-500, 藤倉化成) を塗った銅線をキャピラリー内に入れてリード線とした．そして，銅線とガラスキャピラリーの入り口を UV 硬化樹脂 (BONDIC) で固定化して BDD 針状微小電極の完成とした．

### 2.2.4 評価

上記の手順で作製した BDD 針状微小電極の SEM 像を Figure 2.13 に示す．先端をカットしたキャピラリーから BDD 針状微小電極が露出し， $100\ \mu\text{m}$  強だけ BDD 電極が露出している．また，Figure 2.13b の拡大像を見ると，平板電極と同様に多結晶体で覆われていることがわかる．膜質の均一性を確かめるために，針状微小電極の Raman スペクトルを約  $120$  度ずつ回転させながら  $3$  点測定した (Figure 2.14)．電極 A から D まで  $4$  種類の微小電極を用いた．どの電極においても平板電極 (Figure 2.3) に似たスペクトルが得られたことから， $1\%$  前後のホウ素が取り込まれた BDD の合成ができた．一方で， $1590\ \text{cm}^{-1}$  のグラファイト構造に帰属されるバンド (G-band) が電極 A, B, C において見



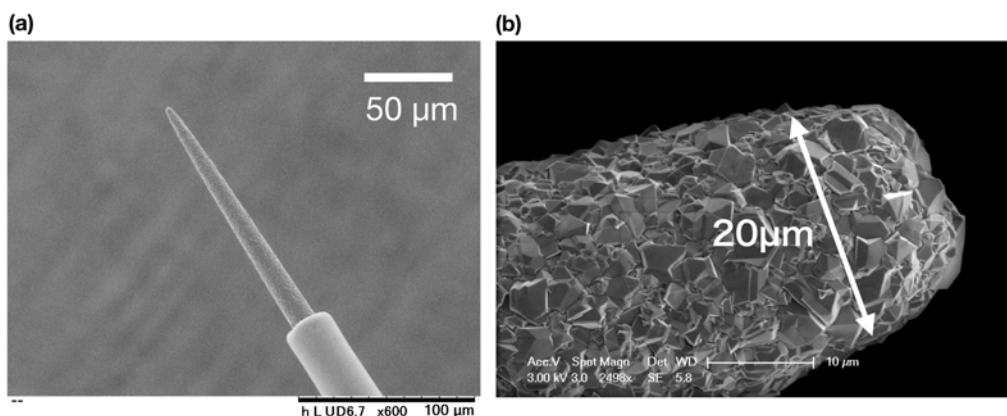


Figure 2.13 Scanning electron micrograph of BDD microneedles. (a) TM3030Plus, HITACHI. (b) JSM-7600F, JEOL.

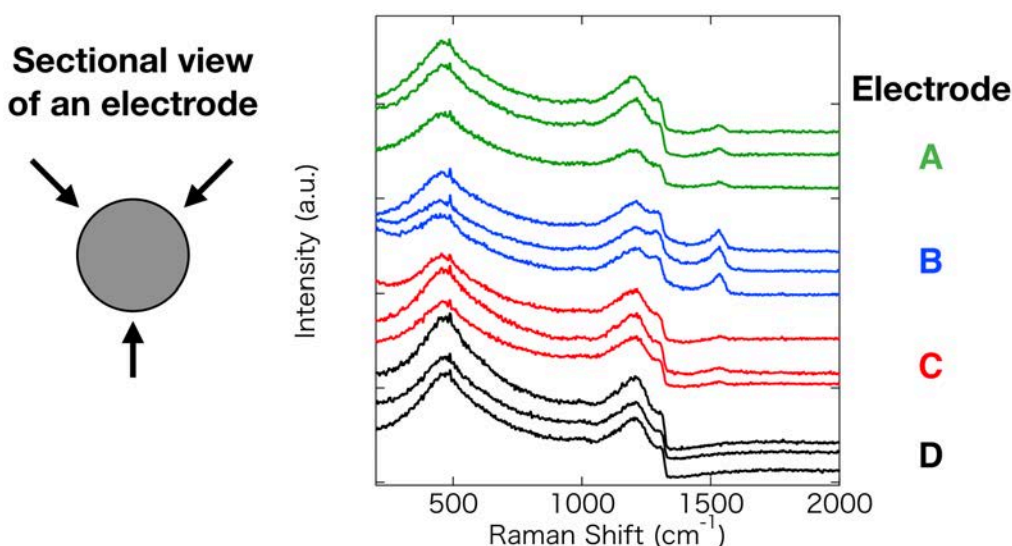


Figure 2.14 Raman spectra of BDD microneedles. Measurements were taken on 4 electrodes from 3 different angles shown in the left.

られ、これら BDD には  $sp^2$  炭素不純物が混入していることがわかる。しかしその均一性に着目すると、どの電極上で取得した 3 点とも同程度の強度を示している。なお、電極の長手方向でも同様の結果が得られた。このことから、BDD の膜質は針状微小電極上で均一だと言える。Figure e2.11b で示したように、針状電極上への BDD 成膜は電極をホルダーに寝かせる形で行うため、針の半面はプラズマに直接接して BDD 成膜がしやすく、もう一方の面との間に膜質のグラデーションが生じそうである。しかし、用いている電極がプラズマの形状に対して十分に細く小さいため、その部分においてはプラズマの状態が均質となり、ムラのない成膜ができているものと考えられる。

この電極を用いた電気化学測定の結果を Figure 2.15 に示す。Figure 2.15a は旧型のエポキシで絶縁した電極、Figure 2.15b はガラス絶縁した電極である。上段の光学顕微鏡像を見て明らかなように、エポキシ樹脂はガラスキャピラリーから染み出して BDD 電極を覆っていることがわかる。下段のフェロシアン化カリウム中における CV を見ると、ガラスキャピラリーから出ている電極は同程度の長さであるにもかかわらず、電流値は半分以下になっている。また、ガラス絶縁電極で見られている微小電極に

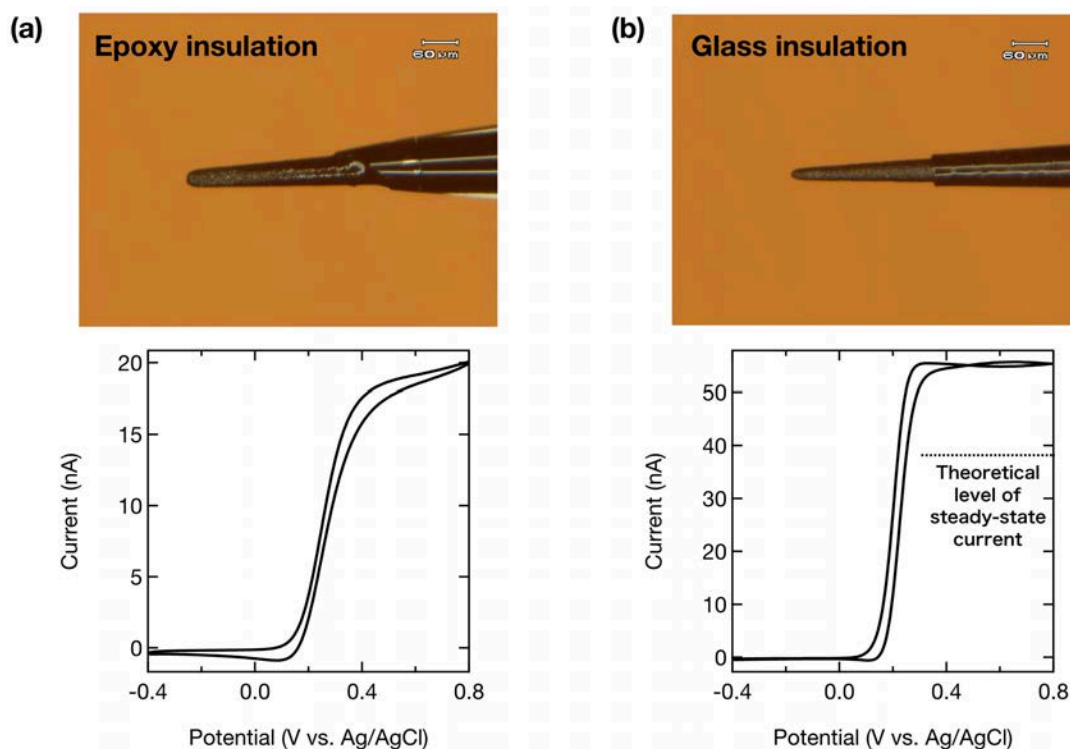


Figure 2.15 Comparison of BDD microneedles insulated with epoxy resin (a) and glass (b). Above are optical photographs and below are cyclic voltammograms in 1 mM ferrocyanide of 0.1 M KCl solution. CV linear scan, scan rate 0.1 V/s, by ALS852Cs.

特徴的な定常電流はエポキシ絶縁電極では見られず、だらだらと電流値が増加し、電子移動速度の遅い成分が混在していること示している。これは、エポキシ樹脂が薄く染み出した部分が半端に絶縁され、そこでも電子移動が生じていることを示す。ガラスのみで絶縁した電極はそのような不明確な部分がなく、測定電極として優れている。

続いて、CVにおけるシグナルの実験値と理論値を比較して、ガラス絶縁の評価を行う。露出部分は半径 ( $r$ ) 18  $\mu\text{m}$ 、長さ ( $L$ ) 240  $\mu\text{m}$  の円柱と近似する。似た形状を持つ円柱型微小電極における定常電流値 ( $i_{\text{ss}}$ ) は、次式で与えられる [98]。

$$i_{\text{ss}} = 2\pi r n F D C \left( \pi + \frac{2\pi L}{r} \right) \times 0.06 \quad (2.3)$$

これを計算すると 38 nA となる。一方、実測値は 55 nA 程度と大きな値となった。これは、上式は絶縁性の平板上から伸びた円柱電極における電流値であり、針状微小電極におけるガラスキャピラリー方向からの物質拡散の寄与が含まれていないことが要因の一つと考えられる。幾何面積の見積もりにおける誤差などを踏まえると、およそ妥当な電流値を与えていると言えるだろう。

最後に、ガラス絶縁の耐久性を確かめた。PBS 中で合計  $-3\text{ V}$  を 35 分間の陰極還元、および  $+3\text{ V}$  を 140 分間の陽極酸化を行なった前後のバックグラウンド溶液中における CV 測定の結果を Figure 2.16 に示す。高電圧処理の前後で波形に違いが生じておらず、ガラス絶縁の強さがわかる。この結果はガラス絶縁の強度のみならず、BDD 自身の強度も示している。上記のように高電圧を印加すると、例えばグラッシーカーボン電極は電極表面が破壊され [99]、大きく電気化学応答が変化することが知られている。筆者の導入したガラス絶縁は BDD 自体の強度を十分活かすことのできる絶縁手法と言えるだ

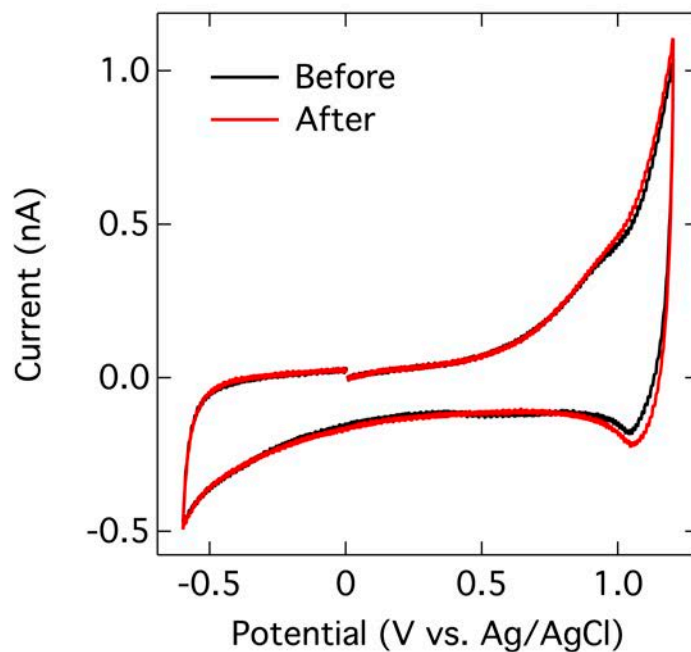


Figure 2.16 Cyclic voltammograms of a BDD microneedle in Tris buffer before and after electrochemical treatments of cathodic reduction (35 min at  $-3$  V) and anodic oxidation (140 min at  $+3$  V) in PBS. CV staircase,  $0.1$  V/s, by PGSTAT101.

ろう。

## 2.3 まとめ

本章では、平板型および針状微小型の BDD 電極の作製手法を説明した。ホウ素濃度約 1 % の BDD が高純度で得られ、広い電位窓と小さなバックグラウンド電流、金属電極に匹敵する電子移動速度といった、BDD 電極の特徴を確認した。BDD 針状微小電極に関しては、ガラスのみによる絶縁手法を確立し、長時間の高電圧印加にも耐えうる微小電極の作製に成功した。次章からは、これらの電極を用いて行なった生体内物質の連続的な電気化学測定に関する 2 つの研究を説明する。さらに、筆者が新たに考案した BDD 針状微小電極の作製手法を報告する。

## 第3章

# オキシトシンおよびバソプレシンの選択的な連続測定 [100]

### 3.1 はじめに

#### 3.1.1 オキシトシンとバソプレシン

オキシトシンは9つのアミノ酸から成るペプチドであり、種々の生理作用を持つ。子宮収縮や母乳生成に作用するホルモンとしての機能だけではなく、オキシトシンは神経伝達物質としても働き、ペア形成や母性攻撃などの社会行動に関与すると言われている [101–103]。オキシトシンは他にも社会行動向上のための作用を持つことから、自閉症、うつ病、不安障害、統合失調症などの治療へ用いることが期待されている。少量の投薬では効果がなく、多量に摂取すると期待に反する作用が見られ、投与量の調節が必要とされている [104–106]。

加えて、未知の多いオキシトシンの役割を本質的に理解するためには、脳内におけるオキシトシンの作用機序を知る必要がある [107]。そのためにも、オキシトシンを脳内で測定することが必然的に重要となる。ミリ秒オーダーでのオキシトシンの分泌を捉えるためには、リアルタイムかつ生体内での測定が求められるものの、そうした測定は現在の手法では達成されていない。いつ、どこで、どれだけのオキシトシンが分泌し、それがどのように生理作用するのかの理解が求められている。

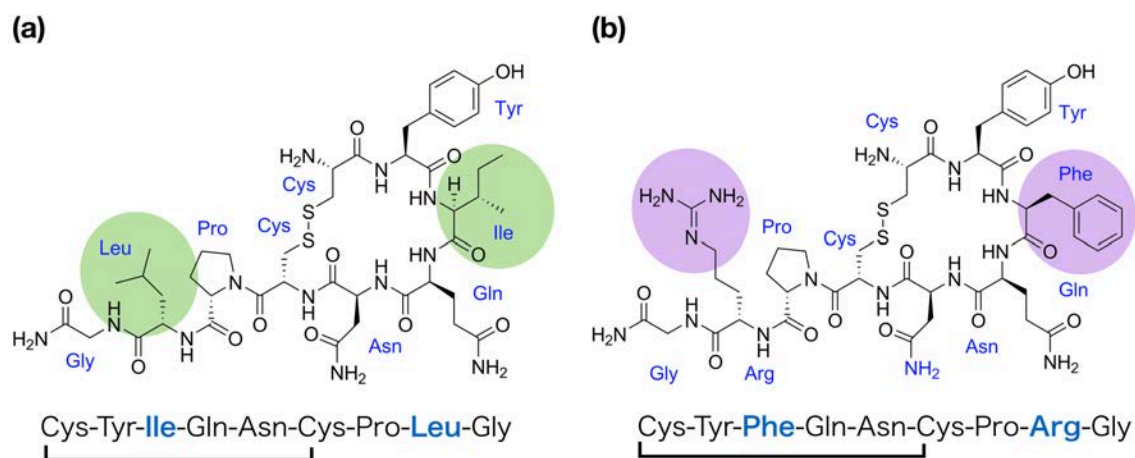


Figure 3.1 Chemical structure of oxytocin (a) and vasopressin (b).

オキシトシンは脳内の視床下部で分泌されるが、同じ場所でバソプレシンというペプチドも分泌される。バソプレシンも 9 つのアミノ酸から構成され、オキシトシンと非常に似た構造を持つ。オキシトシンとバソプレシンのアミノ酸配列を Figure 3.1 に示す。違いは太字で示された 2 つのアミノ酸のみである。なお、2 つのシステインはジスルフィド結合でつながっている。オキシトシンの測定で主に利用されている放射免疫測定法などにおいて、この酷似した構造のため抗体が両者に対して親和性を持ち、特異性の低下が生じる [108, 109]。液体クロマトグラフィーと質量分析を組み合わせることで特異性の問題は克服することができるものの [107]、マイクロダイアリシスによるサンプリングやクロマトグラフィー時の保持時間のため、1 測定に少なくとも数分間を要する。そこで、ミリ秒オーダーの応答速度を持つ電気化学測定において、両者を選択的に測定する手法が求められる。

通常の電位領域においては、タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸の中でシステイン、トリプトファン、そしてチロシンが電気化学的に活性であることが知られている [110–113]。これら 3 つのうちどれかを含む分子であれば、理論的には電気化学的に測定が可能である。しかしながら、ペプチドやタンパク質の直接的な電気化学測定に関する報告は少ない [114, 115]。免疫測定法や液体クロマトグラフィーに比べて電気化学測定の感度が低いことが原因の一つとして考えられる。また、電気化学的に酸化されたタンパク質による電極表面不活性化が、電気化学測定の再現性を低下させる [116]。そこで、そうした表面不活性化の影響が少ない BDD 電極を用いることで、再現の良い高感度測定が期待できる。また、表面終端を制御することで、オキシトシンとバソプレシンの選択的な測定が可能になりうる。

### 3.1.2 概要

本章では、BDD 電極を用いた電気化学測定により、オキシトシンとバソプレシン選択的な連続測定を目指した。サイクリックボルタンメトリーより、両者は +0.7 V に明瞭な酸化シグナルを与えることがわかった。これは、チロシン残基のフェノール部分の酸化反応に帰属される。BDD 針状微小電極を用いたオキシトシンのフローインジェクション分析において、0.1  $\mu\text{M}$  から 10  $\mu\text{M}$  に渡って酸化ピーク電流に高い直線性が得られ ( $R^2 = 0.995$ )、検出下限 50 nM ( $3\sigma$ ) であった。オキシトシンとバソプレシンの酸化ピーク電位は一致したものの、BDD の表面を陽極酸化により酸素終端化することで両者の酸化ピーク電位に明瞭な違いが生じた。これは、酸素終端 BDD と分子間の静電的相互作用に由来すると思われる。この現象を用いることで、BDD 針状微小電極による両者の選択的な連続測定を実現した。

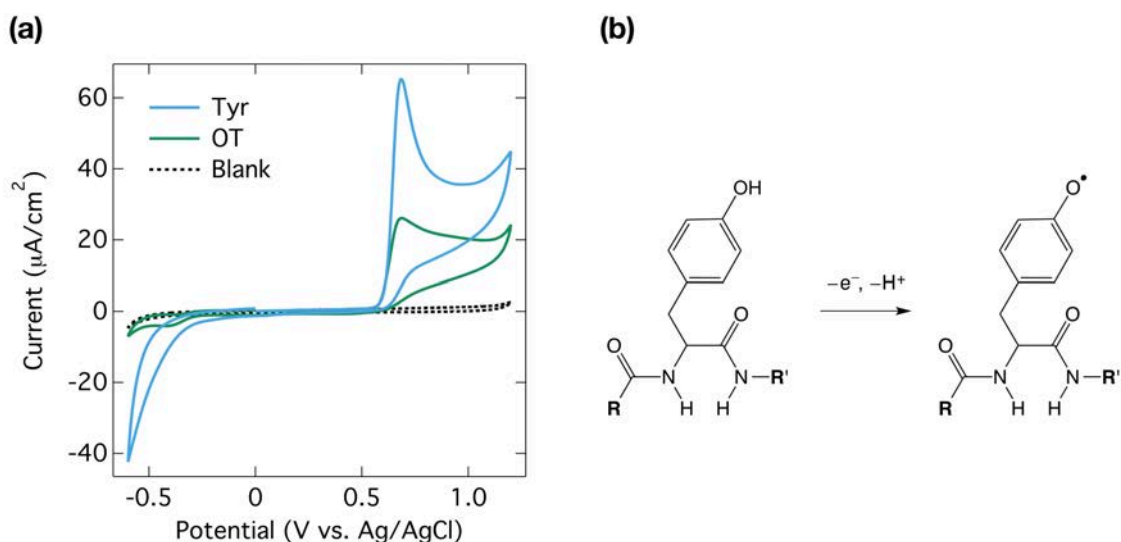


Figure 3.2 The study of electrochemical behavior of oxytocin by cyclic voltammetry. (a) Cyclic voltammograms of PB (0.1 M, pH 7.4) using as deposited-BDD electrodes in the absence (blank) and the presence of 0.1 mM oxytocin (OT) and 0.1 mM tyrosine (Tyr). The scan rate is 100 mV/s and starts from 0.0 V (positive scan). (b) The proposed oxidation mechanism of oxytocin at the tyrosyl moiety. R and R' represent the remaining parts of the oxytocin.

### 3.2 オキシトシンおよびバソプレシンの電気化学特性評価

はじめに、サイクリックボルタンメトリー (CV) によりオキシトシンの電気化学的挙動を調べた。Figure 3.2a に 0.1 M リン酸緩衝液 (PB, pH 7.4) 中における 0.1 mM オキシトシンのボルタモグラムを示す。走査速度は 100 mV/s である。バックグラウンドにおけるボルタモグラムとの比較により、+0.7 V にオキシトシン由来の酸化ピークが見られる。より広い走査範囲で CV 測定を行うと、+1.5 V に幅の広い酸化シグナルが見られた。この幅の広いシグナルは、酸素発生反応との重なりによるものと思われる。BDD 電極において、ジスルフィド結合は +1.5 V 以上で酸化反応を示すことが知られている [117, 118]。システイン 2 分子がジスルフィド結合をしたシスチンについても同様の測定を行うと、似た酸化シグナルが見られたことから (Figure 3.3a), +1.5 V のシグナルはジスルフィド結合の酸化反応に帰属される。しかし、+0.7 V のシグナルの方が低電位にて高い強度を与えるため、以降では +0.7 V の酸化シグナルを測定に用いることとした。

オキシトシンを構成する 9 つのアミノ酸のうちチロシンのみが電気化学的に活性であることから、チロシンについても同様の測定を行なった。チロシンとオキシトシンのボルタモグラムの形状が類似することから (Figure 3.2a), オキシトシンの酸化反応はチロシン残基で生じていると言える。

両者のピーク電流の違いは主に拡散係数の違いによると思われる。拡散律速の電気化学反応 (非可逆系) において CV のピーク電流値は拡散係数 ( $D$ ) の平方根に比例する。一方、次の Stokes-Einstein 式を用いると、 $D$  は分子半径 ( $r_0$ ) の平方根に反比例する。

$$D = \frac{kT}{b\pi r\eta} \quad (3.1)$$

また、オキシトシンの分子半径約 10.5 Å [119] は、チロシンの分子半径約 4.5 Å の 2.3 倍である。した

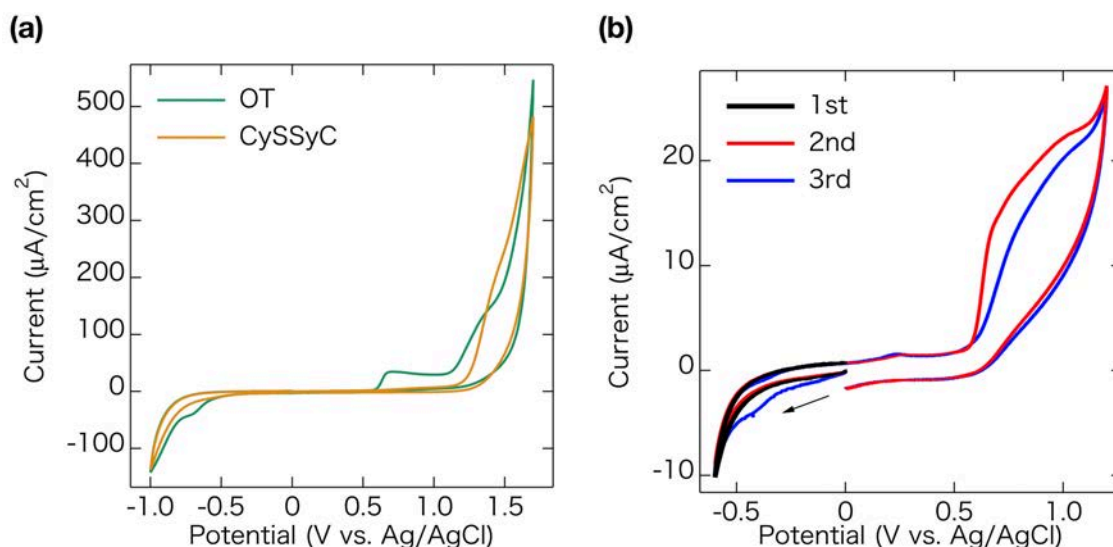


Figure 3.3 The study of electrochemical signals of oxytocin except for tyrosine oxidation. (a) Cyclic voltammograms of oxytocin and cystine. Cyclic voltammograms of 0.1 mM oxytocin (OT) and cystine (CySSyC) in PB (0.1 M, pH 7.4) using as-deposited BDD electrodes. (b) Analysis of reduction signal of oxytocin. Cyclic voltammograms of 0.1 mM oxytocin in PB (0.1 M, pH 7.4) using as-deposited BDD electrodes. 1st scan was from 0 to  $-0.6$ , then 0 V, 2nd and 3rd scans were from 0 to  $-0.6$ ,  $+1.2$ , and 0 V. Note that the reduction signal at  $-0.4$  V did not appear without the oxidation reaction (see the 2<sup>nd</sup> scan). Other conditions are similar to those in Figure 3.2a.

がって、チロシンのピーク電流値は理論的にはオキシトシンの 1.5 倍になる。実際のピーク電流値の違いはこの予想よりも大きい (2.5 倍)、主要な原因は拡散係数の違いによると思われる。

チロシンの電気化学的酸化反応は、BDD を含むいくつかの電極において調べられてきた [113, 120, 121]。チロシンの酸化反応はフェノールの 1 電子 1 プロトン酸化から始まり (Figure 3.2b)、さらなる酸化反応やポリマー化を経て、数種類の成膜体を形成すると思われる。ペプチド中のチロシンが酸化する場合は、ペプチド骨格が C 端側で開裂しうることが知られている [121]。なお、オキシトシンの酸化反応に加えて、 $-0.4$  V に還元ピークも見られた。しかしながら、この還元シグナルはネガティブスキャンで CV 測定を行なったところ現れなかったため (Figure 3.3b)、オキシトシンの酸化成膜体の還元反応に由来する。

続いて、白金 (Pt) およびグラッシーカーボン (GC) 電極について同様にオキシトシンの CV 測定を行なった。Pt 電極ではピークは観測されなかったものの (Figure 3.4b)、GC 電極では明瞭な酸化ピークが見られた (Figure 3.4a)。GC も BDD と同様にカーボン電極であり、似たピーク電流および電圧が得られたことから、オキシトシンに関して BDD の場合と同様のメカニズムで酸化反応が生じていると思われる。しかし、シグナルは BDD の場合より幅広く、バックグラウンド電流は大きい。したがって、シグナル-バックグラウンド比 (S/B) を比較すると、BDD (S/B = 21) は GC (S/B = 5) の 4 倍もの値を示すことがわかった。この結果は、電気化学測定における BDD 電極の優位性を示す。なお、Pt 電極において  $+0.5$  V から  $+0.8$  V に電流値の増加がみられるものの、大きなバックグラウンド電流によりシグナルは不明確であった。

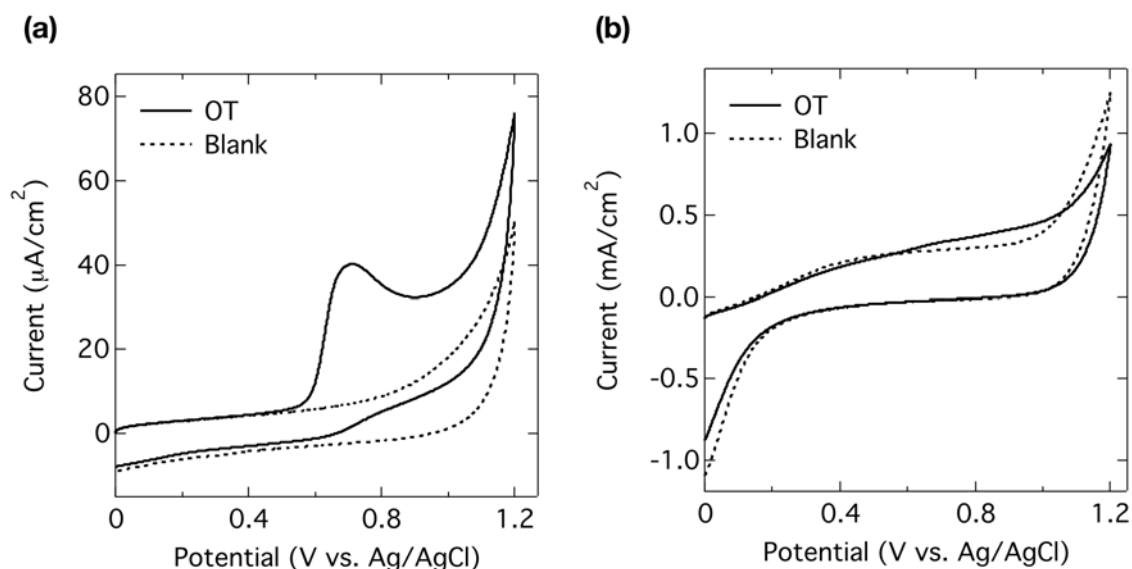


Figure 3.4 Electrochemical behavior of oxytocin on other electrodes. Cyclic voltammograms of PB (0.1 M, pH 7.4) with GC (a) and Pt (b) electrodes in the absence (dashed line) and the presence (solid line) of 0.1 mM oxytocin. The other conditions are as in Figure 3.2a.

### 3.3 酸素終端化による選択性の付与

続いて、オキシトシンとバソプレシンの選択性について検討を行なった。Figure 3.5a に as-deposited BDD (AD-BDD) におけるオキシトシンおよびバソプレシンそれぞれのボルタモグラムを示す。両者とも同様に +0.7 V に酸化ピークが観測され、酷似した波形を与えた。これは、バソプレシンに関して構造中のチロシン残基が電気化学的に活性な部分であるため妥当な結果である。陰極還元した BDD (CR-BDD) についても同様の結果が得られた。

次に、陽極酸化の影響を調べた。1.3 でも述べた通り、本研究で使用している BDD は水素プラズマ中で合成されているため、AD-BDD は水素終端化していることが知られている。この電極に陽極酸化処理を施すことで、水素終端の一部が酸素官能基に変換され、酸素終端化する [122]。Figure 3.5b に、オキシトシンとバソプレシン溶液中における陽極酸化 BDD (AO-BDD) のボルタモグラムを示す。両者のピーク電位に違いが生じていることがわかる。バソプレシンのピーク電位は +0.7 V から変化していないものの、オキシトシンのそれは +0.9 V へと正にシフトした。さらに、チロシンのピーク電位はそれよりもさらに高い +0.95 V であった。

この現象の原因として考えられるのは、電極表面と測定分子との間の静電的相互作用である。1.3.1 でも紹介した通り、AO-BDD のような酸素終端化した BDD (O-BDD) の表面は負に分極していると考えられている。一方、ペプチドは含有するアミノ酸の種類により荷電する。荷電の状態は等電点 (pI) で評価できる。各ペプチドと関連するアミノ酸の等電点を表 3.1 にまとめた。バソプレシンの等電点 (10.9) はオキシトシン (7.7) および チロシン (5.7) よりも圧倒的に高い。測定溶液の中性条件 (pH 7.4) では、等電点 10.9 をもつバソプレシンは正の電荷を持ち、同程度の等電点をもつオキシトシンは電荷を持たない。結果として、負に分極した AO-BDD 表面はバソプレシンを引きつけ、ピーク電位の正へのシフトが抑えられたものと思われる。ロイシン、イソロイシン、およびフェニルアラニンは似た



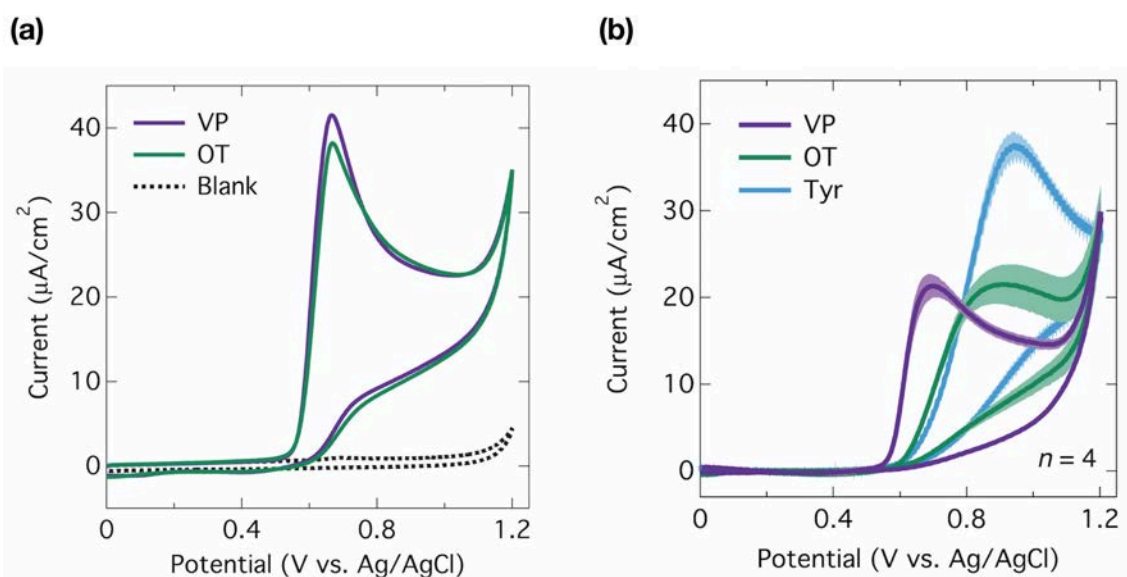


Figure 3.5 Comparison between the CVs of oxytocin and vasopressin on AD-BDD and AO-BDD. (a) Cyclic voltammograms of 0.1 mM oxytocin (OT) and vasopressin (VP) in PB (0.1 M, pH 7.4) using as-deposited BDD electrodes. (b) Cyclic voltammogram of PB (0.1 M, pH 7.4) using an anodically oxidized BDD electrode in comparison with voltammograms in the presence of 0.1 mM oxytocin (OT), vasopressin (VP) and tyrosine (Tyr). The other conditions are similar to those in Figure3.2a.

Table 3.1 Acid dissociation constant ( $pK_a$ ) of the phenolic group of oxytocin, vasopressin, and tyrosine and isoelectric point (pI) of the three molecules[123, 124] and some related amino acids.

	$pK_a$ of the OH group	pI
Tyrosine	10.0	5.7
Oxytocin	10.1	7.7
Vasopressin	9.8	10.9
Isoleucine	-	5.9
Leucine	-	6.0
Phenylalanine	-	5.5
Arginine	-	11.2

等電点 (5.5–6.0) を持つため、バソプレシン中のアルギニン ( $pI = 11.2$ ) がバソプレシンと AO-BDD 表面の相互作用に最も大きな影響を与えていると考えられる。

こうした静電相互作用と思われる効果は過去から報告されている。Table 3.2 に、各種 redox 分子の CV におけるピーク間電位差の O-BDD におけるシフトの例をまとめた。+ の値は、水素終端 BDD (H-BDD) と比較して O-BDD におけるピーク間電位差が増加したことに対応する。負電荷を持つ分子で + の変化、逆に電荷が正の分子においては増加が抑えられている、あるいは減少している。また、Table 3.3 には、3 種類のカテコールの CV 測定における酸化電位に関して、酸素終端化したことによる電位シフトの例をまとめた。DOPAC は 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, EC は 4-Ethylcatechol, DA は dopamine をそれぞれ示している。どれもカテコール構造を共通に持ち、側鎖の違いにより分子

Table 3.2 Shift in CV peak separations for several redox molecules on O-BDD. + means that peak separation obtained in CV on O-BDD is shifted from that on H-BDD. MV: methyl viologen.

	Difference in $\Delta E_p$ on O-BDD (mV)
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	+130[94], +950[50]
$\text{IrCl}_6^{3-/2-}$	+6[94], +570[50]
$\text{MV}^{2+/1+}$	-3[94]
$\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$	0[94], +18[50]
$\text{Fe}^{3+/2+}$	-170 [50]

Table 3.3 Shift in CV peak potential for catechols with different charges. (+) shows the molecule has positive charge in the measurement condition. Data was from [125].

	Difference in $E_p$ on O-BDD (mV)
DOPAC (-)	+36
EC	+34
DA (+)	+19

のもつ電荷がそれぞれ +, 中性, - と異なる. どの分子においても酸素終端化したことで酸化ピーク電位のポジティブ方向へのシフトが見られるが, その程度は分子の電荷と相関しており, 電荷が正ほどシフトの度合いは小さくなっている.

金-チオールの自己組織化単分子膜 (SAM) を用いた実験によっても, 電極表面-分子間の静電相互作用の効果を示唆する結果が得られている. SAM の作製に使用する直鎖炭化水素のチオールに関して, 末端が 1 級アミン (中性条件で正に荷電)[126], あるいはカルボキシ基 (中性条件で負に荷電)[127-129] の分子を用いることで, 密に荷電した SAM 表面を作り, アスコルビン (中性条件で負に荷電) とドーパミン (中性条件で正に荷電) の CV 測定が行われた. 1 級アミンで密に覆われた金電極の場合は, アスコルビン酸の酸化ピーク電位が 0.3 V ほどネガティブにシフトし, ドーパミンにおいては微弱ながらポジティブシフトが観測された. カルボキシ基で密に覆われた金電極の場合は逆の挙動が見られている. これらの例においても, 電極表面と分子の間の静電相互作用によって現象が説明されている.

こうした静電相互作用を定量的に記述するモデルの一つに Frumkin による方法がある [130]. これは, 電極表面反応場の電位と分子の持つ電荷との相互作用を考慮し, 実測で得られる電子移動速度定数 (apparent heterogeneous electron transfer rate constant,  $k_0$ ) から実際の値 ( $k_t^0$ ) を推測する手法であり, 次式で記述される.

$$k_0 = k_t^0 \exp\left(\frac{(\alpha - z)F\phi_2}{RT}\right) \quad (3.2)$$

ここで,  $\alpha$  は移行係数,  $z$  は分子の電荷,  $\phi_2$  は外部ヘルムホルツ面 (OHP) における電位を示す. このモデルに則って電子移動速度が変化するとすれば, OHP における電位が重要になる. O-BDD に関して言えば, 測定電位である +0.5 V から +1.0 V において, 酸素官能基の影響で  $\phi_2 < 0$  になっていれば, Figure 3.5b で見られたような違いが O-BDD と分子との間の静電相互作用 (この場合は双極子-イオン相互作用に相当) に起因するという説を支持する. しかし, 電極が多結晶体であること, 清浄な表面を維持することが難しい [131] などの理由から, BDD における potential of zero charge (PZC) および, そこから計算される電位に依存した電気二重層構造の理解は困難とされており [91], O-BDD

の電気二重層における電位プロファイルは現在のところ知ることができない。

電気二重層の定量的な情報は得られないが、ここで定性的に O-BDD 表面の二重層構造を考察する。それにあたりまず、電気二重層を形成する“過剰なイオン”がどれほどの過剰量なのかを計算してみる。二重層容量が  $5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  の場合、1 V の変化で  $1 \text{ cm}^2$  あたりに  $5 \mu\text{C}$  が充電されることになる。これは 1 価のイオンの場合  $3 \times 10^{13}$  個に対応する。一方、ダイヤモンド上の炭素密度は約  $1.7 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$  である。したがって、 $5 \mu\text{C}$  の充電は、炭素原子 50 個の一つくらいの割合 (2 %) のイオンの“過剰”に対応することになる。

O-BDD において、ある密度で存在する分極した酸素官能基が上記電気二重層の効果に匹敵するほどの電場を形成するのであれば、O-BDD の電気化学反応における静電相互作用の影響を支持することとなる。ここで、単純なデータと計算から O-BDD 表面の分極の様子を考察する。O-BDD の酸素官能基に関する同定と定量は、多結晶構造であるため容易ではないが、いくつかのグループから報告されている [50, 132-135]。酸化の手法により生成する表面官能基が異なると言われているものの、おおまかにまとめると、カルボニル基とヒドロキシ基が多く、その密度は表面炭素の 20-30 % 程度である。ここで、話を単純化するために、酸素官能基はカルボニル基のみとし、これが表面炭素の 10 % に生じていると仮定する。

双極子モーメント  $\mu$  は、部分電荷  $q$  と結合距離  $l$  を用いて

$$\mu = eql \quad (3.3)$$

と記述される。カルボニル基の単位としてアセトン分子を取り上げる。双極子モーメント 2.9 D および C=O 結合長  $1.2 \text{ \AA}$  [136, 137] から、C=O 結合部分に双極子モーメントが局在していると考えた場合、部分電荷は 0.5 となる。これを単純に“1 価イオンの半分の電荷を持つ”と考え、先に仮定したカルボニル基の存在密度と掛け合わせて、O-BDD は表面炭素の 5 % 程度に 1 価の電荷を持つ構造と近似して考えることができる。これは、先の段落で見た溶液側電気二重層内における 2 % 程度の過剰なイオンと互角な値であり、O-BDD 表面の酸素官能基が十分に電気二重層の構造に影響を与えていることを示している。

以上は大まかな議論ではあるものの、先行研究で得られている知見も総合して考えると、本研究で見られた AO-BDD 表面におけるオキシトシンとバソプレシンの反応性の変化には、少なからず静電相互作用の寄与が含まれているものと考えられる。

静電相互作用の効果は一般的にイオン強度に影響される。0.1 M PB のイオン強度は 0.26 であり、生理的な条件 (0.1-0.2) よりも高い。そこで、生理的な条件に近づけるために、Tris 緩衝液 (イオン強度 : 0.18) にて同様の CV 測定を行なった。オキシトシンとバソプレシンの酸化電位にはなお明瞭な違いが見られた (Figure 3.6)。これより、オキシトシンとバソプレシンの選択的測定の生理的条件における適用可能性が示された。Figure 3.5b で見られたようなオキシトシンのピーク形状が微小電極においては見られなかったが、これは電極表面状態の違いによるものと考えている。微小電極は 2.2.3 で述べたガラス加熱絶縁を行って作製されている。加熱時の電極の酸化を防ぐためにアルゴン雰囲気下にて加熱を行っているものの、完全には空気酸化を防いでいるわけではないと思われる。また、BDD の終端構造は酸化の方法 (加熱、酸素プラズマ、酸、UV/O<sub>3</sub> 酸化など) によって異なることが知られている。

なお上記 AO-BDD での測定においては、再現よい測定を行うために陰極還元 (-3.0 V, 5 min) および陽極酸化 (+3.0 V, 20 min) の前処理が各測定で行われている。そうした処理がない場合、測定分子の酸化により電極表面が不活性化し、再現性の低下に加えて電気化学的挙動の違いを評価できなくなっ

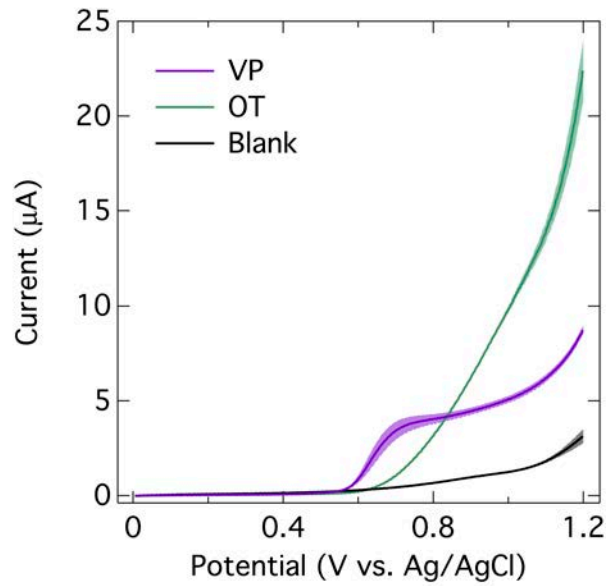


Figure 3.6 Linear sweep voltammograms of oxytocin and vasopressin on an AO-BDD microneedle in Tris buffer. Cyclic voltammograms of Tris buffer (pH 7.4) using an anodically oxidized BDD microelectrode in comparison with voltammograms in the presence of 0.1 mM oxytocin (OT) and vasopressin (VP). The other conditions are similar to those in Figure 3.2a.

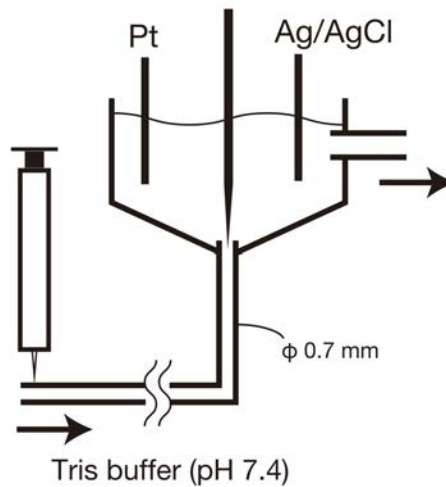


Figure 3.7 Schematic illustration of flow system used for continuous measurement of oxytocin and vasopressin.

たためである。こうした過酷な条件における繰り返しの電気化学処理は他電極では電極の破壊などに繋がる。再現性を高めるために必要なこうした過酷な電気化学処理が行えることも、BDD電極が優れている点である。

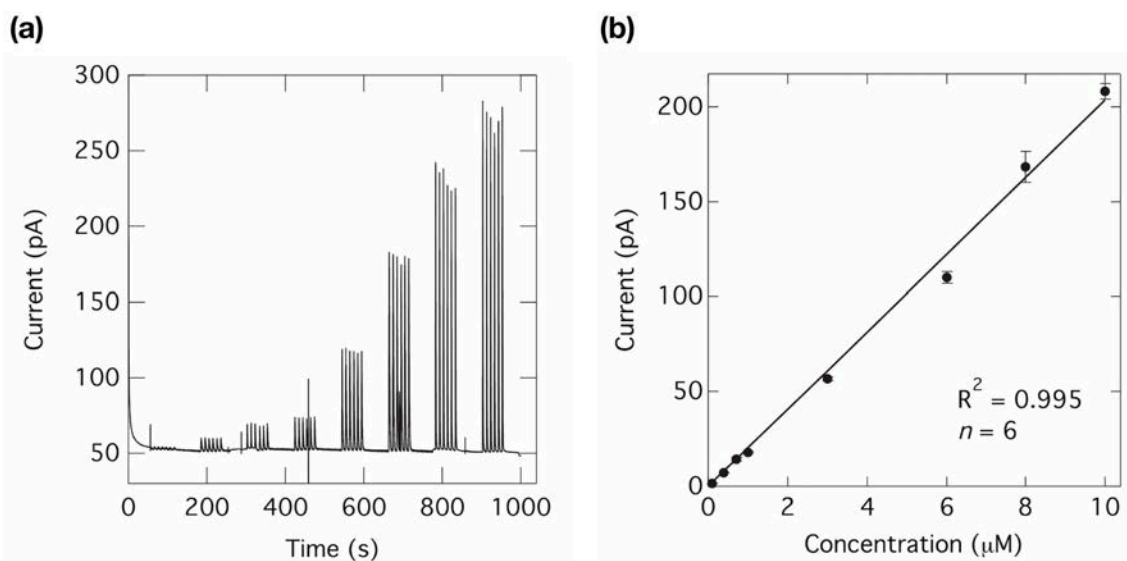


Figure 3.8 Flow injection analysis for oxytocin on BDD microelectrode using chronoamperometry. (a) Flow injection analysis of oxytocin in a Tris buffer (pH 7.4) using a BDD microelectrode. The applied potential was 1.0 V. Oxytocin concentrations of 0.1–10  $\mu\text{M}$  were injected 6 times for each concentration. (b) Calibration curve extracted from the current recorded in (a) against the oxytocin concentration ( $n = 6$ ). Error bar shows standard deviation.

### 3.4 針状微小電極を用いた連続測定

続いて BDD 針状微小電極による測定を行なった。脳内におけるオキシトシンの分泌の測定を想定し、オキシトシンのフローインジェクション分析を AD-BDD 針状微小電極にて行なった。使用したフローシステムを Figure 3.7 に示す。6 ポート HPLC ループインジェクター (9725i, Rheodyne) および HPLC ポンプ (PU 712, GL science) をフローセルにつなぎ、溶液出口に BDD マイクロ電極の先端を 1 mm 挿入した状態で固定した。このフローシステムは [138] を参考にして作製した。流速は 1 mL/min、インジェクションサンプル量は 20  $\mu\text{L}$  とした。

まず、検量線を作成して感度および検出下限の見積もりを行った。0.1  $\mu\text{M}$  から 10  $\mu\text{M}$  までのオキシトシン標準溶液をインジェクションし、+1.0 V の低電位印加時の電流変化を記録した (Figure 3.8a)。標準液のインジェクション直後に鋭い電流応答が得られた。ピーク電流値を濃度に対してプロットすると、直線性の高い検量線が得られ ( $R^2 = 0.995$ )、検出下限は 50 nM ( $3\sigma$ ) となった (Figure 3.8b)。この結果は、オキシトシンのリアルタイム測定が nM オーダーで可能であることを示す。

しかしながら、上記では AD-BDD を用いているためオキシトシンとバソプレシンの選択的な測定はできない。そこで、AO-BDD 微小電極における選択的かつ連続的な測定を目指した。Figure 3.6 の酸化反応における立ち上がり電位に注目すると、バソプレシンは +0.5 V、オキシトシンは +0.7 V と明確な違いがある。したがって理論的には、+0.7 V よりも小さい電を印加することでバソプレシンのみを測定し、+0.7 V よりも高い電位印加により両者の合計量が測定できる。

そこで、+3.0 V の陽極酸化処理を施した微小電極を用いたフローインジェクション分析を行なった。しかしながら、AD-BDD の場合とは違い、バソプレシンの測定を繰り返すとともにピーク電流の減少

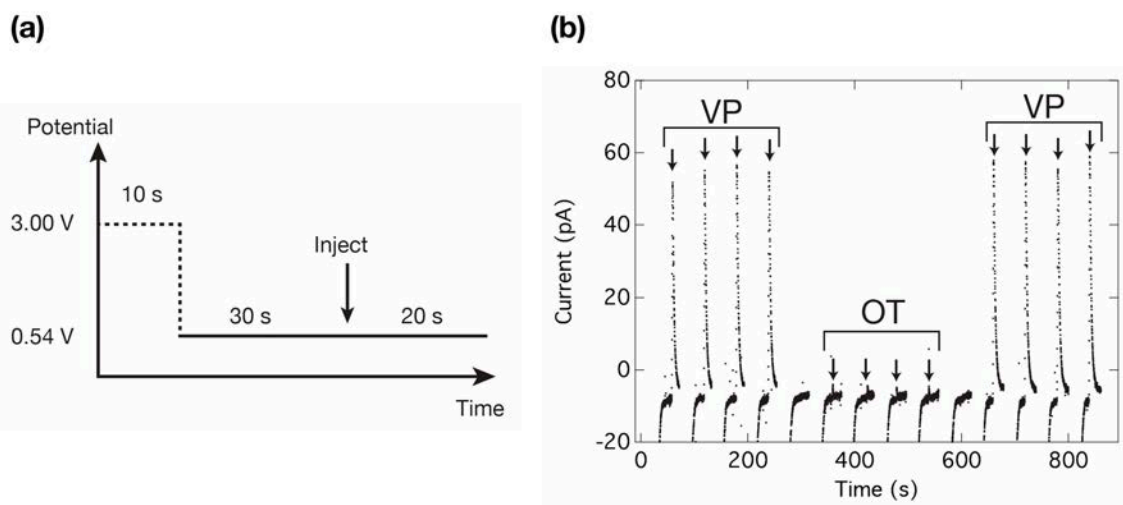


Figure 3.9 Selective detection of vasopressin and oxytocin on BDD microelectrode. (a) Potential step program used for chronoamperometry in the flow injection analysis system. (b) Consecutive signals in the selective detection of 10  $\mu$ M vasopressin and 10  $\mu$ M oxytocin using Tris (pH 7.4) as the buffer. Arrows indicate timings of sample injection. Note that there are two blank recordings between the vasopressin and oxytocin injections.

が見られた。4回の連続したインジェクションによって5%以上シグナルが減少した。シグナル減少の原因のひとつとして、静電的相互作用によるバソプレシンのBDD表面への吸着が考えられる。

高電位での陽極酸化は、BDD表面に吸着した物質を分解して電極感度を回復する効果があることが知られている[52]。そこで、測定電位前に+3.0 Vの陽極酸化処理電位を与え、再現よいシグナルが得られるために必要な陽極酸化時間を10秒から60秒の間で検討した。その結果、+3.0 Vを10秒間印加することで、安定したピーク電流が得られた。したがって、+3.0 V 10秒間を前処理に用いた。

続いて、バソプレシンのピーク電圧である+0.6 V付近(Figure 3.5b)で、測定電位の最適化を行なった。+3.0 V 10秒間の前処理後、電圧を+0.6 Vにステップした30秒後にサンプルをインジェクトした。インジェクト後の20秒間の待ち時間も含めると、1測定に要する時間は60秒であった(Figure 3.9a)。この測定を各サンプルに関して4回ずつ行なった。サンプルはバソプレシン、オキシトシン、そして再度バソプレシンをインジェクトし、各サンプル間にはブランク溶液のインジェクションを挟んだ。+0.50 Vから+0.60 Vまで測定電圧を変化させた結果、+0.54 V以下でオキシトシンのシグナルが抑えられ、バソプレシン選択的な測定が可能になることがわかった。Figure 3.9bに、測定電圧+0.54 Vにおける、バソプレシンとオキシトシンの測定結果を示す。バソプレシンをインジェクションした場合には明瞭なシグナルが観測されたのに対して、オキシトシンの場合は得られたシグナルはバソプレシンの7%程度と小さく、AO-BDD微小電極を用いることでバソプレシンとオキシトシンの選択的測定の可能性を示した。

言うまでもなく、オキシトシンのみが分泌される、あるいはオキシトシン濃度のみが変化するような系の場合には、Figure 3.8で示したようなAD-BDD微小電極における定電圧測定でオキシトシンの測定が可能である。さらに、AO-BDDを併用することで、バソプレシンとの選択性の問題を克服しうる。いずれにせよ、脳内におけるオキシトシンのその場測定は未だ達成されておらず、BDD電極を用いたオキシトシンのリアルタイム測定は、神経伝達物質としてのオキシトシンの働きを研究するための有用な方法になりうるだろう。

### 3.5 まとめ

BDD 電極を使った生体内物質の検出を目的とし，母子間の愛着行動との関連など興味深いはたらきが報告されている神経伝達物質オキシトシンの測定に取り組んだ．サイクリックボルタンメトリーの結果，+0.7 V にオキシトシンの酸化ピークが観測された．オキシトシンを構成するアミノ酸のうち，チロシンが電気化学的に活性であることが知られている．また，チロシンとオキシトシンのボルタモグラムを比較した結果，両者で同様の電気化学的挙動を示した．したがって，オキシトシンの反応はチロシンの酸化反応に由来すると考えられる．

続いて，生体内測定を想定して BDD 針状微小電極を作製し，フローインジェクション分析によるオキシトシンの連続測定を行った．AD-BDD での定電位測定の結果，オキシトシン濃度とピーク電流値との間に高い直線性が得られ ( $R^2 = 0.995$ )，オキシトシンの連続かつ定量的な測定の可能性が示された．なお，この時の検出限界は 50 nM ( $3\sigma$ ) であった．

目標とする脳内での測定を踏まえると，測定妨害物質となるペプチド，バソプレシンもチロシンを含むため両者の選択的測定が必要となる．製膜されたままの水素終端化した BDD (AD-BDD) では両者ともほぼ同一の電気化学的挙動を示したが，陽極酸化により酸素終端化した BDD (AO-BDD) を用いると両者の間に明確な違いが生じた．これは，測定条件の中性条件において両分子が有する電荷の大きさが異なるために，それら分子と負に分極した AO-BDD 表面 との間に働く静電相互作用の効果によるものと考えられる．また AO-BDD 微小電極を用いることで，定電位測定によるフローインジェクション分析において再現性よい選択的な測定を実現し，オキシトシンとバソプレシンの選択的な測定の可能性を示した．

## 第 4 章

# ダイヤモンド電極を基盤とした電気化学 アプタマーセンサーの開発 [139]

### 4.1 はじめに

#### 4.1.1 電気化学アプタマーセンサー

第 3 章では構造の酷似するペプチドホルモンに関して、高電圧印加によりダイヤモンド電極の表面状態を制御することで、それらの酸化電位に違いが生じ、選択的な測定が可能になることを示した。こうした知見を通じて、ダイヤモンド電極を用いた直接的電気化学測定は十分に応用に適用できる段階に達したと思われる。特に最近では、新潟大学日比野グループとの共同研究により、聴力や脳波の測定と同時に BDD 微小電極を用いた薬物の連続測定を行い、薬物動態とその生理活性の直接的なモニタリングシステムを構築した [9]。さらに、難聴治療薬として用いられているにもかかわらず内耳への到達が疑問視されているメチルコバラミンに関して、モルモットの内耳と筋組織のニヶ所同時測定を行うことで、メチルコバラミンが内耳へ到達しにくいことをサポートする結果を得た [140]。

このように、系は限られるものの (現在の手法では血液中では測定困難)、ダイヤモンド電極を用いることで電気化学活性分子の生体内連続測定は可能である。ダイヤモンド電極を用いたバイオセンシングにおける現状の課題は、電気化学的に不活性な分子 (電位窓内で酸化も還元もしない分子) をいかに特異的に測定するかである。もちろん電気化学測定を用いている以上、連続的かつリアルタイムな測定手法が望まれる。こうした目的に最も適する手法の一つに、アプタマーを用いた測定手法がある。アプタマーとは、ターゲット分子と特異的に結合する DNA やペプチドのことである。例えば、末端にレドックスプローブを修飾した DNA アプタマーを電極上に固定化することで、レドックスプローブの酸化還元シグナルの増減からターゲット分子の量を測定することができる [141]。こうしたセンサーは電気化学アプタマーセンサーと呼ばれ、試薬やメディエーターを系中に加えることなく、特異的・可逆的・リアルタイム・連続的なその場測定を可能とする [142, 143]。

#### 4.1.2 ダイヤモンド電極上への DNA の吸着

これまでに DNA の BDD 上への固定化は、アリルジアゾニウム塩の電解グラフトとそれに続くアミド縮合 [143]、あるいはアジド/アルキンのクリック反応 [69] を用いて達成されてきた。これらの手法は電気化学分析にとって有用な手法であるものの、煩雑かつ複数ステップが必要であり電極の処理方法としては望ましいとは言えない。一方で、DNA の直接的電気化学測定の際に、DNA が BDD 表面に



強く吸着することが以前に報告されている [144]. DNA の BDD 上への吸着は, DNA 骨格の負電荷と BDD 表面の正分極との間に働く静電気力に由来すると考えられている. 強い吸着のメカニズムはまだ不明確であるものの, そうした吸着は BDD に特有のものであると思われる. また予備実験において, DNA アプタマーが BDD 上へ吸着することを確認した. さらに, その吸着は繰り返しの測定にも耐えるだけの強さを有し, 電気化学アプタマーセンサーの挙動を示すことがわかった.

### 4.1.3 概要

本章では, DNA アプタマーの BDD 表面への吸着を利用して作製した BDD 電気化学アプタマーセンサーの性能を評価する. 化学療法剤として用いられるドキソルビシン (DOX) に特異的なアプタマーの挙動はよく研究されているため [26, 145, 146], DOX をターゲット分子に選んだ. アプタマーが吸着した BDD と DOX との間に特異的な相互作用が見られ, それに伴いアプタマーに修飾されたプローブ分子の電気化学シグナルが変調した. アプタマーの吸着は複数回の測定, さらには超音波洗浄にも耐えるだけの強度を持つことがわかった. ターゲット特異的なシグナル変調は金およびグラッシーカーボン電極では見られなかったことから, 強く安定なアプタマーの吸着は BDD 特異的であることを示した. シグナルの測定速度依存性から, センサーのメカニズムを考察した. 感度は金電極の電気化学アプタマーセンサーには及ばないものの [26], 検出下限と検出上限は DOX のヒト血液中治療域と互角であった. DNA の BDD 表面への吸着は, アプタマーセンサー作製のための新たな手法と言える.

## 4.2 DNA アプタマーのダイヤモンド電極上への吸着

本章で使用した DNA アプタマーは Biosearch Technologies (USA) にて合成された下記の塩基配列を持つ DNA である。



この塩基配列は DOX との相互作用によりヘアピン構造を形成すると考えられている [145]。その構造変化を電気化学的に捉えられるよう、3' 末端はメチレンブルー (MB) で修飾されており、ターゲットの有無で MB の電子移動速度が変調することを狙っている [26]。なお、レドックスプローブとして MB を用いているのは、生体内において長時間安定したシグナルを与えるからである [147]。また、MB は約  $-250$  mV (vs. Ag/AgCl) という酸化還元電位を持つが、この電位は生体内液において妨害物質が極めて少ない電位領域に収まっていることも、MB をレドックスプローブとして選択した理由である。

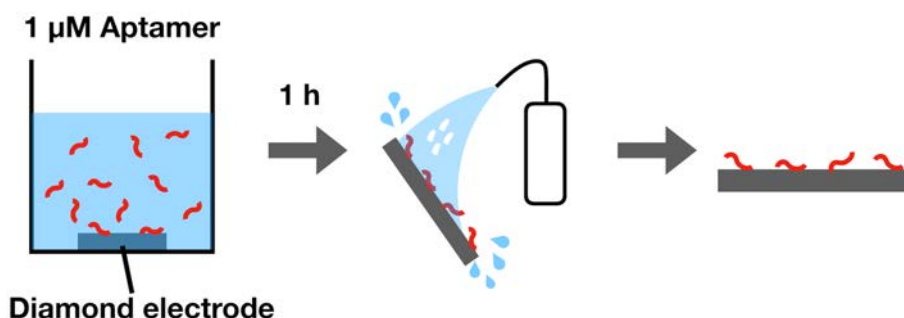


Figure 4.1 Schematic illustration of the preparation of a BDD electrochemical aptamer sensor.

Tris-EDTA バッファー (pH 8.0) の  $4 \mu\text{M}$  アプタマー溶液は  $100 \mu\text{L}$  ずつ小分けにして  $-20$  度で保存した。各実験の直前にアプタマー溶液を溶かし、PBS (pH 7.4) にて  $1 \mu\text{M}$  に希釈して用いた。BDD 電極は純水中 5 分間の超音波洗浄後、電気化学セルに固定し、電極表面を覆うようにアプタマー溶液を滴下した ( $100 \mu\text{L}$  以上)。蒸発による濃度の変化を抑えるため、電気化学セルはパラフィルムで蓋をし、さらにセルを密閉容器に入れて任意の時間静置した。最後に純水で 60 秒間リンスすることで、DNA アプタマーが吸着した BDD 電極を得た (Figure 4.1)。

DNA アプタマーの存在は MB の還元シグナルにより判定ができる。まず、アプタマー溶液へのディップ時間によるアプタマー吸着量への影響を確かめた。ディップ時間を 5-360 分間まで変化させた時に得られた、MB の還元シグナルの推移を Figure 4.2a に示す。10 分もすれば吸着は飽和に達し、それ以降はおおよそ同程度の吸着量に留まっていることがわかる。したがって、以降では余裕を持たせて 30 分間以上のディップをアプタマーの吸着処理に用いた。アプタマーの吸着は CV 測定における MB シグナルの走査速度依存性からも示された。ピーク電流は走査速度に比例したことから、MB は電極表面に固定化されていることがわかる。なお、ピーク面積から吸着したアプタマーの量を見積もると、おおよそ  $10^{12} / \text{cm}^2$  のオーダーであった。

続いて、このアプタマー吸着電極において、DOX の有無による MB シグナルの変化を調べた。Figure 4.2b に、 $1.7 \mu\text{M}$  DOX および DOX なしの場合の SWV の結果を示す。DOX の存在により MB の還元ピーク電流が減少し、再度 DOX のない PBS に浸すとピーク電流に回復が見られた。用い

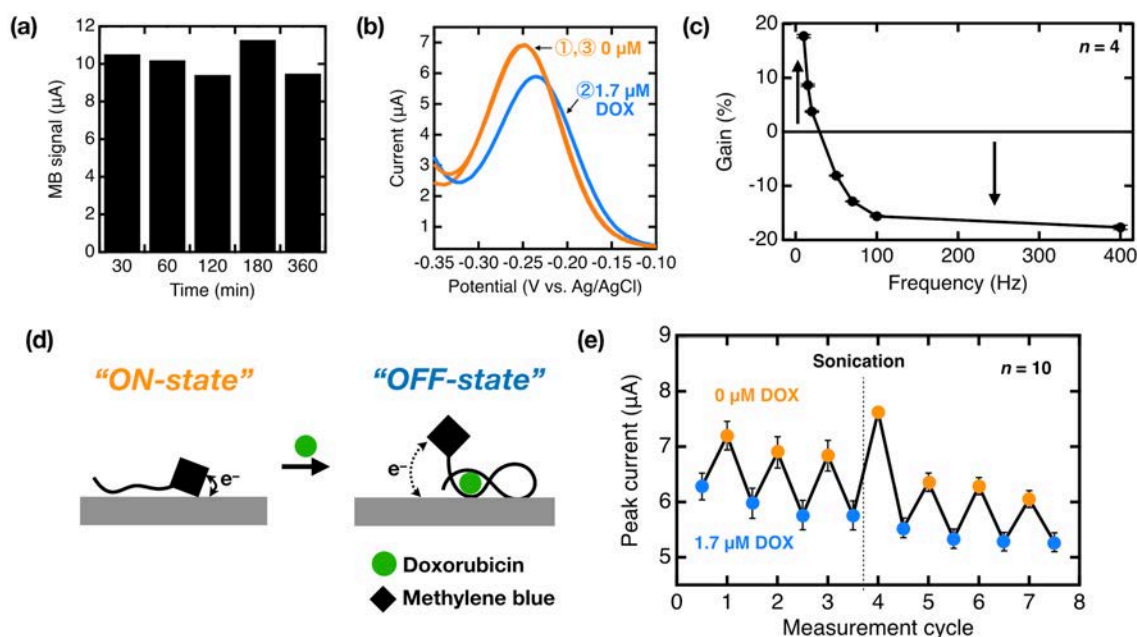


Figure 4.2 SWV measurements on BDD electrodes treated by dipping into an aptamer solution. (a) Dependence of the reduction signal of MB on the dipping time (30–360 min). (b) A reduction signal of MB for 1.7  $\mu\text{M}$  DOX solution. (c) Signal gains in SWV for 1.7  $\mu\text{M}$  DOX measurement. A negative gain was obtained in high frequency measurements. The gain increased to positive values with decreasing frequency. (d) A schematic illustration of how the BDD E-AB sensor works. (e) Repeatability of the sensor response was examined with repetitive measurements of 1.7  $\mu\text{M}$  DOX (odd numbers) and 0  $\mu\text{M}$  DOX (even numbers). Sonication treatment for 3 min in PBS was performed at the dotted line. SWV by EmStat3+.

ているアプタマーは DOX と特異的に結合し、構造を大きく変化させることが知られている。電極上に吸着したアプタマーも同様にターゲット分子である DOX と結合をし、その結果として MB の還元ピーク電流に変化が見られたと仮定すると、DOX の存在により MB が電極表面から遠ざかったと考えられる。その結果として、DOX が存在する場合にピーク電流が減少した。

このメカニズムの正当性を確かめるために、SWV における印加波形の周波数依存性を調べた。電極表面に固定化されたレドックス種に関して、酸化還元電流は SWV の周波数に依存することが知られている [148]。具体的には、レドックス種が電極に近づくとき、高い周波数では電流値が増加し、逆に低い周波数では電流値が減少する。これは、SWV の一つ一つをクロノアンペロメトリーに見られるような電流推移と対応させることで分かりやすくなる (Figure 4.3a)。クロノアンペロメトリーにおいて、電位ステップ後の電子移動は電極表面に近いレドックス種ほど迅速に生じる。したがって、ある時間を境に、レドックス種が遠くに位置する場合の電流推移が、表面近くに位置するレドックス種由来の電流推移を超える。一方で、SWV における周波数は電位ステップ後にどの段階での電流値をピックアップするかに対応する。周波数が高いということは、ステップ直後の早い段階での電流値を測定することに対応する。したがって、電極とレドックス種の距離が近づくとき、高周波数では電流値が増加することになる。

このように、SWV の周波数依存性を調べることで、レドックス種の電極からの距離が相対的に評価することが可能になる。Figure 4.2c に、下式により計算したシグナル gain の SWV 周波数依存性を

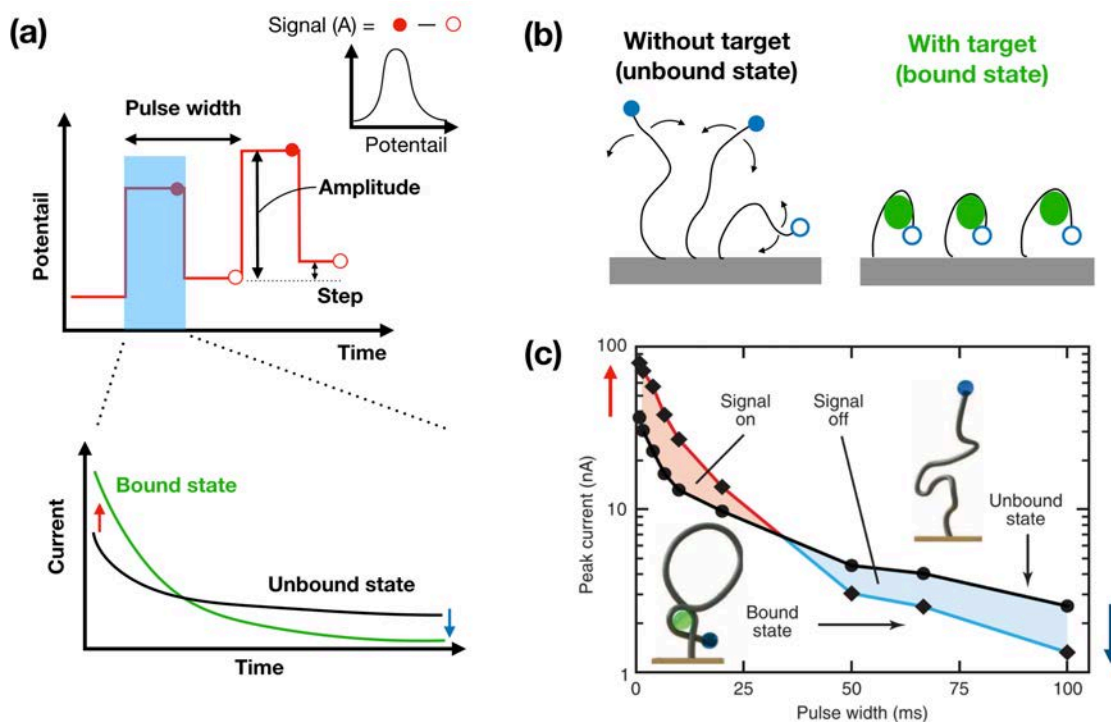


Figure 4.3 Pulse width dependence of SWV signals of redox molecules immobilized on electrodes via DNA aptamer. (a) Potential steps used in SWV and general behavior of current decay in the single potential step. The more firmly the position of the redox probe is fixed via an aptamer, the faster the current decay is. (b) Schematic illustration of the expected aptamer-redox behavior on a gold aptamer-sensor with and without a target molecule. (c) Actual pulse width dependence of signal current on a gold aptamer-sensor. (c) reprinted from [26] with permission from AAAS.

示す。

$$\text{Gain}(\%) = \frac{I_p - I_{p,0}}{I_{p,0}} \times 100 \quad (4.1)$$

ここで、 $I_p$  は DOX サンプル中でのピーク電流値、 $I_{p,0}$  はバックグラウンド溶液中でのピーク電流値である。明瞭な周波数依存性が見られ、高周波数側で負の gain を、低周波数側で正の gain を示した。この結果からも、DOX の存在により MB が電極表面から遠ざかっていることがわかる。なお、これは金電極アプタマーセンサーで見られる周波数依存性とは逆の傾向である (Figure 4.3b,c).

以上の結果を踏まえて、Figure 4.2d に本センサーの推定メカニズムを示した。本研究で使用している BDD は 2 で述べたように CVD プロセスで成膜されている。成膜されたままの BDD は水素終端化していることが知られている [149, 150]。その表面は、水素原子と炭素原子の電気陰性度の違いにより正に分極していると考えられている。数 nm のダイヤモンド分散液を用いた実験により、そうした還元的な表面を有するダイヤモンドは正の表面電位を持つことが示されている [151]。こうした正に分極したダイヤモンド表面と、DNA の骨格が持つ負電荷の間にはたらく静電気力によりアプタマーが BDD 表面に吸着していると考えられる。実際に、BDD 表面を酸化処理することでアプタマーの吸着量に減少が見られた (Figure 4.4)。

アプタマー吸着 BDD 電極は、アプタマーに修飾された MB のシグナル変調により電気化学アプタマーセンサーとして機能する。ターゲットが存在しない場合、アプタマーは電極上に多点の静電的相互

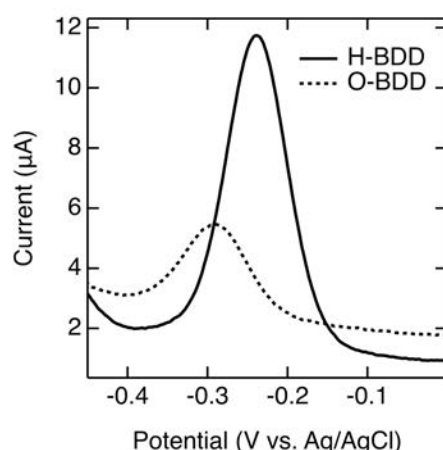


Figure 4.4 Comparison of an SWV signal in PBS at BDD without any treatment (H-BDD) and BDD treated by oxygen plasma (O-BDD). Both electrodes were dipped in 1  $\mu$ M aptamer solution for 1 h. Oxygen plasma treatment: 2 min, O<sub>2</sub> 30 sccm, 100 W, PR301, Yamato Scientific Co., Ltd., Japan. SWV, 70 Hz, by EmStat3+.

作用で吸着した「寝そべった」状態にあるため、大きな MB のシグナルを与える (“ON-state”). アプタマーがターゲットと結合すると、アプタマーの構造変化に起因して MB と BDD 表面との距離が増加し、電子移動が遅くなる (“OFF-state”).

Figure 4.2e は DOX の繰り返し測定に対するセンサー性能の評価結果である. 1.7  $\mu$ M DOX とバックグラウンド溶液中で交互に 3 回ずつ SWV 測定を行い、ピーク電流をプロットした. 各測定後、軽い共洗いをしてから新しい溶液へ交換している. DOX サンプルにおいてシグナルの減少が見られ、バックグラウンド溶液中ではシグナルは回復した. PBS 中での 3 分間の超音波洗浄をした後も、大きな減少なくシグナルが推移した. この結果から、アプタマーの吸着は繰り返しの測定、さらには超音波洗浄にも耐えうるだけの強さを有することがわかった. なお、全体的なシグナルの低下は、DOX の BDD 表面への吸着に起因すると思われる.

続いて、金電極とグラッシーカーボン電極においても同様の実験を行った. 金電極においてもアプタマー溶液へのディップ後に MB の還元シグナルがはっきりと観測されたものの、シグナル強度は DOX 濃度に依存せず、測定を繰り返すほどに減少した (Figure 4.5a). 特に DOX 溶液中での測定後に減少が大きかったことを踏まえると、アプタマーと金電極の相互作用は DOX とアプタマー間の相互作用よりも弱く、測定間のリンスによって金電極表面上のアプタマーが減少すると思われる. この結果から、金電極表面へのアプタマーの吸着は、センサーとして機能するだけの安定性に欠けていることがわかった.

グラッシーカーボン電極では、MB の還元シグナルは DOX の有無に関わらず極めて小さかった (Figure 4.5b). グラッシーカーボンの表面には -OH, -C=O, -COOH など様々な官能基が存在することが知られている [152]. そうした酸素を含む官能基、特に -OH と -COOH は DNA の吸着を阻害することが知られている [153, 154]. それに対し、先にも述べたように BDD の表面には酸素官能基は少なく水素で終端化されている. この均質な BDD の表面構造が、DNA と電極の間の強く再現性の高い相互作用を生んでいるものと考えられる. 以上より、吸着したアプタマーによるセンサーとしての挙動は、水素終端化した BDD 電極に特異的な現象であると結論づけられる.

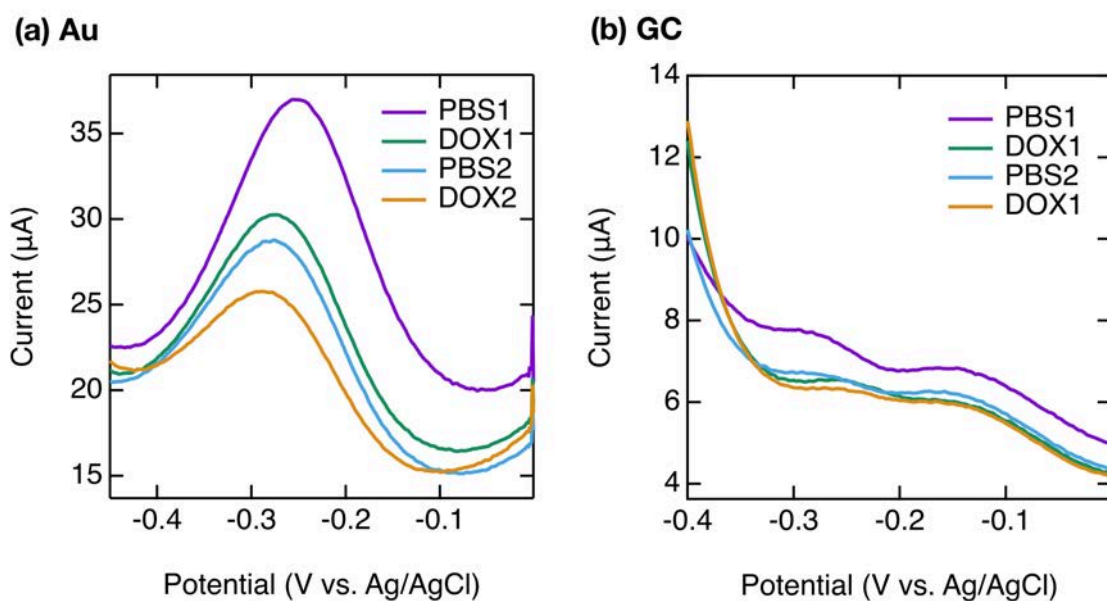


Figure 4.5 SWV on (a) Au and (b) GC electrodes treated by dipping into 1  $\mu\text{M}$  aptamer solution for 1 h. PBS and DOX represent the measurements in 0  $\mu\text{M}$  and 1.7  $\mu\text{M}$  DOX solutions. Measurements were performed in the order mentioned in the annotations (from top to bottom). SWV, 70 Hz, by EmStat3+.

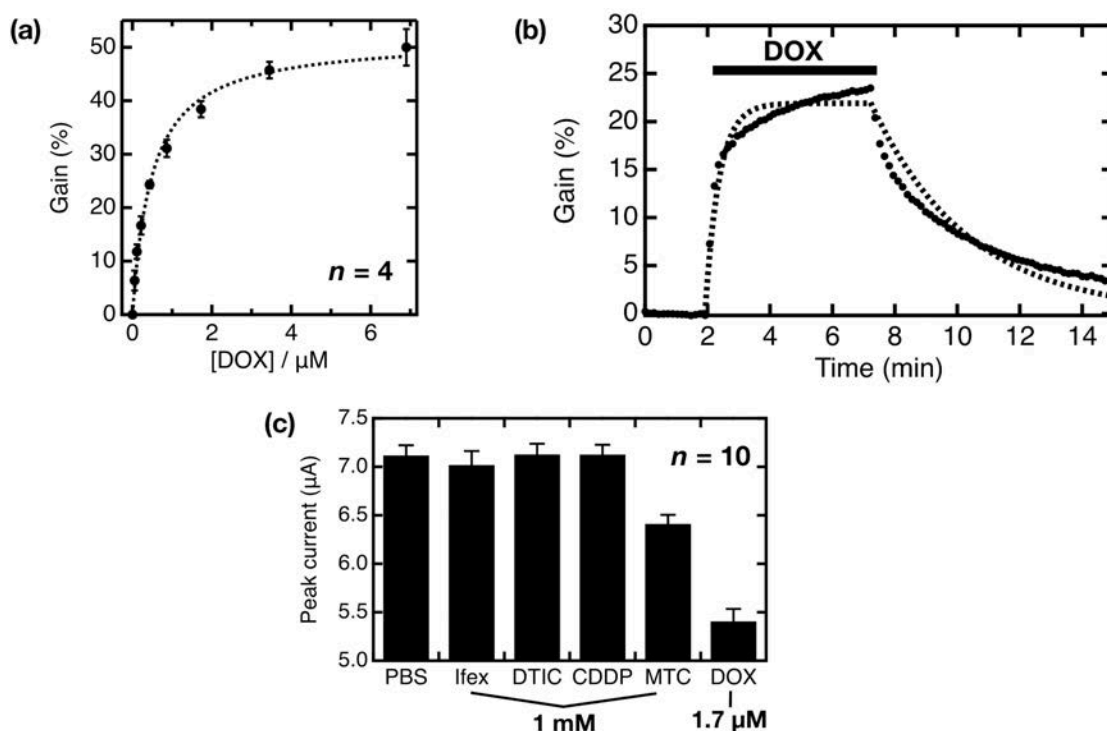


Figure 4.6 (a) Signal gains of the BDD aptamer sensor for the DOX concentration. (b) A time profile of the sensor response to DOX injection; 0.86  $\mu\text{M}$  DOX was flowed for 5 min (indicated as a bar) between PBS flows. (c) A specific response of the sensor to DOX was demonstrated by comparing with the signals of other chemicals. SWV, 70 Hz, by EmStat3+.

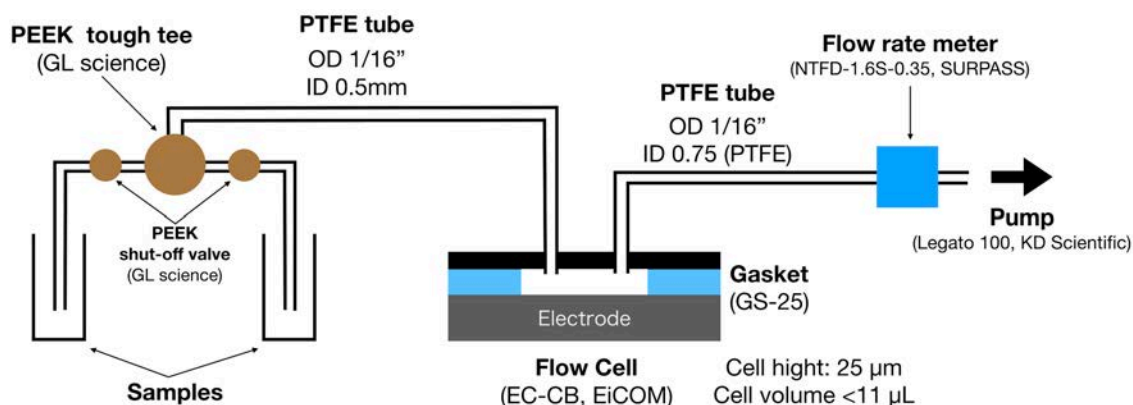


Figure 4.7 Overview of the flow measurement setup. Flow measurements were carried out using the system illustrated above. A flow rate of 10 mL/h (167  $\mu$ L/min) was set in a cylinder pump and monitored by a flow rate meter to verify the flow rate. It takes less than 4 s for the flow to pass the cell volume. The time is enough faster than adsorption/desorption kinetics timescale, leading to reaction limited regime. Flowing sample was switched using two shut-off valves.

### 4.3 電気化学アプタマーセンサーとしての性能評価

DOX 濃度に対する gain の応答を Figure 4.6a に示す. ここではデータを見やすくするために gain は絶対値で示した. したがって, 正の gain は MB シグナルの減少に対応することをここで注意しておく. Gain は 1  $\mu$ M 以下の低濃度域で直線的な応答を与え, 濃度が高くなるに連れて飽和に近づいた. これは物質のある表面への吸脱着に特有の現象であり, 同 Figure の点線は Langmuir の吸着等温式 (次式) へのフィッティング結果を示している.

$$D(c) = \frac{c}{c + K_d} D_{\max} \quad (4.2)$$

ここで,  $D$  は吸着に依存したシグナル,  $D_{\max}$  はシグナルの飽和量,  $K_d$  は平衡解離定数である.  $K_d$  486  $\pm$  49 nM が得られたが, これは同じ塩基配列のアプタマーを使用した金電極での電気化学アプタマーセンサーの値 824 nM よりも小さい. 検出下限と検出上限はそれぞれ 49 nM と 2.3 nM だった. これらの値は金のアプタマーセンサーで得られる値 (10 nM と 10  $\mu$ M) に劣るものの, ヒト血液における DOX の治療濃度域と同程度である [155–157].

私たちの体内におけるは薬剤の濃度は, 薬剤の種類や個人間である時間スケールを持って変化する. したがって, センサーにはその濃度変化を十分にモニターできるだけの感度と時間分解能が要求される. 本センサーが持つ DOX に対する吸脱着速度定数を見積もるために, フロー測定を行った. Figure 4.7 に使用したフローシステムを示す. シリンジポンプで 10 mL/h の速度で引くことで, サンプル溶液を流した. 2 つのバルブを開閉することで, 最上流にある 2 つのサンプルを交互に流すことができる. 電気化学セルは EiCOM 社のフローセルを用いた. 流速はシリンジポンプの手前につけられた微小流量計によりモニタリングした.

0.87  $\mu$ M の DOX 溶液を 5 分間流した時のセンサー応答を Figure 4.6 に示す. 結果は次式に示す

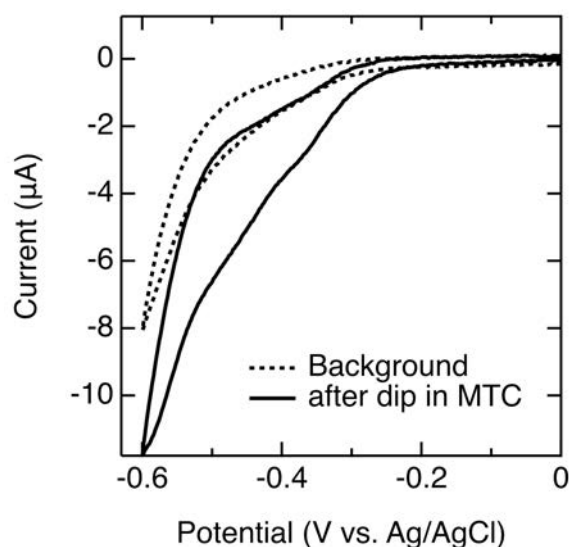


Figure 4.8 Detection of mitomycin C (MTC) adsorption on BDD. Cyclic voltammetry was conducted before (dotted line) and after (solid line) dipping in 0.3 mM MTC solution in PBS (pH 7.4) for 5 min followed by 1 min rinse with flowing pure water. The reduction signal of MTC (around  $-0.45$  V) was observed after the dipping treatment, indicating that MTC adsorbs quite strongly on BDD surface.

one-phase 吸脱着モデルでフィッティングを行った。

$$\text{Adsorption phase: } D(t) = \frac{D_{\max}c}{c + K_d} \left( 1 - \frac{1}{\exp(k_{\text{on}}c + k_{\text{off}}t)} \right) \quad (4.3)$$

$$\text{Desorption phase: } D(t) = D_0 \exp(-k_{\text{off}}t) \quad (4.4)$$

ここで  $D_0$  はシグナル減少直前の  $D$ ,  $k_{\text{on}}$  ( $\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) および  $k_{\text{off}}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) はそれぞれ吸着定数と脱離定数, そして  $t$  は時間である. 実験結果とフィッティング結果の間には明確な違いが生じた. 吸着・脱着ともに, one-phase 吸脱着モデルに当てはまらない遅い応答成分が存在していることがわかる. この結果は, DOX とセンサー表面の相互作用は one-phase ではなく, 複数の吸脱着現象が混在していることを示す. これは, ターゲット分子のアプタマーへの結合が, センサー上で複数のフォールディングパターンを経て生じていること示唆している. BDD 表面へのアプタマーの固定化が特異的な結合ではなく, 多点における非特異的な静電的相互作用を介して行われているため, こうした複雑な挙動は避けることができないと考えられる.

しかしながら, 全体的なセンサーの挙動はフィッティング結果から考察することが可能であろう.  $k_{\text{on}} = 2.25 \mu\text{M min}^{-1}$  と  $K_{\text{off}} = 0.32 \text{ min}^{-1}$  は金アプタマーセンサー ( $k_{\text{on}} = 3.00 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $k_{\text{off}} = 1.5 \text{ min}^{-1}$ ) [26] よりも明らかに小さい値であり, 本センサーの応答が遅いことを示している. 特に脱離定数である  $K_{\text{off}}$  は金アプタマーセンサーの  $1/4$  も小さな値となっている. BDD アプタマーセンサーを用いると, 飽和レベルの 90% のシグナルに達するまでに 2 分以上も要するものの, これは DOX の  $\alpha$ -phase plasma clearance time である 6–26 分 [156] よりも短い. 一方, 脱離に関しては 7 分経ってもシグナルは元のレベルに戻っていない. これらの結果は, DOX-アプタマー間の相互作用以外に, 遅く強い DOX の BDD 表面への吸着が存在していることを示す. Figure 4.2e における全体的なシグナルのドリフトは同様の現象によるものだと考えられる.

最後に, センサーのターゲット特異性を Figure 4.6c で確かめた. DOX と同時に使用される薬剤で



ある ifosphamide (Ifex), dacarbazine (DTIC), cisplatin (CDDP), そして mitomycin C (MTC) それぞれについて, DOX の 500 倍の濃度にて SWV 測定を行った. Ifex, DTIC, CDDP の MB 還元シグナルはほぼバックグラウンド溶液のそれと同程度であった. 一方, MTC と DOX におけるシグナルはそれぞれ約 10 %, 25 % の減少が見られた. MTC におけるシグナルの減少は MTC の BDD 電極への吸着に由来すると思われる. Figure 4.8 に MTC 溶液にディップ前後における PBS 中における CV 測定の結果を示したが, ディップ後に MTC の還元シグナルが残っていることから, MTC は BDD 電極表面に吸着することがわかる. MTC の電極上への吸着が aptamer-BDD 間の相互作用を阻害しているのだろう. BDD 表面に非特異的に吸着するあらゆる分子に関しても, 同様の効果が生じるはずであり, 再三述べている DOX 測定における全体的なシグナル低下もその一例だと思われる. しかしながら, 低い DOX 濃度に対する大きなシグナル変化を考慮すると, シグナル変調は DOX に特異的であると言える. 以上の議論から, aptamer が吸着した BDD 電極は, 電気化学 aptamer センサーとして機能していると結論づけられる.

#### 4.4 まとめ

DNA aptamer と BDD 表面の静電的相互作用を利用して, BDD 電極を用いた電気化学 aptamer センサーを作製した. DNA の吸着は繰り返しの測定, さらには超音波洗浄にも耐えうるだけの強度を有する. センサー応答は Langmuir 吸着等温式でフィッティングでき, DOX の検出下限 49 nM と検出上限 2.3  $\mu$ M を得た. 金 aptamer センサーには劣るものの, それらの値は DOX のヒト血液中治療域濃度と同程度である. 本研究では総じて, DNA aptamer と BDD 電極は電気化学 aptamer センサーとして用いることのできる有用な組み合わせであることを示した. BDD aptamer センサーにおいて, さらに速い応答速度と高い感度を達成するためには, aptamer の固定化において次の 2 点が求められる.

- 特異的な共有結合を介して aptamer を BDD 表面へ固定化.
- タンパク質などの非特異吸着が少ない表面を BDD 上で実現.

All figures were reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry - [139].

## 第 5 章

# オールダイヤモンド針状微小電極の開発 [158]

### 5.1 はじめに

#### 5.1.1 ダイヤモンド針状微小電極作製における課題

針状微小電極は生体内局所の測定を目指す生体内バイオセンシングには欠かすことのできな電極形状である。BDD 電極が持つ感度・耐久性が針状微小電極にも適用できれば、高感度かつ長時間の生体内バイオセンシングに展開できる [9]。

しかしながら、BDD 針状微小電極の作製には課題が多い。 $\mu\text{m}$  オーダーだけ電極先端が露出するようにポリマー [74–80] やガラス [72, 73, 81, 100] を用いた絶縁を行わなければならない。BDD 自体は優れた電気化学特性を有するにも関わらず、それらの絶縁材料は高電圧印加や強塩基中で不安定であるため、絶縁材料により BDD 電極の性質に制限がかけられてします。これまで本研究では筆者の確立したガラスキャピラリーによる絶縁もその一例だ。

こうした問題を解決するために、“オールダイヤモンド”電極、導電性の BDD が絶縁性の undoped diamond (UDD) で覆われた電極、がいくつかのグループで作製されてきた。UDD で覆われた針状の BDD 微小電極の先端のみを集束イオンビームでカットすることにより、ディスク状の BDD 微小電極が得られる [159]。その他にもオールダイヤモンド針状微小電極に関する報告はいくつか存在するものの [160]、どれもが同様にディスク状である。しかしながら、これらの方法では露出電極面積の制御に限界がある。例えば、神経科学においては、一つの神経細胞の活動をモニタリングする場合には  $20\ \mu\text{m}$  以下の長さが必要になるのに対し、複数細胞からなるユニットを対象にする場合には  $100\ \mu\text{m}$  以上の電極が必要になるため [161]、電極長さの制御も重要になる。電極長さの制御はフォトリソグラフィーを用いることで達成できる [162]。しかしながら、ダイヤモンドのみで  $\mu\text{m}$  オーダーの針状構造を形成する方法は、本研究で用いているようなタングステン線などのサポート材料がないため、生体内に挿入することを踏まえると耐久性には疑問が残る。

#### 5.1.2 新規作製手法の提案

そこで本研究では、オールダイヤモンド針状微小電極の新たな作製手法を考案した。作製の概略を Figure 5.1 に示す。BDD で覆われたタングステン針を用いるのは、2.2 で述べた方法と同様である。まず、最終的に露出させたい先端部分をマスクする。マスク材料として金属を用いることで、電気めっ

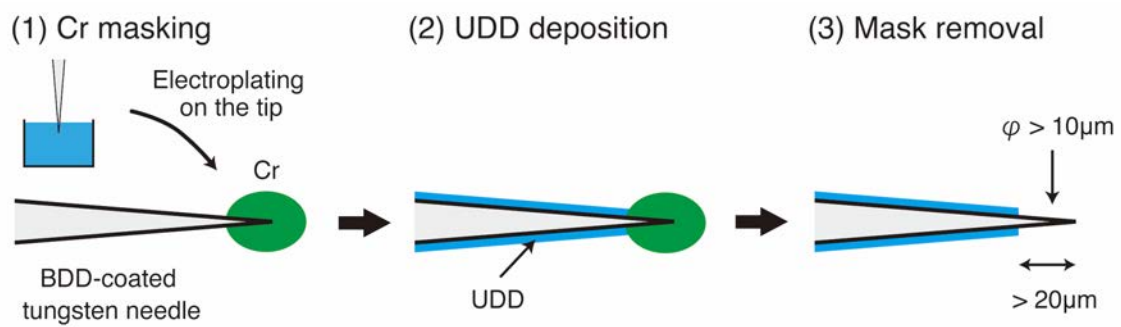


Figure 5.1 Schematic illustration of the fabrication process of diamond microelectrodes.

き浴に浸す長さを変えるだけでマスク長さを制御できる。その上で、UDDを追加成長させ、最後にマスクを除去することで先端のみBDDが露出した針状微小電極が得られる。

本章では、ここで提案した新規作製手法に関する試みと、得られた針状微小電極の評価について述べる。

## 5.2 Step 0: マスク材料の選定

Figure 5.1 で提案した作製手法に取り組むにあたり、まず適するマスク材料を決めなければならない。マスク材料には次の 3 点が必要になる。

- ダイヤモンド成膜時に形状を維持するように、約 1100 度以上の十分な融点を持つ。
- 電気めっきが容易に可能。
- CVD 成膜時にダイヤモンド成長を触媒しない。

表 5.1 に融点の高い順番で金属を列挙した。十分な融点を持つ中で電気めっきが容易にできるものを絞り込むと、ニッケル、コバルト、鉄、そしてクロムが候補になる。この中で、ニッケル、コバルト、そして鉄はダイヤモンド成長の触媒作用を持つことが知られている [163]。実際に、ニッケルをマスクとして Figure 5.1 の作製プロセスを行なった結果を Figure 5.2 に示す。ニッケルの電気めっき浴に BDD 針状微小電極の先端のみを浸してめっきを施した (Figure 5.2a) のち、UDD を追加成長した結果が Figure 5.2b である。見た目からもわかるように、マスク部分も含めた電極全体が多結晶体で覆われた。ニッケルマスクされていた先端部分の Raman スペクトルを見ると、電極本体部分で得られた (Figure 5.2c) のと同様に  $1332\text{ cm}^{-1}$  ダイヤモンドに由来するピークが鋭く立ち上がっていたことから、ニッケル上にも UDD が成長したことがわかった。したがって、ニッケルはダイヤモンド成長を触媒することが改めて示され、ニッケルはマスクとして機能しないことがわかった。

そこで、消去法的にクロムをマスク材料として選定した。

Table 5.1 List of metals having high melting points enough for CVD process. Metals appropriate for electrodeposition were shown in bold.

Metals	Melting point ( $^{\circ}\text{C}$ )
W	3407
Os	3045
Ta	2985
Mo	2623
<b>Ir</b>	2443
<b>Cr</b>	1857
<b>Pt</b>	1769
Ti	1666
Tm	1545
<b>Fe</b>	1536
<b>Co</b>	1495
<b>Ni</b>	1455

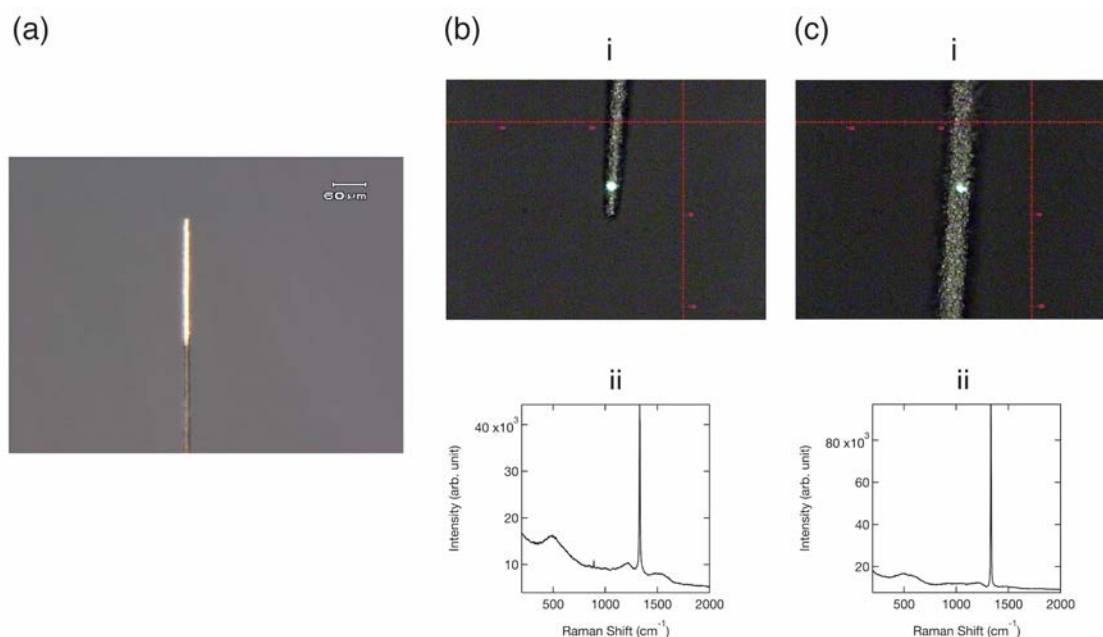


Figure 5.2 (a) Picture of BDD microelectrode masked by Ni on the tip. Tip (b) and body (c) were evaluated after UDD deposition by Raman spectroscopy. (i) show the observation spot and (ii) are the Raman spectra at each spot.

### 5.3 Step 1: 電気めっきによる導電性ダイヤモンド上へのクロムマスクの作製

まず初めに、クロムの電気めっきにおいて一般的に用いられる Sargent 浴 (250 g/L 三酸化クロム, 2.5 g/L 硫酸, 50 度) を用いた。クロムの電着は見られたものの、再現性が悪く茶色の残渣も見られた (Figure 5.3ab)。この原因として次の 2 点を考えた。

- めっき浴表面の振動
- 電極上への水滴の生成

めっき浴表面の振動をなくすことは、安定な電着を行う上で重要になる。そこで、表面積を小さくすると表面張力により液体は固定化される現象を用いた。内径が 4 mm のプラスチックシリンダーを電気化学セルに垂直に設置し、シリンダーから上に凸の球面になるようにめっき浴を満たした (Figure 5.4a)。この状態で電着を行なったものの、再現性に向上は見られなかった。

電着中にめっき浴付近を詳細に観察したところ、めっき浴付近で電極上に水滴が生じていることがわかった (Figure 5.4b)。これは、残渣生成の原因の一つだと思われる。したがって、これ以降のクロム電着は室温にて行うこととした。室温であっても、十分なクロム電着の確認ができた。例えば、20–50  $\mu\text{m}$  電極をめっき浴に浸し、 $-40 \mu\text{A}$  を 120 秒間与えたところ、7  $\mu\text{m}$  以上もクロムが電着した。この成長速度は約 3  $\mu\text{m min}^{-1}$  であり、一般的な Sargent 浴の成長速度 10–25  $\mu\text{m h}^{-1}$  よりも格段に速い。この速い成長速度は、微小電極に特有な 3 次元拡散によりクロムイオンの物質輸送が向上したためであると思われる。なお、エネルギー分散型 X 線分光測定による元素マッピングの結果からも、電着

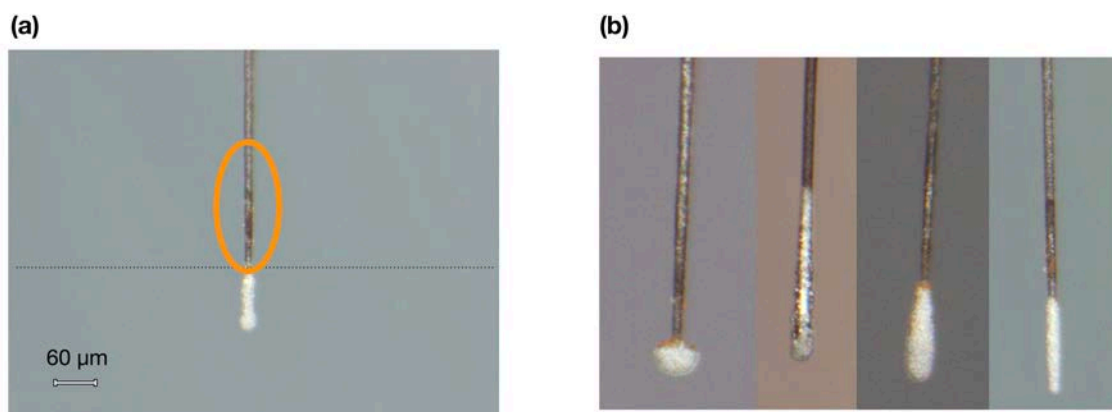


Figure 5.3 Resulted Cr deposition on BDD needles. (a) Brownish residue (circled part) was observed above dipping area (below the dotted line). (b) Cr deposition was unstable among different trials.

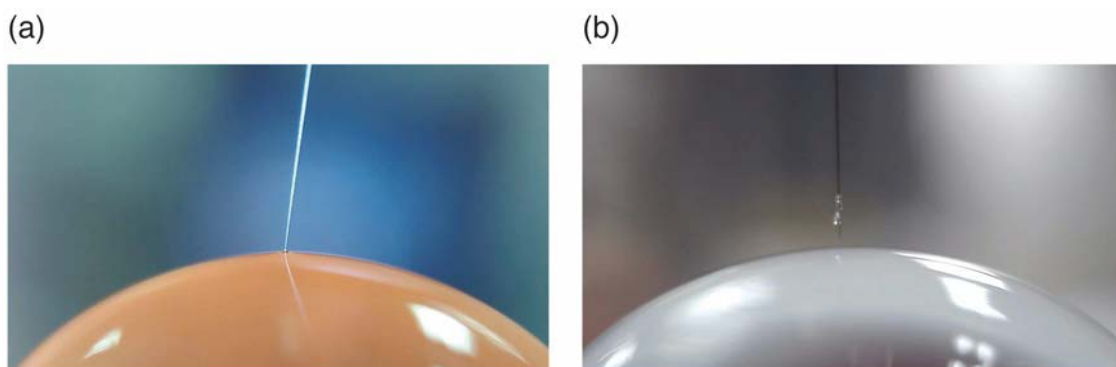


Figure 5.4 Improvements in Cr electrodeposition. (a) Cr electrodeposition was conducted in convex-shaped Sargent bath in order to obtain still surface. Water droplets appeared on the electrode tip when the bath temperature was 50°C (b). Experiment in (b) was conducted using water.

物がクロムであることが示された (Figure 5.5).

しかしながら、 $-40 \mu\text{A}$  の陰極還元 (Figure 5.6a) だけでは再現良い電着が得られなかった。具体的には、陰極還元を繰り返すごとに電着がしにくくなった。そこで、 $+40 \mu\text{A}$  3 秒の陽極酸化を電着前に取り入れる (Figure 5.6b) と安定した電着が可能になった。この現象の詳細な分析は行っていないものの、電極表面において Cr (III) が過多になったことが原因の一つとして考えられる。クロムの金属上への電着は、基板に Cr (III) を含有する膜の形成を経て生じ、Cr (VI) と Cr (III) の比が Cr 電着において重要な役割を果たすことが知られている [164]。度重なる陰極還元によりめっき浴中の Cr (III) の割合が増加し、微小電極の近傍で Cr (VI) と Cr (III) のバランスが崩れたのだと思われる。

## 5.4 Step 2: 絶縁性ダイヤモンドの追加成長

Cr の電着後、純水で微小電極をリンスし、UDD 成膜に移った。UDD の成膜条件は、ホウ素源を導入しない以外は BDD の成膜条件と同一にて行なった。UDD の成膜前は、高濃度ホウ素ドープダ

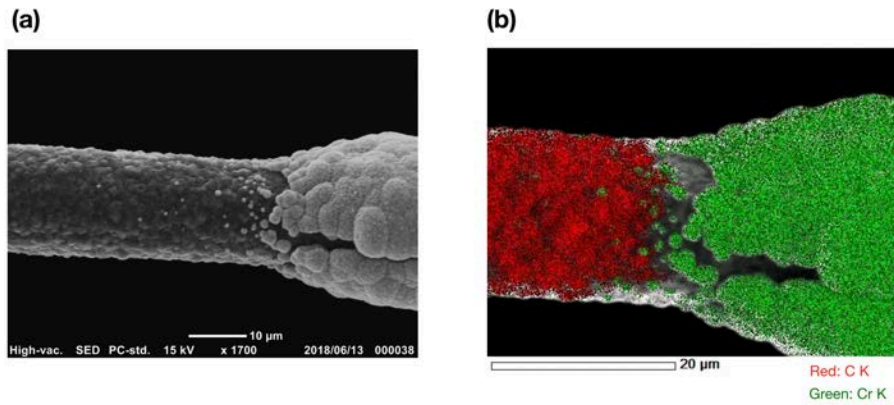


Figure 5.5 (a) SEM and (b) EDS image of a Cr-deposited BDD microneedle. JCM-6000Plus, JEOL.

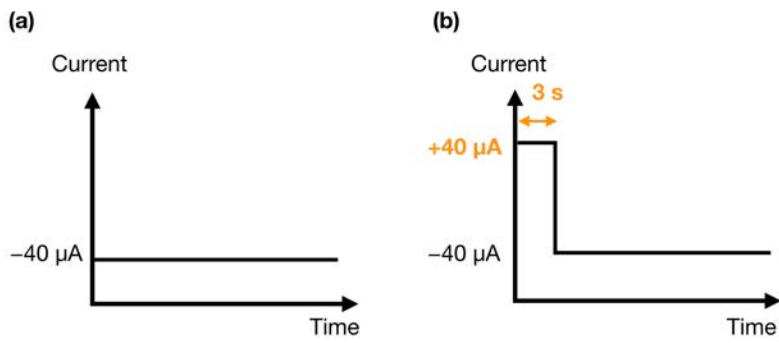


Figure 5.6 Improvements in applying current step for the Cr deposition. Stable Cr deposition was obtained by changing electrodeposition condition from (a) to (b).

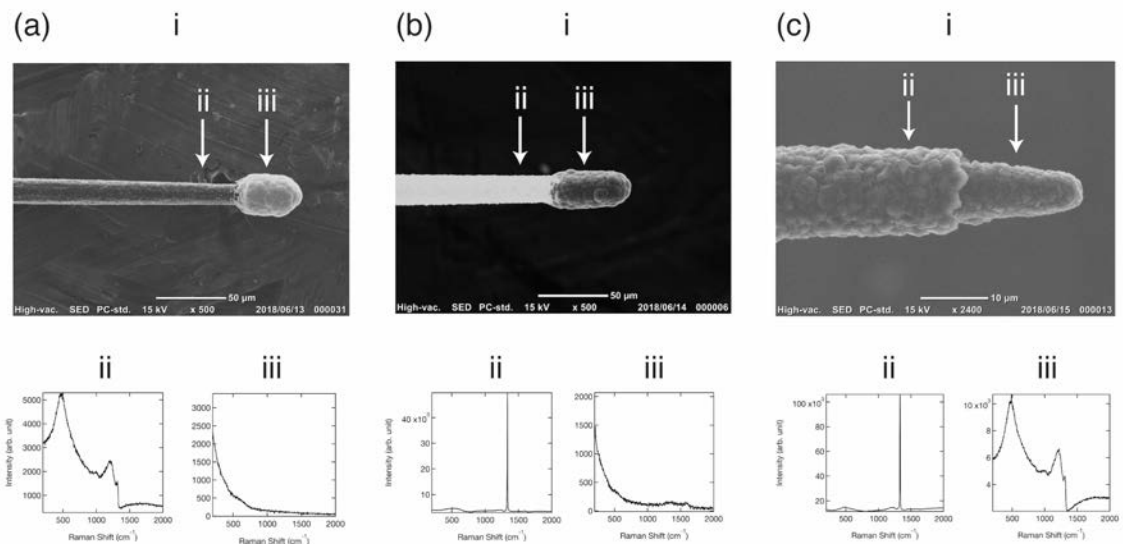


Figure 5.7 Evaluation by SEM (i) and Raman spectroscopy (ii and iii) at each step of the electrode fabrication process. (a), (b), and (c) correspond to (1), (2), and (3) in Figure 5.1, respectively. The regions analyzed by Raman spectroscopy are indicated by arrows in the SEM images.

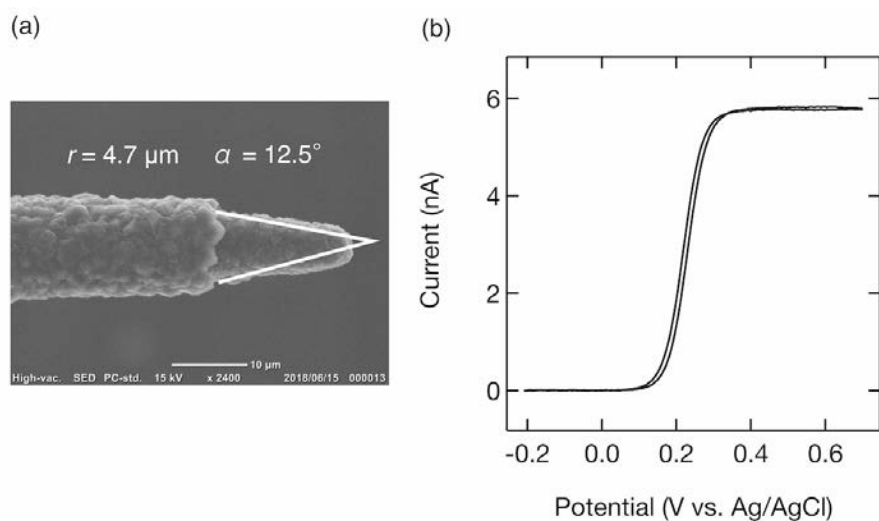


Figure 5.8 Electrochemical evaluation of UDD insulation. Cyclic voltammogram of 1 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$  in 0.1 M KCl (b) using an all-diamond microelectrode (a). The electroactive surface area was estimated using a cone to represent the tip as shown in (a).

ダイヤモンドに特有な Raman シグナルが得られていた (Figure 5.7aii).  $1332 \text{ cm}^{-1}$  はダイヤモンドの zone-center 光学フォノンに、 $500 \text{ cm}^{-1}$  と  $1200 \text{ cm}^{-1}$  付近のブロードなバンドはホウ素ドーブによるダイヤモンド構造中の Raman 禁制帯の緩和によるシグナルに帰属される [82, 83, 165]. UDD の成膜後は  $1332 \text{ cm}^{-1}$  のダイヤモンド構造に由来するピークのみ強度が強くなったことから (Figure 5.7bii), UDD の成長が確認できた. ホウ素ドーブによるシグナルも小さいながら見えているが、これは UDD 膜が  $2 \mu\text{m}$  ほどと薄く透明性が高いことによるとと思われる. また、マスク部分 (iii) にはそうしたダイヤモンド由来のシグナルはほとんど見られなかったことから (Figure 5.7biii), クロムがマスク材料として使用可能であることも示された.

## 5.5 Step 3: クロムマスクの除去

電極作製の最終ステップとして、クロムマスクの除去を試みた. 10 % HCl 水溶液に 30 分間以上浸漬したものの Cr マスクは除去されなかった. UDD 成膜後のクロム部分の Raman スペクトル (Figure 5.7biii) を見ると、 $1350 \text{ cm}^{-1}$  と  $1590 \text{ cm}^{-1}$  に微弱なシグナルが見られるが、これらはグラファイト構造に帰属される. そうしたシグナルを示すグラッシーカーボンやグラファイトなどの炭素材料は耐酸性を持つため、希塩酸ではクロムが除去できなかったものと思われる. 一方、それら  $\text{sp}^2$  炭素成分は電気化学的な高電圧印加により容易に構造が破壊されることが知られている [99]. Figure 5.7c に、UDD 成膜後の微小電極に対して 1 M HCl 中で  $+3.0 \text{ V}$  の陽極酸化を施した後の SEM 像および Raman スペクトルを示す. クロムマスクが除去され、マスクされていた部分とそれ以外の部分に段差が見られる. マスクが除去された部分の Raman スペクトルを見ると (Figure 5.7ciii), 下地 BDD 膜の Raman スペクトル (Figure 5.7aii) と類似していることから、マスクが除去されて BDD 膜が露出したことがわかる.



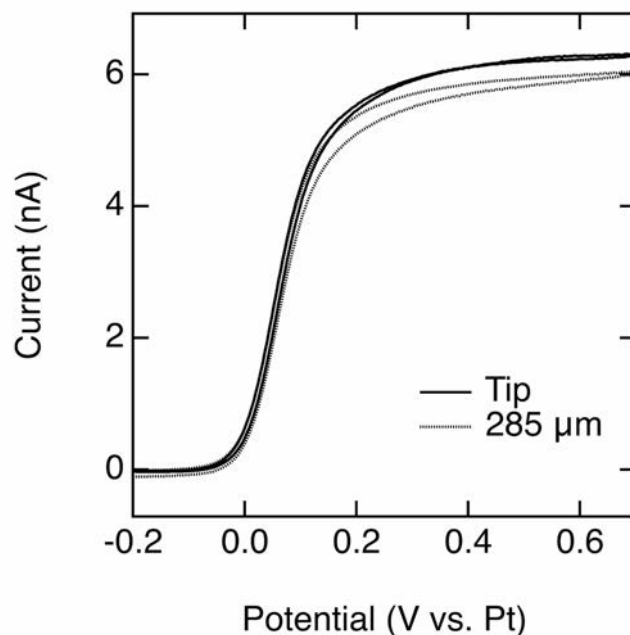


Figure 5.9 i

n 0.1 M KCl with different dip length.] Cyclic voltammograms of 1 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$  in 0.1 M KCl with different dip length of only tip (ca. 20  $\mu\text{m}$ , solid line) and 285  $\mu\text{m}$  (dotted line). Measurements were taken in the same set up as Figure 5.4. In order to monitor the dip length, two electrode system with platinum as counter/reference electrode was used. CV linear scan, scan rate 0.1 V/s, by ALS852Cs.

## 5.6 電気化学特性の評価

以上より目的の電極が作製できたため、最後に電気化学的な特性を評価した。Figure 5.8b に、1 mM フェロシアン化カリウムの 0.1 M KCl 溶液中における、オールダイヤモンド微小電極 (Figure 5.8a) のサイクリックボルタモグラムを示す。微小電極に特有な定常電流 5.8 nA が得られた。一方、円柱状微小電極における理論的な定常電流  $i_{\text{ss}}$  は次式で与えられる [166]。

$$i_{\text{ss}} = \frac{2}{\pi} \sqrt{1 + \cot^2 \alpha} n F d c r 2\pi \quad (5.1)$$

ここで、 $r$  は底面の半径、 $\alpha$  は円柱の半角であり、その他は一般的な値である。円柱の形状は、Figure 5.8a の白線で示された形状で近似した ( $r = 4.7 \mu\text{m}$ ,  $\alpha = 12.5^\circ$ )。フェロシアン化カリウムの拡散係数として  $D = 0.667 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [166] を用いると、理論的な定常電流値として 5.6 nA が得られる。幾何面積の近似はおおよそのものではあるものの、定常電流値について理論的な値と実測値に良い一致が得られたと言える。また、浸漬長さを変えた場合にも、定常電流に大きな変化は見られなかった (Figure 5.9)。これらの結果より、UDD は絶縁材料として機能し、オールダイヤモンド針状微小電極の作製に成功した。

## 5.7 まとめ

オールダイヤモンド針状微小電極のための新たな作製手法を提案した。金属マスクとしてクロムをBDD針状微小電極に電着したのち、UDDの成膜と陽極酸化によるマスクの除去を行なった。電気化学測定の結果、幾何面積とレドックスシグナルから見積もった電極面積との間に良い一致が見られたことから、UDDが絶縁材料として機能していることが示された。絶縁材料に電極と同じ材料を用いることは密着性の面で最良である。また、めっき浴に浸漬する長さを変化させることで露出電極面積の制御が可能になる。マスク作製の再現性と正確性は、浸漬操作を自動化することで大幅に向上するはずである。また、自動化することで電極の大量生産も可能になるだろう。

All figures were reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry - [158].

## 第 6 章

# 総括および今後の展望

### 6.1 総括

本研究では、リアルタイムかつ連続的なその場測定を可能とする電気化学測定を主軸としたバイオセンシング手法の開発を目指した。特に、高感度かつ安定したバイオセンシングが期待できるホウ素ドーパダイヤモンド (BDD) 電極を基盤としたバイオセンシングに取り組んだ。

まず、バイオセンシングの課題となる  $\mu\text{m}$  オーダーの空間分解能をもった連続測定実現のため、BDD 針状微小電極を開発した。ガラスのみによる新規絶縁手法により、エポキシ樹脂による絶縁で見られていた樹脂の濡れ広がりによる絶縁性能の低下を克服し、高耐久な絶縁を達成した。

これで  $\mu\text{m}$  オーダーの微小空間にアプローチ可能な電極形状が得られたので、続いて測定手法の開発に取り組んだ。まず、ペプチドホルモンであるオキシトシンとバソプレシンの連続測定を目指した。両者とも構造中のチロシン残基に由来する酷似した酸化シグナルを示すため選択性が最大の課題となるが、陽極酸化した BDD を用いることで、両者の酸化電位に違いが生じることが明らかになった。この現象は、陽極酸化 BDD の負に分極した表面とそれら分子の持つ電荷との間の静電的相互作用に由来するものと思われる。実際に、陽極酸化 BDD 微小電極を用いたフローインジェクション分析により、オキシトシンおよびバソプレシンの選択的測定の可能性を示した。

次なる測定手法として、電気化学的に活性を示さない分子にも適用可能な測定手法の開発に取り組んだ。それを達成するための手法としては主に enzyme-based sensor と affinity-based sensor があるが、pH や温度などの測定環境の制約を受けにくい後者に着目した。特に、レドックス分子を修飾した DNA アプタマーを用いる電気化学アプタマーセンサーの開発を目指した。ターゲット分子には抗がん剤ドキシソルピシンを選択した。ドキシソルピシン特異的なアプタマーの挙動がよく研究されているからである。

DNA はダイヤモンド表面と強く相互作用することは知られていたが、その相互作用によりダイヤモンド表面に吸着した DNA アプタマーがセンサーの挙動を示すことが、本研究で明らかになった。アプタマーの吸着は繰り返しの測定、さらには超音波洗浄にも耐えうるだけの耐久性を示した。フロー測定によるセンサーの感度および速度論に関する測定を行なった結果、感度・応答速度とも金電極をベースとしたセンサーにはおよばなかったものの、ヒト血液中における治療濃度域を捉えることができる感度を有することがわかった。ただ、応答速度は遅く、特にドキシソルピシンの電極上への吸着による全体的なシグナルのドリフトが見られた。BDD 電極表面に非特異吸着をするタンパク質などによる影響も同様にあると思われるため、血液中などの生体内測定にはまだ適用できないことが課題として挙げられる。

BDD 針状微小電極の作製はガラスキャピラリーを用いた絶縁を行うことで可能になったものの、人

の手作業が作製工程に多く、電極作製手法としては劣っている。そこで、 $\mu\text{m}$  オーダーの加工精度を有しながらも自動化が可能な、新たな針状微小電極の作製手法を考案した。絶縁性ダイヤモンドを絶縁材料に用いるために、BDD 微小電極先端のみに金属マスクとしてクロムを電着させた。続く絶縁性ダイヤモンドの追加成長、そしてクロムマスクの除去の手順を踏むことで、先端のみ BDD が露出した針状微小電極を得た。フェロシアン化カリウム水溶液中における電気化学測定を行い、得られたシグナルを理論式に代入して得られた有効電極面積と、幾何面積とが一致したことから、絶縁性ダイヤモンドによる絶縁は成功したと言える。本手法はどの工程も自動化、バッチ処理が可能であり、BDD 針状微小電極の工業的な製造手法として有用であろう。

## 6.2 今後の展望

ダイヤモンド電極を用いたバイオセンシングは、これまでも主張してきたように、

- 電気化学活性な分子の測定
- 電極修飾による血液などの複雑な系での特異的測定

の 2 つの方向で今後も発展させていく必要があると考える。ダイヤモンド電極は、電気化学活性を示す分子の高感度な測定を可能とする。特に、他電極において水の電気分解反応が活発に生じはじめる  $+1\text{ V}$  以上の高い電位領域で酸化反応を示す物質に対して、広い電位窓を有する BDD の優位性が際立つ。さらに、繰り返しの電気化学反応における副生成物の吸着や、タンパク質などの非特異吸着を起こしにくい特徴も相まって、BDD による安定かつリアルタイムな生体内測定が可能となってきた。また、再現よく測定を行うための電気化学的な電極初期化処理、そして第 3 章でも見たように、選択性を高めるための高電圧印加による表面状態の制御技術が向上し、それ自体優れた特徴をもつ BDD に機能が付加された。これらの技術を組み合わせることで、生体物質の直接的なリアルタイムモニタリングは現時点で可能である。その一例として、薬物の濃度と生理活性の同時測定システムが樹立された [9]。こうした、ダイヤモンド電極の特徴を活かすことで達成できるバイオセンシングはまだ存在するはずであり、この面における測定技術、および応用例を深化させていくのが、今後求められる一つの方向性だと考える。

一方で、電気化学測定における最大の問題点は選択性、もっと言えば特異性である。表面状態の制御により選択性は向上しうるものの、まだ選択性には課題が残る。特に、流れる臓器とも言われる血液は、全身の細胞同士をつなぐ役割を持つため、非常に多くの物質が混在する最も複雑な系の一つである。タンパク質やアスコルビン酸など電気化学的に活性な分子も多く存在するためバックグラウンド電流が大きくなり、測定に用いることのできる電位領域はそれだけ狭くなる。このような複雑な条件下で測定を行うためには、ターゲット特異的な相互作用を示す分子を活用するのが第一の選択肢となるだろう。そうした分子として最も有効に活用されているものが、酵素、抗体、あるいはアプタマーなどである。本研究において第 4 章では、この中でも特にアプタマーに注目した。レドックスプローブとしてメチレンブルーを修飾したアプタマーを用いることで、生体液のバックグラウンドシグナルが極めて少ない  $+0.1\text{ V} - -0.4\text{ V vs. Ag/AgCl}$  の電位領域を有効活用した特異的な測定が可能になるからだ。本研究では、BDD 表面に吸着した DNA アプタマーがセンサーとして機能することを報告したが、同様に BDD 表面に吸着する分子の影響を大きく受ける。したがって、制御した BDD 表面の修飾、具体的には (1) 共有結合を介してアプタマーを固定化、および (2) それ以外の表面を bioresistant な表面に変換する必要がある。特に電気化学アプタマーセンサーとしてのシグナルを効果的に得るためには、金電

極で行われているように単分子層かつ最密に近い形で修飾分子を固定化する必要がある。BDD 表面への有機分子の修飾方法には電解グラフトや光グラフトなどの方法があるものの、修飾される分子の形態までを観察・制御した例はない。清浄な単結晶 BDD 表面を用いて、分子レベルでの表面観察をしながら修飾方法を最適化していくことが必要になるだろう。

一方、酵素を用いるセンサーの場合は、そうした精密な表面分子形態の制御の必要性が低いという点において、多結晶体という複雑な表面を持つ BDD 電極には適用しやすい手法と思われる。しかしながら、多くの電気化学酵素センサーで間接的なセンシング分子として用いられる過酸化水素は BDD 電極において反応性が低く、BDD 電極の必要性は低い。したがって、生体液のバックグラウンドシグナルが極めて少ない  $+0.1\text{ V} - -0.4\text{ V}$  における新たなセンシング手法を創生するという条件付きではあるものの、電気化学酵素センサーも BDD 電極を用いて研究していく一つの方向性だと考える。

アプタマーセンサーにせよ酵素センサーにせよ、理想的な長期間測定を達成するためには、bioresistant な表面が求められる。金を用いた電気化学アプタマーにおいて、金表面を  $-OH$  や  $-PEG$  (polyethylene glycol), ホスホリルコリンで覆うことで bioresistance は向上するものの、数 %/h 程度の大きなバックグラウンドシグナルのドリフトは避けられない。そんな中、bioresistant な表面として、Au ナノワイヤーをアルブミンのネットワークで覆った電極が優れた安定性を示すことが最近報告されており、生体内における長期間連続測定に向けて重要な知見は深まっている [167, 168]。こうした生体液中で変化しない表面を作るにあたり、化学的に安定なダイヤモンドは電極材料としてもっとも有力だろう。したがって、bioresistant な表面ながらターゲット特異的なセンシングが可能なシステムをダイヤモンド電極を基盤として開発していくことは、生体内における長期間連続測定の実現にとって重要なテーマだと言える。

上記のような測定手法の開発とともに、BDD 電極の安定供給も重要になる。特に、生体内測定に適する BDD 針状微小電極は現在一般的には入手不可能で、研究室単位で手作業で作製している。BDD 平板電極に関しても、国内で安定的に供給する会社は存在しない。研究者が集中して研究に取り組めるよう、BDD 微小電極、および平板電極を商業化していくことも研究推進に欠かせない。筆者を含めた研究者がこれらの課題を意識し、産学の両分野におけるダイヤモンド電極を用いた開発のサイクルを回すことが、バイオセンシングだけでなく、ダイヤモンド電極を用いた研究に欠かせないだろう。

# 謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学部栄長泰明教授の指導のもとに行ったものです。栄長教授には学部4年から6年間の研究活動におけるご指導・支援をしていただきました。その中で感謝はここには到底書ききることはできませんが、特に国内外問わず他大学との研究活動における交流の機会を積極的に提供していただくことに、感謝いたします。非常に有意義な経験を得ることができました。

また、本研究の副査を引き受けていただいたマテリアルデザイン科学専修の片山靖教授、Citterio Daniel 教授、および生命システム情報専修の土居信英教授には貴重な助言・討議をしていただきました。感謝申し上げます。

栄長研究室の山本崇史氏には研究はもちろんのこと、研究室の運営などにおいてもご指導していただき様々な経験を得ることができました。花輪藍氏、米田真央氏には、同じバイオセンシンググループとして議論をしながら共に研究ができたことに感謝いたします。花輪氏には微小電極作製に関する条件出しを手伝っていただき、大変助かりました。微小電極の作製はまだまだ煩雑な工程が多いのが現状ですが、米田氏にも基本的な作業を習得していただけて安心しています。これからも、研究テーマの創出はもちろんのこと電極作製の改良に取り組み、少しでもバイオセンシングの発展に影響を与えていきたいと思っています。また、長島紳一氏には装置設計・実装において大変お世話になりました。塚原信彦氏には回路設計に関して貴重な助言をいただきました。Irkhani 氏と Jiwanti Prastika Krisma 氏とは同期として公私にわたり貴重な時間を過ごせました。共に研究ができたことに感謝します。こうした研究活動は全研究室メンバーの力によって支えられており、みんなにこの場を借りて御礼申し上げます。

新潟大学医学部分子生理学分野日比野浩教授、緒方元気氏、澤村晴志郎氏には、動物実験のみならず多方面に渡りディスカッションをしていただきました。ありがとうございます。これからも電極作製-測定応用のサイクルを回して研究が発展していくことを期待しています。本塾医学部耳鼻咽喉科学教室の神崎晶氏には、耳における有用物質測定に関してご指導をいただきました。感謝申し上げます。

本塾医学部先端医科学研究所の佐谷秀行教授、推名健太郎氏、山崎淳太郎氏には悪性腫瘍におけるバイオセンシングに関してご指導いただきました。少ししかお手伝いすることができませんでしたが、悪性腫瘍研究の奥深さを垣間見ることができました。

金沢大学の高橋康史氏と安藤智洋氏には、期間中に論文が間に合いませんでしたが、ナノスケールにおける電気化学特性評価というアイデアを引き受けていただきありがとうございます。電極特性の微視的な観点からの理解につながりました。

Netherlands Institute for Neuroscience の Christian Lohmann 教授、Paloma Maldonado 氏にはオキシトシンプロジェクトに関して有意義なディスカッションをしていただきました。動物実験の成功までは至らなかったものの、数週間の実験を共に行っていただき大変貴重な経験をすることができました。

University of South Carolina の Parastoo Hashemi 教授 (前 Wayne State University) には、fast

scan cyclic voltammetry を一から教えていただきました。このプロジェクト自体は成果を発表するまで至っておりませんが、そこで得ることのできた電気化学測定回路とプログラミングへの理解は本研究の至る所で活用されており、非常に重要な学びでした。ありがとうございます。

最後に、筆者のわがまを受入れ、博士課程進学への理解と応援をしていただいた両親と家族に、心から感謝いたします。

なお、本研究は JSPS 科研費 JP17J02923 の助成を受けたもので、ここに感謝申し上げます。

令和 2 年 2 月 3 日

浅井開

# 研究業績一覧

## 定期刊行紙掲載論文 (本論文に関連する原著論文)

1. Asai, K.; Yamamoto, T.; Nagashima, S.; Ogata, G.; Hibino, H.; Einaga, Y. “An Electrochemical Aptamer-Based Sensor Prepared by Utilizing the Strong Interaction between a DNA Aptamer and Diamond” *Analyst* **2020**, *145*, 544-549.
2. Asai, K.; Einaga, Y. “Fabrication of an All-Diamond Microelectrode Using a Chromium Mask” *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 897-900.
3. Asai, K.; Ivandini, T. A.; Einaga, Y. “Continuous and Selective Measurement of Oxytocin and Vasopressin Using Boron-Doped Diamond Electrodes” *Sci. Rep.* **2016**, *32429*, 1-10.

## 定期刊行紙掲載論文 (その他の論文)

1. Hanawa, A.; Asai, K.; Ogata, G.; Hibino, H.; Einaga, Y. “Electrochemical Measurement of Lamotrigine Using Boron-Doped Diamond Electrodes” *Electrochim. Acta* **2018**, *271*, 35-40.
2. Ogata, G.; Ishii, Y.; Asai, K.; Sano, Y.; Nin, F.; Yoshida, T.; Higuchi, T.; Sawamura, S.; Ota, T.; Hori, K.; Maeda, K.; Komune, S.; Doi, K.; Takai, M.; Findlay, I.; Kusuhara, H.; Einaga, Y.; Hibino, H. “A Microsensing System for the in Vivo Real-Time Detection of Local Drug Kinetics” *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*, 654-666.
3. Shitara, K.; Doi, T.; Nagano, O.; Fukutani, M.; Hasegawa, H.; Nomura, S.; Sato, A.; Kuwata, T.; Asai, K.; Einaga, Y.; Tsuchihashi, K.; Suina, K.; Maeda, Y.; Saya, H.; Ohtsu, A. “Phase 1 Study of Sulfasalazine and Cisplatin for Patients with CD44v-Positive Gastric Cancer Refractory to Cisplatin (EPOC1407)” *Gastric Cancer* **2017**, *20*, 1004-1009.
4. Asai, K.; Ivandini, T. A.; Falah, M. M.; Einaga, Y. “Surface Termination Effect of Boron-Doped Diamond on the Electrochemical Oxidation of Adenosine Phosphate” *Electroanalysis* **2016**, *28*, 177-182.

## 国際会議発表

1. Takahashi, Y.\*; Ando, T.; Asai, K.; Zhou, Y.; Einaga, Y.; Fukuma, T. “Nanoscale Electrochemical Reactivity Imaging on Boron-Doped Diamond Using Scanning Electrochemical Cell Microscopy” In International Symposium on Diamond Electrochemistry; Yokohama, Japan, March 2019. (Invited Talk)
2. Ogata, G.\*; Asai, K.; Sawamura, S.; Kusuhara, H.; Einaga, Y.; Hibino, H. “A Microsensing



- System for the in Vivo Real-Time Monitoring of Local Drug Kinetics” In International Symposium on Diamond Electrochemistry; Yokohama, Japan, March 2019. (Invited Talk)
3. Asai, K.\*; Yamamoto, T.; Einaga, Y. “Development of Electrochemical Aptamer-Based Sensor for Drug Sensing Based on Diamond Electrode” In International Symposium on Diamond Electrochemistry; Yokohama, Japan, March 2019. (Oral)
  4. Hanawa, A.\*; Asai, K.; Ogata, G.; Hibino, H.; Einaga, Y. “In Vivo Real-Time Measurement of Drugs Using Diamond Microelectrodes” In International Symposium on Diamond Electrochemistry; Yokohama, Japan, March 2019. (Poster)
  5. Ando, T.\*; Asai, K.; Zhou, Y.; Einaga, Y.; Fukuma, T.; Takahashi, Y. “Electrochemical Imaging of Boron-Doped Diamond Electrodes Using Scanning Electrochemical Cell Microscope” In International Symposium on Diamond Electrochemistry; Yokohama, Japan, March 2019. (Poster)
  6. Asai, K.\*; Einaga, Y. “Development of Electrochemical Aptamer-Based Sensor for Drug Sensing Based on Diamond Electrode” In International Mini-Symposium on Diamond Electrode; Yokohama, Japan, December 2018. (Poster)
  7. Hanawa, A.\*; Asai, K.; Ogata, G.; Hibino, H.; Einaga, Y. “Electrochemical Measurement of Lamotrigine Using Boron-Doped Diamond Electrodes” In The 69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry; Bologna, Italy, September 2018. (Poster)
  8. Asai, K.\*; Ivandini, T. A.; Einaga, Y. “Selective Detection of Oxytocin on Diamond Electrodes” In Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science (PRiME); Hawaii, USA, October 2016. (Oral)
  9. Asai, K.\*; Einaga, Y. “Electrochemical Detection of Oxytocin Using Diamond Microelectrode” In 21st Symposium of Intelligent Electrophotonic Materials and Molecular Electronics (SIEMME’21); Xiamen, China, September 2015. (Oral)

## 国内学会発表

1. 花輪藍\*; 緒方元気; 浅井開; 日比野浩; 栄長泰明. “ダイヤモンドマイクロ電極を用いた神経作用薬の生体内リアルタイム測定” 第 33 回ダイヤモンドシンポジウム; 東京工業大学, 東京, 2019 年 11 月. (ポスター)
2. 花輪藍; 緒方元気\*; 浅井開; 澤村晴志朗; 日比野浩; 栄長泰明. “針状ダイヤモンドセンサによるメチルコバラミンの生体内リアルタイム測定” 第 66 回中部日本生理学会; 新潟医療人育成センター, 新潟, 2019 年 10 月. (口頭)
3. 澤村晴志朗\*; 緒方元気; 浅井開; 桑原沙耶香; 加藤理都; オリガラズビナ; 栄長泰明; 日比野浩. “ダイヤモンドセンサを用いた複数薬物のリアルタイム定量” 第 66 回中部生理学会; 新潟医療人育成センター, 新潟, 2019 年 10 月. (口頭)
4. 緒方元気\*; 齋木琢郎; 澤村晴志朗; オリガラズビナ; 渡邊航太; 加藤理都; 浅井開; 花輪藍; 西條康夫; 栄長泰明; 日比野浩. “ダイヤモンドセンサを用いた血漿中の分子標的薬の迅速な測定法の創出” 第 70 回日本薬理学会北部会; 北海道大学薬学部, 北海道, 2019 年 9 月. (口頭)
5. 澤村晴志朗\*; 緒方元気; 浅井開; 渡邊航太; オリガラズビナ; 栄長泰明; 日比野浩. “ダイヤモンドセンサを用いた複数薬物のリアルタイム定量” 第 70 回日本薬理学会北部会; 北海道大学薬学部,

北海道, 2019 年 9 月. (口頭)

6. 浅井開\*; 栄長泰明. “クロムめっきをマスクとして用いたオールダイヤモンド微小電極の作製” 2018 年電気化学秋季大会; 金沢大学, 石川, 2018 年 9 月. (口頭)
7. 浅井開\*; 栄長泰明. “ダイヤモンド電極による in Vivo 測定を指向したオキシトシンの電気化学測定” 第 30 回ダイヤモンドシンポジウム; 東京大学, 東京, 2016 年 11 月. (ポスター)
8. 浅井開\*; 栄長泰明. “ダイヤモンド電極によるオキシトシンの電気化学測定” 電気化学会第 83 回大会; 大阪大学吹田キャンパス, 大阪, 2016 年 3 月. (口頭)

付録

## 付録 A

# CVD プロセスにおける液体原料導入量の計算

本研究では、特にホウ素濃度 1 % 程度の高濃度 BDD を成膜する際には、炭素・ホウ素源として液体原料を使用した。ホウ素源に気体のトリメチルボランやジボランを用いないのは、高濃度気体は自然発火する危険性があり、希釈ガスは非常に高価である、などの理由からである。ここでは、炭素源およびホウ素源に液体原料を用いた場合の原料導入量の算出方法を示しておく。

液体原料の導入量は Figure A.1 のようなシステムで制御している。キャリアガスとして水素を液体にバブリングし、下流にあるニードルバルブにより炭素源圧力を制御、つまり、チャンバーへの炭素源導入量を制御する。

ここで、炭素源にモル分率  $\chi_i$  の割合だけ含まれる化学種  $i$  についてラウールの法則が成り立つとすると、 $i$  の蒸気圧は次で表される。

$$P_i = P_i^* \chi_i \quad (\text{A.1})$$

ここで、 $P_i^*$  は  $i$  の純液体状態の蒸気圧である。このとき、炭素源の蒸気圧  $P$  は

$$P = \sum_i P_i^* \chi_i \quad (\text{A.2})$$

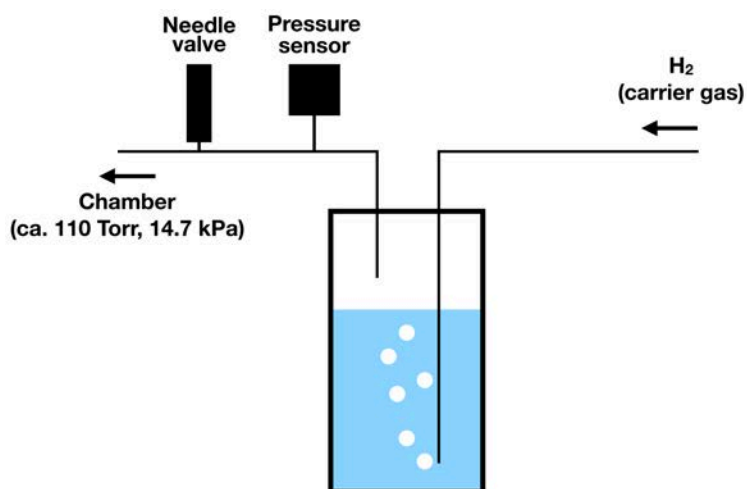


Figure A.1 Gas line of liquid carbon source CVD system.

となる。なお、本研究では炭素源としてアセトン ( $M = 58.08 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\rho = 0.7845 \text{ g mL}^{-1}$ ,  $P_i^* = 30.7 \text{ kPa}$ ), ホウ素源としてトリメトキシボラン ( $M = 103.91 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\rho = 0.932 \text{ g mL}^{-1}$ ,  $P_i^* = 18.3 \text{ kPa}$ ) を使用した。バブリングボトルに入れるそれぞれの体積を  $V_i$  とすると,

$$\chi_i = \frac{\frac{\rho_i V_i}{M_i}}{\sum_i \frac{\rho_i V_i}{M_i}} \quad (\text{A.3})$$

となる。

ここで、アセトンとトリメトキシボランの体積混合比と、チャンバーに導入されるホウ素・炭素原子数比 (B/C) の関係を求める。混合液体中、およびチャンバーに導入される気体中の両分子のモル分率は等しくなる。したがって、アセトンを M, トリメトキシボランを T と表現すると,

$$\text{B/C} = \frac{P_M^* \chi_M}{3(P_M^* \chi_M + P_A^* \chi_A)} \quad (\text{A.4})$$

となり、Equation A.3 を代入すると下が成り立つ。

$$V_M = \frac{2.53 \cdot V_A \cdot 3 \cdot \text{B/C}}{1 - 3 \cdot \text{B/C}} \quad (\text{A.5})$$

通常、50 mL のアセトンを基準に炭素源液体を調製しているので、 $\text{B/C} = 0.01$  (1 %) の仕込みホウ素濃度にする場合にはトリメトキシボランを 3.9 mL 入れれば良いことになる。この計算式を用いて、仕込みホウ素濃度を制御している。なお、Figure B.3 でも示されたように、仕込みホウ素濃度と実際に BDD 中に取り込まれるホウ素濃度は非常に近くなることがわかっている。

次に、これら炭素源がどのくらいチャンバーに導入されているか (流量  $F$  (sccm)) を見積もる。流量単位の sccm は standard cubic centimeter per minute の略であり、単位時間あたりに流れる標準状態の気体の体積、つまり、物質量  $n$  に比例する。

$$F \propto n \quad (\text{A.6})$$

また、気体方程式より、温度が一定の場合

$$n \propto PV \quad (\text{A.7})$$

となる。したがって、2 式を合わせると下になる。

$$F \propto PV \quad (\text{A.8})$$

さらに、炭素源として導入される気体の体積  $V$  は一定とみなせる。したがって、

$$\frac{F_i}{P_i} = \text{constant} \quad (\text{A.9})$$

となる。例えば、通常の BDD 成膜条件であるキャリア水素流量 1.5 sccm, 炭素源圧力 33 kPa, 仕込みホウ素濃度 1 % の場合を考えると下の関係が得られる。

$$\frac{1.5 \text{ sccm}}{(33 - 29.2 - 0.915) \text{ kPa}} = \frac{F_A}{29.2 \text{ kPa}} = \frac{F_T}{0.915 \text{ kPa}} \quad (\text{A.10})$$

したがって、 $F_A = 15.2 \text{ sccm}$ ,  $F_T = 0.47 \text{ sccm}$  と求められる。チャンパーには別のラインから 530 sccm の水素を導入しているので、アセトン/水素流量比は 2.9 % 程度ということになる。本研究ではこのような条件で BDD の合成を行った。

なお、炭素源にメタンガス (M) ではなく液体のアセトンをわざわざ使用している理由は、下記の通りとなる。この場合、液体原料はトリメトキシボランのみであるため、 $P_T$  はトリメトキシボランの蒸気圧 18.3 kPa と同じになる。ゆえに、炭素源圧力を  $P_{\text{line}}$  としたとき、

$$\frac{F_M}{P_{\text{line}} - 18.3 \text{ kPa}} = \frac{F_T}{18.3 \text{ kPa}} \quad (\text{A.11})$$

となる。メタンを用いる場合、メタン-水素流量比は 1-3 % 程度がダイヤモンド成膜の条件となるので、例えばメタン流量 5 sccm、仕込みホウ素濃度 1 % の時、

$$\frac{5 \text{ sccm}}{P_{\text{line}} - 18.3 \text{ kPa}} = \frac{0.05 \text{ sccm}}{18.3 \text{ kPa}} \quad (\text{A.12})$$

$$P_{\text{line}} = 1.8 \text{ MPa} \quad (\text{A.13})$$

と求まる。一般的にガスをボンベから流す際には 0.2 MPa 程度の圧力で行うが、求めた炭素源圧力はこれよりも高いため、キャリアガスを流せない。したがって、炭素源にはアセトン-トリメトキシボランの混合溶液系を用いている。

## 付録 B

# Raman 分光によるダイヤモンド電極中の ホウ素濃度の見積もり

ここでは、本研究でホウ素ドーパ率の推定に使用した BDD の Raman 分光による評価手法について説明する。ただ、これまで BDD の Raman スペクトルの解釈にはこれまで様々な議論があり、画一的な理解がなされていなかったため、以下ではその歴史からまとめていく。

ダイヤモンド電極は、構造中のホウ素濃度によって電気的特性を変化させる。ホウ素を含まないときは絶縁体で、 $[B] = \text{ca. } 2 \times 10^{20}$  (B/C = ca. 0.2 %) 以上において金属的な電子伝導性を示すことが知られている [28]。したがって、BDD 中のホウ素濃度を知ることが BDD を電極材料として用いるにあたって必須となる。

BDD 中のホウ素濃度を測定する方法として最も直接的でないものは、二次イオン質量分析 (SIMS) である。SIMS では、固体の表面にイオンを照射し、そのイオンと固体表面の原子レベルでの衝突によって発生するイオンを質量分析計で検出する表面計測法である。しかし、破壊分析であることが問題になる。グロー放電発光分析 (GD-OES) も同様に高感度な測定手法であるものの、破壊分析であることには変わらない。

一方、本研究でも評価に用いた Raman 分光測定は非破壊で行えるだけでなく、短時間で測定が可能、さらに機械によっては nm サイズの測定を可能とするといった点で、BDD の分析手法としては優れている。また、BDD の Raman スペクトルはホウ素ドーパ率とよい相関があることが経験的に知られている。これまで、Raman シフト  $1332 \text{ cm}^{-1}$  のダイヤモンドの zone-center optical phonon (ZCP) ラインのホウ素ドーパによるシフトや [169–174]、 $500 \text{ cm}^{-1}$  の形状変化・シフト [175] を用いたホウ素ドーパ率の推定が提唱されてきた。しかし、いずれの手法も大きな誤差を与えることが問題である [176]。この問題の原因は、それら手法が経験則的な手法であり、BDD の Raman スペクトルに見られるバンドの帰属がなされていないことにある。

BDD の代表的な Raman スペクトルを Figure B.1 に示す。赤線が仕込みホウ素濃度を 40000 ppm で成膜した場合、黒線が 4000 ppm で成膜した BDD の Raman スペクトルを示す。こうした高ホウ素濃度の BDD には主に 3 つのラインが見られ、それぞれ点線で B1, B2, ZCP と記した。ZCP はドーパなしのダイヤモンドで見られるダイヤモンド構造の振動、具体的には zone-center optical phonon に由来することが知られている。ZCP の形状はドーパなしの場合は対称的であるが、ホウ素ドーパとともに非対称な特徴的な形状になる。これは、ホウ素ドーパとともに大きくなる電子ラマン散乱連続体と ZCP との間に生じる共鳴効果 (Fano 効果) によるものと考えられている [177]。このように、理論的にも統一的な見解が得られている ZCP に対し、B1 と B2 ラインがなぜ生じるのかはまだ明らかに

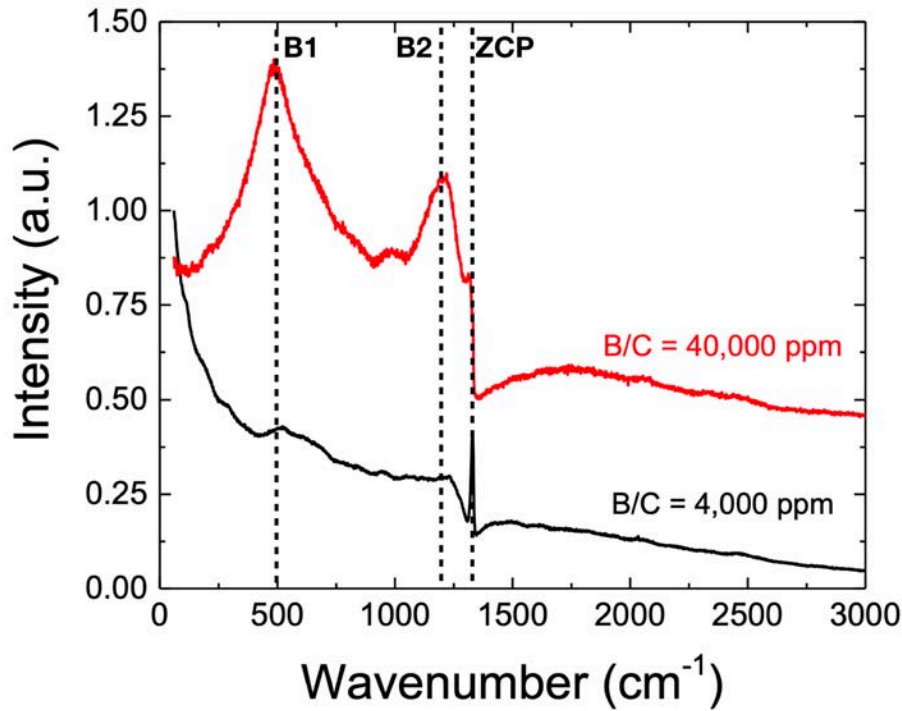


Figure B.1 General Raman spectra of BDD. [83] - Reprinted with permission from Elsevier.

なっていなかった。一つの説として、B1 および B2 ラインが B-C あるいは B-B 結合の振動に由来するというものが提唱されてきた [178]。しかし、B および C の同位体を用いた実験結果はそれを支持せず、Raman スペクトルにあらわれているラインは主に C-C 振動に由来することが報告されてきた [179–181]。

しかし、最近の Mortet らによる報告 [82, 83] により BDD の Raman スペクトルに対する理解が進んだ。彼らは、B2 ラインがダイヤモンドフォノン状態密度の極大値 [182] 付近に存在することに着目した。通常は Raman 禁制なラインも、格子欠陥などにより緩和して Raman スペクトルとして観察されることが知られている [177, 183]。ホウ素ドーパ率の上昇とともに B2 ラインがシフトすることに着目し、Mortet らは B2 ラインも ZCP 同様、Fano 効果による影響を受けていると考え、次のような半経験的な理論を提唱した。

ZCP はダイヤモンドの zone-center optical phonon に由来し、それが高濃度ホウ素ドーパにより生じる電子 Raman 散乱連続体との相互作用 (Fano 効果) により、低波数側へのシフトと非対称化を示す。電子 Raman 散乱連続体による Raman 散乱シグナルは観測する波数 ( $\omega$ ) 域ではゆっくりとした変化を示し、

$$I_e(\omega) = C \times (B_1\omega + B_2) \quad (\text{B.1})$$

と単純に表される。C は、純粋な電子 Raman 散乱効果に対する重み付けである。一方、Fano 関数 ( $F_i(\omega)$ ) によって、ZCP ( $i = 1$ ) とフォノン状態密度の極大 (PDoS,  $i = 2$ ) の Raman シグナル強度



$(I_i(\omega))$  は下記のように表される.

$$F_i(\omega) = \frac{A_i \times \left( q_i + \frac{\omega - \omega_i}{\Gamma_i} \right)^2}{1 + \left( \frac{\omega - \omega_i}{\Gamma_i} \right)^2} \quad (\text{B.2})$$

$$I_i(\omega) = F_i(\omega) \times (B_1\omega + B_2) \quad (\text{B.3})$$

ここで,  $A_1, q_1, \omega_i$ , および  $\Gamma_i$  はそれぞれ ピークの大きさ, 非対称パラメーター, Fano 効果を受けていないピークの位置と幅を示す. したがって, これらを一つに

$$I(\omega) = (B_1\omega + B_2) \times \left( \sum_{i=1}^2 F_i(\omega) + C \right) \quad (\text{B.4})$$

と表記することで  $1000\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$  における Raman スペクトルのモデル化ができる. この式を用いると実験で得られる Raman スペクトルと極めてよい一致が見られ (Figure B.2a), SIMS 分析の結果を用いた検量線が得られる (Figure B.2b). 定性的には, ホウ素ドーパ率を高くしていくと Fano 効果が強まるため, PDoS ラインと ZCP ラインの両者において,  $\omega_i$  の減少および  $\Gamma_i$  の増加が生じる. Raman 分光装置ごとに Raman シフトの校正が必要なことを踏まえると,  $\Gamma_i$  の検量線を用いるのがよい.

上記手法はそのフィッティングの良さから, 理論的にも高濃度 BDD の Raman スペクトルを正しく解釈していると思われる. 本研究ではこの手法を用いたホウ素ドーパ率の見積もりを行った. 上記手法の正統性を確かめるために, 仕込みホウ素濃度 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 % にて 4 種類の BDD を成膜し, SIMS 分析と Equation B.4b の検量線から得られるホウ素濃度の比較を行った. まず, SIMS 分析の結果を示す. SIMS 分析は材料科学技術振興財団への依頼分析で行った. 成膜は 1 時間で行ったため, どの膜においても  $1 \mu\text{m} / \text{h}$  程度の成膜速度で BDD の成膜が行われたことがわかる. 深さ  $1 \mu\text{m}$  までの平均値としてドーパ率を算出すると, ホウ素濃度はそれぞれ, 0.034, 0.52, 0.97, 1.88 % となり, 仕込み 0.1 % サンプル以外は仕込みホウ素濃度と実際のドーパ量に高い一致が見られた.

一方, SIMS 分析前に, SIMS 分析を行った 2 inch ウエハー試料の中心部分にて, ランダムに 20 点の Raman 分光測定を行った. 各 Raman スペクトルに対して Igor pro (ver.8) ソフトウェアにて Equation B.4 のフィッティングを  $1000\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$  の範囲に対して行った. 代表的な結果を Figure B.4 に示す. Figure B.4a-c を見ると, フィッティング結果が生データと一致しており, よいフィッティングができていることがわかる. なお, 0.1 % BDD については, SIMS の結果からもわかるようにホウ素取り込み量が 0.2 % 以下と小さく Fano 効果が生じず, 今回のフィッティングは適用できないため除外した.

フィッティング係数の結果は表 B.1–B.3 にまとめた. このうち  $\Gamma_1$  を用いて Figure B.2b の検量線から求めたホウ素濃度と, SIMS 分析の結果の比較を表 B.4 にまとめた. 0.5 % と 1.0 % BDD においては SIMS 分析との良い一致が見られた. しかし, 表 B.1–B.3 中の  $\Gamma_1$  を見てもわかるように, 相対標準偏差 (RSD) が 10 % 以上と大きくなっている. これは, 測定している BDD が多結晶体であることに起因していると思われる. 実際, 多結晶 BDD に多い (100) 面と (111) 面では, ホウ素取り込み量が最大で 10 倍程度違うと言われており [173], それは Rmana 分光測定のスポットサイズを絞った測定によっても簡単に確かめることができる [165]. 今回行った 20 回の測定では, Raman 測定のスポットが当たる位置によって, スポット中の面方位の割合が変化したことにより, RSD 10 % 以上とばらつき大きな結果となったものと思われる.

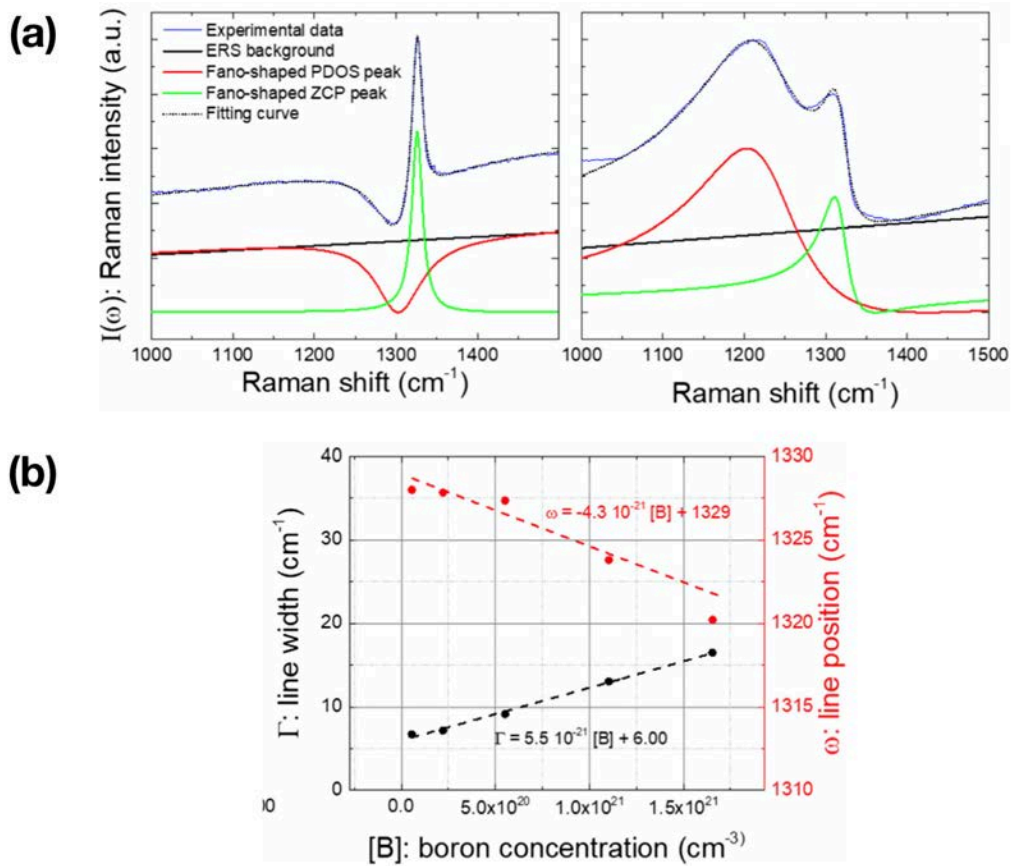
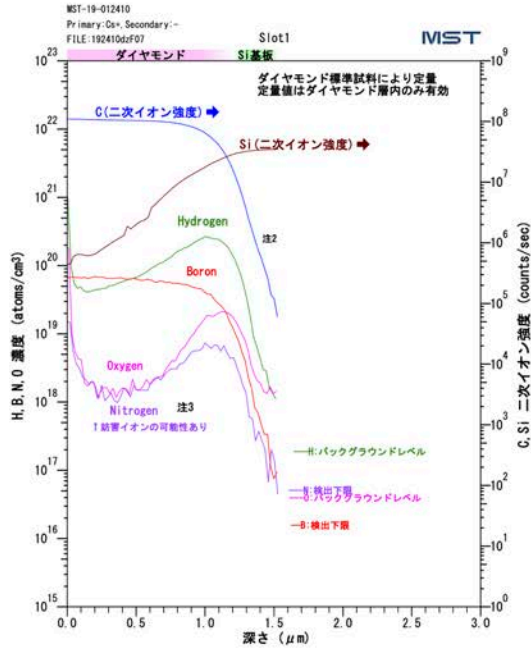


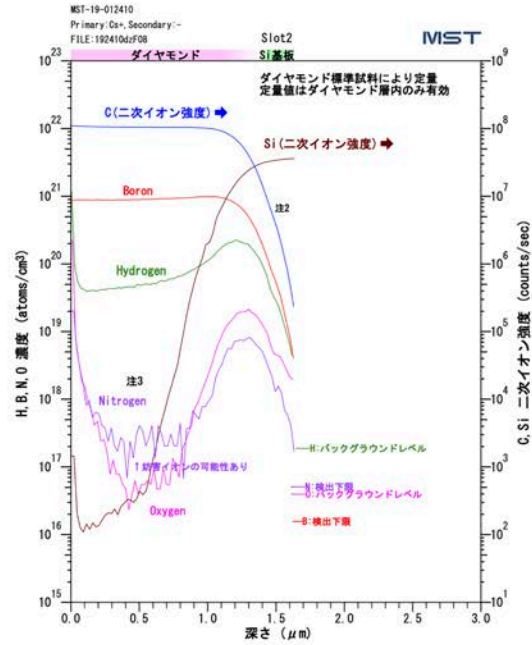
Figure B.2 (a) Fitting of Raman spectra of BDD using Equation B.4. Left shows a low dope sample and right shows a high doping sample. (b) Calibration curve for the estimation of boron concentration in BDD obtained by the combination of SIMS analysis (x axis) and the Raman fitting. [82] - Reprinted with permission from Elsevier.

一方、2.0 % BDD においては SIMS 分析値 1.9 % に対して Raman スペクトルから求めた値は 1.4 % と明らかに小さな値を示した。これは、Raman スペクトルのノイズに大きく依存していると考えられる。Figure B.4 の a から c へと見ていくとわかるように、ホウ素濃度を大きくしていくと、Fano 効果の増大により PDoS と ZCP のライン幅が大きくなり、両者の重なりが大きくなっていく。すると、0.5 % BDD ではっきりと見られていた ZCP ラインは (Figure B.4a), 2.0 % BDD では PDoS ラインの肩に埋もれていく (Figure B.4d)。しかし、Figure B.4 の Raman スペクトルを見ると、全体的にノイズが多い。したがって、おそらく ZCP ラインが PDoS ラインに埋もれているであろう Figure B.4d においても、ZCP ラインが“頭を出した”フィッティング結果を与えている。ホウ素濃度 2.0 % 程度の高濃度域では、このようにフィッティングによる誤差が出やすくなっているものと思われる。Raman 分光器の光学系の調整、あるいは得られたデータのスムージングでこの問題は克服できるであろう。いずれにしても、Raman 分光測定による BDD 中ホウ素濃度の推定は多結晶 BDD にも十分適用できると言える。本研究で用いた BDD 電極の多くは Figure B.4b-d に似た Raman スペクトルを与えたことから、ホウ素濃度は 1 % 以上であると言える。ホウ素ドーパ率 1 % は金属的電子伝導性への転移点である約 0.2 % よりも十分高いため、金属的な電子伝導性をもつ BDD と言える。

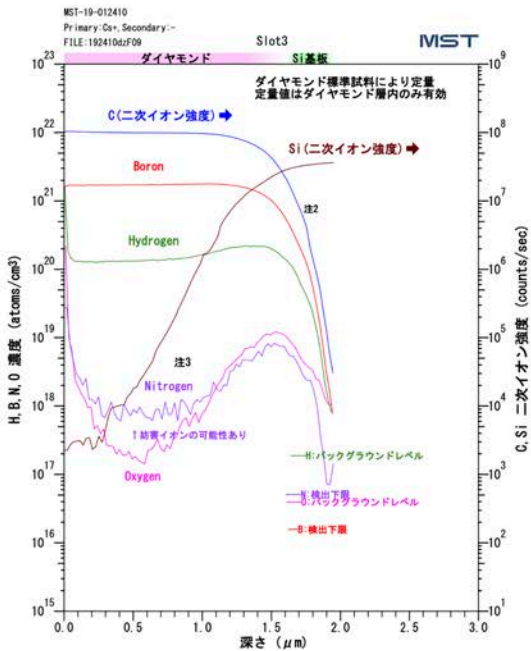
(a) No.1: 0.1 %



(b) No.2: 0.5 %



(c) No.3: 1.0 %



(d) No.4: 2.0 %

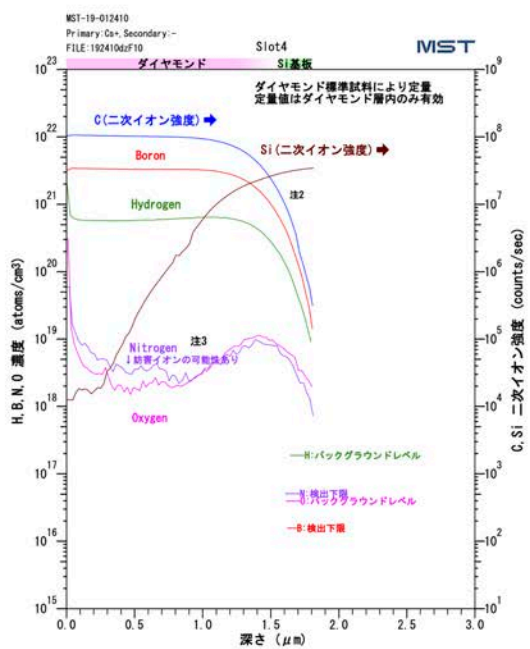


Figure B.3 SIMS analysis of 4 BDDs with different boron doping level. Depth was calculated using a sputtering rate obtained for single crystal diamond standard. 1st ion: Cs<sup>+</sup>, 1st acceleration voltage: 15 kV, analysis range:  $\phi$  30  $\mu$ m, accuracy:  $\pm$ 40 %, by CAMECA IMS-7f.

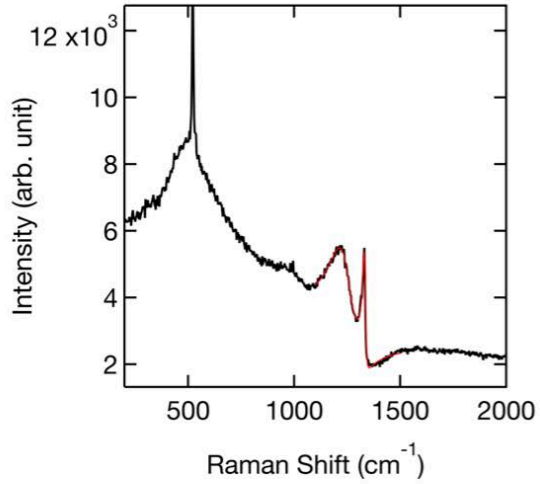
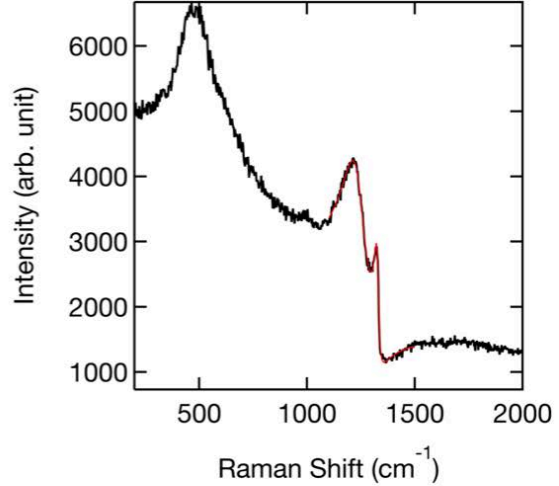
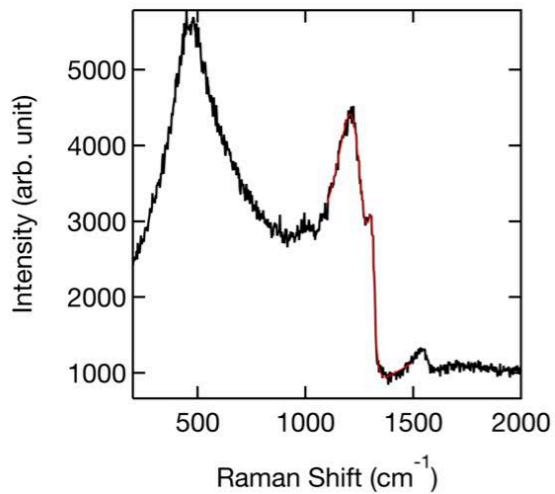
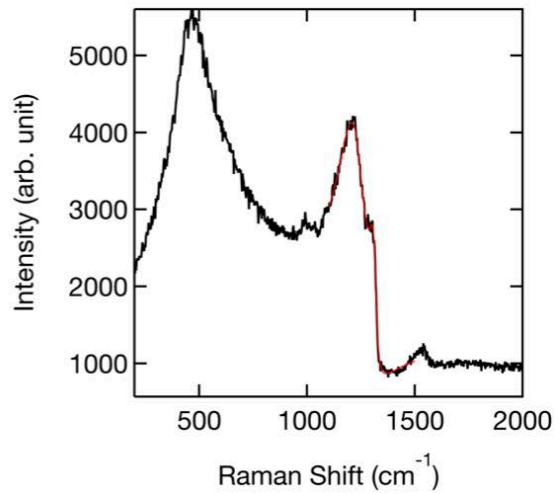
**(a) No.1: 0.5 %****(b) No.2: 1.0 %****(c) No.4: 2.0 %, trial1****(d) No.4: 2.0 %, trial2**

Figure B.4 Fitting results by Equation B.4. Black line is a raw data and red one is the fitting result.

Table B.1 Fitting result for 0.5 % BDD ( $n = 20$ ).

	$q_1$	$q_2$	$\Gamma_1$	$\Gamma_2$	$\omega_1$	$\omega_2$
Average	-2.3	-1.8	9.9	62.2	1331.8	1247.1
SD	0.3	0.1	2.6	1.1	1.5	2.1
RSD (%)	13.9	7.5	26.2	1.8	0.1	0.2

Table B.2 Fitting result for 1.0 % BDD ( $n = 20$ )

	$q_1$	$q_2$	$\Gamma_1$	$\Gamma_2$	$\omega_1$	$\omega_2$
Average	-1.8	-2.1	16.0	64.9	1325.9	1242.9
SD	0.1	0.1	2.0	2.8	3.1	1.9
RSD (%)	6.8	5.2	12.4	4.4	0.2	0.2

Table B.3 Fitting result for 2.0 % BDD ( $n = 20$ )

	$q_1$	$q_2$	$\Gamma_1$	$\Gamma_2$	$\omega_1$	$\omega_2$
Average	-2.2	-2.2	18.8	70.5	1314.8	1239.3
SD	0.2	0.1	2.1	3.3	3.4	1.9
RSD (%)	8.2	5.0	10.9	4.7	0.3	0.2

Table B.4 Comparison of boron concentrations of 4 BDDs obtained by SIMS analysis and Raman fitting.

BDD No.	B/C in gas (%)	B/C, SIMS	B/C, Raman
1	0.1	0.03 %	-
2	0.5	0.52 %	0.41 % (RSD 23 %)
3	1	0.97 %	1.07 % (RSD 12.4 %)
4	2	1.88 %	1.37 % (RSD 10.9 %)

## 付録 C

# BDD の接触抵抗

本研究においては、BDD 電極を用いた電気化学測定を行う際の接触は、BDD をワニ口クリップでつかむことで行った。BDD との接触は、良好にカーバイド層を形成する Ti, 続いて安定した表面を作るための Au を BDD 上に積むことが有効だと一般的に言われているものの [43, 184, 185], それらの報告で用いられている BDD がどれほどのホウ素濃度かわからない。得られている  $I-V$  特性から概算すると、使用している BDD は  $50 \Omega$  ほどの抵抗値を持っていることから、半導体的な BDD (ホウ素濃度  $2 \times 10^{19} - 2 \times 10^{20} \text{ cm}^{-3}$  程度) と推測できる。本研究で使用している BDD は金属的な電子伝導性を持つため、単純にワニ口クリップなどを用いて金属を強く接触させることで十分低い抵抗が得られることは経験的にわかっている。実際に、ワニ口クリップで BDD に接触させた場合の電流-電圧特性を Figure C.1 に示す。電気化学測定には十分な  $\pm 10 \text{ mA}$  ほどの電流領域にて十分な直線性が得られていることから、BDD 表面をワニ口クリップでつかむことで十分な導通がとれることがわかる。

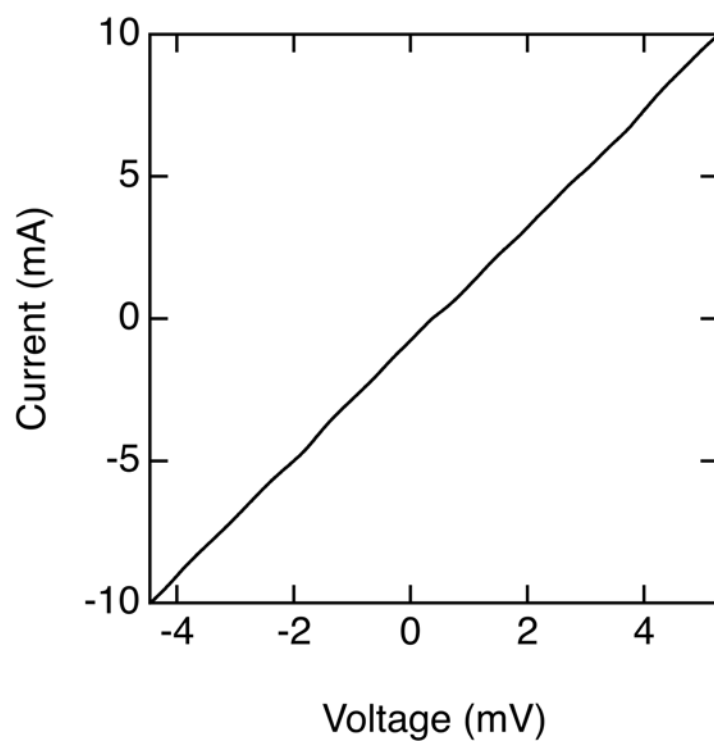


Figure C.1 Current–voltage plot for BDD–clip connection. Galvanostat: 0.1 mA/s scan, by ALS852Cs.

## 付録 D

# タングステンの電解研磨について

タングステンの電解研磨に関して，[96] を参考にはじめはセットアップの容易な二電極系を取り入れていた。しかし，Figure D.1a に示したように，研磨条件に経時変化が見られた。Figure は，2018 年 1 月と 7 月に行った電解研磨の電流-時間プロットの比較である。両方とも 10 本の電解研磨の電流推移を重ねてプロットした。7 月の方が，研磨開始時の電流値が大きいことから，時間経過とともに対極に用いていた金線の表面状態が変化し，その結果として作用極であるタングステン線に印加される電位が高電位側にシフトしたと考えられる。セル形状は一定にし，作用極の接触抵抗も  $1 \Omega$  程度で一定である状態にて研磨を行った。したがって，繰り返しの電解研磨や大気中への放置で金線の表面状態に変化が生じたと推測できる。ただ，毎回対極の金線を新しくするのは現実的な解決策ではない。したがって，三電極系を取り入れた。Figure D.1b を見ると，時間が経過しても大きく研磨条件は変化しておらず，研磨の再現性が向上したことがわかる。以上より，タングステンを再現よく電解研磨を行うためには三電極系が必要であることが示された。

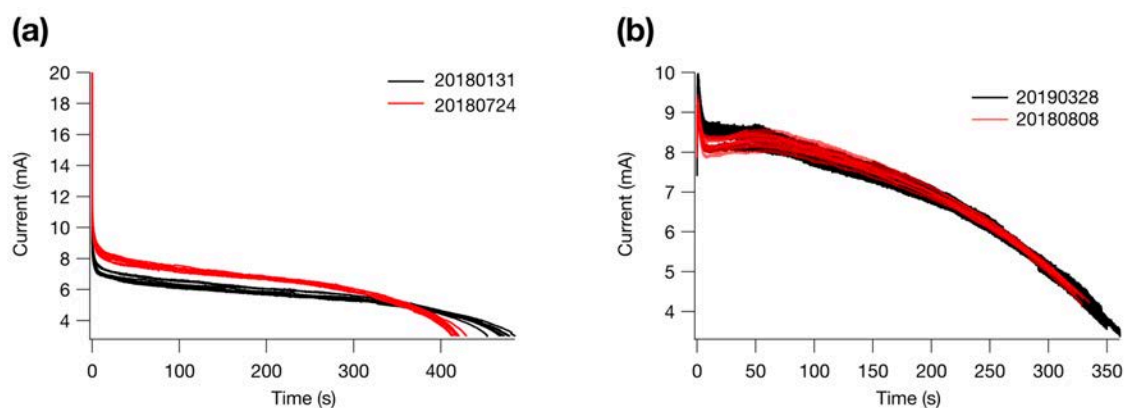


Figure D.1 Comparison of the stability of 2 and 3 electrode system for electropolishing. (a) Condition change in 2 electrode system. (b) Stability of 3 electrode system.



## 参考文献

- (1) 軽部征夫, バイオセンシング; 啓学出版: 1988.
- (2) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- (3) Weaver, W. *Science* **1970**, *170*, 581–582.
- (4) Kalathingal, M.; Sumikama, T.; Mori, T.; Oiki, S.; Saito, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 3334–3348.
- (5) Wang, M.; Zhao, J.; Zhang, L.; Wei, F.; Lian, Y.; Wu, Y.; Gong, Z.; Zhang, S.; Zhou, J.; Cao, K.; Li, X.; Xiong, W.; Li, G.; Zeng, Z.; Guo, C. *J. Cancer* **2017**, *8*, 761–773.
- (6) Balkwill, F. R.; Capasso, M.; Hagemann, T. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 5591–5596.
- (7) Chaurasia, C. S. et al. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1014–1025.
- (8) Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 545–580.
- (9) Ogata, G. et al. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*, 654–666.
- (10) 渡辺正; 中林誠一郎, 電子移動の化学; 朝倉書店: 1996.
- (11) Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: 2000.
- (12) Adams, S. D.; Doeven, E. H.; Tye, S. J.; Bennet, K. E.; Berk, M.; Kouzani, A. Z. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* **2019**, DOI: 10.1109/TNSRE.2019.2956479.
- (13) 田畑功 福井大学工学部技術部技術報告集 **1998**, *3*, 29–34.
- (14) Březina, M.; Zuman, P., *Polarography in medicine, biochemistry, and pharmacy*, Rev. Engli; Interscience Publishers: New York, 1958.
- (15) Purdy, W. C. *Electroanalytical methods in biochemistry.*, New York, 1965.
- (16) Adams, R. N. *J. Pharm. Sci.* **1969**, *58*, 1171–1184.
- (17) Ponchon, J. L.; Cespuglio, R.; Gonon, F.; Jouvret, M.; Pujol1, J. F. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1483–1486.
- (18) Armstrong-James, M.; Millar, J.; Kruk, Z. L. *Nature* **1980**, *288*, 181–183.
- (19) Bond, A.; Fleischmann, M.; Robinson, J. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1984**, *168*, 299–312.
- (20) Rodeberg, N. T.; Sandberg, S. G.; Johnson, J. A.; Phillips, P. E.; Wightman, R. M. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 221–234.
- (21) Clark, L. C.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
- (22) Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. *Sensors* **2008**, *8*, 1400–1458.
- (23) Rackus, D. G.; Shamsi, M. H.; Wheeler, A. R. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5320–5340.
- (24) Kim, J.; Campbell, A. S.; Wang, J. *Talanta* **2018**, *177*, 163–170.

- (25) Arroyo-Currás, N.; Somerson, J.; Vieira, P. A.; Ploense, K. L.; Kippin, T. E.; Plaxco, K. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 645–650.
- (26) Ferguson, B. S.; Hoggarth, D. A.; Maliniak, D.; Ploense, K.; White, R. J.; Woodward, N.; Hsieh, K.; Bonham, A. J.; Eisenstein, M.; Kippin, T. E.; Plaxco, K. W.; Soh, H. T. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 213ra165.
- (27) Ricci, F.; Zari, N.; Caprio, F.; Recine, S.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Plaxco, K. W. *Bioelectrochemistry* **2009**, *76*, 208–213.
- (28) Lagrange, J. P.; Deneuille, A.; Gheeraert, E. *Diam. Relat. Mater.* **1998**, *7*, 1390–1393.
- (29) Eversole, W. G.; Kenmore, N. **1962**, US Patent 3030188.
- (30) Deryagin, B. V.; Fedoseev, D. V.; Lukyanovich, D. V.; Spitsyn, V. M. *J. Cryst. Growth* **1968**, *2*, 380.
- (31) Angus, J. C.; Will, H. A.; Stanko, W. S. *J. Appl. Phys.* **1968**, *39*, 2915–2922.
- (32) Poferl, D. J.; Gardner, N. C.; Angus, J. C. *J. Appl. Phys.* **1973**, *44*, 1428–1434.
- (33) Spitsyn, B. V.; Bouilov, L. L.; Deryagin, B. V. **1981**, *52*, 219–226.
- (34) Matsumoto, S.; Sato, Y.; Tsutsumi, M.; Setaka, N. *J. Mater. Sci.* **1982**, *17*, 3106–3112.
- (35) Kamo, M.; Sato, Y.; Matsumoto, S.; Setaka, N. *J. Cryst. Growth* **1983**, *62*, 642–644.
- (36) Saito, Y.; Matsuda, S.; Nogita, S. *J. Mater. Sci. Lett.* **1986**, *5*, 565–568.
- (37) May, P. W. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2000**, *358*, ed. by Thompson, J. M. T., 473–495.
- (38) Iwaki, M.; Sato, S.; Takahashi, K.; Sakairi, H. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res.* **1983**, *209-210*, 1129–1133.
- (39) Pelskov, Y. V.; Sakharova, A. Y.; Krotova, M. D.; Bouilov, L. L.; Spitsyn, B. V. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1987**, *228*, 19–27.
- (40) Tenne, R.; Patel, K.; Hashimoto, K.; Fujishima, A. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *347*, 409–415.
- (41) Swain, G. M.; Ramesham, R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 345–351.
- (42) Yang, N.; Yu, S.; Macpherson, J. V.; Einaga, Y.; Zhao, H.; Zhao, G.; Swain, G. M.; Jiang, X. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 157–204.
- (43) Macpherson, J. V. In *Electrochem. Carbon Electrodes*, 1st ed., 2016; Vol. 16, pp 163–210.
- (44) Macpherson, J. V. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 2935–49.
- (45) Luong, J. H.; Male, K. B.; Glennon, J. D. *Analyst* **2009**, *134*, 1965–1979.
- (46) Panizza, M.; Cerisola, G. *Electrochim. Acta* **2005**, *51*, 191–199.
- (47) Fujishima, A.; Einaga, Y.; Rao, T. N.; Tryk, D. A., *Diamond Electrochemistry*, 1st ed.; Elsevier Science: 2005.
- (48) Martin, H. B.; Argoitia, A.; Landau, U.; Anderson, A. B.; Angus, J. C. *J. Electrochem. Soc.* **1996**, *143*, L133–L136.
- (49) Swain, G. M.; Anderson, A. B.; Angus, J. C. *MRS Bull.* **1998**, *23*, 56–60.
- (50) Yagi, I.; Notsu, H.; Kondo, T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *473*, 173–178.
- (51) Popa, E.; Notsu, H.; Miwa, T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *Electrochem. Solid-State Lett.* **1999**, *2*, 49–51.

- (52) Suzuki, A.; Ivandini, T. A.; Yoshimi, K.; Fujishima, A.; Oyama, G.; Nakazato, T.; Hattori, N.; Kitazawa, S.; Einaga, Y. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8608–8615.
- (53) Ivandini, T. A.; Rao, T. N.; Fujishima, A.; Einaga, Y. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3467–3471.
- (54) Asai, K.; Ivandini, T. A.; Falah, M. M.; Einaga, Y. *Electroanalysis* **2016**, *28*, 177–182.
- (55) Notsu, H.; Yagi, I.; Tatsuma, T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *492*, 31–37.
- (56) Notsu, H.; Fukazawa, T.; Tatsuma, T.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2001**, *4*, H1.
- (57) Notsu, H.; Tatsuma, T.; Fujishima, A. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *523*, 86–92.
- (58) Kondo, T.; Niwano, Y.; Tamura, A.; Ivandini, T. A.; Einaga, Y.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.; Kawai, T. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 1556–1564.
- (59) Garrett, D. J.; Tong, W.; Simpson, D. A.; Meffin, H. *Carbon N. Y.* **2016**, *102*, 437–454.
- (60) Garrett, D. J.; Saunders, A. L.; McGowan, C.; Specks, J.; Ganesan, K.; Meffin, H.; Williams, R. A.; Nayagam, D. A. X. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **2015**, *104B*, 19–26.
- (61) Trouillon, R.; O'Hare, D. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 6586–6595.
- (62) Sousa, C. P.; Ribeiro, F. W.; Oliveira, T. M.; Salazar-Banda, G. R.; de Lima-Neto, P.; Morais, S.; Correia, A. N. *ChemElectroChem* **2019**, *6*, 2350–2378.
- (63) Baluchová, S.; Daňhel, A.; Dejmková, H.; Ostatná, V.; Fojta, M.; Schwarzová-Pecková, K. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1077*, 30–66.
- (64) Svítková, J.; Ignat, T.; Švorc, Ľ.; Labuda, J.; Barek, J. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46*, 248–256.
- (65) Pecková, K.; Musilová, J.; Barek, J. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *39*, 148–172.
- (66) Compton, R. G.; Foord, J. S.; Marken, F. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1349–1363.
- (67) Matsubara, T.; Ujje, M.; Yamamoto, T.; Akahori, M.; Einaga, Y.; Sato, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 8981–8984.
- (68) Shin, D.; Tokuda, N.; Rezek, B.; Nebel, C. E. *Electrochem. commun.* **2006**, *8*, 844–850.
- (69) Yeap, W. S.; Murib, M. S.; Cuypers, W.; Liu, X.; van Grinsven, B.; Ameloot, M.; Fahlman, M.; Wagner, P.; Maes, W.; Haenen, K. *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 1145–1154.
- (70) Bai, Y. F.; Xu, T. B.; Luong, J. H.; Cui, H. F. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4910–4918.
- (71) Dong, H.; Wang, S.; Galligan, J. J.; Swain, G. M. *Front. Biosci.* **2011**, *3*, 518–540.
- (72) Cooper, J. B.; Pang, S.; Albin, S.; Zheng, J.; Johnson, R. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 464–467.
- (73) Sarada, B. V.; Rao, T. N.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *J. Electrochem. Soc.* **1999**, *146*, 1469–1471.
- (74) Basu, S.; Kang, W. P.; Davidson, J. L.; Choi, B. K.; Bonds, A. B.; Cliffel, D. E. *Diam. Relat. Mater.* **2006**, *15*, 269–274.
- (75) Holt, K. B.; Caruana, D.; Hu, J.; Foord, J. S. *ECS Trans.* **2007**, *3*, 37–45.
- (76) Holt, K. B.; Hu, J.; Foord, J. S. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2556–2561.
- (77) Bennet, K. E.; Tomshine, J. R.; Min, H.-k.; Manciu, F. S.; Michael, P.; Paek, S. B.; Settell, M. L.; Nicolai, E. N.; Blaha, C. D.; Kouzani, Z.; Chang, S.-y.; Lee, K. H. *Front. Hum. Neurosci.* **2016**, *10*, 1–12.

- (78) Arumugam, P. U.; Zeng, H.; Siddiqui, S.; Covey, D. P.; Carlisle, J. A.; Garris, P. A. *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *102*, 1–5.
- (79) Olivia, H.; Sarada, B. V.; Shin, D.; Rao, T. N.; Fujishima, A. *Analyst* **2002**, *127*, 1572–1575.
- (80) Cvačka, J.; Quaiserová, V.; Park, J.; Show, Y.; Muck, A.; Swain, G. M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2678–2687.
- (81) Xie, S.; Shafer, G.; Wilson, C. G.; Martin, H. B. *Diam. Relat. Mater.* **2006**, *15*, 225–228.
- (82) Mortet, V.; Živcová, Z. V.; Taylor, A.; Davydová, M.; Frank, O.; Hubík, P.; Lorincik, J.; Aleshin, M. *Diam. Relat. Mater.* **2019**, *93*, 54–58.
- (83) Mortet, V.; Taylor, A.; Vlčková Živcová, Z.; Machon, D.; Frank, O.; Hubík, P.; Tremouilles, D.; Kavan, L. *Diam. Relat. Mater.* **2018**, *88*, 163–166.
- (84) Christie, J. H.; Lingane, P. J. *J. Electroanal. Chem.* **1965**, *10*, 176–182.
- (85) Bilewicz, R.; Wikiel, K.; Osteryoung, R. A.; Osteryoung, J. G. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 965–972.
- (86) Konopka, S. J.; McDuffie, B. *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 1741–1746.
- (87) Hupert, M.; Muck, A.; Wang, J.; Stotter, J.; Cvackova, Z.; Haymond, S.; Show, Y.; Swain, G. M. *Diam. Relat. Mater.* **2003**, *12*, 1940–1949.
- (88) Tan, S.-y.; Lazenby, R. A.; Bano, K.; Zhang, J.; Bond, A. M.; Macpherson, J. V.; Unwin, P. R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, DOI: 10.1039/C7CP00968B.
- (89) Tan, S.-y. Y.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V.; Zhang, J.; Bond, A. M. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 2830–2837.
- (90) Jarošová, R.; De Sousa Bezerra, P. M.; Munson, C.; Swain, G. M.; Jarošová, R.; De Sousa Bezerra, P. M.; Munson, C.; Swain, G. M. *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.* **2016**, *213*, 2087–2098.
- (91) Bano, K.; Zhang, J.; Bond, A. M.; Unwin, P. R.; Macpherson, J. V. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 12464–12472.
- (92) Hutton, L. a.; Iacobini, J. G.; Bitziou, E.; Channon, R. B.; Newton, M. E.; Macpherson, J. V. *Analytical Chem.* **2013**, *85*, 7230–7240.
- (93) Haymond, S.; Babcock, G. T.; Swain, G. M. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 249–253.
- (94) Granger, M. C.; Swain, G. M. *J. Electrochem. Soc.* **1999**, *146*, 4551.
- (95) 高橋健; 早瀬仁則; 初澤毅 *電気学会論文誌* **2000**, *120*, 156–160.
- (96) Nave, M.; Rubin, B.; Maximov, V.; Creager, S.; Kornev, K. G. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 355702.
- (97) Hajime, K. *Rev. Polarogr.* **2012**, *58*, 13–22.
- (98) Dickinson, E. J. F.; Streeter, I.; Compton, R. G. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 11637–11644.
- (99) Watanabe, T.; Shimizu, T. K.; Tateyama, Y.; Kim, Y.; Kawai, M.; Einaga, Y. *Diam. Relat. Mater.* **2010**, *19*, 772–777.
- (100) Asai, K.; Ivandini, T. A.; Einaga, Y. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32429.
- (101) Kosfeld, M.; Heinrichs, M.; Zak, P. J.; Fischbacher, U.; Fehr, E. *Nature* **2005**, *435*, 673–676.
- (102) Domes, G.; Heinrichs, M.; Michel, A.; Berger, C.; Herpertz, S. C. *Biol. Psychiatry* **2007**, *61*, 731–733.

- (103) Bales, K. L.; van Westerhuyzen, J. A.; Lewis-Reese, A. D.; Grotte, N. D.; Lanter, J. A.; Carter, C. S. *Horm. Behav.* **2007**, *52*, 274–279.
- (104) Guastella, A. J.; Gray, K. M.; Rinehart, N. J.; Alvares, G. a.; Tonge, B. J.; Hickie, I. B.; Keating, C. M.; Cacciotti-Saija, C.; Einfeld, S. L. *J. Child Psychol. Psychiatry* **2015**, *56*, 444–452.
- (105) Guastella, A. J.; Einfeld, S. L.; Gray, K. M.; Rinehart, N. J.; Tonge, B. J.; Lambert, T. J.; Hickie, I. B. *Biol. Psychiatry* **2010**, *67*, 692–694.
- (106) Bartz, J.; Simeon, D.; Hamilton, H.; Kim, S.; Crystal, S.; Braun, A.; Vicens, V.; Hollander, E. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* **2011**, *6*, 556–563.
- (107) Mabrouk, O. S.; Kennedy, R. T. *J. Neurosci. Methods* **2012**, *209*, 127–133.
- (108) Hattori, T.; Morris, M.; Alexander, N.; Sundberg, D. K. *Brain Res.* **1990**, *506*, 169–171.
- (109) Ludwig, M.; Sabatier, N.; Bull, P. M.; Landgraf, R.; Dayanithi, G.; Leng, G. *Nature* **2002**, *418*, 85–89.
- (110) Suprun, E. V.; Shumyantseva, V. V.; Archakov, A. I. *Electrochim. Acta* **2014**, *140*, 72–82.
- (111) Paleček, E.; Scheller, F.; Wang, J., *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics*; Elsevier: Amsterdam, 2005.
- (112) Reynaud, J. A.; Malfoy, B.; Canesson, P. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1980**, *114*, 195–211.
- (113) Reynaud, J.; Malfoy, B.; Canesson, P.; Moldculaire, C. D. B. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1980**, *114*, 213–223.
- (114) Chiku, M.; Ivandini, T. A.; Kamiya, A.; Fujishima, A.; Einaga, Y. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *612*, 201–207.
- (115) Chiku, M.; Nakamura, J.; Fujishima, A.; Einaga, Y. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5783–5787.
- (116) Lane, R. F.; Hubbard, A. T. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1287–1293.
- (117) Terashima, C.; Rao, T. N.; Sarada, B. V.; Kubota, Y.; Fujishima, A. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1564–72.
- (118) Fierro, S.; Yoshikawa, M.; Nagano, O.; Yoshimi, K.; Saya, H.; Einaga, Y. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 1–6.
- (119) Koehbach, J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 21183–8.
- (120) Ivandini, T. A.; Sarada, B. V.; Terashima, C.; Rao, T. N.; Tryk, D. A.; Ishiguro, H.; Kubota, Y.; Fujishima, A. *J. Chromatogr. B* **2003**, *791*, 63–72.
- (121) Permentier, H. P.; Bruins, A. P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1707–1716.
- (122) Fujishima, A.; Einaga, Y.; Rao, T. N.; Tryk, D. A., *Diamond Electrochemistry*, 1st ed.; Elsevier Science: 2005, pp 218–237.
- (123) Taylor Jr., S. P.; du Vigneaud, V.; Kunkel, H. G. *J. Biol. Chem.* **1953**, *205*, 45–53.
- (124) Kunkel, H. G.; Taylor, S. P.; du Vigneaud, V.; Kunkel, G. *J. Biol. Chem.* **1953**, *200*, 559–564.
- (125) Yamaguchi, C.; Natsui, K.; Iizuka, S.; Tateyama, Y.; Einaga, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 13788–13794.
- (126) Raj, C. R.; Tokuda, K.; Ohsaka, T. *Bioelectrochemistry* **2001**, *53*, 183–191.
- (127) Giz, M. J.; Duong, B.; Tao, N. J. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *465*, 72–79.

- (128) Dalmia, A.; Liu, C. C.; Savinell, R. F. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *430*, 205–214.
- (129) Malem, F.; Mandler, D. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 37–41.
- (130) Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., 2000, pp 571–575.
- (131) Geisler, M.; Hugel, T. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 398–402.
- (132) Kasahara, S.; Ogose, T.; Ikemiya, N.; Yamamoto, T.; Natsui, K.; Yokota, Y.; Wong, R. A.; Iizuka, S.; Hoshi, N.; Tateyama, Y.; Kim, Y.; Nakamura, M.; Einaga, Y. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 4980–4986.
- (133) Ogose, T.; Kasahara, S.; Ikemiya, N.; Hoshi, N.; Einaga, Y.; Nakamura, M. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b08429.
- (134) Wang, M.; Simon, N.; Decorse-Pascanut, C.; Bouttemy, M.; Etcheberry, A.; Li, M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 5818–5824.
- (135) Girard, H.; Simon, N.; Ballutaud, D.; Herlem, M.; Etcheberry, A. *Diam. Relat. Mater.* **2007**, *16*, 316–325.
- (136) 日本化学会 化学便覧 基礎編 改訂5版 II., 2003.
- (137) 日本化学会 化学便覧 基礎編 改訂5版 II., 2003.
- (138) Kristensen, E. W.; Wilson, R. L.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 986–988.
- (139) Asai, K.; Yamamoto, T.; Nagashima, S.; Ogata, G.; Hibino, H.; Einaga, Y. *Analyst* **2020**, *145*, 544–549.
- (140) Hanawa, A.; Ogata, G.; Sawamura, S.; Asai, K.; Kanzaki, S.; Hibino, H.; Einaga, Y. *Submitted*.
- (141) Fan, C.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9134–9137.
- (142) Campuzano, S.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Curr. Opin. Electrochem.* **2019**, *16*, 35–41.
- (143) Schoukroun-Barnes, L. R.; Macazo, F. C.; Gutierrez, B.; Lottermoser, J.; Liu, J.; White, R. J. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *9*, 163–181.
- (144) Ivandini, T. A.; Sarada, B. V.; Rao, T. N.; Fujishima, A. *Analyst* **2003**, *128*, 924–929.
- (145) Wochner, A.; Menger, M.; Orgel, D.; Cech, B.; Rimmele, M.; Erdmann, V. A.; Glökler, J. *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 34–42.
- (146) Mage, P. L.; Ferguson, B. S.; Maliniak, D.; Ploense, K. L.; Kippin, T. E.; Soh, H. T. *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*, 70.
- (147) González-Fernández, E.; Avlonitis, N.; Murray, A. F.; Mount, A. R.; Bradley, M. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *84*, 82–88.
- (148) White, R. J.; Plaxco, K. W. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 73–76.
- (149) Wenmackers, S.; Vermeeren, V.; VandeVen, M.; Ameloot, M.; Bijmens, N.; Haenen, K.; Michiels, L.; Wagner, P. *Phys. Status Solidi A* **2009**, *206*, 391–408.
- (150) Yang, Y. L.; Struck, L. M.; Sutcu, L. F.; D’Evelyn, M. P. *Thin Solid Films* **1993**, *225*, 203–211.
- (151) Williams, O. A.; Hees, J.; Dieker, C.; Jäger, W.; Kirste, L.; Nebel, C. E. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4824–4830.
- (152) Deakin, M. R.; Stutts, K. J.; Wightman, R. M. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *182*, 113–122.

- (153) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916–8920.
- (154) Walker, H. W.; Grant, S. B. *Langmuir* **1995**, *11*, 3772–3777.
- (155) Greene, R. F.; Collins, J. M.; Jenkins, J. F.; Speyer, J. L.; Myers, C. E. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 3417–3421.
- (156) Camaggi, C. M.; Comparsi, R.; Strocchi, E.; Testoni, F.; Angelelli, B.; Pannuti, F. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1988**, *21*, 221–228.
- (157) Toutain, P. L.; Bousquet-Mélou, A. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2004**, *27*, 427–439.
- (158) Asai, K.; Einaga, Y. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 897–900.
- (159) Silva, E. L.; Gouvêa, C. P.; Quevedo, M. C.; Neto, M. A.; Archanjo, B. S.; Fernandes, A. J.; Achete, C. A.; Silva, R. F.; Zheludkevich, M. L.; Oliveira, F. J. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6487–6492.
- (160) Vahidpour, F.; Curley, L.; Biró, I.; McDonald, M.; Croux, D.; Pobedinskas, P.; Haenen, K.; Giugliano, M.; Živcová, Z. V.; Kavan, L.; Nesládek, M. *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.* **2017**, *214*, 1532347.
- (161) Stamford, J. A.; Palij, P.; Davidson, C.; Jorm, C. M.; Millar, J. *J. Neurosci. Methods* **1993**, *50*, 279–290.
- (162) Rusinek, C. A.; Guo, Y.; Rechenberg, R.; Becker, M. F.; Purcell, E.; Verber, M.; McKinney, C.; Li, W. *J. Electrochem. Soc.* **2018**, *165*, G3087–G3092.
- (163) Varga, M.; Ižák, T.; Kromka, A.; Veselý, M.; Hruška, K.; Michalka, M. *Cent. Eur. J. Phys.* **2012**, *10*, 218–224.
- (164) Tsutomu, M. *Hyoumen gijutsu* **2005**, *56*, 308.
- (165) Ivandini, T. A.; Watanabe, T.; Matsui, T.; Ootani, Y.; Iizuka, S.; Toyoshima, R.; Kodama, H.; Kondoh, H.; Tateyama, Y.; Einaga, Y. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 5336–5344.
- (166) Dickinson, E. J. F.; Streeter, I.; Compton, R. G. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 4059–4066.
- (167) Sabaté del Río, J.; Henry, O. Y. F.; Jolly, P.; Ingber, D. E. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14*, 1143–1149.
- (168) Gooding, J. J. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14*, 1089–1090.
- (169) Kumar, D.; Chandran, M.; Ramachandra Rao, M. S. *Appl. Phys. Lett.* **2017**, *110*, 191602.
- (170) Li, H.; Zhang, T.; Li, L.; Lü, X.; Li, B.; Jin, Z.; Zou, G. *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 1986–1991.
- (171) Utyuzh, A. N.; Timofeev, Y. A.; Rakhmanina, A. V. *Inorg. Mater.* **2004**, *40*, 926–931.
- (172) Pruvost, F.; Deneuve, A. *Diam. Relat. Mater.* **2001**, *10*, 531–535.
- (173) Ushizawa, K.; Watanabe, K.; Ando, T.; Sakaguchi, I.; Nishitani-Gamo, M.; Sato, Y.; Kanda, H. *Diam. Relat. Mater.* **1998**, *7*, 1719–1722.
- (174) Ager III, J. W.; Walukiewicz, W.; McCluskey, M.; Plano, M. A.; Landstrass, M. I.; Ager, J. W.; Walukiewicz, W.; McCluskey, M.; Plano, M. A.; Landstrass, M. I. *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *616*, 616.
- (175) Bernard, M.; Deneuve, A.; Muret, P. *Diam. Relat. Mater.* **2004**, *13*, 282–286.
- (176) Shakhov, F. M.; Abyzov, A. M.; Takai, K. *J. Solid State Chem.* **2017**, *256*, 72–92.
- (177) Gheeraert, E.; Gonon, P.; Deneuve, A.; Abello, L.; Lucazeau, G. *Diam. Relat. Mater.* **1993**, *2*, 742–745.

- (178) Werner, M.; Dorsch, O.; Baerwind, H. U.; Obermeier, E.; Haase, L.; Seifert, W.; Ringhandt, A.; Johnston, C.; Romani, S.; Bishop, H.; Chalker, P. R. *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *64*, 595–597.
- (179) Szirmai, P.; Pichler, T.; Williams, O. A.; Mandal, S.; Bäuerle, C.; Simon, F. *Phys. Status Solidi Basic Res.* **2012**, *249*, 2656–2659.
- (180) Achatz, P.; Omnès, F.; Ortéga, L.; Marcenat, C.; Vacík, J.; Hnatowicz, V.; Köster, U.; Jomard, F.; Bustarret, E. *Diam. Relat. Mater.* **2010**, *19*, 814–817.
- (181) Dubrovinskaia, N.; Dubrovinsky, L.; Papageorgiou, T.; Bosak, A.; Krisch, M.; Braun, H. F.; Wosnitza, J. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *92*, 13–15.
- (182) Zaitsev, A., *Optical Properties of Diamond*; Springer: 2001.
- (183) Tiong, K. K.; Amirtharaj, P. M.; Pollak, F. H.; Aspnes, D. E. *Appl. Phys. Lett.* **1984**, *44*, 122–124.
- (184) Tachibana, T.; Williams, B. E.; Glass, J. T. *Phys. Rev. B* **1992**, *45*, 11968–11974.
- (185) Tachibana, T.; Williams, B. E.; Glass, J. T. *Phys. Rev. B* **1992**, *45*, 11975–11981.