

# pH計測の新たな挑戦

## ガラス電極の次に来るものは何か？

野村 聡

### 要旨

HORIBAは1950年に国産初のガラス電極式pHメータを完成して以来、常にトップメーカーとして科学技術の発展に寄与してきた。pHは水素イオン濃度を示す指標として、近年、特に生物・生命科学の分野でますます重要になっている。本稿では、HORIBA創立50周年を記念して、当社のコア・テクノロジーの一つであるpH計測に関する最先端の研究開発動向をまとめて紹介する。

### 1 はじめに

pHは溶液物性のパラメータとして最も重要なものであり、我々の身の回りで起きている多くの現象を律するものである。そもそもpHという概念が提唱されたのは、今から約1世紀前に遡り<sup>(1)</sup>、pH測定法として現在最も普及しているガラス電極によるpH測定法の原型が提案されたのも、pHの概念が提唱された時期に遅れること数年である<sup>(2)</sup>。HORIBAでは、創業以来、ガラス電極によるpH測定技術の改良、普及に努め、溶液物性の重要なパラメータであるpHをより簡便に正確に測定することを可能とし、科学技術の発展に貢献してきた。

一方で、ガラス電極によるpH測定法は、決してpH測定のあるあらゆる場面に適用できてきたわけではない。pHの概念が提唱されて以来、あらゆる手段を用いて、この重要な溶液パラメータに多くの人たちが立ち向かってきたのも確かである。HORIBAでも、ガラス電極の形状やサイズを工夫して、pH測定の可能性を広げる努力を行ってきた。しかし、今日発展の著しい半導体、バイオ、ナノテクなどの技術分野においては、原子や分子レベルの化学反応の理解が必要となり、ガラス電極法によるpH測定の応用にも限界が生じる。これからの科学技術の発展に、pH、そしてプロトンの測定で貢献していくためには、今一度、これまでに考案されてきた種々のpH測定法を見直すと共に、今後の科学技術に貢献できるpH測定法について考える必要がある。

本稿では、我々がこれまでに取り組んできたpH測定法をしばらく忘れ、先人たちがガラス電極の他に

も、どのようなpH測定方法を提案し、実現しようと努力してきたのか、また、それらにどのような未来があるのかについて考えてみたい。この半世紀の間、日本の世界のpH測定をガラス電極法という手法で牽引してきたHORIBAの一員として、そして、今後もpHとプロトンに関わっていききたいという思いをこめて。

### 2 ガラス電極を用いない電気化学的pH測定技術

本章では、ガラス電極を用いない電気化学的pH測定法として、どのような手法が提唱され、活用されてきたかを述べる。

#### 2.1 金属酸化物電極と液体膜型pH選択性イオン電極

電気化学的原理に基づく電位差測定法において、ガラスを用いない電極を活用しようという挑戦は古くから行われてきた<sup>(3)</sup>。

一つは、ある種の金属酸化物が、被検液に浸された時、水素イオンまたは水酸イオンの濃度に応じた酸化還元電位を発生することを利用した金属酸化物電極である。代表的な酸化アンチモン電極では、電極を被検液に浸すと酸化還元反応に伴う起電力が発生する。この起電力が溶液のpHに比例するため、これを測れば結果としてpHを求められる。

金属酸化物電極は、応答部が丈夫で取り扱いやすい利点があり、さまざまなものが開発されている。例えば、酸化イリジウムを用いた微小pH電極が実用化されている<sup>(4)</sup>。しかし、電極の研磨状態によって指

示が変わったり、再現性が悪いなどの欠点があり、現在では限られた用途のみに使われている。

また、特定のイオンに選択的に反応するイオノフォアと呼ばれる化合物を有機溶媒に溶し、塩化ビニール(PVC)などの高分子マトリックスに保持させた液膜型のイオン選択性センサがある<sup>[5]</sup>。イオノフォアとしてプロトンや水酸化物に反応する物質を用いれば、pHセンサとして機能させることができる。このタイプの電極は、感応部にガラス膜を用いていないため、特に小型化・微小化には適しており、生物分野で広く用いられている。

## 2.2 半導体技術を用いたpHセンサ

半導体技術とpH計測技術とを融合させた新たなpHセンサが1970年代に発明され<sup>[6]</sup>、pHメータのコンパクト化、高機能化への道が開かれた。最初に発明されたセンサは、ISFET(Ion Sensitive Field Effect Transistor)と呼ばれ、端的に言えば従来のガラス電極とpHメータの初段増幅器とを1つのシリコン基板に形成した、いわゆるワンチップ・センサである。ISFETは、MOSFETのゲートそのものがpH応答部となっており、ガラス電極のように、高インピーダンスの増幅器が必要ない点が特徴である。pH応答膜としては、化学的気相成長法(CVD)で作製した $\text{Si}_3\text{N}_4$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{Ta}_2\text{O}_5$ などの薄膜が用いられることが多い。ISFETは、半導体プロセスを使って作製するため、微小で自由な形状のものを加工しやすい。

一方、同じようにシリコン基板をベースにしたLAPS(Light Addressable Potentiometric Sensor)が1980年代に発明された。LAPSは絶縁体( $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$ )半導体(Si)からなる構造を持つ<sup>[7]</sup>。 $\text{Si}_3\text{N}_4$ はプロトン感受性の薄膜で、電解質溶液と接触させると、電解質中のプロトンの量に応じた界面電位を生ずる。この時、シリコンと電解質の間に電圧を印加しておき、シリコンに変調した光を照射すると、シリコンの内部に光励起された交流電流が流れる。この電流が電解質のpH値に応じて変化することから、pHの測定が可能となる。

LAPSの特長は、pH感応部を平面化し、小さくできる点である。従って、微小領域のpHをそれぞれ独立して測定することができる。つまり、Light Addressableという名の通り、測定点の「番地付け」が可能となる。

LAPSの応用例としては、センサが平面であること

を利用して、細胞代謝をpH値の変化から評価する装置や、センサ表面の複数個所で生じる酵素反応をモニタする装置<sup>[8]</sup>などが実用化されている。

この他に、スクリーン印刷技術を用いて、液膜型イオン選択性電極をシリコン基板上に形成したpHセンサも提案されている<sup>[9]</sup>。電極やpH応答膜部をスクリーン印刷で形成することにより、容易にコンパクトでフラットなセンサが実現できる。

HORIBAでは、スクリーン印刷技術を用いてシート型pH複合電極を10年以上前に開発している(図1)。この電極を使ったカード型pHメータCardyシリーズや、スティック型のTwinシリーズ(図2)は、現在も手軽なpHメータとして幅広い分野で使っていただいている。

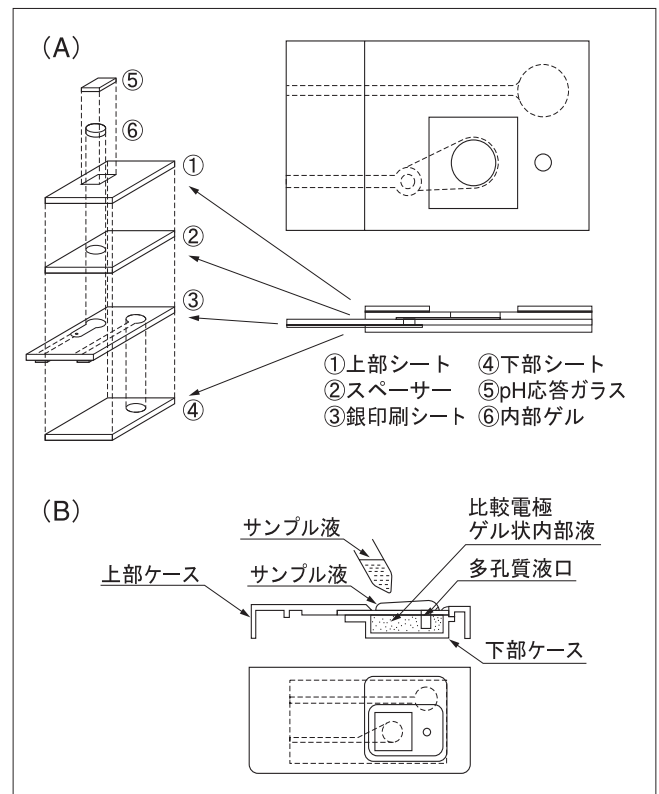


図1 シート型pH複合電極



図2 コンパクトpHメータ<Twin pH>

### 3 特殊な環境におけるpH測定

#### 生物学におけるpH測定の試み

特殊な環境下におけるpH測定例として、生物学の分野における研究動向を紹介する。生物学の研究者達は、古くからいろいろな手段を使って生き物を最小単位に分けて観察しようと努力してきた。その成果が顕微鏡技術である。同様に、生物の最小単位である細胞内pHの計測もまたターゲットの一つであった。これは、生物反応の多くが細胞内のpHによって調節を受けており、細胞内pH測定が生物学の発展にとって重要な課題であったからである<sup>(10)(11)</sup>。

#### 3.1 微小電極法

本法はガラス電極や液膜型イオン選択性電極を微小化し、細胞に直接突き刺して内部のpHを測定する方法である。突き刺しによる細胞への影響をできる限り抑えるためには、電極は極力小さくしなければならない。ガラス微小ピペットの先端にpH応答ガラスを付けた<sup>(12)</sup>、水素イオン選択性液体膜をピペットに詰め込んだ電極<sup>(13)</sup>が用いられてきた。微小で製作が容易な後者が主に用いられてきたが、やはり微小化には限界があり、比較的大きな細胞測定が中心に適應されている。

#### 3.2 標識弱酸・弱塩基を用いたpH測定法

脂溶性弱酸・弱塩基は細胞膜を透過して細胞内部に蓄積されるが、その透過量は細胞の内側と外側のpH値の差に依存する。この現象を利用して、脂溶性弱酸・弱塩基の濃度を測定することによってpHを測定する。これらの濃度測定には、アイソトープによる標識や、蛍光・吸光性の弱酸・弱塩基が用いられ、標識試薬に関する研究も報告されている。本pH測定法は、非常に小さな細胞にも適應できる利点がある一方で、付加した弱酸・弱塩基が平衡に達するまでの時間が長く、急激に変化するpHを連続的に追いかけることは難しい。最近では、細胞内の小胞など、より微小部のpH測定に使用されている<sup>(11)</sup>。

#### 3.3 蛍光性試薬を用いた方法

細胞質に蛍光性pH指示薬を導入し、特定の波長の光で励起した際に生じる蛍光スペクトルを測定することから細胞内pHを測定する方法である。蛍光色素としては当初はフルオロセインが用いられたが<sup>(14)</sup>、その後はその誘導体であるBCECF<sup>\*1</sup>などが主に用いられているようになった<sup>(15)</sup>。

細胞に対する侵襲性が少なく、急激なpH変化を連続的に測定できるなどの利点があり、広く用いられるようになった。一方で、蛍光の消滅時間の関係で測定可能時間が10~12分に制限されることや、蛍光強度がタンパクの影響を受けることなど問題もある。

本測定法は、後述のオプトードや蛍光顕微鏡などの新しいpH測定法の技術開発につながり、生物学への貢献は非常に大きいものがある。

\*1: 2',7'-bis(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein

#### 3.4 オプトード

蛍光物質の消光現象を利用したシンプルなセンサであり、イオン選択性電極同様に各種のイオンの測定に用いられている<sup>(16)</sup>。光ファイバーの先に各種イオン応答の蛍光物質を保持した構造をとることから、電極(electrode)の対比語としてオプトード(optode)又はoptrode)という名称がつけられている。イオン応答物質としてプロトン選択性のイオノフォアを用いたものがpH測定用のオプトードである。

オプトードは発明以来、測定部の微小化、イオン応答性蛍光物質を安定保持などさまざまな工夫・改良がなされ、既存の微小電極よりはるかに小さいものが開発され<sup>(17)</sup>、ラットの子宮内の測定などにも採用されている<sup>(18)</sup>。

#### 3.5 NMR法によるpH測定

リンの同位体<sup>31</sup>Pを含む溶液の核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、溶液のpH値に応じてシフトする。この現象を利用してpHを測定する手法は、測定精度や大がかりな装置が必要になるなどの問題はあるが、細胞内部を無侵襲でpH測定できる点では画期的である<sup>(19)(20)</sup>。



## 4 局在化したプロトンの分布を観る

前章までに述べたpH測定法は、いずれも溶液中にプロトンが均一に存在する状態を定量的に評価する手法である。一方で、pH変化が関与する反応過程では、結果としてプロトンが局在化した状況が必ず発生しているはずである。このようなプロトンの局在状態を把握することは、身の回りの化学現象への理解を深める上でも大変重要である。このような観点から、本章では、プロトンの局在化した状況を把握する、言い換えれば“観る”方法として近年注目されているpHイメージング技術を紹介する。

pHイメージング技術として、最も早くから研究されていたのは、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いる方法で、これらの手法を発展させてきたのは、やはり生命の最小単位について探求してきた生物学者達である。近年は、光学技術の目覚ましい発展により、空間分解能は $\mu\text{m}$ オーダーに、時間分解能もミリ秒のオーダーに達している。その結果、生命現象に伴う細胞内あるいは細胞間でのプロトンの動きがリアルタイムで観察されるようになってきている<sup>[21]</sup>。一方、電気化学法においても、比較電極を機械的に移動させてpHの2次元分布を測定する走査参照電極法が金属腐食の研究者によって提案され<sup>[22]</sup>、この手法を発展させた走査型振動電極法などが考案されている。その他、走査型トンネル顕微鏡 (STM) に、先を細くした金属酸化物pHセンサを探針の代わりに装着し、STMの高精度の機構を用いて数 $\mu\text{m}$ レベルの空間分解能でpH画像を得ようという試みも行われている<sup>[23]</sup>。

HORIBAは、前述のLAPS法を応用したpHイメージング顕微鏡 (図3)を開発し、多岐に渡る分野の研究開発に使っていただいている<sup>[24][28]</sup>。図4にpHイメージング顕微鏡の測定原理を示す。



図3 pHイメージング顕微鏡とセンサ

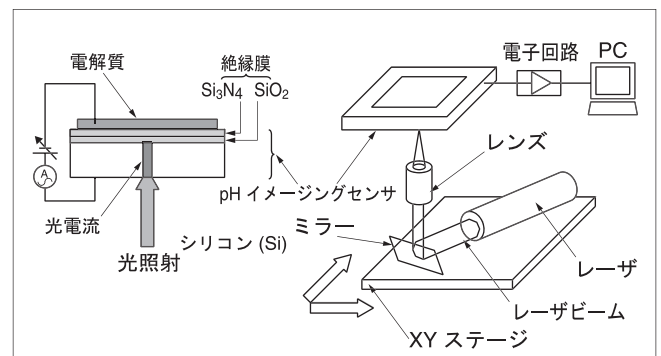


図4 pHイメージング顕微鏡の測定原理

## 5 これからのpH測定を占う ナノテクとpH・プロトン

近年、ナノテクやバイテクと言われる科学技術が目覚ましく発展している。pH計測技術もまた、この動きと共に発展し続けていかなければならない。本稿の締めくくりとして、pH測定技術の最前線を最先端の科学技術動向との絡みで紹介する。

ナノワイヤ、ナノ粒子といったナノメートルサイズの材料開発の成果が、新規なpHセンサ開発にも結びついている。例えば、ナノワイヤをドーピングした半導体を用いて、応答部がナノメートルサイズのISFETが実現した<sup>[29]</sup>。ゲートサイズがナノメートルレベルにまで微小化できることで、例えば、生体膜のイオンチャンネルにおけるプロトンの動きを、チャンネルごとに検出できる可能性も開けるであろう。

一方、ナノテクノロジー発展の原動力の一つである近接場光学は、前述のオプトードの微小化、高機能化に寄与している。また、ナノ粒子を用いたPEBBLE<sup>\*2</sup>というpH測定法が提案されており、非接触で生物細胞のさらに内部の情報をも知る手がかりが得られている<sup>[30]</sup>。

これらのナノテクを用いた新規なpH測定手法は、生命現象の根源を理解することに多に貢献できるものと考えられる。もちろん、ナノ材料の開発・生産断面においても、微小な領域のpHコントロールという点で、これらの新規なpHセンサの活用が期待される。

従来、我々が取り扱ってきたpH計測という概念に基づくと、ガラス電極で測定できるpH範囲は一般的に1から14、分解能は0.001pHであった。仮に、pH = 14の水素イオン濃度を単純に $10^{-14}$ Mとした場合、その溶液に存在するプロトンは $10^9$ 個になる。ガラス電極で分解できる最小pH値は0.001pHであるから、 $10^{20}$ 個のプロトン数の差しか検出できていないことになる。現在ナノテクノロジーが目指している、分子、原子レベルの議論をプロトンに關してもするのであれば、更に9桁から20桁も小さい量のプロトンを相手に、挑戦していかねばならない。“ハイテクの一步先にいつもHORIBA”。このコーポレートスローガンの達成を目指して、pHそしてプロトン計測に対するチャレンジを続けていきたい。

\*2: Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding

## 参考文献

- [1] Cremer, M.: Z. Biol., 47, 562 (1906)
- [2] Sorensen, S.P.L.: Biochem. Z., 21, 131, 201 (1909)
- [3] Koryta, J.: Anal. Chim. Acta, 233, 1-30 (1990)
- [4] Kato, A., Konno, Y., Yanagida, Y., Yamasato, M., Taguchi, T., Motohashi, R. and Katsube, T.: Analytical Sciences 7 Supplement 1577 ~ 1580 (1991)
- [5] Schulthess, P., Shijo, Y., Pham, H.V., Pretsch, E., Ammann, D., Simon, W.: Anal. Chim. Acta, 131, 111-116 (1981)
- [6] Berveld, P., IEEE Trans., Biomed., Eng., 19, 340-351, 1972
- [7] Hafeman, D. G., Parce, W. J., and McConnell, H. M.: Science 240, 1182-5 (1988)
- [8] Parce, W. J., Owick, J.C., Kercso, K.M., Sigal, G. B., Wada, H. G., Muir, V. C., Bousse, L. J., Ross, K. L., Sikic, B. I. and McConnell, H. M.: Science 246, 243-247 (1988)
- [9] Goldberg H. D., Brown R. B., Liu D. P. and Meyerhoff M.E.: Sensors and Actuators B 21 171-183 (1994)
- [10] Kurkdjian, A. and J. Guern: Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 271-303 (1989)
- [11] 花岡一成, 今井正, 吉富宏治, 日本臨床 9 2048-2053 (1992)
- [12] Herbert, N. C.: In Ion-selective Microelectrode, (ed: Berman, H.J. and Herbert, N. C.) 23-41, Plenum Press New York (1973)
- [13] Walker, J.L.: Anal. Chem., 43, 89-93 (1971)
- [14] Martin, M. and Lindqvist, L.: J. Luminescence, 10, 381-390 (1975)
- [15] Michael, J. B. and David, W. H., Methods in Cell Biology, 41, 135-148 (1994)
- [16] 鈴木孝治, 久本秀明, ぶんせき, 112-120 (1998)
- [17] Kopelman, R.: Anal. Chem., 69, 863-867 (1997)
- [18] Tan, W., Thorsrud, B. A., Harris, C. and Kopelman, R.: ACS Symp Ser (Am Chem Soc) No. 690, 266-272 (1998)
- [19] Moon, R.B. and Richerds, J.H.: J. Biol. Chem., 248, 7276-7278 (1973)
- [20] Roberts, J. K. M.: Ann. Rev. Plant. Physiol., 35, 375-386 (1984)
- [21] Kurtz, I. and Emmonos, C.: Methods Cell Biology, 38 183-193 (1993)
- [22] Isaacs, H. S. and Brijesh, V.: In Electrochemical corrosion testing, (ed. Mansfeld, F. and Bertocci, U.) 3-33, ASTM, Philadelphia PA (1981)

- [ 23 ] Bard, J. A.: Anal. Chem., 65,1213-1224( 1993 )
- [ 24 ] Nomura, S., Nakao, M., Nakanishi, T., Takamatsu, S. and Tomita, K.: Anal. Chem., 69, 977( 1997 )
- [ 25 ] Yoshinobu, T., Iwasaki, H., Nomura, S., Nakao, M., Nakanishi, T., Takamatsu, S. and Tomita, K.: Bioimages, 5, 143-147( 1997 )
- [ 26 ] Yoshinobu, T., Iwasaki, H., Nomura, S., Nakao, M., Nakanishi, T., Takamatsu, S. and Tomita, K.: Jpn. J. Appl. Phys., 37, L353-355( 1998 )
- [ 27 ] 中野裕子, 野村 聡, 川本忠文, 田上順次, 堀場 厚, 高野吉郎, 51, 473-476( 2002 )
- [ 28 ] Kitasako, Y., Hiraishi, N., Nakajima M., Nikaido T., Tagami J. and Nomura S.: Operative Dentistry, 27,354-359( 2002 )
- [ 29 ] Cui Y., Lieber C. M.: Science, 1289-1292( 2001 )
- [ 30 ] Brasuel M., Kopelman R., Aylott J. W., Clark H., Xu H., Hoyer M., Miller T. J., Tjalkens R. and Philbert M. A.: Sensors and Materials, 14, 6,309-338( 2002 )



野村 聡  
Satoshi Nomura  
開発センター  
MEMS プロジェクト  
チームリーダー