

論文の内容の要旨

論文題目 Biosensors Based on Enzyme-Carrying Conductive Polymer Films
(導電性ポリマー薄膜を用いたバイオセンサーに関する研究)

氏 名 サイピン タナッチャサイ

近年、生体物質の持つ分子認識機能を利用したバイオセンサーは、測定が迅速、簡便であることから、医療、食品工業、環境など様々な分野に応用されている。現在、高性能で安定性の高いバイオセンサーが求められており、生体材料とトランスデューサとの結合力の改善とセンサー応答を支配するファクターの解明が今後ますます重要となる。

本研究は、導電性ポリマー薄膜を用いて酸化還元酵素を電極上に固定化したバイオセンサーに関し、センサー応答を支配する因子の一つである固定化酵素の定量法を確立し、固定化酵素量と応答特性との関係を解明することを目的とする。さらに膜と酵素との相互作用を高めることにより性能および安定性に優れたセンサーの開発を目指した。

本論文は、①マイナス固定電荷をもつ導電性ポリマー薄膜を用いたバイオセンサーの開発、②導電性ポリマー膜を用いた電極表面固定化酵素の新しい定量法の確立、③導電性ポリマー薄膜を用いた電極の作製条件と固定化酵素量および応答特性との関係解明に関して検討したものであり、5章からなる。

第1章の序論では、バイオセンサーの構成と機能、およびバイオセンサーに関する研究の歴史的背景と現状について概説し、本研究の目的を述べた。

第2章では、マイナス固定電荷をもつ導電性ポリピロール薄膜を酵素固定化マトリックスとして始めて使用して作製した過酸化水素センサーについて述べた。包括固定化法では、調製時の酵素失活は最小限度に抑えられるが、酵素と電極との結合力が化学結合法や架橋法ほど強くないため、酵素の脱離によるセンサー応答の低下が欠点となっており、膜と酵素との強い相互作用による改善が期待されていた。本研究では、センサー性能および安定性を向上させるため、膜と酵素との相互作用を高めて酵素取り込み量を増加させ、また固定化された酵素の脱離を抑えることを目的に、3-位にスルホン酸基を導入したピロール(PS)とピロール(Py)との共重合膜内に酵素西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)を電解重合法により SnO₂ 電極表面上に包括固定化し、HRP/Py-PS 電極を作製した。またポリピロール膜を用いた過酸化水素センサー(HRP/PPy 電極)も作製し、HRP/Py-PS

電極と比較した。同じ条件で作製した HRP/Py-PS 電極は再現性に優れたセンサーであることが示された。HRP/Py-PS 電極の感度は HRP/PPy 電極とほぼ同じであるが、応答のダイナミックレンジが広くなり、しかも HRP/PPy 電極より高い安定性を維持していることがわかった。Py-PS 共重合膜に導入した負電荷と酵素の正電荷との静電相互作用により固定化酵素量が増加し、かつ固定化酵素の脱離が抑えられたことを示す知見が得られ、固定電荷をもつ導電性ポリマー薄膜を用いたことにより性能および安定性に優れた過酸化水素センサーとなった。

第 3 章では、導電性ポリマー薄膜を用いた電極の表面に固定化された酵素の新しい定量法について検討した。電極表面の固定化酵素量はセンサーの性能に大きな影響を及ぼすため、固定化酵素量の評価が極めて重要である。従来の定量法としては、放射性元素による標識法、QCM、SPR を用いた方法、FAD ストリッピングによる方法などが挙げられる。しかし、電解重合ポリマー膜に適用できる定量法は、放射性元素による標識法と FAD ストリッピングによる方法だけである。前者については、特殊な装置と取り扱いが必要であり、後者については、FAD を持つ酵素しか定量できない。そこで、固定化酵素量を迅速かつ簡便に測定できる新しい定量法が必要となる。本研究では、電極作製前後の電解重合溶液中酵素量の差から固定化量を求めるものであり、薄層電解セルの使用と迅速かつ高感度のタンパク質定量法である CBB 色素結合法の採用により、電極表面に固定化された酵素を定量することができた。電極の有効面積が 2 cm^2 に対し電解溶液層の厚みが 2 mm で溶液量が $400 \mu\text{L}$ の薄層セルを用いることによって、電解重合前後の酵素濃度の有意差を測定できるようにした。薄層セルと CBB 色素結合法を組み合わせた固定化酵素の定量法は、特殊な装置が必要である従来法に比べて、簡便性、迅速性、効率などの点ではるかに有利であり、広範囲の酵素にも適用できる。このように、研究例が極めて少ない固定化酵素の定量に関して、多くの特徴を持つ新しい手法を確立した。さらに本法を HRP/Py-PS 電極および HRP/PPy 電極へ適用した結果、HRP/Py-PS 電極は HRP/PPy 電極より酵素密度が高く、多くの酵素が固定化されていることが判明し、膜マトリックスに負電荷を導入したことが有効であることを検証した。

第 4 章では、固定化酵素量と応答特性との関係を明らかにすることを目的に、前節の固定化酵素定量法を用いて HRP/Py-PS 電極の固定化酵素量を測定し、作製条件および応答特性との相関を検討した。導電性ポリマーを用いる酵素電極を実用化するためには、作製条件の最適化が必要である。そこで、電解重合時の電気量、電流密度、および電解重合溶液の pH が固定化酵素量と応答電流にどのように影響するかを調べた。まず電気量の影響を検討した結果、固定化酵素量は 300 mC cm^{-2} までほぼ直線的に増加し、膜厚に比例することがわかり、均一な膜が合成され、同時に膜内の固定化酵素も均一に固定化されることが示唆された。応答電流は電気量とともに上昇するが、 50 mC cm^{-2} で感度が頭打ちになった。導電性ポリマーを用いた酵素電極の応答を支配するのは、酵素反応あるいは基質拡散である。薄い膜では、センサーの応答は固定化酵素量に依存し、固定化酵素量の増加とともに応答も増加する。さらに電気量を大きくして膜が厚くなると応答電流が頭打ちになったが、固定化酵素量が増えても実際にはノイズが大きくなり、基質の拡散を妨げるためと考えられる。次に電流密度の影響を検討した結果、固定化酵素量は電流密度が小さい、つまり電解重合速度が遅いほど多くの酵素が固定化された。しかし、約 0.05 mA cm^{-2} 以下では、逆に固定化酵素量が減少する。作製時の電流密度が小さいほどより均質な膜が合成され、同時に包括された酵素量も増えると考えられるが、重合速度が遅過ぎると水溶性の PS が重合して不溶化する前に

溶液バルクへ溶けてしまい、重合の電流効率が悪くなると考えられる。そのため負電荷をもつ PS の比率が低いポリマーとなり、酵素が取り込まれにくくなると推測される。電流密度による応答の変化は、固定化酵素量の変化とよく対応しており、酵素固定化量がセンサー感度の重要な因子であることが示された。また、電解重合溶液 pH が小さいほど酵素固定化量が大きくなる傾向がある。HRP の等電点は 7.2 であり、pH が等電点より小さいほど正に帯電した酵素が多くなり、Py-PS 共重合膜に導入した負電荷との静電引力により取り込まれやすくなるためと考えられる。一方、電解溶液の pH による応答の変化においても、pH が小さくなると応答電流が大きくなる傾向があり、応答上昇の要因の一つは酵素固定化量の増加であると考えられる。

以上の知見により、酵素と膜との静電相互作用が酵素の取り込みと応答に寄与していることが明らかとなった。導電性ポリマー薄膜を用いた酵素電極に関して、電極作製条件と固定化酵素量および応答特性との関係を明らかにし、最適なセンサー作製条件を検討することができた。センサー応答は固定化酵素量とよく対応しており、酵素固定化量がセンサー応答の重要な因子であることが示された。特に本研究では、様々な作製条件下で固定化酵素量を詳しく定量したことと、固定化酵素量と応答特性との関係を明らかにしたことが新しい点であり、センサー作製条件の最適化に関する指針が得られたと考える。

第 5 章では以上の結果を総括し、導電性ポリマー薄膜を用いたバイオセンサーに関する研究の今後の展望について述べた。