

Synthesis of high Performance Polymeric Mediators and Evaluation of Biosensors based on them

(高機能ポリマーメディエータを基盤としたバイオセンサー)

氏名 氷室 蓉子

1. 緒言

酵素は基質の酸化還元、脱水素反応などを触媒するが、これらの反応は同時に電子授受反応でもある。酵素固定化型アンペロメトリックバイオセンサーは、酵素を電極上に固定化し、いくつかの電子授受反応を解して酵素と電極間の電子移動を行い、電流値を計測し基質の定量を行うセンサーである。分離操作を必要とせず小型化、迅速な測定が可能、という点から、医療や環境計測での応用が期待されている。本研究では電子授受反応を仲介するものとして電子メディエータを採用している。

使い捨てのセンサーであれば電極上に酵素やメディエータを固定化（水不溶化）する必要はない。しかしながら繰り返し使用するセンサーやマイクロデバイス（ほかのセンサーを汚染してはならない）への応用を想定した場合、酵素やメディエータを担体に固定化し水不溶化することが求められる。メディエータは化学架橋により電子授受能力が失われることはほとんどないが、酵素はたんぱく質であるため、化学架橋などにより立体構造が変化し、失活する恐れがある。一方、一度架橋すれば熱などの刺激で立体構造が変化することを防ぐため、活性が維持されるという表裏一体の利点もある。

筆者は、メディエータ兼酵素固定化担体としての機能を持つポリマーメディエータを合成することを考案した。ポリマーをメディエータとして機能させるには一定比率以上のメディエータユニットを導入する必要がある。また、試料として水溶液を用いるためハイドロゲル構造をとるポリマーが望ましい。分子構造、モノマー配列などポリマーにメディエータユニットを導入する際のパラメータを考え、酵素固定化にも影響しない分子設計を行った。そこで、本研究では新規なバイオセンサー用ポリマーメディエータを創成するために酵素—メディエーター—カーボン電極間の電子授受について検討し、また酵素固定化担体としての機能についても検討した。

2. フェロセンを有するポリマーメディエータを用いたバイオセンサーの創製

2. 1 目的

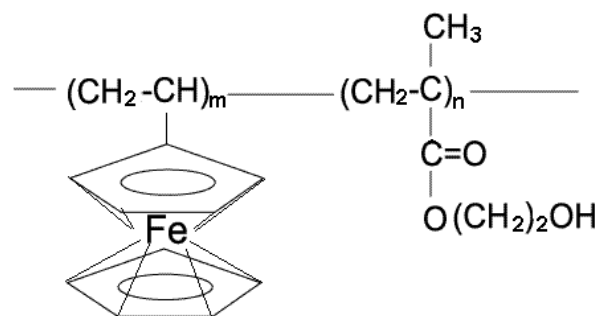


図1 PVHの構造

フェロセンは酸化還元メディエータとして広く知られている物質であり、ビニルフェロセン(VFc)はビニル基を持ち付加重合によりポリマーを得られるフェロセン誘導体である。共重合体としてヒドロゲルかつ水不溶性ポリマーを形成する2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)を用いた。序論で述べたようなポリマーメディエータの合成を期待し、poly(VFc-co-HEMA) (PVH) (図1)を用いたグルコースセンサーを作成し、メディエータ能と酵素固定化担体としての評価を行った。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 PVHの合成と電気化学特性評価

PVHは仕込み比75:25,ラジカル共重合により合成し、リン酸緩衝性食塩液(PBS)中でサイクリックボルタメトリー(CV)により電気化学特性を評価した。

2. 2. 2 グルコースセンサーの作製とグルコース濃度測定

グラッシーカーボン電極上にPVH膜を形成し、ヘキサンジアミン(HMDA)とグルタルアルデヒド(GA)を用いてグルコースオキシダーゼ(GOx)を固定化した。

グルコース応答電流の測定はリン酸緩衝性食塩液(PBS)中で、任意量のグルコース溶液を加えて行った。酵素とメディエータとの電子授受効率を間接的に評価するため、測定試料中の溶存酸素濃度の調節を行った。

2. 2 結果と考察

2. 3. 1 PVHの合成と電気化学特性評価

VFcはラジカルを捕捉し重合を止めやすいという性質があるため、仕込み比に対しモル分率が低くなった。仕込み比75:25のVFcモル分率は0.27、数平均分子量(M_n)は 3.7×10^4 、分子量分布は1.2、収率は15%であった。吸水すると40%程度の重量増加が観察された。

PVHのCVを行ったところ、2回目の走査でフェロセンの酸化還元電位付近に鋭い電流

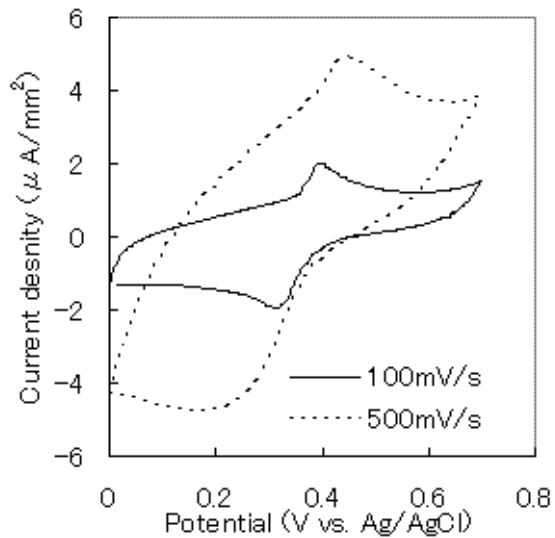


図2 PVHのCV

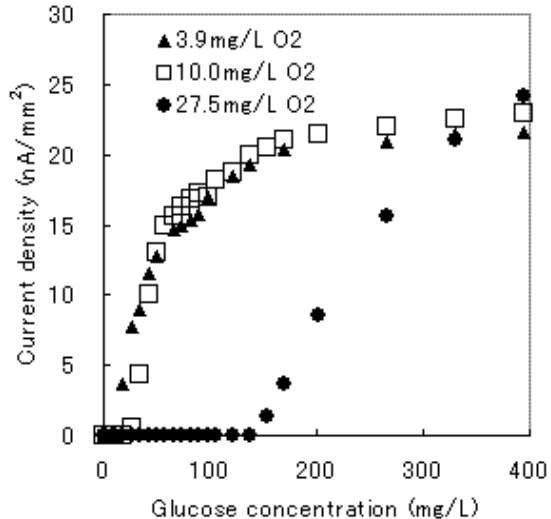


図3 PVHを用いたセンサーによる、異なる溶存酸素濃度条件下でのグルコース濃度測定結果

値ピークがみられた。図2にCVを示す。標準電極電位は $E^0=0.38\text{V}$ (vs. Ag/AgCl)、走査速度が上がるにつれて酸化還元ピーク電位の差が大きくなった。

2. 3. 2 グルコースセンサーの作製とグルコース濃度測定

図3にPVHをポリマーメディエータとして用いたセンサーの溶存酸素濃度の違いとグルコース応答電流値の相関を示す。溶存酸素濃度が高くなるにつれて、閾値が高くなる傾向が見られた。センサー上の酵素の近辺に酸素分子とPVHが存在している場合、酸素が先に酵素の電子授受に寄与し、酸素の反応が飽和状態に達したあとPVHと酵素の電子授受が始まったと考えられる。

最後に1日ごとにグルコースの測定を行った。化学架橋で酵素を固定化する手法の利点は、酵素の立体構造が保持されpH変化や高温における酵素の立体構造の変化および失活を防ぐことである。図4では室温(23°C)において180 mg/dLにおけるグルコース応答電流値測定を行った結果を示し、図5では体温と同程度の温度(37°C)において測定を行った結果を示す。HMDAとグルタルアルデヒドのSchiff結合により、酵素が安定的にセンサー上に固定化され、14日間のグルコース測定を行うことができたと考えられる。

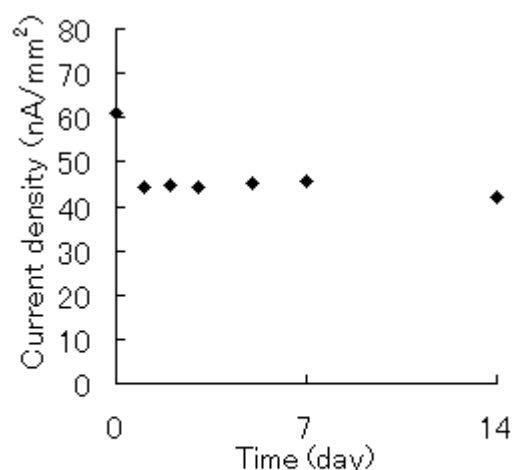


図4 23°Cにおいて180mg/dLのグルコース応答電流値測定を1日ごとに行った結果

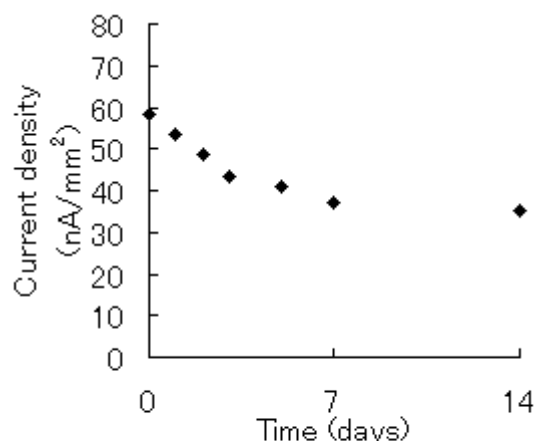


図5 37°Cにおいて180mg/dLのグルコース応答電流値測定を1日ごとに行った結果

3. キノンを有するポリマーメディエータを用いたバイオセンサーの創成

3. 1 目的

酸化還元型酵素の場合、自然界では酸素が電子授受の担い手である。酸素は分子量32g/molの低分子物質であり、拡散速度が速く、酸素の影響を完全に排除することは難しい。第2章ではフェロセン系のメディエータについて扱ったが、溶存酸素存在下において酵素はフェロセン分子よりも先に酸素と反応した。本章ではヒドロキノン系メディエータを使ったグルコースセンサーについて議論する。

ハイドロキノン¹は生体内の酸化還元を
 になう物質である。酵素との電子授受速度
 が速く、溶存酸素存在下において、低グル
 コース濃度領域でも応答電流が生じるこ
 とが確認されている。しかし、ハイドロキ
 ノンは水溶性でセンサーに固定化するこ
 とが困難であった。本研究では、ポリマー
 の側鎖にハイドロキノン誘導体を結合さ
 せることで固定化し、メディエータとして
 使用することを試みた。

3. 2 実験方法

3. 2. 1 PDAM の合成と電気化学特性 評価

まず、バックボーンポリマーとしてメタ
 クリル酸 (MA) と HEMA の共重合体であ
 る poly(MA-co-HEMA)を仕込み比 60:40 で
 ラジカル重合により合成した。MA のカル
 ボキシル基に 2,5-ジヒドロキシアニリンを
 結合し、PDAM を得た (図 6)。CV により
 PDAM の電気化学特性を評価した。

3. 2. 2 グルコースセンサーの作製と グルコース濃度測定

グラッシーカーボン電極上に PDAM 膜
 を形成し、HMDA と GA を用いて GOx を
 固定化した。その後 PVH を用いたセンサ
 ーと同様にグルコース濃度測定を行った。

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 PDAM の合成と電気化学特 性評価

仕込み比 60:40 の poly(MA-co-HEMA)の
 MA モル分率は 0.57、MA のカルボキシル
 基の 2,5-ジヒドロキシアニリン置換率は
 0.88 であった。PDAM の CV を行ったと
 ころ、-0.19 V に酸化電流ピーク、-0.35 V に還元電流ピークが見られた (図 7)。

3. 3. 2 グルコースセンサーの作製とグルコース濃度測定

図 8 に PDAM をポリマーメディエータとして用いたセンサーの溶存酸素濃度の違いとグ

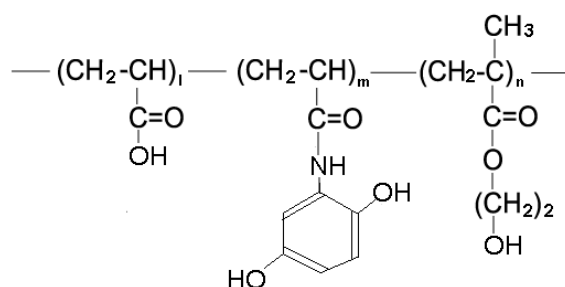


図6 PDAMの構造

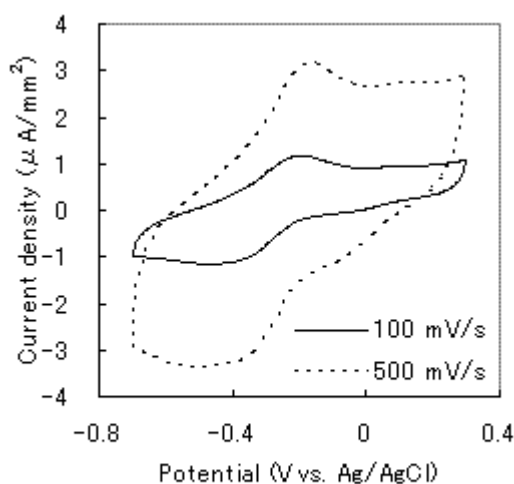


図7 PDAMのCV

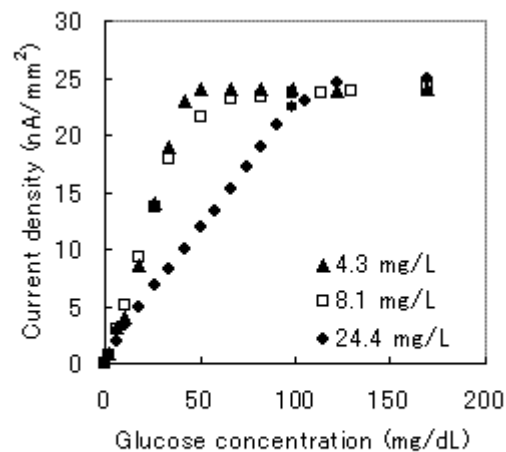


図8 PDAMを用いたセンサーによる、異なる
 溶存酸素濃度条件下でのグルコース濃度測
 定結果

ルコース応答電流の相関を示す。閾値が見られず、溶存酸素濃度が高くなると電流密度/グルコース濃度の傾きが小さくなる傾向が見られた。酸素の影響を完全に免れることはできないがセンサー上の酵素の近辺に酸素分子と PDAM が存在していても、酵素の電子授受がおこったと考えられる。ただし、空气中と平衡な溶存酸素濃度(8-10 mg/L)において、グルコース濃度 50 mg/dL でグルコース応答電流が飽和するという現象が見られた。図 9 に 24 時間ごとに 42 mg/dL におけるグルコース応答電流値測定を行った結果を示す。電流密度が次第に下降していくものの、補正を行えば十分使用可能であると考えられた。

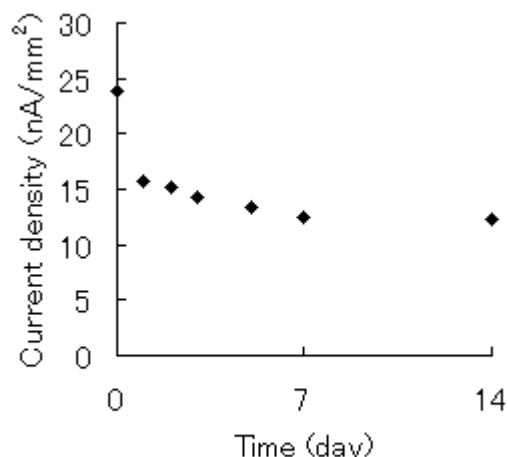


図9 23°Cにおいて、42mg/dLのグルコース応答電流値測定を1日ごとに行った結果

4. PVH と PDAM の電気化学特性比較 および酵素固定化担体としての機能比較

図 10 は PVH の、図 11 は PDAM の pH を変化させた CV を示している。PVH の酸化還元電位はプロトン濃度に依存しないが、PDAM のそれはプロトン濃度によって変化することがわかった。これは PDAM がヒドロキノンと同じ酸化還元機構を持つことを裏付ける結果である。また、ピーク電流値の大きさもプロトン濃度によって変化した。電子移動反応がプロトンに依存することが PDAM の特徴である。

PVH と PDAM はメディエータの種類は異なるが、HEMA を一成分とした共重合体である。両者の酵素固定化担体としての機能を比較したところ、どちらも酵素の流出が少なく、また酵素の活性が維持されグルコースセンサーとしても繰り返し測定において安定し

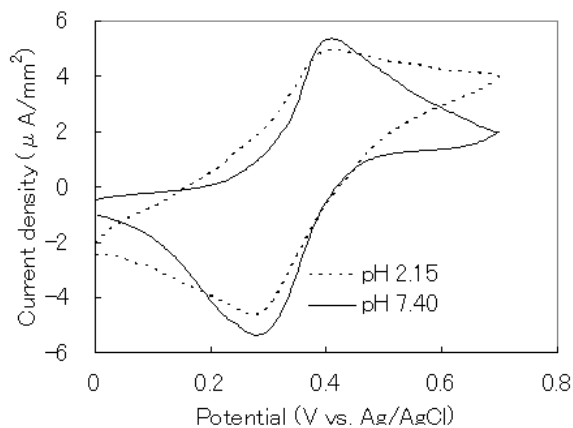


図10 pHを変化させたPVHのCV

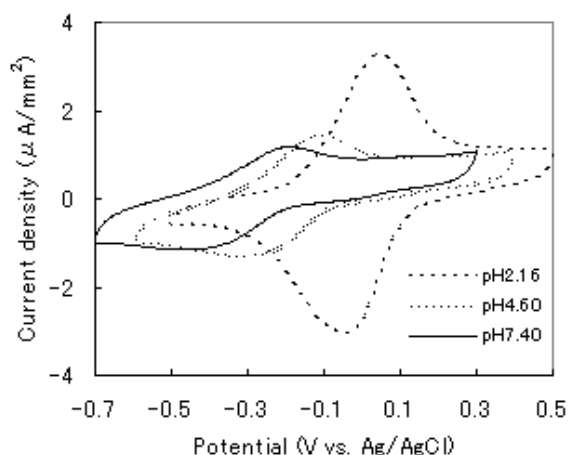


図11 緩衝液のpHを変化させたPDAMのCV

た電流値特性を得ることができた。

理想的なポリマーメディエータとは、酵素固定化能を持ち、電極との密着性が高く、電子移動反応がほかの物質に依存したり妨害を受けたりしないポリマーメディエータである。すべての条件を満たしたポリマーメディエータを得ることは難しいが、PVHとPDAMは用途によって使い分ければ適切なポリマーメディエータとして使えると考えられる。

以上の結果より、電極上に固定化でき、酵素の固定化担体となり、繰り返し測定可能な2種類の高機能ポリマーメディエータが創成できた。