

## 審査の結果の要旨

氏名 氷室 蓉子

酵素固定化型アンペロメトリックバイオセンサー（以下、バイオセンサーと称する）は、酵素の基質特異性を利用して、酵素触媒反応における消費物もしくは生成物を電流値として計測し基質の定量を行うセンサーである。酸化還元酵素と電極間の電子移動を、電子メディエータを介して行うタイプのバイオセンサーは、反応生成物の濃度に依存せずに測定が可能であることから、医療や環境計測で応用されている。特に、同時多項目測定用マイクロデバイスや生体内埋め込み型マイクロセンサーへの応用を想定した場合、微小領域に活性な酵素を高密度に固定化する必要性、さらには酵素とメディエータを担体に固定化し溶出を防ぎ長時間、繰り返しの使用に対する安定性を確保することが求められる。これは、メディエータ機能を有し、かつ酵素固定が可能なポリマーを担体とすることにより解決されると考えた。そこで本研究では、メディエータ機能を効率よく発現し、酵素を固定化できるポリマーを、分子構造、モノマー配列などに着目し分子設計した。またバイオセンサーの機能についても検討した。

本学位請求論文は全体で5章から構成されている。

第1章では、バイオセンサーの要素技術、最近のバイオセンサーの発展の動向を解説し、特に繰り返し使用センサー、微小領域に酵素を固定化する必要のある同時多項目測定デバイスや埋め込み型センサーへの応用を想定した場合の酵素とメディエータの固定化の重要性について述べている。また、酵素やメディエータの固定化についてほかの研究者の試みとメディエータの漏れや酵素の失活といった問題点を検討し、本研究の背景および意義となる部分を述べている。

第2章では、vinylferrocene (VFc)をメディエータユニットとして用い、ハイドロゲルの材料として知られる2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)あるいは疎水性モノマーの材料として知られる *n*-butyl methacrylate (BMA)を共重合モノマーとして用いた poly(VFc-*co*-HEMA) (PVH), poly(VFc-*co*-BMA) (PVB)の合成と電気化学特性評価、酵素固定化担体としての機能、繰り返し測定用センサーとしての安定性についてまとめている。合成したPVHは吸水しハイドロゲルとなり、メディエータユニット比率が0.27と低いにもかかわらずポリマーメディエータ電極間の電子移動反応が見られているが、PVBでは電子移動反応が見られず、ハイドロゲルを形成することがポリマーメディエータとして適当な要素であると結論している。グルコース酸化酵素(GOx)は、PVH表面に1,6-hexamethylenediamine (HMDA)とglutaraldehyde(GA)を用いた化学架橋により酵素の溶出を抑制し固定化されることを見出した。PVHはグラッシカーボンとの密着性もよく、GOxを固定したグルコースセンサーでは2週間にわたって安定したグルコース応答電流が確認できている。ただし、大気下での平衡溶存酸素濃度におけるグルコース濃度測定では、25 mg/dL以下でのグルコース応答電流が見られなかった。この閾値濃度は、溶存酸素濃度が高いほど高くなる傾向があり、この現象はメディエータユニットであるビニルフェロセンの酸化還元特性に由来すると結論している。

第3章では、ハイドロキノンの誘導体である2,5-dihydroxyaniline (An(OH)<sub>2</sub>)をメディエータユニットとして用いたpoly((2,5-dihydroxyphenyl)-methacrylamide-*co*-HEMA) (PDAM)の合成と電気化学的

評価、酵素固定化担体としての機能、繰り返し測定用センサーとしての安定性についてまとめている。ヒドロキノンがラジカルの捕捉剤として機能することを考慮し、バックボーンポリマーとなる poly(methacrylic acid-co-HEMA) の合成を行い、メタクリル酸のカルボキシル基にアミノ基を持つ (An(OH)<sub>2</sub>) を結合し、ポリマーメディエータ (PDAM) を得ている。ヒドロキノンは酸化還元にかかわるヒドロキシル基が 2 個存在し、PDAM はポリマーメディエータと電極間の 2 電子移動反応を示している。PDAM は PVH と同様に塗布し乾燥するだけでグラッシーカーボン電極上に固定化でき、HMDA と GA を用いた化学架橋により GOx を固定化でき、グルコースセンサーは 2 週間にわたって安定したグルコース応答電流を確認できた。HEMA を用いたヒドロキノン系のポリマーメディエータにおいても、ヒドロゲルを形成する共重合体として、酵素固定が可能であることも確認している。また、大気下での平衡溶存酸素濃度における測定では、グルコース濃度の閾値が見られず、この現象はメディエータユニットである (An(OH)<sub>2</sub>) の酸化還元特性に由来すると結論している。

第 4 章では、PVH と PDAM の電気化学特性を比較し、また両者の酵素固定化担体としての機能を比較している。酵素の溶出が少なく、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た電流値特性を得ることができる固定化方法は、メディエータの種類によらず HEMA を一成分とした共重合体を固定化担体とした化学架橋型の固定化により実現されることを示した。

第 5 章は、電極上に固定化でき、酵素の固定化担体として機能するポリマーメディエータの創成に関する総括である。メディエータの溶出を抑制するための解決策としてのポリマー化の提示と、ポリマーを酵素固定化担体として酵素の溶出をも抑制する技術は、酵素センサーの基盤技術として利用できることを結論している。

本研究は、メディエータユニットを持ち電極への固定化が容易で酵素固定化担体としても機能するポリマーメディエータについて系統的に検討しており、バイオセンサーを繰り返し測定センサー、同時多項目測定デバイス、埋め込み型センサーに使用する場合に問題となる酵素やメディエータの溶出を抑制する解決策を提示している。酵素固定化担体としてのポリマーメディエータの確立は、バイオマテリアルとしての有用性を示せたものであり、医療デバイスや環境計測の発展にマテリアル工学の観点から大きな貢献をもたらすものと評価できる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認める。