

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550092

研究課題名(和文)トラックエッチ膜フィルターを母体とする積層型マルチ酵素センサーの開発

研究課題名(英文)Flow-based multi-biosensing system fabricated with track-etched microporous membrane electrodes

研究代表者

水口 仁志 (MIZUGUCHI, HITOSHI)

山形大学・理工学研究科・助教

研究者番号：30333991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トラックエッチ膜フィルター電極を用いる新しい電流検出型酵素センサーを構築した。提案するシステムは、作用電極、検出電極、およびこれらの電極で挟まれた固定化酵素反応器から構成される。L-アスコルビン酸や尿酸のような共存物質は、固定化酵素反応器の上流に位置する作用電極にてほぼ完全に分解される。検出電極で検出される電流のシグナルは、酵素反応によって生成した過酸化水素の電気分解のみに由来し、その大きさは分析対象である基質の濃度に依存する。この結果、ペルオキシダーゼなどの触媒を用いることなく、フィルター電極と固定化酵素反応器を重ねるだけで選択的かつ高感度な酵素センサーとなることが実証された。

研究成果の概要(英文)：The new amperometric biosensor was fabricated by using track-etched microporous membrane electrodes. The proposed sensor system consists a prereactor electrode, a detector electrode, and an immobilized enzyme reactor sandwiched between these electrodes. The interferents such as L-ascorbic acid or uric acid are electrolyzed completely at the prereactor electrode, which is positioned upstream of the enzyme reactor. The increased current response at the detector electrode derives solely from oxidation of hydrogen peroxide produced in the enzymatic reaction. Sensitive and selective response toward analyte concentration was obtained with no other catalytic material such as peroxidase or an electron mediator.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオセンサー 電気分析 酵素 トラックエッチドメンブレン フロー分析

1. 研究開始当初の背景

人の健康状態の指標となる物質を可能な限り簡便な方法で検出することは、疾病の早期発見と適切な処置のためには極めて重要である。電気化学的な分析法には簡便かつ小型化が容易であるという利点があり、これまで多くの手法が開発され実用化されてきた。今日では、生理学的に関連のある複数種の物質を同時に検出することがさらに重要視されている。酵素反応を利用することは選択性の確保において有用である一方、アスコルビン酸や尿酸のように電極反応活性の高い物質の共存による影響を受けやすい。たとえばグルコース酸化酵素 (GOx) を用いてグルコースを間接的に検出する方法では、過酸化水素を酸化する際にアスコルビン酸や尿酸の酸化反応が重なることで妨害となる。また、酵素反応を用いて複数の基質を同時に検出しようとする場合、発生する過酸化水素が他の電極反応に影響を及ぼさないことが大前提である。

酵素センサーにおける妨害の問題を解決するものとして、電極反応活性の高い妨害物質を予め電気分解によって除去する方法がある (図1)。グルコースセンサーの場合、妨害物質の電気分解による生成物は、その後の酵素反応や電極反応に影響を与えないため選択性の優れたセンサーとなる。しかし従来のバンドアレー型の電解セルでは、前段の作用電極で完全な分解を行うには薄層流を用いてさらに流速を抑える必要がある一方、低流速では検出器へ到達するまでに長い時間を要する上に検出感度が低下するという問題がある。これらは互いにトレードオフの関係にあり、従来の電解セルでは上記のスキームを活かすことは難しい。

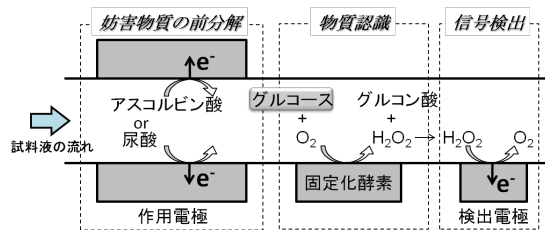


図1. 前段で妨害物質を分解する場合のセンサーの原理

2. 研究の目的

これまで筆者らはトラックエッチ膜フィルターの構造に着目し、これを母体とするフィルター電極を積層したフロー電解セルを提案してきた。トラックエッチ膜フィルターは、径が精密に制御された円筒状真直の孔を持ち、氷面が平滑で膜厚が薄い (7 - 10 μm) という特徴を持つ。このフィルターに金属をコーティングすると、フィルターの表面だけでなく孔の入口付近まで電極として作用し、電解液をろ過しながら安定かつ定量的な電

気分解が可能である。そこで本研究では、このトラックエッチ膜フィルター電極を重ねることで作用電極において妨害物質をすべて分解しつつ、酵素反応で生成した過酸化水素を検出電極ですべて消費するという構造である。この場合、この酵素センサーをさらに積層させても、生成する過酸化水素は後段に影響を及ぼすことはないため、ひとつの電解セルで複数の基質を同時に検出できる理想的なシステムが構築できる。本研究は、この全く新しいタイプのバイオセンサーを開発することが目的である。

3. 研究の方法

ポリカーボネート製のニュークリポアトラックエッチメンブレンフィルターに、スパッタリングで白金をコーティングしたものをフィルター電極として使用した。この作製したフィルター電極を重ね、電解液の流れに沿って、順に作用電極 (WE1)、固定化酵素反応器、検出電極 (WE2)、対電極として配置し、本研究で新たに設計・製作したフローセルにセットした (図2)。各電極の間には、電極同士の短絡を防ぐために何もコーティングしていないトラックエッチ膜フィルターをスペーサーとして挟み込んだ。各電極からのリードはバイポテンシオスタットに接続した。酵素の固定にはアミノ基修飾型シリカゲルを担体として使用し、グルタルアルデヒドを用いる架橋法によって酵素を固定し、本研究ではこれを図中の固定化酵素反応器に充填した。実験の実施にあたっては、図3に示すような流れ分析系を構築した。グルコ

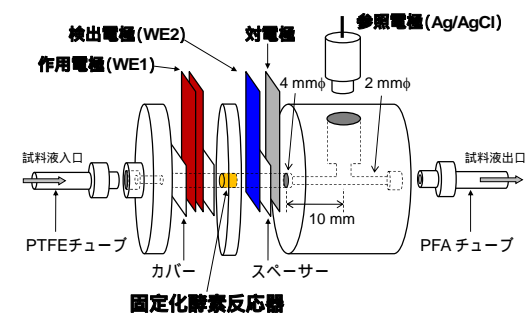


図2. 固定化酵素反応器を搭載したフロー電解セル

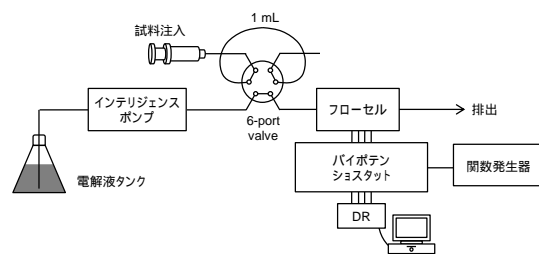


図3. 本研究で使用した流れ分析系の概要

ースを含む試料溶液は、容量 1.0 mL のサンプルループを取り付けた 6 方バルブを介して電解液の流れに注入し、各電極から得られる電流シグナルを観察した。

4. 研究成果

本研究では、まず、作用電極における L-アスコルビン酸および尿酸の分解率と流量の関係について調査した。結果を表 1 に示す。作用電極の電位を 0.9 V vs. Ag/AgCl としたとき 0.1 mM の L-アスコルビン酸は、0.7~1.6 ml min⁻¹ の間においてほぼ定量的に電気分解されたが、0.5 mM の尿酸の場合、流量が増加するにしたがって電気分解効率の顕著な低下が認められた。そこで本研究では、図 4 に示すように、2 枚のフィルター電極を重ねて作用電極を構成したところ、流量が 1.0 ml min⁻¹ まで 0.5 mM の尿酸の 95% 以上が分解され、電極反応活性を有する妨害物質の分解効率の大幅な上昇が認められた。このことは対象となる試料のマトリックスの状況に対して作用電極の枚数だけで対処することができるということを示している。本研究における以後の実験では、フィルター電極を 2 枚重ねて妨害物質分解用の作用電極を構成することとした。

表 1 妨害物質の分解率と流量の関係

物質	流量 / ml min ⁻¹	電気分解率 /%
L-アスコルビン酸	0.7	97
	1.1	97
	1.2	96
	1.6	95
尿酸	0.3	98
	0.5	95
	0.9	91

L-アスコルビン酸および尿酸の濃度はそれぞれ 0.1, 0.5 mM。pH 7.0。作用電極の電位は、0.9 V vs. Ag/AgCl。

次に、グルコースオキシダーゼを固定した担体を固定化酵素反応器に充填したフロー電解セルを用いて、L-アスコルビン酸、尿酸、およびグルコースを含む溶液を注入した時に得られた電流シグナルを図 4 に示す。図中赤線は、作用電極で得られた電流シグナルである。これは、L-アスコルビン酸、および尿酸の電気分解に基づくものであり、グルコース濃度には依存しない。一方、検出電極で得られた電流シグナル(図中青線)は、グルコース濃度の増加にともなって大きくなっていることが分かる。また、グルコースが含まれていないときのブランクシグナル(図中(a))において、L-アスコルビン酸、尿酸の共存は後段の検出電極の電流シグナルにほとんど影響を与えていないことが分かる。これにより、トラックエッチ膜フィルター電極を用いて、図 1 で示したように共存する妨害物

質を分解しつつ酵素反応で生成した過酸化水素を後段の電極で電気分解する原理によって、グルコースを選択的に検出できることがわかった。この原理によれば、基質との反応によって過酸化水素を生成する酸化酵素が適用できる。特に筆者らは、過酸化水素選択性透過膜や電子メディエータ分子などの触媒を用いることなく、フィルター電極と固定化酵素反応器を重ねるだけで作製できるという、本研究で提案する電解セルの構造のシンプルさを強調したい。

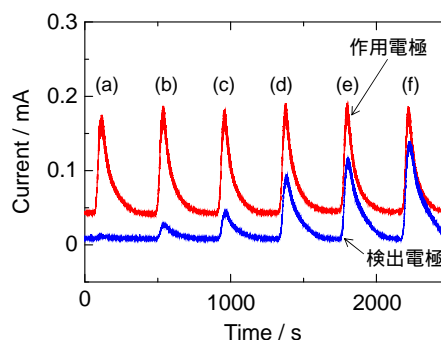


図 4.トラックエッチ膜フィルター電極を用いる酵素センサーにおけるフローシグナル。グルコース濃度はそれぞれ、0 (a)、0.5 (b)、1.0 (c)、3.0 (d)、5.0 (e)、10.0 mM (f)。作用電極と検出電極の電位は、それぞれ+0.9 V、+0.8 V vs. Ag/AgCl。

また、本研究で提案するフロー電解セルでは、固定化酵素反応器と検出電極をさらに交互に重ねることで、複数の基質を同時に検出できるセンサーシステムを構築することができる。この場合、各固定化酵素の反応の至適 pH、および過酸化水素の検出に適した pH との重なり具合によってそれぞれの基質の検出感度が規定される。筆者らは、現在、複数種の固定化酵素反応器を搭載したフロー電解セルを作製しその実証試験を行っており、その結果については近日中に公表できる見込みである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hitoshi Mizuguchi; Track-Etched Microporous Membrane Electrodes and Its Applications in Flow Analysis; Journal of Flow Injection Analysis, 31(1), 19–25 (2014). (査読あり)

Hitoshi Mizuguchi, Jun Sakurai, Yuki Kinoshita, Masamitsu Iiyama, Tatsuro Kijima, Kazuhiro Tachibana, Tatsuo

Nishina, Junichi Shida; Flow-based Biosensing System for Glucose Fabricated by Using Track-etched Microporous Membrane Electrodes, Chemistry Letters, 42(10), 1317–1319 (2013). (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

トラックエッチ膜フィルター電極を搭載したフロー電解セルと流れ分析への応用, 水口仁志; 日本分析化学会第63年会, 広島大学東広島キャンパス, 東広島市, 平成26年9月17–19日. (依頼講演)

トラックエッチ膜フィルター電極システムへの固定化酵素の導入と検出性能の評価; 水口仁志, 市瀬博一, 櫻井淳, 清野翔太, 飯山真充, 木島龍朗, 立花和宏, 仁科辰夫, 志田惇一; 第74回分析化学討論会, 日本大学工学部, 郡山市, 平成26年5月24–25日.

Amperometric Flow Sensor Fabricated Using Track-etched Microporous Membrane Electrodes; H. Mizuguchi; International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Sep. 28–30, 2013, Tohoku University Kawauchi-Kita Campus, Sendai, Japan. (Invited)

Amperometric glucose biosensor fabricated using track-etched microporous membrane electrodes; H. Mizuguchi, J. Sakurai, Y. Kinoshita, M. Iiyama, T. Kijima, K. Tachibana, T. Nishina, J. Shida; 18th International Conference on Flow Injection Analysis (18th ICFIA), Sep. 15–20, 2013, Porto, Portugal.

トラックエッチ膜フィルター電極を用いる酵素センサーの開発と妨害物質の前段階分解によるグルコースの特異検出, 櫻井淳, 木下友貴, 水口仁志, 飯山真充, 木島龍朗, 立花和宏, 仁科辰夫, 志田惇一; 日本分析化学会第62年会, 近畿大学東大阪キャンパス, 東大阪市, 平成25年9月10–12日.

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://mizu-labo.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 仁志 (MIZUGUCHI, HITOSHI)
山形大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号: 30333991

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

木島 龍朗 (KIJIMA, TATSURO)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 50272084

立花 和宏 (TACHIBANA, KAZUHIRO)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 50241724

仁科 辰夫 (NISHINA, TATSUO)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 60172673

飯山 真充 (IIYAMA, MASAMITSU)
野村マイクロサイエンス株式会社