

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670010

研究課題名(和文)非酵素型グルコースセンサーの開発

研究課題名(英文)The development of non-enzymatic glucose sensors

研究代表者

安齋 順一 (ANZAI, Jun-ichi)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40159520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：グルコースに応答する人工素子を化学合成して電極表面に固定化することにより、酵素を用いない非酵素型グルコースセンサーの開発を行った。人工素子は、グルコースに結合するフェニルボロン酸部位および電気化学活性なフェロセン部位を同一分子中に集積化した。この化合物を金電極表面に固定化して、非酵素型グルコースセンサーとした。このセンサーは、pH 7.0 - 9.0の水溶液中で1 - 20ミリモル程度のグルコースに対して濃度に依存した電流応答を示し、血糖値測定に応用可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Non-enzymatic glucose sensors without enzymes were developed by modifying the surface of electrodes with glucose-sensitive synthetic molecules. The synthetic molecules are composed of glucose-binding phenylboronic acid moiety and redox-active ferrocene group. Glucose sensors were prepared by immobilizing the compounds on metal electrode. In cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry, the modified electrode showed redox waves at approximately 0.3 V, which were sensitive to glucose and fructose at pH 7.0-9.0. The glucose sensors exhibited the electrochemical response to glucose in the concentration range of 1-20 mM, suggesting potential application of the sensors to the determination of blood glucose.

研究分野：バイオセンサー

キーワード：グルコースセンサー

1. 研究開始当初の背景

血糖値を測定するグルコースセンサーはすでに市販されており、糖尿病治療の現場で広く利用されている。このグルコースセンサーは、小型電極と酵素を組み合わせて作製された装置で、実際には金、白金、または炭素電極の表面にグルコースオキシダーゼ (GOx) が固定化されている。GOx はグルコースを選択的に酸化してグルコン酸を生成するが、その際に過酸化水素を副生する。グルコースセンサーは、生成した過酸化水素を電気化学的に酸化する際の酸化電流を出力信号とする。この方式では、GOx の高い選択性のために高性能センサーが実現されている。しかし、酵素を用いるので、以下の欠点がある。1) 酵素活性にバラツキがあり、センサーの性能を一定にすることができない、2) 酵素活性が徐々に低下するので、センサーの耐久性が低い、3) 酵素が高価でセンサーのコストが高い。上記の欠点は酵素を使用することに起因するものであり、酵素に代わる素子を用いることができれば解決することができる。事実、非酵素型グルコースセンサーの開発が世界中で活発に研究されている。しかし、これらは金属微粒子や炭素系ナノ物質を用いるものであり、グルコースに対する選択性は実際上皆無であり、また中性溶液中では動作しないセンサーも少なくない。一方、我々はフェニルボロン酸誘導体を人工素子として用いたグルコースセンサーの開発を検討してきた。これまでの検討で、フェニルボロン酸修飾電極がグルコースセンサーとして機能することが明らかになったが、測定に際して酸化還元マーカを試料溶液に添加することが必要であった。これは、血液試料を実際に測定する際には大きな支障となる。したがって、測定試料中に酸化還元マーカの添加を必要としない、真のセンサーの開発が望まれる。

2. 研究の目的

上記の背景に立脚し、本研究ではフェニルボロン酸誘導体を人工素子として用いて電極表面に固定化することにより、酵素を使用しない非酵素型グルコースセンサーを作製する方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) センサーの作製

フェニルボロン酸誘導体をグルコース識別用の人工素子として用いて、これを電極表面に固定化するので、市販原料からこの化合物を化学合成する。このために、フェロセンボロン酸への置換基の導入、およびフェロセンとボロン酸部位を共有する誘導体の合成を行う。また、これらの化合物を電極表面へ固定化するために、チオール誘導体とした自己組織化単分子膜、および高分子膜を検討する。前者については、金電極表面に単分子膜を形成するために、研磨洗浄した金ディスク

電極を、これらの化合物のチオール誘導体をアルコール溶液として浸漬する方法を採用する。チオールと金とは強固な結合を形成することがすでに知られているので、良好な単分子膜修飾電極が作製できる。電極表面の単分子膜被覆率を求めるために、水晶振動子マイクロバランス法および電気化学的還元脱離法を採用する。また、電極表面に固定化されたフェロセン誘導体の酸化還元特性の評価にはサイクリックボルタンメトリー (CV) または微分パルスボルタンメトリー (DPV) を用いる。また、高分子膜としてこれらの化合物を電極表面に固定化するためには、交互累積膜法およびポリイオンコンプレックス法を用いる。このために、ポリアリルアミン (PAH) やポリエチレンジアミン (PEI) など正電荷を有するポリマーの側鎖にこれらの化合物を結合させる。これらのポリマーを用いて交互累積膜およびポリイオンコンプレックスを形成するために、対アニオンとして負電荷を有する数種のポリマー、すなわちポリアクリル酸 (PAA)、ポリビニルスルホン酸 (PVS)、アルギン酸 (AGA)、カルボキシメチルセルロース (CMC) などを検討する。

(2) センサーの性能評価

センサー電極の表面にはフェロセンが固定化されているので、電極電位を変化させることにより酸化還元反応を示し、ボルタモグラム上に酸化還元波が観察される。一方、電極表面のボロン酸部位にグルコースが結合すると、フェロセン部位の電子構造が影響を受けボルタモグラムが変化すると予想される。これは、グルコースが結合することによりフェロセン近傍に負電荷が発生して、フェロセンの酸化型 (正電荷を有する) が安定化されるためである。この際の、電位または電流の変化量がグルコース濃度に依存すると思われるので、センサーの出力信号となる。即ち、この変化量とグルコース濃度との関連をボルタンメトリーにより実験的に求めて、グルコースセンサーとしての性能を評価する。この際に、グルコースを含有した標準試料を用いるが、pH やイオン強度を生理的条件付近として評価を行う。研究目的で述べたとおり、非酵素型グルコースセンサーの利点は、性能のバラツキを抑制できること、および耐久性を向上できることである。この2点について集中的な検討を行い、センサーの性能向上を図る。性能のバラツキを抑制できるかという点に関しては、同一条件で作製した大量のセンサーについて検討して、応答特性がセンサー毎にどの程度差があるのか明らかにする。また、どのような条件で作製すれば均一な性能のセンサーを作製できるのか、試薬の濃度や処理時間、洗浄方法などを検討する。また、センサーの耐久性を向上できるかという点に関しては、最適条件により作製したグルコースセンサーについて、繰り返して測定に用いた際の応答特性の再現性・安定性につ

いて評価を実験的に行う。

4. 研究成果

(1) センサーの作製

初めにフェロセンボロン酸を原料としてチオール誘導体の合成を試みたが、電気化学的反応に伴い分解してしまい、安定な化合物を調製することが困難であった。次に、アミノ基およびカルボキシル基で置換されたフェニルボロン酸を原料として、アミノ基にフェロセンを結合させ、カルボキシル基にはシスタミンを結合させることにより、目的とする化合物を合成することに成功した。さらに、アミノメチル基置換安息香酸のアミノ基をフェロセンおよびフェニルボロン酸で置換した化合物を合成した。この安息香酸誘導体のカルボキシル基にシスタミンを結合させることにより、目的とする第2の化合物を合成した。これらの化合物のエタノール溶液に金ディスク電極を浸漬することにより、電極表面にこれらの化合物を単分子膜として固定化することに成功した。これらの化合物の表面被覆率を求めたところ、ほぼ単分子レベルで被覆されていることが明らかになった。さらに、これら2種の化合物をポリマーの側鎖に結合させて、電極表面にポリイオンコンプレックス膜として被覆することにも成功した。当初は、平滑に研磨した金ディスク電極を使用してセンサーを作製したが、センサーの応答が予期したほど大きくなかったので、炭素電極に金微粒子を析出させた電極を用いたセンサーも作製した。このように、電極表面を目的とする化合物で修飾することにより、当初目的とした非酵素型グルコースセンサーを作製することができた。

(2) センサーの性能評価

単分子膜およびポリイオンコンプレックス膜のいずれの方法で作製したセンサーも、化合物中のフェロセンに起因する酸化還元信号を示した。CVおよびDPVにおける酸化還元電位は約0.3V付近であった。試料溶液中にグルコースまたはフルクトースが添加されると、糖濃度に依存して、たとえばDPVではセンサーの電流値が約50%程度に低下することが見出された。このような糖応答は、pH7.0、8.0、および9.0の溶液で観察された。また、糖の応答濃度範囲は1~20mM程度であった。また、多くのセンサーを作製して応答を比較したが、センサー間の性能のバラツキは比較的小さかった。したがって、ほぼ生理的条件下での血糖値の測定に使用できる可能性が示唆される。一方、グルコースに対する応答よりもフルクトースに対する応答がやや大きく、グルコース選択性は十分でなく、今後改善が必要である。また、センサーの再使用性にはやや難があり、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Yu Aikawa, Takumi Watanabe, Daichi Minaki, Shigehiro Takahashi, Baozhen Wang, Jun-ichi Anzai, Effect of poly(amine)s on the redox properties of carboxymethylcellulose and ferrocene-modified poly(amine) layer-by-layer films, *Electroanalysis*, 28, 327-333 (2016). 査読有、DOI 10.1002/elan.201500424
Baozhen Wang, Jun-ichi Anzai, Recent progress in lectin-based biosensors, *Materials*, 8, 8590-8607 (2015). 査読有、DOI 10.3390/ma8031187
Baozhen Wang, Jun-ichi Anzai, Recent progress in electrochemical HbA1c sensors: A review, *Materials*, 8, 1187-1203 (2015). 査読有、DOI 10.3390/ma8125478

[学会発表](計20件)

諏訪圭祐、多糖類/フェニルボロン酸修飾 dendリマー交互累積膜の糖応答性、日本薬学会第136年会、2016年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
白石裕真、フェロセン修飾フェニルボロン酸の糖応答性、日本薬学会第136年会、2016年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
皆木大知、フェロセン修飾ポリマー被覆電極の電気化学応答のpH依存性、日本薬学会第136年会、2016年3月28日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
Katsuhiko Sato、Glucose-induced decomposition of multilayer film under physiological conditions、*Pacificchem* 2015、2015年12月17日、ホノルル(アメリカ合衆国)
諏訪圭祐、ボロン酸修飾 dendリマー/GOx累積膜の調製とフルクトース応答、第54回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日、岩手医科大学(岩手県矢巾町)
淡路一真、フェニルボロン酸修飾ポリマーを用いた過酸化水素応答薄膜の調製、第54回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日、岩手医科大学(岩手県矢巾町)
瀬野大、ボロン酸含有累積膜のpHおよび糖に対する応答のボロン酸含量の影響、第54回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日、岩手医科大学(岩手県矢巾町)
皆木大知、カテコール/ボロン酸複合体の糖応答性、第54回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日、岩手医科大学(岩手県矢巾町)
白石裕真、フェロセン修飾フェニルボロン酸の各種ジオール類等の応答、第54回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日、岩手医科大学(岩手県矢巾町)

町)

西山智弘、フェロセン修飾フェニルポロン酸のグルコースおよびフルクトース応答、第54回日本薬学会東北支部大会、2015年9月26日、岩手医科大学(岩手県矢巾町)

皆木大知、交互累積膜修飾電極上でのアリザリンレッドSの糖応答性、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

白石裕真、フェロセン修飾フェニルポロン酸の糖共存下における電気化学応答、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

佐藤勝彦、生理条件下でグルコースに応答する多層薄膜の調製、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

白石裕真、グラフェン修飾電極の作製と電気化学応答、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

相川 優、フェロセン置換ポリエチレンイミン修飾電極の応答性、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

高橋麻緒、フェニルポロン酸累積膜のグルコース応答、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

皆木大知、フェニルポロン酸ポリマー修飾電極の糖応答性、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

伊藤愛望、フェニルポロン酸交互累積膜の過酸化水素応答、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

諏訪圭祐、フェニルポロン酸 dendrimer 累積膜の pH 及び糖応答性、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

西山智弘、フェニルポロン酸 dendrimer 累積膜の応答性：修飾率および置換基の効果、日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安齋 順一 (ANZAI, Jun-ichi)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40159520

(2) 研究分担者

佐藤 勝彦 (SATO, Katsuhiko)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：80400266