

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18560005
 研究課題名 (和文) 有機-無機複合ラングミュア・プロジェクト膜による新規グルコースセンサーの開発
 研究課題名 (英文) Development of new amperometric biosensors based on organic-inorganic hybrid ultra-thin films
 研究代表者
 大貫 等 (OHNUKI HITOSHI)
 東京海洋大学・海洋工学部・助教
 研究者番号：60223898

研究成果の概要：正に帯電するカチオン性長鎖アルキル分子を鉄シアノ塩であるプルシアンブルー水溶液上に展開し、その水面上単分子膜を基板上に累積するとナノサイズのプルシアンブルークラスターを含む超薄膜が得られる。この有機-無機ハイブリッド超薄膜は高精度なバイオセンサの構成材料として非常に有望であることが分かった。すなわち、様々な酸化酵素を薄膜内に導入することにより、非常に低い印加電圧で動作する各種バイオセンサを作り出すことができる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：応用物理

科研費の分科・細目：応用物理学・結晶物性

キーワード：有機-無機ハイブリッド、バイオセンサー、ラングミュア・プロジェクト膜

1. 研究開始当初の背景

アンペロメトリー型のバイオセンサーは、扱いやすい電流値の形でシグナルを取り出せることから、最も実用化が進んでいるバイオセンサーである。これまでに、酵素の酸化還元反応を補助するメディエータを導入して印加電圧を低下させ、試料内の溶存酸素や狭雑物質を排除する工夫や、導電性ポリマーの網目構造に酵素を閉じ込めて固定化を行うなど、特性向上の様々な試みがなされてい

る。

最近、無機物であるプルシアンブルー (PB) が、その触媒作用によって H_2O_2 還元反応を促進する点に注目した、新しい有機-無機複合系によるアンペロメトリー型酵素センサーの開発が行われている。ここで PB は、酵素-基質反応によって生成する H_2O_2 に対し、ゼロ電位付近 (0 V vs. Ag/AgCl) においてこれを $2OH^-$ へと変換する反応を引き起こし、測定系に電流を生じさせる。そのためこのセンサ

一では、結果的に印加電圧ゼロ付近において測定が可能であり、狭雑物質の影響をほぼ完璧に排除することが可能である。

一方、我々がこれまでに研究を行ってきたラングミュア・プロジェクト (LB) 膜の研究分野では、水面上におけるカチオン性長鎖アルキル分子と可溶性 PB の反応を利用した、PB ナノ結晶を含む LB 膜の作成法が最近見出された。すなわち、カチオン性長鎖アルキル分子を PB 水溶液上に展開すると、水面上で両者の間で反応が進行し、これを基板上に累積するとナノサイズ (~100 nm) の PB 微結晶層がサンドイッチされたヘテロ膜構造が得られる。

もしもこのような PB ナノ結晶を含むヘテロ LB 膜に酵素の導入が可能ならば、ナノサイズ表面での高触媒活性が期待できることから、理想的な有機 - 無機複合デバイスが作製できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は上記のような観点から、代表的な酸化酵素であるグルコース酸化酵素 (GOx) およびコレステロール酸化酵素 (ChOx) を取り上げ、これを上記 PB ヘテロ LB 膜内に固定化することで新規な超薄膜グルコースセンサーおよびコレステロールセンサーを開発することを目的としている。具体的には、センサー特性の最適化を目指し、次の項目について明らかにしていく。(1) 超薄膜バイオセンサーの諸特性を明らかにする。(2) 下層液の PB 濃度や pH をコントロールすることで PB ナノ結晶のサイズや酵素の吸着密度を変え、デバイス作成に最適な条件を探る。(3) 電極材料として導電性 LB 膜を使用することで応答電流密度を上昇させる。

3. 研究の方法

(1) 試料作成

PB 水溶液 (1×10^{-5} mol/L) 表面上に陽イオン性長鎖アルキル分子 Octadecyl-trimethylammonium bromide (ODTA) を展開し、この水面上単分子膜を LB 法により Au/Cr 電極パターンを形成したガラス基板上に 6 分子層成膜した (以下、ODTA/PB 試料と呼ぶ)。この LB 膜を酵素水溶液中に浸漬することにより酵素を膜中に固定化した (以下、ODTA/PB/酵素試料と呼ぶ)。固定化溶液の pH は HCl, KHCO_3 , KOH によりコントロールを行い、pH 依存性を評価した。導電性 LB 膜は BEDO-TTF とステアリン酸から構成される LB 膜を用いた。本 LB 膜は最も高い電気伝導特性を示す LB 膜の一つであり、110K 以上で金属的な電気伝導特性を示す。

(2) 試料評価

膜の積層構造は X 線回折により評価した。PB 吸着状態は透過電子顕微鏡により調べた。

酵素の固定化量は赤外反射吸収法により評価した。バイオセンサー特性は三電極系を用いたアンペロメトリー計測により評価した (リン酸バッファー溶液中、基準電極: Ag/AgCl, 対電極: Pt ワイヤを使用)。

4. 研究成果

ODTA/PB LB 膜中には直径 10-20nm の PB ナノクラスターが多数吸着していることが透過電子顕微鏡観察より明らかになった。X 線回折実験によると、この LB 膜には 23Å の積層周期が存在する (図 1)。しかし酵素吸着により、この周期構造は完全に消失する。従って、酵素は膜の積層構造の層間に入り込んで固定化されていることが分かった (図 2)。

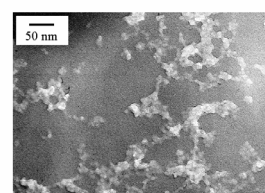


図 1

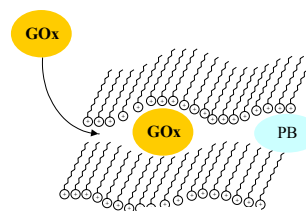


図 2

一方、酵素固定化量は溶液の pH に大きく依存していることが赤外反射吸収測定から明らかにされた。具体的には、酵素が帯電する pH 値に相当する等電点より 0.1 程度高い pH 値で、最大量の酵素が吸着する。しかし、それより高い pH 値では徐々に吸着量が減少し、低い pH 値では殆ど吸着しない。さらにこの現象は、LB 膜の成膜分子である ODTA と酵素との静電相互作用に基づく吸着モデルで説明可能であることが分かった。

グルコース酸化酵素を固定した ODTA/PB/GOxLB 膜およびコレステロール酸化酵素を固定した ODTA/PB/ChOx LB 膜は、印加電圧ゼロ付近において、それぞれ良好なグルコースセンサー特性およびコレステロールセンサー特性を示すことが分かった。特に ODTA/PB/GOx LB 膜については、GOx 吸着量に依存した応答電流密度の増大の研究を通じて、pH=4 の GOx 溶液で最も感度の高いセンサーを構成することを確認した。

導電性 LB 膜コーティングは安定なセンサー特性と応答電流密度の増大に非常に有効であることが分かった。すなわち導電性 LB 膜

コーティングを施した試料では、応答電流密度が2倍程度増大すると共に、一連の測定を複数回行っても感度低下が見られない。これは、導電性LB膜コーティングにより電気的な接触が確立され、表面付近のPBナノクラスター活性化すると同時に、酵素の脱離を防いでいるためと推定される。

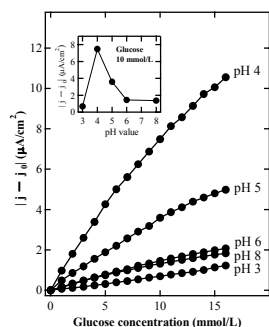


図 3

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 5 件)

- ① Hitoshi Ohnuki, Takafumi Saiki, Akira Kusakari, Masaki Ichihara, Mitsuru Izumi, *Immobilization of glucose oxidase in Langmuir-Blodgett films containing Prussian blue nano-clusters*, Thin Solid Films, vol. 516, p. 8860-8864, 2008 年, 査読有
- ② Akira Kusakari, Mitsuru Izumi, and Hitoshi Ohnuki, *Preparation of an enzymatic glucose sensor based on hybrid organic-inorganic Langmuir-Blodgett films: Adsorption of glucose oxidase into positively charged molecular layers*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 321, p. 47-51, 2008 年, 査読有
- ③ Hitoshi Ohnuki, Takafumi Saiki, Akira Kusakari, Hideaki Endo, Masaki Ichihara, and Mitsuru Izumi, *Incorporation of Glucose Oxidase into Langmuir-Blodgett Films Based on Prussian Blue Applied to Amperometric Glucose Biosensor*, Langmuir, vol. 23, p. 4675-4681, 2007 年, 査読有
- ④ Nobuaki Watanabe, Hitoshi Ohnuki, Mitsuru Izumi, and Tatsuro Iamakubo, *Metal ion adsorption to conducting organic langmuir-blodgett films*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, vol. 284-285, p. 640-642, 2006 年, 査読有
- ⑤ Hitoshi Ohnuki, Takafumi Saiki, Tatsuro

Imakubo, and Mitsuru Izumi, *New Molecular combinations for spontaneous mixed valence state formation between EDO-TTF derivatives and carboxylic acids*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, vol. 284-285, p. 15-19, 2006 年, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① H. Ohnuki, R. Honjo, H. Endo, and T. Imakubo, M. Izumi, *Fabrication of enzymatic biosensors based on hybrid organic-inorganic LB film*, First International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterial, 2009 年 3 月 19 日, Tours (France)
- ② Hitoshi Ohnuki, Rikimaru Honjo, Mitsuru Izumi, Hideaki Endo, and Tatsuro Imakubo, *Amperometric Cholesterol Biosensors Based on Hybrid Inorganic-Organic LB films*, 8th International Conference on Nano-Molecular Electronics, 2008 年 12 月 18 日, Kobe (Japan)
- ③ 大貫 等、本上力丸、今久保達郎、遠藤英明、和泉 充、有機-無機複合構造による超薄膜コレステロールセンサの開発、第 69 回応用物理学会学術講演会、2008 年 9 月 5 日、中部大学
- ④ 草刈 顕、大貫 等、和泉 充、有機-無機複合構造による新しい酵素型グルコースセンサの開発 (III)、第 55 回応用物理学関係連合講演会、2008 年 3 月 30 日、日本大学
- ⑤ Akira Kusakari, Hitoshi Ohnuki, and Mitsuru Izumi, *Preparation of a New Enzymatic Glucose Sensor based on Hybrid Inorganic-Organic LB films*, The 12th International Conference on Organized Molecular Films, 2007 年 7 月 3 日, Krakow (Poland)
- ⑥ 草刈 顕、大貫 等、和泉 充、プルシアンブルー系有機-無機複合 LB 膜のグルコースセンサ特性、電気化学会第 74 回大会、2007 年 3 月 29 日、東京理科大学
- ⑦ 草刈 顕、大貫 等、和泉 充、有機-無機複合構造による新しい酵素型グルコースセンサの開発 (II)、第 54 回応用物理学関係連合講演会、2007 年 3 月 29 日、青山学院大学
- ⑧ 大貫 等、草刈 顕、遠藤 英明、才木隆史、和泉 充、有機-無機複合 Langmuir-Blodgett 膜のバイオセンサ応用、平成 19 年度電気学会全国大会、2007 年 3 月 17 日、富山大学
- ⑨ Hitoshi Ohnuki, Takafumi Saiki, Akira Kusakari, and Mitsuru Izumi, *Immobilization of glucose oxidase in Langmuir-Blodgett films based on Prussian*

Blue, 10th European Conference on Organised Film, 2006年8月23日, Riga (Latvia)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

生体高分子およびナノ構造体への電気的な接触を確立する技術、発明者：大貫 等、和泉 充、草刈 颯、種類：特許権、特願2008-35432、2008年2月22日、国内

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大貫 等 (OHNUKI HITOSHI)

東京海洋大学・海洋工学部・助教

研究者番号：60223898

(2) 研究分担者

和泉 充 (IZUMI MITSURU)

東京海洋大学・海洋工学部・教授

研究者番号：50159802

(3) 連携研究者

なし