

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659013

研究課題名(和文) 呼気ガス測定のための超高感度バイオセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of biosensors for breathing gas

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：表面を金ナノ粒子または還元型グラフェンで修飾して過酸化水素応答性電極を作製した。すなわち、金電極をポリアミンと金ナノ粒子分散液に交互に浸漬して、表面に金ナノ粒子累積層を形成した。この電極は過酸化水素に対して応答がやや増大した。次に、還元型グラフェンを用いて同様な修飾電極を作製した。この電極は過酸化水素に対する応答が未修飾電極に比べて数十倍に増大した。電極表面を高分子薄膜で被覆するとアスコルビン酸と尿酸に対する応答を低減することができた。さらに、乳酸オキシダーゼを修飾すると溶液中の乳酸を測定することが可能であった。一方、センサーを呼気に晒したところ微弱な応答が観察されたが再現性に課題が残った。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen peroxide-sensitive electrodes have been prepared using Au nanoparticles or reduced graphene. Au nanoparticles were deposited on the surface through a layer-by-layer deposition of Au nanoparticles and polyamine. The Au-modified electrodes exhibited enhanced response to hydrogen peroxide to some extent. On the other hand, reduced graphene-modified electrodes showed highly enhanced response to hydrogen peroxide, while the response to ascorbic acid and uric acid was not so enhanced. The response to ascorbic acid and uric acid was reduced by coating the electrode surface with polymer thin films. Biosensors prepared by modifying the surface of graphene-coated electrode with lactate oxidase afforded lactate sensors. The lactate sensors were used for detecting lactate in aqueous solutions. In addition, we tried to use this lactate sensors for detecting lactate in breathing gas. The sensor exhibited weak response to the gas although the response was not satisfactorily reproducible.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

呼吸ガス中には呼吸器や消化器の病態を反映するマーカー物質が含まれているので、バイオセンサーにより直接測定することができれば非常に有益である。しかし、従来のバイオセンサーは血液などの溶液試料を測定対象としており、気体中に含まれる物質を直接測定することはできない。その第一の理由は、呼吸ガス試料には電流を測定するための溶液層が存在しないことである(気体試料は絶縁体なので電流測定が困難)。また、仮に電流測定が可能になっても、呼吸ガスを測定するには現状のバイオセンサーは感度が低すぎる。本研究では、バイオセンサーに新しい構造を導入することにより上記2点の問題を解決して、呼吸ガス中のマーカー物質を直接測定できる超高感度バイオセンサーを開発する。即ち、本研究では国内外に全く類を見ない気体測定用バイオセンサーを実現する。国内外で、排気ガスの測定などを目的とした“ガスセンサー”が開発されているが(Yamazoe et al, Sens. Actuators B, 108, 2, 2005) 呼吸ガス中の化学物質を選択的に検出することはできない。従って、基質選択性のあるバイオセンサーに立脚したセンサー開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、呼吸ガス中に含まれる化学成分を直接測定することを目的に、空気中で使用できる超高感度バイオセンサーを試作する。呼吸ガス中には健康状態や病態を示すマーカー物質が多く含まれているにも拘らず、含量が低いために直接測定はきわめて困難である。本研究では、空気中で使用できる超高感度バイオセンサーを試作する。この目的のために、本研究では以下の2つの方法を用いる。第一は金ナノ粒子により電極の実効表面積を著しく増大させること、第二は交互累積膜ナノゲルによる疑似溶液層を被覆することである。さらに、電極の実効表面積を拡大し、電気化学応答を増大させるために還元型グラフェンオキシドを使用した修飾電極の作製も行う。

3. 研究の方法

電極表面への金ナノ粒子の大規模かつ高密度固定化(超高感度化のため): センサーの出力信号感度(電流値)は用いる電極の表面積に比例する。本研究では、電極表面を金ナノ粒子で修飾して電極の実効的な表面積を著しく増大させることを試みる。電極表面に固定化した金ナノ粒子の数が増えれば増えるほど実効的な表面積が増大し、金は導電性なので表面積に比例して応答電流が増大すると考えられるので、表面に金ナノ粒子を垂直方向に320個程度重ねて固定化すれば、金ナノ粒子の合計の表面積は約1000倍になる。従って、同じ試料を測定したときの応答電流値も1000倍に増大するものと期待でき

る。また、金ナノ粒子の数をある程度制御して固定化するために交互累積法を用いるが、金ナノ粒子の安定化のため、及び金ナノ粒子間の接着剤としてポリアミンを用いる。金ナノ粒子間の電子移動効率がポリアミンに妨害されて低下する可能性もあるので、電流値を増大させるために必要な金ナノ粒子の数は幾分増える可能性もある。以上の考察から、たとえば直径10nmの金ナノ粒子を垂直方向に320個累積固定化すれば、金ナノ粒子層の厚さは約3ミクロンと計算される。いずれにしても、金ナノ粒子を用いて電流値増大のために精密設計された例はこれまでに報告例がなく、本研究での新規な試みである。

電極表面への疑似溶液層の作製(空気中での導電性付与のため及び酵素の反応場): 呼吸ガスを測定試料とするために電極上に固定化した金ナノ粒子の表面を疑似溶液層(ゲル薄膜)で被覆する。疑似溶液層は膨潤特性に富む高分子材料を用いて、交互累積膜法により作製する。交互累積膜法は正および負の電荷を有する高分子を交互に1層ずつ累積させて薄膜とする方法で、累積層数を加減することにより膜厚をナノメートルレベルで制御することができる。センサー表面を被覆したゲル薄膜により導電性が保証され、また酵素の反応場となり気体試料中でも溶液中と同様の測定が可能になる。このゲル薄膜は厚さを10~50ナノメートル程度に調節して、呼吸ガス中の成分を濃縮することにより高感度化を達成する。なお、金または白金電極と参照電極および対極が一体化されている型の電極を用いる。金ナノ粒子の利用をはじめに検討するが、必要に応じて他のナノ物質を用いた検討も実施する。

4. 研究成果

金電極の表面を金ナノ粒子溶液とポリアミン溶液に交互に浸漬することにより、電極表面に金ナノ粒子層の固定化を行った。この過程を水晶振動子マイクロバランスを用いて共振周波数の変化から評価したところ、電極を両方の溶液に浸漬する回数に応じて表面に固定化される金ナノ粒子の重量が増大することが明らかになった。これにより、ポリアミンと金ナノ粒子が化学結合して電極表面上で累積膜を形成していることが強く示唆された。また、溶液への電極の浸漬回数を加減することにより、電極上へ固定化される金ナノ粒子の重量を容易に制御できることが示された。次に、このようにして作製した金ナノ粒子固定化電極を用いて過酸化水素を検出することを試みた。金ナノ粒子修飾電極を過酸化水素溶液に浸して、三電極法により電極電位を0.6Vに設定した際に過酸化水素が電極で酸化されて発生する酸化電流を測定した。その結果、金ナノ粒子修飾電極は1-10mM程度の過酸化水素に対して電流応答を示すことが判明した。金ナノ粒子で修飾した電極は未修飾金電極に比べて応答電流

値の増大が見られたが、増大量は予期したほど大きくはなかった。

過酸化水素に対して高い応答性を示す電極を作製するために、次にグラフェン修飾電極の作製とその性能評価を行った。グラファイトを原料として常法により調製したグラフェンオキシドを水溶液に分散させて、電解法により電極表面に還元型グラフェンを析出させた。すなわち、グラフェンオキシド分散液に浸した電極に電位掃引を行うとグラフェンオキシドが電極表面で電解還元され疎水性が増大することに伴って電極表面に析出した。電位掃引の電位幅や掃引回数を加減することにより、良好な還元型グラフェン修飾電極を作製することが可能であった。このようにして作製した還元型グラフェン修飾電極の過酸化水素に対する応答を検討したところ、電極に 0.6V の電位を印加した際に観察される応用電流は、未修飾電極に比べて数十倍に増大することが明らかになった。また、過酸化水素溶液中で電極に 0V の電位を印加すると過酸化水素の還元電流が観察され、このときの電流値も未修飾電極に比較して著しく増大することがわかった。これは、高い導電性を有する還元型グラフェンが電極表面に固定化されたことにより、電極の実効表面積が増大したことに起因するものと考えられる。

一方、修飾電極を用いてバイオセンサーを作製する際に、生体試料中に共存するアスコルビン酸や尿酸の妨害がしばしば問題となるので、作製した還元型グラフェン修飾電極のこれらの物質に対する応答を検討した。このために、還元型グラフェン修飾電極を用いてアスコルビン酸と尿酸のサイクリックボルタメトローリーを測定した。その結果、修飾電極ではこれらの物質の酸化電位がやや低下したが、電流値の増大は 1.5~2 倍程度であった。過酸化水素に対する電流応答が数十倍に増大したことに比べると、アスコルビン酸と尿酸の電流値の増大はきわめて低いことがわかった。すなわち、アスコルビン酸と尿酸の妨害が増大する危険を回避することが可能であった。アスコルビン酸と尿酸に対する応答が何故それほど増大しないのか、理由は明らかではないが、還元型グラフェン修飾電極は本研究の目的にとっては好都合な性能を示すことが明らかになった。また、電極表面へのグラフェンの修飾方法を検討した。グラフェンオキシド分散液を電極表面に滴下して乾燥するとグラフェンオキシド層が形成したので、これを溶液に浸して電解還元を行うと良好な還元型グラフェン修飾電極になることがわかった。この方法では、電極表面に修飾するグラフェンの量を制御することが容易であり、電極性能の最適化に有用であることがわかった。

前述したように、還元型グラフェン修飾電極は応答が著しく大きくないもののアスコルビン酸と尿酸に対しても電流が観察さ

れるので、バイオセンサーを作製する上で好ましくない。そのため、これらの物質の応答をさらに低減するために、還元型グラフェン修飾電極を高分子薄膜で被覆することを検討した。すなわち、電極表面をポリアリルアミンとポリビニル硫酸の交互累積膜で被覆して、アスコルビン酸と尿酸に対する電流がどのように低減されるか調べた。その結果、交互累積膜の層数を 5 層以上にすると応答が著しく減少した。一方、過酸化水素に対する応答の減少は 50% 程度にとどまることが明らかになった。これは、アスコルビン酸と尿酸に比較して過酸化水素の分子サイズが小さいので、前者は交互累積膜を透過できないのに対して過酸化水素は透過性が高いことに起因するものと考えられる。

このように、交互累積膜で被覆した還元型グラフェン修飾電極が良好な性能を示すことがわかったので、表面に乳酸オキシダーゼを固定化して目的とする乳酸バイオセンサーを作製した。すなわち、電極上の交互累積膜の表面をポリアリルアミンとして静電相互作用により乳酸オキシダーゼを固定化した。その結果、このセンサーは 1~10mM 程度の乳酸に応答し、溶液中の乳酸を測定することが可能であることがわかった。乳酸を測定する際に、共存するアスコルビン酸と尿酸による妨害は一定程度あるものの低減することに成功した。次に、このようにして作製した乳酸センサーを用いて呼気中の乳酸を測定することを試みた。乳酸センサーの表面を呼気に晒すと電流値の微弱な応答が観察されたが、出力信号の再現性が良好ではなく、応答特性を定量的に評価するには至っていない。今後、センサーへの乳酸オキシダーゼの固定化量を増大するなどして、呼気に対する応答感度を向上させることが必要である。

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 1 件)

Shigehiro Takahashi, Naoyuki Abiko, Jun-ichi Anzai, Redox response of reduced grapheme oxide-modified glassy carbon electrodes to hydrogen peroxide and hydrazine, *Materials*, 査読有, 6 巻, 2013 年, 1840-1850
DOI:10.3390/ma6051840

〔学会発表〕(計 3 件)

高橋成周、濱中伸夫、安孫子直幸、安斉順一、還元型グラフェンオキシド修飾電極を用いた固定化 1-ナフタレンボロン酸アリザリンレッド S 複合体の電気化学応答、第 52 回日本薬学会東北支部大会、2013 年 10 月 20 日、仙台
渡邊 匠、安斉順一、グラフェン累積膜

の調製と性質、平成 25 年度日本分析化学
会東北支部若手交流会、2013 年 7 月 20
日、仙台
安孫子直幸、高橋成周、安齋順一、グラ
フェン修飾電極を用いる酸化還元反応、
第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012
年 10 月 7 日、青森

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.tohoku.ac.jp/~bussei/home.html>

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・教授
研究者番号：80400266

(3) 連携研究者

長谷部 靖 (HASEBE, YASUSHI)
埼玉工業大学・工学部・教授
研究者番号：20212144