バイオ・エレクトロケミカル・センサー

下 村 雅 人*

Bioelectrochemical Sensors

Masato SHIMOMURA (Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1, Kamitomioka-machi, Nagaoka 940-2188, Japan)

Bio-related reactions are broadly applicable in detection and determination of specific substances as well as in chemical synthesis. Many types of biosensors have been developed by use of biomaterials, such as enzymes, antibodies and binding proteins. In biosensing systems, it is essential to convert chemical and/or physical changes accompanying specific molecular recognition with the biomaterials into definite information. Bioelectrochemical systems consisting of biochemical and electrochemical reactions are promising candidates to inform the biochemical molecular recognition as electrical signals. In this article are surveyed the molecular recognition with biomaterials, their application to biosensors, especially to bioelectrochemical sensors, and the example of amperometric sensing with them.

Key Words : Biosensor, Bioelectrochemical Sensor, Molecular Recognition, Enzyme, Biomaterial, Amperometric Sensing, Conducting Polymer

1. は じ め に

生体内には特定の物質と特異的に相互作用する様々な物質が存在している。さらに、微生物、植物および動物組織なども特定の物質を特異的に認識する微小装置とみなすことができる。これらの特異的相互作用による物質認識を利用して特定物質の定性、定量を行うために考案された素子がバイオセンサーである。すなわち、バイオセンサーとは分子認識能を有する生物由来の物質や生物(あるいはその一部)と人工的な情報変換機構(トランスデューサー)とを組合わせた物質計測素子に他ならない。

歴史的にみると、すでに1960年代には各種の酵素を用いた酵素センサーの研究・開発が始まっており、次いで、微生物センサー、組織センサー、抗原-抗体反応を利用した免疫センサーなどの開発が盛んに行われるようになった。とくに、バイオセンサーを構成するトランスデューサーはエレクトロニクスや情報処理技術と密接に関連していることから、最近ではバイオエレクトロニクスやバイオオプトエレクトロニクスなどの新領域も生まれている。

トランスデューサーは生物由来の分子認識反応に伴う特定の化学的あるいは物理的变化(濃度変化, 質量変化, 熱的变化, 光学的変化など)を他の情報に変換するものであるが, その情報が電気的信号であれば, 実用上極めて好都合である。

このような観点から, 生化学反応と電気化学反応(電気化学系がトランスデューサーの役割を担う)を組合わせて生物由来の分子認識を電気的信号に変換しようとする「バイオ・エレクトロケミカル・センサー」は実用性の高いバイオセンサーといえるだろう。

本稿では, まず生物関連物質の分子認識能を利用したバイオセンサー全般について触れ, 次いで, 筆者らの研究例も紹介しながら, バイオ・エレクトロケミカル・センサーの特徴, 構成およびセンサー素子の作製に関連する技術について解説する。

2. 生物関連物質の分子認識

冒頭に述べたように, 生体内には特定の物質を認識する分子(あるいはその集合体)が数多く存在しており, 生物の生命活動はこれらの物質認識能が適切に機能することによって維持されているといっても過言ではない。酵素, 抗

*長岡技術科学大学工学部生物系(〒940-2188 長岡市上富岡町1603-1)助教授, 工博, 昭和57年, 北海道大学大学院工学研究科応用化学専攻博士課程修了。同年, 三菱重工業㈱入社, 平成5年, 長岡技術科学大学助教授, 現在に至る。専門は, 生物機能工学, 応用高分子化学。

表1 生物関連物質の分子認識能

生物関連物質	認識対象となる物質
酵 素	基質, 基質類似体, インヒビター, 補酵素
抗 体	抗原, 抗原類似体
結合タンパク質	ビオチン, レチナール, レチノールなど
レクチン	多糖類, 複合糖質(糖鎖を有する物質や細胞)
ホルモンレセプター	ホルモン

体, 結合タンパク質, レクチン, ホルモンレセプターなどが代表的なものであろう. 表1にはこれらの生物関連物質と認識の対象となる物質をまとめた.

例えば, 生体触媒である酵素には特定の分子を認識して結合する部位(基質結合部位)と基質の化学反応に直接関与する部位(触媒部位)が近接して存在し, 両者の協同により高選択的かつ高活性な触媒機能が実現する. 酵素は触媒反応の対象となる物質(基質)を認識するが, これ以外に基質類似体や酵素反応を阻害するインヒビター, 補酵素なども認識の対象となる. 表1の例は生物関連物質の機能に関するものであるが, 微生物や動植物組織の感覚機能もその多くが特異的な分子認識に関連している.

バイオセンサーの狙いはこれらの分子認識能を利用して物質計測を行う点にあり, 合成物質では達成困難な特異性を示す生物関連物質の存在に着目すれば, その発想に至るのは当然のことかも知れない.

3. バイオセンサーのしくみ

バイオセンサーは基本的には分子認識部とトランスデューサー(情報変換部)から構成される. すなわち, 図1に示すように, 検体が分子認識部に到達すると生物由来の特異的な反応が生じ, この反応に伴う変化がトランスデューサーで適当な信号に変換されて計測が行われる.

分子認識部の機能は表1に例示したような生物関連物質が担うが, ここでの化学的あるいは物理的変化に応じて適切なトランスデューサーを選択する必要がある. バイオセンサーに利用されるトランスデューサーとしては, 各種の電極(ガス選択性電極, イオン選択性電極など), イオン感応性電界効果トランジスター, サーミスター, フォトダイ

オード, 圧電素子(水晶振動子)などがあげられる.

4. 生物関連物質の固定化

バイオセンサーの分子認識部の構築において生物関連物質の固定化技術が極めて重要となる. 生物関連物質の固定化法を表2にまとめたが, これらは酵素の固定化¹⁾に広く用いられている手法である. 担体結合法は適当な不溶性担体の表面に生物関連物質を結合させるものであり, 結合様式としては共有結合, イオン結合あるいは物理的吸着などがあげられる. 架橋法は固定化の対象となる分子を橋かけすることによって分子集合体として扱おうとするものである. また, 包括法については, 対象物質を架橋高分子の網目に取り込んだ格子型や半透性の高分子皮膜で被覆したマイクロカプセル型などが考えられる.

これらの固定化技術はいずれもバイオセンサーの分子認識部の構築に適用可能であるが, その中でも担体結合法は応用範囲の広い手法であろう. とくに, 共有結合法は安定な固定化を実現するうえで有用である. その反面, 結合反応による化学変化を伴うので, 生物関連物質本来の機能の低下に関しては十分な注意が必要となる.

筆者らは共有結合法による酵素固定に取り組んできたが, 例えば, 図2に示すように, 担体表面にカルボキシル基が存在すれば酵素のアミノ基との縮合反応によって容易に酵素を固定化することができる. 無機物質についても, その表面にポリアクリル酸をグラフト化すればカルボキシル基を導入できるので, アミド結合による酵素固定が可能な担体に転換しうる²⁻⁵⁾. さらに, 担体表面に導入した官能基によって固定化した物質の至適pHを制御することも可能である⁶⁾.

一方, 生物関連物質と相互作用する物質を担体表面に固定化して生物関連物質を認識対象とすることも当然考えら

表2 生物関連物質の固定化法

固定化法	1. 担体結合法	(1) 共有結合法 (2) イオン結合法 (3) 物理的吸着法
	2. 架橋法	
	3. 包括法	(1) 格子型 (2) マイクロカプセル型

図1 バイオセンサーの基本構成

図2 共有結合法による酵素固定化の一例

れる。例えば、固体表面に固定化したフェニルホウ酸誘導体は特定糖類の選択的認識に応用できる^{7,8)}。

5. バイオ・エレクトロケミカル・センサー

酵素を用いたバイオセンサーの歴史は古く、1960年代の初期には酵素溶液と酸素電極とを組合わせたバイオ・エレクトロケミカル・センサーが提案されており⁹⁾、次いで、酵素(グルコースオキシダーゼ)を固定化したアクリルアミドゲルで酸素電極を被覆したセンサーが試作された¹⁰⁾。現在では、各種酵素を固定化した電極を用いてセンシングが試みられ、とくに、グルコースオキシダーゼ¹¹⁾や乳酸デヒドロゲナーゼ^{12,13)}などの酸化還元酵素は基質(グルコースや乳酸など)の濃度を電流の大きさとして定量化する電流検知型のバイオ・エレクトロケミカル・センサーに利用されている。

バイオ・エレクトロケミカル・センサーを構成する電極としては金属以外に導電性高分子を利用することができる。導電性高分子を用いた初期の研究では、酵素の存在下でピロール類やチオフェン類の電解重合を行い、生成する導電性高分子膜中に酵素を取り込む方法(一種の包括法)によって酵素固定化電極が作製された。しかし、導電性高分子膜中に取り込まれた酵素分子のうちセンシングに寄与するのは膜表面近傍に存在するものに限られるため、この方法は酵素の利用に関して極めて非効率的である。

このため、筆者らは、酵素分子の結合点となる官能基をもつ導電性高分子を合成し、共有結合法による酵素固定を検討している。その一環として、カルボキシル基を含む置換基が結合したピロール誘導体を重合し、アミド結合による酵素固定化電極の作製を試みた¹⁴⁻¹⁷⁾。固定化しようとする酵素の分子サイズを考慮すれば、電極表面に存在する結合点の密度は酵素分子の占有面積あたり1個で十分であるため、図3に示すような共重合体を電極として用いることもできる^{18,19)}。とくに、官能基の存在によって高分子膜の導電性が損なわれるような場合には共重合体の利用が有利である。一方、炭素材料もセンサーの電極として利用することができる。酸化処理を行うことによって炭素材料

図3 官能基(-COOH基)を有する導電性共重合体

の表面に酸素含有基(酵素分子の共有結合点となる水酸基やカルボキシル基)が導入されるため、例えば、酸素プラズマで処理した炭素繊維の表面に酵素分子を共有結合させることも可能である²⁰⁾。

先に述べたように、電極表面に酸化還元酵素を固定化すれば、これを電流検知型のバイオ・エレクトロケミカル・センサーに適用することが可能である。筆者らは、グルコースやエタノールの検出を目的として、グルコースオキシダーゼやアルコールデヒドロゲナーゼを各種電極表面に固定化したセンサーを試作している。図4はグルコースオキシダーゼを固定化した導電性高分子電極によるグルコース検出の原理を例示したものである。グルコースオキシダーゼの存在下で β -D-グルコースは O_2 と反応してD-グルコノ- δ -ラクトンに変化し、同時に H_2O_2 を生成する。この H_2O_2 を電解酸化することによって電流応答を得ることも可能であるが、飽和カロメル電極(SCE)基準で0.8V程度の比較的高い電位を酵素固定化電極に印加するの必要があり、 H_2O_2 による酵素の活性低下も懸念される²¹⁾。このため、図4のようにp-ベンゾキノンなどの適当なメディエーターを用いることが好ましく、これにより応答電流を得るための印加電位を低く抑えることもできる。一方、アルコールデヒドロゲナーゼ固定化電極を用いるエタノールの検出においては、補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)との反応によってエタノールがアセトアルデヒドに変化する際に同時に生成する NAD^+ の還元体($NADH$)を電解酸化することによって電流応答を得ることができる。

これらの酸化還元酵素を固定化した電極を用いて実際にグルコースやエタノールの検出実験を行う場合には図5に示すような装置が用いられる。すなわち、酵素固定化電極、対向電極および参照電極からなる三電極系を構成し、酵素固定化電極に一定電位を印加して、酵素反応生成物の電気化学反応に伴う電流の検出を行う。電極を浸漬したセル中に一定量の基質を添加すると、図6に示すような段階的な電流応答が観測される。この電流応答は測定セル内の基質濃度を反映しているので、あらかじめ基質濃度と電流変化

図4 グルコースオキシダーゼ(GOx)固定化電極によるグルコース検出の原理

図5 酵素固定化電極を用いたセンシング装置

図6 基質溶液の添加に対する電流応答

の関係を把握しておくことにより試料中の基質を定量することが可能となる。

図7はグルコースオキシダーゼを共有結合させた導電性高分子膜を用いてグルコースの検出を行った結果の一例である²²⁾。ここでは、3-メチルチオフェン(3MT)とチオフェン-3-酢酸(T3A)の電解共重合を行って導電性高分子膜(図3の共重合体1)を作製し、膜表面のカルボキシル基との縮合反応によってアミド結合を介した酵素の固定を行っている。共重合組成の異なる膜に酵素固定を試みたところ、T3A成分の含有量が30%以上であれば酵素の固定化量に大きな相違が認められず、固定化酵素の活性もほぼ同程度であった。また、T3A成分が多くなると共重合体膜の導電率が低下する傾向にあり(T3A成分10%の場合に 10^{-3} S/cmであったのに対して、T3A成分100%の場合には 10^{-7} S/cm)、これに伴ってグルコースの添加に対する電流応答も減少した。すなわち、固定化酵素の量や活性が同程度であっても、酵素の固定化担体である電極材の導電性がセンサー性能を大きく左右する重要な因子であることが改めて確認された結果となった。従って、バイオ・エレクトロケミカル・センサーの構築においては、生物由来の機能性物質を結合しうる官能基を有し、かつ導電率の高い電極材を設計することが重要な課題といえる。図7にはT3A成分の含有量10%の共重合体膜に酵素を固定化した電極を用

図7 グルコース濃度と電流応答との関係(T3A成分10%の共重合体1にグルコースオキシダーゼを固定化した電極を用いた場合)

いた場合の電流応答を示しているが、5mM程度まではグルコース濃度に比例した電流応答が得られることがわかる。また、T3A成分の少ない(導電率の高い)共重合体膜を電極として採用したことによって、観測された電流変化は酵素固定化電極 1cm^2 あたり0.5mA程度の高い値となっている。

6. 酵素固定化電極の新展開

バイオ・エレクトロケミカル・センサーは生物関連反応と電気化学反応とを組合わせたものであり、これまで述べた例は酵素の選択的触媒作用によって生成した物質の電気化学反応(電解)における電流から基質を認識・定量しようとするものであった。これとは対照的に、酵素反応生成物の電気化学変化から容易に電気エネルギーを獲得できるような系を選べば、新規なバイオ燃料電池構築への展開が可能である。

燃料電池の開発は産業用あるいは自動車用を想定したものが多かったが、最近では、燃料電池の超小型化に関する研究も行われており²³⁾、携帯用電子機器や人工臓器の電源としての期待が大きい。酸化還元酵素を用いたバイオ燃料電池においては酵素とメディエーターとの組合わせが電極への効率的な電子移動を実現するうえで重要であり²⁴⁾、適当なメディエーターを選択することによって超小型化を実現した例もある²⁵⁾。

筆者らは、酸化還元酵素による脱水素反応をミトコンドリア内での呼吸鎖電子伝達系と類似の電子伝達反応と組合わせることによって、図8に示すようなバイオ燃料電池の構成を提案している。このシステムでは、グルコースやエタノールを燃料(AH_2)とし、これらをアノード表面に固定化した酵素(グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ)によって酸化する。その際に、メディエーターとして用いた NAD^+ は還元されて NADH となるが、 NADH はアノード表面で酸化されて NAD^+ が再生する。一連の反応で生成した H^+ はカソード表面で O_2 と反応して H_2O を与える。この NADH から NAD^+ への酸化反応に伴

図8 バイオ燃料電池構成の一例

う自由エネルギー変化を電気エネルギーとして獲得しようというものである。この研究は緒についたばかりであって、電極材の選定やアノード表面への酵素およびメディエーターの固定化方法などを検討している段階であるため、実用性に関する議論はこれからの問題である。

7. お わ り に

本稿では、生物関連物質の分子認識能とこれをバイオセンサーとして利用するための固定化技術について述べ、生物関連物質の特異的作用によって生成する物質の電気化学反応を利用したバイオ・エレクトロケミカル・センサーについて解説した。一口にバイオセンサーといっても、自然界にはセンシングに活用しうる生物機能とそれを担う物質が数多く存在しているので、生物関連物質による分子認識の情報とその変換手段の組み合わせは多種多様である。このために、個々の目的に応じてセンサーの計測原理(生物関連物質の利用形態)や構成(材料の選定、加工・改質技術も含めて)などが適切に選択されなければならない、必要となる研究要素は生化学反応の解析、合成化学、材料科学、エレクトロニクスなど多岐にわたる。

バイオ・エレクトロケミカル・センサーに限っても、生化学反応と電気化学反応とを効率的に組み合わせるための研究要素は多く、電極表面への生物関連物質の固定化とメディエーターを含む電気化学系の検討のみならず、電極として用いる導電性材料の新たな設計や表面改質などの研究が不可欠である。要するに、センサー構築のための定型的な手法があるのではなく、様々な分野の技術を融合することによって初めてセンシング素子やシステムが実現するといっても過言ではないだろう。筆者はそれらの一部について研究を行っているに過ぎず、また、注目している生物機能に偏りのあることも否めない。本稿で紹介した内容もこの分野の解説としては決して十分なものではないかも知れないが、生物関連物質の高度利用に対して少しでも関心を向けていただき、生物機能というキーワードから新しい発想が生まれるならば幸いである。

参 考 文 献

- 1) Chibata, I.: "Immobilized Enzymes", Kodansha (1975)
- 2) Shimomura, M., Kikuchi, H., Matsumoto, H., Yamauchi, T., Miyauchi, S.: *Polymer J.*, **27**, 974 (1985)
- 3) Shimomura, M., Kikuchi, H., Yamauchi, T., Miyauchi, S.: *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.*, **A33**, 1687 (1996)
- 4) Shimomura, M., Sugiyama, N., Yamauchi, T., Miyauchi, S.: *Polymer J.*, **30**, 350 (1998)
- 5) Shimomura, M., Ohta, M., Sugiyama, N., Oshima, K., Yamauchi, T., Miyauchi, S.: *Polymer J.*, **31**, 274 (1999)
- 6) Shimomura, M., Togashi, R., Oshima, K., Yamauchi, T., Miyauchi, S.: *Jpn. J. Polymer Sci. Technol.*, **61**, 133 (2004)
- 7) Oshima, K., Kobayashi, K., Yamauchi, T., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *J. Chem. Soc. Jpn.*, 2000, 405 (2000)
- 8) Shimomura, M., Abe, T., Sato, Y., Oshima, K., Yamauchi, T., Miyauchi, S.: *Polymer*, **44**, 3877 (2003)
- 9) Clark, L. C., Lyons, C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962)
- 10) Updike, S. J., Hicks, G. P.: *Nature*, **214**, 986 (1967)
- 11) Rahmat, W., Fischer, J., Hibbert, D. B., Gilbert, R. G., Gooding, J. J.: *Electroanalysis*, **15**, 1364 (2003)
- 12) Katz, E., Bückmann, A. F., Willner, I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10752 (2001)
- 13) Zayats, M., Katz, E., Willner, I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14724 (2002)
- 14) Yamauchi, T., Kojima, K., Tanaka, K., Unuma, T., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Polymer*, **37**, 1289 (1996)
- 15) Kojima, K., Unuma, T., Yamauchi, Y., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Synth. Met.*, **85**, 1417 (1997)
- 16) Kojima, K., Yamauchi, T., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Polymer*, **39**, 2079 (1998)
- 17) Yamauchi, T., Kojima, K., Oshima, K., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Synth. Met.*, **102**, 1320 (1999)
- 18) Shimomura, M., Kojima, N., Oshima, K., Yamauchi, T., Miyauchi, S.: *Polymer J.*, **33**, 629 (2001)
- 19) Kuwahara, T., Oshima, K., Yamauchi, T., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Jpn. J. Polymer Sci. Technol.*, **61**, 122 (2004)
- 20) Yamauchi, T., Sato, S., Oshima, K., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Trans. IEE Jpn.*, **119-E**, 538 (1999)
- 21) Kojima, K., Nasu, H., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Synth. Met.*, **71**, 2245 (1995)
- 22) Kuwahara, T., Oshima, K., Shimomura, M., Miyauchi, S.: *Proc. Intl. Conf. on Synth. Met.*, P154 (2004)
- 23) Kelley, S. C., Deliga, G. A., Smyrl, W. H.: *Electrochem. Solid-State Lett.*, **3**, 407 (2000)
- 24) Fultz, M. L., Durst, R. A.: *Anal. Chem. Acta*, **140**, 1 (1982)
- 25) Chen, T., Barton, S. C., Binyamin, G., Gao, Z., Zhang, Y., Kim, H.-H., Heller, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8670 (2001)

日本語表記参考文献

- 1) 千畑一郎:「固定化酵素」, 講談社 (1975)
- 6) 下村雅人, 富樫 良, 大島賢治, 山内 健, 宮内信之助: 高分子論文集, **61**, 133 (2004)
- 7) 大島賢治, 小林幸太, 山内 健, 下村雅人, 宮内信之助: 日本化学会誌, **2000**, 405 (2000)
- 19) 桑原敬司, 大島賢治, 山内 健, 下村雅人, 宮内信之助: 高分子論文集, **61**, 122 (2004)
- 20) 山内 健, 佐藤伸也, 大島賢治, 下村雅人, 宮内信之助: 電気学会論文誌, **119-E**, 538 (1999)