酵素電極——固定化酵素膜の利用

南 條 道 夫*

1. はじめに

酵素，すなわち生体内での触媒作用を持つ蛋白質は高選択性，高活性と一般の無機触媒にはない優れた特長を持っている。しかし，酵素は生体からの抽出，精製などに困難な作業を伴うため高価であり，一般の分析試薬のような手軽さでは取扱えなかった。しかし，最近の酵素固定化技術の進歩⁽¹⁾は酵素の繰返し使用を可能とし，その結果，広い分野での酵素の応用を実現した。

ここで紹介する酵素電極は機能材料である固定化酵素の電気化学分析デバイスへの応用であり，酵素と電極という組み合わせの妙から生まれた製品の紹介である。すでに現在，酵素電極の実用化研究は終りつつあり，尿素，グルコース，ショ糖，乳糖などのアナライザーとしてアメリカで市販されており，これらをほとんど身近な病院で見ることができよう。

2. 酵素の機能

酵素電極は酵素を従来型の電極に張り付けたものである。この2つについて若干説明する。

酵素は生活細胞中で生成される生体触媒であり，生体内での多くの化学反応は温和な条件で極めて選択的にかつ迅速に進行する。その触媒作用は特定の化合物(基質，S)にのみ作用する。たとえば，ウレアーゼは尿素 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ にのみ作用し，これを分解する。

同一反応を触媒する無機物に比して極めて選択的かつ活性である[†]。しかし，酵素はその本体が蛋白質であるため，熱，pHによりその活性が著しく低下する。このため取扱いは留意する必要がある。

酵素電極における酵素の働きは有機化合物から電極活性^{††}なイオンを作ることにある。たとえば式(1)の反応

では酵素反応により NH_4^+ ， HCO_3^- イオンが生成する。これらのイオンは NH_4^+ イオン選択性電極あるいは CO_2 ガス電極により検出できる。すなわち， NH_4^+ ， HCO_3^- の増加は電位変化をもたらす。電位変化の程度から，バルク溶液中にあった基質(式(1)では尿素)の濃度を知ることができる。

しかし，高価な酵素を分析のたびに廃棄していたのでは選択性が良いにしても極めて分析費用が高くなる。そこで酵素を固定化し繰返し使用を計った。

3. 酵素の固定化

酵素を多孔質ガラス，ナイロン，セルロース，金属酸化物，コラーゲン膜などに固定化し(不溶化)繰返し使用が可能となった^{†††}。

図1に化学結合を用いた固定化の一例を示す。図1の方法はマトリックスとなる巨大な蛋白質であるアルブミンのアミノ基と酵素のアミノ基がグルタルアルデヒドのカルボニル基と結合し架橋されている。酵素は失活することなくアルブミンに結合され不溶化状態にある。この

図1 共有結合法による酵素の固定化。

- † 無機触媒と酵素反応の活性化エネルギーの差は，42 J/mol (10 kcal/mol)にも及ぶことがある。
- †† 電極活性とは電極感応性すなわち電極を用いて電気信号に変換できることをいう。
- ††† 酵素は本来生体内では固定化され，水に溶け出すことなく繰返し働いているが，生体から抽出精製するため水に可溶性とし水溶性の粉末として市販される。

* 東北大学助教授；選鉱製錬研究所
Enzyme Electrode: Application of Immobilized Enzyme Membranes as a New Functional Materials; Michio Nanjo
(Research Institute of Mineral Dressing and Metallurgy, Tohoku University, Sendai)
1978年9月29日受理

ように固定化法は通常の有機合成の手順で行なわれる。

固定化法には物理的にゲル中に吸蔵させるなどの方法もあるが酵素が流れ出しやすく実用的でない。

このようにして固定化された酵素は水溶液となった酵素に比べ熱に強く、広い pH 範囲において活性である。しかも長期にわたって活性が持続する。

4. 選択性電極

固定化酵素と組合わせられる従来型の電極(基礎電極)について説明する。

最近のポテンシオメトリの著しい発展はイオン選択性電極の開発にある。現在 50 種以上の電極が市販されほとんどの無機イオンが選択的に測定できるようになった。

たとえば、 NH_4^+ 選択性電極を用い式(1)の酵素反応により生成する NH_4^+ イオンの濃度が次式で与えられる。

$$E = E^\circ + RT/F \ln a_{\text{NH}_4^+} \quad (2)$$

電位差により NH_4^+ の活量、ひいては濃度を知ることができる。 NH_4^+ 電極はガラス膜や NH_3 ガス透過膜を用いている。このように種々の選択性を有する固体膜、液体膜は目的とするイオンやガスのみを通過させ電位を発生する新しい機能材料の1つといえよう。

抗生物質であるノナクチン、パリノマイシンなどは細菌から K^+ イオンを選択的に取込み細菌を殺す。これからヒントを得て、 K^+ イオン選択性電極が作られている⁽²⁾。

一方、酵素膜は選択性膜とは異なった機能を持っており、反応の場を提供してはいるが電気信号を発生することはない。

模式的に酵素電極を表現すると、図2に示すようになる。すなわちバルク溶液(I)中の基質、Sはセロフェン紙などの透析膜(II)を通過し、固定化酵素膜(III)に拡散し、ここで酵素反応を受ける。生成物、Pはイオンあるいはガス選択性膜(IV)を通過し、基礎電極(V)によって

図2 酵素電極の模式図。

I：バルク溶液，II：透析膜，III：固定化酵素膜，IV：イオンあるいはガス選択性膜，V：基礎電極
 ⑤は固定化酵素，Sは基質，Pは生成物を示す(IVは用いない場合もある)。

起電力変化として検知される。膜内に蓄積されたPはバルク溶液中に拡散する。このように局在化した高濃度の酵素のため反応は極めて速く、基質の酵素膜表面への拡散が律速となっている。このように酵素電極は種々の膜を有効に利用し選択性を持たせ、最終的に基礎電極膜により電気信号を得ている。このように酵素電極は電位差滴定あるいは電流滴定において酵素が反応時間に応じて滴定試薬を生成するのに似ており、滴定装置内蔵の電極といえる。

酵素電極による分析法には次の組合せがあり、迅速な分析法が要求される臨床検査では、速度論的方法が望ましい。

ポテンシオメトリー $\rightarrow$ 定常状態法 (mV, μA)
 アンペロメトリー $\rightarrow$ 速度法 (mV/min, $\mu\text{A}/\text{min}$)

定常状態法は酵素膜内への生成物の蓄積や測定時間が長くなるなどの欠点はあるが速度論的方法に比して正確である。

5. 臨床検査

ここでは酵素電極が当面の目標とした臨床検査について述べ、分析の選択性の重要性を説明したい。

病院で採血され検査されることは、今日では当然となり、臨床分析が医療サービスの中で大きな部分を占めるようになり、大病院での検査件数は年間 100 万件を越えるほどである。今後その数は激増する傾向にある。そのため、より迅速、選択的、高感度の分析法の開発が望まれている。

臨床検査の対象は血清(血球成分を除いたもの)、尿、唾液、胃液および腸液などに含まれる糖質、脂質、蛋白質、酵素、非蛋白質性窒素化合物、電解質、ホルモンなどがある。分析は主として分光光度計を用いた非分離分析機器により行なわれており、オートアナライザーにより 10 項目以上の分析が一举に行なわれている。

臨床検査は、材料の量的制約から分離分析は困難である。また臨床検査では目的成分の絶対値は必要でなく、標準血清に対しての位置付けが分かればよい。検体数が極めて多いので迅速性すなわち、測定の自動化は必須である。

酵素電極は以上の要求に合致し、高感度、高選択性、迅速性など分光光度法に比較しうる能力を持っている。これらの点で酵素電極は臨床検査用のデバイスといえよう。

6. 酵素電極の組立て

電気化学的方法による酵素反応の研究はガラス電極、白金などの酵素電極により行なわれていたが、それらの研究は主として酵素反応に力点が置かれ、新しい分析手段としての発想は Updike と Hicks⁽³⁾ に始まる。彼ら

は酵素を電極表面に張り付け、酵素電極(enzyme electrode)という名称を与えた。酵素をバルクから電極界面に集めたことにより新しいデバイスができたことになる。

酵素電極の組立ては次の手順で行なう。

(1) 酵素の選定, (2) 基礎電極の選定, (3) 酵素の入手と固定化, (4) 固定化酵素の電極への張り付け

各プロセスでの問題点を列挙すると

(1) 分析目的物(基質)が与えられたならば、その基質の関与する酵素反応を調べ、反応生成物が電極活性な生成物を与える酵素を選び出す。一般の酵素反応で電極活性物質が生成しない場合には、複数の酵素を用いて連続反応を行なわせ、電極活性物質を作る[†]。

(2) 式(1)の尿素の場合には2種の電極活性物質が生成するが検体中の妨害イオンを考慮し、 NH_4^+ あるいは CO_2 電極のいずれかを基礎電極として選ぶ。

(3) 酵素の入手と固定化が酵素電極の成否を決定する重要な因子である。現在2000種を越える酵素が知られており、すでに市販されている酵素も300種に及んでいる。市販していない場合には各自生体より抽出し、分離精製を行なう必要がある。市販品には固定化されているものもある。

固定化酵素を用いる酵素電極の寿命については一応の目安として⁽⁴⁾

物理的固定化法 3～4週間、または50～200分析

化学的固定化法 4～14ヵ月、または200～1000分析
ちなみに水溶性酵素をセロファンなど透析膜でくるんだ場合、1週間または20～50分析が可能であった⁽⁵⁾。

酵素電極の寿命はその使われ方にも依存する。使用しない場合には最適の緩衝液中に入れ冷暗所に保存する。一般に酵素電極の寿命は固定化酵素の寿命で決定されるが、基礎電極の寿命にも留意する必要がある。

(4) 固定化酵素の基礎電極への張り付けは図3に示すような手順で行う。すなわち、基礎電極(IV)の表面に固定化酵素(III)を載せ、セロファン紙などの透析膜で包み、さらに透析膜を“O”リングで縛る。このような単

純な方法で酵素のバルク溶液への流出は避けられ、酵素の繰返し使用が可能となる。

このようにして作製された酵素電極に対する基質の応答特性を次に調べる。

一般に応答特性は下記に依存する。

(1) 液の搅拌速度, (2) 酵素層の厚さ、濃度, (3) 基質濃度, (4) 緩衝液の pH, 温度, 種類, (5) 透析膜の厚さ。

電極の長期安定性や妨害イオンの影響を調べ実用化の見通しをつける。

以上のようにして作製された酵素電極についての例を次に示す。

7. 酵素電極の応答例

尿素と並んで重要な検査対象であるグルコースは血清100g中に70～120mg含まれており、糖尿病になると血糖値が基準より上昇する。従来はO-トルイジン発色法により定量が非選択的に行なわれていた。

酵素電極では2分間に1検体の分析が極めて選択的に行なわれる。すなわち、固定化されたグルコースオキシターゼをディスク状の白金電極に張り付け、溶存酵素の消費速度あるいは過酸化水素の生成速度を求める。

グルコース酵素電極の応答を図4に示す⁽⁵⁾。白金電極はpH6のリン酸緩衝液中に浸されており+0.9Vvs. SCEの電位がかけられている。グルコースの添加に伴って生成する過酸化水素の量の時間変化が分かる。初速度と添加グルコース量は直線関係にあり、血糖値を知ることができた。

酵素電極は図3に示されるようにセロファン紙で固定化グルコースオキシターゼを包んだだけの単純な構造である。電極の安定性は極めて良く、6ヵ月にわたって血糖の繰返し測定ができた⁽⁵⁾。

図3 酵素電極の組み立て。
I: “O” リング, II: 透析膜, III: 固定化酵素, IV: 基礎電極(白金電極など)

図4 グルコース酵素電極の応答。
pH 6.0, $\mu=0.1$
グルコース濃度 1: 2.0×10^{-2} M, 2: 1.0×10^{-2} M,
3: 5.0×10^{-3} M, 4: 2.5×10^{-3} M, 5: 5.0×10^{-4} M

[†] 基質自体が電極活性な場合(例: 尿酸)もあり、酵素反応により、基質の減少が測定できる。

酵素電極はグルコースアナライザーのように始めは小病院で使用されよう。大病院での分光法を主体とするオートアナライザーに組込めるかどうかは自動化と微小化の成否にかかっており、取扱い易く、保守が簡単かどうかが今後の問題点となろう。

8. あ と が き

酵素電極は電極と酵素という硬軟の素材の組合わせにより生まれた新製品であり、その用途は臨床検査のみでなく製薬工業、食品工業などに及び、今後の一層の発展が期待できる。

また、反応膜として酵素以外に微生物自体を固定化し、より複雑な連続した生化学反応により通常の方法では分析困難な物質を検出する微生物電極や抗原抗体反応を用いる免疫センサー⁽⁶⁾⁽⁷⁾、酵素自体を求める基質電極などの開発が進み、より選択的な分析が追求されている[†]。

† 酵素電極について詳細は文献(8)(9)を参照。

このように酵素電極は従来の技術を結合するという点で行なわれたが、同様な例は多い。医学と工学などのように異なった分野の協力から新たな発明が今後期待される。

文 献

- (1) O.R.Zaborsky : *Immobilized Enzymes*, CRS Press, Cleveland, (1973).
- (2) G.G.Guilbault and G.Nagy : *Anal.Chem.*, **45** (1973), 417.
- (3) S.J.Updike and G.Hicks : *Nature*, **214** (1967), 986; *Anal.Chem.*, **28**(1966), 726.
- (4) G.G.Guilbault : *Handbook of Enzymatic Method of Analysis*, Ed. by M.K.Schwartz, Clinical and Biochemical Analysis, vol.4, Deker, (1976).
- (5) G.G.Guilbault and G.J.Lubrano : *Anal. Chem. Acta.*, **60**(1972), 254.
- (6) 相沢益男, 鈴木周一 : *電気化学*, **44**(1976), 279.
- (7) 鈴木周一, 軽部征夫 : *化学と工業*, **31**(1978), 611.
- (8) 南條道夫 : *電気化学*, **44**(1976), 694.
- (9) 河嶋拓治 : *ぶんせき*, **11**(1977), 681.

日 本 金 属 学 会 誌 第 42 卷 第 12 号 目 次

電気泳動によるモリブデンのニクロム合金被覆
新井 隆 依田連平…1127

Fe-W 系合金(Gentalloy)の減衰能について
増本 量 沢谷昭八 比内正勝…1134

Fe-20Cr 合金の高温耐酸化性に及ぼす希土類元素および数種の活性元素添加の影響
永井 宏 村井照幸 三谷裕康…1138

FeCo 合金の等温規則化における格子定数変化
田原良信 森 久美子 沖 憲典 江口鉄男…1145

高温メスバウアー効果による Fe-Al 合金の規則化の研究
沖 憲典 山村明彦 工藤和直 江口鉄男…1149

アルミニウム中の水銀, タリウムおよび鉛の拡散
澤柳文夫 橋口隆吉…1155

14 MeV 中性子放射化分析法による製鋼滓中のふっ素の定量
千葉 実…1161

Cu-Zn, Cu-Al α 固溶体の中間温度脆化
山縣 裕 和泉 修…1167

中間温度領域における Cu-Zn, Cu-Al α 固溶体合金の変形および破壊組織
山縣 裕 和泉 修…1173

熔融 ZnCl₂-MCl(M=Li, Na, K, Cs) 2 成分系混合塩の密度
横尾俊信 Rene Crescent 塚越康弘 江島辰彦…1179

チタン添加によるアルミニウム凝固結晶粒微細化現象の遠心力利用による研究
森棟文夫 新宮秀夫 小林紘二郎 尾崎良平…1186

Cu-Ge 合金結晶の変形双晶による擬弾性効果
成田舒孝 梅本利明 高村仁一 山本彰利…1190

鉄合金における AES の Peak-to-Peak 値による定量分析の評価
小俣裕保 小川洋之…1200

熔融 Ag-Au および Cu-(Fe, Co, Ni) 2 元合金の表面張力測定
笠間昭夫 乾 隆信 森田善一郎…1206

第42巻総目次・著者索引

巻 末