

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	野田 達夫
論文題目	Study on Electrode Structure for High-Performance Electrochemical Biosensors (高性能電気化学バイオセンサのための電極構造に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、臨床・食品・環境等に関する安全安心への関心が高まる中、迅速・簡便・安定・高感度・高選択・小型といった特徴を兼ね備えた高性能なセンサの開発が望まれている。電気化学バイオセンサは、生体起源の物質認識機構と電極反応を組み合わせたものの総称で、その多くは酵素の酸化還元能と物質認識能を利用したものであり、血糖値センサのように実用化に至ったものも多い。通常直径数mmの電極を用いた場合、電気化学計測で得られる応答電流は測定時間に依存するが、酵素反応と共役させることで定常な触媒電流が得られる。しかし、その応答は酵素活性の変動に左右されるという新たな問題を生じ、実用的なセンサの構築を目指す上での障害となっており、その改善は急務である。</p> <p>本論文では、電気化学バイオセンサの心臓部である電極の構造に着目し、新規ナノ材料であるカップ積層型カーボンナノチューブ (CSCNT) のバイオセンサ素子材料への利用、そして直径数十μm程度の微小電極での拡散定常電流に基づくバイオセンサの開発、さらに従来の検出法では困難であった微生物の酸化還元活性の新たな評価法についても検討した。</p> <p>第1章では、CSCNTを酵素吸着基盤かつ電極材料として機能させた超高感度バイオセンサの開発を検討した。CSCNTは底の空いたカップが分子間力により積層した構造をしており、従来の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) と比べて酵素を内包できる程大きな径の細孔を有し、表面には多くの親水性基がある。CSCNTへの酵素吸着量はMWCNT、グラファイト、あるいは活性炭といった他の炭素同素体を遙かに上回った。また固定化酵素の活性は、従来の化学的架橋法を上回る高い値を示し、酵素吸着保持担体としての優れた性質を明らかにした。得られた知見に基づいて作製した西洋わさびペルオキシダーゼ吸着CSCNT修飾電極では、究極の反応系と言われる酵素-電極間の直接電子移動反応に基づく系で、ナノモル濃度レベルまでの過酸化水素を選択的に検出することに成功した。さらに、多種多様な酸化酵素反応と組み合わせることで、生体物質の微量定量を実現できることを示した。</p> <p>第2章では、メディエータと呼ばれる低分子酸化還元物質を介した酵素電極反応に基づく微小電極センサを構築した。通常、酵素触媒による電流の定常化と非線形拡散による電流の定常化が互いに拮抗するので、この組み合わせは分析目的としては無意味であると考えられてきた。しかし、酵素触媒能を十分高めて、電極近傍あ</p>			

るいはバルク溶液中において、全基質からメディエータへの電子移動を完結させれば、メディエータの拡散係数と基質濃度に基づく拡散定常電流が得られることを見出した。本法は、酵素活性変動や応答の時間依存性に左右されない究極のメディエータ型バイオセンサであり、微小電極での拡散定常電流の理論式に従う再現性の高い応答が得られる利点がある。しかし、微小電極では電極面積の低減に伴い応答感度は微弱なものとなる欠点がある。このため、シグナルノイズ比を改善すべく微小電極を複数本集積したアレイ型電極を作製した。従来のアレイ型電極とは異なり電極間距離を十分に確保することで、拡散層の重なりを防ぎ、集積本数に比例した拡散定常電流を得ることに成功した。また、酵素反応終点を捉えるエンドポイント法と組み合わせることで理論式に従う拡散定常電流が得られることを示し、基質濃度を測定するだけでなく、反応電子数などのパラメータ算出にも有効な測定法であることを明らかにした。

第3章では、薄層リング電極を用いた微生物活性測定法について検討した。通常、反応速度の測定には吸光光度法がよく用いられる。しかし、着色溶液や微生物などを含む懸濁液での測定は、分離操作などの煩雑な作業を必要とし、試料溶液中での濃度変化を連続的に追跡することは困難である。電気化学測定法は溶液の光学的特性に左右されず極めて有効な手法であるが、高感度かつ定常な応答を与える電極が必要となる。そこで、直径5 mm、厚さ100 nmの導電体リングから成る薄層リング電極を作製したところ、迅速に擬定常電流が得られ、通常の微小電極の十倍以上の定常電流密度が得られた。本電極を用いることにより、マイクロモル濃度レベルの酸化還元物質を擬定常電流として検出できることを明らかにした。2,6-ジクロロインドフェノールを電子受容体とするグルコース脱水素酵素活性測定に、本法を適用したところ、吸光光度法の結果と良く一致した。電子受容体として*p*-ベンゾキノンを用いた場合には、吸光光度法では反応中間体形成による誤差が生ずるが、本法ではそうした欠点もなく、高精度測定を実現できることがわかった。また、微生物懸濁液中においても、微生物の酸化還元触媒能を評価できることを明らかにした。さらに、薄層リング電極のリング内側に、対極と参照極を集積したプローブ型電極を作製した。このプローブ型電極では、電極上へ数十 μL 程度の試料溶液を滴下するだけで電気化学測定が可能であり、酵素や微生物の触媒特性を測定できるマイクロプレートへの適用の可能性を示した。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

電気化学バイオセンサは、血糖値センサの実用化を契機に、臨床・食品・環境分野などへの更なる展開が期待されている。多くの電気化学バイオセンサではその応答が酵素活性に依存したものとなるため、酵素を安定かつ高活性に維持した状態で電極上に固定化する必要がある。このことが実用化への課題のひとつであり、機能性ナノ材料や化学反応を駆使した酵素機能電極の作製に力が注がれている。しかし、こうしたアプローチはセンサの応答感度や安定性を向上させる一方で、電極構造を複雑にし、その作製手順を煩雑にする欠点を伴う。

本論文は、かかる背景のもと、新規ナノ材料や微小電極の性質を上手く活用することで、物理吸着に基づく簡便かつ安定な酵素の固定化、あるいは酵素活性変動の影響を無視できるセンサの開発、さらに微生物の酸化還元触媒特性の新しい評価法の確立にも取り組んだものであり、評価できる点は以下の通りである。

1. カップ積層型カーボンナノチューブの構造が酵素の吸着固定化に有利であることを見出し、物理吸着に基づく簡便な方法のみで、従来法よりも高い活性を維持したまま安定に保持できることを明らかにした。またその性質を利用し、酵素-電極間直接電子移動に基づく高感度過酸化水素センサの開発と酸化酵素反応を組み合わせた生体物質検出への応用例を示した。
2. 酵素活性を十分高めた条件下で微小電極を用いたメディエータ型触媒電流検出を行い、酵素活性変動の影響や時間依存性がない応答を得る方法を提言した。さらにこのような微小電極を集積し、その本数に比例する応答が得られるアレイ型電極を作製し、高感度化を実現した。
3. 薄層リング電極での定常電流に基づく電気化学検出法を提言し、吸光光度法では不可能な微生物活性の連続測定および定量的評価を行った。また、本電極は、脱水素酵素活性測定においても吸光光度法を凌ぐ特性を有することを明らかにした。

以上のように本論文は、酵素特性、物質移動特性、電極反応特性等を考慮して電極構造を設計し、さらに電極基材の特性を活用することによって、実用的な電気化学バイオセンサの開発について研究したものであり、電気化学および分析化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成24年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。