

特 集 4
研 究 解 説

導電性ポリマーを用いるバイオセンサー

Biosensors by Use of Enzyme-incorporated Conducting Polymer Ultra-thin Films

鈴木 一路*・吉田 章一郎*・渡辺 正*

Kazuro SUZUKI, Shoichiro YOSHIDA and Tadashi WATANABE

バイオセンサーは生体素材の持つ高度の分子認識機能を利用した物質センサーであり、医療、食品工業、環境計測など広い分野での応用が期待されている。最近、導電性ポリマーを用いて酸化還元酵素を電極上に固定した電気化学バイオセンサーが注目されており、電子メディエーターの同時固定、電極-酵素間の直接電子移動などこれまでの固定化法になかった特徴を持つ。本稿ではこのようなセンサーの研究小史、計測原理などを解説し、筆者らがこれまでに実施してきた研究の一部を紹介する。

1. バイオセンサー

バイオセンサーとは、生体物質の持つ高度な物質認識機能を利用または模倣した計測デバイスである。1962年 Clark と Lyons¹⁾が初めて提示して以来、さまざまな信号変換デバイスと生体素子を組み合わせることで発展し、医療、食品などの分野で応用が期待されている。バイオセンサーは、基質（測定対象物質）を認識し化学変化を起こす基質認識部（レセプター）と、その変化を最終的に電気信号に変換する信号変換部（トランスデューサー）からなる（図1）。基質認識部には酵素、抗体、細胞、微生物などが、信号変換部には物質変化を検出する電極やFET、熱変化を検出するサーミスタ、重量変化を検出する圧電素子など

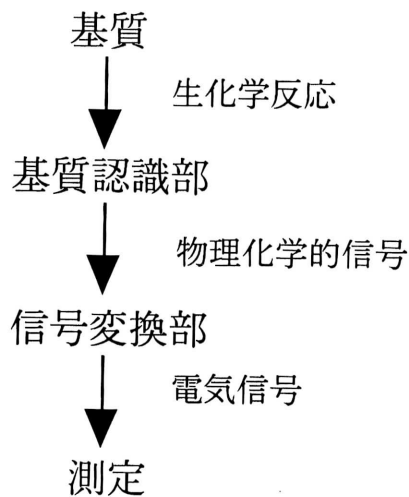


図1 バイオセンサーの構成

が用いられる。現在のバイオセンサーの中では基質認識部に酵素、信号変換部に電極を用いた酵素電極が主流であり、酵素と電極の組み合わせにより種々の物質を測定できる。

2. 酵素電極

2.1 初期の試み

1967年 Updike と Hicks が酵素電極を初めて報告した²⁾。彼らは、グルコースオキシダーゼ (GOD) をポリアクリルアミドのマトリックス中に包括固定化し、これをクラーク型酵素電極上に装着してセンサーを構成した（図2）。グルコースを含む試験溶液に電極を入れると、膜に固定化されている GOD によりグルコースが酸化されてグルコノラクトンが生成するが、同時に酸素を消費する（図3）。酸素消費量は、下地の酸素電極で電流値の減少としてモニターでき、この変化よりグルコース濃度が求まる。また GOD の酵素反応は、酸素の消費の他に pH の低下や過酸化水素濃度の増加を伴うため、ガラス電極や過酸化水素測定デバイスなどと組み合わせたグルコースセンサーも作れる^{3),4)}。

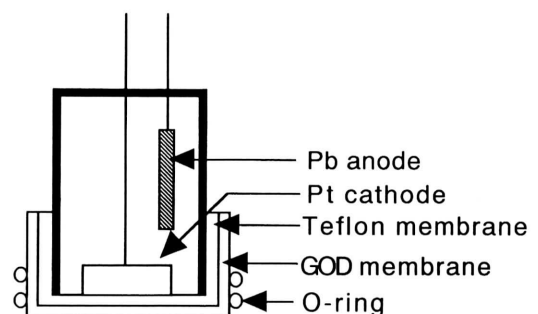


図2 Updike と Hicks によるグルコースセンサー

*東京大学生産技術研究所 第4部

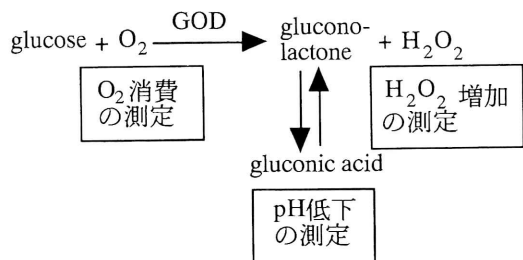


図 3 グルコースオキシダーゼを用いたグルコースセンサーの原理

2.2 計測の原理

一般的な酵素電極の原理をまとめると図4のようになる。Aでは、基質Sが酵素E_{ox}によって酸化され、酵素は還元型のE_{red}になり、E_{red}は電極に電子を渡してE_{ox}にもどる。この酵素から電極への電子の受け渡しの頻度を電流の大きさとして測定すれば基質の濃度がわかる。基質が還元される場合は電流が逆向きに流れる。酵素の反応中心(電子授受サイト)は絶縁性の厚いポリペプチド層に覆われているため、電極と直接の電子授受はかなり困難である。そこでBに示すように、電子メディエーターと呼ばれる第三の電極活性物質Mを共存させることが多い。つまり、還元された酵素E_{red}がM_{ox}を還元してM_{red}にし、M_{red}が酸化されてM_{ox}になる際のM_{red}から電極への電子の流れを電流として測定する。メディエーターとしては、フェロセンとその誘導体、p-ベンゾキノンとその誘導体、ヘキサシアノ鉄酸(Ⅲ)イオン、ジクロロフェノールインドフェノールなど電気化学活性の高い物質が用いられる。前述のUpdikeとHicksによる酵素電極も、溶存する酸素/過酸化水素をメディエーターと考えれば、後者の原理によってグルコースを測定するバイオセンサーである。

2.3 酵素の固定化法

酵素電極で最も重要な側面の一つは、酵素の電極上への固定化法である。酵素固定化法は化学結合法、架橋法、包括法に大別できる(図5)。化学結合法と架橋法は、電極と酵素の結合力が強いため電極からの酵素の脱離は少ないが、化学試薬を用いるため調製時の酵素の失活が起こりやすい。包括法は、ポリアクリルアミドやポリビニルアルコールなどの高分子膜中に包括する方法であり、本解説で述べる導電性ポリマーを用いた酵素電極も包括法に属する。包括法では、調製時の酵素の失活は最小限度に押さえられ調製も容易ながら、酵素と電極との結合力が化学結合法や架橋法ほど強くなく、酵素の脱離によるセンサー感度の低下が欠点となる。このように酵素固定化法には一長一短があり、それ故に酵素電極は多くのグループにより幅広く研究されている^{5)~11)}。

2.4 電子メディエーター

最近の酵素電極の研究では、電子メディエーターの固定

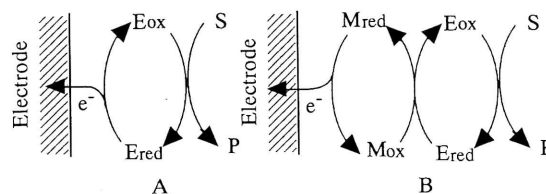


図 4 一般的な酵素電極の原理

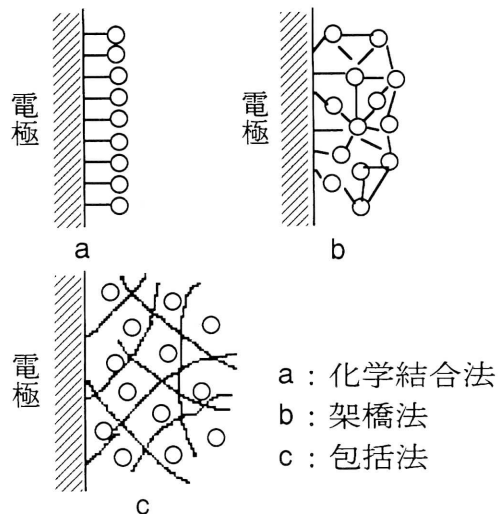


図 5 電極上への酵素固定化法

化が重要となっている。前にも述べたように、被検溶液に第三の物質を添加するのは操作を煩雑にするだけでなく、人工臓器への応用や生体植え込み型センサーとして用いるためにも全機能のデバイス化が要望されている。これまで、電極上にメディエーターを固定化する、メディエーターの結合したポリマー(レドックスポリマー)で酵素を包括する、酵素自身にメディエーターを結合させるなどの方法が報告されている。導電性ポリマーで酸化還元酵素を包括する方法も、添加試薬不要のセンサーを目指す上で注目され、1980年代後半から活発に研究されている。以下では導電性ポリマーを用いる酵素電極について述べる。

3. 導電性ポリマーを用いる酵素電極

3.1 導電性ポリマー

1979年にDiazら¹²⁾が電解酸化重合で合成したポリピロールに始まり、ポリチオフェンやポリアニリンなども出現して導電性ポリマーは宇宙、航空用軽量導電材料、異方性導電体、透明導電体などの新しい導電材料として注目されるようになった。エレクトロニクス分野では、電気二重層キャパシタ、コンデンサ、電界効果型トランジスタなど、エネルギー分野では、一次電池、二次電池、燃料電池、光電池などへの応用が期待され、一部実用化もできている^{13)~16)}。

導電性ポリマーは化学重合でも合成できるが、酵素電極

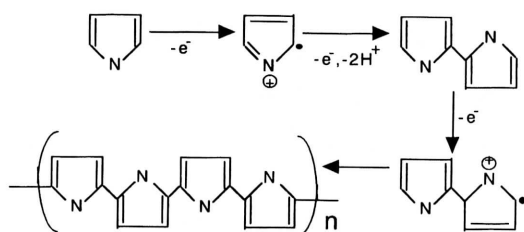


図6 ポリピロールの電解重合

の作製にはもっぱら電解重合法が用いられ、その中でもポリピロールが研究対象の主流となっている。ピロールを銀/塩化銀電極 (Ag/AgCl) に対して +650 mV より正の電位で電解すると、図6に示すようなモノマーからの水素の引き抜き反応とそれに続くラジカルカップリング反応で、電極上に導電性の重合膜が生成する。得られるポリマーは共役二重結合を保持し、支持電解質のアニオンをドーパントとして取り込むので高い電気伝導性を示す。

3.2 導電性ポリマーを用いる酵素電極

(1) 特徴

ポリピロールはきわめて安定な導電性ポリマーの一つであり¹⁷⁾、様々な電解液中で電解重合により容易に作製でき、酵素の取り扱いに適した水溶液中でも作製できる¹⁸⁾。このポリピロールの特徴を利用して、1986年に Foulds と Lowe¹⁹⁾は、ポリピロール膜中に酵素を包括固定した酵素電極を報告した。酵素を導電性ポリマー膜中に包括する利点として、1) 作製の簡便性-酵素とモノマーを水に溶かして電解酸化するだけで作製できる、2) 電解電流量で膜厚をかなり正確に制御できる、3) 電極上の特定の場所に面積を制御して作製できる、などがあげられる。Foulds と Lowe は、ピロールのモノマーと GOD を溶かした水溶液を2.5時間、+0.8 V (vs. Ag/AgCl) の定電位で電解することにより、白金電極上に GOD を包括したポリピロール膜を得た。この酵素電極では、電極電位を +0.7 V とし、GOD とグルコースの反応の際に酸素の還元で生ずる過酸化水素を電極上で酸化することによりグルコース濃度を調べる原理になっている。

(2) 計測電位の問題

しかし、過酸化水素を電極で直接酸化するためには +0.7 V という高い電位を電極に印加する必要がある、食品中や血中のグルコース濃度を測定する場合、共存するアスコルビン酸などの他の電極活性物質の影響を受けやすい。また +0.75 V の電位をポリピロール膜に印加すると、導電性が著しく低下するという報告²⁰⁾もある。

そこでメディエーターを GOD とともにポリピロール膜に包括し、より低い電位で測定しようとする研究が広く行われている^{21)~27)}。Yoneyama ら²¹⁾は、ピロール、GOD、ハイドロキノンスルホン酸ナトリウム (HQS) を含む水溶液を +0.8 V の定電位で電解重合して GOD/HQS/ポリ

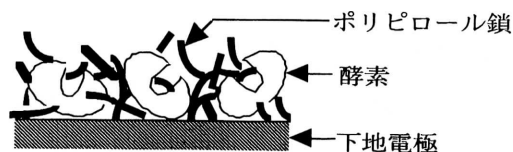


図7 酵素を包括したポリピロール膜の模式図

ピロール (PPy) 電極を作製した。この場合、ハイドロキノンスルホン酸イオンはドーパントとして GOD とともにポリピロール膜中に包括され、メディエーターの機能も持つ。さらにはピロールとフェロセン修飾ピロールを用いた共重合膜中に酵素を包括した例もある²⁸⁾。しかし、いずれもメディエーターの失活や膜からの脱離のため繰り返しの耐久性に乏しい。

(3) 電極-酵素間の電子授受

ポリピロールを用いる酵素包括については、酵素と電極の間で直接の電子授受が進むかどうか問題になる。前述のように、酵素の酸化還元反応中心は絶縁性の厚いタンパク質の殻に覆われているために、一般には電極と酵素の間の直接電子移動は困難であると言われている。しかし図7のように酵素が導電性ポリピロール鎖の中に埋め込まれれば、酵素の酸化還元反応中心とポリピロール鎖が電子の授受ができるほど近づき、酵素からポリピロール、ポリピロールから電極へと電子が流れる(還元される場合は逆向きに電子が流れる)と期待できる^{29)~32)}。

Aizawa ら²⁹⁾は、次のようにして GOD をポリピロール膜中に包括固定した。GOD 水溶液中に白金電極を浸漬して定電位を印加すると白金表面に GOD が吸着し単分子層を形成する。この GOD が吸着した電極をピロールのモノマーを含む水溶液に入れ、約 +0.5 V の定電位を印加し GOD を覆うようにポリピロール膜を形成して GOD/PPy 電極を作製した。そして GOD/PPy 電極のディファレンシャルパルスボルタンメトリー (DPV) により、GOD と電極との間に可逆な電子移動が行われていると考えた。Koopal^{30),31)}らは、トラック-エッチ膜の内側にポリピロール膜を合成した導電性の微小管を作り、その上に GOD を吸着した電極を作製した。この電極では、グルコースとの反応で還元された GOD の反応中心を +0.35 V で再酸化できた。制限された空間内で作られたポリピロール膜は電氣的、機械的特徴が平面電極上の膜と異なる³³⁾ことが知られ、酵素と相互作用しやすいようにポリピロール膜が生成したのではないかと説明している。また Karube ら³²⁾は、N-メチルピロールを 50°C で電解重合して GOD を包括した電極では、GOD と電極との間で直接電子移動すると報告し、酵素が部分的に変性することによって反応中心とポリピロール鎖が互いに接近すると考えた。

(4) 過酸化水素センサー

筆者らはまず、溶存メディエーターを用いない高感度の

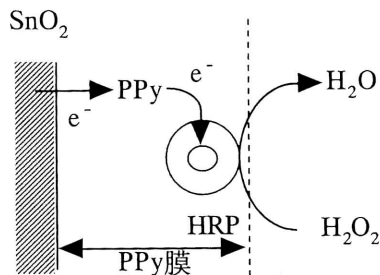


図 8 (a) HRP/PPy 電極の原理

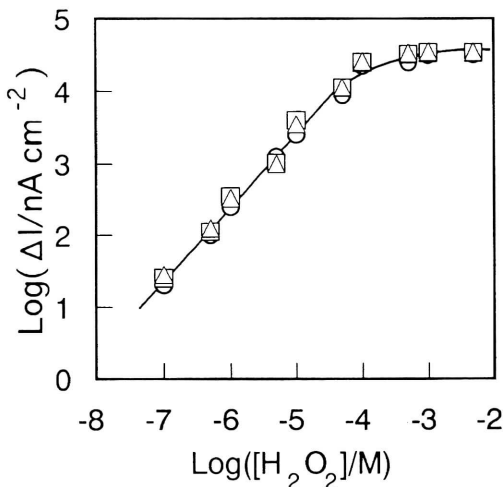


図 8 (b) HRP/PPy 電極の過酸化水素に対する電流応答 (3 回の独立な測定の結果)

過酸化水素センサーを作製するため、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を包括固定したポリピロール膜を電極上に被覆した^{34)~36)}。この電極は図 8(a) のように、過酸化水素が HRP によって還元され、酸化された HRP の反応中心からポリピロールを介して電極へ電子が流れる原理になっている。実際の作製では、電極基板として酸化スズ (SnO₂) コートガラスを用い、ピロール (0.05 M), HRP (0.6 g/L), KCl (0.06 M) を含む電解液中、定電流モード (0.1 mA/cm²) で電解重合した。膜厚は重合電気量によって制御でき、厚くすれば包括される酵素の量が増えて感度が良くなると予想されたが、実際にはノイズが大きくなりまた基質の拡散が律速になるため 5 mC/cm² (時間 50 秒、膜厚 10 nm 程度³⁷⁾) で感度が頭打ちになった。5 mC/cm² で電解重合した HRP/PPy 電極について過酸化水素の濃度と応答電流の関係を図 8(b) に示す。測定は +150 mV で行った。この電位ではポリピロールの導電性の低下はなく、他の電極活性物質の影響もほとんど受けない。また 10⁻⁷~10⁻⁴ M の広い濃度範囲の過酸化水素に直線応答があり、従来の電極³⁸⁾ と比べて格段に優れた過酸化水素センサーである。

(5) 複合酵素を同時固定したセンサー

さらに、HRP/PPy 電極を応用して、ポリピロール膜中

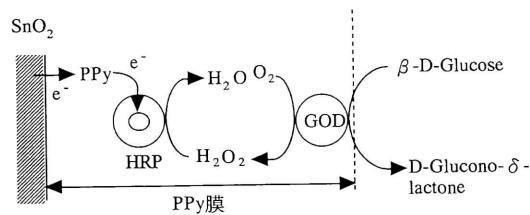


図 9 (a) GOD/HRP/PPy 電極の原理

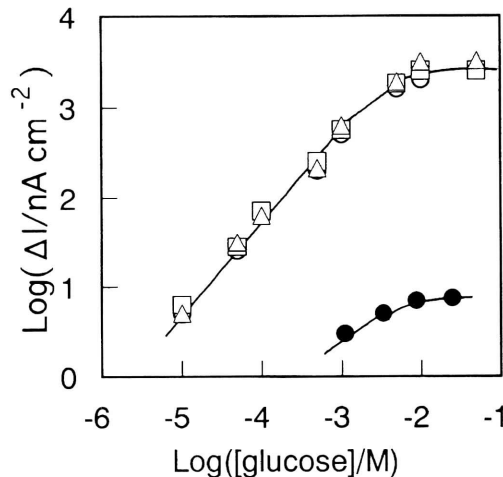


図 9 (b) GOD/HRP/PPy 電極のグルコースに対する電流応答 (3 回の独立な測定の結果)
●: GOD/PPy 電極の電流応答

に GOD と HRP を同時に包括固定した GOD/HRP/PPy 電極を作製した^{39,40)}。この電極は図 9(a) に示すように、GOD によるグルコースの酸化と同時に溶存酸素から生成する過酸化水素を HRP/PPy 電極と同様の原理で検出することによりグルコースのセンシングができる。HRP/PPy 電極と同様にメディエーターを用いずに +150 mV の穏やかな電位で測定でき、10⁻⁵~10⁻³ M のグルコースに対し直線応答があった (図 9(b))。GOD のみをポリピロール膜中に包括した GOD/PPy 電極の電流応答はきわめて小さい。以上の事実は、膜中の HRP が過酸化水素からポリピロールへの電子の移動を促進することを物語る。

応答感度は、電解溶液中の GOD と HRP の量比に依存する。電解溶液中の GOD が多くなると膜中の HRP の見かけの活性が低下し、HRP が多くなると膜中の GOD の見かけの活性が低下した。これは GOD と HRP が競争的にポリピロール膜に包括されることを示唆し、複合酵素系では組成の最適化が重要となる。また GOD 包括ポリピロール膜の上に HRP 包括ポリピロール膜を乗せて 2 層構造を持たせた (HRP/PPy) / (GOD/PPy) 電極およびその逆の手順で作製した (GOD/PPy) / (HRP/PPy) では、GOD と HRP を同一の膜中に包括した GOD/HRP/PPy 電極と比べて感度が劣る。前者では HRP/PPy 層により

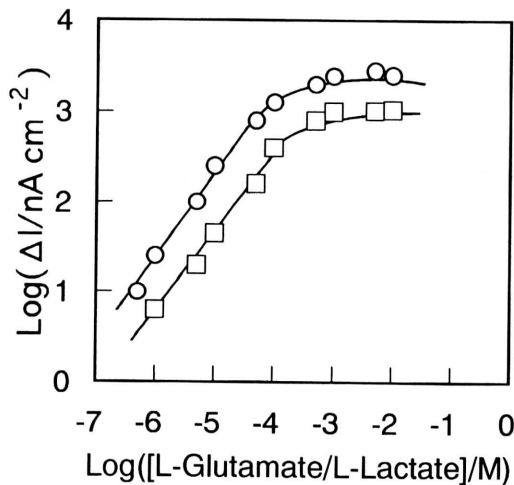


図10 GLOD/HRP/PPy 電極のグルタミン酸に対する応答電流 (○) と LOD/HRP/PPy 電極の乳酸に対する応答電流 (□)

グルコースの GOD への拡散が妨げられ、後者ではグルコースと GOD の反応により生ずる過酸化水素の大部分が HRP と反応するよりも膜外へ拡散するためと考えられる。したがって、二つの酵素が近接し均一に分散していることが重要となる。

GOD/HRP/PPy 電極と同様の方法で、グルタミン酸オキシダーゼと乳酸オキシダーゼを用いてグルタミン酸センサーと乳酸センサーも作製した (図10)⁴¹⁾。このように、基質を酸化し酸素から過酸化水素を生成する各種オキシダーゼを、HRP とともにポリピロロール膜中に包括することによって様々な生体関連物質のセンサーの開発が可能となる。

4. センサー性能を左右する因子の検討

4.1 はじめに

医療分野ではすでにグルコースオキシダーゼ固定化電極を用いた血糖値の測定が実用化されている⁴²⁾が、患者から採血しセンサーのある中央検査室に運んでまとめて測定するために、診断結果が出るまでかなりの時間を要するという問題があり、リアルタイムで血糖値を測定する方法が研究されている。その方法の一つとして、超微小酵素電極を血管中に直接刺す方法がある⁴³⁾。微小電極上に酵素を固定化するのは一般に難しいが、電極上の特定の場所に面積を制御して作製できる導電性ポリマー膜を用いれば、比較的容易にできる。この章では導電性ポリマーを用いる酵素電極の実用化を念頭に置き、電極の最適な作製法および保存条件について述べる。

4.2 電解重合条件の検討

HRP/PPy 電極は重合電気量が 5 mC/cm^2 のとき最も感度が高く、また独立な作製を行ったときの標準誤差が10%

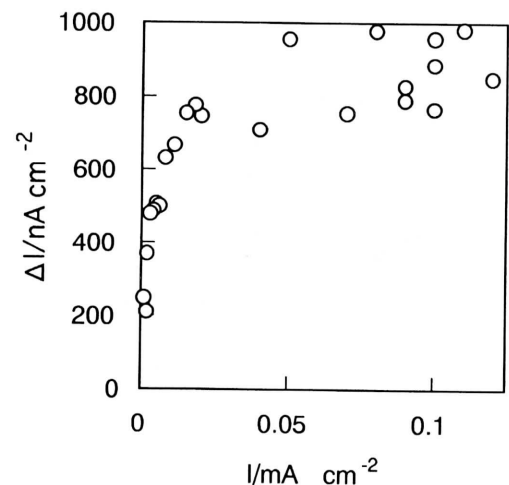


図11 電解重合時の電流密度と応答電流の関係

以下と再現性も良好であった。そこで重合電気量を 5 mC/cm^2 に固定し、さまざまな電流密度で電極を作製して、 10^{-5} M の過酸化水素に対する応答電流を測定した。その結果、図11に示すように約 0.06 mA/cm^2 までは電流密度の増加とともに応答も増加し、それ以上電流密度を増やしても応答電流に変化はなかった。低電流密度で感度が下がる原因として、酵素包括量の低下、ポリピロロール膜の導電性の低下、膜のモルフォロジーの変化などが考えられるが、詳細は今後の検討課題としたい。また定電位モードで 5 mC/cm^2 の電解をして電極を作製したが応答電流の顕著な変化はなかった。

4.3 保存条件の検討

次に、電流密度 0.1 mA/cm^2 、重合電気量 5 mC/cm^2 で作製した HRP/PPy 電極と GOD/HRP/PPy 電極の最適な保存条件を検討した。図12(a) に保存液の温度を変えたときの、図12(b) に保存液の pH を変えたときの両電極の応答電流の半減期を示す。保存液の温度が高いほど、また pH が中性付近からずれるほど電極の保存安定性が悪くなるのがわかる。保存安定性の低下の原因としては、1) 膜からの酵素の脱離、2) 膜中の酵素自身の活性の低下 3) 膜の導電性の低下などが考えられる。この実験で変化した温度や pH の範囲では、酵素自身の活性の低下は考えられず、またサイクリックボルタンメトリーの測定より膜の導電性の低下も考えられない。筆者らの作製したポリピロロール膜よりもかなり厚い膜 ($0.1 \sim 1.6 \mu\text{m}$) であるが、ゆるく包括された酵素を除くために電極を浸けた溶液を攪拌したあと保存安定性の実験を行うと、20日間ほぼ初期の酵素活性を保つという報告があり⁴⁴⁾、筆者らもサイクリックボルタンメトリーの結果より、膜が崩壊して酵素が膜から脱離しやすくなり、応答電流が低下すると考えている。さらに、電解重合時の電流密度や電解量を変えて電極を作製し、これらが保存安定性に及ぼす影響を調べた。

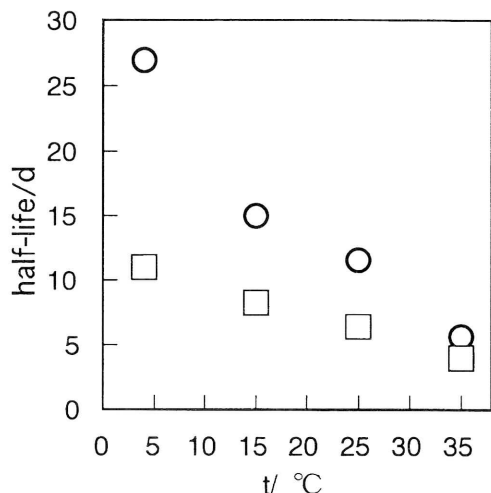


図12(a) 保存液の温度と電流応答の半減期の関係
○ HRP/PPy 電極
□ GOD/HRP/PPy 電極

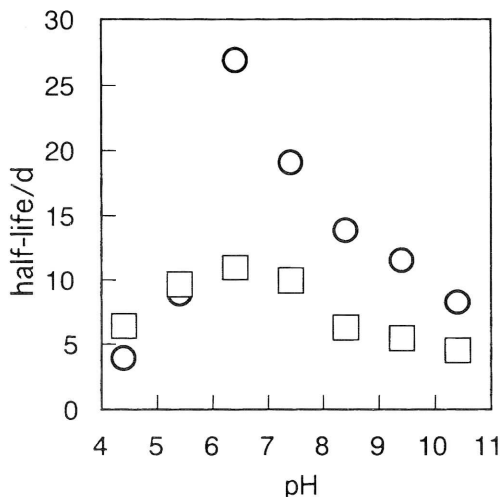


図12(b) 保存液の pH と電流応答の半減期の関係
○ HRP/PPy 電極
□ GOD/HRP/PPy 電極

電流密度を変えることにより形態の異なるポリピロール膜を作製したが、保存安定性の向上にはつながらなかった。しかし電解量を増やして膜を厚くすると保存安定性が向上した。また電解重合時の支持塩を KCl から Na₂SO₄ に変えたところ40日後でもおよそ80%の応答があり保存安定性が向上した。支持塩のアニオンはドーパントとしてポリピロール膜中に取り込まれるので、酵素が脱離しにくいような構造のポリピロール膜が生成したと考えられる。この興味深い支持塩の影響については現在検討中である。

5. おわりに

バイオセンサーの主流である酵素電極について述べ、次に導電性ポリマーを用いる酵素電極について現在までの研

究の流れと筆者らの研究成果を簡単にまとめた。膜からの酵素の脱離による保存安定性の低下が実用化の障壁になっているが、本文でも述べたように微小電極への酵素固定や作製が簡単であるためにディスプレイバイオセンサーへの応用が期待される。今後は保存安定性を向上させる作製条件と保存条件を確立し、医療や食品などの分野における実用化を目指す。
(1996年1月5日受理)

参 考 文 献

- 1) L. C. Clark, Jr., C. Lyons: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
- 2) S. J. Updike, G. P. Hicks: *Nature (London)*, **214**, 986 (1967).
- 3) G. G. Guilbault, G. J. Lubrano: *Anal. Chim. Acta*, **64**, 439 (1973).
- 4) L. M. Mell, J. T. Maloy: *Anal. Chem.*, **48**, 1597(1976).
- 5) J. D. Czaban: *Anal. Chem.*, **57**, 345A (1985).
- 6) P. N. Bartlett, R. G. Whitaker: *Biosensors*, **3**, 359 (1987/1988).
- 7) L. J. Blum, P. R. Coulet: "Biosensor Principles and Applications" (1991).
- 8) F. Scheller, F. Schubert: "Biosensors" (1992).
- 9) D. G. Buerk: "Biosensors" (1993).
- 10) 鈴木周一編: "バイオセンサー", 講談社 (1984).
- 11) 池田篤治: *分析化学*, **44**(5), 333 (1995).
- 12) A. F. Diaz, K. Kanazawa, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 635 (1979).
- 13) T. A. Skotheim ed: "Handbook of Conducting Polymers" Vols. I and II (1986).
- 14) W. R. Salaneck, D. L. Clark, E. J. E. Samuelsen: "Science and Applications of Conductive Polymers" (1990).
- 15) 吉村進: "導電性ポリマー", 共立出版 (1987).
- 16) 緒方直哉編: "導電性高分子", 講談社 (1990).
- 17) A. F. Diaz, B. Hall: *IBM J. Res. Dev.*, **27**(4), 342 (1983).
- 18) S. Asavapiriyant, G. K. Chandler, G. A. Gunawardena, D. Pletcher: *J. Electroanal. Chem.*, **177**, 229 (1984).
- 19) N. C. Foulds, C. R. Lowe: *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **82**, 1259 (1986).
- 20) D. Belanger, J. Nadreau, G. Fortier: *J. Electroanal. Chem.*, **274**, 143 (1989).
- 21) Y. Kajiya, H. Sugai, C. Iwakura, H. Yoneyama: *Anal. Chem.*, **63**, 49 (1991).
- 22) J. M. Dicks, S. Hattori, I. Karube, A. P. F. Turner, T. Yokozawa: *Ann. Bio. Clin.*, **47**, 607 (1989).
- 23) P. N. Bartlett, Z. Ali, V. Eastwick-Field: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **88**, 2677 (1992).
- 24) C. Iwakura, Y. Kajiya, H. Yoneyama: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1019 (1988).
- 25) F. Mizutani, M. Asai: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 4458 (1988).
- 26) P. Janda, J. Weber: *J. Electroanal. Chem.*, **300**, 119 (1991).
- 27) M. Umana, J. Waller: *Anal. Chem.*, **58**, 2979 (1986).
- 28) N. C. Foulds, C. R. Lowe: *Anal. Chem.*, **60**, 2473 (1988).