



Title	電気化学バイオセンサの機能デザイン
Author(s)	Daluwathu Mulla Gamage, Preethichandra; 小野田, 光宣
Citation	電気材料技術雑誌. 2014, 23, p. 24-32
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/76903
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

電気化学バイオセンサの機能デザイン

Daluwathu Mulla Gamage Preethichandra、小野田 光宜*

School of Engineering and Technology, Central Queensland University, Bruce Highway, Rockhampton QLD 4702, Australia

*兵庫県立大学 大学院工学研究科 電気系工学専攻 〒671-2280 兵庫県姫路市書写2167

バイオセンサの性能、すなわち感度、応答時間そして線形領域を改善する目的で3つの異なる固定化法、すなわち物理吸着法、包括法およびこれら二つの手法を重畳した2-step法で作製した新しい電流測定ポリピロール(PPy)ブドウ糖バイオセンサの特性を調べた。固定化法の違いにより酵素含有量や材料特性は異なった特性を示す。

本研究では、0.05mol/lのピロールと0.1mol/lのNaPF₆からなる電解液を使用して、0.3mAcm⁻²の定電流でPPyを電解重合した。Pt(白金)薄膜を被覆したAnodiscTM(細孔径0.2μm)を作用電極として使用した。最高感度を示すPPy膜の電解重合時間は90秒程度と求め、最適重合時間とした。包括法では、ブドウ糖オキシダーゼ(GO_x)(1mg/ml)を電解液に加えた。物理吸着法では、GO_x(5μl)をPPyをあらかじめ電解重合したAnodiscTM電極上に滴下した。これら2つの手法を重畳する固定化法(2-step法)を使用した。物理吸着法では、感度3mAcm⁻²(mol/l)⁻¹、応答時間3秒、線形範囲0.5–13×10⁻³mol/lを得た。一方、包括法では、感度3.75mAcm⁻²(mol/l)⁻¹、2-step法では感度4.45mAcm⁻²(mol/l)⁻¹が得られ、物理吸着法による感度に比べて、それぞれ25%および48%の増加となる。応答時間は包括法で9秒、2-step法で8秒と物理吸着法に比べて遅くなった。これは、包括法および2-step法では、3次元(3-D)PPyマトリックス体積内で酵素の固定化が起り、ブドウ糖が酵素に到達するまある程度時間を要するため応答速度が遅くなると考える。2-step法の線形範囲は、包含と吸着による補強酵素含有により最高16×10⁻³mol/lまで広がった。

キーワード：ポリピロール、電気化学的重合、アルミナナノ細管、ブドウ糖酸化酵素、酵素吸着、酵素包括

Functional Design of Electrochemical Biosensors

Daluwathu Mulla Gamage Preethichandra and Mitsuyoshi ONODA*

School of Engineering and Technology, Central Queensland University, Bruce Highway, Rockhampton QLD 4702, Australia

*Graduate School of Engineering, University of Hyogo, 2167 Shosha, Himeji, Hyogo 671-2280, Japan

In order to improve biosensor performance namely, the sensitivity, response time, and linear range values, novel amperometric polypyrrole (PPy) glucose biosensors, achieved by three different immobilizing techniques namely, physical adsorption, coentrapment and a two steps method of coentrapment superimposed with physical adsorption had been studied. Different enzyme loading and material properties resulted in varied immobilizing techniques lead to dissimilarities in characteristics.

In this study, Pt coated AnodiscTMs with 0.2 μm maximum pore size were used as electrodes to polymerize PPy at 0.3mAcm⁻² using a solution containing 0.05mol/l pyrrole and 0.1mol/l NaPF₆. The polymerization time was optimized to 90 s. In the coentrapment method, glucose oxidase (GO_x)(1mg/ml) was added to the monomer solution while an aliquot of GO_x(5 μl) was placed on the pre-polymerized electrode for physical adsorption. A combined procedure of these two techniques was used as the last immobilization technique. Physical adsorption method gave a sensitivity of 3mAcm⁻²(mol/l)⁻¹ and a linear range of 0.5–13×10⁻³mol/l with a response time of a 3 s. Sensitivity in the case of coentrapment was 3.75mAcm⁻²(mol/l)⁻¹ while it showed a value of 4.45mAcm⁻²(mol/l)⁻¹ in two step immobilization thus giving 25 and 48% increases respectively. Response times of 9 and 8 s in latter cases reveal the possible repercussion taking place at enzyme immobilization in three dimensional (3-D) PPy matrix and the delay occur in glucose to reach the enzyme. Linear range of the two step method was extended up to 16×10⁻³mol/l due to the reinforced enzyme loading.

Keywords : Polypyrrole, electrolysis polymerization, alumina nanotube, glucose oxidase, enzyme adsorption, enzyme entrapment

1. まえがき

21世紀に入り、環境・エネルギー・ライフサイエンス・バイオ・通信・ナノテクノロジーの時代と言われ、我国でも重点分野と位置づけた政策がとられている。高度映像情報化社会を取り巻く環境はますます複雑となり、多種多様化し、インターネットを中心とした情報化技術の著しい進展に伴って、次世代エレクトロニクス技術の構築が極めて重要であることが指摘されている。また、事業展開のグローバル化、ボーダーレス化および国際大競争化の時代に入り、産業界は激しい技術・価格競争にさらされているだけでなく世界的規模での組織の改編や構造改革を余儀なくされている。我国では、2000年に“産業技術力強化法案”を成立させており、産官学連携を積極的に推進し、高度先端技術に基づく産業競争力の強化が図られている。このような背景の中、これまでシリコン(Si)をはじめとする無機半導体を中心に発展してきたエレクトロニクスの世界が、有機機能材料を中心とするエレクトロニクス(有機エレクトロニクスと呼ぶ。)に置き換わろうとするパラダイムシフトがいよいよ現実味を帯びてきた⁽¹⁾。

有機材料は多くの場合ファンデルワールス力で結合しているため、柔軟性に富み、軽く、薄く、曲げられることから、半導体の性質を示す柔構造有機半導体(Flexible Organic Semiconductor)を基本とする有機エレクトロニクスは、フレキシブル・エレクトロニクス(Flexible Electronics)あるいはプラスチック・エレクトロニクス(Plastic Electronics)とも呼ばれている。また、印刷技術を用いて製膜できるので大面積化や低価格化が可能なことから、プリンテッド・エレクトロニクス(Printed Electronics)とも呼ばれ、柔構造有機半導体材料を活性層とする有機電界発光素子、有機トラ

ンジスタ、有機太陽電池などをはじめとする有機電子機能素子の開発研究が極めて活発に展開されている⁽¹⁾。

一方、酵素、微生物、抗体などの生体関連物質が、特定の物質と反応する機能を分子識別機能と言う。バイオセンサは、生体関連物質が有する分子識別機能を利用して検出対象物質の検出、計測を行うセンサのことである⁽²⁾。バイオセンサは、主に“分子識別素子”、“トランスデューサ”、“固定化層”および“選択膜、メディエータ”の4つの技術構成から成っている。Fig.1にバイオセンサの基本原則を示す簡易図を示す。“分子識別素子”は、分子識別機能を有する生体関連物質を示す。“トランスデューサ”は、分子識別機能により発生する信号をアンペロメトリ(電流)、ポテンショメトリ(電圧)などの電気化学的变化に変換する素子である。“固定化層”は、機能や活性を損なうことなくトランスデューサ上に固定する層を示す。“選択膜”は、目的物質だけをトランスデューサで計測するための感応膜や透過膜を示す。特に、溶存酸素の影響を受けず高濃度の対象物の測定を可能にする電子伝達物質を“メディエータ”と言う⁽²⁾。

酵素センサは、酵素を用いて種々の化学物質を選択的に計測するセンサである。例えば、お酒を飲んだ時を考えてみる。お酒に弱い人は、顔が赤くなったり、気分が悪くなったりする。これは、アルコールが分解してできるアセトアルデヒドを分解する酵素が無い、あるいは少ないことによっている。一方、お酒に強い人は、アセトアルデヒドをさらに分解して酢酸にしている。お酒に弱い人は、中間物質のアセトアルデヒドにより不快症状を引き起こす。生体内では、酵素を用いて穏やかに反応が進行している。このようなアルコールやアセトアルデヒドを分解する機能を持つ蛋白質

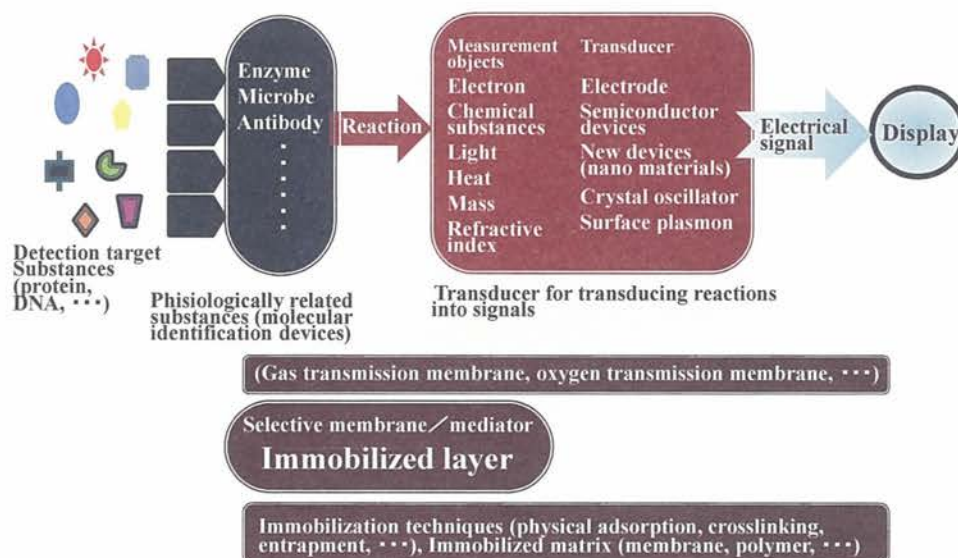


図1 バイオセンサの基本原則
Fig.1 Basic principles of biosensors.

は酵素と呼ばれている。例えば、glucose（ブドウ糖）を測るセンサは、次の反応



が生じ、この反応を助ける酵素が glucose oxidase (GO_x) で、減少する O_2 または発生する H_2O_2 の量を測定して glucose の濃度を見積もっている。

バイオセンサの応用分野は、“医療、健康分野”、“食品、発酵分野”、“環境分野” および “セキュリティ分野” に大別され、バイオセンサの性能、機能など特性の向上に関する解決すべき課題が明確にされている。例えば、“固定化層”では、“分子識別素子”の活性を維持し、安定性を保持するため“固定化層”の母材に多孔性膜や高分子が用いられている。酵素の固定化の方法として、“分子識別素子”への損傷が低く、活性を維持できる物理吸着法、強固な結合で“分子識別素子”の長期安定性に優れる架橋法、あるいは母材に直接取込む包括法など、種々の技術開発が行われている。

一方、導電性高分子は二重結合と単結合が交互に長く連なった構造で、共役系が高度に発達した高分子である。二重結合に寄与している π 電子は高分子鎖に沿って自由に動き易く、空間的に広く拡がっているため、主鎖が単結合からなり π 電子のみが存在する通常の絶縁性高分子には見られない特異な性質を導電性高分子は示す事になる⁽¹⁾。

電解重合法は導電性高分子膜を得る比較的簡単な重合法で、ドーパントとして電解質イオンを取込んだ形で得られる。これは、見方を変えれば導電性高分子と他の材料との複合化であり、導電性高分子に機能を付与するという観点から重要な知見である⁽¹⁾。言い換えれば、バイオ関連技術用の材料として導電性高分子の利用が広く提案されている⁽²⁾。

2. 電解反応に基づく導電性高分子の重合

(2・1) 電気化学的重合法（電解重合）^{(1), (3)}

一般に電解重合法は Fig.2 に示す電解重合装置を用いて行われる。

すなわち、重合しようとする芳香族化合物モノマーを適当な支持電解質を含む溶媒に溶解し、この溶液に浸漬した電極対に適当な電圧を印加するとモノマーは陽極表面で酸化あるいは陰極表面で還元されて膜状、粉末状あるいは時に樹脂状などの形態で重合する。

特に、陽極表面でモノマーが酸化され重合する場合を電解酸化重合と称し、それに対し陰極表面でモノマーが還元され重合する場合を電解還元重合と呼んでいる。なお、必要に応じて参照電極を浸漬する場合がある。この重合法で最も重要な点は、電解液の組成、すなわち溶媒の種類と支持電解質、モノマーの種類や濃度の違いなどが重合反応に大きな影響を及ぼすことで

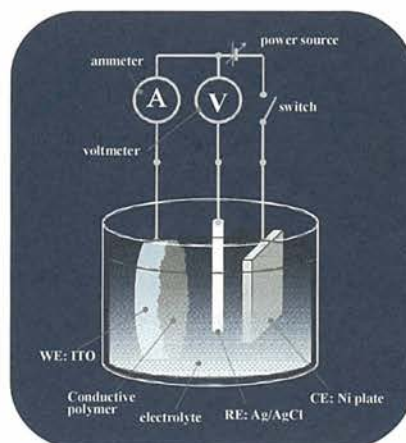


図2 電解重合装置の概略図

Fig.2 Schematic illustration of electrolysis polymerization cell.

ある。同一モノマーを用いた場合でも電解液の組成が異なると生成物の形態も大きく異なり、時にはまったく生成物が得られないこともある^{(4), (5)}。このような電解重合反応の支配的因子としては、このほかに印加電圧や電流密度の大きさおよび重合温度などが考えられ、場合によっては電極の材質、電極間距離、なども大きく影響を及ぼすことがある。

(2・2) 電解重合反応機構^{(1), (3)}

電解重合法による導電性高分子重合の反応機構は、電解液の組成や電解条件など種々の諸因子が非常に複雑に電極反応と関与しているため明確には解明されていない。従って、重合反応条件は個々の導電性高分子について異なっており、最適条件が経験的に採用されている。しかし、定性的には次のような反応機構が一般に受け入れられている。いずれにしても電解重合法では、電極と電解液界面において電子の授受を伴うモノマーと電解質イオン、それに溶媒が関与する分子のダイナミックな動きが生じている。

電解重合法による導電性高分子の生成収支を調べると、通常、電解重合反応によってモノマー1分子当たり

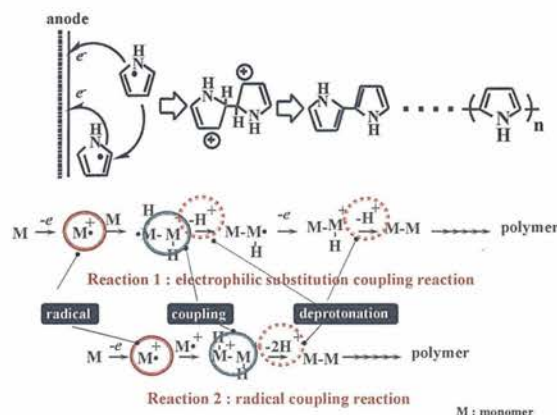


図3 電解重合反応

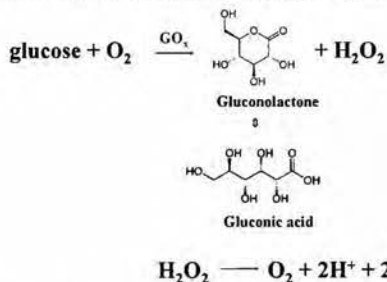
Fig.3 Electrolysis polymerization reaction.

2～2.5個の電子が消費され、そのうち2個は重合反応に、残りはドーピングに使われる。その結果、重合に使われた電子の数に相当するプロトン (H^+) が重合液に蓄積することになる。重合反応はモノマーからの電子の引き抜きによって起こり、生成したラジカルカチオン (陽イオン) を活性種とするカップリングと脱プロトン化反応が繰り返されて進行するものと考えられる。重合反応としては Fig.3の反応1: 親電子置換カップリング反応あるいは反応2: ラジカルカップリング反応のどちらかであると考えられるが (ここで、M はモノマーを示す。) 得られた重合体が不溶不融で構造解析が困難なこと、また重合反応は電極近傍に限られた場所で行われる不均一形の反応で、その場所へのモノマーや電解質イオンの供給を考慮しなければならないため重合反応機構そのものが非常に複雑となり統一的な見解は得られていない。すなわち、電解重合は電圧印加による電解液中のモノマーの酸化反応あるいは還元反応により開始し、芳香族化合物のラジカルカチオンあるいはラジカルアニオンが生成され、その後、カップリング反応と脱プロトン化を繰り返して重合が進行すると考えられる。

3. 高性能 glucose バイオセンサと PPy 膜の重合

〈3・1〉 glucose バイオセンサ

バイオセンサは、1962年に L.C. Clark Jr. と C. Lyone が初めて提案して以来⁽⁶⁾、信号変換素子や生体素子などと組合せて発展し、現在では医療や食料品、環境などの分野で応用展開が期待されている。酵素電極が初めて報告されたのは1967年で、S.J. Uplike と G.P. Hicks によっている⁽⁷⁾。吸着法や包括法など、何らかの方法で膜に固定化された GO_x は、glucose を含む溶液中で次式の反応が生じ、glucose を酸化し、グルコノラクトンやグルコン酸を生成すると同時に、酸素を消費する。この時、pH の低下や過酸化水素濃度の増加を伴う⁽⁷⁾。



このような変化により glucose 濃度が求まる。ブドウ糖酸化酵素である GO_x やブドウ糖脱水素酵素を固定化する技術が種々検討されている⁽⁸⁾。また、glucose バイオセンサの品質を決定する要因として、例えば、“信号の正確さ”、“信号の安定性”、“信号の感度”、“信号の線形範囲”、あるいは“信号の再現性”など固定化技術以外の要因を検討することは不可欠である。本報

告では、このような要因を念頭に置いて、ポリピロール (PPy) 膜を用い glucose バイオセンサの性能向上について検討した。

〈3・2〉 PPy 膜の作製⁽⁹⁾⁻⁽¹¹⁾

Fig.3に示す分子構造の PPy は、比較的容易に電解重合が可能でドーピング状態が安定である。重合した PPy の導電率は、重合条件にも依存するが比較的良好で数十～数百 S/cm の高い値を示す。また、PPy は環境安定性に優れているだけでなく生体親和性も良好で、バイオセンサの材料としては極めて有効である^{(12), (13)}。

Fig.2に示す電解重合装置の作用極として ITO (インジウム-錫酸化物) 導電性ガラス板、対向電極を白金 (Pt) 板、参照電極に $Ag/AgCl$ を用いて、電解重合をおこなった。電解液の組成はモノマーとしてピロール (Py) 0.05mol/l (和光純薬工業、純度98%)、支持電解質として六弗化リン酸ナトリウム ($NaPF_6$ 、和光純薬工業) 0.1mol/l、溶媒には蒸留水を使用した。定電流 ($0.3mA/cm^2$) 電解重合で PPy 膜を得た。

〈3・3〉 試薬⁽⁹⁾⁻⁽¹¹⁾

実験には全て超高純度分析用試薬を用いた。d-glucose は Sigma-Aldrich から、固定化に使用した GO_x は Aspergillus Niger 製の E.C.1.1.3.4. 210U/mg (U/mg は、 $1\mu mol$ の測定対象物質 (基質と言う。) の反応に関与する酵素の活力) で和光純薬工業から、それぞれ購入した。

水溶液に酸や塩基を加えた場合、水溶液の pH 値の変化を抑制するため緩衝液を用いた。pH6.5のリン酸塩緩衝液 (PBS) 0.05mol/l は、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) およびリン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) から作製した。電流応答測定に用いる 1mol/l glucose 貯蔵溶液をあらかじめ用意し、水溶液の状態に静置保存した。

〈3・4〉 電流応答

glucose バイオセンサの感度は次式により評価した⁽⁸⁾。

$$\text{センサ感度} = \frac{(\text{電流応答})}{(\text{glucoseの濃度} \times \text{電極面積})}$$

ここで、電流応答は、1mol/l の glucose 貯蔵溶液から $5\mu l$ (glucose の濃度 $5 \times 10^{-4} mol/l$ に相当) を採取し、0.4V ($Ag/AgCl$) の定電圧を印加し他状態で PBS 緩衝液 10ml に連続して滴下して求めた。

〈3・5〉 アルミナ性ナノ細管 (AnodiscTM)⁽⁹⁾⁻⁽¹¹⁾

バイオセンサの感度、応答時間など性能の向上を念頭に置いて、固定化電極として PPy ナノ細管多孔質電

極を作製した。平均細孔径200nmのアルミナ性の多孔質ナノ細管円板 (AnodiscTM、Whatman 製) を基板として、日本電子 (JEOL) 製の Ion Sputtering Device (JFC1500) を用い Pt を被覆し、電解重合の基準作用電極とした。

〈3・6〉測定機器

電解重合や電流応答測定を含む全ての電気化学的な実験は、Fig.2に示す三電極電気化学容器を用いて北斗電工製の Automatic Polarization System (HSV-100) で行った。PPy 膜重合前後のアルミナ性多孔質ナノ細管電極の形態は、島津製作所製の走査型電子顕微鏡 {Superscan, SS-550} を用いて観察した。PBS の pH は、Eutech 製の Cyberscan pH100/RS232 を使用して調節した。

尚、本章3.で述べた一連の実験は、特に述べない限り温度300K 程度の空气中で実施した。

4. 実験結果および検討

〈4・1〉最適重合時間^{(9)・(11)}

ナノ多孔性の AnodiscTM をナノ細管を有する PPy 薄膜の形成に用いた。露出表面積0.8cm² の AnodiscTM をマスクして Pt をスパッタ蒸着した。得られた Pt/AnodiscTM 電極は、Fig.2に示す Ag/AgCl 参照電極、Pt 対向電極板からなる三電極電気化学重合容器の作用電極とした。電解重合では、導電性高分子の生成量は、基本的には通過電荷量に応じて決まる。重合反応条件を選ぶと電解重合反応に要した電荷は膜形成に使われ、生成量はファラデー則で決まり、重合時間と膜厚は比例関係を示すことが知られている⁽¹⁾。本実験では重合時間を45、90、180および900秒と種々変化して厚さの異なる PPy 膜を作製し、2mg/ml の GO_x 溶液5 μ l を滴下して物理吸着により GO_x を固定化し、バイオセンサを作製した。これらセンサの応答電流測定を行い、〈3・4〉節で述べた関係式を用いてセンサ感度を求めた。最高感度は90秒の重合時間で作製した PPy 膜で得られ、GO_x 固定化 PPy 膜の最適重合時間とした。

〈4・2〉glucose oxidase の固定化

酵素電極で最も重要な側面の一つは、電極上への酵素の固定化法である。酵素固定化法としては、“化学結合法”、“架橋法”、“包括法”などが知られている⁽²⁾。“化学結合法”や“架橋法”は、電極と酵素の結合力が強いので、電極からの酵素の脱離は抑制される。しかし、試薬による酵素の失活が起こりやすいという欠点がある。

本実験では、酵素の固定化法として最も単純で容易な“吸着法”、導電性高分子の特長を利用した“包括法”、そしてこれら両者を併用した“2-step 法”についても検

討した。

“包括法”では、Py モノマに1mg/ml の GO_x を加え、PPy の電解重合を行った。一方、“物理吸着法”では、GO_x の貯蔵溶液 (210U/mg の2mg/ml) から5 μ l を採取し、あらかじめ電解重合した PPy を有する AnodiscTM 電極上に滴下した。“2-step 法”と名付けた“包括法”と“物理吸着法”を併用した固定化法も実験し、酵素固定化の性能を調べた。

本実験で用いた Py の定電流電解重合において、電解液へ GO_x を添加した場合 (“GO_x 有り”) と電解液へ GO_x を添加しない場合 (“GO_x 無し”) で観測した電位と重合時間の関係を調べた。“GO_x 無し”の場合、重合開始後数秒以内に小さな電圧ピークが観測され、重合開始瞬時におけるオリゴマやダイマの形成⁽¹⁴⁾、あるいは電極界面の濡れ性⁽¹⁵⁾などに起因しているかもしれない。定常状態の値に比べて非常に小さい過渡電圧ピークは、極めて短時間で定常値を示し、重要な物理的意味は有していないようである。このことは、電解重合により非常に均一な PPy 薄膜が Pt 電極表面に形成されていることを示唆し、ナノサイズの細孔を有する電極を用いた電解重合により、その内壁では薄い PPy 膜からなるナノチューブを形成していると考えられる。電位は重合時間に対してほとんど変化せずほぼ一定値を示す。“GO_x 無し”の場合の電位 (約0.8V) に比べて、添加した場合の電位は約0.25V の降下が見られ約0.55V の一定値を示す。実験条件は GO_x 添加の有無以外は、全て同じである。これらの観測結果は、GO_x の添加によって電解液の導電率の増加をもたらし、重合電位の降下 (0.25V) を引き起こすと考えられる。従って、“GO_x 有り”の電解液を用いて重合した PPy 膜は比較的高い導電率を有していると推察される。

〈4・3〉PPy ナノ細管多孔質膜の SEM 観察⁽⁹⁾

アルミナ性の AnodiscTM を電解重合用に電極として利用するため Pt のスパッタ蒸着を行った。AnodiscTM のナノ細孔を遮る Pt 粒子を避け、導電性を確保するため厚さ約50nm の Pt 薄膜層を形成した。Pt をスパッタ蒸着した AnodiscTM は、ナノ多孔性アルミナ電極として作用し、PPy を重合した後でもナノ多孔性を保持しているので、多孔性 PPy 膜を得ることができる。従って、重合時間 (言い換えれば、通過電荷量) を最適化し、厚さを制御することが重要となる。GO_x 酵素は、10–100nm 程度の大きさの粒子径を有することが分かっている⁽¹⁶⁾。使用する AnodiscTM の平均細孔径が200nm の場合、GO_x 包括に対する多孔性を考えると、細孔径は最大200nm だから GO_x を包括しやすいと考えられる⁽¹⁶⁾。

本実験では、〈4・1〉節で述べたように約90秒の電解重合時間でセンサ感度は最大となり、PPy 膜は適当な

大きさの細孔を形成していると考え。すなわち、PPyの膜厚は、重合時間の経過とともに増加するので、電解重合時間が約90秒より長くなると PPy 膜が厚くなり、センサ電極表面のナノ細孔が PPy 膜で埋まり、センサ感度が低下すると考える。

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて平均細孔径200nmの Anodisc™ のナノ細孔および断面の観察を行った。Anodisc™ の断面は、多数の細管が相互に連結することなく、平行に配列している様子が観測された。一方、Pt をスパッタ蒸着した Anodisc™ は、平均細孔径 (細管径) 200nm の多孔質構造を有しており、Py の電解重合により Anodisc™ 細管表面が PPy 膜で被覆され PPy 細管が形成されている。Anodisc™ は、細孔径 (細管径) 10–200nm の多孔質構造を有しており、電解重合により PPy 細管が形成される。Anodisc™ の細管内壁に電解重合した PPy と GO_x を“吸着法”により担持すると、わずかに PPy 細管が細くなっていることが観察された。

Anodisc™ は、PPy 膜を電解重合後、さらにそれに続く GO_x の吸着後でさえ、細管構造を維持しているので、glucose や酸素分子は細管内を動きやすく、結果として応答時間も大きく改善できる可能性がある。

GO_x 酵素の粒子径は10–100nm の範囲にあり⁽¹⁶⁾、 GO_x を包括するために生体適合性 PPy 膜で被覆した Anodisc™ 細管は、適度な細孔径を有している。言い換えると、ナノ多孔質 PPy 薄膜 (PPy 細管) は、 GO_x 吸着のトランスデューサとして好都合であり、PPy 平坦膜を使用した時に生じる酵素の染み出し防止が可能であると考えられる。本実験では、 $5\mu\text{l}$ の GO_x がセンサの構築に使用されており、極めて少量である。試作した glucose バイオセンサは、〈4・4〉節で述べるように低濃度の酵素吸着で動作し、PPy 細管が配列した Anodisc™ を用いることで高効率、高感度を実現できた^{(9)–(11)}。

〈4・4〉 ナノ細孔 Pt/PPy/glucose 電極の電流応答^{(9)–(11)}

最高感度を示す重合時間90秒で得た PPy/PF₆膜を用いて電流応答測定を行った。Fig.4は GO_x の固定化を“吸着法”、“包括法”および“2-step 法”とした Anodisc™ 電極および通常の PPy 膜に GO_x を“吸着法”で固定化した電極を用いて作製したバイオセンサに0.4V (vs. Ag/AgCl) の電圧を印加し、 $5\times 10^{-4}\text{mol/l}$ の glucose を連続的に滴下 (1mol/l の貯蔵溶液 $5\mu\text{l}$ を 10ml の PBS に滴下) して観測した典型的な電流応答と経過時間の関係を示す。応答電流測定中は、溶液の組成を均一にするため、磁気攪拌機で電解液を攪拌した。Anodisc™ 電極を用いたセンサでは、 GO_x の固定化法に関係なく貯蔵液から分取した glucose を添加すると、

ほぼ同時に酸化電流は増加し、数秒以内に、定常状態の電流値の90%に到達する。このセンサは、電圧0.4V (vs. Ag/AgCl) という低い電圧で動作し、検出目的の物質ではないアスコルビン酸 (ビタミン C) や尿酸などの酸化の影響を抑制できる^{(17)–(19)}。最大細孔径200nm の Anodisc™ を用いたセンサでは、“吸着法”の場合、感度 $3\text{mAcm}^{-2} (\text{mol/l})^{-1}$ で、線形範囲は、 $0.5–13\times 10^{-3}\text{mol/l}$ 、応答時間3秒であった。“包括法”では、 $3.75\text{mAcm}^{-2} (\text{mol/l})^{-1}$ の感度が得られ、線形範囲は“吸着法”に比べてわずかに狭く $0.5–9\times 10^{-3}\text{mol/l}$ 、応答時間9秒となった。“2-step 法”で作製したセンサの感度は、 $4.45\text{mAcm}^{-2} (\text{mol/l})^{-1}$ と大きくなり、線形範囲も広くなり、 $0.5–16\times 10^{-3}\text{mol/l}$ が得られた。しかし、応答時間は“包括法”と有意差は無く、8秒となった。“包括法”および“2-step”法で応答時間が遅くなるのは、 GO_x が PPy 膜中の奥深くに3次元空間的に包括されることによると考える。

一方、ITO 被覆ガラス板に Pt をスパッタ蒸着して電極とし、電解重合条件を Anodisc™ 電極と同一として PPy/PF₆膜を作製し、“吸着法”で GO_x を固定化した

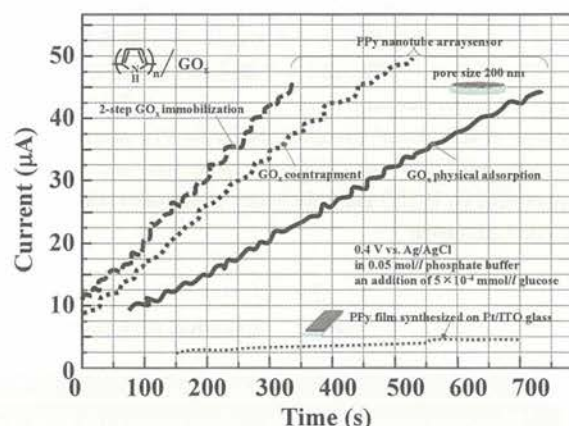


図4 3種類の固定化法 (2-step 法、包括法および吸着法) で GO_x を固定化したとき、センサに流れる典型的な電流の時間特性0.4V (vs. Ag/AgCl)を印加して pH が6.5のリン酸塩緩衝液 PBS に $5\times 10^{-4}\text{mol/l}$ のブドウ糖を連続的に滴下した。2-step 法による GO_x の固定化は、PPy 重合中に電解液に 1mg/ml の GO_x を加えて行い、その後 2mg/ml の GO_x 貯蔵液から $5\mu\text{l}$ を採取して吸着した。包括法による GO_x の固定化は、PPy 重合中に電解液に 1mg/ml の GO_x を添加して行った。吸着法による GO_x の固定化は、PPy を重合した後、 2mg/ml の GO_x 貯蔵液から $5\mu\text{l}$ を採取して吸着した。

Fig.4 Typical amperometric performances of the sensors with 2-step GO_x immobilization, GO_x coentrapping, and GO_x physical adsorption, for successive addition of $5\times 10^{-4}\text{mol/l}$ glucose to pH 6.5 PBS at 0.4V (vs. Ag/AgCl). 2-step GO_x immobilization was done by adding GO_x (1mg/ml) to the electrolyte during PPy polymerization and by adsorption $5\mu\text{l}$ of GO_x (from 2mg/ml) afterwards. GO_x coentrapping was accomplished by adding GO_x (1mg/ml) to the electrolyte during PPy polymerization. After PPy polymerization, GO_x physical adsorption was accomplished by adsorption $5\mu\text{l}$ of GO_x (from 2mg/ml).

バイオセンサの電流応答と時間の関係も Fig.4に示した。同図から明らかなように、Anodisc™を用いたナノ細孔電極に比べて Pt/ITO 電極を用いた PPy/PF₆膜バイオセンサでは、電流応答の変化は極めて少なく、感度は0.3mAcm⁻² (mol/l)⁻¹と求まり、Anodisc™電極に比べて一桁程度小さい値を示す。言い換えれば、PPy/PF₆膜内には少量の GO_xしか取り込まれて（吸着し

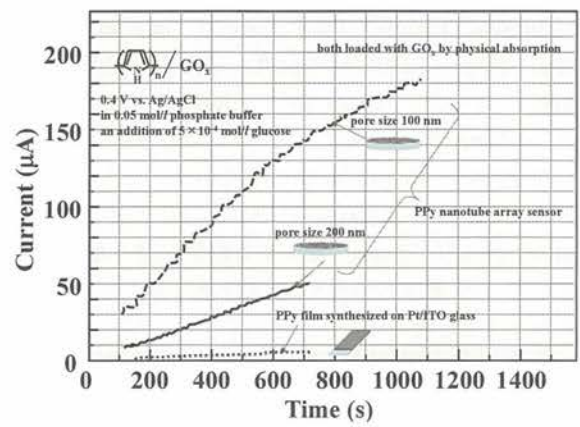


図5 細孔径100nmと200nmを有する PPy ナノ細管配列および Pt/ITO ガラス基板を用いて重合した PPy 膜に GO_xを物理吸着してセンサ電極とし、0.05mol/l リン酸塩緩衝液に 5×10⁻⁴mol/l のブドウ糖を滴下して観測した電流応答
Fig.5 Current response with an addition of 5×10⁻⁴mol/l of glucose in to 0.05mol/l phosphate buffer for PPy nanotube array seonsors with 100 and 200nm of pore size and PPy film synthesized on Pt/ITO glass electrodes, both loaded with GO_x by phvsical adsorption.

て) いないことを示唆している。

Fig.5は、平均細孔径100nmおよび200nmの Anodisc™を用いて GO_xを“吸着法”により固定化したバイオセンサの電流応答と時間の関係を示す。尚、同図には比較のため Fig.4で述べた Pt/ITO 電極を用いた PPy/PF₆膜バイオセンサの電流応答と時間の関係も示している。同図に示すように平均細孔径100nmの Anodisc™の電流応答特性を、平均細孔径200nmの Anodisc™を用いた同一条件でのバイオセンサの特性と比較すると、濃度5×10⁻⁴mol/lの glucoseの滴下による電流の増加量は、極めて明瞭になる。

Fig.5から、バイオセンサの特性、すなわち応答時間、感度および線形領域についてまとめた結果を Table1に示す。このバイオセンサの感度は、7.4mAcm⁻² (mol/l)⁻¹と求まり、約2.46倍増加している⁽⁹⁾。しかし、線形領域は0.5－10.4×10⁻³mol/lと減少し、電流応答時間も若干遅くなり4秒と求まる。

これ等の結果は、バイオセンサの性能が、Anodisc™の細孔径に依存することを示唆しており、実効表面積の変化が要因となっている。すなわち、平均細孔径100nmの Anodisc™を用いて作製したバイオセンサでは、PPy膜を電解重合した後の表面積はPt/ITO電極を用いたセンサより増加する。しかし、GO_xの粒子径が10－100nm程度であることから、GO_xが平均細孔径100nmの奥深くまで吸着固定化するのは比較的困難と考える。それゆえ、比較的低濃度での酵素反応は吸着固定化した GO_xの作用で生じやすいが、酵素の濃度が

表1 グルコースバイオセンサの性能比較（Anodisc™細孔径の違い）
Table1 Analytical performance comparison of polymer based glucose biosensors

Biosensor configuration	Sensitivity (mAcm ⁻² (mol/l) ⁻¹)	Response time (s)	Linear range (× 10 ⁻³ mol/l)
Al ₂ O ₃ /Pt/PPy/GO _x (pore size : 100 nm)	7.4	<4	0.5 - 10
Al ₂ O ₃ /Pt/PPy/GO _x (pore size : 200 nm)	3	<3	0.5 - 13

表2 GO_xの固定化法の違いによるグルコースバイオセンサの性能比較
Table2 Performance comparisons of glucose biosensors based on the difference in GO_x immobilization techniques.

	Physical adsorption	Coentrapment method	2-step method
Sensitivity (mAcm ⁻² (mol/l) ⁻¹)	3	3.75	4.45
Linear range (× 10 ⁻³ mol/l)	0.5－13	0.5－9	0.5－16
Response time (s)	3	9	8

文 献

高くなると GO_x の吸着量が少ないため酵素反応が起こりにくくなるので線形範囲は狭くなると考える⁽²⁰⁾。AnodiscTM (平均細孔径200nm) に比べて AnodiscTM (平均細孔径100nm) の表面積は大きいので、酵素の酸化反応による H_2O_2 の検出は容易となり、比感度は AnodiscTM (平均細孔径200nm) より AnodiscTM (平均細孔径100nm) の方が高くなり、高感度 glucose バイオセンサ電極を開発する指針を与えている⁽²¹⁾。

Table2は、Fig.4から得られた glucose バイオセンサの性能比較を示す。ナノ細管を有する AnodiscTM を利用したナノ細孔 glucose バイオセンサは、応答速度が比較的早く、表面積を増加することで高感度となりその有効性が認められた。言い換えれば、Pt 被覆アルミナナノ細管鑄型 (AnodiscTM) 電極を有効利用した例として、PPy 薄膜バイオセンサを試作し、その特性を述べた。

5. まとめ

本研究では、バイオセンサの性能向上を目的として、3種類 (“吸着法”、“包括法” およびこれら両者を併用した “2-step 法”) の GO_x の固定化法を用いた、glucose バイオセンサの基本特性について検討した。すなわち、 GO_x 固定化に対するナノ多孔質アルミナ性円板 (AnodiscTM) の使用の可能性、そしてこの特異な電極に関連した特性の変化を調べた。

バイオセンサにおける反応活物質の固定化の方法や信号を検出するトランスデューサの電極などを工夫することにより、感度、応答時間、そして線形範囲は大幅に改善できることが明らかになった。

バイオセンサの長寿命化や選択膜 (メディアータ) の有無による異なる固定化法での特性の違いなど、今後さらに解明すべき多くの課題がある。本研究では、AnodiscTM の細孔径の違いによるバイオセンサの性能比較を行い、酵素粒子径の比較的広範囲の分布 (10-100nm) から、特性、性能について検討した。ここで述べたような細孔径の異なるナノ細管が配列した電極を有するバイオセンサでは、酵素のような目的とする検出物質と細管径をうまく適合させることで性能向上につながるので、AnodiscTM の平均細孔径を最適化することが不可欠であるが、バイオセンサのトランスデューサとして有望な電極となる⁽²¹⁾。

- (1) 小野田光宣監修: “有機電子デバイスのための導電性高分子の物性と評価”, (シーエムシー出版、東京、2012年6月)
- (2) 鈴木一路、吉田章一郎、渡辺 正: “導電性ポリマーを用いるバイオセンサー”, 生産研究、48巻、3号、pp.158-163 (1996).
- (3) Mitsuyoshi Onoda: “New Fabrication Techniques of Conductive Polymer/Insulative Polymer Composite Films for Printed Electronics”, New Developments in Polymer Composites Research (Editors: Stephan Laske, Andreas Witschnigg), Chapter 3, pp. 67-149 (Nova Science Publishers, Inc., 2014)
- (4) 小野田光宣、岡田昌之: “電気化学的手法によるポリピロールの形態制御”, 電気学会論文誌 A、131巻、6号、pp.433-438. (2011)
- (5) M.Onoda: “Morphological control of conductive polymers utilized electrolysis polymerization technique: Trial of fabricating biocircuit”, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 174 (2014) in press.
- (6) Leland C.Clark Jr., and Champ Lyone: “Electrode systems for continue monitoring in cardiovascular surgery”, Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 102, pp.29-45 (1962)
- (7) S. J. Updike and G. P. Hicks: “The enzyme electrode”, Nature, Vol. 214, No.5092, pp.986-988 (1967)
- (8) Mingming Ma, Liangti Qu, and Gaoquan Shi: “Glucose oxidase electrodes based on microstructured polypyrrole films”, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 98, Issue 6, pp. 2550-2554 (2005)
- (9) E.M.I. Mala Ekanayake, D.M.G. Preethichandra, K. Kaneto: “Polypyrrole nanotube array sensor for enhanced adsorption of glucose oxidase in glucose biosensors”, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 23, pp.107-113 (2007).
- (10) E. M. I. Mala Ekanayake, D. M. G. Preethichandra, and K. Kaneto: “An amperometric glucose biosensor with enhanced measurement stability and sensitivity using an artificially porous conducting polymer”, IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, Vol. 57, No.8, pp.621-1626 (2008)
- (11) E. M. I. Mala Ekanayake, D. M. G. Preethichandra, and K. Kaneto: “Effect of glucose oxidase immobilizing techniques on performances of nano scale polypyrrole glucose biosensors”, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 47, No.2, pp.1321-1324 (2008)
- (12) M. Onoda and Y. Abe: “Experimental study of culture for mouse fibroblast used conductive polymer films”, Thin Solid Films, Vol. 519, Issue 3, pp.1230-1234 (2010).
- (13) 小野田光宣、阿部弥生: “生体エレクトロニクス材料としての導電性高分子”, 電気学会論文誌 C、132巻、9号、pp.1422-1428 (2012)
- (14) V. K. Gade, D. J. Shirale, P. D. Gaikwad, P. A. Savale, K. P. Kakdem H. J. Kharat, and M. D. Shirsat: “Immobilization of GOD on electrochemically synthesized PPy-PVS composite film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose”, Reactive and Functional Polymers, Vol. 66, No.12, pp. 1420-1426 (2006)
- (15) Rocío Redón, Vázquez-Olmos M.E. Mata-Zamora, A.

- Ordóñez- Medrano, F. Rivera-Torres, and J. M. Saniger :
“Contact angle studies on anodic porous alumina”, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 287, Issue 2, pp. 664-670 (2005)
- (16) Dan Shan, Yuanyuan He, Shanxia Wang, Huaiguo Xue, and Hao Zheng : “A porous poly (acrylonitrile-co-acrylic acid) film-based glucose biosensor constructed by electrochemical entrapment”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 356, Issue 2, pp. 215-221 (2006)
- (17) Simon Serban and Nabil El Murr : “Synergetic effect for NADH oxidation of ferrocene and zeolite in modified carbon paste electrodes: New approach for dehydrogenase based biosensors”, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 20, Issue 2, pp. 161-166 (2004)
- (18) M. Pilar Garcia Armada, José Losada, Isabel Cuadrado, Beatriz Alonso, Blanca González, Carmen M. Casado, and Jinbiao Zhang : “Preparation of biosensors based in a siloxane homopolymer with interacting ferrocenes for the amperometric detection of peroxides”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 101, Issue 1-2, pp. 143-149 (2004)
- (19) Cheng Chen, Yan Jiang, and Jinqing Kan : “A noninterference polypyrrole glucose biosensor”, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 22, Issue 5, pp. 639-643 (2006)
- (20) Edited by Keith Wilson and John Walker : “Principles and Techniques of Practical Biochemistry”, (fifth edition, Cambridge University Press, UK, 2000)
- (21) 小野田光宣、Daluwathu M.G. Preethichandra : “電気化学バイオセンサの機能デザイン”、平成26年電気学会電子・情報・システム部門大会講演論文集、GS8-6 (2014年9月3日-6日、島根大学) pp.1643-1648

(2014年10月8日受理)

Daluwathu Mulla Gamage Preethichandra



1963年9月21日生。1990年8月ペラデニア大学(スリランカ)電気電子工学科卒業。2001年3月佐賀大学大学院理工学研究科修了。2002年6月～12月メルボルン大学工学部客員研究員。2003年1月～2004年10月サザンクイーンズランド大学工学部研究員。2009年10月～2010年3月グリフィス大学工学部講師。などの勤務を経て、2010年4月からセントラルクイーンズランド大学工学部准教授。現在に至る。2013年10月～11月兵庫県立大学客員研究員。現在、導電性高分子を用いたナノバイオセンサの高感度化、長寿命、低コスト化などを旨とした意思決定支援システムの開発に従事。

小野田 光宣



1951年8月19日生。1975年3月姫路工業大学工学部電気工学科卒業。1977年3月同大学院工学研究科修了。同大学助手、助教授、教授を経て、2004年4月から兵庫県立大学大学院工学研究科教授。工学博士(大阪大学)。1994～1995年ペンシルバニア大学化学科客員研究員(Alan G. MacDiarmid 教授研究室、2000年“導電性高分子の発見と開発”で Alan J. Heeger 教授、白川英樹教授らとノーベル化学賞を共同受賞、2007年2月7日逝去)。滞在中は導電性高分子の機能応用に関する研究に従事。現在、導電性高分子の生体エレクトロニクス応用を念頭においた電気化学的性質、電子光物性に関する研究に従事。2013年電子情報通信学会フェロー、電気学会、電子情報通信学会、応用物理学会、高分子学会、日本液晶学会、IEEE 会員。