

論文内容要旨

近年、高分子電解質の静電的相互作用を利用した新しい薄膜調製法が検討されており、高分子交互累積膜法と呼ばれている。この方法は金属等の固体基板を正または負に荷電した高分子電解質の水溶液に交互に浸漬して、任意の層数からなる累積膜を作製する方法である。ポリカチオンとしてはポリアリルアミン (PAH)、ポリエチレンイミン (PEI)、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド (PDDA)、またポリアニオンとしてはポリビニル硫酸 (PVS)、ポリスチレンスルホン酸 (PSS)、ポリアクリル酸 (PAA) などが汎用されている。この方法では、特殊な装置を用いることなく常温常圧で水溶液から累積膜を作製することができるので、バイオセンサー感応膜や選択透過膜への応用が期待されている。本研究では、交互累積膜法により電極表面へ高分子薄膜を調製して、アスコルビン酸や尿酸に対する透過性およびバイオセンサーへの応用に関して検討した。

第2章では、アスコルビン酸と尿酸に対する高分子交互累積膜の透過性について検討した。これらの物質はいずれも電気化学的活物質であり、電気化学バイオセンサーによる測定に著しい妨害を及ぼすことが知られている。特に、過酸化水素検出型バイオセンサーに対して著しい妨害を与えるので、妨害除去のための改善が必要である。これらの物質は電極表面で直接酸化されて妨害電流を与えるので、この妨害を排除するためには透過制限膜で電極表面を被覆して、これらの物質が電極表面に接触することを防ぐ方法が有効である。そこで本研究では金電極上に交互累積膜を形成し、サイクリックボルタンメトリーにおける電極の応答挙動からアスコルビン酸と尿酸に対する交互累積膜の透過性を考察した。

電極には、アルミナによる研磨と希硫酸中での電解研磨を施して表面を清浄化した金電極を用いた。洗浄後、金電極をアミノエタンチオール (AET) またはメルカプトプロパンスルホン酸 (MPS) 水溶液 (5 mM) に浸漬して、電極表面に AET あるいは MPS からなる単分子層を導入した。MPS および AET 修飾電極を用いてサイクリックボルタンメトリーを行ったところ、負に帯電している MPS 単分子層はアスコルビン酸と尿酸に対して低い透過性を示した。一方、正に帯電している AET 単分子層はアスコルビン酸と尿酸に対して高い透過性を示し、酸化電位は負側にシフトした。アスコルビン酸と尿酸はともに試料液中でアニオンになっているため、電極表面の単分子膜の電荷の正負によってそれぞれ静電的引力または斥力を受けるためと考えられる。

次に、電極を PAH と PVS 水溶液に交互に浸漬して、MPS 単分子層上に PAH と PVS から構成される交互累積膜を被覆した。この累積膜修飾電極のアスコルビン酸と尿酸に対する応答を検討したところ、累積膜層数が増大するにつれて累積膜表面の電荷の正負に無関係に尿酸の透過性は低下することが明らかになった。一方、アスコルビン酸の透過性も抑制されたものの、最外層が正電荷を有する PAH の時には抑制効果は顕著ではなかった。従って、尿酸の透過抑制は主に分子ふるい効果によるもので、アスコルビン酸の透過抑制は分子ふるい効果だけでなく静電的效果も関与していると考えられる。また、AET 単分子膜修飾電極についても同様の検討を行った。その結果、尿酸の酸化電流はほぼ完全に抑制されるが、アスコルビン酸の酸化電流は完全には抑制されないことがわかった。以上の結果から、金電極表面

を PAH と PVS で構成される交互累積膜で被覆すると、アスコルビン酸と尿酸に影響を受けない過酸化水素検出型バイオセンサーが作製可能であることが示唆された。

第 3 章では PAH/PVS 交互累積膜のバイオセンサーへの適用についてさらに検討するために、交互累積膜法により作製した過酸化水素選択透過膜と酵素累積膜を組合せ、キサンチンセンサーと乳酸センサーを作製した。白金ディスク電極にキサンチンオキシダーゼ (XOx) あるいは乳酸オキシダーゼ (LOx) を累積固定化して、それぞれキサンチンセンサーおよび乳酸センサーとした。

キサンチンセンサーは (PAH/PVS)₂ 累積膜の表面に XOx (0.1 mg/mL) と PDDA (2 mg/mL) を交互に被覆することにより作製した。キサンチンの測定にはリン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.5) を用い、酵素反応で生成する過酸化水素を +600 mV vs. Ag/AgCl で酸化した時の電流を記録した。キサンチンに対する応答電流は XOx の層数が多くなるに従い増大した。このことから、XOx の活性を保持したまま交互累積膜法によって白金電極上に累積固定化できることがわかった。キサンチンに対する応答範囲は 10^{-7} M ~ 3×10^{-4} M であった。また、このセンサーは尿酸 (0.1 mM) に対してほとんど応答しないことが明らかになった。これは、(PAH/PVS)₂ 膜は過酸化水素選択透過膜として機能し、XOx を修飾した後でもその性質を保持していることを示している。このキサンチンセンサーのキサンチンに対する応答性は、センサー作製後 10 日間は急激に減少を続け応答電流は作製直後の 10% にまで低下した。その後も徐々に応答性の減少は続いたが約 30 日間の測定が可能であった。

同様にして、LOx を (PAH/PVS)₂ 累積膜上に固定化して乳酸センサーを作製した。すなわち、LOx (0.1 mg/mL) を PAH (2 mg/mL) とともに (PAH/PVS)₂ 膜上に累積固定化した。乳酸の測定はリン酸緩衝液 (100 mM, pH 6.8) 中で行い、酵素反応により生成した過酸化水素の酸化電流を記録した。その結果、応答電流は LOx の層数に依存して増大することがわかった。乳酸に対する応答範囲は 10^{-6} M ~ 10^{-2} M であった。また、アスコルビン酸 (0.1 mM) と尿酸 (0.1 mM) に対してはほとんど応答しなかった。このように、交互累積膜法で調製した過酸化水素選択透過膜はバイオセンサーの妨害除去膜として広範に応用可能であることが示された。

第 4 章では、負電荷を有する多糖類を用いて作製した交互累積膜で金電極表面を被覆して、多糖累積膜のフェリシアン酸イオンに対する透過性を評価するとともに膜中へのフェリシアン酸イオンの固定化について検討した。交互累積膜の作製には、ポリカチオンとして PAH (0.5 mg/mL) を用い、多糖類にはカルボキシメチルセルロース (CMC, 0.5 mg/mL) またはアルギン酸 (AGA, 0.5 mg/mL) を使用した。水晶振動子マイクロバランス法による測定から、これらの累積膜は累積層数が増大するにつれて、1 回の累積操作で吸着する CMC または AGA の量がしだいに増大することが明らかになった。一般に、このような累積挙動を示す交互累積膜は膜内での高分子鎖の充填状態が密ではなく、多孔性に富んでいることが報告されており、PAH/CMC および PAH/AGA 累積膜も物質透過性が高いことが示唆された。次に、PAH/CMC および PAH/AGA 累積膜を MPS 単分子層修飾金電極に被覆してサイクリックボルタンメトリーによりフェリシアン酸イオンの透過性を評価した。PAH/CMC および PAH/AGA 累積膜被覆電極は 1 mM フェリシアン酸イオン溶液中で 0.2 V ~ 0.3 V にほぼ可逆なサイクリックボルタモグラム (CV) を示した。

この電気化学応答は累積膜の表面に PAH がある場合も CMC または AGA があるときもほぼ同様に観察された。すなわち、累積膜表面の電荷の正負に依存しないことが判明した。これは、PVS や PSS などを用いた交互累積膜には見られない多糖累積膜に独自の挙動であり、多糖累積膜が多孔性に富むことが原因と考えられる。

さらに、PAH/CMC および PAH/AGA 累積膜修飾電極の累積膜内へのフェリシアン酸イオンの固定化を検討した。修飾電極をフェリシアン酸イオン溶液に浸した後、緩衝液で十分に洗浄してフェリシアン酸イオンを含まない緩衝液中で CV を測定すると、0.3 V より高電位側に表面吸着に起因すると考えられる酸化還元波が観察された。この CV の酸化還元ピーク電流値は累積膜が厚い場合により大きい値を示したことから、累積膜へ固定化されたフェリシアン酸イオンに起因するものであることが支持された。このフェリシアン酸イオン固定化電極は、溶液中のアスコルビン酸を酸化するための良好な電気触媒（電子メディエーター）として機能することも確認した。

審査結果の要旨

本論文では、はじめに高分子交互累積膜のアスコルビン酸と尿酸に対する透過性が検討された。金電極表面にポリアリルアミンとポリビニル硫酸から構成される交互累積膜を被覆すると電気化学応答が著しく抑制されたことから、この交互累積膜はアスコルビン酸と尿酸の透過を阻止することが明らかになった。この透過制御は、交互累積膜の細孔をこれらの物質が透過できないことによることが示唆された。以上の結果は、ポリアリルアミンとポリビニル硫酸から構成される交互累積膜を被覆した電極は、血液などの試料を測定対象とするバイオセンサーへ利用できることを示唆している。

次に、ポリアリルアミンとポリビニル硫酸から構成される交互累積膜を被覆した電極とキサンチンオキシダーゼおよび乳酸オキシダーゼを組み合わせて、キサンチンおよび乳酸を測定するためのバイオセンサーを作製し、応答特性を評価した。キサンチンオキシダーゼの触媒反応では尿酸が生成されて測定を妨害するが、この交互累積膜で被覆した電極を用いると尿酸は透過阻害を受けるためキサンチン濃度を正確に測定することが可能であった。また、乳酸センサーでは試料液中のアスコルビン酸や尿酸の妨害を受けずに乳酸濃度を正確に測定することができた。以上より、バイオセンサーを作製する上でポリアリルアミンとポリビニル硫酸から構成される交互累積膜を被覆した電極の有用性が示された。

さらに、高分子交互累積膜被覆電極への電子メディエーターの固定化を検討した。すなわち、カルボキシメチルセルロースとポリアリルアミンから構成される交互累積膜を金電極表面に被覆して、サイクリックボルタンメトリーによりフェリシアン酸イオンの応答性を検討し、このイオンの交互累積膜内への固定化を評価した。その結果、交互累積膜の表面電荷の正負に関わらずフェリシアン酸イオンは膜内へ拡散することができ、拡散支配に基づくボルタモグラムを与えた。これは、カルボキシメチルセルロース累積膜が多孔性であることによるものと推定される。ポリアクリル酸などの従来から汎用されているビニルポリマーで作製した累積膜では、イオンの拡散は膜の表面電荷に著しく依存することが知られており、多糖を材料とした際の違いが明らかになった。また、フェリシアン酸イオンはカルボキシメチルセルロースとポリアリルアミンから構成される交互累積膜に固定化されることが明らかになった。膜内に固定化されたフェリシアン酸イオンは、表面固定された酸化還元種によるボルタモグラムを示した。固定化されたフェリシアン酸イオンによるアスコルビン酸に対する電気触媒反応を検討したところ良好な触媒活性を示し、バイオセンサーへの応用可能性が示唆された。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。