

氏 名 (本籍) <sup>かく</sup>郭 <sup>ほく</sup>北

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 2 3 4 号

学位授与年月日 平成 8 年 3 月 26 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専門課程 東北大学大学院薬学研究科  
(博士課程) 薬学専攻

学位論文題目 Nonspecific Adsorption of Serum Albumin on  
Electrodes and Its Suppression by Chemical  
Modification of the Electrode Surface  
(電極への血清アルブミンの非特異吸着と電極表面  
の化学修飾による抑制)

(主 査)  
論文審査委員 教授 長 哲 郎 教授 後 藤 順 一  
教授 竹 内 英 夫

# 論文内容要旨

## 第1章 緒言

高分子表面へのタンパク質の非特異的な吸着挙動は、人工臓器、薬物伝達システム、バイオセンサーなどへの高分子材料の利用との関連で、これまでに活発に研究が行われている。一方、電極表面へのタンパク質の吸着挙動は充分には検討されていない。しかし、血液等の生体試料の化学分析を行う際に、電気化学的方法が非常に有効な手段のひとつであることを考慮すると、電極表面へのタンパク質の吸着挙動を検討することは重要な課題である。事実、電極表面へのタンパク質の非特異吸着は、生体試料の電気分析化学においてしばしば妨害となることが報告されている。そこで、本研究では血液中に最も高濃度で存在するタンパク質であるアルブミンの各種電極表面への吸着挙動を詳細に検討した。さらにこれらの電極に適当な表面化学修飾を施すことにより、アルブミンの吸着を抑制または除去するための方策を検討した。

第2章では、サイクリックボルタンメトリー (CV) および水晶振動子マイクロバランス (QCM) により、金 (Au)、白金 (Pt) およびグラッシーカーボン (GC) 電極への血清アルブミンの吸着挙動を、アルブミン溶液の濃度と pH、および電極電位の影響を中心に検討する。第3章では、Au および Pt 電極の表面を4種の異なる化学構造をもつチオール化合物を成分とする単分子層で修飾して、電極表面の疎水性または親水性の程度と荷電状態を系統的に制御することにより、アルブミンの吸着挙動に対して電極の表面物性がどのような影響を与えるかを検討する。第4章では、Au および Pt 電極表面を2-メルカプトエタンスルホン酸で化学修飾する方法、および種々のジオール化合物を電解酸化することにより GC 電極表面に水酸基を固定化する方法、の2法により電極表面へのアルブミンの非特異吸着を抑制することが可能であることを示す。第5章では本研究の結論を述べる。

## 第2章 電極表面への血清アルブミンの吸着挙動と電極電位の影響

[実験] Au, Pt, または GC 電極を血清アルブミン溶液に所定の時間浸漬して、電極表面にアルブミンを吸着させた。この時、ポテンシオスタットを用いて電極電位を任意の値に設定した。アルブミン処理の前後に各電極上で 2.5mM  $K_4Fe(CN)_6$  の CV を測定して、その電流値の減少からアルブミンの吸着量を評価した。また、試料液中へのアルブミンの添加により誘起される水晶振動子 (Au または Pt 薄膜被覆) の共振周波数の減少から、アルブミンの吸着速度と吸着量を *in situ* にて定量的に評価した。

[結果と考察]  $K_4Fe(CN)_6$  の CV を測定した結果、Au, Pt, GC のいずれの電極においても、血清アルブミンの希薄溶液 (0.04% または 0.4%, pH7) に浸漬すると CV のピーク電流値は減少した。これはアルブミンがこれらの電極表面に非特異的に吸着したために、 $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$  イオンの電極反応が妨害されたことを示している。電極に電位を印加しない場合に比較して、電極電位を +0.5V または +1.0V に設定した場合には吸着速度が著しく加速された。たとえば 0.4% アルブミン溶液に Pt 電極を浸漬し +0.5V の電位を印加すると、約 2 分後には CV に酸化還元電流がほとんど観察されなくなり、電極表面が完全にアルブミンにより被覆されることが明らかになった。しかし、電極電位を 0V または -0.5V

に設定した場合には吸着の促進は観察されなかった。アルブミンは pH7 において負電荷を有することを考慮すると、+0.5V または +1.0V の電位印加により正に分極した電極表面との静電的な吸引力によりアルブミンの吸着が加速されたものと考えられる。さらに、QCM 法による実験結果からも、電極電位の印加によりアルブミンの吸着が加速されることが示された。しかし、最終的な吸着量は電位の印加に依存せずほぼ同量であった。また吸着挙動の pH 依存性を検討したところ、アルブミンの等電点に近い pH5 において吸着が最も著しいことが判明した。さらに、アルブミンの溶液濃度が高い場合に吸着は促進された。

電極表面に吸着したアルブミンは、緩衝液で洗浄しても表面から脱着しないことが、CV の測定結果より明らかになった。一晚緩衝液中で洗浄すると、CV の電流値はさらに減少したことから、電極表面でアルブミン分子が変性していることが示唆された。また、電極への吸着の初期段階で電極電位を連続的に変化させると、吸着したアルブミンの一部は脱着することが、QCM による結果から判明した。これらの結果より、吸着初期過程ではアルブミンの可逆的な吸着過程と非可逆的な吸着過程の両方が存在するものと推定される。アルブミンが楕円体の分子形状であることを考慮すると、電極表面でのアルブミンの分子配向に依存して吸着の可逆性が決定されるものと推定される。

電極を血清に浸漬した場合にも、血清タンパク質が電極表面に吸着することが明らかになった。したがって血清を測定試料として電気分析を実施するときには、電極表面へのタンパク質の吸着を十分に考慮することが必要である。

### 第3章 疎水性と極性が異なるチオール単分子膜修飾電極への血清アルブミンの吸着挙動

【実験】 Au 電極をエチルメルカプタン (EM, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), メルカプトエタノール (ME, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 2-アミノエタンチオール (AET, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) およびチオグリコール酸 (TGA, HSCH<sub>2</sub>COOH) のエタノール溶液 (10mM) に室温にて4時間浸漬することにより、4種のチオール単分子膜修飾電極を得た。CV および QCM の測定は第2章と同様に行った。

【結果と考察】 調製したチオール単分子膜修飾電極の表面は、pH7 付近では EM は疎水性、ME は親水性、AET は正に帯電、および TGA は負に帯電しているものと考えられる。これら4種類の電極表面へのアルブミンの吸着挙動を QCM および CV により検討した。pH7 の緩衝液中で 0.01% のアルブミン溶液からの電極への吸着量は、多い順に EM>AET>ME>TGA であった。この結果は、アルブミンは疎水性表面に最も吸着し易く、また正に帯電した表面にもよく吸着することを示している。逆に、親水性表面には吸着しにくく、負電荷をもつ表面に対する吸着は抑制される。EM 単分子膜修飾電極への吸着が、AET 修飾電極への吸着量より多いことから、吸着の第一の駆動力は疎水性相互作用であり、静電気力は二次的に作用しているものと考えられる。また、ME および AET 単分子膜表面へのアルブミン吸着の pH 依存性を検討したところ、いずれも pH3 および pH7 に比較すると pH5 において吸着が最も促進された。これは、第2章で検討した未修飾電極上の吸着挙動と一致する。

#### 第4章 電極表面の化学修飾による血清タンパク質の吸着抑制

【実験】 2-メルカプトエタンスルホン酸 (2-MS) による Au および Pt 電極の修飾は、第3章で述べたチオール単分子膜修飾電極の調製と同様にして行った。GC 電極の修飾は、少量の硫酸を含有するジオール中で電極電位を 0-+2V の範囲で5回走引することにより行った。QCM および CV の測定は前章と同様に行った。

【結果と考察】 2-MS 修飾電極へのアルブミン吸着挙動を QCM および CV により検討した結果、2-MS で修飾することにより吸着が著しく抑制されることが明らかになった。すなわち、4%アルブミン溶液中で未修飾 Au 電極に吸着するアルブミンは 288ng/cm<sup>2</sup>であったが、2-MS 修飾後は 40ng/cm<sup>2</sup>以下に減少することが QCM の結果より示された。また同条件にて、アルブミン吸着後の CV の電流減少量は僅かであり、電流測定にほとんど影響を与えないことが判明した。2-MS で修飾することにより、電極表面が親水的で負電荷を有することが吸着抑制の原因であると考えられる。

次に、ジオール修飾 GC 電極のアルブミン吸着挙動を CV により検討した。その結果、エチレングリコール、ジエチレングリコール、1,2-プロパンジオール、および1,3-プロパンジオールで修飾すると、0.4%アルブミン処理後の CV における電流減少を4~7%程度に抑制することができた。また、これらの修飾 GC 電極は、血清中に浸漬しても表面へのタンパク質の吸着をほぼ抑制できることが判明した。電極表面には固定化されたジオールの水酸基が存在し、親水性表面になっていることがタンパク質吸着を抑制するために有効に機能しているものと考えられる。

#### 第5章 結論

Au, Pt, および GC 電極表面にはアルブミンや血清成分が不可逆的かつ非特異的に吸着し、CV 等の電気化学測定を妨害する。吸着挙動は、溶液の pH と濃度、電極表面の疎水性と荷電状態、および電極電位により著しい影響を受ける。電極表面へのアルブミンの吸着が促進される条件は、pH5, 高濃度溶液、疎水性表面、正に帯電した表面、および正の電極電位の印加、であることが明らかになった。

これらの非特異吸着を抑制するためには、電極表面を負電荷をもつ親水的な分子で化学修飾することが有効であることが示された。

## 審査結果の要旨

血液などの生体試料の迅速測定で脚光を浴びているバイオセンサーでは、その電極表面へのタンパク質の非特異的吸着はしばしばセンシングで妨害を与える。本論文では、血液中に最も高濃度で存在するタンパク質であるアルブミンの各種電極表面への吸着挙動を詳細に検討し、さらに電極表面に適当な化学修飾を施すことにより、アルブミンの吸着を抑制または除去するための方策を論じたもので、5章より構成される。

まず Au, Pt, グラッシーカーボン (GC) を血清アルブミン溶液に浸漬してアルブミンを吸着させた後、2.5mM  $K_4Fe(CN)_6$  のサイクリックボルタンメトリー (CV) の電流減少および水晶振動子マイクロバランス (QCM) の共振周波数の減少から、アルブミンの吸着量および吸着速度を *in situ* で定量的に検討した。使用したすべての電極にアルブミンは非可逆的に特異吸着し、吸着初期には可逆的および非可逆的吸着過程の両方が存在した。最終吸着量はアルブミンの等電点に近い pH5 で最大となり、またアルブミン濃度に依存した。電位負荷または無負荷の実験などからアルブミンの吸着速度は静電的吸引力に依存することが明らかになった。血清タンパク質の試料に対しても同様な結果となった。

次に、Au 表面に疎水性と極性が異なる 4 種のチオール化合物の単分子膜を被覆し、血清アルブミンの吸着挙動を CV および QCM の測定により検討した。この結果は、アルブミンは疎水性表面に最も吸着しやすく、また正に帯電した表面にもよく吸着し、逆に親水性表面には吸着しにくく、負電荷を持つ表面への吸着は抑制されることを明らかにした。また吸着の第一の駆動力は疎水性相互作用であり、静電的引力は二次的に作用することも考察している。

上記結果に基づき、Au および Pt 表面への 2-メルカプトエタンスルホン酸の修飾を自己組織化法により行い、アルブミンの吸着挙動を同様に検討した。4%アルブミン溶液中で未修飾 Au 電極に吸着するアルブミンは 288ng/cm<sup>2</sup>であったが、修飾電極では 40ng/cm<sup>2</sup>以下に減少し、電極表面が親水的で負電荷を有することが吸着抑制に有効であることを明らかにした。

さらに少量の硫酸を含むエチレングリコールなどのジオール類を 0~2.0V の電位範囲で 5 回走引して吸着させた GC 電極はアルブミンの吸着量を 93~96%減少でき、血清中のタンパク質に対しても同様の抑制効果を認めた。電極表面に固定されたジオールの水酸基の親水性表面がタンパク質吸着の抑制に同様に機能しているものと説明している。

以上のように、数種の電極に対するアルブミンまたは血清タンパク質の吸着速度ないしは吸着量を測定し、電極への化学修飾による表面状態の解析から非特異吸着を抑制する方法を確立した。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。