

氏名	しく ひとし 珠玖 仁
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科(博士課程) 応用化学専攻
学位論文題目	走査型電気化学顕微鏡による 生体分子機能表面の構築と評価
指導教官	東北大学教授 内田 勇
論文審査委員	東北大学教授 内田 勇 東北大学教授 板谷 謹悟 東北大学教授 四ツ柳 隆夫

論文内容要旨

走査型電気化学顕微鏡 (SECM, scanning electrochemical microscopy) は、走査型プローブ顕微鏡の一種であり、直径数10~数 μm のマイクロ電極を探針として試料表面の極近傍を走査することにより、試料の局所的な電気化学的性質を明らかにすることが可能である。通常サイズの電極で得られる電気化学的情報が電極面積全体で平均化されたものであるのに対し、マイクロ電極では、電極径が微小であるため、空間的に極めて限定された領域内の情報だけをとりだすことができる。このような微小空間では、モル量よりむしろ実分子数で議論し得る物質の電気化学的現象を観測することも可能である。さらに、マイクロ電極で反応活性種を発生させ、局所的な表面処理、表面改質に利用することにより、 μm またはサブ μm オーダーで制御された機能表面を構築できる。本研究の目的は、SECMを用いることにより、酵素、抗原-抗体、イオンチャンネルなどの生体試料を2次元的に配置した機能表面を構築し、その電気化学的挙動を評価することにある。2次元的配置を制御した表面の構築は、マルチバイオセンサやバイオチップの開発へ向けた指針となる。論文は全6編より構成されている。

1章 序論

本論文の背景のなかで、特に重要な走査型電気化学顕微鏡 (SECM)、生体試料のパターニング、免疫測定法、平面脂質二分子膜について述べた。SECMは電気化学の関わる諸現象の解析に幅広く適用されつつあるが、なかでも単一分子の電気化学検出も含め、限定された空間内での極微量の化学種の検出が可能であることは、極めて重要な測定手法としての特徴である。また、SECMのファブリケーションに関しても、他のプローブ顕微鏡にはない利点があることを強調した。

2章 走査型電気化学顕微鏡による生体試料のパターニング

論文全体のなかで基盤となる実験手法について述べると共に、様々な生体試料のパターニング手法を検討し、パターニングされた基板をSECMにより評価した。

まず、SECMによる極微物質変換を利用して、生体試料のパターニングを検討した。本手法では、探針における電極反応生成種が表面改質反応を担う。電極生成種としては活性ハロゲン種、ヒドロキシルラジカルを採用し、局所表面改質反応を設計した。活性ハロゲン種によるマイクロパターニングの模式図を図1に示した。あらかじめ酵素を全面に固定したガラス基板に探針を近接させ、局所的に活性ハロゲン種を生成させることにより、酵素の失活パターンの描画を試みた。酵素としてNADHの酸化を触媒するジアゾラーゼを用いた。図2は、25 mM KBr を含むリン酸バッファー溶液 (pH 7.5) 中において、半径 $2.4\mu\text{m}$

の探針を基板近傍に近接させ、探針電位1.7 V vs. Ag/AgCl, 走査速度73 $\mu\text{m/s}$ でジアフォラーゼの失活ラインを描画した基板表面のSECM像である。NADHとフェロセニルメタノール (FMA) の存在する溶液中において、探針-基板間距離8 μm , 探針電位0.40 V vs. Ag/AgCl でFMAの酸化電流およびジアフォラーゼを介する触媒酸化電流を観測した。酵素失活ラインの線幅は約20 μm であった。SECMでは、単分子層レベルの酵素活性を定量することも可能であり、線の中心および外側の酵素濃度として 9×10^{-13} および $1.6 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ を得た。ヒドロキシルラジカルによるマイクロパターニングでは、種々の官能基を有するアルキルシランで修飾したガラス基板を、探針近傍で生成させたヒドロキシルラジカルによって局所的に表面改質し、酵素のパターニングに適用した。ヒドロキシルラジカル生成には、フェントン反応として知られる Fe^{2+} と過酸化水素の反応を利用した。

キャピラリーによる生体試料のパターニングでは、ガラスキャピラリーに生体試料溶液を充填し、キャピラリーの座標をアクチュエーターで制御することにより、パターンを基板に直接描画した。この手法は、様々な生体試料に広く適用できるだけでなく、同一基板上に複数の試料をパターンすることも可能である。3章, 4章では、この手法を基板作製に利用し、SECMによるイムノアッセイ, およびマルチイムノアッセイに展開した。

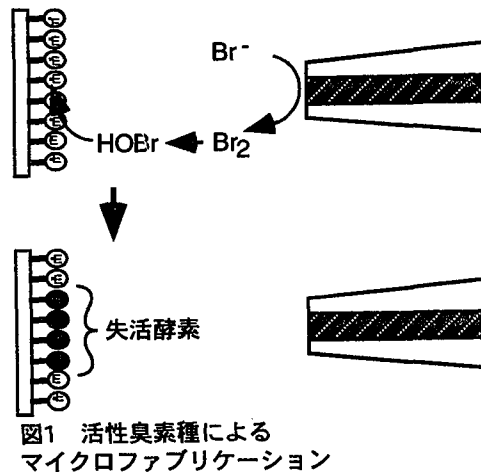


図1 活性酸素種によるマイクロファブ리케이션

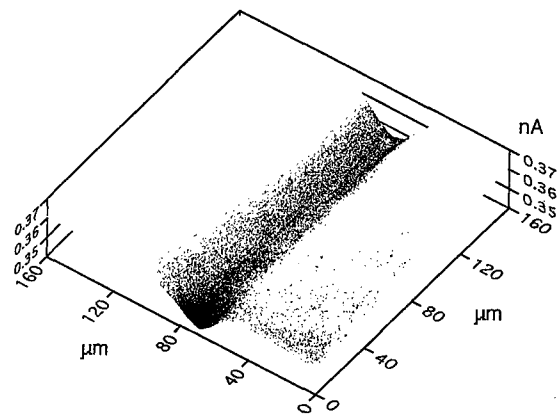


図2 酵素失活ラインのSECM像

3章 走査型電気化学顕微鏡によるエンザイムイムノアッセイ

SECM を酵素免疫測定法 (エンザイムイムノアッセイ) に適用した。酵素標識抗体を利用することにより、電気化学的に不活性な抗原タンパク質の所在を標識酵素を介する電気化学的応答として検出することが期待される。図3は、抗体固定化ガラス基板上に、ガラスキャピラリーを用いて半径約20 μm の抗原溶液のスポットを100 μm 間隔に描画し、さらに酵素標識抗体で処理した基板表面のSECM像である。抗原には腫瘍マーカーとして知られる癌胎児性抗原 (CEA) を、標識酵素には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を用いた。測定は、酵素の基質である過酸化水素とフェロセニルメタノール (FMA) を含む電解質溶液中において、探針の電位を0.05 V vs. Ag/AgCl に設定し、HRPから生成する FMA^+ の還元電流を観測し

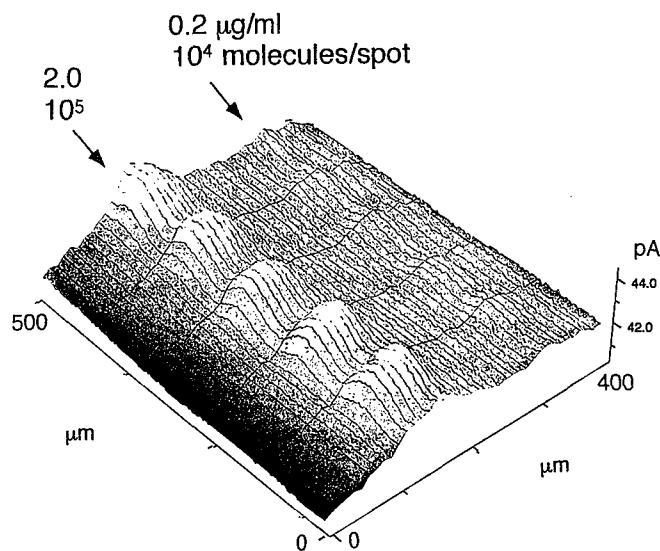


図3 抗原-抗体固定化基板のSECM像

た。探針-基板間の距離は10 μm した。FMA⁺の還元電流ピークが100 μm 間隔に観測されており、抗原の所在をHRP標識抗体を介する電気化学応答として検出可能であることが示された。還元電流応答には抗原濃度依存性があり、左側の矢印に沿った5点は2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、右側の矢印の5点は0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のCEAスポットに対応している。スポットの体積は極めて微小であるため、1つのスポットに存在するCEA抗原分子数は、各々10万および1万と見積られた。走査する微小電極で標識酵素の生成種を直接検出する本測定システムは、従来のELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) と異なり、酵素と基質の反応時間が不要である。キャピラリーを用いて抗原溶液をスポットする方法は、スポットの体積を極めて微小に制御することができるため、実分子数で議論し得る極微量の抗原に起因する電流応答を得ることができた。さらに本法では、基板の微小領域内に多数のスポットを配置し、1画面のSECM像で多数のサンプルを同時に評価することができた。

同様に、体積1 μL の抗原溶液をスポットした基板を用い、還元電流応答のより詳細な抗原濃度依存性を検討した。

4章 走査型電気化学顕微鏡によるマルチ免疫アッセイ

マルチ免疫アッセイは、1回の測定で複数種類の抗原を同時に定量することをめざす測定形式であり、1つの分析対象物当たりの作業量、測定時間、コストを軽減できる利点から、様々な形式が提案されてきた。最も有効なシステムは、同一基板上の所定の位置に抗原の種類ごとの結合領域を配置した形式であるが、生体試料を微小領域に配置する基板作製行程や、空間分解能と感度が共に優れた計測手段の開発において、多くの課題が残されているのが現状である。本章では、SECMを用いるマルチ免疫センシングシステムの構築を検討した。フォトリソグラフィとフッ酸による化学エッチングで複数個の50 μm 四方の凸部のある基板を作成し、その凸部の各々に所定の抗体分子を固定化した。抗体のパターニングには、ガラスキャピラリーを用いたスポット法を適用した。基板の凹凸情報は、SECMで基板の位置を正確に把握する際に有用である。本章で使用した抗原は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン

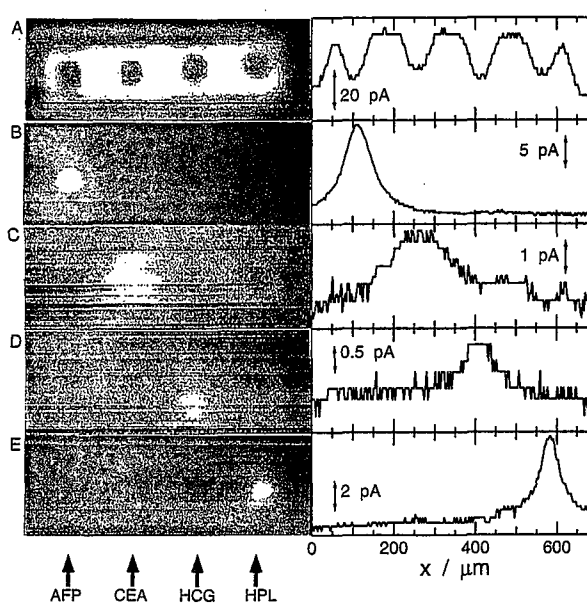


図4 マルチ免疫アッセイ基板のSECM像

(HCG)、ヒト胎盤性ラクトゲン (HPL)、癌胎児性抗原 (CEA)、 α -フェトプロテイン (AFP) である。標識酵素はHRPを用いた。本章では、まず、マルチ免疫アッセイに用いた基板自体を評価した。次にHPLとHCGのデュアル免疫アッセイを検討し、HPL、HCG両方について、電流応答の抗原濃度依存性を評価した。検出限界はHPLで3 ng/mL 、HCGで0.1 IU/ mL であった。

同様に、4種類の抗原でマルチ免疫アッセイを検討した。図4は、過酸化水素添加前の電位0.40 V vs. Ag/AgClにおける基板の凹凸に起因するFMAの酸化電流応答 (A) および、過酸化水素添加後、電位0.05 V vs. Ag/AgClにおけるFMA⁺の還元電流応答に基づくSECM像 (B~E) である。試料溶液として5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFP (B)、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CEA (C)、0.67 IU/ mL HCG (D)、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HPL (E)を用いた。いずれのSECM像においても、各々の抗体をスポットした所定の領域で還元電流の増加が認められた。本法は、抗原の種類がさらに増えても、標識酵素はHRP1種類でよく、全く同じプロセスで基板の作製およびSECMによる評価が可能である。

5章 走査型電気化学顕微鏡システムを用いたアラメシチンチャンネルのイオン透過性の解析

アラメシチンはアミノ酸残基20個からなる α -ヘリックス構造の天然ペプチドである。この分子を平面脂質二分子膜に組み込み膜電位を印加すると、複数の分子が会合してチャンネルを形成する。本章では、SECMの測定システムを平面脂質二分子膜系に適用し、アラメシチンチャンネルを介するイオンの透過性を解析した。複数種類のRedox イオンについてイオン透過率を求め、チャンネルの孔径、極性、およびイオンの大きさ、電荷といった、nm オーダーの現象から、透過率の違いを説明することができた。SECMでは、微小領域の現象をとらえることが可能であり、探針で観測された電流応答はわずかに数百個のチャンネルを介して流れこむRedox 電流に起因していることがわかった。

6章 総括

本研究での成果を要約し、総括的な結論を述べた。

本研究では、SECMの局所機能測定装置としての側面とマイクロファブリケーションの道具としての側面を共に活かすことにより、機能表面の構築から評価に至るまでの行程をすべてSECMシステムで行うことをめざした。今後も、生体試料を2次元的に配置した表面の構築により、論文中で検討した多検体同時測定システムだけでなく、さらに高度な情報処理システムの実現が期待される。

審査結果の要旨

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、走査型プローブ顕微鏡の一種であり、探針にマイクロ電極を用い、試料表面の局所的な電気化学的性質を明らかにすることが可能な新しい分析機器として注目されている。一方で、探針での極微物質変換を利用した、局所的電析やエッチングなどのマイクロファブリケーションへの応用も検討されてきた。本論文は、SECMを用いて、酵素、抗原-抗体、イオンチャンネルなどの生体試料を2次元的に配置した機能表面の構築と、その電気化学的挙動の評価に関する研究を行ったものであり、全6編よりなる。

第1章は序論である。

第2章では、本研究に用いた実験手法について述べると共に、様々な生体試料のパターニング手法の検討結果およびパターニングされた基板のSECMによる評価について述べている。SECMによるファブリケーションの研究は、これまで電析やエッチングなど主に無機材料を対象とされてきたが、本研究では、SECMによる活性ハロゲン種やヒドロキシルラジカル発生によるマイクロパターニングを検討し、SECMによるファブリケーションが生体試料にも適用可能であることを初めて明らかにした。また、キャピラリーによる生体試料のパターニング法は、様々な生体試料に広く適用できるだけでなく、同一基板上に複数の試料をパターンすることも可能であることが示された。これらはいずれも工学的に有用な知見である。

第3章では、SECMのエンザイムイムノアッセイへの適用を検討している。1つのスポット当たり1万個のCEA抗原分子に起因する応答を、標識酵素を介する触媒電流として検出可能であることを示し、また、1度の測定で複数のサンプルを同時に評価する手法を提案している。

第4章では、SECMによるマルチイムノアッセイを検討している。デュアルイムノアッセイでは、両抗原に対する電流応答の検量線を作成すると共に検出限界を決定している。また4種類の抗原を用いたマルチイムノアッセイも実現している。本法は、抗原の種類がさらに増えても、全く同じプロセスで基板の作製およびSECMによる評価が可能であるという利点がある。これらの結果は、新しい医療分析システムの構築に重要な指針を与えるものである。

第5章では、SECMの測定システムを平面脂質二分子膜系に適用し、アラメシチンチャンネルを介するイオンの透過性を解析した。複数種類のRedox イオンについてイオン透過率を求め、チャンネルの孔径、極性、およびイオンの大きさ、電荷など、分子レベルの現象から、透過率の違いを説明している。SECMでは、微小領域の現象をとらえることが可能であり、探針で観測された電流応答はわずか数百個のチャンネルを介して流れこむRedox 電流に起因していることを明らかにした。

第6章は総括である。

以上要するに本論文は、SECMの局所機能評価・測定装置としての側面とマイクロファブリケーションの道具としての側面を共に活用することにより、生体試料を2次元的に配置した表面の構築および機能評価を行ったもので、電気分析化学および応用化学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。