

| | |
|---------------|--------------------------|
| 氏 名 | 芝 駿介 |
| 学 位 の 種 類 | 博 士（工学） |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 8483 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 30年 3月 23日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 審 査 研 究 科 | 数理物質科学研究科 |
| 学 位 論 文 題 目 | 生体分子の電気化学検出にむけたナノ構造電極の研究 |

| | | | |
|-----|----------------|-------|--------|
| 主 査 | 筑波大学教授 | 木島 正志 | 理学博士 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 長崎 幸夫 | 工学博士 |
| 副 査 | 筑波大学准教授 | 辻村 清也 | 博士(農学) |
| 副 査 | 筑波大学准教授(連携大学院) | 栗田 僚二 | 博士(工学) |
| 副 査 | 埼玉工業大学教授 | 丹羽 修 | 工学博士 |

論 文 の 要 旨

本論文はナノ構造電極を利用した電気化学分析に関する研究である。本論文は四章から構成されており、第一章を緒言、第二章および三章を実験項、第四章を総括としている。近年、難治性疾患の早期発見や健康寿命の延伸、あるいは安全性試験のハイスループット化を目的としたバイオ分析法に関する研究開発が盛んに行われている。とりわけ電気化学分析法は、高感度分析に加えて装置の低コスト・小型化が容易という点から抜群の普及性を有し、上述の条件を満たすバイオセンサの構築に好適であることが知られている。しかしながら、生体分子の電気化学分析を実用的にするにあたり、いくつか解決すべき課題が残されている。例えば、生体分子として重要な疾患診断パラメータとなる糖分子は電気化学活性が極めて低い。同様に、タンパク質は疾患診断や薬物の安全性試験で最も重要な分子であるが、電気化学分析はこのような巨大分子の検出には不向きである。このひとつの原因として、タンパク質の電気化学活性部位と電極表面の間の距離が遠くなる場合が挙げられる。したがって、電気化学をベースとした生体分子検出は、質量分析や光分析に比べ極めて限られているのが現状である。以上の背景により、本論文では、電極材料のナノ構造を積極的に活用することで、従来電気化学検出が困難であった生体分子を電気化学的に高感度検出することを目的としてかかげている。

第一章では、現在の社会医療における課題、ならびに現存する生体分子の測定原理の特徴についてまとめられている。特に、電気化学分析の特徴ならびにナノ構造電極を用いた酵素電極や電極触媒材料に関する研究動向が概説されている。さらに、本研究における特徴および論文の構成が示されている。

第二章では、ナノ構造電極と酵素間の“直接電子移動(DET)”現象を利用した酵素電極の開発が述べ

られている。従来、酵素の安定化や固定化に必要とされた有機修飾を一切用いない極めて単純な構造のセンサが構築されている。2章1節では、市販されているグラフェン水溶液をグラッシーカーボン上にドロップキャストし、ビリルビンオキシダーゼ(BOD)への直接電子移動(DET)に好適なナノ構造電極を構築できることを見出した。基板電極上のグラフェン修飾量を制御することで、ノイズ電流の指標であるキャパシタンス電流を2倍程度に抑制したまま、DET電流を74倍促進できる点で特徴的である。このことより、シグナルノイズ(S/N比)に優れたバイオセンサを構築可能であることを示している。2章2節では、薬物代謝反応を触媒するシトクロム P450 (CYP) 酵素活性をリアルタイムに電気化学検出するマイクロ流路型薬物代謝センサの開発について述べられている。市販の多結晶インジウム錫酸化物(pcITO) 薄膜電極は CYP への DET に適したナノ凹凸および表面電荷を有する。しかし、表面親水性のため表面に吸着した CYP が容易に脱離し、測定安定性が低いことが課題であった。本節では、CYP 脱離サイトに新たな CYP が再吸着する吸着平衡状態によりシグナルを安定化すると同時に、極めて簡便なマイクロ流体技術や電極パタニングにより、溶液消費量やシグナル定量性を向上させ、薬物代謝反応をリアルタイムに検出することに成功している。薬剤や食物の飲み合わせによる代謝異常発生をハイスループットに予期する一次スクリーニング分析デバイスとしての提案がなされている。

第三章では、電気化学活性の低い糖分子を高感度検出可能なニッケル銅(Ni-Cu)合金ナノ粒子(ナノアロイ)埋め込みカーボン薄膜電極に関する研究について述べられている。消化器官粘膜(GI)透過性の変化は、腸疾患や胃腸疾患、心臓疾患などとの相関が指摘されており、致命的な敗血症や栄養失調などの二次疾患を引き起こすことが知られている。GI 透過性は種々の糖類試薬を経口摂取し、数時間後に代謝されずに尿中あるいは血中に排泄された糖濃度を調べることで評価されており、一般的に高速液体クロマトグラフィーによる尿成分と糖類の分離後に電気化学検出されている。しかし、現在採用されている金のパルスアンペロメトリー法は、パルス電位印加によるノイズ電流の増加のため検出限界が $10 \mu\text{M}$ と高いことが問題であった。本研究では、共スパッタ法により一段階作製した Ni-Cu ナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極が、糖類に対する電極活性が極めて高いことが述べられている。その際、ナノアロイの組成や埋め込み量といった電極のナノ構造を制御することで、糖類検出に対する電極活性が最適化されている。とりわけ、定電位における測定安定性が極めて高く、金電極に特徴的な糖類酸化中間体や尿成分による被毒をほとんど受けないことを見出したことは極めて意義が高い。結果として、種々の糖類試薬の検出限界を2桁から3桁向上することに成功しており、これは質量分析法と同等の分析性能である。以上の結果は、従来は2種が限界であった糖類試薬を5種に拡張することにより可能となる、胃・十二指腸、小腸および大腸の粘膜透過性を個別に評価する“多糖試験”への有用性が示唆されている。

第四章では各実験項で得られた結果に関して総括を行い、電気化学分析におけるナノ構造電極の社会貢献への可能性について言及している。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

現在、電気化学バイオセンサや酵素を用いたバイオ燃料電池の分野で、メディエータという電子を媒介する分子を用いる必要のない電極の開発が、特に炭素や酸化物材料を用いて盛んに行われてきている。また、カーボンやナノカーボン材料に窒素や酸素、或いは金属をハイブリッドすることで高い触媒活性を実現しようとする研究も電気化学分析や燃料電池の電極開発において盛んに行われている。

本論文では、まず、よく知られたナノカーボンであるグラフェンとバイオ燃料電池の酸素極に用いられる酵素であるビリルビン酸化酵素(BOD)を用いて、ナノ構造電極を作製することで、ノイズ電流の指標であるキャパシタンス電流を2倍程度に抑制したまま、DET電流を74倍促進できることを見出し、シグナルノイズ(S/N比)に優れたバイオセンサを構築可能であることを示している。

次に、著者は、薬物代謝反応を触媒するシトクロム P450(CYP)酵素活性をリアルタイムに電気化学検出するマイクロ流路型薬物代謝センサの開発を行っている。CYPは、比較的大きな酵素で電極との電子移動が起こりにくいが、多結晶インジウム錫酸化物(pcITO)薄膜電極は、ナノレベルの凹凸を有し、CYPと高効率に電子移動する。しかし、表面親水性のためCYPが容易に脱離し、測定安定性が低いことが課題であった。著者は、マイクロ流路にITO電極を配置し、測定溶液にCYPを入れておくことで、CYP脱離サイトに新たなCYPが再吸着する吸着平衡状態によりシグナルを安定化させ、極微量で定量的かつ安定に薬物代謝反応をリアルタイムに検出することに成功しており、簡便な飲み合わせのスクリーニングが可能なデバイスとして高い意義が認められる。

更に、著者は、電気化学活性の低い糖分子を高感度検出可能なニッケル銅(Ni-Cu)合金ナノ粒子(ナノアロイ)埋め込みカーボン薄膜電極に関する研究を行っている。検出対象として、腸疾患やすい臓疾患、心臓疾患などとの相関が指摘されている消化器官粘膜(GI)透過性のマーカーとして使用される非代謝性の糖類試薬を選択し、経口摂取後、数時間後に尿中あるいは血中に排泄された糖濃度を同時に調べるため電極開発と共に高速液体クロマトグラフィー検出器への応用も検討している。従来の金電極が測定にパルス法を用いるため、ノイズが大きく検出限界が $10\ \mu\text{M}$ と高かったことに対して、本研究では、共スパッタ法により一段階で作製したNi-Cuナノアロイ埋め込みカーボン薄膜電極を用いることで2~3桁検出限界が向上した。更に、定電位における測定安定性が極めて高く、金電極に特徴的な糖類酸化物中間体や尿成分による被毒をほとんど受けないことを見出している。以上の結果は、従来は2種が限界であった糖類試薬を5種に拡張し、より精度の高いスクリーニング法実現を可能とすると評価できる。また、胃・十二指腸、小腸および大腸の粘膜透過性を個別に評価する“多糖試験”への有用性が示唆されている。以上を総括すると著者は、ナノ構造を有する電極を開発し、電気化学分析やバイオセンサの電極として非常に有望なことを実証したと考えられ、本研究の目的を達成している。

〔最終試験結果〕

平成30年2月13日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。