

—電気化学からバイオ計測科学への道—

八尾俊男

はじめに

FIA 会誌編集委員長の長岡 勉教授からパーソナルレビュー執筆の依頼があった。研究を離れて数年、今は JST と少し関わりを持ちながら趣味の陶芸に興味を移している自分に書けるのか、資格があるのかを自問自答したが、なぜタイトルにある研究テーマを試行錯誤しながら自身のライフワークにしたのか、そこにはたくさんの人との出会いがありました。その中の恩人と云うべき人、掛け替えのない友人達と永遠の別れも重ねてきた。その方々の顔を思い浮かべながら、タイトルにある研究の一つ一つを思い出しながら、私が歩んできた研究の概略をレビューしようと思った。

今から 40 年近く前、私は大阪府立大学の武者研究室で助手（現在 助教）をしていた。当時の研究テーマは核酸や核酸塩基のボルタンメトリーで、R.N.Adams の成書“Electrochemistry at Solid Electrode”を片手に実験をしていたことが思い出される。その後、NAD 電極などの修飾電極による酵素反応の解析や酵素センサーの研究を始めていた頃、1975 年に *Anal. Chim. Acta* に掲載された Ruzicka と Hansen による“Flow Injection Analysis (FIA)”の論文に出会い、方法論としてのその高い精度と多様性、迅速性に注目し、実用的な“フローインジェクション電気化学バイオセンサー”の研究を思い立った。

研究の当初は電気（分析）化学分野の先生方との交流から始まったが、この分野は物理化学を基礎とする理論派の先生方が多く、理論の大切さを深く感じるようになった。その後、FIA の研究を通じて多数の先生方との交流が始まり、分析化学における実用性・機能性の重要性に興味を抱くようになった。研究の一つ一つに懐かしさを感じると共に、お世話になった先生方、共に研究を語った学生達の顔を思い浮かべながら研究の概要を述べることにする。

研究の概要

先に述べたように、著者は当初、核酸と核糖を構成する核酸塩基及び関連化合物が電気化学的に検出でき、その酸化還元過程に 2 種類のラジカル種が存在することを、非水溶媒を用いた液体窒素温度での ESR によりはじめて明らかにした。また、電気化学検出法が生体反応を検索

するのに有効であることを見だし、新たに“生物電気化学”の領域を開拓した。ここで得られた知見と手法は、著者の主要な研究分野であるその後のバイオ計測科学の研究に発展的に生かされた。

その後、生命科学から環境化学までの幅広い計測化学の分野で、従来の計測法の選択性と感度を飛躍的に改善するために、生体の分子認識、特に酵素などの生体機能性分子の分子認識機能を利用し、さらに分析の迅速性と選択性（特異性）に優れたフローインジェクション分析 (FIA) 法に基づいた高感度電気化学バイオセンサーの研究に着手することになる。

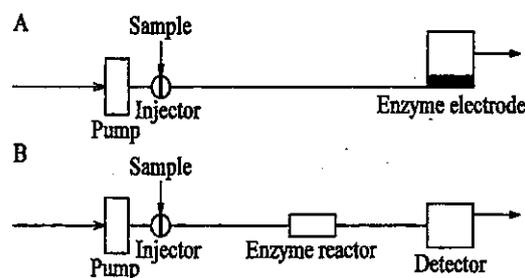


図 1 酵素電極 (A) と酵素リアクター (B) を用いたフローインジェクションバイオセンサーシステム

FIA に基づいた電気化学バイオセンサーには、バイオセンサーを直接、流路に用いる方法とバイオセンサーの酵素レセプター部を酵素リアクターとして電極部から分離して用いる方法がある。特に、FIA 用酵素センサーには、膜への物質拡散が律速とならない迅速な応答を与えるバイオセンサーが必要となる。また、酵素リアクターを分子認識・反応素子として用いた電気化学 FIA の研究は、当時では先駆的であった。

著者の主要な研究分野であるバイオ計測科学の研究はさらに次の 6 分野に分類できる。

- A 分子認識デバイスの開発と電気化学センシング、
- B 分子認識リアクターの設計と電気化学センシング、
- C 分子認識・増幅素子デバイスの設計と電気化学センシング、
- D 脳内 *in vivo* 測定のための分子認識・電気化学センサーシステム、

- E 高速液体クロマトグラフィーの特異的電気化学検出システム、
 F バイオ・ナノ材料を利用したバイオセンサーシステム。

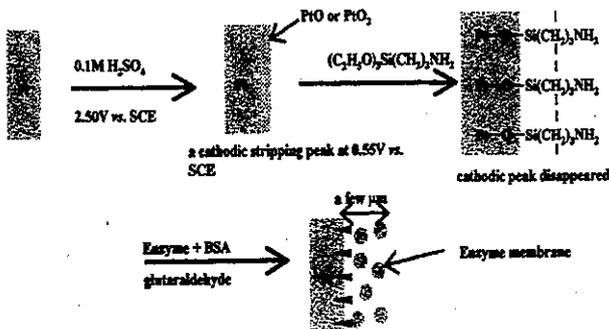


図2 化学修飾酵素膜電極 (CMEME) の作製方法

A 分子認識デバイスの開発と電気化学センシング

FIA に利用できる高感度酵素センサーとして迅速な応答 (応答時間: 10 秒以下) を与える酵素膜電極を開発した。これは硫酸酸性で電解酸化した白金電極を 3-アミノプロピトリエトキシシランでシリルし、末端にアミノ基を有する安定な Pt-O-Si 結合で修飾する。この電極上で、酵素とウシ血清アルブミンのグルタルアルデヒド溶液をスピコートして架橋薄膜を作製すると、膜の一部が電極に結合した安定な化学修飾酵素膜電極 (Chemically-modified Enzyme Membrane Electrode: CMEME と命名, 主要論文 1) が作製できる。この酵素修飾電極を FIA に利用すると、 10^{-7} M レベルの基質の連続測定が可能になった。さらに、CMEME に 1,2-ジアミノベンゼン電解重合膜をハイブリッド化し分子ふるい機能を付与し、アスコルビン酸などの被酸化性物質による妨害を排除することで、酵素反応により過酸化水素を生成する分析基質に対して、迅速で、高選択的、高感度な FIA 応答が得られた。また、ゾルーゲル法により作製した酵素トラップシリケート薄膜電極、分子ワイヤー原理に基づいた酵素含有導電性ポリマー電極や酵素と電極間での直接電子移動に基づく酵素電極など、新たな展開を含んでいる。これらのセンサーは血清中の各種成分、各種の酵素活性の測定、畜肉の鮮度測定に利用された。また、酵素分子の活性部位は特定のアミノ酸構造を有しているので、不斉場となる場合がある。このような立体特異性を有した酵素電極として、デュアル酵素電極を用いた D, L-アミノ酸電極と D, L-乳酸電極を開発し、FIA によるこれら光学対掌体の光学分割検出に成功した。さらに、環境試料中のフェノール、サリチル酸、オルトリン酸と総リン酸の同時定量、シックハウス症候群の原因となる気相中のホルムアルデヒド計測用酵素電極と計測システム、

後に述べる基質リサイクリング原理に基づいた発癌性 2,4,6-トリクロロフェノール (主要論文 2) と 4-クロロフェノールの nM 濃度レベルの測定が可能な高感度酵素電極と FIA 計測システムを提案した。

B 分子認識リアクターの設計と電気化学センシング

特異的分子認識機能を有した多くのバイオリアクターの開発とビオチン-アビジン生物親和結合を用いた酵素リアクターの新規な分子設計法を提案した。さらに分子ふるい機能と静電反発機能を有した高選択的な過酸化水素電極を開発し、酵素リアクターと組み合わせた FIA 電気化学計測法により、様々な基質を特異的に検出する方法を開発した。酵素リアクターは酵素電極に比べて、一般に安定性に優れ、長期間にわたる計測に適している。

また、試料ゾーン再合流 FIA や 16 方スウッチングバルブを用いた多成分同時定量電気化学 FIA を開発すると共に、畜肉や魚肉の鮮度センサ FIA 法を開発した。特に魚肉の鮮度センサ FIA (主要論文 3) は鮮度指数を迅速に得ることができ、実際に鮮度と良好な相関があることから、鮮度という“あいまいさ”を、固定化酵素リアクターを用いた FIA システムにより数値化して測定することも可能になった。また、糖尿病の確定診断に用いられる血球糖化ヘモグロビン (HbA1c) の FIA 電気化学センサーシステムの開発にも成功した。

C 分子認識・増幅素子デバイスの設計と電気化学センシング

基質リサイクリング酵素レセプターを用いた高感度 L-グルタミン酸センサー (検出下限: 0.2 nM) の先駆的研究を発表 (主要論文 4) して以来、この増幅原理を酵素電極や酵素リアクターに発現させた高感度 FIA 電気化学計測法を開発し、L-グルタミン酸、オルトリン酸、L-乳酸とピルビン酸、プリンヌクレオチド、NAD と NADP と FMN 補酵素の fmol オーダーの特異的検出に成功した。特に NAD と NADP は多くの酵素反応の補酵素として重要であり、それら補酵素の選択的な増幅が望まれる。ここで酵母起源グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) とジアホラーゼ系のリアクターでは NADP に特異的に応答し、増幅率は約 600 倍であった。一方、*Leuconostoc mesenteroides* 起源 G6PDH と乳酸脱水素酵素と乳酸酸化酵素系のリアクターでは、NAD に特異的に応答し、増幅率は約 500 倍であった。この後者の酵素リアクターを NAD の増幅素子リアクターとして使い、二段階増幅に基づいたフローインジェクション酵素免疫電気化学自動計測法を開発し、fmol から pmol 濃度レベルのヒト IgG の定量に成功した。

D 脳内 *in vivo* 測定のための分子認識・電気化学センサーシステム



図3 ラット脳内成分の *in vivo* 計測

脳細胞外液をマイクロ透析プローブでオンラインサンプリングして検出できる電気化学 *in vivo* 計測法を開発した。人間を含めて多くの動物は脳で情報の集約化が行われており、それは細胞間シナプスを介した神経伝達物質による情報伝達に基づいている。L-グルタミン酸は興奮性の神経伝達物質として知られ、*in vivo* 計測をめざした研究例は多いが、神経細胞を用いた *in vitro* 実験が大半であり、オンライン *in vivo* 計測した例は少ない。その理由の一つに感度の問題がある。著者は L-グルタミン酸の増幅素子リアクターを *in vivo* 計測システムに組み込むことで感度の問題を解決し、実際に KCl 刺激によって脳細胞から L-グルタミン酸が放出される過程を *in vivo* モニターした (主要論文 5)。他にグルコース、L-グルタミン酸、アセチルコリンの *in vivo* 計測法を開発すると共に、トリプル酵素電極を検出器として用いた脳内グルコースとその代謝生成物 (乳酸とピルビン酸) の 3 成分同時 *in vivo* 計測法を提案した。さらに、3 電極式のマイクロ透析酵素センサーを開発し、グルコースと NAD 補酵素のオンライン増幅検出に成功した。

E 高速液体クロマトグラフィーの特異的電気化学検出システム

酵素電極や酵素リアクターから構成された電気化学 FIA 検出システムを、HPLC の特異的ポストカラム検出器として用い、アセチルコリンとコリン、D, L-アミノ酸、NAD(P)補酵素、プリン塩基とプリンヌクレオシド、L-乳酸とピルビン酸の特異的増幅検出に成功した。

F バイオ・ナノ材料を利用したバイオセンサー

大阪府立大学での研究生活の最後の数年間は、ナノ材料として磁性アパタイトナノ粒子 (磁性ヒドロキシアパタイトナノビーズ: 粒子径 約 200 nm)、カーボンナノチューブ (多層、カップ積層型 Carbere)、マイクロ (ナノ) チップ (新規なナノインプリント法による高性能病理検査チップ) に興味を持ち、これらをバイオ素子として用いた高感度センサーを開発し FIA に利用した。

おわりに

研究者としてスタートした若い頃に、尊敬するある先生から、はやりの研究は科研費などの支援が得られやすいが、あまり意味があるとは思えない。それよりも独創性のある only one の研究を目指せとお教え頂いたことが、私の研究者としてのスタートであった。たくさんのいろいろな先生方との学術的な交流、企業の皆様との技術的な交流、時にはビールを片手に議論した大学院の学生達、気がつけばこのような研究を 30 数年間にわたり、続け発展させてきたのだと改めて思う。時には“八尾さんの研究はユニークだ”との評価をたくさんの先生方から頂いたこともあり、若い頃の研究に対するスタンスを変えずに続けられたことを少しは誇りに思うと共に、たくさんの先生方、特に FIA に関わってからの諸先生方のおかげと今は感謝の気持ちでいっぱいです。

今現在は、独創的な陶芸を目指して、特に釉薬と土は物質化学の分野、陶芸の摩訶不思議な現象を少しでも明らかにしたいと思っています。願わくば、最後は一冊の本にまとめてみたいと重いながら悪戦苦闘中である。



昨年の展示会 (炎展) の出品作の一部

主要論文

- 1) A Chemically Modified Enzyme Membrane Electrode as an Amperometric Glucose Sensor, T. Yao, *Anal. Chim. Acta*, **148**, 27-33 (1983).
- 2) A Flow Injection Biosensor System for Highly Sensitive Detection of 2,4,6-Trichlorophenol Based on Preoxidation by Ceric Sulfate, T. Yao, K. Kotegawa, *Anal. Sci.*, **19**, 829-833 (2003).
- 3) Rapid Measurement of Fish Freshness Indices by an Amperometric Flow-injection System with a 16-Way Switching Valve and Immobilized Enzyme Reactors, Y. Nanjyo, T. Yao, *Anal. Chim. Acta*, **470**, 175-183 (2002).
- 4) L-Glutamate Enzyme Electrode Involving Amplification by Substrate Recycling, T. Yao, H. Yamamoto, T. Wasa, *Anal. Chim. Acta*, **236**, 437-440 (1990).
- 5) An Electrochemical *In Vivo* Flow-injection System for Highly Selective and Sensitive Detection of L-Glutamate Using Enzyme Reactor Involving Amplification, T. Yao, Y. Nanjyo, T. Tanaka, H. Nishino, *Electroanalysis*, **13**, 1361-1366 (2001).