

学位論文題名

Study of Electrochemical Assay with Enzymatic Reaction

(酸素反応を用いる電気化学的分析法の開発に関する研究)

学位論文内容の要旨

微分パルスポーラログラフイー(DPP)は、ボルタンメトリーの一つであり、溶液に浸した水銀滴下電極の電位を連続的に変化させ、電極に流れる電流値を電位の関数として記録し(ポーラログラム)、電流の流れる電位から定性、電流値から定量を行うことのできる分析法である。DPPは、金属などの無機物ばかりでなく、医薬品のような有機物に対しても、その定量や電気化学的性質の研究が行われ、化学工業等の実用分析にも応用された。しかし、DPPで測定不可能な物質も多く、これらを検出するために酵素反応と組み合わせた定量法はほとんどない。

また、酵素センサーは、電極上に固定した酵素が被分析物の変換反応を触媒する際に消費、または、生成する化学種を検出して被分析物の定量を行うものである。酵素センサーは、酵素反応の特異性によって選択性が高く、操作が簡便であることが特徴である。しかし、それらのほとんどは、酵素反応によって消費、または、生成する酸素、過酸化水素、補酵素のどれかを検出するものであり、また、検出電位を負電位に設定するものは少ない。

そこで本研究では、第1に、特異的な酵素反応と高感度な微分パルスポーラログラフイーを組み合わせた有機酸の定量法の開発を試みた。そして第2に、酵素-ポーラログラフ定量法の原理を応用した、新しい型の酵素センサーの開発を検討した。対象とする有機酸としては、臨床分析、食品分析において重要で、ポーラログラフイーによって酸化還元電流を測定することができない、クエン酸とL-乳酸を選んだ。

本論文は、7章からなる。第1章は、序論であり、ポーラログラフイー、および、酵素センサーの簡単な歴史と特徴を示し、本研究の目的を述べた。

第2章では、溶存酵素と微分パルスポーラログラフイーを組み合わせた、クエン酸、または、L-乳酸の定量法の開発について検討した。それらの原理は、クエン酸、または、L-乳酸を含む試料に、クエン酸リアーゼ(CLE)+オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ(OADC)、または、乳酸オキシダーゼ(LO)を加えて一定時間変換反応させ、生成したピルビン酸をDPPによって検出する単純なものである。これらの方法は、試料量が $50\mu\text{l}$ 以下と少なく済み、また、操作も迅速、簡便である。さらに、本法は酵素の特異性によ

て高選択的であり、電解反応に基づくDPPを用いることにより高感度である。これらの方法の検出限界は共に酵素反応溶液中で約 $0.3 \mu\text{mol/l}$ であった。また、DPP測定時の妨害となる、タンパク質(酵素)、または、過酸化水素の除去法についても検討した。さらに、セッコウ、スポーツドリンク中のクエン酸、または、乳製品中のL-乳酸の定量に応用し、良好な結果が得られた。

第3章では、第2章の応用として、微分パルスポーラログラフによる酵素(クエン酸リアーゼ、乳酸オキシダーゼ)活性、および、速度論的定数(ミカエリス定数)の測定法の開発について述べた。これらは、過剰量の基質存在下で反応速度を測定するものである。これまで、酵素活性の測定は主に吸光光度法で行われてきたが、本研究において微分パルスポーラログラフによる、より高感度、高精度な優れた測定法を開発することができた。また、少量の酵素を用いて、酵素の定量や酵素反応の速度論的取り扱いを簡便迅速に行うことが可能となった。得られた値を文献値と比較した結果は良好であった。

第4章では、酵素の反復有効利用と操作の簡易、迅速化のために、酵素を固定化してリアクターを作製し、クエン酸、または、L-乳酸の微分パルスポーラログラフ定量法への応用について検討した。これらは固定化酵素をカラムに詰めてリアクターとし、これに試料溶液を通して変換し、DPPで測定するものである。第1に、これまでに例のないクエン酸リアーゼのポリアクリルアミドゲル中への包括固定化を試みた。リアクターは6日間安定であった。第2章における溶存のクエン酸リアーゼを用いる定量法に比べて、除タンパク操作が不要となったために操作が簡便となったことと、CL、OADCの2つ酵素を初めて固定化し、これらの反復利用が可能となったことから有用な定量法である。第2に、固定化担体として用いられた例の少ないキトパールへの乳酸オキシダーゼの共有結合固定化を行った。この固定化酵素リアクターは4ヶ月以上も使用可能であった。さらに、第3章の酵素活性測定法を用いて酵素固定化率を求めることも可能であった。また、この固定化酵素リアクターによって、さらに迅速、かつ、簡便なL-乳酸定量法を開発することができた。これらの検出限界は、リアクターに注入する試料中で共に約 $0.6 \mu\text{mol/l}$ であった。これらの方法を、ワイン中のクエン酸、または、動物血清中のL-乳酸の定量に応用し、その有用性を確かめた。

第5章では、さらに、簡便性を高めるために、キトパールを用いる固定化乳酸オキシダーゼリアクターと静止水銀滴電極を用いるポーラログラフ的な還元電流検出器によるL-乳酸のフローインジェクション分析装置を作製した。測定の妨害となる試料中の溶存酸素はODS-カラムによって分離され、10試料/時間の測定が可能である。また、酵素リアクターは、1ヶ月間の反復使用が可能であった。 $200 \mu\text{mol/l}$ のL-乳酸に対する相対標準偏差は2.8%、検出限界は注入試料中で $9.9 \mu\text{mol/l}$ であった。本装置の感度は従来の吸光光度検出器を用いるものより100倍ほど高く、また、他の電気化学検出器に比べてアスコルビン酸などの酸化性物質に妨害されないなどの利点がある。本装置を用いてヒト血清

中のL-乳酸の定量に応用し、良い結果が得られた。

第6章では、より汎用性の高い定量法として、酵素-ポーラログラフ定量法の原理を応用するなどの、これまでにない新しい原理による酵素センサーを作製した。第1に、水銀薄膜電極を用いる酵素センサーの開発を検討した。このセンサーは、酵素-ポーラログラフ定量法と同様に、酵素反応による生成物、ピルビン酸の還元電流を測定するものであり、上述のDPPを用いる方法より簡便である。その定量範囲は0.5-3.0 mmol/lで、1.0 mmol/lのクエン酸に対する相対標準偏差は4.8%であった。第2に、特異的な酵素反応とキトサン膜の酸素に対する透過選択性を利用して選択性の高いL-乳酸センサーを開発した。その原理は、LOによる変換反応の際に消費される酸素を検出するものである。このセンサーは、一般に酵素の阻害剤である水銀の薄膜電極を用いても、長期に渡って(28日間)安定であった。定量範囲は10.0-300 μ mol/l、50 μ mol/lのL-乳酸に対する相対標準偏差は1.4%で、検出限界は試料注入後の電解セル中で6.4 μ mol/lであった。また、キトサン膜の酸素に対する透過選択性を実験的に確かめた。さらに、このセンサーを用いてヒト血清中のL-乳酸の定量を行い、その有用性を確かめた。第3に、微分パルスアンペロメトリック検出法を用いて高感度なL-乳酸センサーを開発した。このセンサーは、酵素反応の特異性と微分パルス法の選択性によって高選択的なセンサーである。その原理は、乳酸デヒドロゲナーゼによって消費されるNAD⁺(酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)の還元電流を測定するものである。定量範囲は0.05-0.5 mmol/lで、0.25 mmol/lのL-乳酸に対する相対標準偏差は5.0%であった。また、NAD⁺透過性の酵素固定化膜の選択についても検討した。

第7章では、本研究によって得られた成果を総括した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長谷部 清
副 査 教 授 多 賀 光 彦
副 査 教 授 魚 崎 浩 平
副 査 教 授 中 村 博

学 位 論 文 題 名

Study of Electrochemical Assay with Enzymatic Reaction

(酵素反応を用いる電気化学的分析法の開発に関する研究)

申請者は、高感度かつ高選択的な定量法として、酵素反応を用いる電気化学的分析法の開発を試みている。この中で、溶存酵素または固定化酵素による変換反応後に、微分パルスポーラログラフィー[DPP]によって測定する方法と、このポーラログラフ定量法の原理を応用した新しい型の酵素センサーの開発を検討している。これらの方法によって、食品および生体試料中のクエン酸とL-乳酸の高感度かつ高選択的な定量法を開発し、良好な結果を得ている。

本論文は、7章からなる。第1章は、序論であり、ポーラログラフィー、および、酵素センサーの簡単な歴史と特徴を示し、本研究の目的を述べている。

第2章では、溶存酵素とDPPを組み合わせたクエン酸またはL-乳酸の定量法の開発について検討している。それらの原理は、試料に酵素を加えて一定時間変換反応させ、生成したピルビン酸をDPPによって検出する単純なものであるが、用いる試料量が少なく、吸光光度法よりも操作が迅速、簡便で、かつ高感度である。

第3章では、第2章の応用として、DPPによる酵素活性の測定法の開発について述べている。これらは、過剰量の基質存在下で反応速度を測定するものである。これまでの酵素活性の測定は主に吸光光度法で行われてきたが、本研究によって、用いる酵素が少量でDPPによってより高感度かつ高精度な優れた測定法が開発され、改善がみられている。

第4章では、酵素の反復有効利用と操作の簡易、迅速化のために、酵素を固定化してリアクターを作製し、クエン酸またはL-乳酸のDPP定量法への応用について

検討している。その1つとして、これまでに固定化例のないクエン酸リアーゼのポリアクリルアミドゲル中への包括固定化を試みている。リアクターは6日間安定である。ここでは、第2章における溶存酵素を用いる定量法に比べて操作がさらに簡便となったことと、クエン酸リアーゼを初めて固定化し、これらの反復利用が可能としたことが新しい点である。2つ目に、固定化担体として用いられた例の少ないキトパールへの乳酸オキシダーゼの共有結合固定化を行っている。この固定化酵素リアクターは4ヶ月以上も使用可能である。さらに、第3章の酵素活性測定法を用いて酵素固定化率を求めることができることを確かめている。これらの固定化酵素リアクターによって、溶存酵素法よりも迅速かつ簡便な定量法を開発している。

第5章では、さらに、簡便性を高めるために、固定化酵素リアクターとポーラログラフ検出器を用いるL-乳酸のフローインジェクション分析装置を作製している。測定妨害となる試料中の溶存酵素はODS-カラムによって分離される。また、酵素リアクターは、約1ヶ月間の反復使用が可能であり、感度は従来の吸光光度検出器を用いるものより100倍ほど向上している。また、他の電気化学検出器に比べてアスコルビン酸などの酸化されやすい物質に妨害されないこと等が利点である。

第6章では、より汎用性の高い定量法として、酵素-ポーラログラフ定量法を応用するなどの新しい原理に基づく酵素センサーを作製している。第1に、水銀薄膜電極を用いる酵素センサーの構築である。このセンサーは、酵素反応による生成物、ピルビン酸の還元電流を測定する全く新しいものであり、上述のDPPを用いる方法よりもさらに簡便である。第2に、特異的な酵素反応とキトサン膜の酸素に対する透過選択性を利用して選択性の高い、酸素検出型のL-乳酸センサーを開発している。開発したセンサーは、一般に酵素の阻害剤である水銀の薄膜電極を用いても、長期に渡って(28日間)安定である。また、キトサン膜の酸素に対する透過選択性を実験的に確かめている。第3に、これまで酵素センサーに用いられたことのない微分パルスアンペロメトリック検出法を用いて高感度なL-乳酸センサーを作製している。このセンサーは、酵素反応の特異性と微分パルス法の選択性によって高選択的なセンサーである。この中で酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド[NAD⁺]透過性の酵素固定化膜の選択についても検討している。

第7章では、本研究によって得られた成果を総括している。

以上のように申請者は、酵素反応を組み合わせた微分パルスポーラログラフィーおよび電気化学的酵素センサーにより数種の有機酸の高感度かつ高選択的、さらに迅速、簡便な分析法を種々開発している。これらの研究は、電気分析化学に関する研究の発展に寄与するところが大きい。参考論文は、11編ありいずれも国内外の権威ある学術雑誌に掲載されたものである。ここに審査員一同は最終試験の結果と合わせ、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有すると認定した。