電気化学測定用の電極に形成されたシルク膜の特性

Properties of silk materials deposited onto electrodes for electrochemical detections

素材試験係　信澤　和行（NOBUSAWA Kazuyuki）
企画連携係　中村　暢助（NAKAMURA Yosuke）
生産技術係　齋藤　　宏（SAITO Hiroshi）　　清水　弘幸（SHIMIZU Hiroyuki）

電気化学測定において、シルクが電極膜の素材として活用できるか評価した。水溶化したシルクフィブロイン(SF)の電解により、カーボン電極表面にSF膜を化学的に固定できる可能性を示した。作製したSF膜電極を用いて黄色ぶどう球菌(SA)の検出を評価した結果、SF膜のない電極と比べて、SF膜のある電極は、SAに対する検出感度を向上させることを示唆する結果が得られた。

１．　はじめに

シルクは、フィブロイン(SF)とセリシン(SS)という2種類のタンパク質から構成されている。SSを取り除いたSFは、他の繊維素材では表現できない高級感ある織物の製造などに活用されている。一方、シルクは糸素材としての魅力だけではなく、例えば、シルクの保湿性や生体適合性などの機能性に着目して、ヘルスケアや医療など非衣料分野にシルクを活用する研究開発が進んでいる。本研究では、シルクを用いたセンシング分野への活用を検討する。

電気化学センサーはスマホサイズに小型化されており、水質検査や食品分析など様々な分野におけるポータブルな分析機器としての可能性を有している。電気化学測定において、水中のイオンや細菌などを検出するには、これら検出対象（以下、「検体」という）を特異的に吸着させる材料を電極表面に作ることが重要になる。本研究では、検体を電極表面に濃縮するために、シルクが有する物質捕捉能などの利用を試みた。

シルクを電極表面に固定した電極膜を作製し、検体検出を評価するため、SFをシルクの素材として用い、①電極へのSFの成膜条件の検討、②SF膜電極による検体検出の検討を行った。

２．電気化学測定装置の構成

電気化学測定装置には、メトローム社製DRP-STAT300を用いた。電極の基本的構成として、作用電極にグラッシーカーボン電極（GCE）、対電極に白金線、参照電極に銀-塩化銀（3M NaCl）電極を用いた。酸化還元試薬には、フェロシアン化カリウム（$K_4[Fe(CN)_6]$）、フェリシアン化カリウム（$K_3[Fe(CN)_6]$）、電解質には塩化カリウム（KCl）あるいはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を使用した。電気化学測定における電位の数値はすべて参照電極を基準とした値を表記した。

３．SFの水溶化

SF水溶液は常法に従って調製した。精練済のぐんま200の絹糸を、塩化カルシウム水溶液中にて115～120℃条件にて水溶化した。塩化カルシウムを透析（分画分子量12,000～14,000）により除去した後、遠心分離により不溶物を除去した。SF水溶液は、冷蔵保存においてもゲル化することがなく、水溶液として保存可能であった。SF水溶液の絶乾重量からSF重量を求め、任意の濃度になるよう希釈して用いた。

４．電極への SF 成膜条件の検討

アミノ酸を電気化学測定に供すると、例えばチロシンの電極への吸着に伴う電流変化や、システインの酸化反応などの電解反応が観測されることが知られている。SF にはこれらアミノ酸が含まれていることから、アミノ酸の電解反応を利用することで SF を電極に化学的に固定させ、容易に剥離しないシルク膜が形成できると期待した。そこで、SF 水溶液を支持電解質として電気化学測定を実施した (図 1)。

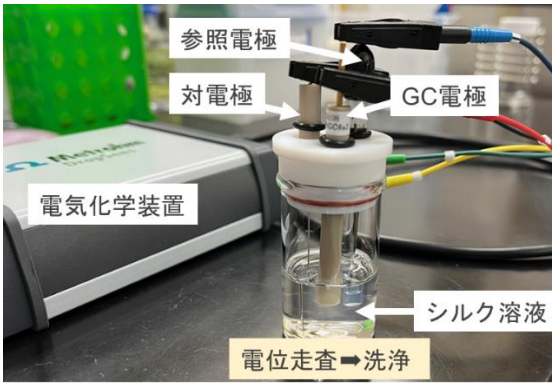

図1　電解を利用したシルク膜作製

まず、SF 水溶液中においてサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定を行った。CV 測定では、酸化還元試薬の酸化反応、還元反応に伴う電流－電位曲線が得られる。SF 水溶液には酸化還元試薬を混合していないため、観測される電流ピークはシルク由来のものと判断できる。結果を図 2 に示したが、0.6～0.7V 付近に電流ピークが観測され、SF 濃度に依存して電流値が高くなった。これは SF を構成しているアミノ酸の酸化反応に由来すると考えられる。結果は示していないが、電位走査を繰り返すと電流値が減少し観測されなくなった。これは電解反応が不可逆であることを示しており、1 回目の電位走査でシルクが電極上に固定されたことを示唆している。

続いて、電解反応を行った電極を水洗し、酸化還元試薬を含む電解質溶液中での CV 測定を行った (図 3)。その結果、SF 電解反応を行った電極では、酸化還元反応に伴う電流ピークの電位シフトが観測された。電極上に何かの物質が吸着した場合、電流ピークと電位の変化が起こることが知られている。そのため、電流ピークの電位シフトは、シルクが電極上に固定されたことを示唆する結果であるといえる。

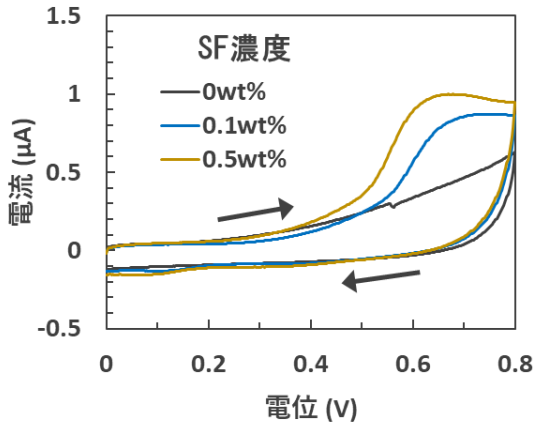

図2　SF の電解反応にともなう電流値の変化，（図中矢印は電位走査方向を表す）
[SF]=0～0.5wt%，0.01×PBS

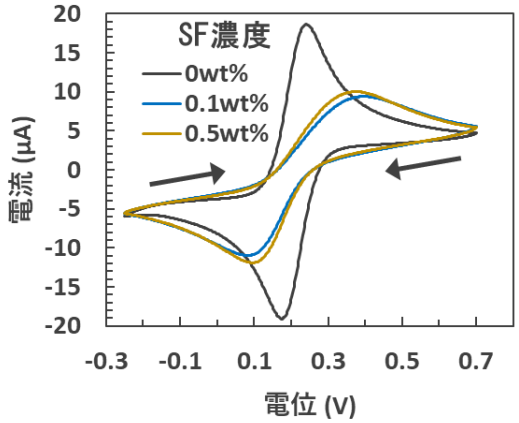

図3　SF 電解膜形成後の$[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$の酸化還元応答（図中矢印は電位走査方向を表す）
$[[Fe(CN)_6]^{4-/3-}]$=1 mM，1×PBS

SF 水溶液は、水分を除去するなどの加工を施すと多孔質体を形成することが知られている。電位走査後の電極表面を SEM 観察したが、シルクが多孔質構造を形成している様子は観察されなかった。この結果は、SF が非常に薄い層構造を電極表面に形成していることを示唆している。

５．SF 膜電極による検体検出の検討

電解により作製した SF 膜電極の検体検出について評価した。検体のモデルとして黄色ぶどう球菌 (SA) を用いた。SA は培養後、洗菌・集菌し、任意の濃度になるよう PBS 中に再分散して試験に供した。

微分パルスボルタンメトリー (DPV) 測定を行い、SA の添加後から 120 分後までの酸化還元試薬の還元電流を一定時間ごとに測定した (図 4(a),図 4(b))。SF 膜がない場合、ある場合のどちらについても、SA 添加後から電流値が徐々に減少していく様子が確認された。これは SA が電極に吸着したことにより、試薬の還元反応が抑制されたと考えられる。続いて、SF 膜の有無の違いを比較するために、SA 添加直後の電流値の値を基準にして、電流値の変化を時間に対してプロットした (図 4(c))。その結果、SF 膜を形成させた電極は、膜のない電極と比較して、電流値の減少度合いが大きくなることがわかった。すなわち、電極表面に SF 膜が存在することによって、SA の電極に対する吸着性が向上したことを示唆する結果が得られた。

６． まとめ

電極表面にシルク層を形成させる方法を見出すとともに、シルク層が電極表面に存在することによって、SA の電極表面への吸着が促進される可能性を示唆する結果を得た。これにより、SA の検出可能性を示すことができた。一方、検出感度や、他の菌種が夾雑した場合に SA に対してのみ特異性が得られるかについて課題を残した。今後、シルク膜の多孔質化や膜の化学修飾によって、より検体が吸着しやすくなるシルク膜が作製できるか検討する。

７． 謝辞

本研究は、一般財団法人大日本蚕糸会の令和６年度貞明皇后研究助成を受けて実施したものです。

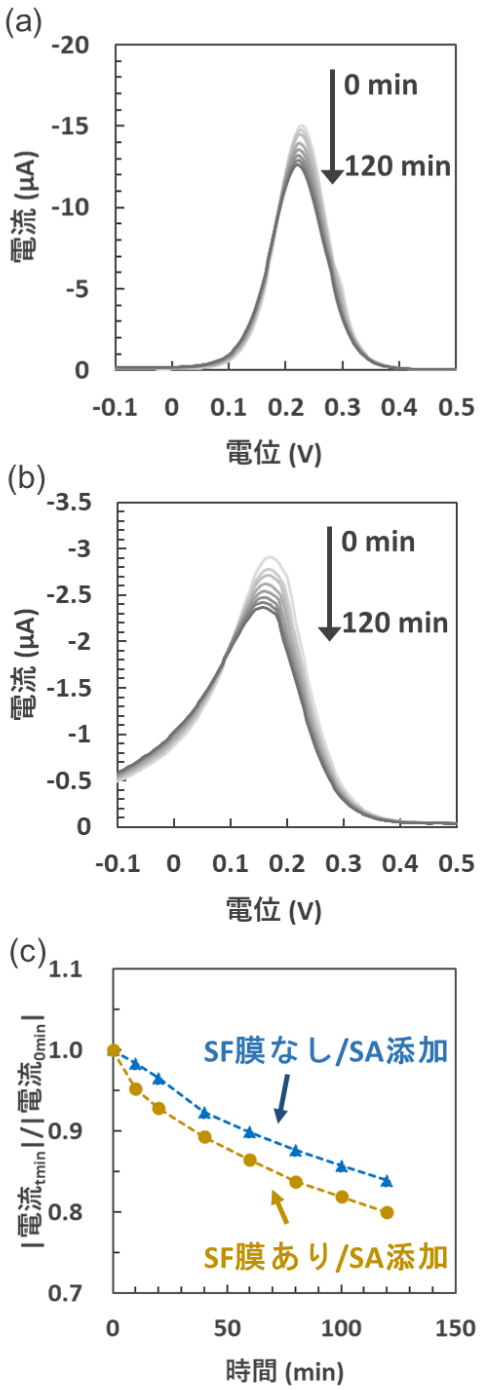

図4 (a) SF 膜なし、(b) SF 膜あり電極における、SA 添加に伴う $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 還元電流の時間変化、(c) 還元電流の減少率
$[[Fe(CN)_6]^{3-}]$=1 mM, [SA]=10^7 CFU/mL, 1×PBS