

生理活性物質定量化のための複合型多機能バイオセンサーの開発とその生体計測への応用

著者	清水 宣明
雑誌名	平成7(1995)年度 科学研究費補助金 試験研究(B) 研究成果報告書
巻	1993-1995
ページ	20p.
発行年	1996-03-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/47125

生理活性物質定量化のための複合型多機能
バイオセンサーの開発とその生体計測への応用

(研究課題番号：05558115)

平成7年度科学研究費補助金試験研究B(1)

研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 清水宣明

(金沢大学大学院自然科学研究科)
助教授

はしがき

本報告書は平成5年～平成7年度、文部省科学研究費補助金試験研究B(1)「生理活性物質定量化のための複合型多機能バイオセンサーの開発とその生体計測への応用」(課題番号05558115)の助成のもとに行った研究成果をまとめたものである。本研究を遂行するにあたり、粟生 修司(九州大学・医学部・助教授)、片渕 俊彦(九州大学・医学部・講師)、都甲 潔(九州大学・工学部・助教授)、川西 琢也(金沢大学・工学部・助手)の各位から多大な援助、ご指導を賜った。ここに深く感謝の意を表します。

研究組織

研究代表者：清水 宣明(金沢大学・大学院自然科学研究科・助教授)

研究分担者：林 良茂(金沢大学・工学部・教授)

研究分担者：堀 哲郎(九州大学・医学部・教授)

研究分担者：大村 裕(日本臓器製薬(株)・生物活性科学研究所
・名誉顧問)

研究分担者：松村 英生(株式会社エイコム・開発部・部長)

研究経費

平成5年度 8,300千円

平成6年度 6,000千円

平成7年度 2,200千円

計 16,500千円

研究発表

I. 学会誌等

原著論文

- 1) Shimizu, N., Hori, T. & Nakane, H. An interleukin-1 β -induced noradrenaline release in the spleen is mediated by brain corticotropin-releasing factor: an in vivo microdialysis study in conscious rats. *Brai behav. Immun.*, 7, 14-23, 1994.
- 2) Shimizu, N., Nakane, H., Hori, T. & Hayashi, Y. CRF receptor antagonist attenuates stress-induced noradrenaline release in the medial prefrontal cortex of rats. *Brain Res.*, 654, 145-148, 1994.
- 3) Nakane, H., Shimizu, N. & Hori, T. Stress-induced noradrenaline release in the rat prefrontal cortex measured by microdialysis. *Am. J. Physiol.*, 267, R1559-R1566, 1994.
- 4) Lee, R.-S., Smith, S.S., Chapin, J.K., Waterhouse, B.D., Shimizu, N. et al. Effects of systemic and local ethanol on responses of rat cerebellar Purkinje neurons to iontophoretic applied γ -aminobutyric acid. *Brain Res.*, 687, 1-11, 1995.
- 5) Lee, R.-S., Smith, S.S., Chapin, J.K., Shimizu, N. et al. Effects of systemic and local ethanol on responses of rat cerebellar Purkinje neurons to iontophoretic applied norepinephrine and γ -aminobutyric acid. *Brain Res.*, 687, 12-21, 1995.
- 6) 姜 志恒、川西 琢也、阿保 篤志、清水 宣明、林 良茂 有機物供給による土壤浸透排水からの窒素除去に関する流れと混合過程のシミュレーション *水環境学会誌*, 18(6), 511-517, 1995.
- 7) 川西 琢也、姜 志恒、稲垣 道弘、清水 宣明、林 良茂 稲わらを利用した土壤浸透水からの窒素除去 *水環境学会誌*, 18(12), 993-1000, 1995.
- 8) 東田 明弘、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也 過酸化水素水処理のための四三酸化鉄磁性体による二酸化マンガン触媒の回収と再利用 *水環境学誌*, 18(7), 561-568, 1995.
- 9) 東田 明弘、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也 磁界中の磁性体微粒子充填の透過特性 *紛体工学会誌*, 32(8), 538-543, 1995.
- 10) 林 良茂、川西 琢也、清水 宣明 窒素酸化物-水溶液系の反応機構 -吸収速度に及ぼす pH の影響- *大気環境学会誌*, 印刷中.
- 11) Shimizu, N., Kaizuka, Y. Hori, T. & Nakane, H. Immobilization increases noradrenaline release and reduces natural killer cytotoxicity in the conscious rat spleen. *Am. J. Physiology*, in press.

- 12) Hossain, M.J., Hayashi, Y., Shimizu, N. & Kawanishi, T. Determination of critical micelle concentration of aerosol OT/isooctane reverse micelles by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR). J. Chem. Eng. Japan, in press.

総説、報告書等

- 1) 清水 宣明、大村 裕 新しい空腹および満腹物質. Clinical Neuroscience, 11(4), 36-38, 1993.
- 2) 堀 哲郎、片渕 俊彦、武 幸子、海塚 安郎、清水 宣明 他 5名 脳インターフェロン α による脾臓ナチュラルキラー細胞活性の抑制. 平成4年度文部省科学研究費補助金総合研究(A)「生体の温熱感受性の修飾因子に関する細胞から固体までの総合的研究」第1回班会議研究報告集, 32-34, 1993.
- 3) 清水 宣明、大村 裕 内因性摂食行動調節因子と大脳視床下部統御機構 三島海雲記念財団研究報告書(30号), 60-64, 1993.
- 4) 清水 宣明、堀 哲郎、大村 裕 脳内生理活性物質動態解析のための多機能バイオセンサーの開発とその神経生理学への応用 平成6年カシオ科学振興財団年報, 82-83, 1994.
- 5) 粟生 修司 他6名 神経性食欲不振性におけるドーパミンおよびコレシストキニンの意義 厚生省特定疾患神経性食欲不振性調査研究班平成5年度研究報告書, 75-79, 1994.
- 6) 清水 宣明、大村 裕 拘束ストレスと摂食抑制の中枢機序 Neurosciences, 21, 19-22, 1995.

II. 口頭発表

- 1) Hori, T., Katafuchi, T., Take, S., Kaizuka, Y., Ichijo, T. & Shimizu, N. Brain cytokines reduce natural killer cytotoxicity through the CRF-sympathetic nervous system. Abstract for 2nd International Congress ISNIM (International Society for Neuro-immunomodulation), Paestum (Salerno), Italy, p39, 1993.
- 2) Hori, T., Katafuchi, T., Take, S., Kaizuka, Y., Ichijo, T. & Shimizu, N. Immune cytokines modulate peripheral cellular immunity through the hypothalamo-sympathetic nervous system. Abstract for the Integrative Symposium for Integrative and Cellular Aspects of Autonomic Functions: Temperature and Osmoregulation in Max-Planck-Institute in Bad Nauheim, Germany, 1993.
- 3) Hori, T., Katafuchi, T., Take, S., Kaizuka, Y., Mori, T. & Shimizu, N. Activation of hypothalamic opioid receptors reduces peripheral cellular immunity through splenic sympathetic innervation. Abstracts for XXXII congress of the International Union of Physiological Sciences, p248, Glasgow, 1993.

- 4) 清水 宣明、中根 秀之、堀 哲郎 Diazepam 誘発摂食行動とセロトニン系による抑制性修飾. 第 70 回日本生理学会、1993・4、山梨。
Shimizu, N., Nakane, H. & Hori, T. Suppression of diazepam-induced feeding behavior through the serotonin-2 receptors in rats. *Jpn. J. Physiol.*, 43(Suppl.): No. 627, S253, 1993.
- 5) 中根 秀之、清水 宣明、堀 哲郎 ストレス反応時のラット前頭前野ノルアドレナリン放出における B Z P 系、C R F 系の役割. 第 70 回日本生理学会、1993・4、山梨。
Nakane, H., Shimizu, N. & Hori, T. Involvement of benzodiazepines and corticotropin-releasing factor in stress-induced increase of noradrenaline release in the rat medial prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Jpn. J. Physiol.*, 43(Suppl.): No. 628, S253, 1993.
- 6) 堀 哲郎、海塚 安郎、片渕 俊彦、武 幸子、森 俊憲、清水 宣明 体温調節と免疫-脳・免疫連関の観点から. 第 70 回日本生理学会、1993・4、山梨。
Hori, T., Kaizuka, Y., Katafuchi, T., Take, S., Mori, T. & Shimizu, N. Thermoregulation and immunity -- a view from the brain-immune interaction mechanisms. *Jpn. J. Physiol.*, 43(suppl): S3-1, S10, 1993.
- 7) 堀 哲郎、片渕 俊彦、武 幸子、安藤 哲也、一條 智康、清水 宣明 視床下部による免疫系制御. 日本病態生理学会雑誌、1(2): 32, 1993.
- 8) 清水 宣明、大村 裕 拘束ストレスと摂食抑制の中枢機序.
シンポジウム「ストレスと脳機能」招待講演. 第 21 回日本脳研究会、1994・10、名古屋。
- 9) 清水 宣明、林 良茂、堀 哲郎 マイクロダイアリシス法による拘束ストレス時の脾臓ノルアドレナリン遊離の解析. 第 5 回東北マイクロダイアリシス研究会、1994・12、仙台。
- 10) 鈴木 健治、粟生 修司、清水 宣明、堀 哲郎 コレシストキニンの摂食抑制作用におけるラット延髄弧束核ニューロンの関与. 第 15 回 日本肥満学会、1994・11、大阪。
- 11) 鈴木 健治、粟生 修司、清水 宣明、堀 哲郎 CCK は弧束核内側亜核の反復発火型細胞に短持続性の興奮を引き起こす. 第 18 回日本神経科学大会、1994・11、東京。
Suzuki, K., Aou, S., Shimizu, N. & Hori, T. Cholecystokinin (CCK) induces short-lasting excitation in repetitive firing neurons of the rat nucleus tractus solitarius (NTS). *Neurosci. Res.*, Suppl. 19, S76, 1994.

- 12) 鈴木 健治、清水 宣明、粟生 修司、堀 哲郎 ラット延髄弧束核コレシストキニン (CCK) 感受性ニューロンの膜特性. 第 71 回日本生理学会大会、1994・3、高松。
Suzuki, K., Shimizu, N., Aou, S. & Hori, T. Characterization of cholecystokinin (CCK) responsive neurons in the rat nucleus tractus solitarius (NTS).
Jpn. J. Physiol., 44 (suppl), S248, 1994.
- 13) 堀 哲郎、片渕 俊彦、武 幸子、岡 孝和、太田 一樹、高木 厚司、清水 宣明、一條 智康 脳免疫系連関におけるサイトカインの役割. 第 71 回日本生理学会大会、シンポジウム 7 神経-内分泌-免疫系連関、1994・3、高松。
- 14) Hori, T., Katafuchi, T., Take, S., Kaizuka, Y., Ichijo, T. & Shimizu, N. Hypothalamic and sympathetic modulation of immunity. Abstract for the 4th Naito Conference on Neuro-Immuno- Endocrine Networks. B-2, pp. 20, 1994.
- 15) 川西 琢也、清水 宣明、林 良茂 不飽和土壌中のトリクロロエチレンの拡散機構の解析. 化学工学会第 28 回秋季大会、1995.
- 16) 片岡 明洋、林 良茂、川西 琢也、清水 宣明、中村 静夫 微粒子沈着 CVD 法におけるジルコニア膜の合成. 化学工学会第 28 回秋季大会、1995.
- 17) 姜 志恒、川西 琢也、阿保 篤志、清水 宣明、林 良茂 有機物供給による土壌浸透水からの窒素除去Ⅲ-有機物供給法の脱窒への影響. 化学工学会第 60 年会、1995・大阪。

Ⅲ. 出版物

- 1) Hori, T., Katafuchi, T., Take, S., Kaizuka, Y., Ichijo, T. & Shimizu, N. Immune cytokines modulate peripheral cellular immunity through the hypothalamo-sympathetic nervous system. In: K. Pleschka & R. Gerstberger (Eds.), Integrative and Cellular Aspects of Autonomic Functions, Jhon Libbey Eurotext, Paris, pp. 125-129, 1994.

研究成果

はじめに

ヒトを含めた動物行動の発現時には、大脳内においてそれぞれの行動に特異的あるいは互いに干渉しあう多くの神経回路網が作動している。その神経機構は単なる脳ニューロン活動の解析や回路網の解析からだけでは理解できず、その物質的基礎の解明が突破口になると期待できる。本研究の目的は、無麻酔・無拘束の動物のある特定の行動時に作動する神経回路網において、どのような生理活性物質がどのように作用しているかを定量的かつ経時的に分析する手法や機器を開発し、それをシステム化することにある。

近年種々の化学物質を測定対象とするバイオセンサの開発が注目されている。バイオセンサのもっとも一般的なものには固定化酵素と電極を組み合わせた酵素センサであり、グルコースオキシダーゼ固定化電極を用いたグルコースセンサなどが報告されている。しかし、中枢神経系に適用するだけの超微小化にはいたっておらず、また中枢神経系に存在する神経ペプチドに応用した例はない。われわれは現在までの基礎研究において、

(1) インビボ・ボルタンメトリー法により脳内モノアミンを電気化学的に検出する微小カーボンファイバー電極の開発、(2) インビボ・ボルタンメトリーカーボンファイバー電極と単一ニューロン活動を記録する白金イリジウム電極を一体化した複合電極の製作、(3) 各種内因性生理活性物質を微小透析プローブに回収し、高速液体クロマトグラフ・電気化学検出器により超高感度分析を行うマイクロダイアリシス法などにより脳内モノアミンの動態とニューロン活動の相関を同時解析した。生体内には酵素、抗体などをはじめとする特異的分子認識機構を有する生体物質が多数存在するが、化学センサの認識機能部位にこれらの生体物質の優れた分子認識機構を利用すれば高選択性を有する高感度バイオセンサを構築できると期待できる。ここでは基質選択性酵素センサ及び水晶振動子マイクロバランスを利用した免疫センサについてその基礎的研究を行った。

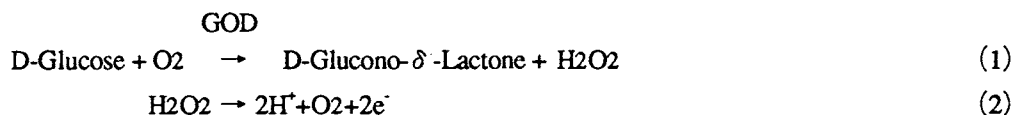
I. 基質選択性酵素センサの開発とグルコースの高感度測定

現在様々な種類の化学センサが報告されているが、その代表的なものはグルコースセンサである。グルコースセンサは医療分野では血液中のグルコース濃度の測定、またバイオインダストリーの分野ではグルコース濃度を測定することにより発酵プロセスのフィードバック制御に用いることができる。さらに食品の成分計測用としても多くの研究がなされている。本研究では

- 1) 電極表面へのグルコースオキシダーゼの固定化法の確立
- 2) グルコースセンサの基本特性の確認及びその高度化への基礎条件を検討した。

1. 測定原理

電極表面に固定されたグルコースオキシダーゼ (GOD) は、(1) 式のようにグルコースの酸化反応を触媒する。この酸化反応によりグルコノラクトンと過酸化水素を生じる。したがって、過酸化水素は(2) 式のようにアノード分極上で酸化される。ここで起こる酸化電流値を計測することでグルコース濃度を定量する事ができる。



2. グルコースオキシダーゼの固定化

本研究では、GODを電極表面に固定化する方法としてグルタルアルデヒド法を用いた。固定化の手順は以下の通りである。

a) チラミンの電解重合

GOD固定化用の電極として、直径が3mmの白金電極を用いた。電解重合は0.1Mチラミン溶液 (0.3M水酸化ナトリウム-メタノール溶液) を電解液とし、固定化用白金電極を陽極に、カウンター電極として白金電極を陰極に接続した。回路に0.5Aの定電流を3分間通電することにより、チラミンを陽極の白金電極表面に重合し、電極表面にアミノ基を導入した。

b) グルタルアルデヒドとのSciff塩基形式反応

チラミンを電解重合した白金電極を5%グルタルアルデヒド溶液中に3時間放置する。この操作により、チラミンとグルタルアルデヒドの間にSciff塩基を形成させる。

c) GODの固定化

以上の反応を経た電極を、GOD溶液中 (10mg/ml) に24時間放置する。このとき、グルタルアルデヒドのアルデヒド基とGODのアミノ基の脱水縮合により、2)と同様にSciff塩基が

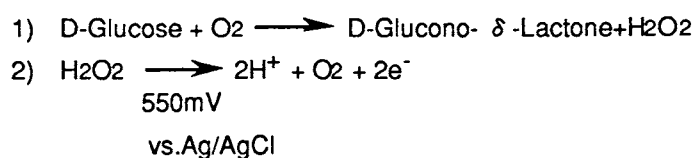
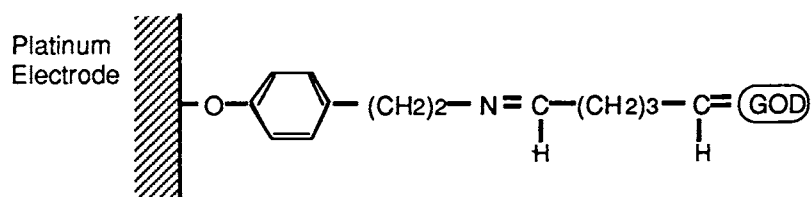


図1 電極表面模式図および反応式概略

形成され、GODを電極表面に固定化することができる (図1)。

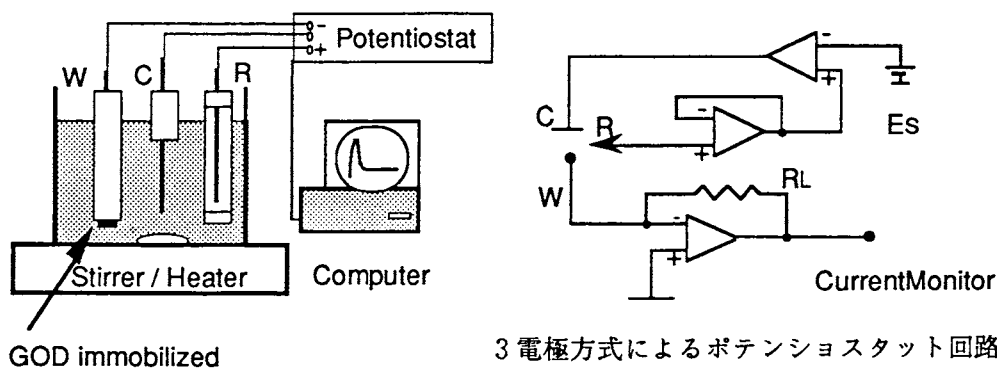
3. グルコースセンサの測定原理

本研究で作製したGODの測定原理を図1下段に示す。溶液中のグルコースは電極表面に固定化されているGODを触媒として酸化され、グルコノラクトンと過酸化水素を生成する。ここで生じた過酸化水素は銀/塩化銀電極を基準電極として550mVの電圧を負荷することにより容易に酸化される。このときの過酸化水素の酸化電流は過酸化水素濃度に比例することから、過酸化水素の酸化電流を測定することにより、溶液中のグルコース濃度を求めることができる。

4. 実験装置および方法

図2に実験装置の概略を示す。ここで、GOD固定化電極を陰極に、陽極にはカウンター電極として白金電極を接続した。参照電極には銀/塩化銀電極を使用した。溶液はpHを5.0に調製したクエン酸緩衝液を用い、溶液をマグネティックスターラーにより絶えず攪拌した。また実験は室温で行った。

コンピュータによって各種パラメータを制御できる電気化学検出器（BAS100 B/Wエレクトロケミカルワークステーション；BAS社製）により、作用電極への印加電圧を550mV（v.s. Ag/AgCl）に設定した。0.5秒おきに測定・記録し、オンラインでディスプレイ上に表示した。電極用セルを一定流速のクエン酸緩衝液で灌流し、回路を流れる電流値が一定になったことを確認後、各種グルコース濃度のクエン酸緩衝液を灌流した。また、グルコース投与を電極セル中に滴下することによっても同様の実験を行った。



C: 対極 (白金) R: 参照電極(銀/塩化銀) W: 作用電極 (グルコースオキシダーゼ固定化白金)

図2 実験装置概略図

5. グルコースセンサの基質選択性

本研究で作製したグルコースセンサの基質選択性を調べた結果を図3に示す。図はセンサ出力の経時変化を示すがグルコース(1M)、シュクロース(1M)、果糖(1M) 100 μ lをそれぞれ電極セル(クエン酸緩衝液; 10ml)に滴下したところ、グルコースを滴下した場合についてのみ酸化電流を観測することができた。グルコースと同じ糖類であるシュクロースや果糖の場合は反応を示さないことから、本研究で作製したグルコースセンサの基質選択性を確認することができた。

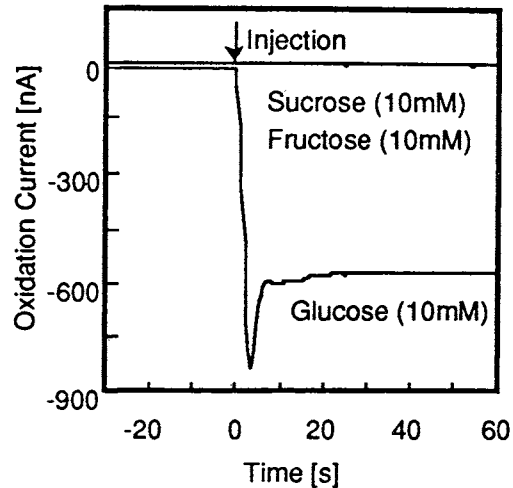


図3 グルコースセンサの基質選択性

6. グルコース応答の濃度依性

グルコースセンサ応答の濃度依存性について調べた結果を図4に示す。図が示すように、グルコース濃度の増加に対応して酸化電流値が増加することが分かる。またその応答時間は各濃度において10秒以内であり、応答性はよいといえる。

グルコース濃度と検出された酸化電流値の関係をプロットしたものを図5に示す。

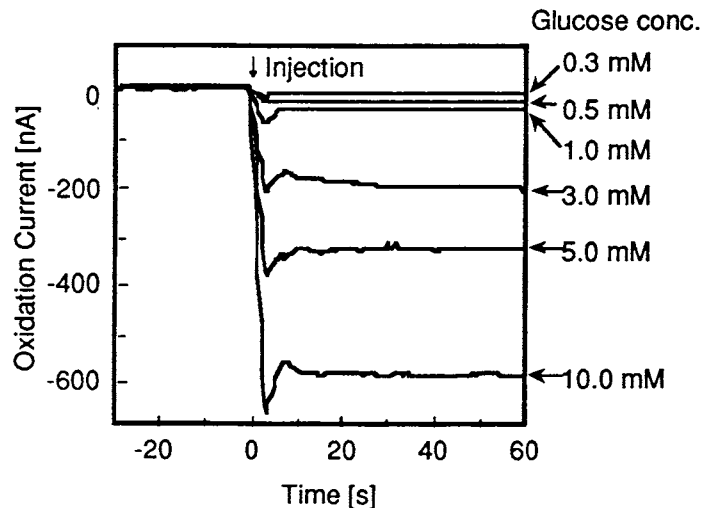


図4 グルコース酸化電流の経時変化と濃度依存性

酸化電流値はグルコース濃度に比例して増大する。また、図中でグルコース濃度が5 μ M以下では、検出される酸化電流値とバックグラウンド電流にみられるノイズとの区別が不可能であった。したがって、グルコース濃度の検出限界は5 μ Mである。

さらに、グルコース溶液を連続で流した場合の検出電流値の変化を図6に示す。クエン酸緩衝液(グルコース濃度0M)を灌流し、電流値が安定したことを確認した後、時間が1000秒のところで1mM、2000秒の時点で3mM、3000秒の時点で10mMのグルコース溶液を灌流した。グルコース溶液(またはクエン酸緩衝液)の灌流速度は6 (ml/min)である。

図が示すようにセンサの検出電流の経時変化はセンサ検出部溶液のグルコース濃度変化に対応しており、濃度依存性が確認できる。また、約350秒の潜時をおいて一定の酸化電流値を示したことから、この値をそれに対応するグルコース濃度に対してプロットしたものを図7に示す。同じ電極を使用し、同様の実験を6回行ったが再現性はよく、センサの感度の低下は認められなかった。

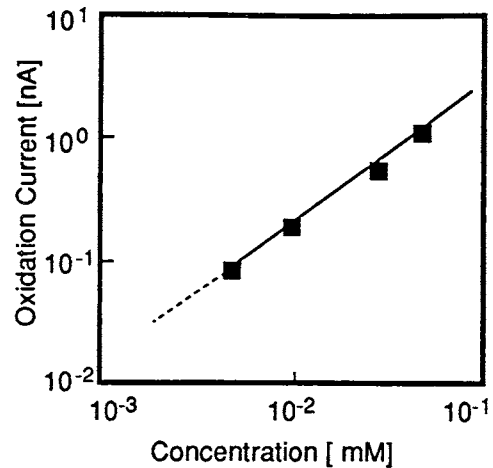


図5 グルコースの検出限界濃度

7. グルコースセンサの溶存酸素依存性

図1に示す反応式のように、GOD酸化反応は酸素を必要とする。さらに反応により生成する過酸化水素はグルコース濃度に比例するとともに、溶液中の溶存酸素濃度にも比例する。このようにグルコースセンサを使用する場合、溶存酸素の存在が絶対条件となる。したがって溶存酸素が不足すれば、センサの感度の低下が起こると考えられる。したがって以下にグルコースセンサの溶存酸素依存性を検討した。

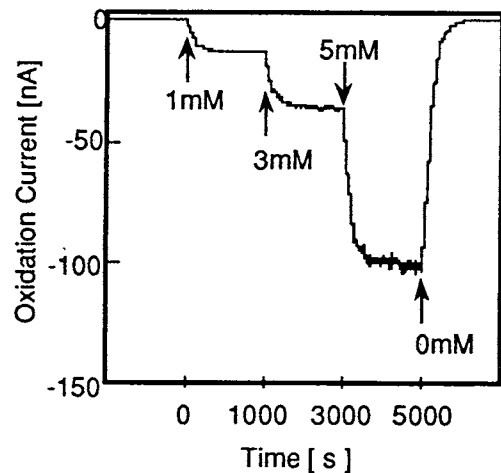


図6 グルコース溶液を灌流させた場合の酸化電流の経時変化

あらかじめ窒素ガスをバブリングすることにより溶存酸素濃度を低下させておいたクエン酸緩衝液と、対照として窒素をバブリングしなかったクエン酸溶液とを、同じグルコース濃度、同じ電極で比較した。図8に示すように、あらかじめ窒素ガスをバブリングして溶存酸素を低下させておいたクエン酸緩衝液中では、対照と比較して検出電流値が明らかに低下しており、グルコースセンサの感度には溶存酸素依存性のあることが認められる。

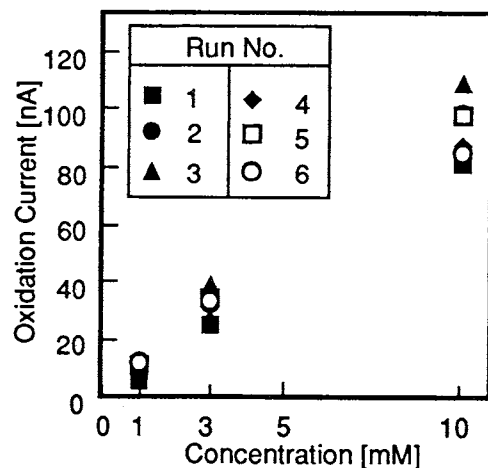


図7 グルコースセンサーの再現性

また、グルコース溶液を0.1~50mMの濃度範囲で灌流し、それぞれのグルコース濃度に

対してその検出電流値を調べた結果を図9に示す。図から明らかなようにグルコース濃度が5mMまでの範囲では検出電流値はグルコース濃度に比例するが、濃度が5mM以上の範囲では直線性が認められなくなる。これは図1で示した反応式により説明できる。すなわち、図1の反応式で検出電流はグルコース濃度に比例することを述べたが、溶存酸素量が限られているために5mM以上の高濃度域のグルコースを酸化するためには、溶存酸素が不足していたことが原因と考えられる。

8. メディエーターの導入

酵素による酸化還元反応は、基質と酵素間の電子の授受によるものである。分子にはそれぞれ酸化剤として働くもの、還元剤として働くものがある。酸化剤として働くものとは相手からいくつかの電子を受け取ることにより、相手を酸化させる性質があり、還元剤として働くものは相手にいくつかの電子を与えることにより、相手を還元する性質を持つ。前者を酸化型、後者を還元型とよぶ。

電極表面に固定化されたGODの場合、酸化型の場合にその活性を示す。酸化型のGODは、基質であるグルコースから電子を受け取ることによってグルコースを酸化する。またこの酸化反応により、自身は還元型に移行する。

これまでの電極では、活性を示さなくなった還元型のGODは、溶液中に存在する酸素が電子受容体として作用することにより、もとの酸化型に戻ることができる。式(3)にその化学反応式を示す。

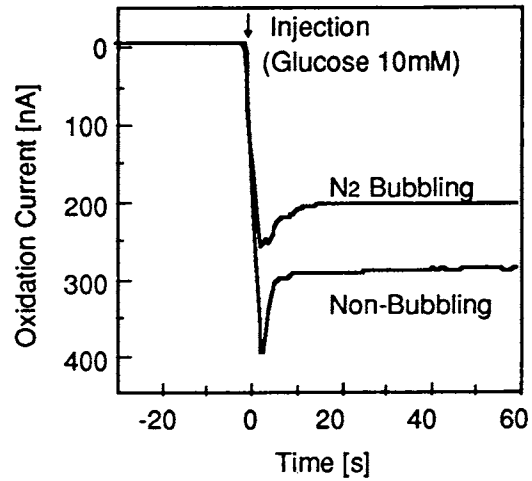
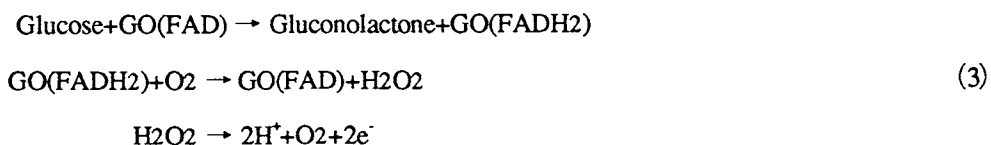


図8 グルコース酸化電流値に対する溶存酸素の影響

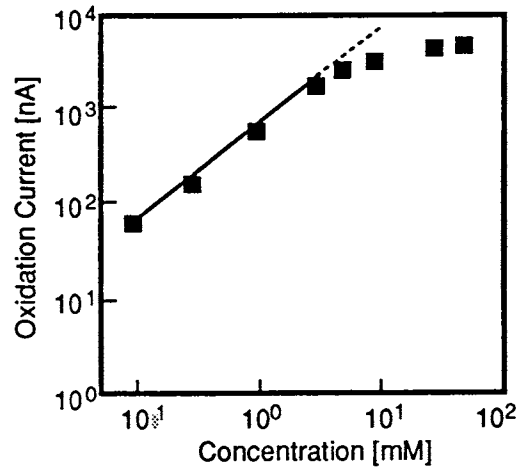


図9 グルコース濃度と酸化電流値の関係

式中でGO(FAD)、GO(FADH₂)はそれぞれ酸化型GOD、還元型GODを表す。また図10(a)にその模式図を示す。酸素の作用により、GODが本来の活性を取り戻す際、過酸化水素が発生する。これを電極表面で酸化することにより得られる酸化電流値を計測することにより、グルコース濃度を定量するのが従来のセンサの原理である。したがって、溶存酸素が不足している場合、GODはもとの酸化型に戻ることができず、その感度が低下すると考えられる。しかし電極と酵素との間に電子を間接的に授受する物質を介在させることにより、溶存酸素のない状態でも反応により活性を失ったGODをもとの酸化型に戻すことができる。このような物質をメディエーターとよぶ。メディエーターは分子量の小さな有機物、または無機物である。このメディエーターを用いた電極表面の酸化還元反応を式(4)に示す。

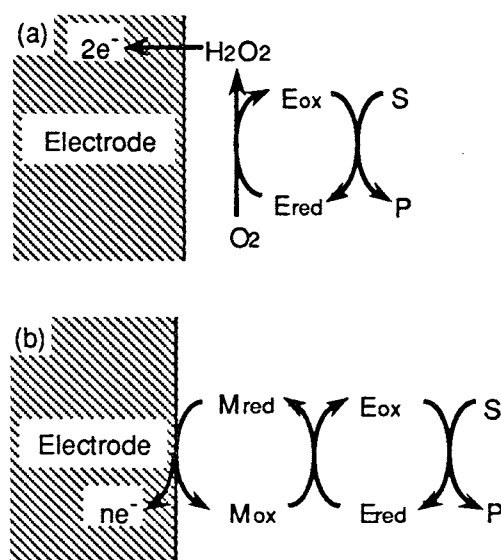
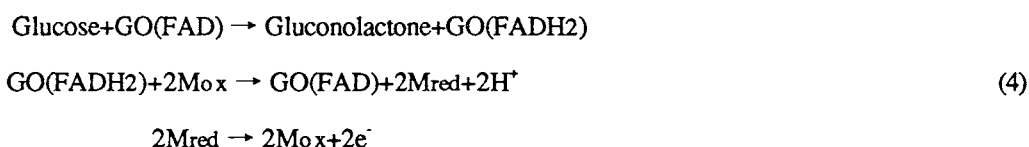


図10 電極表面での酵素の反応機構



上式で、Mox、Mredはそれぞれ酸化型、還元型のメディエーターを表す。また、図10(b)にこの反応の電極表面での反応様式を表す。電子を受け取り、活性を失ったGODは、電極表面に介在し、GODの活性部位と結合するメディエーターに電子を放出することにより、活性のある酸化型に戻ることができる。メディエーターはこの反応で電子を受け取ることで酸化型から還元型になるが、電極表面に電子を放出することで酸化型に戻ることができる。したがってメディエーターを用いる場合、溶存酸素が存在しない状態でもセンサの感度が維持できると考えられる。

9. フェロセン

本研究では、メディエーターとして Ferrocene Carboxialdehyde を使用した。フェロセンをグルタルアルデヒドの変わりに電極表面に固定化し、電極とGODとの間のメディエーターとして用いた場合の溶存酸素の濃度依存性を検討した。GODの固定化では、チラミンを電解重合した電極を飽和フェロセン溶液(0.2~0.3%)中に3時間放置し、さらに

GOD溶液 (10mg/ml) 中に24時間放置した。図11にフェロセンをグルタルアルデヒドの代わりに反応させた電極を使用した場合の検出電流値の経時変化を示す。図に示すように、最初クエン酸緩衝液を灌流し、検出電流値が一定であることを確認した後500秒、1000秒、1500秒、2000秒の時点でそれぞれ、0.1mM、0.3mM、1.0mM、3.0mMのグルコース溶液を灌流した。図が示すようにフェロセンを重合した電極の場合もグルタルアルデヒドの場合と同様にグルコース濃度変化に対応している。

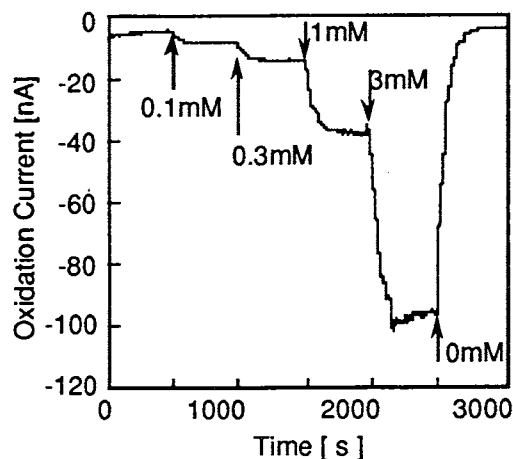


図11 フェロセンを電子メディエータとするグルコースセンサのグルコース応答と経時変化

また、図12に酸化電流値とグルコース濃度との関係を示すが、フェロセン電極は、グルコース濃度が高濃度域に達しても濃度-酸化電流値間の直線関係を維持しているのが分かる。これはフェロセンがメディエーターとして、GODと電極間に介在し、電子の授受を行うことにより酵素反応を円滑に進行させていることを示す。

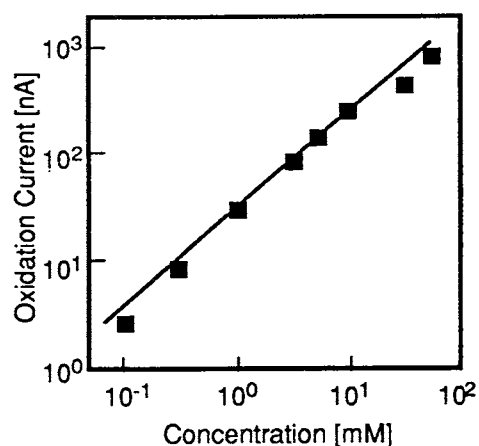


図12 フェロセンを電子メディエータとして用いた場合のグルコース濃度と酸化電流の直線関係

まとめ

- (1) 電極表面にチラミンを電解重合後、グルタルアルデヒドを用いてGODを固定化する方法は、センサの基質選択性、グルコース濃度依存性から有効な方法である。
- (2) 酵素反応に必要な溶存酸素が不足している場合、グルコースセンサの感度が低下する。しかし、フェロセンを電子メディエーターとして電極とGODとの間に介在させることで、グルコース濃度の高い（溶存酸素の影響を受ける）領域でもセンサの感度を維持することができる。

II. 水晶振動子マイクロバランス免疫センサ

これまで、生体内の各種微量成分の検出は抗原と抗体との結合能を利用した測定法—イムノアッセイ—によって行われ、病因の解明および治療、正常値の設定などに重要な情報を与えてきた。イムノアッセイの中でもラジオイムノアッセイとよばれる方法が多く用いられてきた。しかし、ラジオイムノアッセイではアイソトープを標識剤として用いるため費用もかかり安全性にも問題がある。そのため、アイソトープを使わない非放射性イムノアッセイが数多く開発、応用されているが、標識剤として酵素あるいは蛍光プローブを用いているため、操作の複雑さや測定時間の長さなどはラジオイムノアッセイとほとんど変わっていない。

そこで、取扱いが簡単で測定時間の短い免疫センサの開発が必要とされている。また、免疫センサを農薬の検出に応用するなど工学分野への利用も考えられている。この免疫センサの測定原理はいくつか考案されているが、本研究では水晶振動子マイクロバランスをトランスデューサーとして用いる免疫センサの開発について検討する。

水晶振動子はクォーツ時計にも使用されているように、非常に正確な高周波を発生させるものである。この水晶振動子の歴史はおよそ100年前のピエゾ圧電効果の発見により始まる。以来、水晶振動子はその正確な振動数を利用して各種測定機器の周波数制御に用いられてきた。

ところが、1959年、Sauerbreyによって水晶振動子の電極の質量変化と基本振動数との関係について報告された。この報告以来、水晶振動子をマイクロバランス（微量天秤）として利用しマイクログラム、場合によってはナノグラムオーダーでの微量成分の検出、定量が試みられてきた。電極表面に薄膜などを塗布することにより特定の物質の検出が可能で、空気中のガス成分や水溶液中のイオンなどの高感度検出に成功している。本研究では電極表面に抗体を固定化することにより抗原を特異的に検出、定量したい。

以下、水晶振動子マイクロバランス免疫センサを開発するために、次の3点について考察、検討する。

- (1) 水晶振動子のマイクロバランスとしての基本的な性質
- (2) 水晶振動子電極表面上への抗体の効果的な固定化の方法
- (3) 作製した免疫センサの応答特性

1. 水晶振動子作動原理

AT-cutあるいはBT-cut水晶結晶のような圧電結晶の両面に電極をデポジットし電圧を加えると結晶がゆがむ。ここで電圧を取り除くと結晶のゆがみが元に戻るため再び両電極間に電位差が生じる。この電位差は結晶に新たなゆがみを引き起こす。したがって、ここに一定周期での振動が生まれる。しかしこのままではこの振動は結晶内の摩擦により減衰し、やがて消滅してしまう。そこで、水晶振動子にはこの減衰を防ぐために両極間の電位差を検出、フィードバックし適当な電圧を加えるための発振回路が接続されており半永久的な一定の周期の振動が得られるようになっている（図1）。

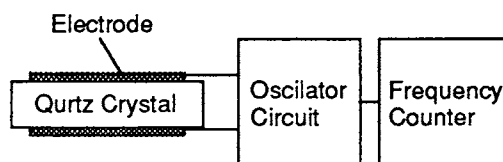


図1 水晶振動子模式図

2. Sauerbreyの式

AT-cutおよびBT-cutの水晶振動子は厚みすべり振動を行う。このときの基本振動数は

$$F = \frac{V_p}{2d} = \frac{N}{d} \quad (1)$$

F :基本振動数 [Hz] V_p :水晶結晶中の横波伝播速度 [m/s]
 d :水晶結晶厚み [m] N :振動数定数 [Hz m]

と表される。式中の振動数定数は結晶に固有の値でAT-cut水晶結晶では1670 [Hz m]、BT-cutでは2500 [Hz m]である。この水晶振動子の厚さが Δd だけ変化したときに振動数が ΔF だけ変化するとすると式(1)より

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta d}{d} \quad (2)$$

また

$$\Delta d = \frac{\Delta M}{A\rho} \quad (3)$$

ΔM :水晶振動子質量増加 [kg] A :電極表面積 [m^2]
 ρ :水晶密度 [kg/m^3] (=2650 kg/m^3)

であるから結局

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta M}{dA\rho} \quad (4)$$

となる。式(4)は水晶振動子の厚みの変化すなわち質量の変化による基本振動数の変化を表している。ところがSauerbreyはこの式を水晶振動子表面上に一樣に付着した物質質量に対しても成り立つとして

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta m}{dA\rho} \quad (5)$$

Δm :付着物質質量 [kg]

を得た。式(5)より振動数変化は質量に比例し、その比例定数は基本振動数が大きいほどまた電極面積が小さいほど大きくなることがわかる。At-cutの水晶結晶の場合、10MHz程度の基本振動数で電極直径が数mmならばナノグラムオーダーの測定が可能なマイクロバランスになる。

3. 液相での水晶振動子の振動

免疫センサーは液相での使用を想定しているので水晶振動子の液相中での振動状態の変化を知らなければいけない。水晶振動子が発見された当初は液体中では振動しないとされていた。しかし現在では発振回路の工夫などによって液体中での振動が確認されている。

この液相中での振動数変化について金沢らが結晶中横波と流体中の減衰横波を組み合わせたモデルより

$$\Delta F = -F^{\frac{3}{2}} \left(\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_Q \rho_Q} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

ΔF : 振動数変化 [Hz]
 η_L : 液体の粘度 [Pa s]
 μ_Q : 水晶の弾性率 [Pa]

F : 空気中での振動数変化 [Hz]
 ρ_L : 液体の密度 [kg/m^3]
 ρ_Q : 水晶密度 [kg/m^3]

を導いており、また実験によりこれを例証している。

4. 水晶振動子マイクロバランス免疫センサ

水晶振動子が Sauerbrey の式にしたがうならばこの水晶振動子は高感度の微量天秤として使用することができる。これを水晶振動子マイクロバランスとよぶ。水晶振動子の電極表面上にあらかじめなんらかの方法で抗体を固定化しておく。この水晶振動子マイクロバランスを検体中におき、このとき電極上で抗原と抗体の結合がおこったならば電極の質量が増加する。この質量増加を振動数の減少として測定することが可能である (図2)。

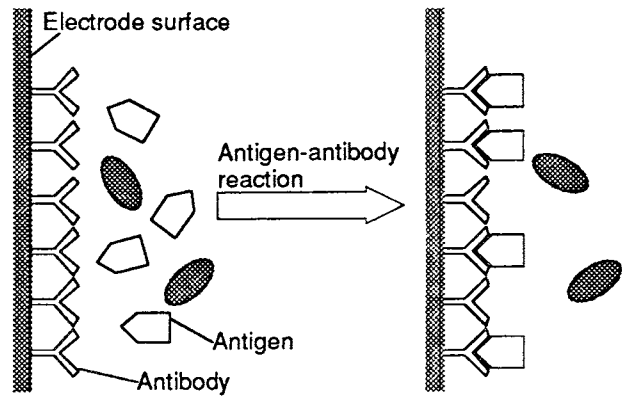


図2 水晶振動子マイクロバランス免疫センサ作動原理

5. 抗体の固定化 (グルタルアルデヒド法)

水晶振動子の電極が金などの金属の場合、タンパク質である抗体は電極上にある程度自然吸着する。しかし、本研究ではより効果的に抗体を固定化するためにグルタルアルデヒド法とよばれる方法を用いる。この方法はまず電極表面にアミノ基を導入し、このアミノ基にグルタルアルデヒドを反応させる。このときアミノ基とアルデヒド基とのあいだにシッフ塩基が形成される。この電極に抗体 (タンパク質) を反応させると未反応のアルデヒド基と抗体のアミノ基とのあいだにもシッフ塩基が形成されるので抗体は自然吸着させるよりもより効果的に電極上に固定化される (図3)。

なお図3は金電極水晶振動子にチラミンを用いてアミノ基を導入する場合について示している。

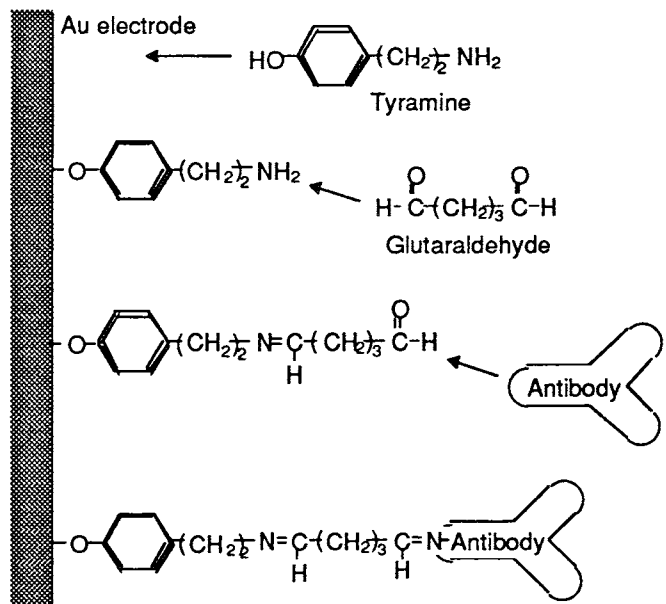


図3 金電極表面への抗体の固定化

6. 水晶振動子電極付着質量と振動数変化の関係

図4に本実験の振動数の変化の様子の一例を示す。図の (a)、(b)、(c) で蒸留水および試料液を適下している。この図からもわかるように蒸留水のみを滴下した場合にも振動数の変化 (ΔF_0 および ΔF_1) がある。これは蒸留水中にもわずかではあるが不純物が含まれていることを示している。そこで本実験では蒸留水中の不純物による影響を式 (7) により考慮して付着した NaCl 質量による振動数の変化

(ΔF_{NaCl}) を求めた。

$$\Delta F_{\text{NaCl}} = \Delta F - \frac{\Delta F_0 + \Delta F_0'}{2} \quad (7)$$

NaCl水溶液 (10ng/ μ l) 1 μ lが蒸発すると10ngの残留物が電極上に付着する。他の濃度も同様である。これら蒸発残留物に対する振動数変化を上の方法で求め質量に対しプロットしたものが図5である。

図5から電極上の付着物質量 (10-100ng) と振動数変化との間には有意な直線関係が得られることがわかる。この直線の傾きは1.0Hz/ngとなる。式 (5) に必要な定数を代入して計算すると、

$$\Delta F[\text{Hz}] = -1.1[\text{Hz/ng}] \times \Delta m[\text{ng}]$$

となり、1.0ngの質量変化に対して1.1Hzの振動数変化が得られることになる。ところで、図の直線は原点をとっていない。これは質量の付着が電極の一部に限られていることが影響しているものと考えられる。しかし、このことは免疫センサを使用する場合には電極上にすでに抗体を付着させているので考慮する必要はない。

以上のことより水晶振動子をマイクロバランスとして利用できることが確認される。

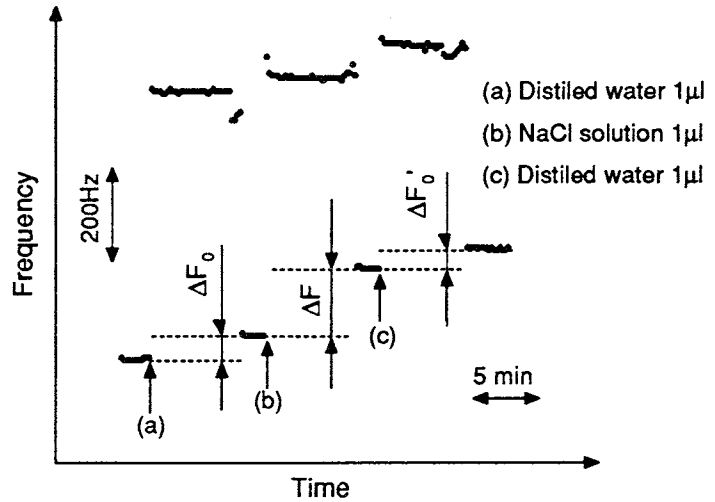


図4 質量の付着による振動数変化

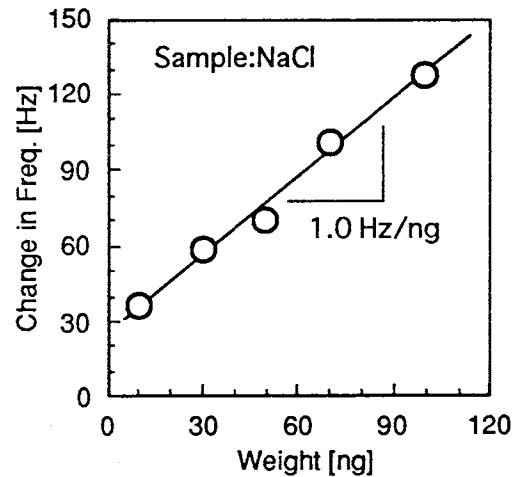


図5 質量増加と振動数変化の関係

7. 液相での振動数変化

a) 密度および粘度の影響

シヨ糖溶液の濃度を变化させると溶液の密度と粘度が変化する。シヨ糖溶液の濃度に対して振動数変化をプロットしたものを図6に示す。このグラフよりシヨ糖濃度が変化するると水晶振動子の振動数が変化することがわかる。図の振動数変化が式 (6) から得られる値よりかなり小さくなっているのは、式 (6) が静止流体中でのモデルより求められているのに対し本実験では溶液の攪拌をおこなったためと考えられる。

b) 溶液の温度と振動数

溶液の温度が変化するると溶液の密度と粘度は変化する。図7は液温と振動数の関係を示している。この図と式 (6) とは傾向が一致せずこの振動数の変化に密度、粘度よりも溶液の温度が大きく影響を与えていることになる。

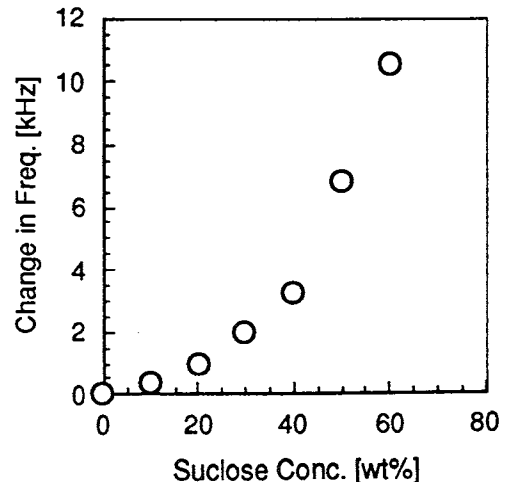


図6 シヨ糖溶液濃度と振動数変化の関係

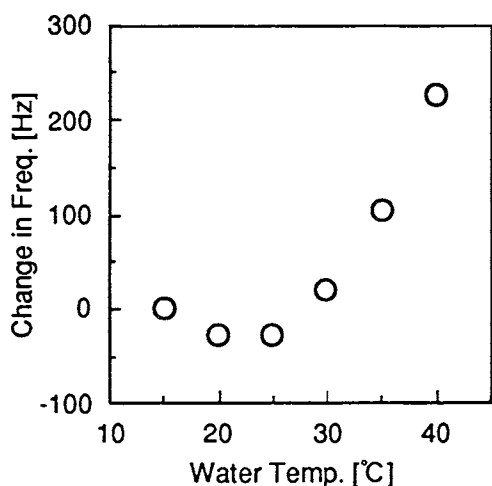


図7 溶液の温度と振動数変化の関係

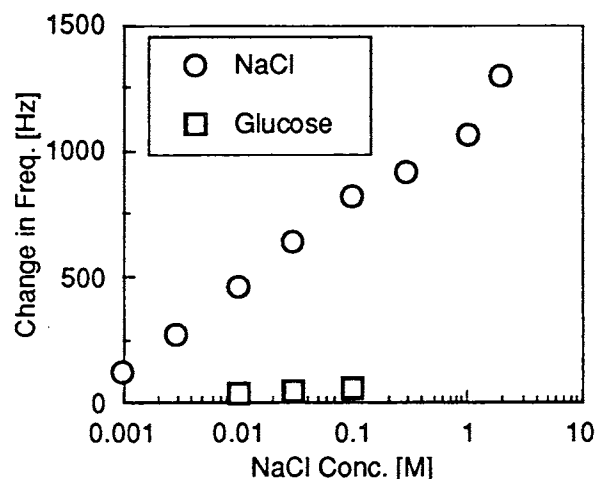


図8 塩濃度と振動数変化の関係

c) 塩濃度と振動数

図8はNaCl濃度と振動数変化の関係を表すグラフである。図の中でNaCl濃度相当グルコース溶液に対する振動数変化も同時にプロットしている。0.1MNaCl濃度相当グルコース溶液は58.4mg/mlで密度は等しいが、図よりNaCl溶液の方が振動数の変化はるかに大きく電極表面上への吸着がおこっている可能性がある。このことはショ糖溶液に水晶振動子を浸した場合、素子の洗浄後振動数が短時間で容易に基本振動数に回復するが、NaCl溶液の場合は容易には基本振動数に戻らないことからこの可能性が示唆される。

d) pH と振動数

水晶振動子の振動数は溶液のpHによっても有意に影響を受ける（図9）。この場合も溶液中に多数のイオンが存在し電極表面に吸着するためと考えられる。

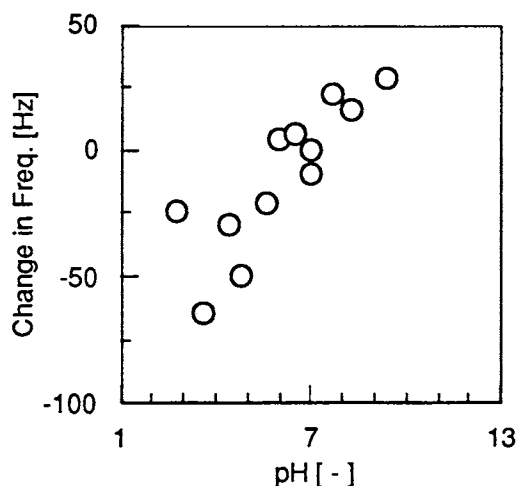


図9 溶液pHと振動数変化の関係

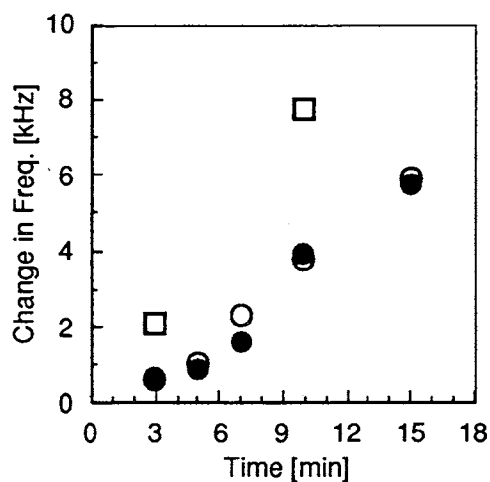


図10 チラミン重合時間と重合量の関係

8. 電極表面へのタンパクの固定化

a) チラミンの重合

電解重合の時間とチラミンの重合量の関係を図10に示す。縦軸の振動数変化がチラミンの重合量を表す。ロットナンバーの異なる素子による結果を合わせて示してある。どちらの場合も時間とともにチラミンの重合量は増加している。以後の実験に使った水晶振動子は振動数変化の大きい方（□）である。

なお、チラミンの重合時間は振動数の変化が2000Hz程度になるように3分間とした。

b) ウシ血清アルブミン (BSA) の固定化

この実験は金およびパラジウム電極を用いてグルタルアルデヒド法と自然吸着とを比較した。グルタルアルデヒド法において両電極に結合するグルタルアルデヒドの量が等しくなるように各電極の処理条件は次のように決定した。

金電極

チラミン重合時間 : 3 [min]
 グルタルアルデヒド反応時間 : 3 [h]

パラジウム電極

電解酸化時間 : 3 [min]
 APTES反応時間 : 1 [h]
 グルタルアルデヒド反応時間 : 3 [h]

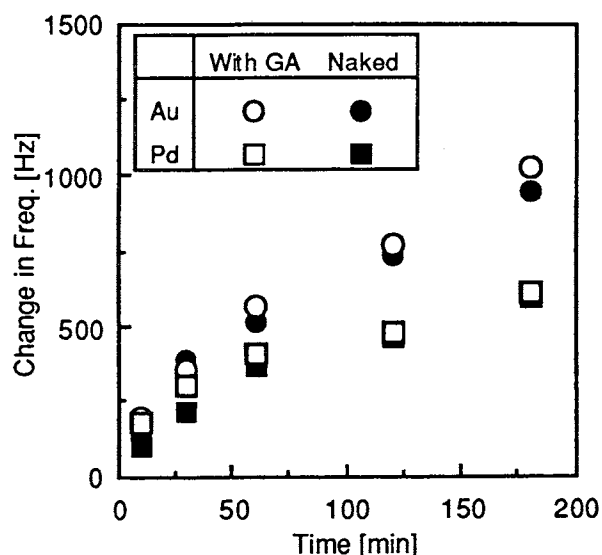


図11 BSA反応時間と固定化量の関係

上記方法で処理した電極と無処理の電極について BSA 固定化時間と固定化量の関係を図11に示す。図中縦軸の振動数変化はBSAの固定化量に対応している。

いずれの場合も時間の増加とともに BSA の固定化量は増加している。また、金、パラジウムどちらの場合もグルタルアルデヒドを反応させた電極の方が多くの BSA が固定化されている。以上の結果より、本研究で行なったチラミンの電解重合およびグルタルアルデヒド反応による固定化法によってタンパク質を電極表面に十分固定化できることが判明した。したがって、以下本法を用いて免疫センサーの作製を試みた。

9. 免疫センサーの応答特性

a) 免疫センサーの再生と耐久性

前述の方法によってヤギ抗ヒト免疫グロブリン G を重合させた水晶振動子マイクロバランスを用いヒト免疫グロブリン G の検出を検討した。この際一度 IgG と反応した免疫センサーの再生には 0.1M グリシン-塩酸緩衝液中で洗浄することにより行う。表1は免疫センサーを再生しながら繰り返し IgG と反応させたときの振動数変化である。実験ごとに多少応答にばらつきがあるものの 5 回以上、8 時間以上にわたって使用できることが明らかになった。

表1 免疫センサーによる抗原抗体反応の検出

Run no.	Ex.1	Ex.2
1	245[Hz]	230[Hz]
2	160	185
3	110	265
4	185	205
5	220	205
6		170
7		125
Mean±SD	184.0±52.7	188.6±33.7

b) 免疫センサーの応答特性

各種濃度の IgG 溶液 (0.01, 0.03, 0.05mg/ml) に対する免疫センサーの振動数変化を調べた。図11にこのときの振動数変化の例を示す。BSA を注入しても振動数の変化がないことから IgG 溶液に対する振動数

変化はIgGと抗IgGによる抗原と抗体の特異的結合によるものであり、非特異的タンパク質結合によるものではない。

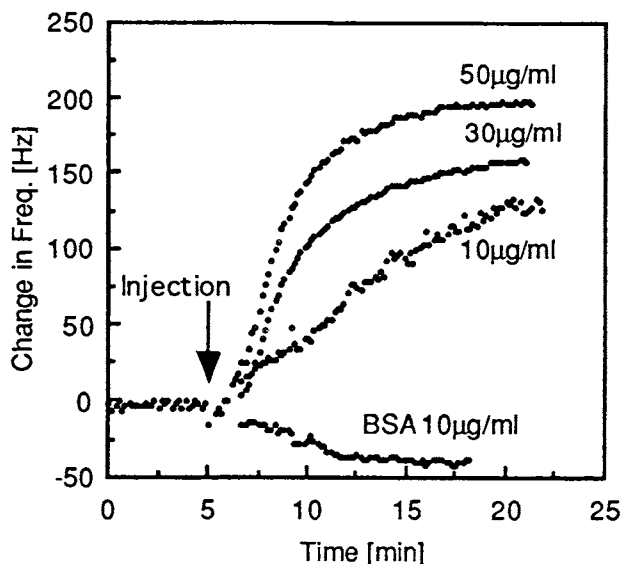


図12 免疫センサ応答のIgG濃度依存性

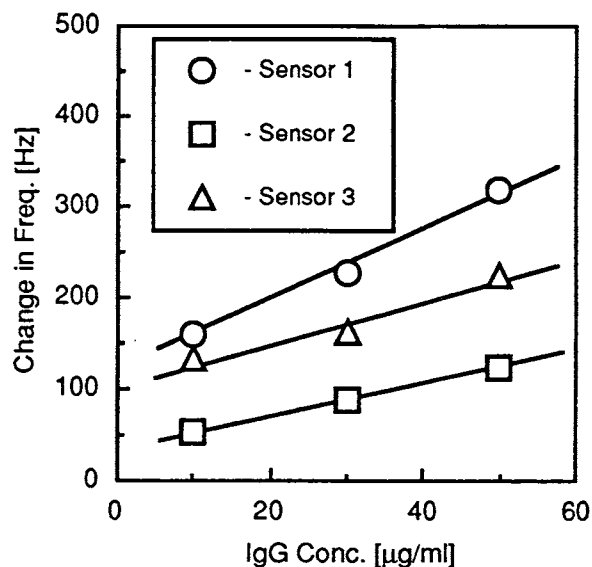


図13 免疫センサ応答とIgG濃度の関係

図12はIgGの濃度と振動数変化の関係を示している。IgGの濃度が増加すると振動数変化も増加し、両者の間には有意の相関がある。しかし、振動数変化は各素子によって異なり、また同じ素子を用いても実験によっては異なる値が得られる場合がある。この理由として次のことが考えられる。

- 1) 素子ごとの抗IgGの固定化量が一定していない。
- 2) 素子の位置（水面からの深さ）が異なる。
- 3) IgGを注入する際の外的因子の影響。

これらの結果についてはさらに実験を行い、くわしく検討する必要がある。

まとめ

- 1) 水晶振動子をマイクロバランスとして利用できることが確認できた。また、その感度は1Hz/ngと極めて高い。
- 2) 水晶振動子マイクロバランスを液相で使用する際は液体の密度、粘度、温度などの物性値を一定にする必要がある。
- 3) 電極表面にアミノ基を導入後、グルタルアルデヒドを用い抗体のアミノ基との間にシッフ塩基形成反応を行わせることで抗体を電極表面に固定化できる。また、金電極の場合はチラミンの電解重合によってアミノ基を導入できる。
- 4) 水晶振動子マイクロバランス免疫センサーを用いての抗原-抗体反応の検出が可能となった。
- 5) 抗原濃度と免疫センサーの応答には有意な相関が認められる。しかし、素子ごとのばらつきが認められるので、測定ごとに検量線を作成する必要がある。