Bio-affinity Chemical Sensors for in Vivo Monitoring of Bio-active Substances

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: Shimizu, Nobuaki
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034826

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

KAKEN
2000
66
金沢大学

バイオアフィニティを利用する多機能バイオセンシングシステムの開発

（研究課題番号：１０５５７００６）

平成１０年度～平成１２年度科学研究費補助金基盤研究 B(1)
研究成果報告書

平成１３年３月

研究代表者　清水 宣明
（金沢大学・工学部・教授）

金沢大学附属図書館
8000-96493-7

はしがき

本報告書は平成１０年度～平成１２年度、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B(1)「バイオアフィニティを利用する多機能バイオセンシングシステムの開発」（課題番号１０５５７００６）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当り関係各位から多大の援助、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・工学部・教授）
研究分担者：林 良茂（金沢大学・工学部・教授）
研究分担者：川西 琢也（金沢大学・自然科学研究科・助教授）

研究分担者：高木 厚司（九州大学・医学系研究科・助手）
研究分担者：中村 静夫（石川県工業試験場・化学食品部・研究主幹）
研究分担者：山本 勝信（ビー・エー・エス（株）・
アプリケーションサポート部・部長）

研究経費

平成１０年度	６,３００千円
平成１１年度	３,９００千円
平成１２年度	２,６００千円
計	１２,８００千円

研究発表

Ⅰ．学会誌等

原著論文

1) Hori, T., Katafuchi, T., Take, S. & Shimizu, N. Neuroimmunomodulatory actions of hypothalamic interferon-α. Neuroimmunomodulation, 5, 172-177, 1998.

2) Hayashi, Y., Sugiyama, S., Kawanishi, T. & Shimizu, N. Kinetics of sorption and permeation of water in glassy polyimide. J. Membrane Sci., 156, 11-16, 1999.

3) Hossain, M.J., Takeyama, T., Hayashi, Y., Kawanishi, Y. & Shimizu, N. Enzymatic activity of chromobacterium viscosum pase in AOT/Twee85 mixed reverse micellar system. J. Chem. Tech. Biotechnol., 74, 423-428, 1999.

4) Hayashi, Y., Yuzaki, S., Kawanishi, T., & Shimizu, N. An efficient ethanol concentration process by vapor permeation through asymmetric polyimide membrane. J. Membrane Sci., 177, 233-239, 2000.

5) Shimizu, N., Hori, T., Ogino, C. et al. The 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, attenuates stress-induced anorexia in conjunction with the suppression of hypothalamic serotonin release in rats. Brain Res., 887(1), 178-182, 2000.

6) Ogino, C., Negi, Y., Daido, H., Shimizu, N. et al. Identification of novel membrane-bound phospholipase D from *streptoverticillium cinnamoneum*, possessing only hydrolytic activity. Biochimica et Biophysica Acta, 1530, 23-31, 2001.

7) Shimizu, N., Ogino, C., Kawanishi, T., Hayashi, Y. Fractal analysis of Daphnia motion for acute toxicity bioassay. Environ. Toxicol. Water Qual., 2001 in press.

Ⅱ．口頭発表

1）竹山 友潔、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也、Hossain, M.J.、水田 信行　逆相ミセル系における酵素反応特性．化学工学会富山大会，1998.

2）森川 規司、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也、矢野 完侍　常圧下での微粒子沈着 CVD 法による安定化ジルコニア膜の合成．化学工学会富山大会，1998.

3）久湊 達也、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也、田中 高志、川野 瑞江、高橋 里佳　休耕田転換人工湿地における物質収支解析．化学工学会富山大会，1998.

4）村田 豊、清水 宣明、林 良茂、川西 琢也、浜谷 希人　アセチルコリンエステラーゼ（ACh)を用いた農薬検出バイオセンサの開発．化学工学会富山大会，1998.

5）三宅 亮、清水 宣明、林 良茂、川西 琢也、中谷 美鈴　ミジンコの動画像解析による水環境汚染物質バイオアッセイ．化学工学会富山大会，1998.

6）原谷 昌浩、清水 宣明、林 良茂、川西 琢也、渡辺 仁　マクロファージの貪食能を指標とする水環境汚染物質のバイオアッセイ．化学工学会富山大会, 1998.

7）Dadang, S.、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也　電気分解を利用した硝酸態窒素除去法に関する基礎的研究．化学工学会富山大会, 1998.

8）池野 慎也、清水 宣明、林 良茂、川西 琢也、山上 晃　電気化学検出法による酵母細胞の活性測定．化学工学会富山大会, 1998.

9）川西 琢也、林 良茂、清水 宣明　土壌中二相、三相流における気掖、液々界面面積のネットワークモデルによる推算．　第３３回日本水環境学会, 1999.

１０）清水 宣明、川西 琢也、林 良茂、三宅 亮　ミジンコ動画像のフラクタル解析による有害化学物質バイオアッセイ．第３３回日本水環境学会, 1999.

１１）長沖 未来子、清水 宣明、川西 琢也、林 良茂、村田 豊　酵素活性を指標とした環境計測バイオセンサの開発．第３３回日本水環境学会, 1999.

１２）清水 宣明　バイオアフィニティを利用する化学センサ．シンポジウム「新しい統合生理学研究法の開発応用とその有用性」招待講演．第７６回日本生理学会, 1999.

１３）南部 祐司、川西 琢也、林 良茂、清水 宣明　マクロファージの貪食能を指標とする有害化学物質のバイオアッセイ．化学工学会３２回秋季大会, 1999.

１４）原谷 昌浩、川西 琢也、林 良茂、清水 宣明　含水多孔質体中気相拡散係数のネットワークモデリングによる推算．化学工学会３２回秋季大会, 1999.

１５）川西 琢也、清水 宣明、林 良茂　土壌中気液界面面積の推算：界面面積と含水率・毛管圧との関係について．化学工学会３２回秋季大会, 1999.

１６）池野 慎也、川西 琢也、林 良茂、清水 宣明　フラビンにより誘発される酵母細胞の過酸化水素生成メカニズム．化学工学会３２回秋季大会, 1999.

１７）姚 文政、T.M.M. Rahman、林 良茂、清水 宣明、呉 金川、川西 琢也　AOT/イソオクタン系逆相ミセルにおける小分子量 MPEG 保護された酵素反応特性（C.V.リパーゼーオリーブオイル系加水分解反応）．化学工学会３２ 回秋季大会, 1999.

１８）浜谷 希人、竹山 友潔、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也　逆相ミセル系を酵素反応場とした加水分解反応機構の調査—C.V.リパーゼ・オリーブオイル系加水分解—．化学工学会 32 回秋季大会, 1999.

１９）前田 信吾、森川 規司、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也　常圧 CVD におけるイットリア安定化ジルコニア膜の合成．化学工学会３２回秋季大会, 1999.

２０）南 賢宏、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也　蒸気透過膜による水溶性有機溶剤の回収．化学工学会３２回秋季大会, 1999.

２１）N. Shimizu　Bio-affinity chemical sensors for in vivo monitoring.　Jpn. J. Physiol., 49(Suppl.), S23, 1999.

２２）川西 琢也、藤井 啓之、清水 宣明、荻野 千秋、林 良茂　土壌中気液二相流における有効界面面積の測定．化学工学会 33 回秋季大会, 2000.

２３）　島田 泰行、荻野 千秋、川西 琢也、林 良茂、清水 宣明　蛍光標識ブドウ糖の細胞内取り込み活性を指標とする有害物質毒性評価．化学工学会 33 回秋季大会, 2000.

２４）　Dadang Suhendar、川西 琢也、清水 宣明、荻野 千秋、林 良茂　炭素電極を用いた電気分解水素による硝酸態窒素除去速度の解析．化学工学会 33 回秋季大会, 2000.

２５）　荒木 貴司、川崎 式子、林 良茂、清水 宣明、川西 琢也、荻野 千秋　動物細胞の活性を指標とした環境水中の化学物質の毒性評価．化学工学会 33 回秋季大会, 2000.

２６）　高木 厚司、清水 宣明　電磁誘導エネルギーを利用した新しい水浄化法（磁場触媒法）．　第３５回日本水環境学会，2001.

２７）　大村 有香、畑中 祐樹、荻野 千秋、川西 琢也、林 良茂、清水 宣明　リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ D の触媒機構及び活性化機構の解析．　化学工学会第６６年会，2001.

２８）　池野 慎也、荻野 千秋、川西 琢也、林 良茂、清水 宣明　レポータ遺伝子組み換え微生物を用いる水質評価法の構築．　化学工学会第６６年会，2001.

研究成果

1．研究目的

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、（1） 無麻酔・無拘束の動物において、ある特定の行動時に作動する神経回路で、どの様な生理活性物質がどのように作用しているかを定裏的かつ経時的に分析する手法や機器を開発し、（2） それをシステム化することにある。この目的のため、無麻酔・無拘束の動物の行動時に大脳の特定部位から神経伝達物質などの動態を同時に測定する高機能バイオセンシングシステムを開発する。生体内には酵素、抗体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機能バイオセンシングシステムを構築できる。
さらに特異的選択性を有する複数の微小バイオセンサを一体化し高感度多機能バイオセンサへと発展させ、行動発現に至る神経生理学的及び神経化学的機能連絡を明らかにするとともに、種々の行動を制御する神経機構を明らかにしたい。

2．研究の概要

2.1 微小透析バイオセンサの開発

2.11 酸化電流値のグルコース濃度依存性

グルコース濃度依存性を調べた結果、酸化電流値はグルコース濃度に比例して増加した。検出限界濃度は 0.01mM であり、また 5mM 以上では直線性が認められなくなった。酵素固定化型の電極と比較して電流値の再現性は優れていた。

2.12 溶存酸素依存性と電子メディエータの導入

グルコースオキシダーゼはその反応過程で酸素を必要とする。したがって低溶存酸素の状態では、センサの感度が低下する可能性がある。予め窒素ガスをバブリングすることで溶存酸素濃度を低下させた場合、感度の低下と応答時間に対する時定数の増加が見られた。フェロセンを電子メディエータとして白金電極とグルコースオキシダーゼの間に介在させ、低溶存酸素領域でもセンサの感度を維持できた。

2.13 pH の影響

酵素には至適 pH があり、センサの識別素子として用いる場合には pH の影響を調べる必要がある。そこでグルコースオキシダーゼ溶液を pH=5.6、試料溶液のグルコ

ース濃度を 1.0 mM に設定し、溶液中のリン酸緩衝液の pH5.6～8.0 まで変化させ、試料溶液中の pH の影響を調べた。その結果、pH5.6 から 7.5 の範囲において試料溶液中の pH の影響を受けないことが明らかとなった。これは、酵素が透析膜によって外液の pH 変化から保護されているためと考えられる。

2.2 水晶振動子マイクロバランス免疫センサ

抗体の固定化法を検討した。これには抗体がもつアミノ基やカルボキシル基等のアミノ酸残基と担体のもつ官能基とを共有結合した。すなわち、水晶振動子の金電極表面にチラミンの電解重合によりアミノ基を導入する。このアミノ基にグルタルアルデヒドを反応させ、アミノ基とアルデヒド基の間にシッフ塩を形成させる。このチラミン・グルタルアルデヒド複合体に抗体（酵素）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にもシッフ塩が形成されるので抗体は効果的かつ安定に電極上に固定できた。ヤギ抗ヒト IgG を固定化し、水晶振動子の基本振動数がヒト IgG 濃度に依存して特異的に変化することが確認できた。

3．バイオセンシングシステム

3.1 バイオアフィニティ

生体が外界の刺激に反応し内部環境の恒常性を維持したり、あるいは適切な行動を起こすには、生体内外の情報を的確に把握しなければならない。このような情報の受容に関与する感覚機能は、生体にとって欠くことのできないものである。環境の変化を最初に検知するのは、第一次感覚ニューロン軸索の末端にある感覚器または受容器と呼ばれるものであり、受容器は圧（触・圧覚）、光（視覚）、音（聴覚）、味（味覚）、ニオイ（嗅覚）などの物理・化学的エネルギーを電気的信号（インパルス）に変換する役目をもっている。一方、中枢神経系においても外界及び体液性化学物質の濃度変化を直接感知する神経細胞が存在し、これらを総称して化学感受性ニューロンとよぶ。
このような生体のもつ優れた分子識別能力を利用あるいは模倣しようという試みが多くなされているが、その一つにバイオセンサに関する研究がある。各種化学センサのうち、バイオセンサは生体のもつ分子認識機構を巧みに利用するセンサであり、生体関連物質を分子認識素子として用いる点に特徴がある。また、素子として用いる生体関連物質によって、酵素センサ、微生物センサ、オルガネラセンサ、免疫センサ等に分類できるが、これらのバイオセンサはいずれも固定化生体関連物質あるいは固定化細胞等を物理化学デバイスと組み合わせたものである。すなわち、バイオセンサは測定対象物質を選択的に識別する素子として固定化生体物質あるいは固定化細胞を用い、物理化学デバイスで電気信号に変換するものである。

3.2 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

3.2.1 はじめに

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。ここでは

(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) 作製したグルコースセンサの基本特性の確認をおこない、その高度化への基礎条件を、検討した。

3.2.2 グルコースセンサ

3.2.2.1 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、(2-1) 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 (2-2) 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。

$$\text{D-Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{D-Glucono-}\delta\text{-Lactone} + H_2O_2 \qquad (2\text{-}1)$$

$$H_2O_2 \rightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^- \qquad (2\text{-}2)$$

その他にも、グルコースオキシダーゼとペルオキシダーゼの2種類の酵素をヨウ化物イオン電極上に固定化してグルコースを定量する方法や、ヘキサシアノ鉄（Ⅲ）酸イオンを用いて、生成するヘキサシアノ鉄（Ⅱ）酸イオンの定電位電解によりグルコースを定量する方法、キノンを電子受容体とするフローシステムなどがある。

3.2.2.2 酵素の固定化

一般に酵素は水溶性であるので、このままの状態では極めて不安定である。さらに酵素を直接電極表面に固定化することは極めて困難であり、しかも固定化を行ったとしても電極表面から容易に脱離してしまう。これらをセンサ素子として繰り返し使用するためには、酵素を何らかの方法により電極表面上に固定化しなければならない。固定化の例としては

以下の方法が報告されている。図 2-1 にその概略を示す。

(1) 共有結合法

酵素が持っているアミノ基やカルボキシル基などのアミノ酸残基と担体の持つ官能基とを共有結合し、固定化する方法である。この方法にはペプチド法、アルキル法、ジアゾ法などがある。二官能性試薬グルタルアルデヒドを酵素と反応させ、Sciff 塩基を形成させる方法は良く採用されている。例えば、ウレアーゼをグルタルアルデヒドを用いてガラスビーズ表面に固定化する方法や、リパーゼをポリスチレン表面に共有結合し pH 電極表面に固定化する方法などがある。

(2) 架橋化法

低分子量の多官能性試薬を用いて酵素分子間に共有結合を導入し、酵素を不溶化することにより、膜状に形成する方法である。グルタルアルデヒドは代表的な架橋化試薬の一つである。例えば、アルコールオキシダーゼとアルブミンの混合溶液をグルタルアルデヒド処理し酸素電極表面に固定化する方法や、L-アミノ酸オキシダーゼをグルタルアルデヒドを用いてアルブミンと架橋化し、酸素電極に固定化する方法などがある。

(3) 包括法

水不溶性の高分子膜を素子表面に装着・固定化し、その高分子繊維中に酵素を包括することにより固定化する方法である。例えば酵素を含むアクリルアミドモノマーを重合して膜状に形成する方法、有機溶媒に可溶化したアセチルセルロース溶液に酵素を分散させて固定化する方法、光硬化性樹脂と酵素の混合溶液に光を照射し、酵素をゲル中に包括する方法などがある。

最近でも、アルコールデヒドロゲナーゼをポリピロール膜に包括して白金電極表面に固定化する方法や、チロシナーゼをシリコンゲル中に包括しグラファイト電極表面に固定化する方法などが報告されている。

(4) 吸着法

水不溶性担体に酵素を吸着させ、電極表面に固定化する方法である。吸着担体としてはイオン交換樹脂や多孔性のセルロース膜、多孔性のポリ塩化ビニル膜などがある。このような担体を酵素溶液中に入れて反応させると酵素が吸着し固定化が可能である。例えばウレアーゼを透析膜で覆うことで二酸化炭素電極に固定化する方法や、ガラクトースオキシダーゼを 2 枚のアセチルセルロース膜に固定化して白金電極に装着する方法などがある。

Updike らはグルコースオキシダーゼをポリアクリルアミドゲル中に包括し、それを酸素電極に装着することによりグルコースセンサを作製し、グルコースの定量を行っている。また、グルコースオキシダーゼをパラホルムアルデヒドと共有結合させ酸素電極テフロン

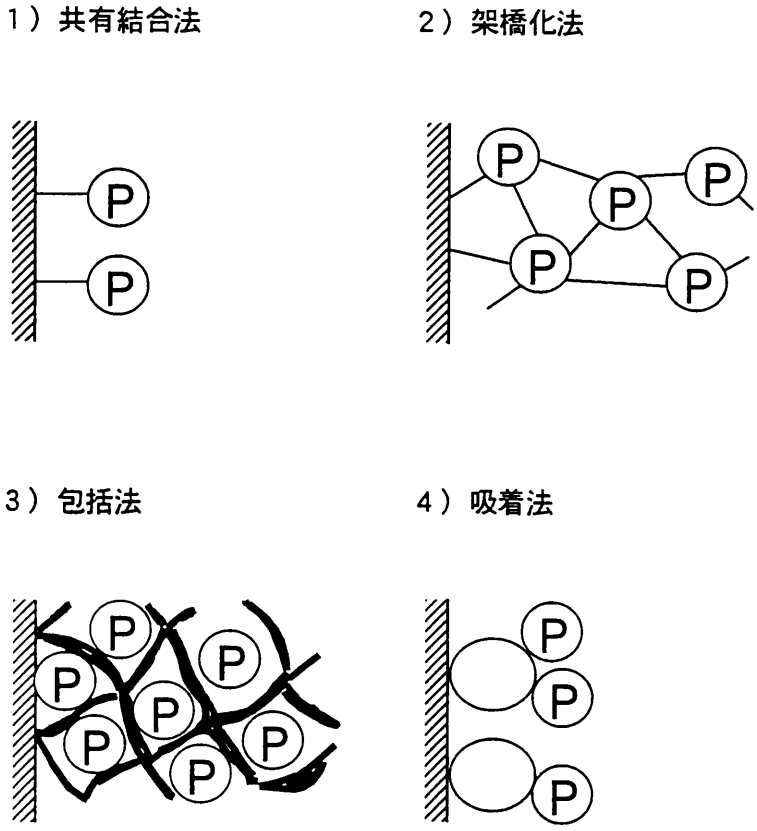


図2-1　生体関連物質の固定化の概略図
Ⓟ・生体関連物質

膜に固定化したもの、ゼラチンに包括後グルタルアルデヒド処理し酸素電極に固定化したもの、ポリ塩化ビニルに包括したのち酸素電極に固定化したものなどは、応答が早く測定範囲が広いことが報告されている。現在では作製が簡便なセンサや、電子受容体を酵素と結合し、より電気化学的な処理ができるセンサが考案されている。

3.2.2.3 グルコースオキシダーゼの性質

本実験で用いたグルコースオキシダーゼは和光純薬で精製されたものを使用した。以下にこの主な性質を述べる。

・酵素源

この酵素は微生物 Aspergillus niger を起源としている。

・活性

グルコースオキシダーゼの活性は、1mg あたり 150〜250units 以上である。ただし、1unit はグルコースを基質として pH が 7.0、25℃において 1 分間に 1μmole の D-グルコノ-δ-ラクトンを生成する酵素量として定義する。

・分子量

グルコースオキシダーゼの分子量は約 18,000 である。この中には、2 つの補酵素フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) が含まれている。FAD は、グルコースオキシダーゼとの結合により、その酸化還元反応に大きく寄与している。これは、FAD が酵素との結合により基質と酵素との間の水素運搬体として作用し、反応の発現に深く関与しているためである。

・pH の影響

酵素活性の促進、保持に関して pH は重要な因子である。グルコースオキシダーゼの場合、一般に至適 pH は 5.6 といわれている。また、活性がみられるのは pH が 2.0〜8.0 の場合である。また、グルコースオキシダーゼの等電点 pH は 4.2 である。したがって、溶媒の pH が 4.2 以上であればグルコースオキシダーゼは負に帯電し、陽極の電極に直接固定化することも可能である。

・温度

温度は pH と同様に酵素活性に影響を与える因子である。グルコースオキシダーゼの場合、最適な温度は 30〜40℃である。

・主な阻害剤

酵素を変性により失活させることなく酵素のある部分に結合し、その反応速度を低下させる物質のことを阻害剤という。グルコースオキシダーゼの場合、ヒドロキシキノリン、

サミカルバジドによって阻害を受ける。また、Hg^{2+}, Ag^{+}、Cu^{2+}などの無機物イオンも同様にその酵素活性を阻害する。

3.2.3 実験装置および実験手順

3.2.3.1 グルコースオキシダーゼの固定化

本研究では、グルコースオキシダーゼ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。

(1) チラミンの電解重合

グルコースオキシダーゼ固定化用の電極として、直径が3mmの白金電極を用いた(図2-3(a))。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。

(2) 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。

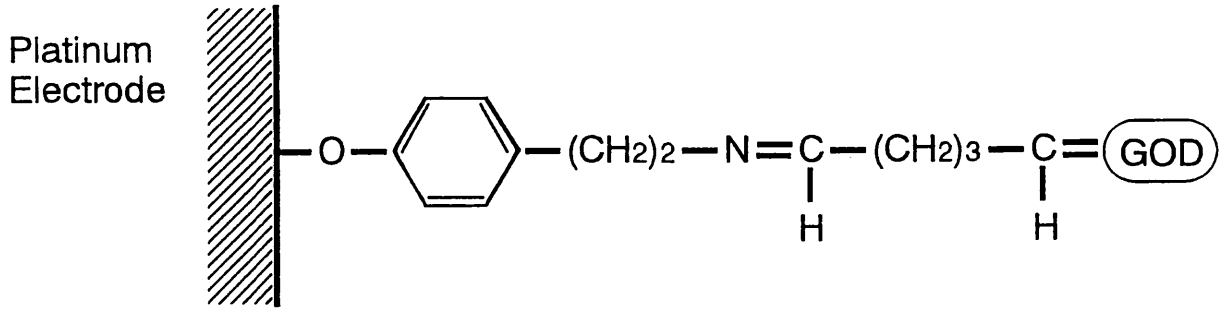
(3) グルコースオキシダーゼの固定化

以上の反応を経た電極を、グルコースオキシダーゼ溶液中(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グルコースオキシダーゼのアミノ基の脱水縮合により、2)と同様にSciff塩基が形成され、グルコースオキシダーゼを電極表面に固定化することができる。

3.2.3.2 グルコースセンサの測定原理

本研究で作製したグルコースオキシダーゼの測定原理を図2-2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グルコースオキシダーゼ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。

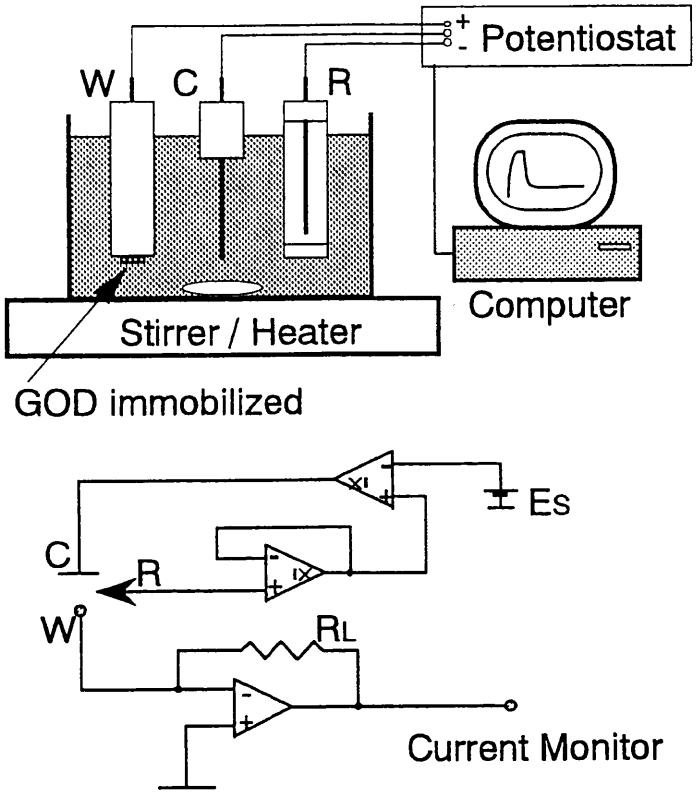
ここで生じた過酸化水素は銀/塩化銀電極を基準電極として550mVの電圧を負荷することにより容易に酸化される。このときの過酸化水素の酸化電流は過酸化水素濃度に比例することから、過酸化水素の酸化電流を測定することにより、溶液中のグルコース濃度を求めることができる。



1) D-Glucose + O_2 ⟶ D-Glucono- δ -Lactone+H_2O_2

2) $H_2O_2 + 2H^+ + 2e^-$ ⟶ $2H_2O$

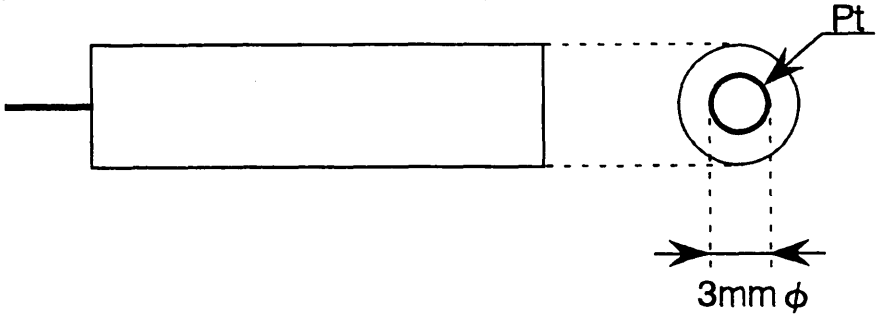
図2-2　電極表面模式図および反応式概略



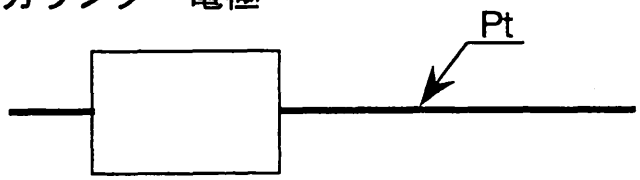
3電極方式によるポテンショスタット回路
C: 対極 (白金)
R: 参照電極(銀/塩化銀)
W: 作用電極(グルコースオキシダーゼ固定化白金)

図2-3　実験装置概略図

a)グルコースオキシダーゼ固定化用白金電極



b)カウンター電極



c)銀／塩化銀参照電極

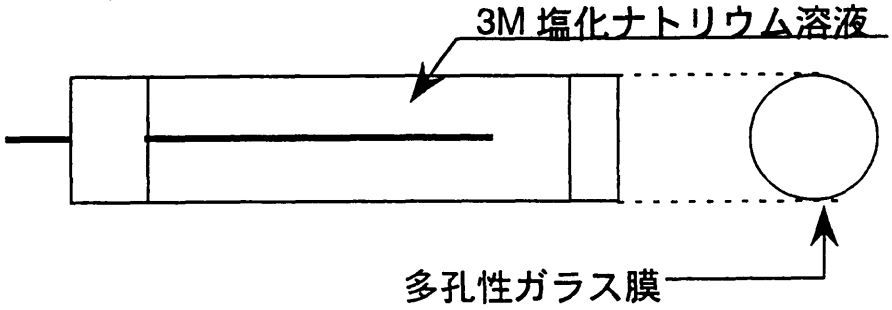


図2-4　電極概略図

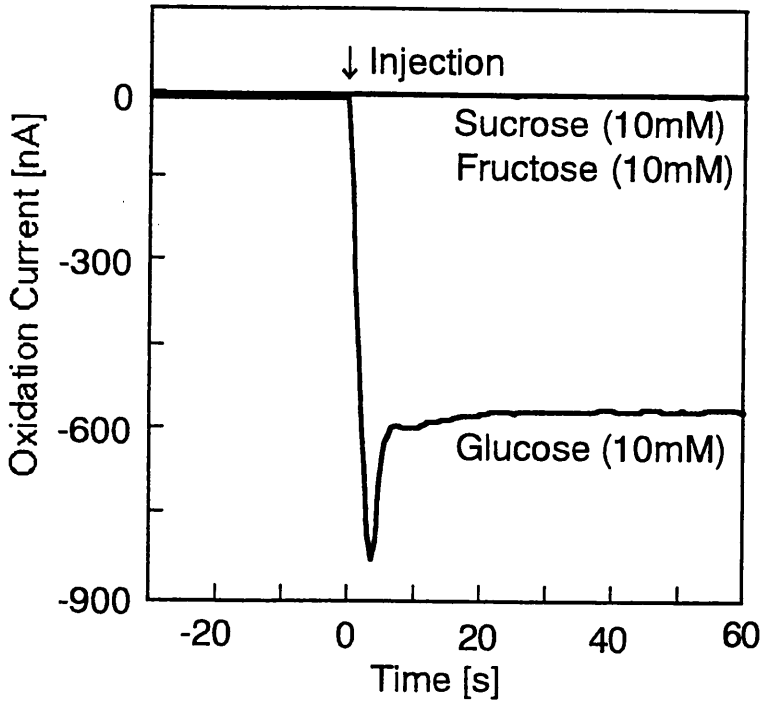


図2-5　グルコースセンサの基質選択性

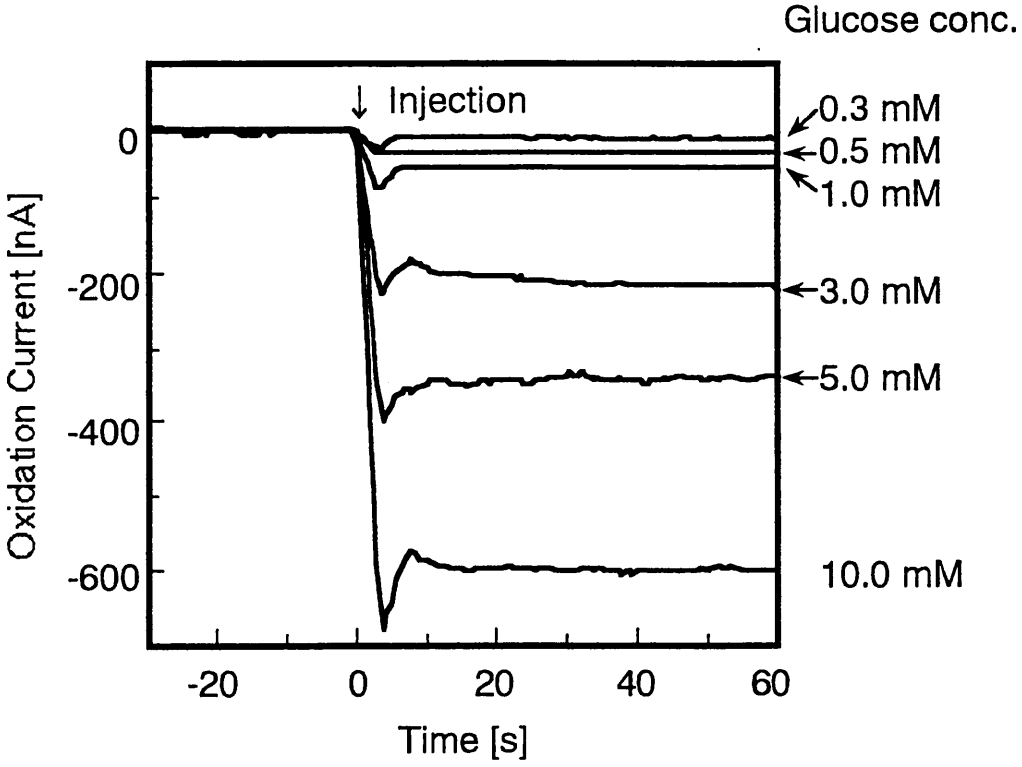


図2-6　グルコース酸化電流の経時変化と
濃度依存性

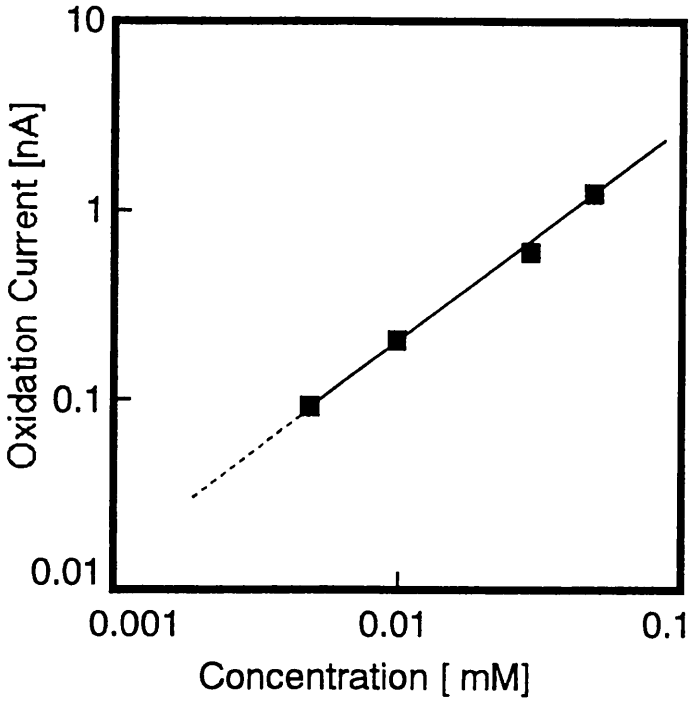


図2-7　グルコースの検出限界濃度

3.2.3.3 実験装置

図 2-3 に実験装置の概略を示す。この場合、グルコースオキシダーゼ固定化電極を陰極に接続した。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。それぞれの電極の概略を図 2-4 に示す。

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撹拌した。また実験は室温で行った。

3.2.3.4 実験方法

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。

まず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。

3.2.4 実験結果

3.2.4.1 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 2-5 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）、シュークロース（1M）、果糖（1M）100μl 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ー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。

3.2.4.2 グルコース応答の濃度依存性

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 2-6 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 2-7 に示す。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 5μM 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5μM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検討した。実験結果を図2-8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6.1（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2-9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。

3.2.4.3　グルコースセンサの溶存酸素依存性

図2-2に示す反応式のように、グルコースオキシダーゼ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。

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2-10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いることがわかる。このことから、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。

また、グルコース溶液を0.1ー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2-11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2-2で示した反応式により説明できる。すなわち、図2-2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。

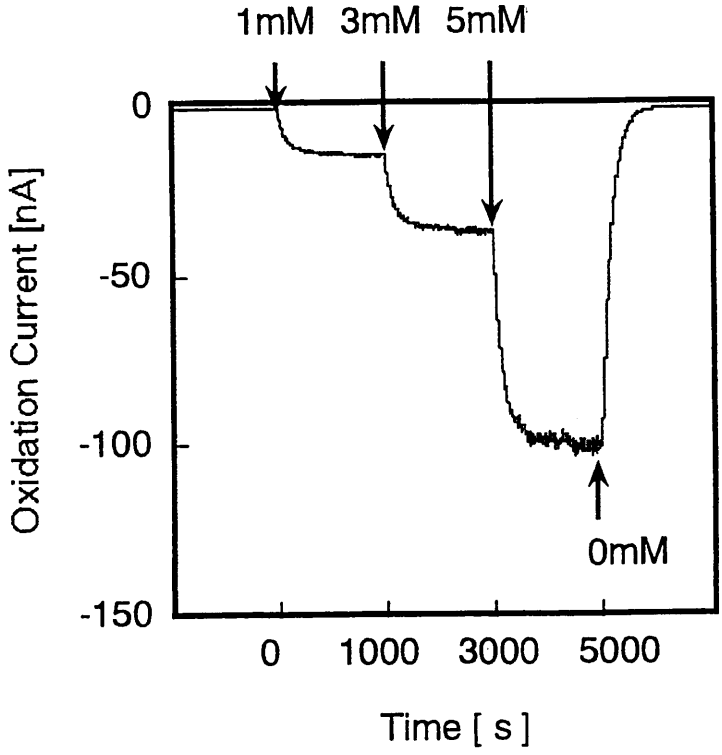


図2-8　グルコース溶液を灌流させた場合の
酸化電流の経時変化

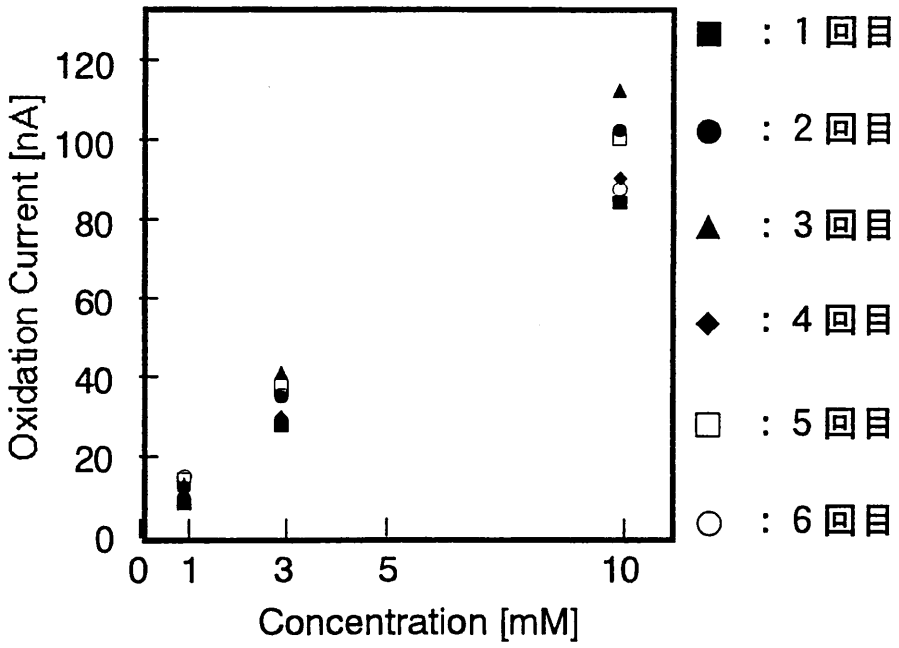


図2-9　グルコースセンサーの再現性

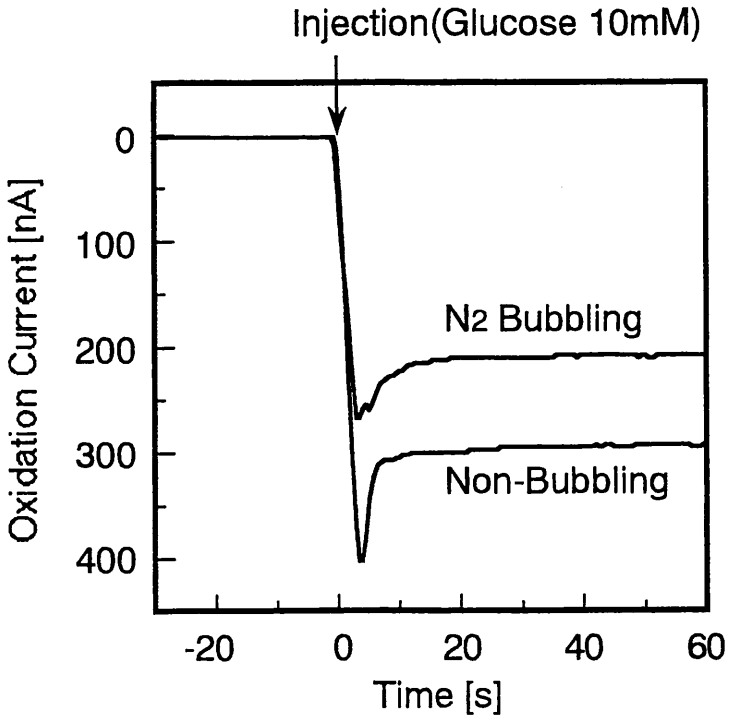


図2-10　グルコース酸化電流値に対する
溶存酸素の影響

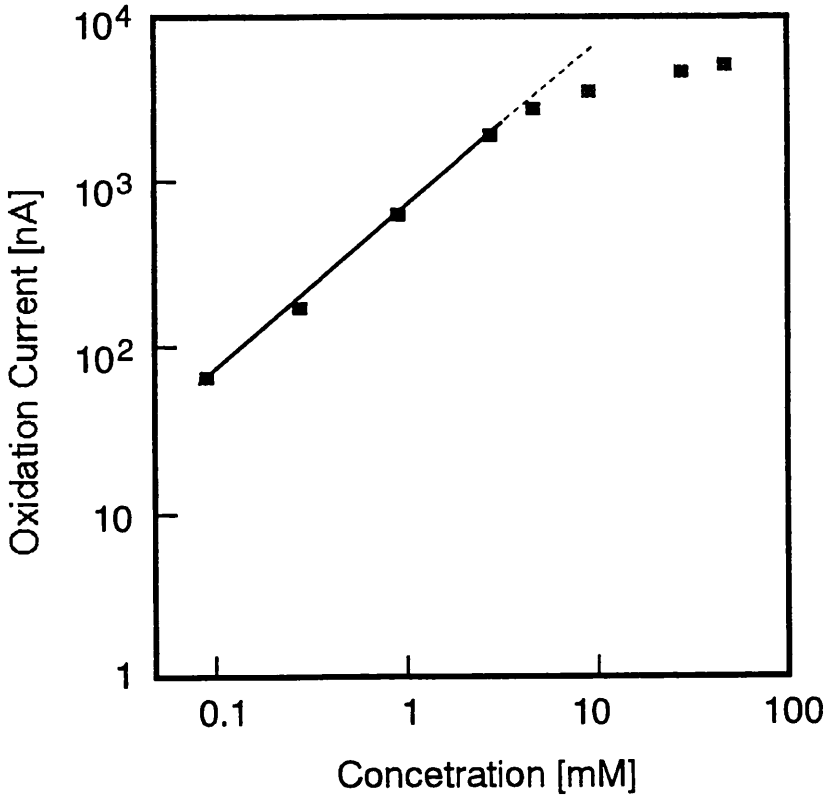


図2-11　グルコース濃度と酸化電流値の関係

3.2.4.4 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とがある。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グルコースオキシダーゼの場合、酸化型の場合にその活性を示す。酸化型のグルコースオキシダーゼは、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グルコースオキシダーゼは、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 2-3 にその化学反応式を示す。

$$\mathrm{Glucose+GO(FAD)} \rightarrow \mathrm{Glucono\text{-}lactone+GO(FADH_2)}$$

$$\mathrm{GO(FADH_2)+O_2} \rightarrow \mathrm{GO(FAD)+H_2O_2} \qquad (2\text{-}3)$$

$$\mathrm{H_2O_2} \rightarrow \mathrm{2H^+ + O_2 + 2e^-}$$

式中で GO(FAD)、GO($FADH_2$)はそれぞれ酸化型グルコースオキシダーゼ、還元型オキシダーゼを表す。また図 2-12(a)にその模式図を示す。酸素の作用により、グルコースオキシダーゼ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、グルコースオキシダーゼはもとの酸化型に戻ることがでず、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グルコースオキシダーゼ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 2-3 に示す。

$$\mathrm{Glucose+GO(FAD)} \rightarrow \mathrm{Gluconolactone+GO(FADH_2)}$$

$$\mathrm{GO(FADH_2)} \rightarrow \mathrm{GO(FAD)+2Mred+2H^+} \qquad (2\text{-}4)$$

$$\mathrm{2Mred} \rightarrow \mathrm{2Mox+2e^-}$$

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 2-12(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、活性を失ったグルコースオキシダーゼは、電極表面に介在し、グルコースオキシダーゼ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

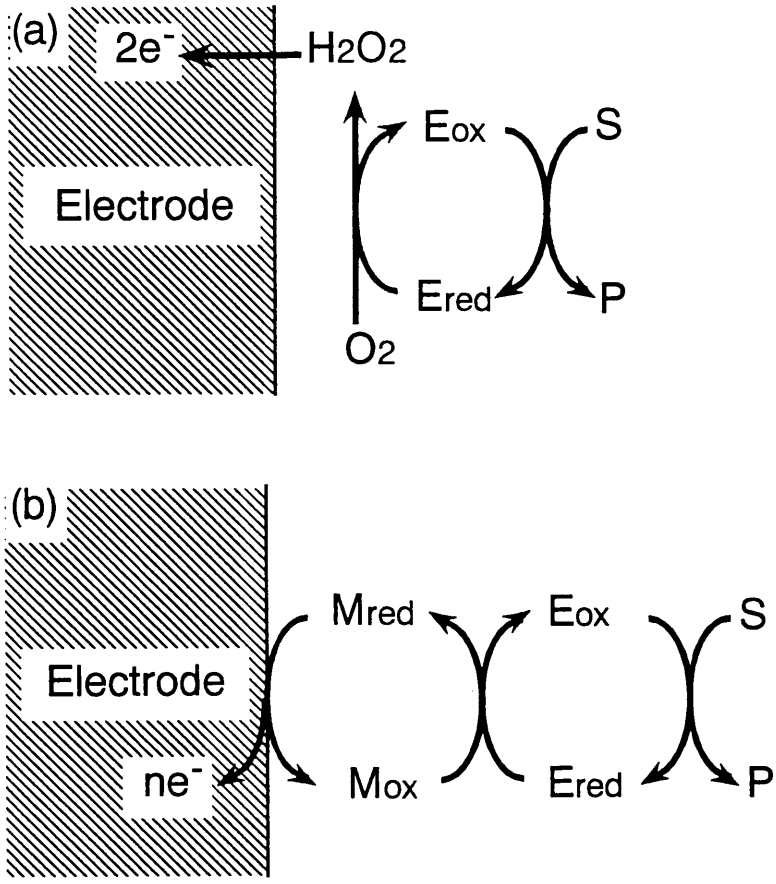


図2-12　電極表面での酵素の反応機構

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。

3.2.4.5 フェロセン

本研究では、メディエーターとして五員環にカルボキシアルデヒドが結合したFerrocene Carboxialdehyde を使用した。フェロセンの化学構造式を図 2-13 に示す。従来の電極ではセンサ出力が溶存酸素の影響を受けることが明らかになったので、同じアルデヒド基を持つ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、電極とグルコースオキシダーゼ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。グルコースオキシダーゼの固定化では、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、さらにグルコースオキシダーゼ溶液（10mg/ml）中に 24 時間放置した。図 2-14 にフェロセンをグルタルアルデヒドの変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。

また、図 2-15 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、グルコースオキシダーゼと電極間に介在し、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。

3.2.5 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グルコースオキシダーゼを固定化する方法は、センサ基質選択性、グルコース濃度依存性から有効な方法であることが確認できた。

(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ことが認められた。しかし、フェロセンを電子メディエーターとして電極とグルコースオキシダーゼとの間に介在させ　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た。

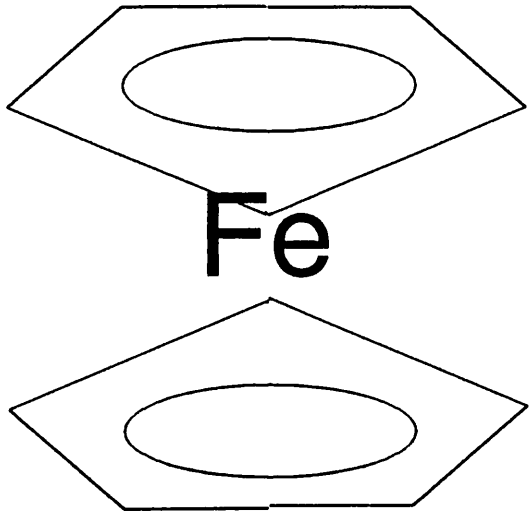


図2-13　フェロセンの化学構造式

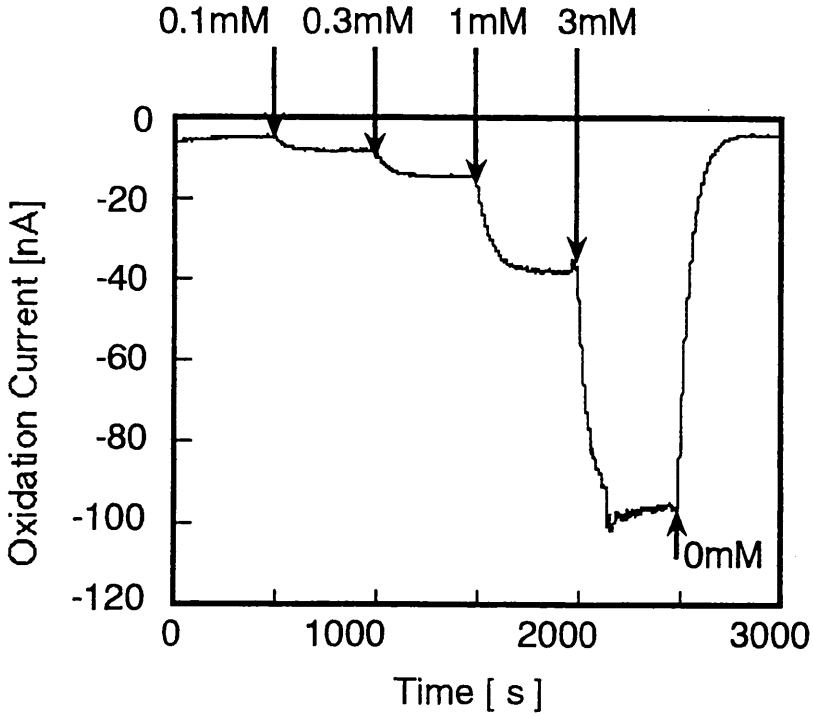


図2-14　フェロセンを電子メディエータとするグルコースセンサのグルコース応答と経時変化

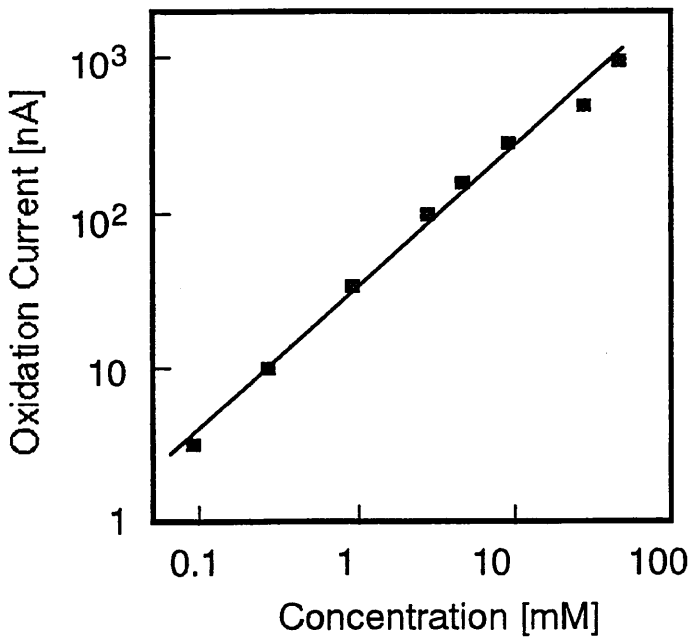


図2-15　フェロセンを電子メディエータとして用いた場合のグルコース濃度と酸化電流の直線関係

3.3 微小透析法による生理活性物質の分離と高感度測定

3.3.1 はじめに

多様化する疾病あるいは高齢化社会への移行に伴う検査項目の膨大な増加に対応するため、現在数多くの医用電子機器、計測機器が開発・導入され、病気の診断・治療そして予防に汎用されている。特に、生体内の化学情報の測定は病気の診断・治療のみならず、生体機能の解明を目的とする基礎医学あるいは神経科学分野においても、その開発が重要な課題となっている。

こういった課題を解消する手だての一つとして微小透析法がある。微小透析法は生体関連物質の動態を経時的、定量的かつ高感度で分析する方法として、近年神経生理学の分野で広く応用されている。この方法は微小透析チューブから構成される微小プローブを用いるが、その回収率に影響を及ぼす様々な要因がある。

ここでは微小透析プローブの基本特性について調べるとともに、プローブの回収率に影響を及ぼす各種要因についても検討する。

3.3.2 マイクロダイアリシス法

3.3.2.1 マイクロダイアリシス法の歴史

マイクロダイアリシス法は Brain Dialysis 法として 1966 年に最初に導入された。1970 年代に入り、小型の脳透析プローブの開発が行われ、微量物質分析技術の発展に伴い脳透析法は著しく改良された。特にスウェーデンの Understedt のグループによる中空系（Hollow fiber）透析膜を用いたプローブの開発と電気化学検出器（Electrochemical Detector; ECD), 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography ; HLPC) を組み合わせた簡便かつ高感度な分析法が導入されると、この方法を使った in vivo でのドーパミン遊離の研究が神経科学の分野で広く行われるようになった。

それまでは特定脳部位の細胞間隙に存在する様々な物質を回収する方法としては Cortial Cup 法および Push-Pull Cannulation 法が用いられてきた。これは 2 本の微小カニューレを脳の目的部位に刺入し、一方のカニューレから 20〜100 μl/min という比較的速い流速で灌流液を送液し、他方のカニューレを吸引しながら灌流液を回収するものである。この方法は、脳内で遊離するあらゆる物質を 100%近く回収することができる。しかし、灌流液の送液速度と回収速度を正確に等しくする必要があり、高度な技術が要求されること、また連続して長時間灌流すると脳の組織を破壊することなどから普及しなかった。

一方、Brain Dialysis 法は微小透析チューブに灌流液を低流速で流すため、秒単位という短時間で急速に変化する化学的事象の測定はできないが、脳組織の損傷も少なく、再現

性よく長時間にわたって安定した実験結果を得ることができる。

3.3.2.2 マイクロダイアリシス法の原理

マイクロダイアリシス法は、微小透析膜からなるプローブの先端にリンガー液を灌流させることにより、試料溶液中に存在する化学物質を膜内外の濃度勾配によって分離回収し、分析するものである。プローブの概略を図 3-1、3-2 に示す。プローブは腎透析に用いる半透膜中空糸（Hollow fiber ）と灌流液を流すための 2 本のチューブから構成される。

プローブを測定部位に刺入し、一方のチューブ（Inner Cannula）に一定量で灌流液を流すことにより灌流液とプローブ周囲の溶液とが半透膜を隔てて接する。その結果プローブ周囲の化学物質は濃度勾配によって濃度の低い灌流液側へ拡散し、プローブ内に取り込まれる。この回収の模式図を図 3-3 に示す。

回収される物質は使用する半透膜により異なり、それぞれのポアサイズなどにより決定される。それぞれの膜が持つ固有の分画分子量（分子量 Cut-off）以下の物質が回収される。分画分子量とは膜がある物質を 90%排除できるという場合、その物質の分子量で示される。図 3-4 に Hollow fiber による分画分子量曲線を示す。例えば分画分子量が 20,000 の膜は分子量 20,000 程度の物質を 90%排除可能となる。低分子量のカテコラミン、アセチルコリン、アミノ酸などは比較的小さい分画分子量の膜を用いた方が、回収透析液中に不純物が少なく分析も容易である。大きな分画分子量の膜を用いると回収率は高くなるが、分解酵素などの不純物も多くなる。

3.3.2.3 プローブの構造

中空糸の材質はセルロースアセテート（再生セルロース）、ポリカーボネイト、ポリアクリルニトリル、セルロース、キュプロファンなどが用いられる。また、プローブの種類は図 3-5 のようにループ型、ストレート型、注射針型などがある。本研究では膜には分画分子量 50,000 のセルロースアセテート膜を、形状は（C）のストレート型のものを使用した。また、透析膜部分の直径は 220 μm、長さは 5mm である。

3.3.2.4 相対回収率

微小透析法はプローブ周囲の化学物質をプローブ内外の濃度差によって灌流液中に回収するので、回収された物質の濃度は実際のプローブ周囲の濃度よりも低くなる。この回収の割合を示すものが相対回収率であり、次式のように定義される。

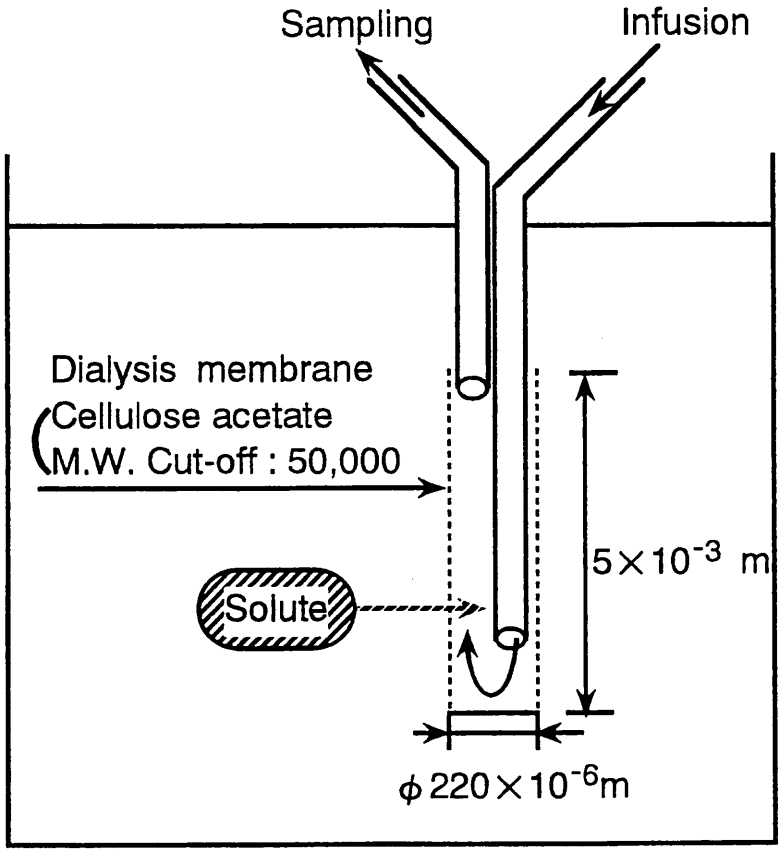


図3-1　微小透析Probe概略図

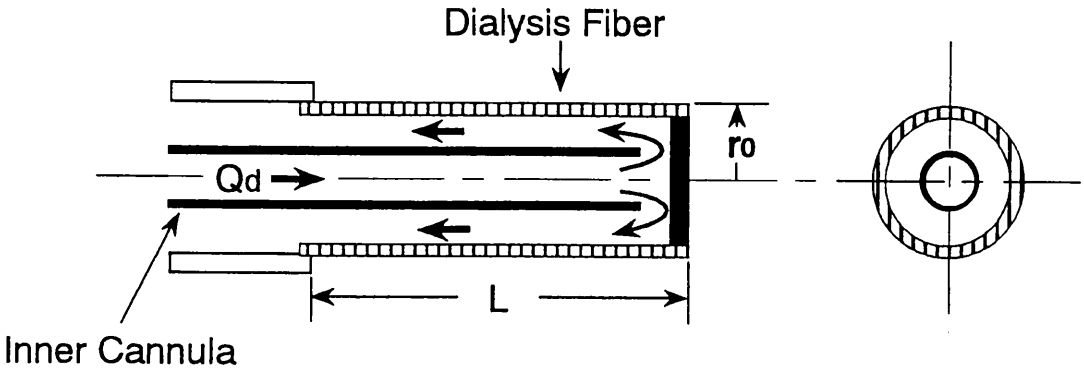


図3-2　微小透析プローブ回収部の概略図

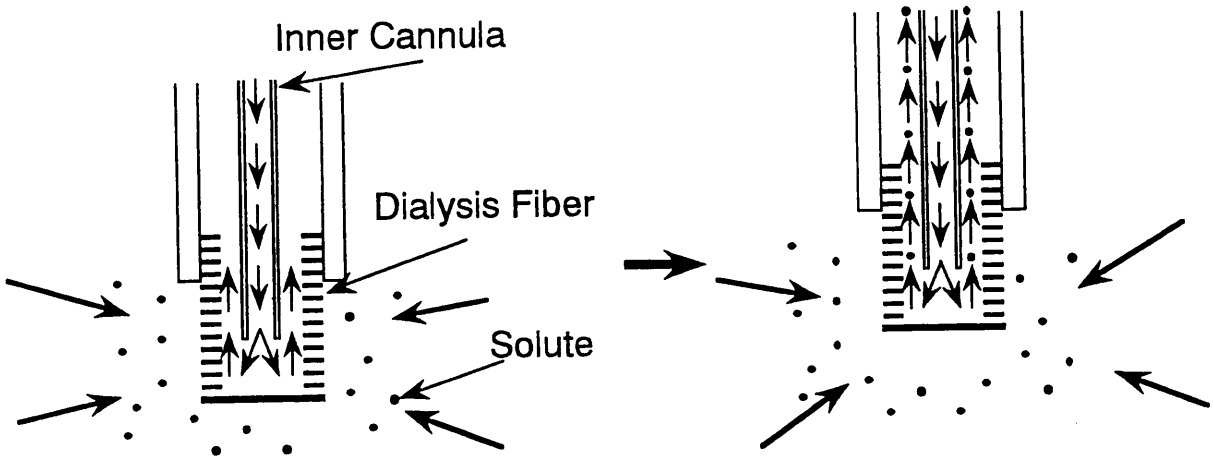


図3-3　プローブによる物質回収の模式図

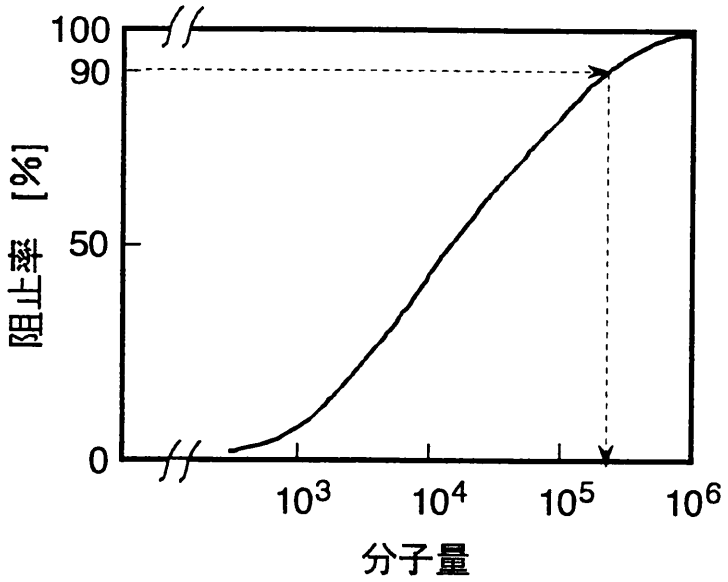


図3-4　ホローファイバーによる
分画分子量曲線

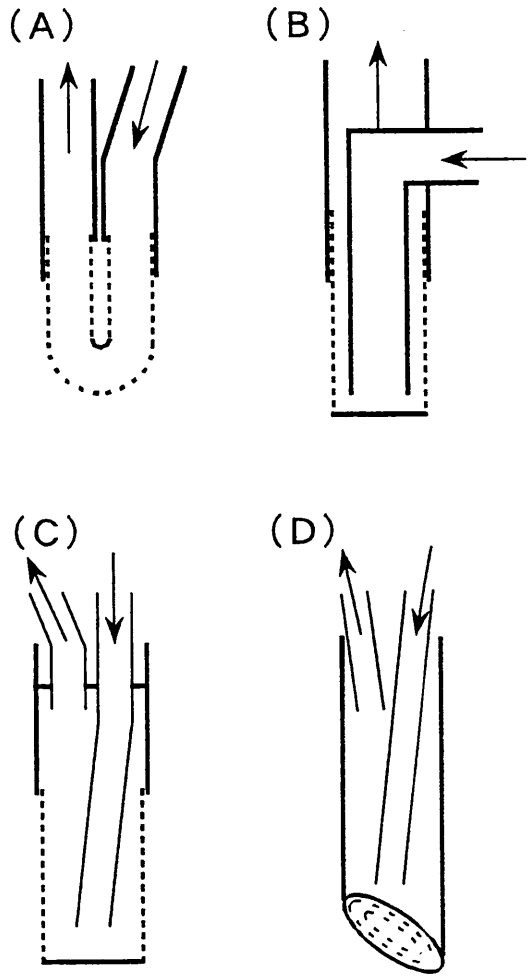


図3-5　透析用カニューレの種類

（A）：ループ型
（B）（C）：ストレート型
（D）：注射針型

$$Recovery(in\ vitro) = Cout/Ci \qquad (3\text{-}1)$$

Cout　:　in vitro で透析膜内に回収された目的物質濃度

Ci　　:　in vitro で透析膜周囲の目的物質濃度

in vitro と in vivo でのプローブ周囲の環境が等しいと仮定すると、生体内での透析膜周囲の目的物質濃度は以下のように推算できる。

$$Ci^* = Cout^*/Recovery(in\ vitro) \qquad (3\text{-}2)$$

Ci*　:　生体内での透析膜周囲の目的物質濃度

Cout*　:　生体内で透析膜内に回収された目的物質濃度

しかし、実際の生体内での測定はプローブ周囲の環境が極めて複雑であり、上記の仮定は厳密には成り立たず、in vitro で求めた相対回収率をそのまま適用することはできない。In vitro での測定、あるいは in vitro、in vivo 双方での測定の場合について相対回収率に与える影響について検討する必要がある。

相対回収率はいくつかの要因によって影響を受ける。これらについては以下の要因が考えられる。

(1) 灌流速度

多くの研究者によって透析される物質の in vitro の回収率に及ぼす灌流液の流速の影響について研究されており、相対回収率は流速が増加すると指数関数的に減少すること、絶対回収率は灌流速度が 2〜4 μl/min 以上ではほぼ一定となることが報告されている。通常は透析効率の良い 2〜4 μl/min の流速が用いられる。

(2) 物質濃度

相対回収率はプローブ周囲の化学物質濃度とは無関係であるが絶対回収率は濃度に比例する。

(3) 膜面積

回収率は膜面積に比例して増加する。

(4) 透析膜と物質の相互作用

膜の材質は物質輸送と相互作用をもち、マス輸送（mass transport）に影響する。同じ

膜でも神経ペプチドに対する回収率はアミンや代謝物質に対する回収率の数分の一にすぎない。これは神経ペプチドが膜に吸着しやすいことに起因すると考えられる。

(5) 拡散係数

相対回収率は測定物質によって異なる。これは膜の性質、分子量、荷電状態などの違いによって拡散係数が変わるためである。さらに、in vitro に比べて in vivo では媒質が不均一で、そのため複雑な拡散経路をたどることとなり、透析チューブ内への物質移動は in vitro の場合に比べて減少する。

(6) drainage 効果

微小透析を行っている間、プローブ周囲の物質は絶えず灌流液内にくみ出される。長時間の灌流を行うとその結果、生体からの物質の補充が限界となり、プローブ内への物質移動が減少する。

以上にのべた要因の他に灌流温度、灌流液の組成なども回収率に影響を与える重要な要因である。したがって、プローブを用いて生体内の真の物質濃度を求めるには in vitro で求めた相対回収率のみから推定だけでは不十分である。

3.3.3 実験装置および実験手順

本研究では神経伝達物質の一つであり、またストレスホルモンとしても知られているノルアドレナリン (NA) と、血液中の主要化学成分である Glucose、尿素、L-乳酸、グリセロールについて微小透析法によるプローブでの回収を行い、その濃度変化に対する回収率への影響を調べた。測定の際には各物質の試料溶液濃度、撹拌速度、回収溶液の灌流速度等を変化させた。また、試料溶液に微小粒子やアルブミンなどのタンパク質を加え、それらの要素の回収率への影響も調べた。ただし、NA については蒸留水中で容易に分解されることから、NA の溶解および回収のための灌流液には 0.1M 酢酸溶液を使用し、他の 4 種の物質については超純水を使用した。

本研究で使用するプローブでは回収される試料の量が極めて少ないので (数 10 μl)、試料の分析には高感度で特異性が高い分析方法を用いる必要がある。したがって、電気的に活性な物質である NA については高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と電気化学検出器 (ECD) を組み合わせた HPLC-ECD 法で、また Glucose、尿素、L-乳酸、グリセロールについては分光光度計を用いた酵素法によって定量を行った。

3.3.3.1 HPLC-ECD システムによる NA 高感度分析

微小透析法によって回収した NA 定量化のための HPLC-ECD システムを図 3-6 に示す。既知濃度の試料溶液中に微小透析プローブを浸し、微量注入ポンプにより蒸留水を毎分 2μl の流速で灌流した。回収した NA は HPLC-ECD システムによって高感度分析を行った。本実験は逆相クロマトグラフィー用カラムとしてオクタデシル (ODS, C18)化シリカゲル充填カラムを使用し、移動相としては 0.1M リン酸緩衝液 (pH=6.0)、6%メタノール、1-オクタンスルホン酸ナトリウム (400mg/l)、エチレンジアミン-4-酢酸二ナトリウム (50mg/l) の組成のものを用いた。

本実験に使用した分離カラム、電気化学検出器の詳細を以下に示す。

(1) 分離カラム

製造会社	株式会社エイコム
形式	Eicompak MA-5ODS (4.6φ×150mm)
流量	1ml/min
カラム温度	Tc=30℃

(2) 電気化学検出器

製造会社	株式会社エイコム
形式	Eicom ECD-100 電気化学検出器
作用電極	グラファイト電極 (Eicom WE-3G)
参照電極	銀-塩化銀電極 (Eicom RE-100)
加電圧	0.45V (vs. 銀-塩化銀電極)

3.3.3.2 吸光光度計

酵素法で濃度測定を行った際の吸光度測定装置は以下のものを使用した。

製造	株式会社日立製作所
形式	U-2000 型ダブルビーム分光光度計

上記の装置での測定条件を以下に示す。

波長	340nm
キュベット	光路長 10mm
測定温度	20〜25℃
対 照	蒸留水

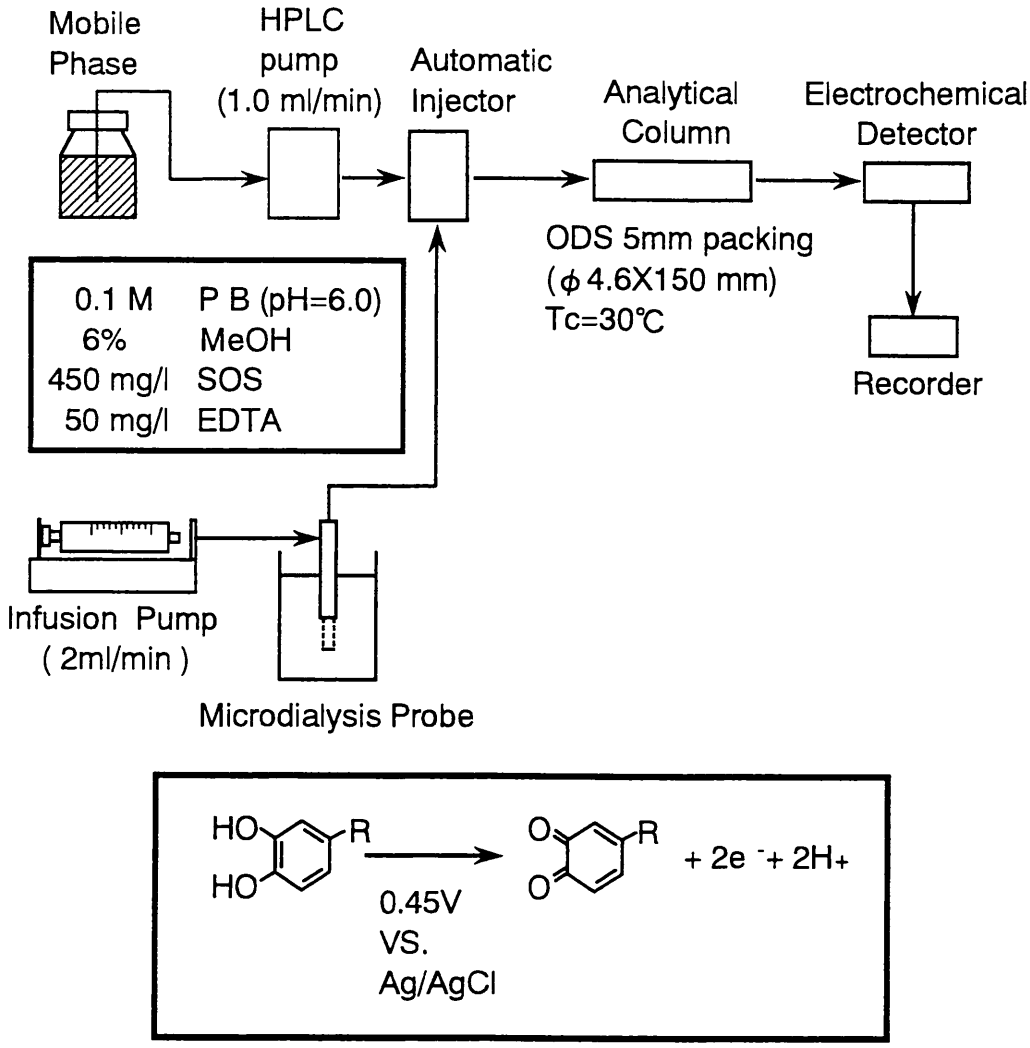


図3-6　HPLC-ECDシステムとその流れ図

グルコース、L-乳酸、尿素、グリセリンについては以下の測定原理で定量を行った。

(1) グルコース

a) Glucose $\xrightarrow{HK}$ G-6-P + ADP

b) G-6-P + $NADP^+$ $\xrightarrow{G\text{-}6\text{-}P\text{-}DH}$ グルコン酸—6－燐酸＋NADPH + H^+

生成したNADPHの量を340nmの吸光度の増加で定量する。

(2) L-乳酸

a) L-乳酸＋NAD^+ $\overset{L\text{-}LDH}{\rightleftarrows}$ ピルビン酸＋NADH＋H^+

b) ピルビン酸＋L-グルタミン酸 $\overset{GPT}{\rightleftarrows}$ L-アラニン＋α-ケトグルタール酸

a)で生成したNADHの量はL-乳酸の量に相当するので、340nmの吸光度の増加で定量する。

(3) 尿

a) 尿素＋H_2O $\xrightarrow{Urease}$ $2NH_3$＋CO_2

b) 2-オキソグルタレート＋ NADH＋NH^4 ＋

$\xrightarrow{GLDH}$ L-グルタメート＋NAD++H_2O

b) の反応で消費されるNADHの量はアンモニア量または1/2尿素量に比例するので、吸光度の減少を測定することにより、尿素またはアンモニア量を求める。

(4) グリセロール

a) グリセロール＋ATP $\xrightarrow{GK}$ グリセロール-3-リン酸＋ADP

b) ADP＋PEP $\xrightarrow{PK}$ ATP＋ピルビン酸

c)　ピルビン酸＋NADH＋H^+　$\xrightarrow{LDH}$　乳酸＋NAD^+

c）で消費されたNADHの量はグリセロールの量に等しくNADHが酸化されてNADになり、340nmの吸光度は減少する。

3.3.4　実験結果

3.3.4.1　相対回収率

本実験で使用したHPLC-ECDシステムのNAに対する検量線を図3-7に示す。この図から明らかなように、酸化電流値は分析範囲27.4〜822ng/lにおいてNA注入量に有意に依存しその感度は1.02nA/pgであった。また本分析システムのNA検出限界はシグナル/ノイズ比が3:1で約500fg/試料であり、極めて高感度な分析が可能であった。また本分析システムを用いて測定した、試料溶液中でのNA濃度と微小分析透析プローブによって回収した灌流液中でのNA濃度の関係を図3-8に示す。この場合においても両者の間には有意な直線関係が得られ、その傾きからNAの相対回収率Rは0.122と算出できた。また同様の実験結果がグルコース、尿素、L-乳酸、グリセロールについても得られることから（図3-9)、本研究で用いた微小透析プローブを用いてこれら各物質を定量する事が可能である。さらに直線の傾きから各物質に対する相対回収率Rは表3-1のように算出されたが、L-乳酸を除いては分子量の逆数と相対回収率の間に比例関係があることも明らかとなった（図3-10)。

3.3.4.2　灌流速度と相対回収率との関係

相対回収率に対する灌流速度の影響を、2種類のNA濃度（50nM、100nM）について解析したものを図3-11に示す。いずれの濃度についても灌流速度の増加に伴い、相対回収率は指数関数的に減少する。これは灌流流速の増大に伴って単位時間当たりに回収される液の量は多くなるが、拡散限界と膜を横切る水圧が高まり、透析膜を横切って起こる物質移動の流束が減少するためと考えられる。しかしながら、相対回収率は試料溶液中のNA濃度によっては影響されない。

3.3.4.3　Sephadex微粒子存在下での灌流速度と相対回収率との関係

NA溶液中（100nM）にSephadex G-10、G-200の2種類の微粒子を自然沈降させその中にプローブを刺入して回収実験を行った。灌流速度Qdは2μl/minで一定とした。微粒子の乾燥時粒子径、水吸収度を表3-2に示す。実験ではSephadex G-10を2g、Sephadex G-200を0.1gずつ、100nMのNA溶液中に混合した。またNAの微粒子への吸着等によるNA濃度

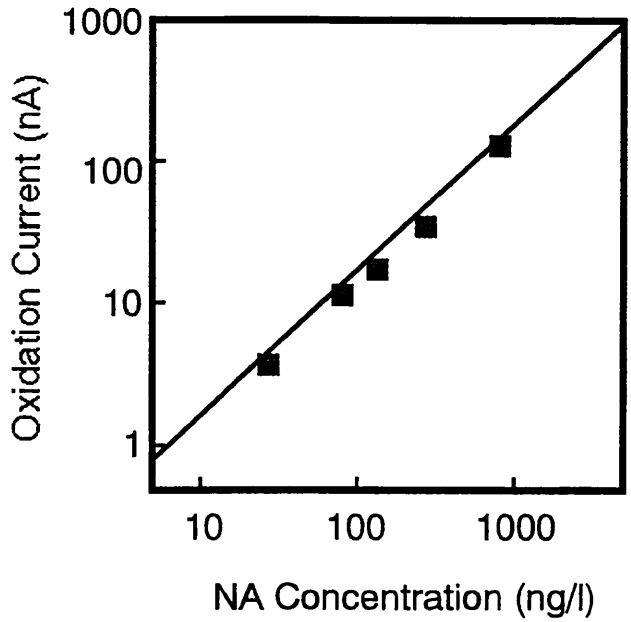


図3-7　ノルアドレナリンの検量線

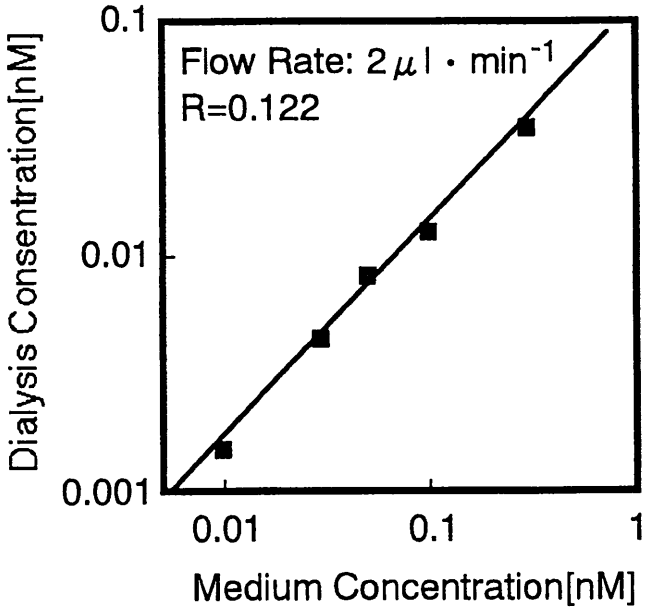


図3-8　NAの測定溶液濃度に対する
回収液濃度の関係

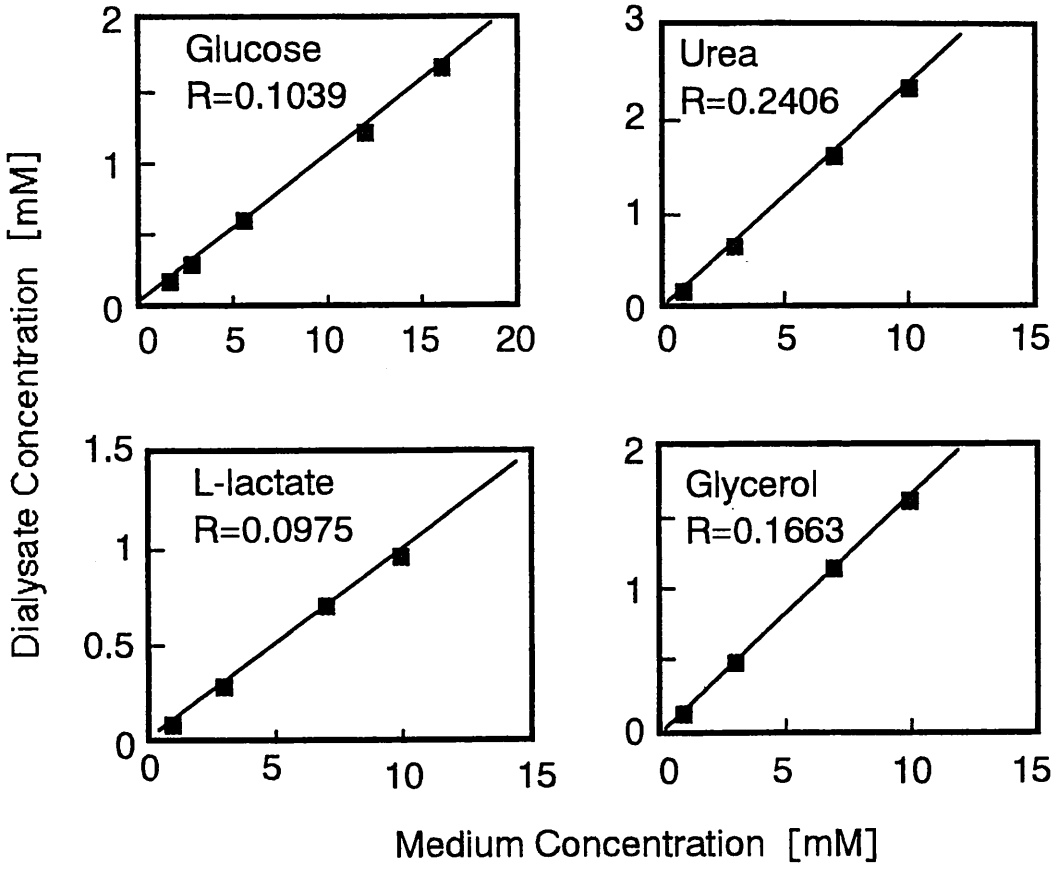


図3-9　測定溶液濃度と回収液濃度の関係

表3-1　各成分の相対回収率

成分	相対回収率R（-）
NA	0.12
Glucose	0.10
尿素	0.24
L-乳酸	0.10
グリセロール	0.17

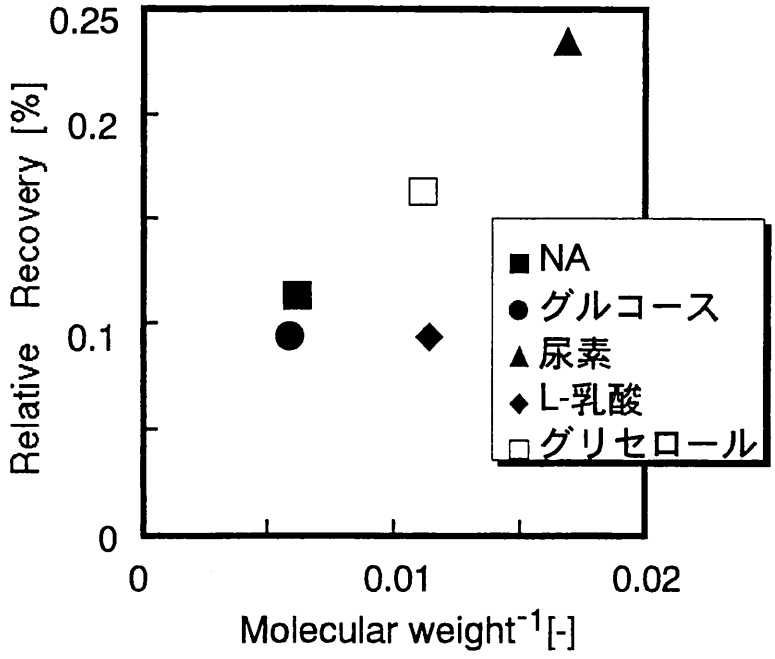


図3-10　分子量の逆数と相対回収率との関係

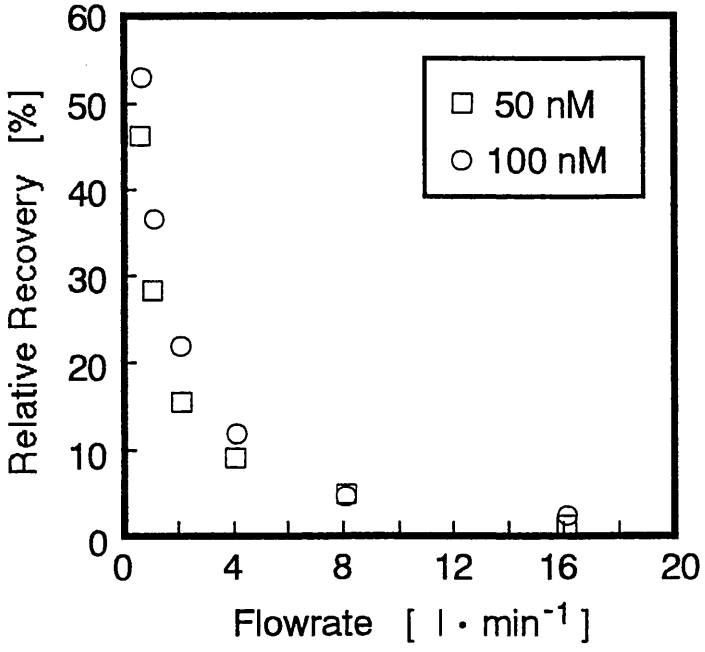


図3-11　NAの灌流流速と相対回収率の関係

の減少は認められなかった。実験結果を図 3-12 に示す。相対回収率は灌流速度の増大とともに指数関数的に減少するが、Sephadex 微粒子存在下では NA 単独の場合と比較して有意に低い。これは灌流速度の小さいところ、あるいは水吸収度の小さい Sephadex G-10 粒子を用いた場合に顕著である。

一方、透析プローブの長さ方向（z）の微小部分で溶質についての物質収支式から、次式が得られる。

$$\frac{d\overline{C}_d}{dz} = \frac{2\pi\kappa}{Q_d}(C_e^{\infty} - \overline{C}_d) \tag{3-3}$$

これを

$$\begin{aligned} z = 0 \qquad & \overline{C}_d(0) = C_d^{in} \\ z = L \qquad & \overline{C}_d(L) = C_d^{out} \end{aligned} \tag{3-4}$$

の条件で解けば灌流速度と相対回収率の関係が次式のように与えられる。

$$\ln\{1/(1-R)\} = 2\pi r_0 LK \cdot 1/Q_d \tag{3-5}$$

R：相対回収率[-]　　r_0：probe の半径［Length］

L：probe の長さ[Length]　　K：総括物質移動係数［Length・time^{-1}］

Q_d：灌流体積流速[Length^3・time^{-1}]

ただし、

$$R = \frac{C_d^{out} - C_d^{in}}{C_e^{\infty} - C_d^{in}}$$

であり、相対回収率となる。

$\overline{C}_d$ ：プローブ半径方向の灌流液中溶質平均濃度［mass・length^{-3}］

C_d^{in}：プローブ入口における灌流液中の溶質濃度［mass・length^{-3}］

C_d^{out} ：プローブ出口における灌流液中の溶質濃度［mass・length^{-3}］

C_e^{∞} ：プローブ透析膜外液の溶質濃度［mass・length^{-3}］

図 3-13 に ln｛1/（1-R)｝対 1/Qd の関係を 2 種類の Sephadex 微粒子、および微粒子を含まない溶液中で測定した場合についてプロットしたものを示す。図から明らかなように両者の間には直線関係が得られ、それぞれの試料によって傾きが異なる。直線の傾きが $2\pi r_0LK$ であるから、それぞれの傾きより総括物質移動係数を算出した結果、Sephadex 微粒子を含まない溶液中で求めた総括物質移動係数の値は、K=5.52×10^3 cm・min^{-1}、G-200 存在下では K=2.47×10^{3}cm・min^{-1}、G-10 存在下では K=1.09×10^{3}cm・min^{-1} であった。本研究に

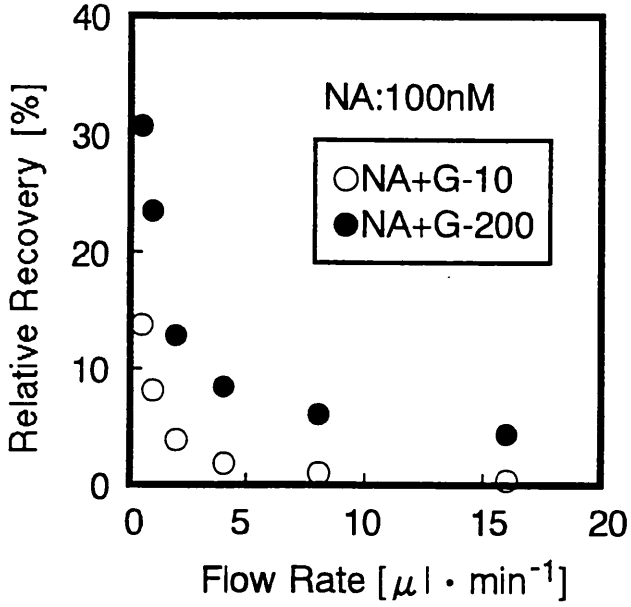


図3-12　セファデックス微粒子中における
灌流速度と相対回収率の関係

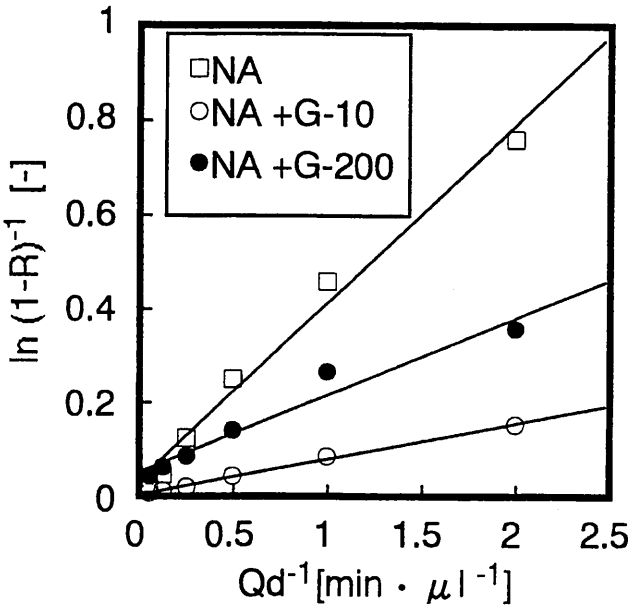


図3-13　灌流速度とノルアドレナリン相対回収率の関係

物質移動係数は

NAの場合K=5.52 ×10 ^{3} cm・min^{-1}

NA+G-10は2.47 ×10 ^{3}cm・min^{-1}

NA+G-200は1.09 ×10 ^{3}cm・min^{-1}

より総括物質移動係数が3種類の溶液中で異なった値を示すことから、プローブ周囲に存在する微粒子が障壁となり、物質回収率を低下させる可能性が示唆される。

また試料溶液をマグネティックスタラーで撹拌し、その相対回収率に及ぼす影響を検討したが、撹拌の程度によって相対回収率には有意差を認めなかった（図 3-14)。このことから液側境膜抵抗は無視できると考える。

微小透析を行っている間、透析プローブ近傍の物質は絶えず灌流液中へくみ出される、いわゆる drainage 効果が存在するとすれば、プローブ周囲に微粒子などの障害が存在する場合、長時間の灌流により液本体から膜近傍への物質の補充が限界となり、プローブ内への物質移動が減少する可能性がある。本研究で使用した Sephadex G-200 および G-10 は乾燥時の粒子直径に差はないが水吸収度に関しては G-200 は G-10 に対して約 20 倍大きい。したがって両微粒子が存在する溶液中の拡散抵抗の違いを考慮すれば、本研究で得られた総括物質移動係数の差が一部説明できるものと考えるられる。

3.3.4.4 NA の相対回収率に対するウシ血清アルブミンの影響

NA 溶液（100nM）にそれぞれ 10、30、50、70、100（g/l）になるようにウシ血清アルブミンを溶解した。これらの溶液を用いて NA の回収実験を行った結果を図 3-15 に示す。測定値に多少のばらつきはあるもののアルブミン濃度変化に対して、相対回収率は 20ー30% と有意差はない。したがってウシ血清アルブミンを短期間作用させても NA の相対回収率には影響を与えることはないと考えられる。

一方、透析膜の相対回収率に対するウシ血清アルブミン長期作用による吸着の影響を検討した（図 3-16)。これは NA 溶液中（100 nM）に濃度が 100（g/l）になるようウシ血清アルブミンを溶解し、プローブを最長三日間にわたって冷暗所で放置した。このプローブを用いて前述と同様に NA の回収実験を行った。透析プローブをウシ血清アルブミンを含む溶液中に放置したものは、アルブミンと反応させてないものよりも 5%程度であるが、有意に回収率が低下している（$P<0.05$、一元配置の分散分析)。これはアルブミン溶液中にプローブを長時間浸すことで透析膜にアルブミンが吸着したため、膜の回収能力が低下したためと考えられる。

3.3.5 まとめ

(1) 臨床検査の分野で重要な生体関連物質である NA、Glucose、尿素、L-乳酸、グリセロールについて in vitro で濃度測定を試みた結果、いずれも相対回収率は約 20% で回収分析できる。

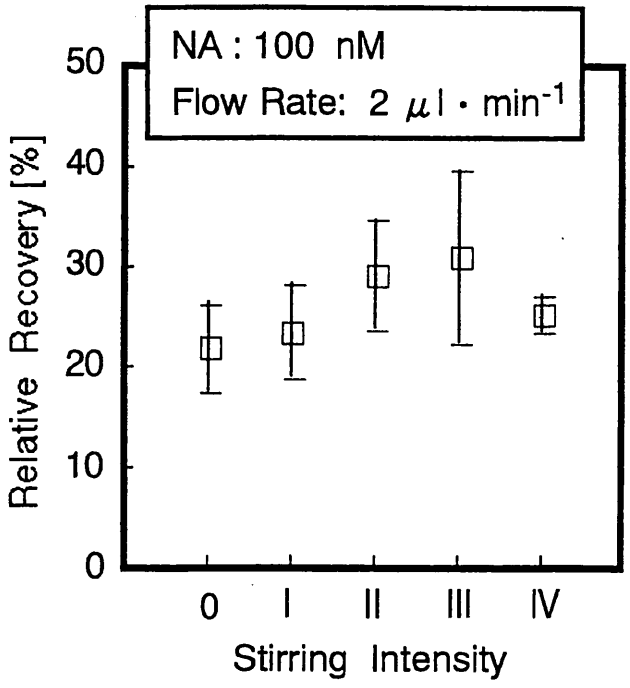


図3-14　ノルアドレナリン溶液の撹拌と相対回収率の関係

溶液はマグネティクスタラーにより4段階の強度（Ⅰ～Ⅳ）で撹拌。0：溶液は静止状態。データは平均値±標準偏差（n=4）を示す。

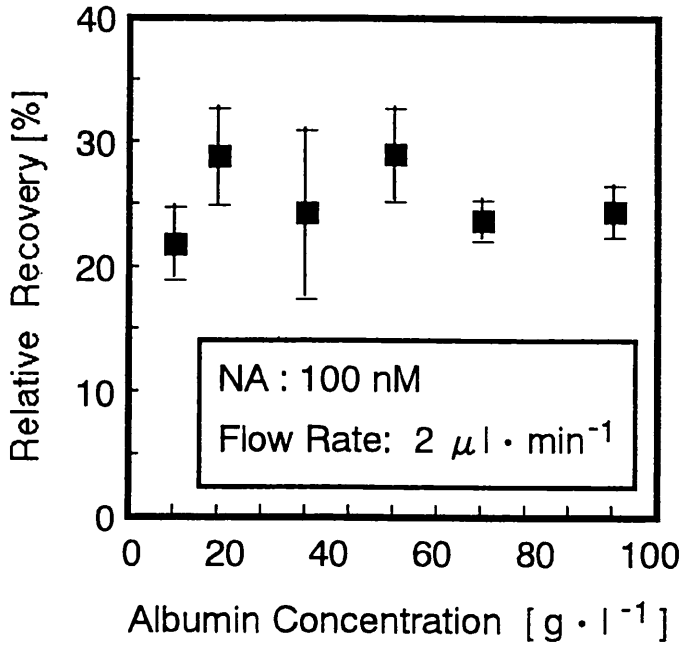


図3-15　ノルアドレナリン 相対回収率に対するウシ血清アルブミンの影響

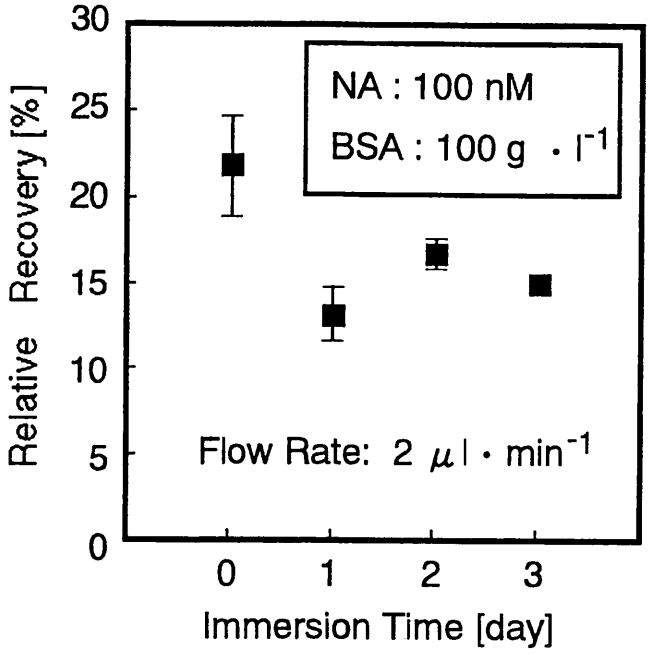


図3-16　ウシ血清アルブミンの
相対回収率に与える影響

(2) 相対回収率は灌流速度の増大とともに指数関数的に減少し、両者の間には以下の関係が成り立つ。

$\ln\{1/(1-R)\}=2\pi r_o LK\cdot 1/Qd$

(3) 相対回収率はプローブ周囲に存在する微粒子等に大きく影響を受け、またウシ血清アルブミンなどのタンパク質の透析膜への吸着により有意に減少する。

3.4 微小透析バイオセンサ

3.4.1 はじめに

これまで討したグルコースセンサは、その測定対象物質への選択性、応答の速さ、再現性という点で優れていることが明らかになった。また、フェロセンを電子メディエーターとして用いることで溶液中の溶存酸素濃度依存性を解消することもできた。今後さらに、電極への固定化酵素を変えることによりグルコース以外の糖類やアルコール、また乳酸や尿素といった生体関連物質を計測できるセンサを開発することができるものと考えられる。しかし、今後解決すべき課題として以下の点が挙げられる。

(1) 測定対象物質が複数存在する場合、それに対応する複数の酵素を固　定化する必要がある。しかしながら、複合酵素系を利用した酵素センサは複数の基質が同時に存在する場合、これらを区別して計測できない。

(2)　同一の固定化条件により電極への酵素固定化を行っても一定の感度を得ることが困難であり、センサごとに検量線を作製する必要がある。

(3) 医療分野での使用を考慮した場合、センサ直径を 0.5mm 以下に微小化する必要がある。

また、本研究で示した微小透析法はサイズが小さく、測定濃度範囲が広いという点では優れてはいるが、プローブの灌流速度が遅く試料の回収に時間を要し、時間分解能に劣るという欠点がある。したがって生体内で起こる速い現象の解析は不可能である。

微小化、多機能化、高感度化に加えて基質選択性はこれからのセンサ開発にとって解決しなければならない最重要課題である。ここでは酵素固定化電極と微小透析プローブの両者の長所を取り入れた微小透析バイオセンサ を開発し、その基本特性を調べた。

3.4.2 微小透析を利用した多機能バイオセンサ

3.4.2.1 微小透析バイオセンサの構造

図 3-17 に本実験で用いた微小透析バイオセンサ の概略を示す。センサのボディーは約 1 cmで、エポキシ樹脂で出来ている。また、酵素溶液を灌流するための 2 本のチューブが、胴体を貫通する形で埋め込まれている。胴体下部には約 2 cmの長さの円筒形のコンパート

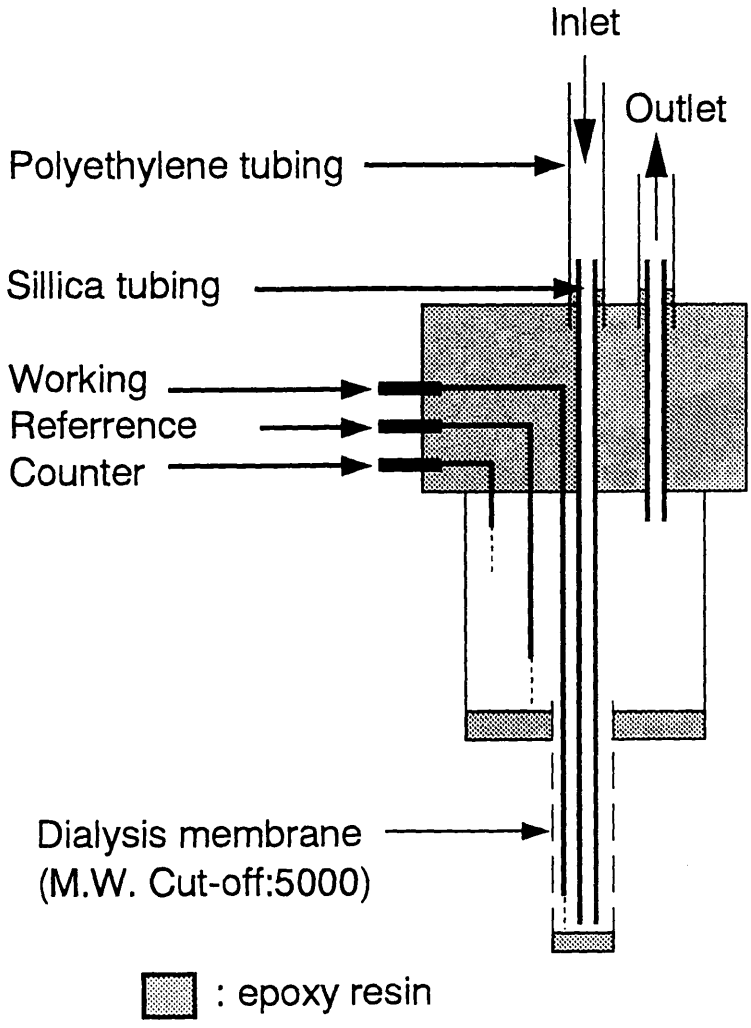


図3 - 17 微小透析バイオセンサ の概略

メントが接続されており、その内側には作用電極、参照電極、カウンター電極、および溶液灌流用チューブが納められている。このうち作用電極とチューブは、さらに下部に接合されている約1㎝の微小透析膜（φ=220μm）の先端まで伸びており、透析膜先端はエポキシ樹脂で栓をされた構造になっている。この透析膜の先端部分は脆弱であるので、実験で使用する際はこの部分を守るための円筒形のプロテクターをとりつけたが、透析膜そのものには直接溶液が接触するよう配慮した。また、胴体上部から突き出たチューブはさらに径の太いポリエチレンチューブに接続されている。

酵素溶液をマイクロシリンジを用いてセンサ上部のポリエチレンチューブから注入し、センサの先端まで酵素溶液で満たした。透析膜のCut-offは、分子量50000であるので、高分子である酵素は透析膜から漏出することはない。

3.4.2.2 微小透析バイオセンサの特徴

このセンサを使用することでこれまでのセンサと比較して、次のようなメリットが期待できる。

(1) 膜の破損や劣化等がない限り、常に新鮮な酵素を供給することにより繰り返し利用することが可能である。

(2) 注入する酵素を変えることで一つのセンサに多様性を持たせ、複数個の生体関連物質を定量することが可能である。

(3) 同一の物理的構造を有するセンサを使用するため、酵素溶液の調製に注意すれば固定化型電極と異なり、センサごとの検量線を作成する必要がない。

(4) 一回に使用する酵素の量は極めて微量であり、固定化型酵素電極と比較して経済的である。

(5) センサそのものがコンパクトであり、今後その形状の改良を行えば、センシング部を体内に刺入・固定し、患者の複数の体液成分のオンラインモニタリングの可能性が期待できる。

(6) 二次的な操作が必要ないので微小透析法のような分離・回収、そして分析という操作上の煩雑さが軽減できる。

(7) 取り扱い方に注意すれば、固定化型の酵素電極と比較して長期にわたって使用できる。

3.4.3 実験装置および方法

図 3-18 に実験装置の概略図を示す。本実験においてもグルコースオキシダーゼ固定化電極の場合と同様、3 電極方式によるポテンショスタット回路を用いて酸化電流値を測定した。作用電極への印加電圧を 550mV (vs. Ag/AgCl) に設定し、酸過電流は 0.5 秒間隔で測定・記録し、オンラインでディスプレイ上に表示した。

グルコースオキシダーゼ (和光純薬工業) を 0.1M リン酸緩衝液 (pH=5.6) に溶解し、微量ポンプにより微小透析バイオセンサに注入した。センサを試料セル中に固定し、出力電流値が安定したことを確認後、種々の濃度のグルコース溶液中での酸化電流値を測定した。実験はすべて室温で行い、試料溶液はマグネティクスタラーにより絶えず撹拌した。

3.4.4 実験結果及び考察

3.4.4.1 酸化電流値のグルコース濃度依存性

本研究で使用した微小透析バイオセンサのグルコース濃度依存性を調べた結果を図 3-19 に示す。このときグルコースオキシダーゼ溶液濃度を 5mg/ml とした。この実験では酸化電流値を測定する際に毎回酵素溶液を取り替え、合計 5 回の測定を行った。図から酸化電流値はグルコース溶液濃度に比例して増加することがわかる。また、グルコース濃度 0.01mM 以下ではバックグラウンド電流のノイズの影響で検出電流値のバラツキが大きく、また 5mM 以上では直線性が認められなくなることから、測定可能な濃度範囲は 0.03〜3mM である。固定化型の酵素電極と比較して測定可能な濃度範囲は劣るが、5 回の実験値を比較してその再現性は優れていることが分かる。

3.4.4.2 溶存酸素依存性

グルコースオキシダーゼはその反応過程で酸素を必要とする。したがって低溶存酸素の状態では、センサの感度が低下する可能性がある。これを確かめる目的で、あらかじめ窒素ガスをバブリングすることで溶存酸素濃度を低下させた試料と、窒素をバブリングしなかったものとで、その検出電流値の経時的変化を比較した (図 3-20)。図から明らかなように窒素をバブリングすることにより溶存酸素濃度を低下させた方が感度が低下し、また応答時間に対する時定数も大きくなっている。さらに、溶存酸素濃度の低下は反応そのものの量の減少につながるため、検出電流値のノイズも低下した。また、溶存酸素濃度と酸化電流値との関係を図 3-21 にまとめるが、図から測定試料中の溶存酸素濃度が減少するにしたがって、検出される酸化電流値も減少する傾向が見られる。このことからも試料溶液中の溶存酸素濃度がセンサの感度に影響を与えることが分かる。

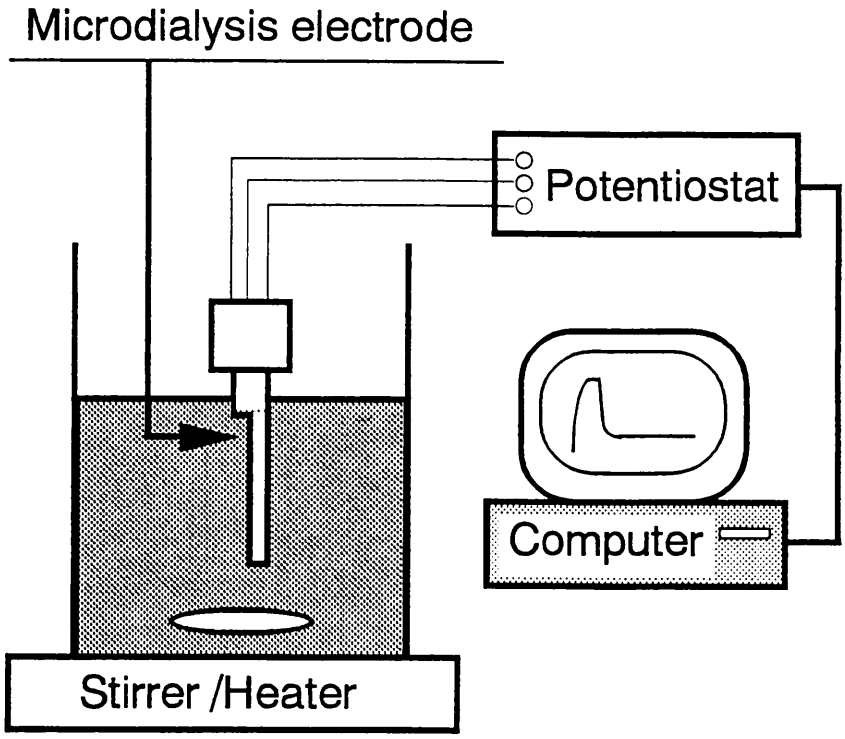


図3 - 18　実験装置概略図

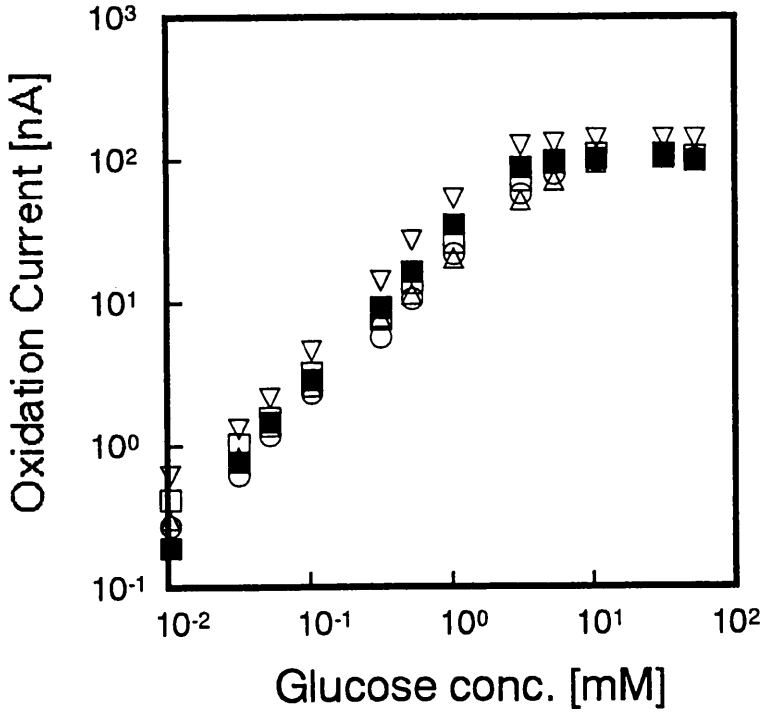


図3 - 19　微小透析バイオセンサの
Glucose濃度依存性

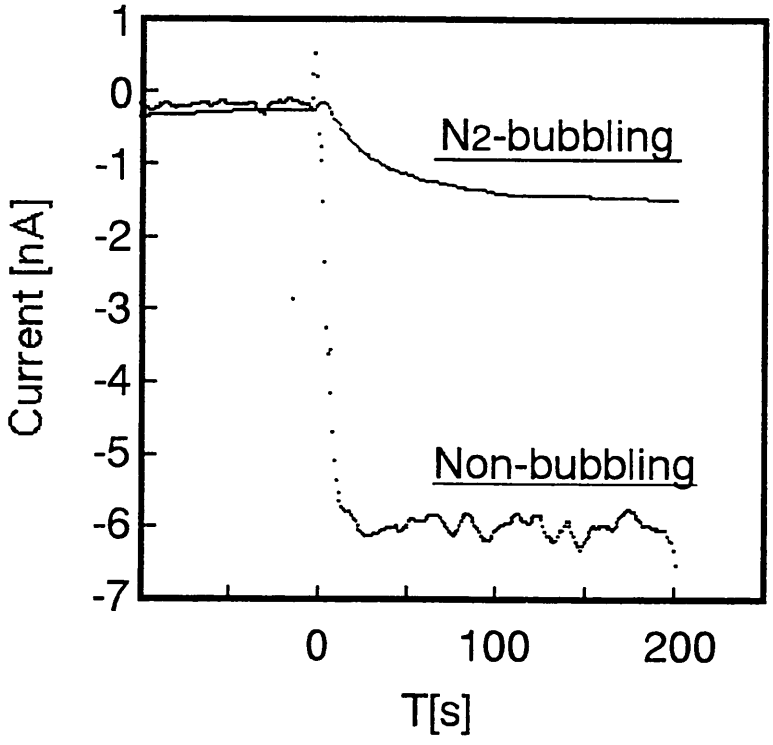


図3 - 20　溶存酸素の影響

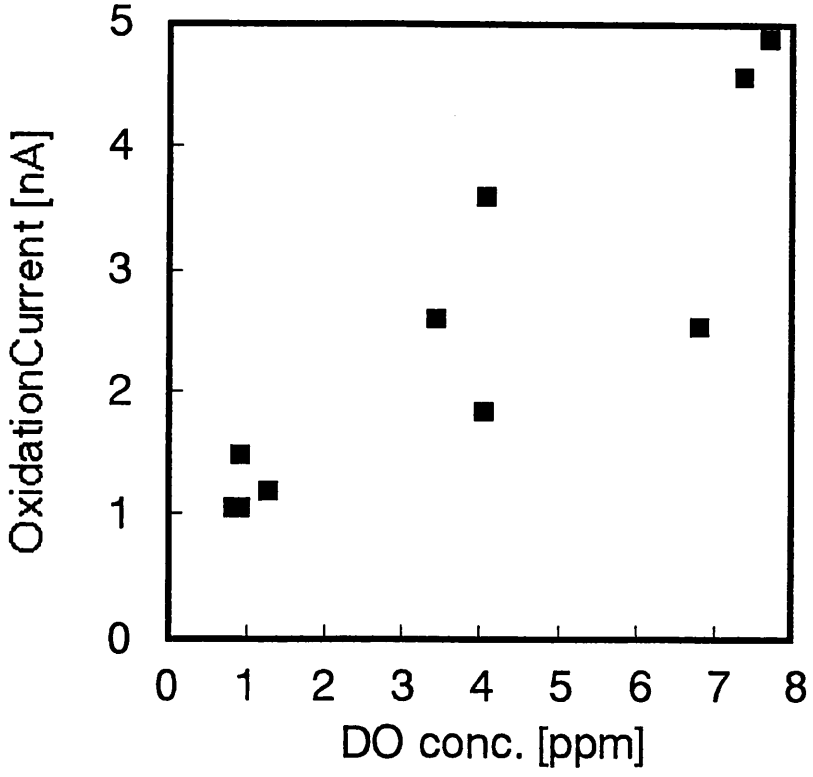


図3 - 21　溶存酸素濃度と酸化電流値との関係

3.4.4.3 メディエータの導入

酵素反応で酸素の変わりの電子受容体としてフェロセンを用いたが、今回の実験でもフェロセンを電子メディエーターとして用いた。結果を図 3-22 に示す。図に示すように、N_2 バブリングによって溶存酸素濃度を低下させた測定溶液と、通常の測定溶液との両方をプロットしているが、両者に応答の違いがほとんどないことが分かる。このことからフェロセンをメディエータとして用いることで、測定溶液中の溶存酸素濃度の影響を解消することが出来ると考えられる。

また、フェロセンを用いることで検出電流のノイズが減少するが、これは電子受容体として酸素が働く場合、透析膜を通して測定溶液中から浸透し、さらに酵素溶液中で拡散して作用電極表面付近まで到達することでその役割を発揮するためであると考える。フェロセンの場合、膜での浸透および酵素溶液中での拡散という経路を考えない分だけ酵素反応がスムーズに起こり、ノイズが減少するものと考える。これに対して、酵素溶液を酸素で飽和させて測定する方法もあるが、その煩雑さと生体内での使用ということを考えると、フェロセンを用いた方が有効であると考える。

また、応答時間は 30 秒程度であり、固定化型の酵素センサと比べるとわずかに遅いが十分実用的な応答時間であると判断する。

3.4.4.4 グルコース濃度と酸化電流値との関係

フェロセンを酵素溶液中に溶解していない場合のグルコース濃度と酸化電流値との関係を図 3-23 に、溶解した場合のものを図 3-24、図 3-25 に示す。図 3-23、3-24 ではグルコースオキシダーゼ濃度は 1.0mg/ml、図 3-25 では 0.5mg/ml である。実験ではグルコースオキシダーゼ濃度を、0.1、0.5、1.0、5.0、10、15、30mg/ml と変化させた。その結果、0.5mg/ml 以上の濃度でよい直線性を得ることが出来た。また、これらの各酵素濃度の値の中でも、より安定していたものはグルコースオキシダーゼ濃度が 0.5、1.0、5.0mg/ml の場合であった。この三つの濃度と比べると他の濃度のセンサでは再現性の点でバラツキが大きく、また酵素溶液の濃度と測定限界濃度の上限は必ずしも比例しないことが分かった。また、測定可能なグルコース濃度範囲を調べた結果、グルコースオキシダーゼ濃度が 0.5mg/ml と 1mg/ml のものが、グルコース溶液濃度 0.03〜10mM と他の濃度の酵素溶液と比べて一番広い範囲の測定が可能であった。この酵素濃度を unit に換算すると 88〜176 units/ml となり、今後 100 units/ml 前後の値がほかの酵素を利用するときの一つの目安になるであろうと考える。

図 3-23 と図 3-24 を比較すると、フェロセンを加えたものの方が再現性がよい。しかし、

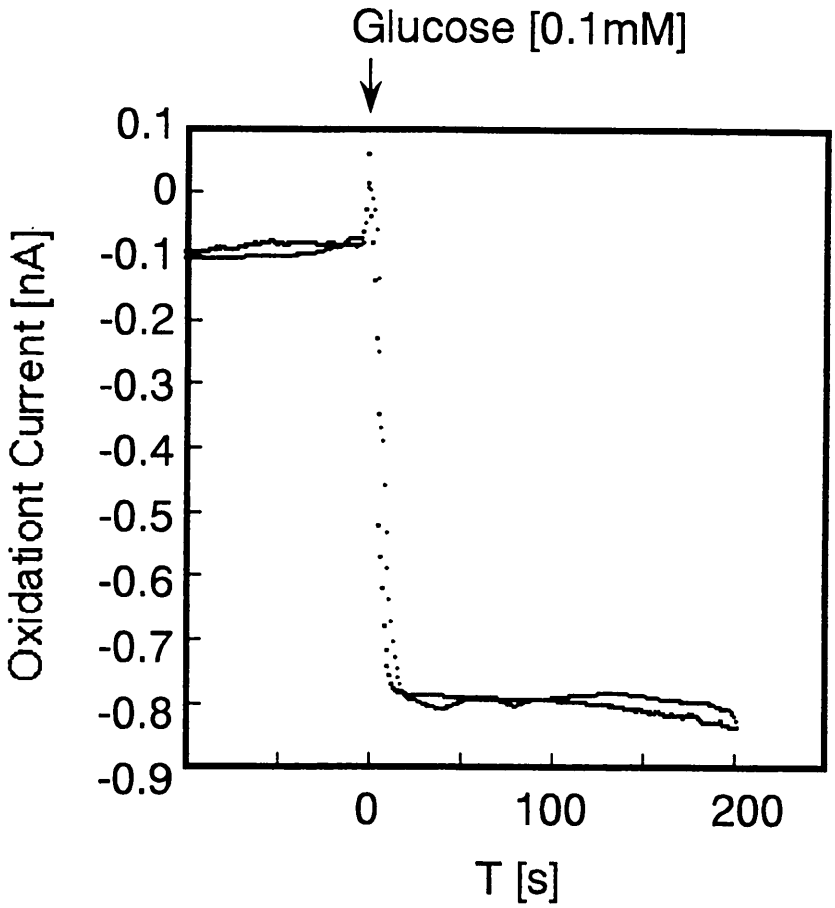


図3－22　フェロセンを用いた場合の
検出電流値の経時変化

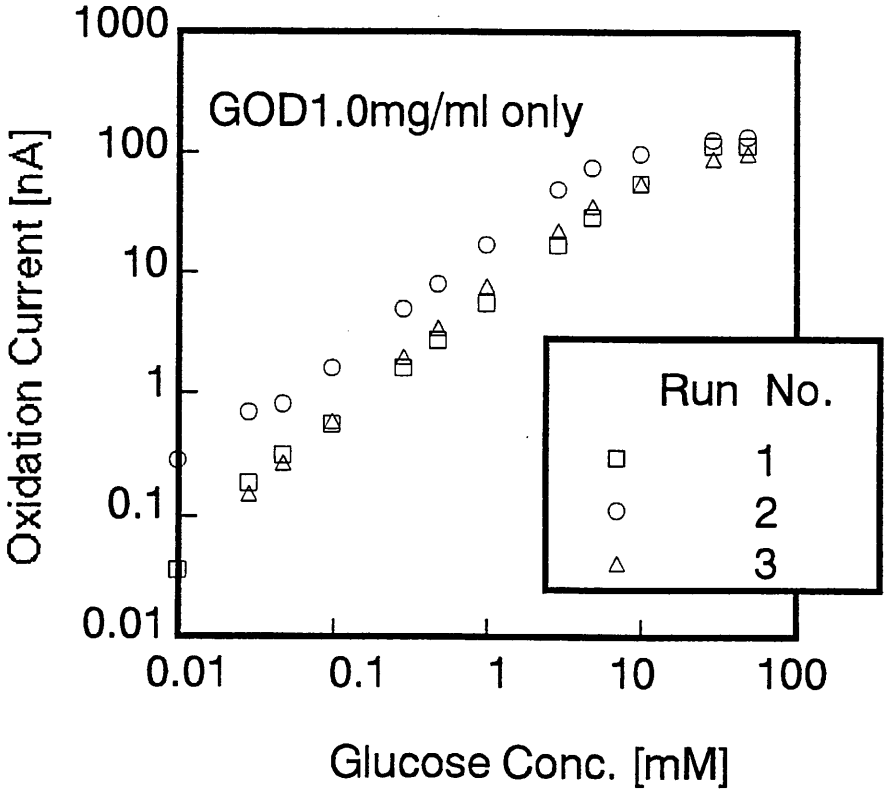


図3－23　グルコース濃度と酸化電流値の関係

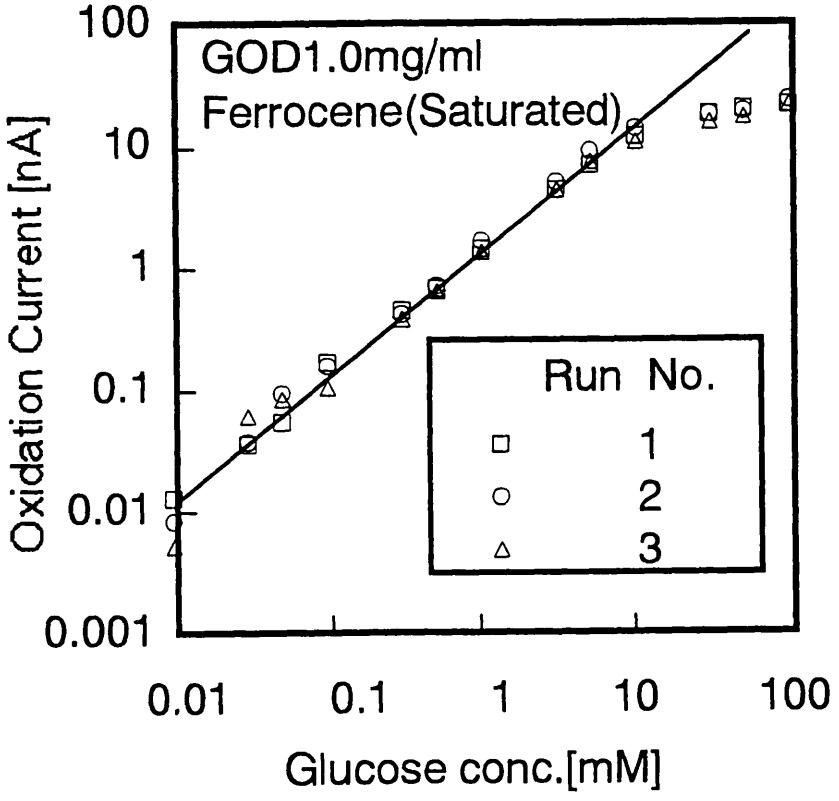


図3-24　グルコース濃度と酸化電流値の関係

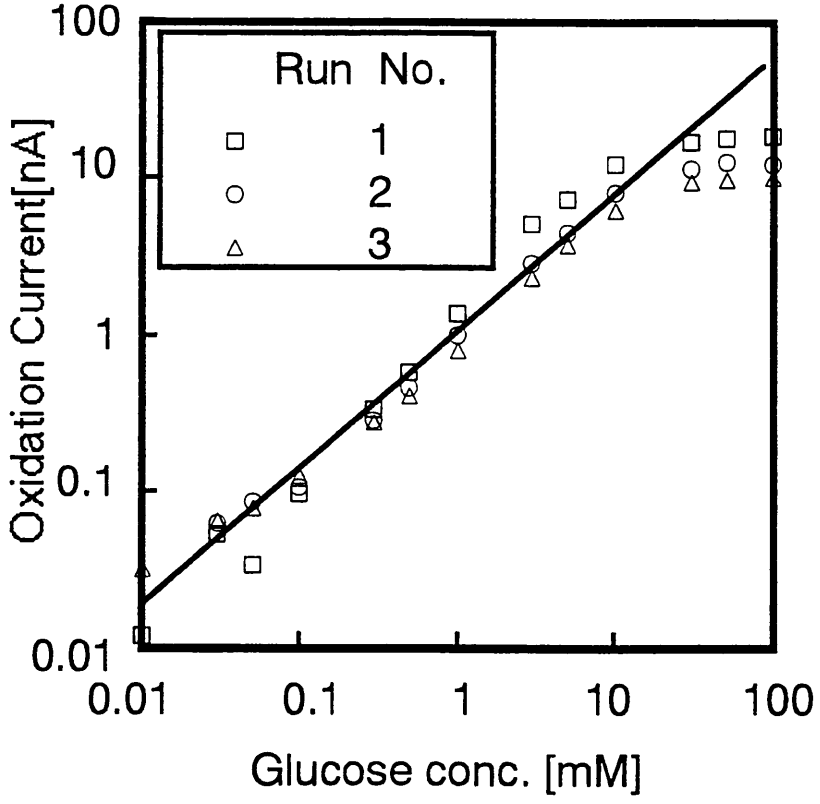


図3-25 グルコース濃度と酸化電流値の関係

グラフの傾きそのものは小さくなっており、感度は低下している。この傾向は他のグルコースオキシダーゼ濃度の場合にもみられた。図 3-24 と図 3-25 とを比較するとグルコースオキシダーゼ濃度が 0.5mg/ml の場合でもバラツキはあるもののグルコース濃度の測定は可能である。

3.4.4.5 温度と pH の影響

酵素活性は温度に依存するため、測定温度はセンサの感度に影響を及ぼす重要な因子である。測定温度と酸化電流値との関係をプロットしたものを図 3-26 に示す。図から本研究における測定温度（25℃）での酸化電流値よりも、実際の生体内の温度（37℃前後）付近での酸化電流値は約 2 倍程度の値を示しす。また 40℃以上で酵素の失活が始まり、感度が減少する。

また酵素には至適 pH があり、センサの識別素子として用いる場合は pH の影響を調べる必要がある。そこで GOD 溶液を pH=5.6、試料溶液のグルコース濃度を 1.0mM に設定し、溶液中のリン酸緩衝液の pH を 5.6〜8.0 まで変化させ、試料溶液中の pH 変化の影響を調べた（図 3-27)。図から pH5.6 から 7.5 の範囲において試料溶液中の pH の影響を受けないことが分かる。これは酵素が透析膜によって外液の pH 変化から保護されているためと考えられる。

3.4.5 まとめ

(1) 微小透析バイオセンサを利用することにより、グルコース濃度と酸　化電流値との間に良い直線関係が得られ、グルコースオキシダーゼ濃　度 100 units/ml においてその測定範囲はグルコース濃度 0.03〜10mM であった。

(2) 固定化型酵素電極と同様に電子メディエーターとしてフェロセンを導入することで、測定試料中の溶存酸素濃度の影響を解消することができた。

(3) 微小透析バイオセンサは pH で 5.6〜7.5 の範囲で、温度では 40℃まで測定可能であり、生体内においては十分にその機能を果たすことが期待できる。

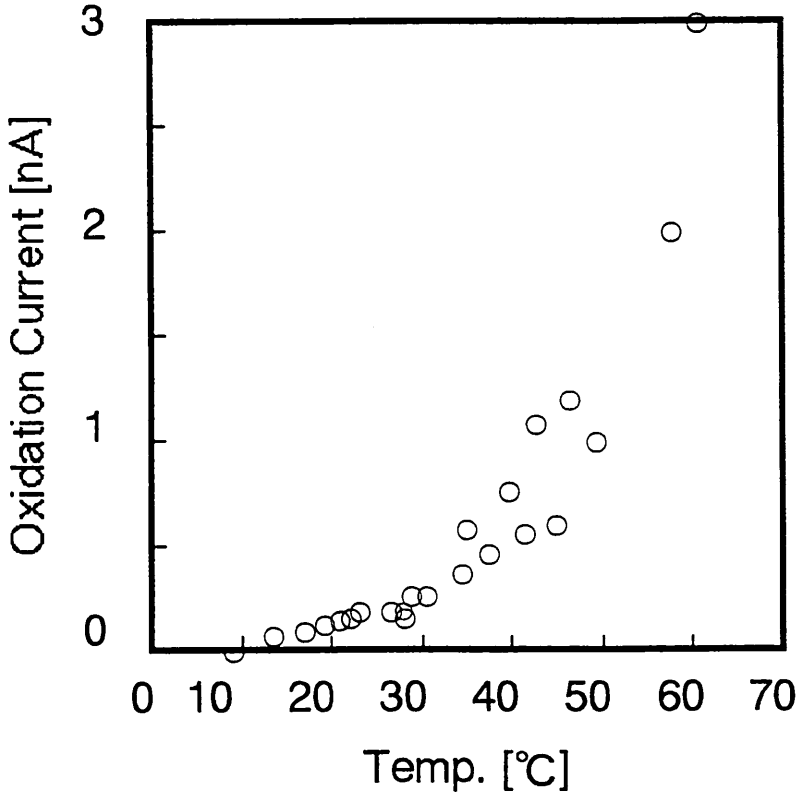


図3－26 グルコース応答に対する温度の影響

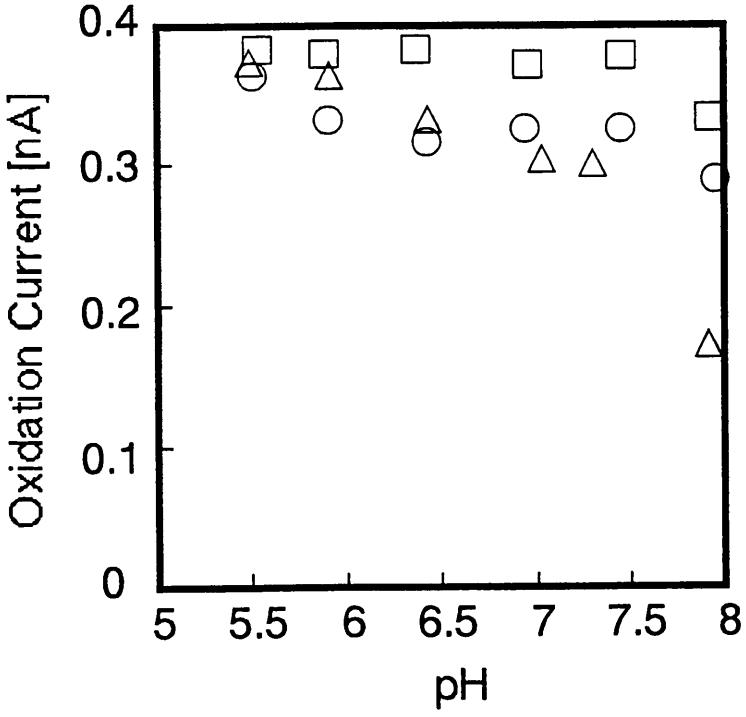


図3 - 27 pHの応答への影響

4. 微小透析バイオセンサの水環境計測への応用

4.1 はじめに

有害化学物質による水環境汚染は、近年の深刻な地球環境問題である。従来の機器分析による水質分析では、簡便性及び迅速性を欠き、またサンプルの前処理などが煩雑であることから、十分な対応ができないのが現状である。

本研究で検討した微小透析バイオセンサは、微小透析膜内での酵素反応によって生成する過酸化水素を電気化学的に検出・定量することを測定原理としている。したがって、農薬や重金属などによってその活性が阻害されるような酵素を選択することにより、迅速、簡便かつ多機能な水質分析のための微小透析バイオセンサを開発できると考えられる。

4.2 測定原理

酵素アセチルコリンエステラーゼ(AChE)およびコリンオキシダーゼ(ChOx)を 50mMTrIs-塩酸緩衝溶液に溶解し各 100U/ml の混合酵素溶液とした。それを、電気化学検出器の白金作用電極を封入した直径 220μm の透析膜チューブ内に充填した（図 4-1)。本センサは酵素溶液の充填された透析膜部分を試料に浸漬して測定に用いるが、透析膜チューブの分子量 Cut-off は 50000 なので、高分子である酵素は膜チューブ内から流出することはない。一方、試料中(膜外)に存在する基質アセチルコリン(ACh)や阻害物質は膜チューブ内に容易に拡散・流入する。この ACh は酵素 AChE によってコリン(Ch)と酢酸に分解され、Ch は ChOx によって過酸化水素と Betaine に分解される。この過酸化水素は白金作用電極に 550mV の電圧を加えることにより容易に酸化され、この時発生する酸化電流値を測定することで、生成した過酸化水素濃度が測定できる。すなわち過酸化水素濃度は酵素活性や基質濃度に依存するので、酸化電流値を測定することで酵素活性や基質濃度の測定が可能となる。

4.3 実験方法

AChE と ChOx の混合溶液をセンサ上部のポリエチレンチューブから透析膜チューブ内に約 10μl 注入する。センサと対極・参照電極を Tris-塩酸緩衝液を満たした試料セル（10ml）中に電極スタンドで固定した。出力電流値が安定したことを確認後、試料セルに 10mM に調整した ACh を 50μl 注入する。注入後スターラーで数秒間攪拌し、出力電流値が定常になった事を確認し、そのときの出力電流値と ACh 注入前の電流値の差を ACh に対する酸化電流値として測定した。試料温度は恒温槽を用いて 24℃に保った。

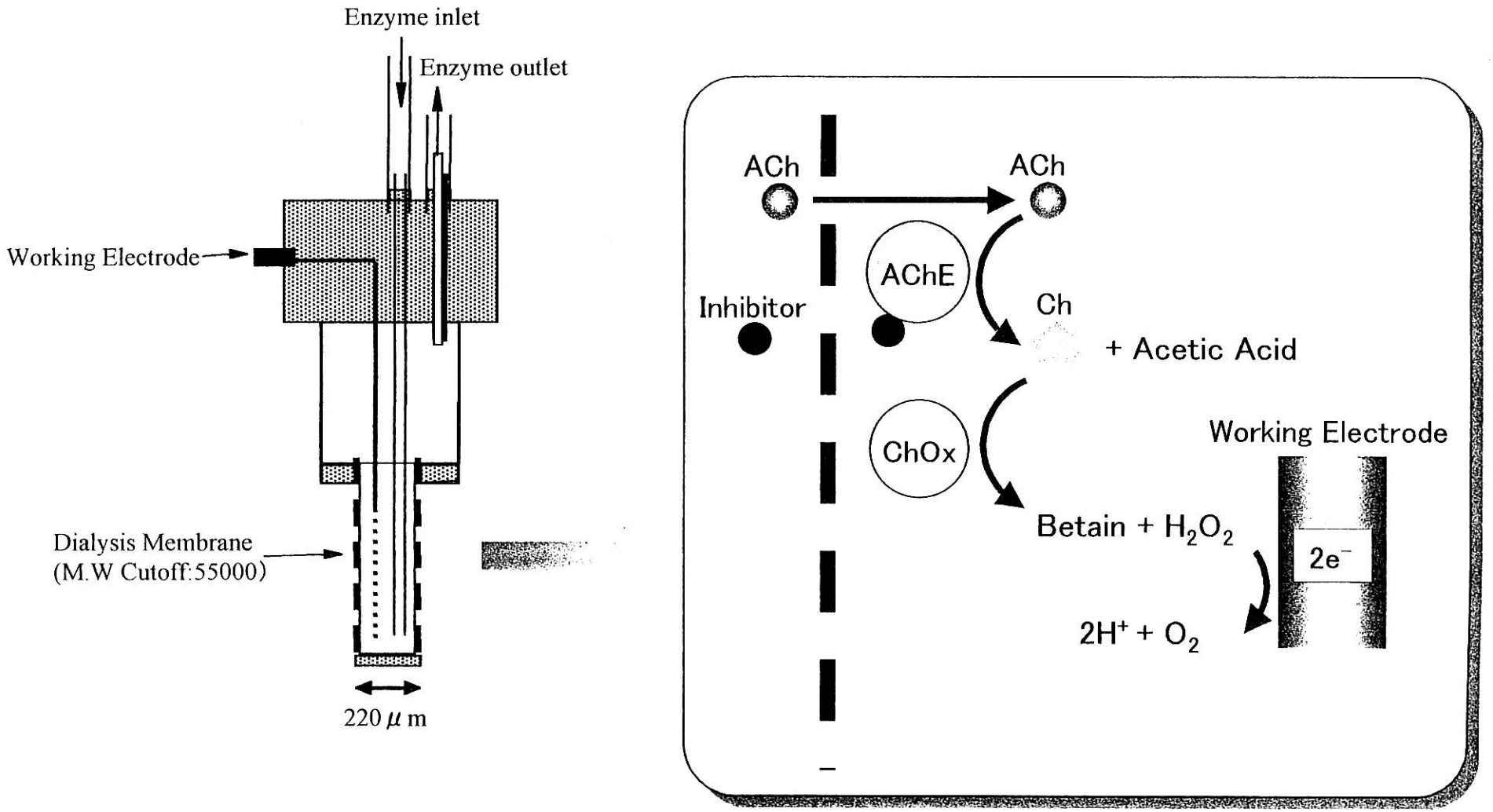


図4-1　バイオセンサの概略及び測定原理

4.4 実験結果

4.4.1 ACh 濃度依存性センサ応答に対する溶液の pH、温度の影響

Dialysis Biosensor の ACh 濃度依存性について検討した（図 4-2)。本実験では酵素溶液濃度は AChE、ChOx 共に 100U/ml とした。酸化電流値は測定毎に新しい酵素溶液と交換し、同一濃度の測定に対し合計 5 回の測定を行った。その結果、ACh 濃度 1μM から 1mM の範囲で酸化電流値は濃度に依存して変化することを確認した。また、ACh 応答の再現性を確認するために同一条件での連続した 10 回の測定を行った結果、良好な再現性が認められた（図 4-3)。

さらに酸化電流値の変化に対する緩衝液の pH および温度の影響について調べた（図 4-4、図 4-5)。基質 ACh の濃度は 50μM と一定とし、温度依存性については同一温度の測定に対し 10 回以上の測定を行った。酸化電流値の大きさから pH8 が、また酸化電流値が安定している測定温度 24℃が最適であると考えられる。

4.4.2 酵素活性の安定性

酵素を室温で放置した場合の安定性について検討した。ここで、酵素活性の変化率は次式より算出した。

$$\text{酵素活性の変化率}[\%] = \frac{A - A_0}{A_0} \times 100$$

A :室温放置の酵素で測定した電流値

A_0:最初に測定した時の電流値

一度解凍・調製した酵素溶液が 4℃での保存でどれくらいの期間活性を保持できるかを調べた（図 4-6)。酵素を解凍・調製した日からの経過日数に対する活性の変化率を求めた。酵素活性の変化率は測定日に解凍・調製した酵素での測定電流値を基準とし、室温保存の際と同様の式で算出した。その結果、4℃での保存で解凍した時点と同じ活性を保持できるのは約 20 日であることがわかる。

4.4.3 酵素反応式のパラメータ推算

微小透析バイオセンサの酵素反応において AChE あるいは ChOx のいずれかの反応が律速であると仮定し、反応式のパラメータを算出した。このため農薬 PHC 0.0、3.0、5.0、10.0 ppm の各濃度における酵素阻害下の条件で、基質 ACh 濃度 100、125、200、400μM での酸化電流値の変化速度を求めた。本来反応速度には生成物質濃度の変化速度を用いるが、本

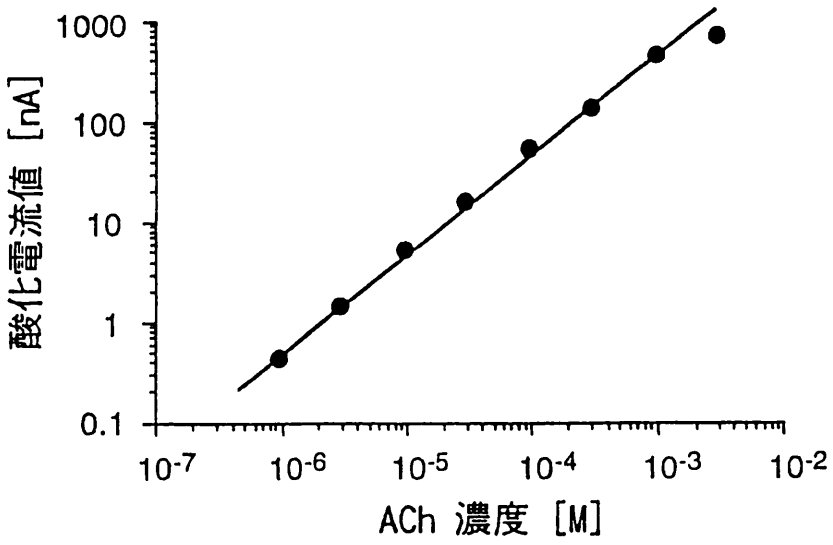


図 4.2　濃度依存性 ACh 応答

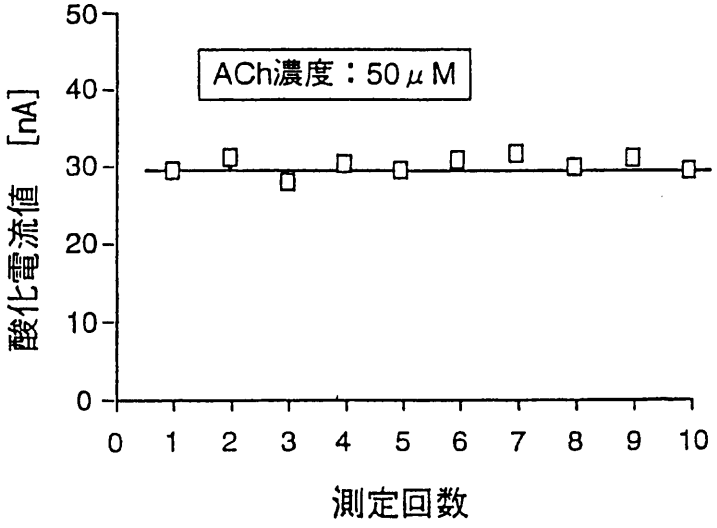


図 4.3　バイオセンサ応答の安定性

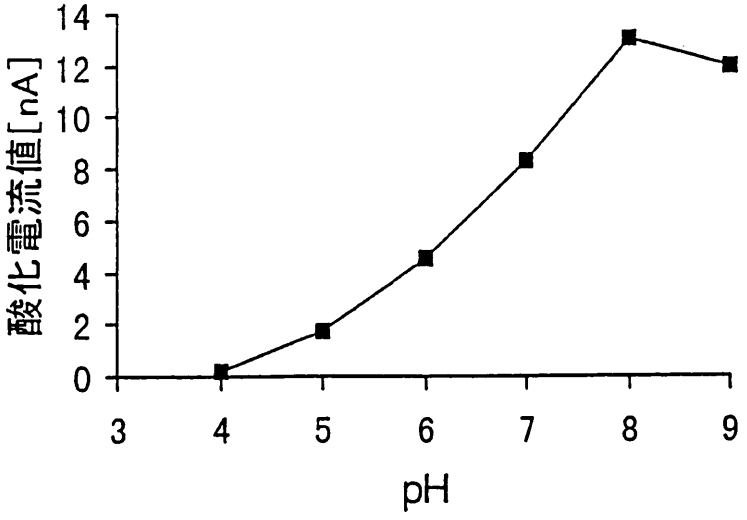


図４.4　酸化電流値に対するpHの影響

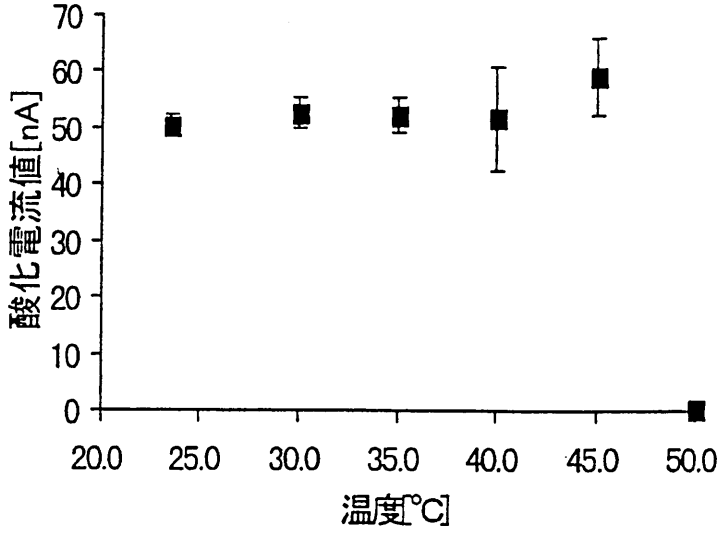


図４.5　酸化電流値に対する温度の影響

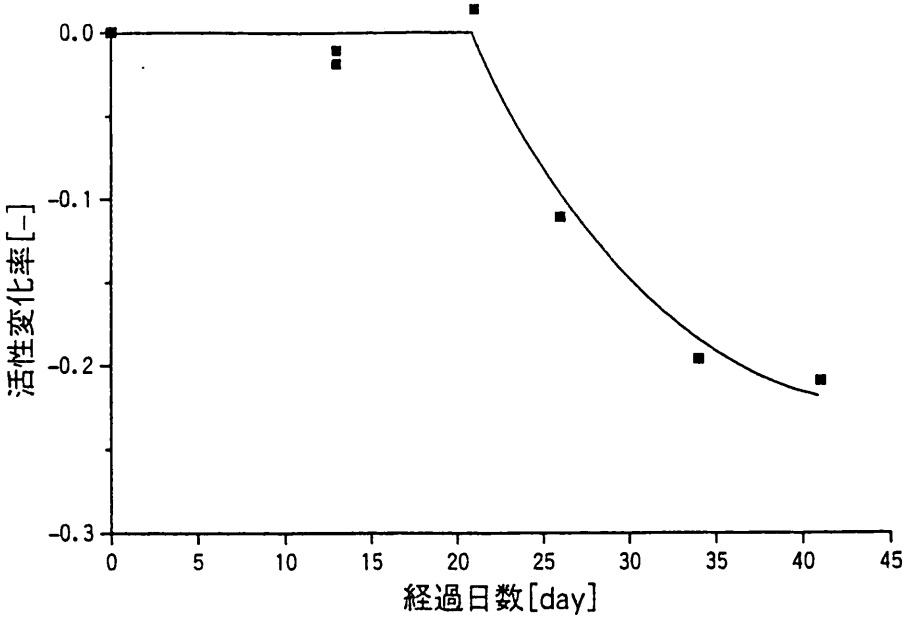


図4.6　冷蔵庫内保存による酵素活性の変化

研究で用いたセンサは酸化電流値を出力するため、電流値の変化速度を用いた。酸化電流値は生成物質である過酸化水素の濃度に比例しているため、濃度の代わりに電流値を用いることができると考えられる。基質濃度に対する電流値の変化速度の両逆数プロットを作成した結果、各 PHC 濃度に対する直線が Y 軸上の 1 点で交わることから、PHC による阻害は拮抗阻害であると考えられる。また、各パラメータは

最大反応速度　V_{max}＝333.0[nA/s]

Michaelis 定数 Km=5.6×10^3[μM]

阻害定数 Ki=3.9×10[μM]

となり、酵素反応式は

$$V=\frac{3.3\times10^2[S]}{5.6\times10^3\left[1+\frac{[I]}{3.9\times10}\right]+[S]}$$

V: 電流値換算の反応速度 [nA/s]

[S] : 基質濃度 [μM]

[I] : 阻害物質濃度 [μM]

となる。

4.5 まとめ

(1) 本センサを用いるのに最適な温度は 24℃、最適な pH は 8 である。

(2) 室温で酵素活性が維持されるのは約 24 時間、冷蔵保存では 20 日程度である。

(3) 本研究で用いたセンサによる農薬の検出が可能である。

(4) センサ内での反応について AChE および ChE に関する総括の反応を考えると、各反応パラメータは、以下のように推算できる。

最大反応速度　V_{max}＝333.0[nA/s]

Michaelis 定数 Km=5.6×10^3 [μM]

阻害定数 Ki=3.9×10[μM]

$$反応速度\ V=\frac{3.3\times10^2[S]}{5.6\times10^3\left[1+\frac{[I]}{3.9\times10}\right]+[S]}$$