

内21-7

早稲田大学大学院理工学研究科

## 博士論文概要

### 論文題目

生体機能を模倣した  
バイオセンシングシステムの開発  
Development of biosensing systems  
imitating bio-functions

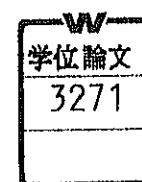
### 申請者

青柳 里果

SATOKA AOYAGI

応用化学専攻 化学工学研究

2001年10月



理 2642 (3271)

人工臓器の一部をになうものとして医療用バイオセンシングシステムを開発した。生体がセンサ的機能を持つことに着目し、生体機能を化学工学的に解析し、バイオセンサへの応用を試みた。第二章で述べる免疫センサでは、抗原抗体反応という特異性の高い反応をセンシングに利用した免疫測定法に reagentless な系を導入した。第三章で述べる化学発光を利用した測定法では、生体内のラジカル生成反応を模倣し、アデノシン三リボスフェイト (ATP) 測定法に応用した。また、新しい化学発光装置を免疫測定法に応用した例についても述べる。第四章では、汚染がされやすく、また粘度が高い特殊な試薬を用いる発色反応を透析治療の現場で用いられるように、簡便で低コストなシステムを構築したエンドトキシン測定法について述べる。第五章では、非線形現象を考慮することによって、酵素電極を利用した従来の測定法を高機能化できることを示した。

第二章では、蛍光発光を利用した reagentless 免疫測定法について述べる。臓器移植に伴う拒絶反応のモニタリングは重要であり、これまでに様々な免疫測定法が開発されている。そのほとんどは標識物質との結合物と遊離物の分離洗浄操作を必要とする分離免疫測定法である。酵素活性や蛍光発光特性の変化が試料量に応答することを利用して、分離洗浄操作なしで測定できる非分離免疫測定法は均一系では開発されているが、不均一系への応用例はない。非分離免疫測定法の中でも、蛍光強度の変化を利用した蛍光増強法に注目し、試薬を固定化した不均一系測定法の開発を試みた。固定化試薬を用いた非分離免疫測定法が実現すれば、試薬の無供給 (reagentless) での測定が可能となる。

具体的には、蛍光团でタンパク質を標識して、その挙動を観測するという手法<sup>4)</sup>を応用し、蛍光標識した抗原（抗体）に抗体（抗原）を反応させ、そのときの蛍光特性の変化から、抗体（抗原）を定量する測定法を試みた。免疫グロブリン G (IgG) をモデル試料として、IgG と特異的に反応するプロテイン A に蛍光試薬フルオレセインイソチオシアネート (Fluorescein isothiocyanate : FITC) を標識した試薬を固定化し、蛍光強度の IgG 応答性を検討した。プロテイン A に IgG が結合することによって FITC 周囲の環境が疎水化され、FITC 蛍光発光に変化が生じることが予想された。これまで、固定化担体として、ナイロン膜、アミノシリコン化ガラスおよびポリスチレンプレートを用い、いずれの場合でも IgG 濃度に応答した蛍光強度増強が確認された。ガラス表面への固相化が可能であることから、この方法は光ファイバーへ応用できると考えられる。

第三章では、ラジカル生成反応を利用した化学発光測定法について述べる。ATP は、

生体反応のエネルギー源として重要な物質である。また、ATP および ADP は代謝経路をはじめとする生体系の調節制御に大きな役割を果たしている。したがって、生体試料中の ATP を定量することによって、生体系の解明が進むと期待されるが、その測定方法は多くない。そこで、既存法とは異なるコンセプトによる ATP 測定法を開発した。それは、ATP および ADP によるフェントン試薬からのヒドロキシリジカル生成促進を利用したルミノール化学発光による ATP および ADP 測定法である。この方法の特徴の一つは、ATP および ADP の両方が測定できる点である。ATP と ADP の混合液をクロマトグラフで分離して別々に測定する方法はあるが、ATP と ADP が混合した状態で両方を測定できる方法はない。

さらに、化学発光法の新しい発光装置の開発に取り組んだ。ルミノールなどの化学発光物質は、過酸化水素の分解で生じるヒドロキシリジカルによって励起される。化学発光では、発光物質、過酸化水素、過酸化水素を分解する触媒を混合して発光させるため、溶液の混合状態によって発光が影響を受けるという問題がある。そこで、特定の場所で電位を印加し、任意に発光させることができる電気化学発光法を開発することによって、化学発光の制御が容易となった。しかし、電位印加に用いた白金板は過酸化水素を分解する触媒であり、それ自体がルミノールを発光させることができる。また、そのときのルミノール発光強度は過酸化水素濃度に依存した。そこで、このシステムを均一系の免疫測定法に応用し、生体内タンパク質アルブミン定量法を開発した。

第四章では、流れを考慮したモニタリングシステムについて述べる。腎不全患者の治療において、透析器の使用に伴って外因毒素であるエンドトキシンが体内に流入することが問題となっている。これは、現行の透析システムに有害物質を感知し、排除する機能があれば回避できる現象である。エンドトキシンの検出には、エンドトキシンと特異的に反応するカブトガニ血中成分を主成分とする発色性リムルス試薬が使用される。エンドトキシンは大気中にも含まれるため、テスト中に汚染する危険性が高く、操作は煩雑で透析治療中のモニタリングに不向きであるため、単一チューブ内にリムルス試薬と試料を混合・反応させるシステムを開発した。しかし、リムルス試薬の粘度が高く、チューブ素材に吸着しやすいため、長期間の正確なモニタリングは困難であった。そこで、反応チューブ内に一時的に乱流を発生させ、試料と試薬の混合効率を高め、また洗浄用の回路を設置することによって、前測定時に吸着したリムルス試薬の影響を回避し、長期間のモニタリングを可能とした。

第五章では、非線形現象を利用した測定法について述べる。バイオセンサでは、化学反応が信号発信の媒介となっている。したがって、センサの応答性は反応工学的に

制御される。バイオセンサの代表例として、酵素電極型グルコースセンサを取り上げ、酵素電極に酵素の on-off 制御および過渡状態での測定を実行し、従来のセンサの機能向上を図った。

一般的なグルコースセンサはグルコースを酸化する酵素グルコースオキシダーゼ (GOD) を電極上に固定化し、酵素反応を電流値で検出する原理であり、電流値から間接的に基質濃度が求められる。酵素反応による生成物ではなく、反応に伴う電子の授受を直接検出する場合には、電極と酵素間の電子の授受を円滑に行うために、酵素の電極への固定に導電性高分子やメディエータが用いられる。体内に埋め込むことを目的として、微小針型電極を用いたグルコースセンサが開発されている。現在、体内埋込型グルコースセンサの寿命は、2 週間程度であり、本格的な使用のためには、さらなる改良が必要である。センサの寿命を制限する大きな因子は、センサ表面の汚れである。センサを体内で使用すると、センサ表面へのタンパク質の吸着および組織の付着によって、センサの応答性が低下する。

そこで、センサ表面に汚れが生じてもセンサ性能を低下させない工夫として、酵素活性を電気化学的に on-off 制御した過渡電流測定法を開発した。この方法では、酵素固定化電極にパルス的に電位を印加し、off 時間を十分に取ることによって、電極表面に生じる試料（グルコース）の濃度勾配を常に小さく抑えている。従来のセンサで問題となっていた、表面の劣化とともに濃度勾配が経時的に大きくなり、最終的には応答がなくなる現象が起こらず、センサ表面にタンパク質などが吸着しても、センサの応答性は下がることなく、長時間の連続使用が可能となった。

以上のように、従来法の改良、もしくは新しい測定原理を考案することによって、さまざまな状況に応じたセンシングシステムを開発した。バイオセンサの開発においては、試料を認識する化学反応の部分からシグナルを検出する装置的な部分まで総合的なシステムを化学工学的に至適化する必要がある。