

早大学位記 報告番号
2003 | 3696 | 甲 1843

3696

内23-21

早稻田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

新規バイオセンシングシステムの開発
Development of a New Biosensing System

申請者
遠藤 恒介

Kosuke Endo

応用化学専攻 化学工学研究

2003年 11月



バイオセンサは特異性が高く、小型化が比較的容易であることを利点として、生体情報のモニタリングに幅広く用いられている。医療現場においては、そこから得られた情報を元に、患者の Quality of Life を向上させるための改良が重ねられる。医療機器の進歩に伴い、病態管理や性能評価に必要とされる計測技術も、新たな測定対象、新たな測定方法が必要となる。本論文では、中空糸透析膜の溶質除去能の向上に伴う新しい監視システムとして、ヒト血清アルブミンモニタリング法を開発した。また、様々な疾患の要因として注目されている活性酸素について、新規測定法を開発し、*in vivo*、*ex vivo*での測定、および中空糸透析膜に関する新規生体適合性評価法を開発した。

1. 電気化学発光による免疫定量法を用いた透析治療監視システムの開発

近年、透析治療に用いられる透析器の溶質除去能は飛躍的に向上しており、より大きな分子量の病因子質の除去が可能となっている。しかし、それに伴い有用物質の漏出量も増大するという問題が生じている。そのため、透析液中に漏出した有用物質を連続的に監視するセンサの開発が望まれている。ここでは、透析排液中の漏出物のうち、代表的なタンパク質であるヒト血清アルブミン（HSA）の定量法を検討した。有効な定量法として、免疫定量法が挙げられるが、現在実用化されている方法では、吸着や洗浄操作を繰り返す必要があり、連続定量が不可能である。そこで、当研究室で開発した電気化学発光を利用した免疫センサを定量法として用いた。適切な標識法を決定するため、グルタルアルdehyド法およびマレイミド法による luminol 標識 anti-HSA を用い、luminol 標識 anti-HSA 濃度と発光強度の関係を比較した結果、マレイミド法が再現性に優れており、標識法として適切であることがわかった。マレイミド法による luminol 標識 anti-HSA を用い、PBS 中および透析液中の HSA 濃度を測定したところ、HSA 濃度の増加に伴って発光強度も増加し、良好な濃度依存性が得られた。次に、透析排液中の HSA を定量し、ラテックス凝集免疫比濁法による測定結果と比較、検討した。その結果、ラテックス凝集免疫比濁法による結果と良い相関が得られた。今後、装置をフローインジェクション方式にすることで、リアルタイムで HSA が定量できると考える。透析法が on-line HDF の場合、電気化学発光法では誤差も大きく、HSA を定量できなかった。これは、on-line DHF では、低、中分子量タンパク質が多く漏出し、luminol の発光機構に何らかの影響を及ぼしているためと考える。

2. 酵素固定化電極を用いた新規スーパーオキシドモニタリングシステムの開発

生物は、必要な場所では活性酸素やフリーラジカルを產生し、不必要な場所では有効に消去する防御能を有している。しかし、この活性酸素產生と消去のバランスが崩れると、DNA 損傷や殺菌力の低下など様々な障害が發生する。また、老化や細胞の癌化も活性酸素種による DNA 損傷の結果であると考えられており、様々な生命現象の解明、もしくは酸素の毒性とその対処法を知るために、生体局部での活性酸素濃度のモニタリングが望まれている。そこでここでは、活性酸素の1つであるスーパーオキシド (O_2^-) の定量を目的とする。酵素固定化電極を用いた電流値測定法により、*xanthine oxidase* (XOD) による *xanthine* の酸化において生成する O_2^- を測定した。

Pt 線に、 O_2^- の消去剤である superoxide dismutase (SOD) およびメディエータをグルタルアルデヒドにより固定化し、作用極とした。メディエータは、電子の流れを円滑に進めるための電子運搬体として機能する。作用極の検出部以外をガラスチューブにて絶縁したのち、対極であるステンレスチューブで被覆した針型のセンサを作成した。ポテンシオスタットにより対極に対して +0.5 V の電位を印加した。測定にはバッチセルを用い、 O_2^- 生成には *xanthine* の XOD による酸化反応を利用した。pH 7.4 の PBS により希釀した *xanthine* 溶液に XOD 溶液を添加して酵素反応させ、生成する O_2^- による電流値の変化を測定した。

O_2^- 生成により電流値が変化し、定常に達した。その定常電流値は、酵素である XOD 濃度 0 ~ 50 mU/ml の範囲において、良好な濃度依存性を示した。また、水溶液系では精度の高い測定が可能な 2-methyl-6-p-methoxyphenylimidazopyrazinone (MPEC) を用いた化学発光法の結果も同様の挙動を示したことから、SOD 固定化電極を用いることで O_2^- のモニタリングが可能であることが示唆された。12 週齢の高血圧とエンドトキシンショックの両病態、および健常ラットの摘出心臓、腎臓、肝臓からのスーパーオキシドの生成量を測定した。測定には、フローセルを用いた。測定部の直前に設置した充填槽に各摘出臓器組織をお充填した。緩衝液として Krebs-Henseleit buffer を用いた。対極に対して +0.5 V の電位を作用極に印加し、電流値の変化をチャートレコーダーで検出した。その結果、健常ラットの摘出臓器からは O_2^- の生成は検出されなかつたのに対し、両病態モデルラットの摘出臓器からは、スーパーオキシドの生成が確認された。両病態とも、心臓における O_2^- の生成は極微量であったのに対し、肝臓、腎臓では著しい O_2^- 生成が確認された。エンドトキシンショックでは肝臓、高血圧では腎臓において顕著に増加した。

3. 化学発光によるスーパーオキシド測定による 中空糸透析膜の新規評価法の開発

現在、透析操作による活性酸素種 (Reactive Oxygen Species) 产生と合併症の関係が注目されており、血液と中空糸透析膜との接触による活性酸素生成の膜素材による差異が検討されている。ここでは、活性酸素の中でも特に多くの毒性機構が知られている O_2^- に着目し、活性酸素の消去活性・透過能による中空糸透析膜の評価法の開発を目指す。 O_2^- 検出には、酵素固定化電極による電気化学的手法を用いたセンサを用いた。 O_2^- の消去酵素である SOD および電子運搬体となるメディエータを Pt 線電極表面に固定化して、SOD の酸化電流値より O_2^- 濃度を測定した。中空糸透析膜を浸漬させたバッヂセル、および透析器ミニモジュールを用いたフローセルにおいて、xanthine/XOD から生成する O_2^- の濃度低下を測定した。測定の結果、バッヂセル、フローセルとともにビタミン E による抗酸化活性が確認された。しかしバッヂセルでは再生セルロース (CE) 膜、ポリスルホン (PS) 膜に O_2^- 消去活性の違いは認められなかったのに対し、フローセルでは PS の方がスーパーオキシド濃度が減少していた。このことから、フローセルの場合、 O_2^- 消去活性のみならず、 O_2^- の膜透過の影響を受けていると考えた。そこで、 O_2^- の膜透過を評価するために、化学発光を利用した O_2^- 測定法を開発した。中空糸透析膜外側において、基質である xanthine の XOD による酸化反応により、 O_2^- を生成させた。生じた O_2^- は MPEC と反応して発光する。光ファイバにより中空糸内側の発光強度を測定し、透過した O_2^- を検出することで、中空糸透析膜による O_2^- 透過能の違いを明らかにすることを目的とした。

代表的なサンプルとして、CE 膜、PS 膜について、両中空糸膜表面に固定されているビタミン E の有無による O_2^- 透過能を評価した。結果、MPEC の発光による peak height、peak area は、CE 膜、PS 膜ともに、ビタミン E 改質膜では発光強度が減少し、ビタミン E の抗酸化活性が確認できた。また、CE 膜と PS 膜以外に、エチレン・ビニルアルコール共重合体樹脂 (EVAL)、ジエチルアミノエチル修飾セルロース (DEAE)、ポリアクリロニトリル (PAN)、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリアリレート樹脂/ポリエーテルスルホン樹脂共重合体 (PEPA) について、膜厚と O_2^- 透過能の関係を調べた。その結果、非対称膜である PS 膜と PEPA 膜以外の均質膜については、膜厚の大きなものほど発光強度は小さく、 O_2^- の中空糸膜透過は膜厚に依存することが分かった。

以上、本研究により開発したバイオセンサは、生体における基礎研究から、医療機器の開発段階における性能評価、臨床使用時の監視システムまで、幅広い用途で活用できる。