バイオセンサーの最新動向

村上裕二・民谷栄一・軽部征夫

1. はじめに

バイオセンサーは生体分子や組織などが持つ反応選択性を認識素子として利用し、そこで起こる物理・化学的变化を電極などのトランスデューサーを用いて検出するものである。

バイオセンサーの構成例として、酸素電極や過酸化水素電極上に固定化酵素膜を配置したものがある。これは、酵素反応にかかわる基質や反応生成物を、電気化学的に活性な物質である酸素や過酸化水素の増減を測定することによって検出しようとするものである。この場合酵素が認識素子で、電極がトランスデューサーである。現在ではさらに様々な認識素子やトランスデューサーの組み合わせが検討されている。以下に最近の話題をいくつか紹介する。

2. ルシフェラーゼ組み換え溶原大腸菌を用いた変異原センサー

環境に放出された数多くの化学物質の中でも、特に発ガン性を持つものが社会的な問題となっている。環境保護や公衆衛生の点から、これらを迅速で簡便に測定する方法が求められている。発ガン性試験にはサルやマウスなどの実験動物を用いる方法の信頼性が高いが、きわめて多くの時間と費用を必要としている。そのため、微生物を用いるエイムス試験やレックアッセイなど、変異原のプレスクリーニング法が開発されてきた。

一方、微生物を固定した膜と電気化学デバイスとを組

み合わせた微生物センサーが開発され、これを用いた変異原センサーも作製されている[1]。これは微生物の呼吸活性を電気化学的に計測する原理に基づいており、変異原により変異を受けた微生物の活性の変化を調べ、測定物質の変異原性を評価するものである。しかし呼吸活性を基準とするため、変異原以外の殺菌能力を持つ化学種の影響をも受けてしまうという欠点があった。

著者らはホタルルシフェラーゼ遺伝子を大腸菌に溶原化することによって、迅速で簡便な変異原の測定法を開発した[2]。この組み換え大腸菌は、ファージである λ gt10をベクターとしホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入したものである。これだけではリプレッサーを持たず溶原菌にすることができないので、 λ imm434を同時に導入した。実験条件の最適化は、変異原の代わりに適当な時間紫外線を照射することによって行った。

測定法は次のとおりである。変異原としてマイトマイシンCを加え培養すると、先のファージは増殖型になり

図1 溶原菌を用いる生化学発光の原理

村上裕二氏

民谷栄一氏

軽部征夫氏

業新聞社, 1991) などがある。趣味は映画鑑賞。

軽部氏は教授, 工学博士。生物工学, 生物電子工学を専門とされ, 昭和61年日本化学会学術賞, 平成2年市村学術賞を受賞された。著書に「バイオエレクトロニクスの未来」(NTT出版, 1992)「酵素応用のはなし」(日刊工業新聞社, 1990)他多数。趣味は自動車, 機械いじり。

本稿ではバイオセンサーの最近の研究について解説いただいた。

Recent Trends in Biosensors

筆者紹介 YUJI MURAKAMI, EIICHI TAMIYA, and ISAO KARUBE

Research Center for Advanced Science and Technology, the University of Tokyo 東京大学先端科学技術センター

村上氏は博士課程(生物工学), 工学修士, 趣味は合唱
民谷氏は助教授, 工学博士。生物工学, 応用分子生物学を専門とされ, 昭和63年日本化学会進歩賞を受賞された。著書に「マイクロマシンの工学的実現」(共著, 日刊工

ホタルルシフェラーゼが発現し、組み換え大腸菌の溶菌でルシフェラーゼが放出される(図1)。37℃で約1時間の培養ののち、系中にATPとルシフェリンを加えると、触媒であるルシフェラーゼ濃度に依存した発光反応が起こる。これを光電子増倍管によって検出した。紫外線、マイトマイシンCのいずれを用いた場合も、培養が3時間であれば1時間の場合の約2倍の応答を示した。1時間で検出下限は100ng/assayであった。またこの方法ではアジ化ナトリウムなどの変異原でない毒物に応答しなかった。

3. 生体の臭覚機能を模したにおいセンサー

生活の豊かさが高まるにつれて、においや香りに対する関心が高くなってきた。また環境計測や医療、および食品工業でのプロセスモニタリングなどの面で、におい物質を検出することが非常に強く求められるようになってきた。

従来、においの評価方法としては、ガスクロマトグラフィ法やマスマスペクトロメトリーのような機器分析法と、人間の臭覚を利用した感応試験法とが一般的である。しかしながら、これらの評価法にはまだまだ問題点が多い。前者の場合は試料のサンプリングが煩雑で、高価な装置が必要であり、リアルタイムの測定ができないなどの問題点がある。一方、後者の場合には感受性や個人差や順応、疲労などがあり、結果が環境や生理的心理的な条件の影響を受けやすく、客観性に乏しく、信頼性が低いといわれている。

このような背景から、人間と同じ様なおい検知機構を有し、かつ個人差や順応、疲労がなく、オンライン測定が可能なおいセンサーの開発が望まれている。

Sauerbrey は水晶振動子表面でわずかな質量変化が起こるときの共振周波数差が質量変化に比例することを導いた。またこのことを利用して微量でんびんとして利用できることも示唆した。たとえば9 MHzで、直径5 mmの水晶振動子を用いると、1 ngの質量変化で約1 Hzの周波数変化が起こる。

一方栗原らは、脂質がにおい物質に対する感応素子として機能することを示した。著者らは、このことを利用し天然脂質を感応膜として水晶振動子により吸着量を測定することによって、におい物質の計測が可能であることを示し、相対的な感度で比較するとその応答パターンがそれぞれ異なることから(図2)、このパターンを利用したにおいの識別の可能性を示唆した[3]。天然脂質にはフォスファチジルエタノールアミン、アゾレクシン、卵黄レシチン、コレステロールなどを用いた。

著者らはトランスデューサーにSAWデバイスをを用い

— acetoin --- amyl acetate menthone

PG: フォスファチジルグリセロール, LA: リピッドA, PI: フォスファチジルイノシトール, PE: フォスファチジルエタノールアミン, PS: フォスファチジルセリン

図2 各種におい物質の応答パターン

ることでさらに10倍高感度に同様のにおい物質の計測が可能であることを示した[4]。SAWデバイスは水晶板上にとりつけられている2組のくし形電極からの高周波信号による表面弾性波(Surface Acoustic Wave)を用いる圧電素子で、水晶振動子よりも小型・集積化が可能で感度も高いことが知られている。

また6チャンネルの水晶振動子やSAWデバイスを用いてニューラルネットワークによる認識も行った[5]。臭覚は味覚とともに化学感覚であり、数多くの種類の化合物を識別できる。この臭覚の識別能力は、中枢神経系におけるネットワークにおいてにおいを高度に情報処理し知覚・認識するしくみができていることにもよっている。

このニューラルネットワークに関しては、すでに人工的なアルゴリズムが提案されている。すなわちシナプスに相当するユニットが数層の論理的な構造をなし隣接する層のユニット同士が、興奮性または抑制性の結合をする。この結合パラメーターを学習(バックプロパゲーション)により最適化するものである。これにより6チャンネルの入力で、7種のにおい物質に対し200回以上の学習を行うと、物質によっては最高99%以上で、平均でも75%以上の確率で認識できることを示した。

4. DNA センシングシステム

特定の DNA を検出することは、医療、食品製造プロセス、環境計測などの分野で極めて重要とされている。特に遺伝病は DNA の変異が原因とされており、発病前に診断を行うには迅速で簡便な検出法の確立が必要となる。DNA や RNA には相補的な結合をする性質があり、この分子識別能を利用して診断を行う。すでに DNA 診断にはこの性質を利用したサザンハイブリダイゼーション法が用いられている。この方法は、DNA プローブとハイブリダイゼーション後に未反応のプローブと反応したプローブとを分離し、結合したプローブ量を測定する。しかし分離操作を必要とするため煩雑になり、通常 3~5 日程度の日数が必要としている。また感度向上のためにアイソトープを使用すればきわめて危険な操作を必要とする。

そこで著者らは蛍光偏光解消法を利用することによって、この分離操作を行わずに溶液状態のままハイブリダイズした DNA 量を測定した [6]。以下にその測定原理を示す。まず蛍光物質である FITC で DNA プローブの 5' 端を修飾しておく。蛍光を測定する際に励起光を、例えば鉛直方向に偏光したとする。さらに蛍光を鉛直方向、水平方向のそれぞれについて測定する。溶液中の蛍光物質が完全に静止していたとすると、蛍光も鉛直方向に偏光したものしか観測されないが、実際には励起から発光までの間にも回転運動などを行っているため、水平成分も観測される。ハイブリダイズしていないプローブはハイブリダイズしたプローブに比べて溶液中を自由に運動でき、そのため強く偏光異方度が解消される。実際には十分時間が経てば多少のミスマッチの塩基があってもハイブリダイズしてしまう。したがって初期の蛍光

図3 ミスマッチ塩基を有するターゲット DNA のハイブリダイゼーション

偏光異方度を指標とすれば、ハイブリダイズした DNA 量を知ることができる。

pBR322 プラスミド DNA の 540bp 断片中の 3 個あるいは 6 個のシトシンをチミンに変化させた試料を用いて時間経過を調べた (図 3)。その結果、ミスマッチの塩基数が増加するにつれ、蛍光偏光異方度の増加が小さいことが明らかになった。遺伝病の遺伝子の変異タイプには、塩基置換や遺伝子の欠出、挿入などがあるが、PCR 法を併用することによって白血球細胞試料中の遺伝子を測定できることも示されている。

5. 脳・神経研究用微小グルタミン酸センサー

神経情報の伝達はシナプスを介して神経トランスミッターが放出されることにより行われる。神経トランスミッターとしてはアセチルコリン、アミノ酸、神経ペプチドなどが知られている。これらの物質は、長期・短期記憶、うつ病、分裂病などの精神病、アルツハイマー病などの老人病、ストレス、不安感などの情緒作用、さらには痛みに至るまで様々な脳神経作用と密接に関連している。しかしながら、こうした神経トランスミッターを直接モニタリングする方法に開発は極めて立ち遅れており、リアルタイムにかつ空間分解能 (シナプス間隙から 1 神経細胞のレベル) の優れた *in vivo* 測定方法の開発が、脳・神経科学上強く要望されている。

著者らは白金を被覆した微小なカーボンファイバー電極を用い、これにグルタミン酸オキシダーゼを固定化した微小グルタミン酸センサー作製し (図 4)、実際に神経細胞から放出されるグルタミン酸を測定した [7]。中枢神経系の中でも、小脳は解剖学的あるいは神経生理学的にもよく解析されている部位である。また最近では小脳皮質に存在するプルキンエ細胞が平行線維及び登上線維からの共同した興奮性入力に対して、長期間にわたり伝達効率の低下を起こす長期抑制現象についての研究が注目されている。このような可塑性を示すシナプス

A: 酵素固定化膜 B: 電解メッキにより作製した白金ディスク
C: カーボンファイバ D: ガラスキャピラリー E: 銀ペースト
F: シリコン樹脂 G: リード線
(酵素固定化膜部分の直径は約 15 μ m)

図4 微小バイオセンサの構成

図5 小脳切片におけるカリウム刺激後のグルタミン酸の放出パターン (センサは分子層に設置)

において神経伝達物質の濃度変化を直接的に測定することは極めて意義深いと考えられる。

リンガー緩衝液を灌流させた容器にラットの小脳皮質の切片を置き、その分子層と呼ばれる領域にグルタミン酸センサーを設置し、脳切片を高カリウムイオン溶液で刺激したときに観察された応答を示す(図5)。高カリウムイオン溶液の灌流にともない、S/N比の高いピーク応答値が観察された。30分後に同様な操作を行ったところ再びピーク応答値が観察された。つぎに、高カリウムイオン溶液による刺激を交互に行ったところ、グルタミン酸放出はカルシウムイオンの存在が必要であることが確認できた。

こうした研究により記憶の分子メカニズムが明らかになり、人工頭脳を構築するための重要な知見を提供できると考えられる。またグルタミン酸は、脳障害により虚血状態になったときに多量に放出され、これによって脳細胞が破壊、死にいたることも知られている。そのため現在製薬会社などが中心となってグルタミン酸遮断薬が研究されている。このセンサーはこうした薬剤の効果を評価するにも適用できるため、新薬開発にも貢献できるであろう。

6. マイクロマシーニング技術を用いるフロー型バイオセンシングシステム

最近、バイオセンサーの微小化・集積化が求められている。例えば医療分析では、微量なサンプルで複数の測定が必要である。また環境モニタリングなどのように野外での測定が必要な場合もあり、センシングシステム全体の小型化により携帯性を向上させることも要望されている。バイオセンシングシステムを構成するポンプ、酵素固定化部位、検出用電極やフローセルなど各デバイスの微小化およびそれらの一体化などが重要な研究課題と

図6 センシングシステムの作製プロセス

なっている。

一方 IC 製造技術に代表されるマイクロマシーニング技術を利用し、モーターやポンプなどの機械的デバイスを微小化する研究が注目を集めている。なかでもフォトリソグラフィー技術は実用段階としてすでにサブミクロンのオーダーに達しており、複雑なパターン形成を可能にしている。これに高品位な成膜技術や、結晶の性質や反応性ガスの進入方向を制御するなど、特定の方向へ選択的に行う異方性エッチング技術などを組み合わせることにより複雑な3次元構造の作製を可能にしている。また静電的な力や圧電素子の利用により可動デバイスの作製が可能になった。さらに作製した微小デバイス同士を接合させる方法の一つとして陽極接合法がある。この方法は、加熱したガラスと金属を重ねておき、ガラス側が負になるように電圧を印加すると、界面に起こる電場の作用により容易に均一な接合ができることを利用したものである。

すでにガスクロマトグラフィーやフローインジェクション分析、キャピラリー電気泳動などの試験的なシステムが作製されている。われわれは、マイクロマシーニング技術を用いて微小な酵素反応カラムを作製して、フロー型バイオセンシングシステムを構築しその特性評価を行った。さらに検出用電極を同一基板上に一体化したシステムを構築し、その特性を評価した。

測定原理は緩衝液をキャリアーとして試料を導入し、酵素反応カラム内で反応したのち電気化学フローセルにおいて反応生成物である過酸化水素量を測定するもので、既存の電気化学的な検出を行う酵素 FIA と同様である。

微小酵素反応カラムは以下のように作製した。直径2インチのシリコン基板を用い、まず試料導入口とV型微細溝を、フォトリソグラフィーと異方性エッチングを用いて作製した(図6)。V型微細溝は幅0.1mmで1枚の基板に長さが2.5mなら1本、1mなら2本作製した。また検出用電極は、パイレックスガラス上にクロムを接着層として金を真空蒸着しフォトリソグラフィとエッチングを用いて作製した。このシリコン基盤とガラスとを陽極接合しカラムとした。

次に作製したカラムに酵素を固定化するために、カラムの内面に共有結合法でグルコースオキシダーゼを結合させた。さらにフランジ型メスコネクターを試料導入口上に接着した。これをHPLC用のポンプ、インジェクタおよび電気化学検出器などと接続してフロー分析システムを構築し、グルコースに対する応答を調べた。

長さ2.5mの酵素反応カラムを用いたシステムでリン酸緩衝液をキャリアーとし、流速0.06ml/minで、グルコースに対して直線的な応答を得た。一回の測定に要する時間は約2分で繰り返し再現性はCV=4.6% (n=17)であった。さらに1mの反応カラムと電気化学検出器を同一基板上に作製し、その特性を評価した。流速0.01ml/minで、デバイス中の金電極により応答を調べたところ、グルコースに対しておよそ1mMから25mM

程度での直線的な応答が得られた。この範囲は人の血糖値域とほぼ一致する。また0.2 μ lという極めて微量な試料での測定が可能であった。以上のように半導体微細加工技術を用いてフロー型バイオセンシングシステムを微小化し、集積化することが可能であることを明らかにした。

7.まとめ

以上のように概してバイオセンサーの研究は、感度の向上だけでなく様々な測定の対象を迅速で簡便に測定できることを目的としている。そのためトランスデューサー側の研究として微小化、集積化、多機能化を、生体素子側の研究では新しい物質や複合的な要因の測定を可能にしている。このほか広く民生用として利用するための研究開発が進んでおり、将来非常に大規模な市場も予想されている。

参考文献

- 1) Nakahara, T. et al., Anal. Chem., 61, 2388 (1989)
 - 2) Lee, S. M. et al., Anal. Chem., 64, 1755 (1992)
 - 3) Muramatsu, H. et al., Anal. Chim. Acta, 225, 399 (1989)
 - 4) Chang, S.M. et al., J. Biotech., 16, 211 (1990)
 - 5) Chang, S. M. et al., Sens. Actuators, B 5, 53 (1991)
 - 6) Herning, T. et al., Anal. Chim. Acta, 244, 207 (1991)
 - 7) Tamiya, E. et al., Anal. Chim. Acta, 251, 129 (1991)
- (平成4年9月25日受理)

第6回エラストマー討論会

主 催：(社)日本ゴム協会

協 賛：(社)繊維学会ほか

日 時：平成4年12月3日(木)～4日(金)

場 所：大阪科学技術センター (大阪西区靱本町1-8-4
電話06-443-5321)

登録費：正会員 *6,000円(期限内)、7,000円(11月15日以降)、学生3,000円(期限内)、4,000円(11月15日以降)、会員外9,000円(期限内)、10,000円(11月15日以降)いずれも消費税を含む。

*賛助会員は、2名まで。また、協賛団体会員は、正会員扱いといたします。

登録方法：所定の登録用紙(コピー可)を使用し、登録費とともにお送り下さい。

ミキサー：参加費 5,000円(含消費税)

連絡先：〒107 東京都港区元赤坂1-5-26 東部ビル
(社)日本ゴム協会 エラストマー討論会係

東海シンポジウム-重合化学のフロンティア-

主 催：高分子学会東海支部

協 賛：繊維学会東海支部ほか

日 時：平成5年2月1日(月)、2日(火)

会 場：名古屋通信ビル (名古屋市中区千代田2-15-18
電話052-263-5221 地下鉄鶴舞線 鶴舞駅下車 1番出口すぐ)

参加要領 1) 定員 100名 2) 参加費(予稿集代含む) 会員 9,273円、会員外 20,600円、学生 2,060円 3) 申込方法 氏名、勤務先、電話番号、会員番号を明記し、宛名を記入した返信用ハガキを添えて、下記申込み先へお申込下さい。 4) 申込締切 1月18日

申込先 〒460 名古屋市中区栄2-17-22 中部科学技術センター内 高分子学会東海支部 箕浦昭明
電話052-231-3070

連絡先 〒441 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1 豊橋技術科学大学 5系 伊藤浩一 電話0532-47-0111 内線443