Measurement of glycolysis related compounds by microbiosensors

マイクロバイオセンサによる糖代謝関連物質の測定

Kouji SHIMAZAKI, Kazuko INOUE, Takashi UENO, Hiroyuki KOBAYASHI
Sinichi SAKANO, Yuichiro UEDA, Keita JINBO and Kentaro YODA

Department of Bio-Medical Engineering, Tokai University

317 Nishino, Numazu, Shizuoka, 410-03 JAPAN

TEL:81-559-68-1111, FAX:81-559-68-1156

(Accepted for publication 16 November 1995)

Microbiosensors for glucose and lactate measurement were constructed by coating of hydrogen peroxide electrode 800 μm in diameter with immobilized enzyme layers. The sensors were applied to the determination of glucose and lactate in mammalian cell culture media and human saliva.

Key words: Glucose sensor, Lactate sensor, Melanoma cell, Cultured neuron, Saliva

I. INTRODUCTION

中心代謝経路である解糖系により、グルコースは好氣的条件下ではピルビン酸を経由して炭酸ガスと水に酸化分解されるが、嫌氣的条件下ではピルビン酸は乳酸に還元される。骨格筋では激しい運動による嫌氣的解糖によってATPを供給して乳酸が生成するので、スポーツ医学においては乳酸の生成と消失が重要な指標となる。また、糖尿病などの代謝異常や循環障害においては、グルコース、ピルビン酸、乳酸の濃度は種々の要因の影響を受けるために、これらの疾病の病態の指標として重要である。一方、培養動物細胞においても糖代謝産物としての乳酸が生成するので、エネルギー源であるグルコースとともに乳酸の濃度管理が重要となる。本研究においては、糖代謝の指標となるグルコースおよび乳酸を測定するためのマイクロバイオセンサを作成し、培養動物細胞系および唾液中の成分測定に応用した。

II. EXPERIMENT

グルコースおよび乳酸センサは、Fig. 1に示すようなPt陽極とAg/AgCl陰極からなる直径800 μm の自作した過酸化水素電極表面にセルロースアセテート(CA)膜を被覆し、グルコースオキシダーゼ(GOD)またはラクテートオキシダーゼ(LOX)を下記の手順で固定化して作成した。

5%CA溶液(CA 0.125g、溶媒としてのアセトン2.375ml)にエタノール2.5mlを加えた溶液に過酸化水素電極(以下電極)を約10秒間浸し、均一にCA膜を被覆した。乳酸センサの場合はLOX 7mg、牛血清アルブミン(BSA) 5mg、pH 7.0の0.1Mリン酸カリウム溶液(KPBS) 0.125ml、4%のグルタルアルデヒド(GA) 0.05mlを混合した溶液を作成した。グルコースセンサの場合はGOD 4mg、BSA 2mg、0.25%GA 0.15mlを混合した。上記の混合溶液に電極の先端を数秒浸し、その後10分間乾燥させる操作を4回繰り返し、それぞれの酵素を架橋反応により固定化させた。

各バイオセンサの測定原理をFig. 2に示した。グルコースセンサ、乳酸センサを1mMEDTA溶

FIG. 1. Schematic diagram of hydrogen peroxide electrode.

FIG. 2. Principle of enzyme sensor.

液を含有したK P B Sに浸して安定化させた。グルコースセンサについてはp H 7.0の0.05 M酢酸ナトリウムバッファに一定量のグルコースを溶解した標準溶液を使用し、乳酸センサについてはK P B Sに一定量の乳酸を溶解した標準溶液を使用して検量線を作成した。

人メラノーマ樹立細胞株細胞 (ATCC # 1619) をダルベコ改変イーグル培地にて 5×10^4 cells/mlに希釈して35 mmベトリディッシュに接種し、5%炭酸ガス含有空気下に37℃にて一定時間静置培養した。

エーテル麻酔した7週令Jcl:ICR雄マウスより摘出した脊髄後根神経節をコラーゲナーゼ処理とトリプシン処理をした後、バーコール密度勾配遠心法により神経細胞を分離した。分離した神経細胞を牛胎児血清10%含有ハムF-12培地に浮遊させて、 3.4×10^4 cells/mlずつポリ-L-レジンコート35 mmベトリディッシュに接種し、5%炭酸ガス含有空気下に37℃にて4時間静置培養した後、培地および非壁着性細胞を除去した。新鮮培地200 μ l、神経成長因子 (7s NGF) 200 ngを添加して一定時間培養した。

一定時間ごとに採取したマウス神経細胞培養液および人メラノーマ細胞培養液試料についてそれぞれ測定を行い、検量線より試料中のグルコースと乳酸の濃度を求めた。

成人男子の健康者1名にエアロバイクを心拍数140~160拍/分になるように負荷を調節しながら20分間施し、負荷前、負荷後の混合唾液をそれぞれ約3 ml採取した。次にこの混合唾液中の乳酸を5分以内に測定し、その後、グルコースを測定した。

III. RESULT AND DISCUSSION

グルコースおよび乳酸センサの検量線をそれぞれFig. 3およびFig. 4に示した。グルコースについては5~50 mg/dl、乳酸については0.05~0.55 mg/dlの範囲で良好な直線関係が認められた。また、両センサの応答時間は30秒であり、測定は極めて短時間に実施できた。

人メラノーマ細胞を7日間培養した際の培養液中のグルコースおよび乳酸濃度を測定した結果をFig. 5に示した。培養時間とともにグルコース濃度が減少し、乳酸濃度が上昇している。これは、細胞内においてグルコースがエネルギー源として消費され、糖代謝の最終産物として乳酸が分泌された結果を示している。培養時間の経過に伴って細胞は分裂増殖し、初期値 5×10^4 cells/mlから7日目には 7.5×10^5 cells/mlにまで増加した。

マウス神経細胞を5日間培養した際には培養液中のグルコースは殆ど消費されず、一定値168 mg/dlを示した。また、乳酸は検出されなかった。一方、培養期間中に神経細胞の数はほぼ一定で、神経線維の伸長は認められたが細胞の増殖は観察されなかった。

運動負荷前の唾液中のグルコース濃度と負荷後の濃度はそれぞれ12 mg/dlおよび4.2 mg/dlとなりグルコース値は減少した。一方、負荷前後の乳酸濃度はそれぞれ0 mg/dlおよび0.33 mg/dlとなり負荷により上昇した。激しい運動負荷による嫌気性代謝が進行し、グルコースがエネルギー源として消費され、乳酸が生成する過程をよく反映しているものと考えられる。

本研究のマイクロバイオセンサは微量サンプルでの測定が可能、生体への挿入が容易などの特徴があり、糖尿病管理、スポーツ医学、培養プロセス管理など多方面での利用が期待できる。

FIG. 3. Standard curve for glucose analysis.

FIG. 4. Standard curve for lactate analysis.

FIG. 5. Concentration of glucose and lactate in culture medium: $\square$ glucose, $\circ$ lactate

REFERENCES

- 1 K.Yoda, T.Tsuchida, H.Takasugi, Ann.N.Y.Acad.Sci., 613 410 (1990)
- 2 K.Yoda, T.Tsuchida, H.Takasugi, Ann.N.Y.Acad.Sci., 750 175 (1995)

'95 SAS Intelligent Symposium