膜 セ ン サ ー*

化学物質を識別する機能性膜とその応用

鈴木 周 一・相 沢 益 男**

東京工業大学資源化学研究所

227 横浜市緑区長津田

要 旨 化学物質を識別する機能性膜を電気化学デバイスと組み合わせると膜センサーを構成できる。従来固体膜、液膜、あるいは高分子膜などが膜センサーに用いられてきたが、最近各種の生物活性物質を固定化した新しい生物機能性膜が開発された。選択的反応性を示す酵素膜あるいは選択的親和性を示す抗原（抗体）膜などはその代表的な例である。これらの生物機能性膜の出現によって、酵素センサー、免疫センサー、酵素免疫センサー、オルガネラセンサー、微生物センサーなどの新しい膜センサーが次々に創案された。

1. はじめに	6. オルガネラセンサー
2. 化学物質を識別する機能性膜	7. 生物化学指標としてのヘモグロビン膜の応用
3. アフィニティーメンブランポテンシャル	8. 微生物（膜）センサー
4. 酵素（膜）センサー	9. むすび
5. 酵素免疫センサー	文 献

1. はじめに

最近生体膜機能をモデルとしたいわゆる機能性膜の開発とその応用が世界的に注目されている¹⁾。生体膜機能を標榜しても、それを必ずしも具現化するまでには至っていないのが現状であるが、その端緒が見出されつつあり、部分的ではあるが生体膜機能を人工膜に賦与することに成功した例も現われてきた。とくに特定化学物質を識別する機能を有する膜の出現によって数多くの膜センサーが可能となった^{2,3)}。ここでは進展の目ざましい膜センサーの研究動向を、機能性膜の立場からまとめてみたい。

2. 化学物質を識別する機能性膜

(1) 化学受容器

* Membrane Sensor: Use of Functional Membranes Capable of Recognizing Chemical Substances

** Shuichi Suzuki and Masuo Aizawa: Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology (Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 227)

生体には、味覚や嗅覚のように化学物質に応答する化学受容器 (chemoreceptor) があることはよく知られている。化学受容器の詳細な機構は明らかでない点も多いが、基本的スキームは Fig. 1 のようであると考えられている。すなわち化学受容器には、味物質や臭い物質のそれぞれに対応した受容物質が固定化された膜があり、膜表面において受容物質は特定化学物質と複合体を形成するとされている。多くの場合、複合体の形成によって、膜の構造変化が誘起され、その結果膜電位が発生すると考えられている。しかし受容物質との複合体がさらに化学

Fig. 1 化学受容器における基本的スキーム

反応を行い、反応生成物が膜の構造変化を誘起する場合も当然考えられる。いずれの場合においても、膜が化学物質を識別し、その結果が電気信号に変換されている。このような膜は、特定物質の化学情報を識別し、変換することが出来る機能性膜である。化学受容器こそこれから述べる膜センサーの基本的モデルである。

(2) 膜による化学物質の識別

化学物質を識別し得る膜は数多く開発されてきた。その主なものを Fig. 2 に示す。これらの膜には、特定物質のみを選択的に識別するものから、構造あるいは特性の類似した物質群を識別するものなどが含まれる。Fig. 2 は膜機能に着目した分類であり、今後とも次々と新しい機能性膜が開発されるものと思われる。化学物質の識別機能の発現要因としては一応次の諸点が考えられる。

i) 膜細孔と透過分子径

膜細孔の孔径をコントロールすることによって、透過分子の選別を行える。たとえば膜細孔を小さくし、膜マトリックスを疎水性とした膜は、水溶液を透過せず、低分子気体のみを透過する。気体透過性のシリコン膜、テフロン膜、ポリプロピレン膜、ポリエチレン膜などがその例である。

ii) キャリア分子との親和性と膜透過性

液膜中に種々のキャリアを共存させ、液膜相にとけにくい化学物質がキャリアとの複合体を形成することによって、膜中を輸送される。環状ペプチドやクラウンエーテルなどをキャリアとする液膜がイオンの選択的透過性を示すことが知られている。

iii) 膜表面受容物質との親和性

膜表面に固定化された受容物質が、対応する特定化学物質と複合体を形成し、膜構造の変化を誘起する。抗原/抗体、凝集原/凝集素、ホルモンレセプターなど特異

Fig. 2 化学物質を識別する機能性膜

Fig. 3 膜センサーの構成

Fig. 4 膜センサーの分類

的親和性を示す組合せの一方を膜に固定化することによって、選択的親和性を膜に賦与できる。

iv) 膜固定化酵素の選択的反応性

酵素の基質となる物質のみが特定の生成物に選択的に変換される。酵素が物質識別機能をもっている。

(3) 膜センサーの分類

古くから知られている代表的な膜センサーは、pH 測定用ガラス電極である。水素イオンを識別するガラス薄膜（固体膜）をはさんで存在する一対の基準電極によって、ガラス薄膜に発生する膜電位が出力として導出される。このように膜センサーは、(1)化学物質を識別し得る膜と、(2)電気信号導出部位、から構成され、化学物質の情報を電気信号に変換する電気化学デバイスである。

ところで化学物質を識別する機能性膜は2種類ある。第1は、上記ガラス薄膜のように、化学物質を識別すると同時に、膜電位など膜の電気的性質が変化する機能性膜。第2は、化学物質を識別するが、膜の電気的性質はとくに変化しない機能性膜である。第1の機能性膜を用いた膜センサーがもっとも基本的な構成であり、直接変換型ともいえる。第2の機能性膜の場合には、何らかの方法で電気信号への変換を行う必要のあるものであり、間接変換型ともいえる。

膜センサーの分類を Fig. 4 に示す。ここではガスセンサーおよびイオンセンサーについては省略し、生物電

気化学センサー (bioelectrochemical sensor) を重点に述べることにしたい。

3. アフィニティーメンブレンポテンシャル

(1) 選択的親和性膜

化学受容器の膜は、特定化学物質に対して選択的親和性を示す。このような選択的親和性膜をつくれないものだろうか。生物活性物質の中には、酵素/基質 (あるいはインヒビターなど)、抗原/抗体、凝集原/凝集素など選択的親和性を示し、複合体を形成する組合せが数多く存在する。これらの組合せのうち一方を膜に固定化すれば、他方の物質に対する選択的親和性膜をつくれるのではないかと著者らは考えた。この考えを具現化するため、抗原抗体の組み合わせについて次の実験を行った。

まず抗原 (antigen) を適当な膜マトリックスに固定化した。膜マトリックスとしては、アセチル化度の異なる種々のアセチルセルロースを用いた。抗原固定化膜を抗体 (antibody) を含有する溶液と反応させれば、Fig. 5 に示すように膜表面に抗原抗体複合体を形成すると考えられる。事実抗原固定化膜は、抗原抗体複合体を形成するとともに、膜電位を変化することが見出された。抗原抗体反応前後の膜電位の変動は、選択的親和性の反応に起因するもので、アフィニティメンブレンポテンシャル (affinity membrane potential) とでも称されるべきものである。しかも膜電位発生の機構を検討したところ、膜相の荷電密度変化が主な原因であることが示された⁴⁾。

ところで膜表面に抗体のようなタンパク質の複合体が形成されるだけで、膜電位が変動するものであろうか。著者らは、膜表面に荷電状態の異なるタンパク質を共有結合させ、すなわち膜表面を化学修飾 (chemical modification) することによっても膜電位が著しく変動することを示した。ブロムアセチルセルロース膜を Fig. 6 に

示す方法で順次化学修飾し、それぞれの膜電位を検討したところ、所期の通り、膜表面の化学物質の荷電状態に

Fig. 5 抗原固定化膜における抗原抗体反応

Fig. 7 化学修飾に伴う膜電位の変化
ACM-Lys, ACM-EPOX, ACM-Alb, ACM-Gly はそれぞれ、アセチルセルロース膜にリジン、エポキシイド、アルブミン、グリシンを共有結合させたもの。膜両面の電解質 (NaCl) 濃度 C_1 , C_2 の比 $r=2.0$ を一定として膜電位の電解質濃度依存性を示す。

Fig. 6 ブロムアセチルセルロース膜の化学修飾法

対応して膜電位が決定されていることが明らかにされた⁵⁾。主な結果を Fig. 7 に示す。

以上のような選択的親和性膜およびそのアフィニティメンブレンポテンシャルには数多くの応用が考えられる。主なものを次に示す。

(2) 免疫センサー

人体は異種物質（抗原）が侵入するとその異種物質に特異的結合能を有する抗体タンパク質がつくられることはよく知られている。したがって病菌への感染状態を判定する際、対応した抗体を検知する場合も多い。このような場合にしばしば免疫分析が行われる。たとえば梅毒患者の血清診断においては、梅毒の病原体トレポネマ (*Treponema pallidum*) に対応してつくられた血清中の梅毒抗体が検出される。

カルジオライピン、コレステロール、ホスファチジルコリン（レシチン）から成る脂質抗原は、梅毒血清診断に広く用いられている。この脂質抗原をアセチルセルロース膜に固定した膜は梅毒抗体と反応し、アフィニティメンブレンポテンシャルを発生する。脂質抗原固定化膜の膜電位を簡便に測定できるようにしたデバイスは免疫センサー (Immunosensor) と呼ばれ^{6~8)}、目下開発研究が行われるとともに、新たな応用展開が試みられている。

(3) アフィニティメンブレンポテンシャル法の

応用

ケファリン-コレステロール-レシチン (CCL) 複合脂質は血清中のある種のタンパク質画分と反応し、凝集沈殿する。肝機能疾患の患者血清中には、この複合脂質と反応するタンパク質が増大することが知られているため、この反応は膠質反応と呼ばれ臨床検査法として用いられている。反応するタンパク質はグロブリン画分と考えられているが、その詳細は明らかではない。数多くの膠質反応が知られているが、著者らは CCL 複合脂質を固定化した膜を調製し、膠質反応に対するセンサーを構成した。

以上の項はすべて選択的親和性膜が、特定化学物質と複合体を形成するとともに、膜電位を発生する、いわば直接変換型に属するものである。直接変換型の生物電気化学センサーは未だ余り報告されていない。これから述べる例は間接変換型の生物電気化学センサーである。

4. 酵素（膜）センサー

(1) 選択的反応性膜

酵素は特定基質に対して特定反応を触媒するタンパク質である。したがって酵素を膜に固定化すれば、選択的反応性膜をつくることができる。近年酵素の固定化技術が著しく進展し¹⁰⁾、酵素膜の調製も簡便に行えるようになった。ポリアクリルアミドあるいは寒天などのゲルに酵素を包括した酵素膜は、調製法が簡単なため古くから広く用いられている。著者らは、コラーゲンを固定化担体として酵素膜を調製する方法を世界に先かけて開発した^{9,11)}。酵素-コラーゲン膜は、酵素の活性保持率も比較的高く、物質の膜透過も良いので、間接変換型の生物電気化学センサー用の膜として優れた特性を備えている。この他、種々の天然高分子あるいは合成高分子膜に、共有結合によって酵素を固定化する方法もしばしば用いられる。場合によっては、適当な高分子膜の間にサンドイッチ状に酵素液を固定化する方法が好結果をもたらすこともある^{12~16)}。

選択的反応性膜は、目的物質に作用して、対応する反応生成物に変換する。この反応系で増減する物質の中に電気化学的検知可能なものがあれば、選択的反応性膜を用いた膜センサーを構成できる。たとえば、グルコースオキシダーゼ (glucose oxidase (GOD)) は次の反応を触媒する。

この反応においては、 O_2 の減少量、あるいは H_2O_2 の増加量が電気化学的に測定できる。したがって GOD 固定化膜を O_2 あるいは H_2O_2 プロブ (probe) と組合せ

Fig. 8 酵素センサーの構造

Table 1 主 な 酵 素 セ ン サ ー

被測定物質	酵 素	固定化法	電気化学デバイス	文献
尿 素	ウレアーゼ	酵素液-セロハン	カチオン電極	18)
	"	ポリアクリルアミドゲル	"	19~21)
	"	酵素液-セロハン	CO ₂ 電極	22)
	"	ポリアクリルアミドゲル	ノナクチン液膜 NH ₄ ⁺ 電極	23, 24)
	"	酵素液-EDTA	NH ₃ ガス電極	25, 26)
	"		NH ₃ エアギャップ電極	27~29)
尿 酸	ウリカーゼ	アルブミン, グルタルアルデヒド	O ₂ 検知用Pt(-0.6V/SCE)	31)
	"	コラーゲン	クラーク型 O ₂ 電極	332, 33)
	"	ヒドロキシエチルセルロース, セロハン	CO ₂ 電極	34)
グ ル コ ー ス	グルコースオキシダーゼ	ポリアクリルアミドゲル	O ₂ 検知用Pt(-0.6V/SCE)	12)
	"	アルブミン, グルタルアルデヒド	"	35)
	"	コラーゲン	クラーク型 O ₂ 電極	33)
	"	ポリアクリルアミド, ジアゾカップリング	H ₂ O ₂ 検知用 Pt 黒電極	36)
	グルコースオキシダーゼ, パーオキシダーゼ	"	I ⁻ 電極	37)
ア ミ ノ 酸	L-アミノ酸オキシダーゼ	アルブミン, グルタルアルデヒド	O ₂ , H ₂ O ₂ 電極	35, 38)
	D-アミノ酸オキシダーゼ	"	"	39)
	L-アミノ酸オキシダーゼ, カタラーゼ	グルタルアルデヒド	NH ₃ 電極	40)
	チロシンデカルボキシラーゼ	"	CO ₂ 電極	22)
H ₂ O ₂	カタラーゼ	コラーゲン	クラーク型 O ₂ 電極	41)
アミグダリン	β -グルコシダーゼ	ポリアクリルアミドゲル	CN 電極	42~44)
ペニシリン	ペニシリナーゼ	ポリアクリルアミドゲル	pH 用ガラス電極	45~47)
AMP	AMP デアミナーゼ	吸着	NH ₃ 電極	48)
クレアチニン	クレアチナーゼ	"	"	49)
シ ョ 糖	インベルターゼ, ムタロターゼ, グルコースオキシダーゼ	コラーゲン	クラーク型 O ₂ 電極	50)
リ ン 酸	アルカリホスファターゼ, グルコースオキシダーゼ		O ₂ 電極	51)
ア ル コ ー ル	アルコールオキシダーゼ		H ₂ O ₂ 電極	52)
	アルコールデヒドロゲナーゼ	コラーゲン	NADH 検知用電極	53)
コレステロール	コレステロールオキシダーゼ	コラーゲン	O ₂ 電極	54)
中 性 脂 質	リパーゼ	コラーゲン	pH 用ガラス電極(フロー型)	55)

れば、グルコース検出用のセンサーをつくることができる。

(2) 酵素(膜) センサー

酵素(膜) センサーは、酵素膜(選択的反応性膜)と電気化学デバイス(electrochemical device)によって構成されている。酵素膜における被検知物質の変化を、アンペロメトリック(amperometric)にとらえるか、あるいはポテンシオメトリック(potentiometric)にとらえるかによって、酵素センサーは2種類に分類される。

尿酸検出用の酵素センサーには、尿酸酸化酵素(ウリカーゼ uricase) 固定化膜が用いられる。ウリカーゼによって尿酸は次のように酸化される。したがって

O_2 あるいは H_2O_2 を電気化学的に測定する方式ならばアンペロメトリック、一方 CO_2 を測定する方式ならばポテンシオメトリックな電気化学デバイスと組合せることになる。これらの基本的構造を Fig. 8 に示す。

ここ10年余数多くの酵素センサーが研究された。主なものを Table 1 に示す。1種類の酵素だけではなく、複数酵素系を用いた例もある。センサー構成の基本は酵素膜であるというものの、組合わせる電気化学デバイスが限定されているので、報告されているセンサーの種類は比較的少ない。使用される電気化学デバイスによって分類すると、(1)酸素検出型、(2)過酸化水素検出型、(3)イオン検出型、(4)ガス検出型、(5) NADH 検出型、などである。(1), (2), (5)はアンペロメトリーによるものであり、その他はポテンシオメトリーによるものである。ガス検出型には、 NH_3 , CO_2 などのガスセンサーがあるが、基本的には NH_3 , CO_2 による pH の変化をガラス電極で測定するシステムなので、イオン検出型とも考えられる。上記以外の新しい電気化学デバイスが開発されれば、別種の酵素センサーが可能となることはいうまでもない。

(3) 今後の展開

酵素センサーが測定対象とする物質は、従来主に比色法によって測定されてきた。酵素センサーによる測定は、比色法などに比べて分析試薬の消耗がほとんどなく、しかもきわめて簡便に行えるなどの利点がある。測定対象となる物質の多くが生体内に存在する物質であることから、当初医療計測への応用が企図され、開発研究が続けられている。しかし酵素センサーの適用範囲は、医療計測のみに限定されるものではなく、醗酵その他のプロセス計測制御、品質管理、毒物薬物の検定など多方面にわたる応用が期待されている。

使用目的に応じて酵素センサーのデザインを変える必要がある。たとえば固定化酵素と電気化学デバイスを分離し、フローシステムに組み込みやすい状態とすることもできる。著者らは中性脂質測定用のフローシステムを構成し、中性脂質を連続的に測定できることを示した⁵⁵⁾。

酵素センサーは既にアイディアの段階ではなく、使用目的に合致し経済的にも実用に供し得るよう開発研究が進められている。

5. 酵素免疫センサー

(1) 標識剤としての酵素の利用

被測定物質を直接測定することが困難である場合、適当な標識剤を利用して間接的な測定を行うことがある。ラジオアイソトープ(RI)は代表的な標識剤である。既に述べた血清中の抗原や抗体を測定する免疫分析法においても、RI がしばしば用いられ、ラジオイムノアッセイ(radio immunoassay, RIA)として確立されている⁵⁶⁾。RIAは極微量計測にきわめて有効であるが、特殊設備を必要とするうえ、とくにわが国においては放射性物質の取扱いが必ずしも容易に行えないので、どこでも簡便に行える方法とはいいい難い。そこで非放射性物質による標識法(labeling method)の進展が期待されている。

酵素を標識剤として用いた免疫分析法(enzyme immunoassay)は酵素免疫法と呼ばれ、非放射性標識法としてとくに注目されている^{57,58)}。その原理を Fig. 9 に示す。抗原を測定する場合を想定してみる。測定対象となる抗原の標準品をあらかじめ酵素で標識する(酵素を共有結合させる)。標識抗原のみを抗体と反応させてみる。抗原抗体反応後、結合抗原(B)と遊離状態の抗原(F)を分離する。抗原量を抗体量の2倍としておけば、 $B/F=1$ となるであろう(I)。次いで未知量の抗原が既知量の標識抗原に添加された場合を考えると、標識抗原についての B/F は1以下となるであろう(II)。非標識抗原量と B/F との関係を求めておけば、これを検量線として抗原を定量できる。なおここで B/F を求めるには、それぞれの酵素の活性測定を行って酵素でラベルされた抗原量を求める。

ところで酵素にはラベル剤としてきわめて特異的な特徴がある。それは化学的増幅作用(Chemical amplification)とでも称されるものである。たとえば抗体に酵素を結合させて、酵素ラベルした場合を想定する。酵素免疫分析においては、抗原抗体反応によって複合体を形成させた後に、酵素ラベルされた抗体の分子数を測定することになる。しかし抗体の分子数はきわめて微量である。

Fig. 9 標識免疫分析法の原理

B: 結合型 F: 遊離型

Fig. 10 酵素免疫センサーの原理

ところが、酵素の基質を添加すれば、基質は酵素反応によって次々と生成物に変化する。1分子の酵素が100分子の基質を変化させれば、情報量は酵素あるいは抗体分子数の100倍に増大したことになる。したがってターンオーバー数の大きい酵素を使用すれば、情報量の増大、すなわち増幅度が大きくなる。酵素免疫法は酵素のこのような増幅作用を巧みに利用した方法である。しかし従来の酵素免疫法は、比色法にもとづく酵素分析を基本としている。著者らは酵素免疫法にも電気化学計測を導入し、酵素免疫センサー (enzyme immunosensor) を考案した⁵⁹⁾。

(2) 酵素免疫センサーの原理

抗原を検出する酵素免疫センサーの測定原理と主な操作方法を Fig. 10 に示す。標識用酵素としてはカタラーゼ (catalase) を用いた。

まず抗原にカタラーゼを共有結合させ、標識抗原を調製する。次いで、この抗原に対応する抗体を膜表面に固定化する。抗体固定化膜を、酵素センサーの酸素透過性膜の外面に密着させて装着する。

第1ステップは、抗体固定化膜表面における抗原抗体反応である。未知濃度の抗原を含有する試料液に、所定量の酵素標識抗原 (enzyme-labeled antigen) を添加する。非標識抗原 (non-labeled antigen) と標識抗原は競合的に膜表面の固定化抗体と反応し、複合体を形成する。

第2ステップは、未反応抗原の除去である。抗体固定化膜表面を十分に洗浄し、非特異的に吸着した物質および未反応抗原を除去する。

第3ステップは、酵素活性の測定である。抗体固定化膜表面には、非標識抗原と標識抗原が複合体を形成して吸着されている。吸着された抗原の分子数を酵素活性の測定によって求める。そこで過酸化水素を基質として添加する。膜に結合したカタラーゼによって

の反応が進み、 O_2 が生成する。生成 O_2 はクラーク型酸素センサーによって経時的に検知される。酸素センサーの電流値の増加速度から、カタラーゼの初速度が求められる。あらかじめ検量線を作製しておけば、この初速

度からカタラーゼ量すなわち標識抗原量と非標識抗原量がわかる。

以上の操作は、競争反応による酵素免疫法の原理にもとづいて行われるのであるが、サンドウィッチ法などについても同様な測定原理を適用ができる。

(3) 免疫グロブリン検知用酵素免疫センサー

IgG, IgA, IgM, IgD あるいは IgE など免疫グロブリン (immunoglobulin) の血清中濃度は、臨床検査における重要な測定項目とされている。著者らは血清中免疫グロブリンの測定に酵素免疫センサーを適用した。

IgG は正常人の血清中に 800~1300mg/dl 含まれている。競争反応の酵素免疫センサーを構成する場合にはまず、標準試料 IgG をカタラーゼで標識する。次いで抗 IgG 抗体を膜に固定化しセンサーを調製する。一定量の血清試料と酵素標識 IgG を混合し、センサーの膜表面で競合的抗原抗体反応を行う。反応終了後、未反応の IgG を洗浄によって分離する。このセンサーを所定濃度の H_2O_2 溶液に浸漬する。膜表面に結合したカタラーゼの酵素活性によって、酸素還元電流が増大する。電流増大の初速度は、血清中 IgG の濃度ときわめて良い相関性を示す⁶⁰⁾。従来の酵素免疫分析法では、第 3 ステップにおける酵素活性の測定に一昼夜要することが多い。酵素免疫センサーでは初速度法を適用し得るのできわめて短時間にしかもきわめて簡単に定量することができる。従来 IgG の測定は Single radial immunodiffusion (SRID) 法によって行われている。患者血清を対象として酵素免疫法と SRID 法の結果を比較したところ、Fig. 11 に示すように、両者はきわめて良い相関性を示すことが明らかとなった。

(4) 酵素免疫センサーのその他の応用

酵素免疫センサーによって抗原も抗体も測定し得るこ

Fig. 11 酵素免疫センサーと従来法 (SRID) の相関性

とは、以上の原理から明らかである。すなわち抗原固定化膜を用いれば抗体を、他方抗体固定化膜を用いれば抗原を検出することができる。既にヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, HCG) などのペプチドホルモンをはじめ数多くの生体物質を測定し得る酵素免疫センサーが研究されている。

6. オルガネラセンサー

(1) オルガネラ固定化膜

細胞はミトコンドリアや核などの細胞小器官 (オルガネラ) から構成されている。オルガネラはきわめて高度な機能が集約された分子集合体である。したがってオルガネラの機能を保持したオルガネラ固定化膜をつくることのできれば、既に述べてきた酵素や抗原 (抗体) などの単独分子とは異なった分子集合体の生物機能を利用した膜センサーを構成できると考えられる。

著者らはオルガネラの一例としてミトコンドリアの電子伝達粒子 (ETP) に着目した。ミトコンドリアにおいては、解糖系および TCA 回路に直結し、アデノシン・三リン酸 (ATP) の合成が行われている。Fig. 12 に示すように、ETP の機能は ATP 合成に必要な電子伝達を行うことである。ETP には多数の酸化還元酵素が規則的に組み込まれており、補酵素還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド NADH から O_2 への電子伝達をきわめて円滑に行っている。ところで ETP に、ジニトロフェノール (DNP) などの脱共役剤を作用させると、センサーが構成された。このセンサーは微生物 (膜) センサーと称され、環境計測、醗酵プロセス計測、あるいはバ

Fig. 12 ETP の電子伝達系

NAD⁺, NADH: 酸化型および還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチド,
FMN, FMNH₂: 酸化型および還元型フラビンモノヌクレオチド

Cyt. a: チトクロム a

ADP: アデノシンジリン酸

ATP: アデノシントリリン酸

ETP: 電子伝達粒子 (Electron transport particle)

ATP 合成反応が抑制され、NADH から O_2 への電子移動が促進される。著者らは DNP 共存下で ETP を寒天ゲル薄膜中に固定化した。この ETP 固定化膜は、電子伝達機能を保持しており、NADH が存在すると O_2 を著しく消費した。

(2) オルガネラセンサー

著者らは上記 ETP 膜を用いて、NADH 検出用のセンサーを構成した。このセンサーをオルガネラ (膜) センサーと称することとする。すなわち膜式酸素プローブの酸素透過性膜に、ETP 膜を密着固定した。NADH は ETP 膜で酸化され、この際 O_2 が消費される。消費された O_2 量だけ、膜近傍の O_2 濃度は減少する。そのため酸素透過性膜を拡散して、カソードに到達する O_2 は少なくなり、酸素還元電流が減少する。酸素還元電流の減少量から、NADH 濃度を求めることができる。

7. 生物化学的指標としてのヘモグロビン膜の応用

ヘモグロビンは赤血球中に含まれる酸素運搬体としてよく知られている。ヘモグロビンは 1 分子中に 4 個のヘムを含むが、ヘムの状態により、Fig. 13 のように、オキシヘモグロビン (HbO_2)、デオキシヘモグロビン (Hb)、およびメトヘモグロビン ($MetHb$) などとなる。ヘム部分は O_2 のかわりに CO と親和性が強いこともよく知られている。また O_2 や CO 以外にも、ヘモグロビンが気体分子と親和性を有することはしばしば指摘されている。このようなヘモグロビンの気体分子親和性に着目し、著

Fig. 13 ヘモグロビンの相互変換

Fig. 14 ヘモグロビン膜センサーの構造

者らはヘモグロビンに及ぼす大気汚染物質とくに窒素酸化物 (NO_x) の影響を検討した。その結果 NO_x の作用によって HbO_2 が $MetHb$ に変化することが示された。しかもこの変化は、吸収スペクトルによって容易に測定できた。

従来環境汚染物質の生体に及ぼす影響は、生物個体そのものを実験対象とする生物指標法によって評価されてきた。しかし最近、酵素などの生物活性物質を指標とする生物化学的指標法の有効性が注目されるようになった。著者らは、上記ヘモグロビンの NO_x に対する変化に着目し、ヘモグロビンの生物化学的指標としての適用性を検討した。ところで生体の粘膜は、膜中の生物活性物質を常に湿润状態に保ち、しかも外気と直接接し得るきわめて優れた膜である。著者らは粘膜を模して Fig. 14 のようなヘモグロビン膜センサーを考案した⁶²⁾。ヘモグロビン膜の一方は水に接し、他方は直接外気と接する。水の拡散と、膜面からの水の蒸発とのバランスによってヘモグロビンの水分は一定に保たれることになる。しかも全体が透明であり、このセルをスペクトロメーターに装着すれば、スペクトル測定が容易に行える。また気体状 NO_x が直接ヘモグロビン膜と反応し、長時間反応させれば NO_x が膜中に濃縮されることになる。未だ研究の端緒であるが、生物機能性膜の新たな応用と考えられる。

8. 微生物 (膜) センサー

微生物細胞全体を膜に固定化し、この膜を用いてセン

イオアッセイなどへの応用が次々と研究され、世界的な注目を集めている。しかし既に他の総説でも詳しく述べてあるのでここでは省略することとしたい。

9. むすび

以上著者らの研究を中心に、生物機能性膜を用いた膜センサー研究の最近の進展状況をまとめてみた。いうまでもなく、ここに述べたことは、きわめて広範多岐に渡る膜センサー研究のごく一部である。ここでは生物機能性分子を固定化した膜が化学物質を識別する機能を発現し、この機能性膜を電気化学デバイスと組合せることによって次々と新しい膜センサーが誕生した経緯を述べた。従来単なる分析試薬として用いられていた酵素などの生物活性物質が、膜に固定化されることによって素子として機能するようになった。これらの膜センサーが次々と開発されることによって、従来必ずしも容易ではなかった物質に着目した計測が進展するものと期待される。

文 献

- 1) 鈴木周一, 相沢益男: 表面, **16**, 513 (1978)
- 2) 鈴木周一, 相沢益男: 化学工業, **28**, 962 (1977)
- 3) 相沢益男, 鈴木周一: 表面, **16**, 253 (1978)
- 4) M. Aizawa, S. Kato, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **2**, 125 (1977)
- 5) S. Kato, M. Aizawa, S. Suzuki: *ibid.*,
- 6) M. Aizawa, S. Suzuki, Y. Nagamura, R. Shinohara, I. Ishiguro: *Chem. Lett.*, 779 (1977)
- 7) M. Aizawa, S. Suzuki, Y. Nagamura, R. Shinohara, I. Ishiguro: *J. Solid-Phase Biochem.*, (in press)
- 8) 相沢益男, 加藤誠志, 鈴木周一, 長村洋一, 石黒伊三雄: 高分子論文集, **34**, (1977)
- 9) S. Suzuki, M. Aizawa, I. Karube: "Immobilized Enzyme Technology" (H. H. Weetall and S. Suzuki, ed.) Plenum Press, New York (1975) p. 253
- 10) K. Pye and L. B. Wingard, Jr. ed., "Enzyme Engineering, I, II, III" Plenum Press, New York (1977)
- 11) S. Suzuki, I. Karube, I. Satoh: "Biomedical Application of Immobilized Enzymes and Proteins, II." (T. M. S. Chang, ed.) Plenum Press, New York (1977) p. 177
- 12) S. J. Updike, G. P. Hicks: *Nature* **214**, 986 (1967); *Science*, **158**, 270 (1967); *Anal. Chem.*, **38** 726 (1966)
- 13) L. C. Clark, Jr.: *Biotechnol. Bioeng.*,
- 14) D. A. Gough, J. D. Andrade: *Science*, **180**, 380 (1973)
- 15) G. A. Rechnitz: *Science*, **190**, 234 (1975)
- 16) G. G. Guilbault: "Handbook of Enzymatic Methods of Analysis" Marcel Dekker, New York (1976)
- 17) 河嶋拓治: 分析, **11**, 681 (1977)
- 18) J. G. Montalvo, Jr.: *Anal. Chem.*, **42**, 2093 (1969)
- 19) J. G. Montalvo, Jr., G. G. Guilbault: *Anal. Chem.*, **41**, 1897 (1969)
- 20) G. G. Guilbault, J. G. Montalvo, Jr.: *Anal. Lett.*, **2**, 283 (1969); *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2164 (1969); **92**, 2533 (1970)
- 21) G. G. Guilbault, E. Hrabankova: *Anal. Chim. Acta*, **52**, 287 (1970)
- 22) G. G. Guilbault, F. R. Shu: *Anal. Chem.*, **44**, 2161 (1972)
- 23) G. G. Guilbault, G. Nagy: *Anal. Chem.*, **45**, 419 (1973)
- 24) G. G. Guilbault, G. Nagy, S. S. Kuan: *Anal. Chim. Acta*, **67**, 195 (1973)
- 25) D. S. Papastathopoulos, G. A. Rechnitz: *Anal. Chim. Acta*, **79**, 17 (1975)
- 26) T. Anfalt, A. Graneli, D. Jagner: *Anal. Lett.*, **6**, 969 (1973)
- 27) E. H. Hansen, J. Ruzicka: *Anal. Chim. Acta*, **72**, 353 (1974)
- 28) G. G. Guilbault, M. Tarp: *Anal. Chim. Acta*, **73**, 355 (1974)
- 29) G. G. Guilbault, W. Stokbro: *Anal. Chim. Acta*, **76**, 237 (1975)
- 30) G. Johansson, J. Ogren: *Anal. Chim. Acta*, **84**, 23 (1976)
- 31) M. Nanjo, G. G. Guilbault: *Anal. Chem.*, **46**, 1769 (1974)
- 32) S. Suzuki, N. Sonobe, I. Karube, M. Aizawa: *Chem. Lett.*, 9 (1974)
- 33) 相沢益男, 鈴木周一: 電化, **44**, 279 (1976)
- 34) T. Kawashima, G. A. Rechnitz: *Anal. Chim. Acta*, **83**, 9 (1976)
- 35) M. Nanjo, G. G. Guilbault: *Anal. Chim. Acta*, **73**, 367 (1974)
- 36) G. G. Guilbault, G. J. Lubrano: *Anal. Chim. Acta*, **60**, 254 (1972); **64**, 439 (1973)
- 37) G. Nagy, L. H. Von Storp, G. G. Guilbault: *Anal. Chim. Acta*, **66**, 443 (1973)
- 38) G. G. Guilbault, G. J. Lubrano: *Anal. Chim. Acta*, **69**, 183 (1974)
- 39) G. G. Guilbault, E. Hrabankova: *Anal. Chem.*, **42**, 1779 (1970); *Anal. Chim. Acta*, **56**, 285 (1971)
- 40) G. Johansson, K. Edstrom, L. Ogren: *Anal. Chim. Acta*, **85**, 55 (1976)
- 41) M. Aizawa, I. Karube, S. Suzuki: *Anal. Chim. Acta*, **69**, 431 (1974)
- 42) G. A. Rechnitz, R. A. Llenado: *Anal. Chem.*, **43**, 283 (1971)
- 43) R. A. Llenado, G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **43**, 1457 (1971); **44**, 468 (1972)
- 44) M. Mascini, A. Liberti: *Anal. Chim. Acta*, **68**, 177 (1974)
- 45) G. J. Papariello, A. K. Mukherji, C. M. Shearer: *Anal. Chem.*, **45**, 790 (1973)
- 46) L. F. Cullen, J. F. Rusling, A. Schleifer, G. J. Papariello: *Anal. Chem.*, **46**, 1955 (1974)

- 47) J. F. Rusling, G. H. Luttrell, L. F. Cullen, G. J. Papariello: *Anal. Chem.*, **48**, 1211 (1976)
- 48) D. S. Papastathopoulos, G. A. Rechnitz: *Anal. Chem.*, **48**, 862 (1976)
- 49) M. Meyerhoff, G. A. Rechnitz: *Anal. Chim. Acta*, **85**, 277 (1976)
- 50) I. Satoh, I. Karube, S. Suzuki: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 269 (1976)
- 51) G. G. Guilbault, M. Nanjo: *Anal. Chim. Acta*, **78**, 69 (1975)
- 52) G. G. Guilbault, G. J. Lubrano: *Anal. Chim. Acta*, **69**, 189 (1974)
- 53) S. Suzuki, F. Takahashi, I. Satoh, N. Sonobe: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **48**, 3246 (1975)
- 54) I. Satoh, I. Karube, S. Suzuki: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1095 (1977)
- 55) I. Satoh, I. Karube, S. Suzuki: *J. Solid-Phase Biochem.*, **2**, 1 (1977)
- 56) 入江実編: ラジオイムノアッセイ, 講談社 (1976)
- 57) 石川栄治, 加藤兼房: 化学と生物, **14**, 727 (1977)
- 58) G. B. Wisdom: *Clin. Chem.*, **22**, 243 (1976)
- 59) M. Aizawa, A. Morioka, H. Matsuoka, S. Suzuki, Y. Nagamura, R. Shinohara, I. Ishiguro: *J. Solid-Phase Biochem.*, **1**, 319 (1976)
- 60) M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, (in press)
- 61) M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki: *Anal. Biochem.* (in press)
- 62) H. Matsuoka, M. Aizawa, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, (in press)

生体膜関係国際学会の予定について

詳細はそれぞれの連絡先へ各自で問合わせて下さい。

- 1) Febr. 16-17, 1979: "Transports membranaires" (Congrès de printemps de la société de chimie biologique) Info: Université Claude Bernard de Lyon 1, UER de Chimie-Biochimie, 43 Bd du 11 Novembre 1918, F- 69621 Villeurbanne (France)
- 2) May 1979: Joint meeting of the Biomembrane Groups of Switzerland and of the USSR in Tbilisi on membrane transport, cell-cell interaction, membrane immunology. Info: Prof. Y. A. Ovchinnikov, Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Academy of Sciences Ul. Vavilova, 32, Moscow 117312, USSR.
- 3) July 24-27, 1979, Antibes: EMBO-Workshop on "Polypeptide neurotoxines: Structure and Function". Info: Prof. M. Lazdunski, Université de Nice, Centre de Biochimie, Parc Valrose, F- 06034 Nice (France).
- 4) July 30-Aug. 30, 1979, Les Houches: "Biophysics of Membranes and Inter-cellular Communication". Info: Profs. M. Chabre and P. F. Devaux, Ecole d'été de physique théorique, F- 74310 Les Houches (France).
- 5) Aug. 20-25, 1979, Stockholm: 3rd Intern. Conference on Surface and Colloid Science. Info: The Swedish Institute for Surface Chemistry, c/o Stockholm Convention Bureau, Strandvägen 7 C, S- 114 56 Stockholm, Sweden.
- 6) May 3-5, 1979, Montpellier: "2nd Intern. Symp. on Hormonal Receptors in Digestive Tract Physiology". Info: EURECEPT, Inserm U.10. Hôpital Bichat, F- 75877 Paris Cedex 18 (France).
- 7) May 7-11, 1979, Capri, Italy: "Neurotransmitters and peptide hormones" Info: Prof. F. Fraioli, Patologia Medica II, Policlinico Umberto I, Università di Roma, I- 00161 Rome (Italy).
- 8) Aug. 30-Sept. 1, 1979, Köln: "21st Intern. Conf. on the Biochemistry of Lipids". Info: Prof. W. Stoffel, Institut für Physiologische Chemie, Universität Köln, Joseph-Stelzmann-Str. 52, D- 5000 Köln 41 (FRG).
- 9) Sept. 2-7, 1979, Jerusalem: "7th Intern. Meeting of the Intern. Soc. of Neurochemistry". Info: Prof. S. Gatt, Lab. of Neurochem., Dept. of Biochem. The Hebrew University, Hadassah Medical School, P.O.Box 1172, Jerusalem, Israel.

(香川靖雄)