アフィニティメンブランポテンシャル

相 澤 益 男

筑波大学物質工学系 〒305 茨城県桜村

Affinity Membrane Potential

Masuo Aizawa

Institute of Materials Science, University of Tsukuba, Sakura-mura, Ibaraki 305, Japan

Biospecific affinity is retained by immobilizing a molecular recognizable biosubstance on the surfaces of synthetic membranes. A biospecific affinity membrane adsorbs specifically the corresponding molecules to the surface with resulting change in transmembrane potential, which is termed “affinity membrane potential”. The concept of affinity membrane potential is generalized and successfully applied in designing biosensors including immunosensors. Theoretical and experimental aspects of affinity membrane potential is reviewed with current topics on practical use.

Key words: Affinity membrane, Affinity membrane potential, Biosensor, Membrane-bound antibody, Biospecific affinity

1. はじめに

アフィニティクロマトグラフィ, 免疫測定, 標識抗体法による細胞組織染色など, 生体物質の選択的親和性 (Biospecific affinity) を巧みに利用した例がいろいろと知られるようになった。これらの流れと軌を一にして, アフィニティメンブラン (Affinity medbrane) と呼ばれる機能膜が考案された。選択的親和性を示す物質の一方が, 表面に結合されている膜である。この膜は, それぞれ対応する親和性物質のみを選択的に膜表面に吸着し, 複合体を形成する。しかも, この複合体形成にともなって, 膜の基本物性である膜電位が変動することが見出された。選択的親和性反応に起因する, この膜電位変動はアフィニティメンブランポテンシャル (Affinity membrane potential) と名付けられた。その後, この概念は, 膜のみに限定せず, あらゆる固相表面の選択的親和性反応に適用され, アフィニティポテンシャル (Affinity potential) として一般化された。

2. 固定電荷界面のポテンシャルプロファイル

荷電粒子あるいはイオンが固体表面, 膜表面, 膜内,

あるいは液相内などに固定されると非荷電相にはみられないいろいろと変わった現象が現われる。2, 3の固定電荷界面について, それぞれのポテンシャルプロファイルの特徴を次にまとめておきたい^{1,2)}。

1) 固体表面の固定電荷

金属あるいは半導体電極表面, コロイド粒子の表面などが, 電解質溶液に接触すると, 通常, 溶液中の特定のイオンが固体表面に強く吸着し, 帯電する。その結果, 反対符号のイオンが固体表面近くに引き寄せられ, あたかも反対符号に帯電した2枚の面が接近し合うような構造になるので, 電気二重層と呼ばれている。

電気二重層の構造モデルはいろいろ提案されているが, ここでは, 界面に引き寄せられるイオンの熱運動による拡散を考慮した Gouy-Chapman の“拡散電気二重層”を取り上げる。固体表面の電位を ϕ_0 , 表面電荷密度を σ とすれば, 両者の関係は,

$$\sigma = \sqrt{2\epsilon\epsilon_r n_0 k T} \cdot 2 \sinh(2e\phi_0/2kT) \quad (1)$$

であることが示されている。 ϵ , ϵ_r は溶液および真空の比誘電率, n_0 は固体表面から無限に離れたところのイオン濃度 [個数/cm³], k はボルツマン定数, T は絶対温度である。 σ が小さいときは, ϕ_0 も小さく, 次のよう

に近似される。この場合の電気二重層は、極板間距離が $1/\kappa$ の

$$\sigma = \sqrt{2\epsilon\epsilon_0 n_0 kT} \cdot 2(ze\phi_0/2kT) = \kappa\epsilon\epsilon_0\phi_0 \quad (2)$$

$$\kappa \equiv \sqrt{2n_0 z^2 e^2 / \epsilon\epsilon_0 kT} \quad (3)$$

に平板コンデンサーモデル (Helmholtz の電気二重層) と等価になる。

固相表面の電荷密度 σ が変動すれば、表面電位 ϕ_0 が変化することが明らかである。ところで ϕ_0 を直接測定することは難しい、実際には表面から離れた位置における電位を測定することになる。表面から距離 x における電位 ϕ は、次のように示される。

$$\phi = \phi_0 e^{-\kappa x} \quad (4)$$

以上の関係式はすべて固相表面の電荷の変動が、表面電位に直接的に影響をおよぼすことを明確に示している。

電極については電極電位の測定、コロイドなどの粒子系については電気泳動速度の測定などによって、以上の関係を求めることができる。

2) 固定電荷膜

固定電荷膜の膜相電荷密度が膜電位におよぼす効果は、Teorell³⁾, Meyer, および Sievers⁴⁾ によって理論的に取扱われ、その後小畠ら⁵⁾ によって修正、改良された。関係式の誘導は省略し、結果のみを示すと、次のようになる。

固定電荷密度 X [equiv dm⁻³] の膜が、1-1型電解質の水溶液 (膜の一方が濃度 C_1 , 他方が濃度 C_2 の電解質水溶液) に接触しているとす。膜電位 (両電解質水相間の電位差) $\Delta\phi$ は、膜相のそれぞれの界面に発生する Donnan 電位と、膜相内に生ずる拡散電位の和によって表わされる。

$$\Delta\phi = (\text{一方の膜界面の Donnan 電位}) + (\text{膜相内の拡散電位}) + (\text{他方の膜界面の Donnan 電位})$$

$$= -\frac{RT}{F} \ln \frac{\xi_2}{\xi_1} \frac{\sqrt{1+(2\xi_1)^2+1}}{\sqrt{1+(2\xi_2)^2+1}} - \frac{RT}{F} W \ln \frac{\sqrt{1+(2\xi_2)^2+W}}{\sqrt{1+(2\xi_1)^2+W}} \quad (5)$$

ここで、 ξ_1, ξ_2 は膜に接するそれぞれの水相の還元濃度と呼ばれ、固定電荷密度 X に対する相対的な水相イオ

$$\xi_1 \equiv (k_+ k_- / \gamma_+ \gamma_-)^{1/2} (C_1 / X),$$

$$\xi_2 \equiv (k_+ k_- / \gamma_+ \gamma_-)^{1/2} (C_2 / X) \quad (6)$$

ン濃度である。 k_+, k_- は膜相の固定電荷がないときのカチオンおよびアニオンの分配係数であり、 $k_+ > 1$ は膜相に溶けやすいことを示す。 γ_+, γ_- はカチオン、アニオ

ンの膜相内の活量係数である。なお W は、 w_+ (カチオンのモル移動度)、 w_- (アニオンのモル移動度) で表わされる量であり、輸率 t_+ と上記の関係で示される。

したがって、固定電荷膜の膜電位は、 C_1, C_2, T が一定の条件では、膜相の固定電荷 X と輸率 t_+ の関数であることがわかる。

3) 固定電荷相界面にイオン拡散のある系

固定電荷膜の界面に発生するポテンシャルを Donnan 電位で近似した。しかしこれらの界面におけるイオンの熱運動を無視できない場合には、界面のポテンシャルプロファイルが多少変わってくる。この様な場合には、Donnan 電位と拡散電気二重層が共存状態であると近似できる^{6,7)}。

以上、固定電荷を有する固相界面のポテンシャルプロファイルを3種類示した。これをまとめて Fig. 1 に示す。これらのポテンシャルプロファイルは、もちろん厳密なものではない。しかし、これから述べる種々の固相界面における、荷電変化と膜電位あるいは電極電位などの相関性を理解するには十分な近似であると考えられる。

3. 固定電荷相の表面修飾によるポテンシャル制御

1) 膜荷電および膜電位の光制御^{8~12)}

固定電荷膜について得られた膜電位の関係式は、膜荷電の大きさが変化すれば、膜電位が変動することを示唆している。もちろん、膜の両面に接する電解質濃度、温度などの条件は一定であるとする。この示唆を実験的に具現化することは、膜電位の式の妥当性を支持するばかりでなく、新しい機能膜を設計する上からも重要である。

ところで、膜荷電を簡便に変える方法はないものであろうか。可能であれば、連続的にしかも可逆的に、膜荷電を変える方法が望ましい。このような条件を満たす方法として、光照射によって膜荷電を変化させる方法が考案された。この方法の骨子は次の通りである。スピロピラン化合物は、Fig. 2 に示すような光異性化 (ホトクロミズム) を行い、荷電変化する。そこでスピロピラン化合物を膜相内に固定化することによって、膜周辺の条件を変えることなく、外部光源で膜相の荷電をコントロールできる。たとえば、有機溶媒中にアセチルセルロース、ホスファチジルコリンおよびスピロピラン化合物をとかし、この溶液をガラス板上に展開・乾燥すれば、スピロピランを固定化した膜ができる。膜厚は 10 μ m 程度で

(a) Gouy-Chapman の電気拡散二重層モデル

(b) 固定電荷膜系での電位分布モデル

(c) 固定電荷相の境界面における電位分布モデル

Fig. 1 いろいろな固定電荷固相界面のポテンシャルプロファイル

ある。この膜は透明であり、スピロピランの光異性化反応に対応し、着色、消色の変化をする。1', 3', 3'-trime-thyl-6-nitrospiro [2H-1-benzopyran-2, 2'-indoline] をスピロピラン化合物として用いた場合、紫外光を照射する

Fig. 2 スピロピラン化合物のホトクロミズムによる膜電位制御

と、スピロピラン環が開環して着色する。その結果、533nm の吸収が増大する。一方、可視光を照射するか、あるいは暗所に放置すると閉環構造に戻り、533nm の吸収も減少する。すなわち、スピロピラン膜はホトクロミズムを示す。スピロピラン膜のそれぞれの膜面に、異なる電解質水溶液を接し、膜電位を測定する電解液を均一に攪拌した状態では安定な膜電位が得られる。紫外光照射下および可視光照射下で膜電位を測定すると、著しく異なった値となる。照射光を繰返し変化させると、照射光に対応して、膜電位が可逆的に変動する。したがって、これらの膜は光応答膜 (photoresponsive membrane) とも称される。紫外光および可視光照射下の膜電位をそれぞれ $\Delta\phi_{UV}$ 、 $\Delta\phi_{VIS}$ とすれば、式 (5) から次が導かれる。

$$\Delta\phi_{UV} - \Delta\phi_{VIS} = \text{const. } t_+(1-t_+)/C_2(X_{UV} - X_{VIS}) \quad (8)$$

光誘起膜電位 ($\Delta\phi_{UV} - \Delta\phi_{VIS}$) は $(1/C_2)$ に比例して増大することは、Fig. 2 に示す通りである。

次に、スピロピランを含む膜相と、スピロピランを含まない膜相を重ねた非対称膜について、以上と同様の測定を行うと、さらに重要な事実が判明する。対称膜の場合には、膜に接触する電解質水溶液の電解質濃度に差があるときのみ、光誘起膜電位が認められた。このことは、関係式からも容易に推察されることである。ところが、非対称膜では、膜両面に同濃度の電解質水溶液が接触している場合でも、光誘起膜電位が測定された。

(5)式から、膜電位は、それぞれの膜界面の Donnan 電位と拡散電位の和で表わされる。膜相内にイオン濃度に勾配がない場合には、当然のことながら拡散電位は発生しない。また膜の各表面の荷電密度が等しければ、Donnan 電位は等しいから、結局膜電位はゼロである。しかし非対称スピロピラン膜ではどうなるであろうか。膜の一面はスピロピランが存在しないから、光照射に関係なく、荷電密度は一定である。一方、スピロピランを含む面では、紫外光、可視光照射で荷電密度が変動する。したがって、スピロピランを含む膜面の Donnan 電位は光照射に対応して変化する。その結果、等濃度の電解質水溶液に接触しているときでも、非対称スピロピラン膜では光誘起膜電位が観測されることになる。しかも Donnan 電位の変化が主原因であることが明らかである。

2) 膜表面の化学修飾による膜電位制御¹³⁾

膜相の荷電状態は、種々の解離性残基を膜表面に導入することによっても、制御することが可能である。アセチルセルロース膜を化学修飾した場合の膜電位について行われた一連の実験結果を次に示す。まずブromoアセチルセルロース (ACM-Br) で調製した膜の膜電位測定を行う。膜電位測定条件は、スピロピラン膜の場合と同様である。測定用電解質 (C_1 および C_2) の濃度比 (C_1/C_2) は 8 とする。 C_1/C_2 を一定としながら、 C_1 あるいは C_2 を変化させると、(5) 式から明らかなように膜電位は変動する。ACM-Br の膜電位は、 $C_1=1\sim 10^{-2}M$ の範囲で $+2\sim -2mV$ である。ところで、ACM-Br にヘキサメチレンジアミンを反応させ、末端にアミノ基を導入してみよう。アミノ基が導入されれば、正の膜荷電が増大し、膜電位が変動すると考えられる。ACM-Br とアミンとの反応時間に依存して、膜電位が変動する様子を Fig. 3 に示す。測定用電解質濃度によって、膜電位の変動値は当然異なるが、(5) 式の示唆する膜電位の特性が明確に示されている。

ACM-Br にタンパク質を結合した場合はどうなるであろうか。等電点が著しく異なる 2 種類のタンパク質として、リゾチーム ($pI=11.0$)、卵アルブミン ($pI=4.6$) を選び、これらを共有結合した膜について膜電位が測定された。その結果、正荷電の増加が期待されるリゾチーム結合膜の膜電位は、正方向に変化し、一方卵アルブミン結合膜は負荷電増加の挙動を示した。

以上の実験事実は、荷電膜担体の表面に荷電物質が結合することによって、膜荷電すなわち膜電位が変動する相関性をはっきりと示している。ここでは固定荷電相の

Fig. 3 アセチルセルロース膜のアミノ化に伴う膜電位の変動

表面修飾法として共有結合法を用いた。しかし、共有結合以外によっても、固定荷電相表面に種々の荷電体を導入することができる。しかも、これらの方法によって、膜荷電および膜電位を制御することが可能となるわけである。

4. アフィニティメンブランポテンシャル^{14~16)}

1) アフィニティメンブラン

固定荷電膜が特定の物質にのみ親和力をもつならば、その物質によって選択的に膜電位を制御できることになる。このような膜は、生体物質の選択的親和性を利用することによってつくることができる。たとえば、抗原抗体反応を例にとってみよう。抗体は、対応する抗原を選択的に識別し、しかも安定な複合体を形成する。したがって、抗体を膜表面に固定化した抗体膜は、対応する抗原を選択的に膜表面に結合し得る。事実、このような発想でつくられた抗体膜表面には、抗原抗体複合体が形成される。

抗体以外にも、特定の物質に選択的親和性を示す生体物質は非常に数多く知られている。アフィニティクロマトグラフィには、これらの選択的親和性が巧みに利用されているアフィニティクロマトグラフィ用担体は、選択的親和性を示す一対の物質の一方をゲル状ビーズ表面に固定化することによってつくられている。同様の方法によって、特定の物質に対して選択性親和性を示す膜をつくることできる。このような膜は、アフィニティメンブランと呼ばれる。アフィニティメンブランのつくり方は多種多様であるので、ここでは省略する。

2) 抗体膜表面における抗原抗体反応と膜電位¹⁷⁾

アフィニティメンブランの代表例として、抗体膜を取り上げる。ヒト血清アルブミン (HSA) を抗原とする抗体 (抗 HSA 抗体) を表面に共有結合した膜を対象とする。この膜は、トリアセチルセルロース、1,8-ジアミノ-4-アミノメチルオクタン、グルタルアルデヒドによってつくられた膜担体にグルタルアルデヒドを介して抗体を共有結合することによってつくられた。この抗体膜は、膜担体アミノ基が多く、しかも抗体分子が正荷電をもっているため、正荷電膜としての挙動を示すことが膜電位測定からも明らかである。

この抗体膜を抗原 (HSA) 溶液に侵漬し、抗原抗体反応を行う。膜表面には抗原抗体複合体が形成される。ここで抗体膜を洗浄し、非特異的に吸着している物質を除去する。次いで、この膜の膜電位測定を行い、抗原抗体反応後の膜電位の変動を調べる。その結果、抗原抗体複合体が形成されることによって、膜電位が変化することが明らかとなった。しかも、この膜電位変化は膜表面に負荷電が増大することによって、対応することが示された。この結果は、抗原 (HSA) が膜電位測定条件下で負に荷電していることによって説明される。

抗原抗体反応前後の膜電位変動値は、抗原膜と反応させる抗原濃度に依存して変わる。また抗原以外との反応によっては、抗体膜の膜電位の変動は認められない。これらの事実から、ここで観測された膜電位の変動は、抗体の選択的親和性に起因するものであると結論された。このような背景から、この膜電位変動はアフィニティメンブランポテンシャル (affinity membrane potential) と称されるようになった。

3) 脂質抗原膜におけるアフィニティメンブランポテンシャル^{17~22)}

抗体膜について認められたアフィニティメンブランポテンシャルは、抗原膜についても同様に測定されるはずである。赤血球表面には血液型決定物質 (アグリュチニン) があり、対応する抗体は血清中に存在する。たとえば A 型血球の抗体は、B 型血清に含まれている。そこで、A 型血球が B 型血清に接触すれば、抗原抗体反応が進み凝集する。この反応を利用して、血液型の判定が行われている。

血液型物質は、血清中の抗体の抗原である。そこで、赤血球から血液型物質を抽出し、人工膜に固定化して、抗原膜をつくる。この抗原は脂質なので、アセチルセルロース膜に容易に包括固定できる。この脂質抗原膜について、膜電位の測定を行うと、Fig. 4 のような結果が

Fig. 4 血液型 (A) 物質固定膜の膜電位 ($\Delta\phi$)-電解質濃度 (C_1) 曲線 ($C_1/C_2=2.0$)

Fig. 5 血液型物質固定膜におけるアフィニティメンブランポテンシャルの発生

得られる²²⁾。この膜には A 型物質が固定されている。次に、A 型血清と反応させ、膜を洗浄後、再び膜電位を測定する。しかし、反応前後で、膜電位の変動はほとんど認められない。ところが、B 型血清との反応では、著しい膜電位変動が誘起される。いうまでもなく、膜表面に抗原抗体複合体が形成されたからである。

以上の結果は、抗体膜について認められたアフィニティメンブランポテンシャルと同様に解釈される。抗原抗体反応前後の膜電位変動を説明するスキームを Fig. 5 に示す。

4) アビジン・ビオチン反応によるアフィニティメンブランポテンシャル²³⁾

アビジンはビオチンを非常に強固に結合するタンパク質としてよく知られている。いわゆる結合タンパク質(binding protein)である。ビオチンはカルボキシル基を有するので、共有結合あるいは配位結合によって、膜表面に結合される。アセチルセルロース膜の表面が、ビオチンによって化学修飾され、膜電位特性が調べられた。ユニークな膜表面修飾法が開発され、膜荷電が異なる3種類のビオチン膜がつくられた。これらすべてのビオチン膜について、アビジンとの反応前後の膜電位変動、すなわちアフィニティメンブランポテンシャルが明確に示された。

ところで、アビジンは塩基性タンパク質であり、この膜電位測定状態では正荷電を有する。したがって、ビオチン・アビジン複合体の形成によって、ビオチン膜の膜荷電には正荷電の増大が認められるはずである。膜電位測定の結果は、この推論を正しく反映している。しかも、アフィニティメンブランポテンシャルの大きさは、ビオチン膜担体の荷電状態に著しく依存していることも明らかとなった。すなわち、負あるいはいくぶん正に荷電した膜については、きわめて大きなアフィニティメンブランポテンシャルが認められる。しかし、大きな正荷電を有するビオチン膜のアフィニティメンブランポテンシャルは小さい。膜担体の荷電とくらべて、結合するアビジンの荷電が小さいため、膜荷電の変化量としてはほとんど認められない程度となってしまうからである。これらの知見は、アフィニティメンブランポテンシャルを理解する上で、きわめて重要である。

以上の例の他、種々の選択的親和性を示す物質について、アフィニティメンブランポテンシャルが測定され、アフィニティメンブランポテンシャルの一般性が広く確かめられようとしている。

5. 膜以外のアフィニティポテンシャル

1) 電極表面におけるアフィニティポテンシャル

金属あるいは半導体電極表面を。アフィニティメンブランと同様に化学修飾することによって、選択的親和反応にもとづくポテンシャル変化(アフィニティポテンシャル)を誘起することができる。

チタン電極の表面を酸化し、臭化シアン処理によって、抗体(ヒト絨毛性ゴナドトロピン抗体、抗HCG抗体)を共有結合する。高入力インピーダンスをもつエレクトロメータで、抗体結合電極の電位測定を行う。電極電位

が一定となった後、溶液にHCGを添加すると、電極表面に抗原抗体複合体が形成され、数mVの電位変動が認められる。電位が一定となるまでの所要時間は約30分であると報告されている²⁴⁾。一方、HCGを電極表面に共有結合し、抗体溶液中での電極電位を測定すると、抗体結合電極の場合とは逆方向の電位変動が認められている。これらの現象はアフィニティメンブランにおける抗原抗体反応にともなう膜電位変動(アフィニティメンブランポテンシャル)と類似しており、アフィニティポテンシャルと称することができる。

抗原抗体反応以外では、酵素・インヒビター反応およびレクチン・糖反応²⁵⁾についても、アフィニティポテンシャルが測定されている。

2) 微粒子表面におけるアフィニティポテンシャル

粒子表面に抗体分子が結合されていれば、この粒子は抗原と反応することによって、粒子表面に抗原抗体複合体を形成するであろう。抗体結合粒子の表面は電荷が固定されているため、既に述べた電気二重層が形成されている。このような粒子表面の電気二重層、すなわちポテンシャルプロファイルは、電気泳動速度に密接に関連していることはよく知られている。たとえば、電気二重層の拡散層に対応して理解されるジータ電位(ζ ポテンシャル)と電気泳動速度 u との関係は次式で示される。

$$u = K(E/l)\zeta\epsilon/\eta$$

E/l は電気泳動における電位勾配、 ϵ および η は分散媒の誘電率および粘度である。また K は粒子の形状などによって定まる定数である。すなわち、 (E/l) 、 ϵ 、 η を一定とすれば、 u は ζ に比例して変化する。

ヒト血清アルブミン(HSA)の抗体(抗HSA抗体)を微粒子表面に共有結合し、抗原抗体反応前後の電気泳動速度を測定する。その結果、粒子表面に抗原抗体複合体が形成されることによって、電気泳動速度すなわち ζ ポテンシャルが顕著に変動することが認められた²⁶⁾。粒子表面におけるアフィニティポテンシャルの発生と考えることができる。

以上の例で明らかのように、種々様々な生物親和性固相表面にアフィニティポテンシャルを発生させることが可能となった。これらをまとめてFig. 6に示す。アフィニティメンブランポテンシャルのみならず、これらのアフィニティポテンシャルの発見は、新しいバイオセンサー開発に応用展開されている。

Fig. 6 種々の系で発生するアフィニティポテンシャル

6. バイオメディカルセンサーへの応用²⁷⁻³⁴⁾

1) 血液型センサー²²⁾

輸血検査をはじめとして、血液型検査を必要とする場合が非常に多い。血液型の検査の判定における誤りは、重大な診断過誤をもたらす原因となるから、検査手技と肉眼判定を熟知することが必要とされている。これまでに数多くの血液が調べられているが、臨床的にもっとも重要な意義があるのは、ABO 式と Rh 式血液型である。ABO 式血液型は、赤血球のもつ血液型物質によって、A, B, O, AB 群の 4 つの表現型に分類され、血清中には自己の血球と対応しない抗体を必ずもっているから、被検血球と既知の抗 A, 抗 B 血清を用いて判定する。“おもて検査”と、既知の A 型血球, B 型血球を用いて被検血清中に存在する抗 A, 抗 B 体を検査する“うら検査”が可能である。

アフィニティメンブランポテンシャルを利用して、血液型判定を行うバイオセンサーを構成できる。バイオセンサーは、pH センサーやイオンセンサーと同様に、特定の化学物質を選択的に検出する計測デバイスであり、抗体あるいは酵素などの生体機能物質を検出部位に用い

ることを特徴としている。これまでに数多くのバイオセンサーが考案され、実用化に向け精力的な研究が進められている。

血液型センサーの基本構成を Fig. 7 に示す。被検血清中の抗体によって血液型を判定する場合には、血液型物質 (A および B 型) を固定化したアフィニティメンブランをつくり、Fig. 7 のような膜電位測定系を構成する。A 型物質固定化膜および B 型物質固定化膜のそれぞれでつくられセンサーを用意する。A 型センサーで、アフィニティメンブランポテンシャルが測定されたらば、被検血清中は抗 A 抗体が含まれていることになる。すなわち被検血清の血液型は、B 型はあるいは A B 型である。次に B 型センサーを用いて、同様の測定を行う。アフィニティメンブランポテンシャルの発生が認められなかったとしよう。被検査血清中には、抗 B 抗体が含まれていないことになる。このような結果を与えるのは、B 型か O 型血液である。A 型センサーおよび B 型センサーの結果を総合すると、この被検血清の血液型は、B 型であると判定できる。

以上の測定は、被検血清中の抗体を対象とする。いわ

Fig. 7 アフィニティポテンシャルを利用したバイオセンサー

ゆる“うら検査”である。臨床検査では、慎重を期して、“うら検査”と“おもて検査”を同時に行うことが多い。“おもて検査”の場合には、抗A抗体および抗B抗体をそれぞれ固定したアフィニティメンブランをつくり、Fig. 7のセンサーを構成し、被検赤血球との反応によって発生するアフィニティメンブランポテンシャルを測定すればよい。

以上の測定においては、抗体濃度あるいは血球濃度を定量する必要がなく、それぞれの存在の有無を確定できればよい。このセンサーの出力が変動することは、それぞれの対応する抗体あるいは血球が存在することを示すため、判定がきわめて容易になるものと期待される。

2) 梅毒センサー^{19~21)}

梅毒血清診断は、患者血清中に生成した梅毒抗体を対象に行われている。臨床検査では、①梅毒病原体（トレポネーマ）と共通抗原をもつ脂質（カルジオライピンを主成分）。②トレポネーマそのもの、③非病原性のトレポネーマをそれぞれ抗原として用いる方法が適用されている。梅毒血清診断を目的としたバイオセンサーもアフィニティメンブランポテンシャルを利用して構成された。原理は、血液型センサーと同様であり、一例として、抗原を固定化したアフィニティメンブランを用いられた。

3) 血清膠質反応センサー³⁵⁾

肝臓で生成される総タンパク質の約40%は血漿タンパク質となるので、血清中のアルブミン、およびグロブリンなどの血清タンパク分画の変化は肝機能検査の重要な指標となっている。血清タンパク分画の変動が生じると、

血清の混濁あるいは沈殿を誘起する試薬が、臨床検査では古くから用いられている。このような反応は、血清膠質反応と呼ばれ、適用される試薬によって、①チモール混濁試験 (TTT)、②硫酸亜鉛混濁試験 (ZTT, Kunkel)、③セファリン・コレステロール試験 (CCF)、④コバルト反応、⑤カドミウム反応、などに分類されている。

一例として、CCF法に準拠した血清膠質反応センサーがつくられた。セファリン・コレステロール(1:3モル比)乳濁液を固定したアフィニティメンブランをつくり、Fig. 7と同様なセンサーを構成する。このセンサーで、アフィニティメンブランポテンシャルが発生することは、血清膠質反応陽性に対応した。これまでCCF法血清膠質反応の判定は、半定量的に行われていたが、このセンサーを用いることによって定量化への道がひらけるものと考えられる。

4) ホルモンセンサー²⁴⁾

アフィニティメンブランおよびアフィニティエレクトロードを用いたホルモンセンサーが提案されている。いずれも抗原抗体反応を用いるものであり、膜あるいは電極表面に抗体が共有結合されている。発生するアフィニティメンブランポテンシャルの大きさから、ホルモンを定量する。非標識免疫法であり、直接測定できるためきわめて簡便である。この形式のセンサーによって、 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 程度の測定が可能である。

ところで、ホルモンなどの測定では、さらに超微量の定量が必要とされることが多い。超微量定量を目的として、化学増幅という新しい構想を導入したバイオセンサーも、既に開発されている。これらのセンサーでは、ngから $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ オーダーの測定感度が追求されている^{17, 36~39)}。

7. 新しい研究の展開：アフィニティメンブランポテンシャルからアフィニティポテンシャルへ

生物選択的親和性の反応によって、膜電位の変動を誘起できることが見出され、アフィニティメンブランポテンシャルの概念が提案された。この概念は、膜電位の制御法としても注目され、新しい特殊機能膜設計の指針とされつつある。一方、バイオメディカルセンサーへの応用が図られ、種々のセンサーが次々と考案され、新機軸を形成している。

アフィニティメンブランポテンシャルの概念が、一般化される過程で、この概念をさらに拡大する現象が数多く報告されるようになった。すなわち、膜系に限らず、電極表面あるいは固体粒子などの固相表面で、生物的親和性の反応が進行すれば、表面のポテンシャルが変化する

る現象が次々と認められた。したがって、これらを総称して“アフィニティポテンシャル (affinity potential)”とする方が適切と思われる。

アフィニティポテンシャルに関する基礎および応用両面からの研究が、今後益々活発に行われるものと考えられる。主な方向を列挙する。第1に生体における化学的受容機構および分子識別機構のシミュレーション。第2に、固液界面のキャラクターリゼーションなどの分野に有力な方法論を提供するであろう。第3は、新しい機能材料開発の設計指針を与え、とくに表面の機能化に重要な役割を果たし、さらに表面の機能制御を行う具体的方法論となることなどが期待される。

文 献

- 1) 花井哲也：“膜とイオン” 化学同人 (1978)
- 2) 中垣正幸編：“膜学入門” 喜多見書房 (1978)
- 3) T. Teorell: *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, **33**, 282 (1935)
- 4) K. H. Meyer, J. F. Sievers: *Helv. Chim. Acta*, **19**, 649, 665, 987 (1936)
- 5) 加茂直樹, 小島陽之助: 生物物理, **11**, 24 (1971)
- 6) E. J. W. Verwey, K. F. Niessen: *Phil. Mag.*, **28**, 435 (1939)
- 7) A. Mauro: *Biophys. J.*, **2**, 179 (1962)
- 8) S. Kato, M. Aizawa, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **1**, (1976)
- 9) S. Kato, M. Aizawa, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **2**, 39 (1977)
- 10) M. Aizawa, S. Tomono, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **2**, 289 (1977)
- 11) 加藤誠志, 相澤益男, 鈴木周一: 高分子論文集, **34**, 793 (1977)
- 12) M. Aizawa, S. Tomono, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **6**, 235 (1980)
- 13) S. Kato, M. Aizawa, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **3**, 29 (1978)
- 14) 相澤益男, 鈴木周一: 表面, **16**, 253 (1978)
- 15) 鈴木周一, 相澤益男: “膜学入門” (中垣正幸編) 喜多見書房, p. 243 (1978)
- 16) 相澤益男: “イオン電極と酵素電極” (鈴木周一編) 講談社, p. 154 (1981)
- 17) M. Aizawa, S. Suzuki: *Jap. J. Appl. Phys.*, **21**, Supplement 21-1, 219 (1982)
- 18) M. Aizawa, S. Kato, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **2**, 125 (1977)
- 19) M. Aizawa, S. Suzuki, Y. Nagamura, R. Shinohara, I. Ishiguro: *Chem. Lett.*, 779 (1977)
- 20) 相澤益男, 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)
- 21) M. Aizawa, S. Suzuki, Y. Nagamura, R. Shinohara, I. Ishiguro: *J. Solid-Phase Biochem.*, **4**, 25 (1979)
- 22) M. Aizawa, S. Kato, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **7**, 1 (1980)
- 23) 相澤益男, 碓山義人, 豊島武博: 日化第43秋季年会講演発表 (1981)
- 24) N. Yamamoto, Y. Nagasawa, M. Sawai, T. Suda, H. Tsubomura: *J. Immunol. Methods*, **22**, 309 (1978)
- 25) J. Janata: *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2914 (1975)
- 26) 小山昌夫, 佐藤祐一, 相澤益男, 鈴木周一: 日化第42秋季年会講演発表 (1980)
- 27) “特集 バイオセンサー” 化学増刊, **36**(7), 化学同人 (1981)
- 28) 鈴木周一, 相澤益男: 膜, **4**, 37 (1979)
- 29) 相澤益男, 鈴木周一: 計測と制御, **19**, 89 (1980)
- 30) 鈴木周一, 相澤益男: 医用電子と生体工学, **18** (2), 91 (1980)
- 31) 相澤益男: 化学と工業, **34**, 94 (1981)
- 32) 相澤益男: IONICS, **7**(12), 28 (1981)
- 33) 相澤益男, 鈴木周一: “センサ” (日経エレクトロニクス編) 日経マグロウヒル, p. 109, (1981)
- 34) 鈴木周一編: “イオン電極と酵素電極”, 講談社 (1981)
- 35) 相澤益男, 永井敬祐, 鈴木周一: 日化第40秋季年会講演発表 (1978)
- 36) M. Aizawa, A. Morioka, H. Matsuoka, S. Suzuki: *J. Solid-Phase Biochem.*, **1**, 319 (1976)
- 37) M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki: *J. Membrane Sci.*, **4**, 221 (1978)
- 38) M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki, Y. Nagamura: *Anal-Biochem.*, **94**, 22 (1979)
- 39) M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki: *Anal. Chim. Acta*, **115**, 61 (1980)