

称号及び氏名 博士（工学） 南條 陽子

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

論文名 「Flow-injection Biosensing Systems with Multiple Functions and Their Analytical Applications」  
(多機能フローインジェクションバイオセンサーシステムとその応用)

論文審査委員 主査 八尾 俊男  
副査 井上 博史  
副査 長岡 勉

## 論文要旨

バイオセンサーは、高次の分子識別機能を有する分子認識部位と得られた物質情報を電気信号に変換するトランスデューサーとで構成され、一般に基質特異性が高く、複雑な前処理をほとんど必要としない。特に、分子認識部位に酵素を用いたバイオセンサーは実用性に優れ、さらに簡易迅速、高精度のオンライン計測法であるフローインジェクション分析法(FIA)と組み合わせることで、FIAの特徴を生かしたバイオセンサーシステムを構築することができる。

酵素を用いたバイオセンサーは、試料中の特定の成分を迅速に分析できる方法として発展してきたが、近年、複合酵素反応をデザインしたバイオ計測、生体内での物質情報のオンライン・リアルタイム計測、複数成分の同時計測、さらに微量成分の高感度計測など、バイオセンサーの高感度化と高機能化が要望されている。

本論文は、固定化酵素バイオセンサーを FIA に組み込んだフローインジェクションバイオセンサーシステムにより、バイオセンサーの高機能化、多機能化、高感度化に関する研究成果をまとめたものである。

本論文は、バイオセンシングに関する一般的な緒言と 4 章から成る研究結果、及び結言とから構成されている。

初めに本論文に関連する一般的な緒言を述べた。

第 1 章では、2 つの酵素センシング部から成るデュアル酵素電極を用いた高機能 FIA 計測について述べた。第 1 節では、広い濃度範囲にわたるオルトリン酸の高感度計測について述べた。デュアル電極の 2 つのセンシング部に複数の酵素を修飾し、オルトリン酸の検出に対して連続的な酵素反応をデザインした。一方のセンシング部はオルトリン酸に対して通常の応答を、他方のセンシング部は基質リサイクリング反応に基づいた増幅応答を与えるデュアル酵素電極を開発した。このシステムでは 2 つの FIA シグナルが得られ、両ピーク電流から  $2 \times 10^{-7} \sim 2 \times 10^{-3} \text{ M}$  の広い濃度範囲にわたってオルトリン酸を、ほぼ特異的に計測することができた。第 2 節では、酵素分子の不斉認識機能を利用し、デュアル電極の各センシング部にアミノ酸に対する不斉認識機能を付与した。各センシング部は D-アミノ酸と L-アミノ酸に特異的に応答し、試料中の D, L-アミノ酸を

光学分割して同時検出できるFIA法を開発した。第3節では、試料溶液のオンラインサンプリングとD, L-乳酸の光学分割検出を可能にしたデュアル酵素電極-FIAシステムを開発した。デュアル電極の各センシング部に、それぞれD-乳酸デヒドロゲナーゼ/ジアホラーゼとL-乳酸デヒドロゲナーゼ/ジアホラーゼ固定化膜を修飾したフロー電極を作製した。D-乳酸検出部位はD-乳酸に、L-乳酸検出部位はL-乳酸に特異的に応答し、マイクロ透析チューブによってオンライン透析された透析液中のD, L-乳酸を光学分割して同時検出できた。このFIAシステムはアルコール飲料中のD, L-乳酸の同時検出に適用され、その有用性が立証された。

第2章では、脳細胞外液中の物質情報を *in vivo* モニタリングできるマイクロ透析バイオセンサーシステムについて述べた。第1節では、脳での興奮性の神経伝達物質である L-グルタミン酸の *in vivo* 連続モニタリング法について述べた。マイクロ透析プローブによる連続サンプリング技術と L-グルタミン酸に対する増幅型酵素リアクターを組み込んだマイクロフローFIA システムを開発した。この方法では、L-グルタミン酸を増幅してオンライン計測できるので、検出下限は 0.08  $\mu\text{M}$  と高感度であった。このセンサーシステムで KCl 刺激によりラット脳細胞から L-グルタミン酸が放出される過程を *in vivo* モニタリングした。第2節では、脳内神経伝達物質 L-グルタミン酸をより簡単に連続モニタリングできる方法として、オンライン透析された透析液を一定時間間隔で自動的に FIA 流路に注入するフローインジェクションバイオセンサー *in vivo* システムについて述べた。この検出システムは、検出系の感度を常時補正できる機能と L-グルタミン酸の計測に妨害となる 2-オキシグルタル酸の除去機能を有しているため、ラット脳細胞外の L-グルタミン酸を選択的、高感度に *in vivo* 計測できた。第3節では、脳での主要なエネルギー源としてのグルコースとその代謝物質である L-乳酸の同時 *in vivo* 計測法について述べた。試料液分割-再合流 FIA 流路に、グルコースと L-乳酸に対する分子認識酵素リアクターを配列し、マイクロ透析流路を組み合わせたセンサーシステムを開発した。この方法で、脳細胞外液中のグルコースと L-乳酸濃度を高感度に *in vivo* モニタリングできた。ここで提案した *in vivo* FIA システムは、自動分析技術としての FIA 法を脳科学を解明するための技術として利用したもので、脳だけでなく皮下、血管、臓器、神経などの *in vivo* 計測に発展できる技術であり、今後の応用が期待できる。

第3章では、複数の高活性固定化酵素リアクターと 16 方スイッチングバルブを用いた 2 成分同時定量FIAシステムについての研究結果を述べた。第1節では、魚肉の鮮度測定に応用した結果について述べた。魚は死と同時に、魚肉中のアデノシン-5'-三リン酸が特有の代謝経路に従って分解する。その分解過程から、鮮度指数  $K_1$  (%) は  $([\text{イノシン}] + [\text{ヒポキサンチン}]) \times 100 / ([\text{イノシン酸}] + [\text{イノシン}] + [\text{ヒポキサンチン}])$  で表される。開発したFIAシステムは鮮度指数  $K_1$  を簡単な操作で求めることができ、得られた鮮度指数  $K_1$  と 4°C でのタイの保存時間との間に良好な相関があることから、鮮度測定システムとして有用であることを立証した。このように、鮮度という“あいまいさ”をFIAで数値化して測定することも可能になった。第2節では、オルトリン酸と総リン酸（ポリリン酸と有機リン酸を含む）を同時計測できる固定化酵素リアクター-FIAシステムを開発し、環境計測に有用であることを明らかにした。

第4章では、糖尿病の診断において注目されている糖化ヘモグロビン ( $\text{HbA}_{1c}$ ) の酵素法による測定システムについて述べた。 $\text{HbA}_{1c}$  は、ヘモグロビン  $\text{A}_0$  の  $\beta$  鎖 N 末端が糖化されたものであり、その量は全ヘモグロビンの 4 ~ 15 % であり、全ヘモグロビンに対する  $\text{HbA}_{1c}$  の比率で表される。 $\text{HbA}_{1c}$  に直接作用する酵素は発見されていないので、 $\text{HbA}_{1c}$  の酵素的な測定においては、まず  $\text{HbA}_{1c}$  から  $\beta$  鎖 N 末端の糖化ペプチドまたは糖化アミノ酸をプロテアーゼによって切り出し、続いてこれらの生成物を定量すると共に、血液試料中の全ヘモグロビン量を定量する必要がある。第1節では、プロテアーゼによって  $\text{HbA}_{1c}$  から生成するフルクトシルバリルヒスチジン (FVH) とフルクトシルバリン (FV) の定量のための固定化酵素リアクター-FIAシステムについて検討した。2 種類のフルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPO) とフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAO) を固定化した酵素リアクターを作製し、各々のリアクター特性を比較検討した。FAO は FVH に不活性で FV にのみ作用したが、FPO は FV と FVH の両方に作用することがわかった。第2節では、 $\text{HbA}_{1c}$  からプロテアーゼ反応により、FVH を選択的に生成させ、FVH と全ヘモグロビンの同時定量が可

能なFIAシステムを開発した。このセンサーシステムは、HbA<sub>1c</sub>をプロテアーゼにより分解してFVHを生成させた後、フロー型吸光度計で全ヘモグロビンを定量し、続いてFPOリアクターを有したバイオセンサーシステムでFVHをオンライン計測する方法に基づいている。このバイオセンサーシステムは血球試料に適用でき、得られたHbA<sub>1c</sub>値と日本糖尿病学会及び国際臨床化学連合によって認証されたHbA<sub>1c</sub>値との相関は非常に良好であり、実用的なHbA<sub>1c</sub>測定法として有用であることを立証した。

最後に、これらの研究成果を総括した。

## 審査結果の要旨

本論文は、分子認識部位に酵素を用いたバイオセンサーと、簡易迅速・高精度のオンライン計測法であるフローインジェクション分析（FIA）法とを組み合わせた新規なバイオセンサーシステムを開発し、バイオセンサーの高機能化、多機能化、高感度化に関する研究結果をまとめたものであり、次のような成果を得ている。

(1) デュアル電極のそれぞれのセンシング部に連続的な酵素反応をデザインし、広い濃度範囲にわたってオルトリン酸を特異的に計測できる方法を開発している。同様の手法で、デュアル酵素電極に不斉認識機能を付与し、D, L-アミノ酸およびD, L-乳酸を光学分割して同時検出できる方法を開発している。

(2) 脳細胞外液中の物質情報を *in vivo* モニターできるマイクロ透析バイオセンサーシステムを開発し、脳での興奮性神経伝達物質であるL-グルタミン酸の高感度計測を可能にしている。さらに、脳での主要なエネルギー源としてのグルコースとその代謝物質であるL-乳酸の同時 *in vivo* 計測法を開発している。提案した *in vivo* FIA センサーシステムは、脳だけでなく皮下、血管、臓器、神経などの *in vivo* 計測に発展できる技術であり、今後の応用が期待できる。

(3) 複数の高活性固定化酵素リアクターを組み込んだ2成分同時定量FIAシステムを開発し、魚肉の鮮度測定システムとして有用であることを立証した。このように、鮮度という“あいまいさ”をFIAで数値化して評価できることを提案している。さらに、同様のシステムで、オルトリン酸と総リン酸を同時計測できるシステムを開発し、環境計測に有用であることを明らかにしている。

(4) 糖尿病の診断において注目されている糖化ヘモグロビンの酵素法による測定システムを確立している。このセンサーシステムは血球試料に適用でき、得られた分析値と日本糖尿病学会および国際臨床化学連合による認証値との相関は非常に良好であり、実用的な糖尿病診断法として有用であることを立証している。

以上の研究成果は、バイオセンサーの多機能化、高感度化、実用化に関して、貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うに必用な能力と学識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。