

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18680038

研究課題名 (和文) 分子鑄型を用いた非侵襲コレステロール計測法の開発

研究課題名 (英文) NON-INVASIVE DETECTION OF CHOLESTEROL BY USING A MOLECULARLY IMPRINTED ELECTRODE

研究代表者

椎木 弘 (SHIIGI HIROSHI)

大阪府立大学・産学官連携機構・准教授

研究者番号：70335769

## 研究成果の概要：

生活習慣病、特に高脂血症などに深く関与している総コレステロール値は、現在、酵素法により計測されている。しかしながら、従来法は侵襲的操作(採血)を伴うため医療機関へ出向く必要があり、計測までに多くの工程を要するなどの問題を抱えている。そこで、本研究では皮膚コレステロールの計測に着目する一方で、分子鑄型を有する自己集合単分子膜(SAM)を用いて、簡便で非侵襲的なコレステロール計測法の開発を行った。SAMはチオール基が金に自発的に吸着することで形成されるが、分子鑄型を形成するマトリックス分子としてチオールを用い、コレステロールの分子鑄型を金電極に形成した。この分子鑄型電極は1.0mM以下のコレステロール濃度に対して直線的に変化した(相関係数：0.9983)。分子鑄型電極の感度、選択性や再現性などについて検討し、簡便で迅速な電気化学センサの開発への応用を試みた。また、皮膚コレステロールを高速液体クロマトグラフィーで計測する一方、従来の酵素法による血中濃度との比較を継続的に行った結果、良い相関が得られた。非侵襲計測法開発の観点から、皮膚コレステロールへの着目が妥当であることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	17,700,000	5,310,000	23,010,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：非侵襲計測, 生活習慣病, コレステロール, 分子鑄型, センサ, 高脂血症, 分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

コレステロールは細胞膜や細胞内の物質の移動を防ぐ生体膜の成分、胆汁酸、各種ホルモンの原料になるなど様々な役割を担っており、生命を維持していくために不可欠な

化合物であるが、過剰摂取は動脈硬化や狭心症の危険因子である高脂血症の発症に深く関わると言われている。生活習慣病の一つである高コレステロール血症を含む高脂血症は、食文化の相違から欧米人に多く見られ、

東洋人、とりわけ日本人には軽視されがちであるが、その人口は日本国内においても年々増大し、平成2年には700万人であった患者は平成12年には2000万人を超えるまでに増大している。

近年、米国FDAは皮膚コレステロールが体内コレステロール全体の約11%を占めていることを報告し、加国International Medical Innovations社と米国クリーブランドクリニックの研究グループはコレステロール検査法Cholesterol 1,2,3™を開発した。この方法は検査パッドを手のひらに貼り付け、酵素反応による色の変化で皮膚のコレステロール量を判断できるというもので非侵襲的な検査が可能である。しかしながら、低感度なために定量的な計測は困難で、成人で50%狭窄の冠動脈が2枝以上の重度冠動脈疾患(CAD)患者および心筋梗塞の既往歴のある成人に対する併用検査への有用性は認められているが、一般母集団を対象としたCADのリスクを判定するスクリーニングテストとしては不適応であるとされており、標準的な血液検査に取って代わる検査法ではない。実際に皮膚と血中のコレステロールに相関が在るか否かという問題はいくつかの報告に結論を委ねるが、コレステロールを非侵襲的に計測するひとつの新しい試みとして、分子鑄型を刷り込んだ自己集合単分子膜を利用した測定法の開発を行い、コレステロールの定量を目指した。

特に高コレステロール血症は動脈硬化や狭心症の危険因子であり、他の生活習慣病や疾患・疾病などとの合併症のリスクから生体濃度の適正レベルの維持はゆとりある日常生活を送るための必要条件となっている。従って簡易計測法の開発は医療従事者だけでなく多くの人々に切望されている。しかしながら、医療機関で行われる計測の全てが酵素法によるもので、採血(侵襲操作)を伴うため検査技師や多くの工程(採血後に遠心分離、鹼化、抽出、酵素反応の手順に従い、最終的に呈色反応を利用した比色法により定量)を要し、さらに低濃度領域での測定感度や長期保存などに問題がある。そこで、優れた分子認識能を持つ分子鑄型膜を電極に組み込んだコレステロールセンサの開発とそれを用いる“簡易”で“非侵襲”的な計測法の開発を行い、従来法に代わる新しい計測法の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

コレステロールの分子鑄型を持つ自己集合単分子膜が優れた分子認識能を持つことを利用して、分子鑄型膜を電極に組み込んだセンサの開発とそれを用いる“簡易”で“非侵襲”的な計測法の開発を行い、従来法に代わる新しい計測法の確立を目的として当該研究期間においては下記の(1)~(4)の項目、

- (1) 高感度、高選択的なセンシングを可能にする分子鑄型膜電極の作製
- (2) 従来法(酵素法、クロマトグラフィー法)

との特性比較

- (3) 分子鑄型膜の表面観察および電気化学的特性評価
  - (4) 皮膚成分に関する調査と非侵襲的計測への利用
- などについて詳細な検討を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 高感度、高選択的なセンシングを可能にする分子鑄型膜電極の作製

検出目的物質であるコレステロールと自己集合単分子膜(SAM)から成るマトリックスを構成する分子の分子間相互作用を考慮した分子鑄型膜の設計および作製について検討した。

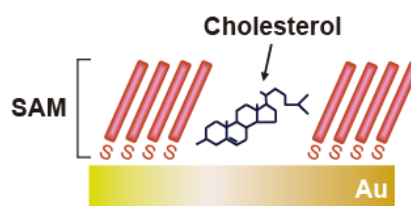


図1 分子鑄型電極の概念図

SAMはチオール基(-SH)が金に自発的に吸着することを利用して、チオール分子とコレステロールを含むエタノール溶液に金電極を浸すことにより得られた(図1)。この際チオール分子として直鎖アルキルチオールを用い、アルキル鎖の炭素数や官能基や架橋構造を持つチオール分子により精巧で強固な分子鑄型を作製し、電気化学的手法により分子認識能や膜抵抗を調べた。一方、分子鑄型電極の表面観察を行い、表面形態が及ぼすセンシング特性への影響を、特に選択性、感度の観点から調べた。また、これまでは無垢の金電極を使用してきたが、医療計測の場合、人体接触する箇所はディスプレイブルであることが好ましく、使い捨て電極の低価格化が必要になるため、金めっき電極の作製・適用について検討した。その際、形状を自由に制御できるプラスチック材を基板とした無電解めっきを適用した。めっき電極表面観察を行い、優れたセンシング特性を得るための電極の形状などを調べた。

- (2) 従来法(酵素法、クロマトグラフィー法)との特性比較

無害で人体になるべく刺激の少ない溶媒、例えばエタノールなど少量(1mL程度)を皮膚に接触させて皮膚成分を抽出した(図2)。その際に不純物として考えられる他の皮膚成分(スクワレン、トリグリセリドなど)を多く含むことが予測されるため、高速液体クロマトグラフ(HPLC)、蛍光分光計および可視紫外分光計、赤外分光計などにより抽出液の成分を調べ、コレステロール抽出に適する溶媒について、選択性などのセンシング特性、皮膚状態に与える影響の双方から検討した。

- (3) 分子鑄型膜の表面観察および電気化学的

### 特性評価

チオール分子のラテラル運動や配向性など SAM 特有の表面形態がセンシング特性に与える影響を調べた。単結晶 Au(111)や多結晶 Au 電極を用いることで SAM の配向性を変化させ、センシング特性を調べた。



図 2 コレステロールを含む皮膚成分抽出法

### (4) 皮膚成分に関する調査と非侵襲的計測への利用

分子鑄型法や高速液体クロマトグラフィーでの皮膚のコレステロール濃度と、従来法による血中濃度との比較を継続的に行い、それぞれから得られた濃度の相関性について統計的に解析した。

### 4. 研究成果

分子鑄型電極による分子認識は、図 3 により説明される。コレステロールが SAM の分子鑄型に取り込まれ(A)、酸化還元化学種の電流値が減少する。酸化電流の変化は分子鑄型電極における物質移動、つまり酸化還元マーカーの拡散に関する。電気化学的に不活性なコレステロールが酸化還元化学種の電極への拡散(B)を妨げることに起因する。この電流変化(図 4 挿入図,  $\Delta I = I_0 - I_r$ )によりコレステロール濃度が測定でき、信号の取り扱いが容易で数値化が可能であることがわかった。コレステロールと、チオール分子から成る絶縁性マトリックス膜を構成する分子の分子間相互作用を考慮した分子鑄型膜の設計および作製について検討した。チオール分子のアルキル鎖の炭素数が小さい場合、SAM 形成直後においてもマーカー分子の酸化電流が大きく、コレステロールの溶出( $I_0$ )、検出( $I_r$ )で得られた電流( $\Delta I$ )に大きな差が見られなかった。これは、マトリックスのチオール分子同士の分子間力が弱いために疎な単分子膜が形成され、それによって分子鑄型が不完全であることが推察される。したがって、感度、選択性に関して、良い特性が得られなかったものと考えられる。しかしながら、アルキル鎖の炭素数が増加するにつれ、分子鑄型膜のコレステロールに対する感度、選択性ともに増大し、炭素数 18 で最も良い特性が得られた(図 5A)。さらに分子長が増大すると(炭

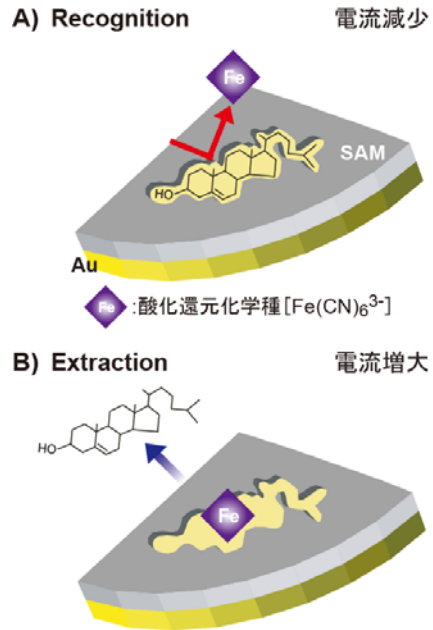


図 3 分子鑄型によるコレステロール認識(A)と吐き出し(B)に伴う電流応答の原理

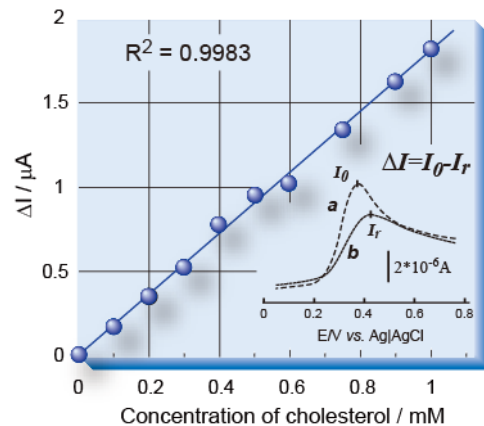


図 4 分子鑄型電極の電流応答のコレステロール濃度依存性

素数 20 以上)、コレステロール溶出操作後においても電流値に回復が見られなかった。これは、コレステロール溶出過程において、SAM に取り込まれたコレステロールがチオール分子に包み込まれ、コレステロールの SAM からの溶出が困難になっていることを意味している。感度および選択性の観点から、炭素数 18 の場合が最も良いセンシング特性を示すことがわかった。これは、コレステロールの分子サイズと炭素数 18 のステアリルメルカプタンの分子長がほぼ等しいことに起因するものと考えられる。

以上のようにして、金電極上に形成した分子鑄型膜を用いることでコレステロールの高感度計測が可能になった。

また、医療計測の場合、人体接触する箇所はディスプレイであることが好ましいため、使い捨て電極として金薄膜電極の作製・適用について検討した。その際、形状を

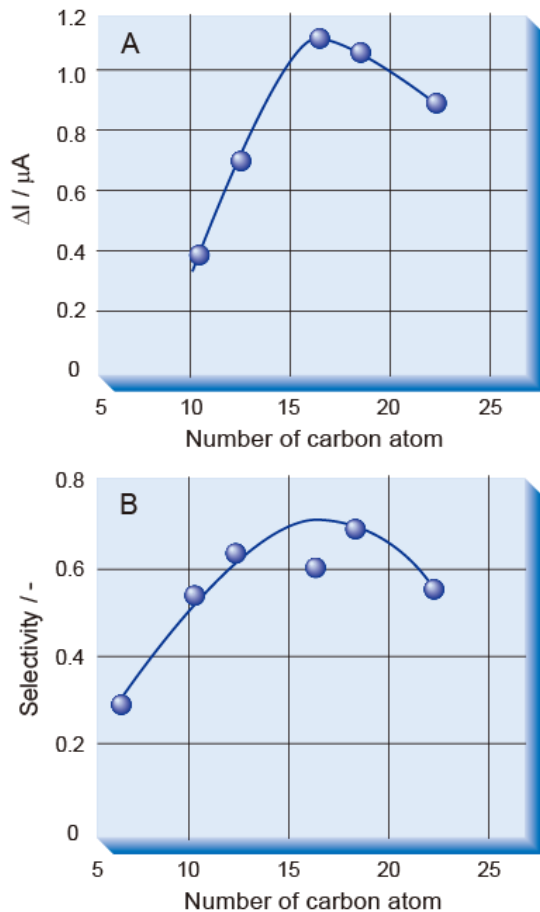


図5 分子鋳型電極のセンシング特性。(A) 応答感度のマトリックスを構成するアルキルチオール分子の炭素数依存性、(B) 選択性(コレステロールを1.0とした)のアルキルチオール分子の炭素数依存性。

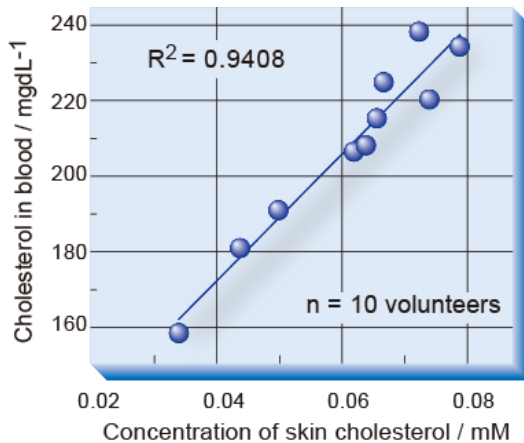


図6 皮膚と血中のコレステロールの相関 (被験者 10人)

自由に制御できるプラスチック材を基板とした蒸着やイオンスパッタ法、金ナノ粒子を用いた無電解めっきを適用した。また、電極表面観察を行い、センシング特性について検討した。電極のディスポーザブル化について、イオンスパッタ法で作製した金薄膜を用い

ることで達成された。さらに、ナノ粒子を用いて作製した金ナノ粒子膜ではセンサ応答が増大する効果が得られ、電極表面に存在する微細な構造がその電流応答を増幅するものと考えられる。

コレステロールの非侵襲計測の観点から、皮膚から抽出したコレステロールと血液検査から得られた総コレステロール量の比較をおこなった。10人の被験者はいずれも男性で、血中総コレステロールと皮膚コレステロールの間に相関が見られた(相関係数 0.9408, 図6)。

皮膚からエタノール抽出した成分について、HPLC および分子鋳型電極を用いて測定を行った。抽出液中のコレステロール濃度は抽出時間に依存したが60s以上では変化が見られないことから、抽出時間は60sとした。HPLC法では抽出液そのままでは吸光計の感度が得られないため、加熱・減圧により5倍に濃縮した。それぞれの方法から得られた値は等しいものとなった。以上のことから、分子鋳型法はHPLC法と比較して同等の認識能を持つだけでなく、5倍以上の感度を有するため、皮膚コレステロールの計測に適していることがわかった。

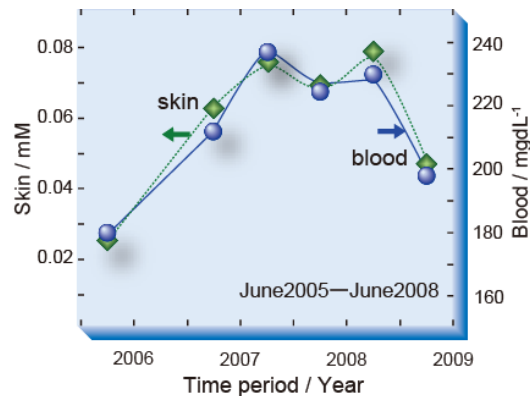


図7 ある被験者の皮膚と血中のコレステロールの相関3年間の推移

実際の計測を考えると、総コレステロールの正常値は個人差はあるが通常 130~240 mg/dL と言われる。皮膚に存在するコレステロールは 0.02~0.08 mM であり、従来法による定量は抽出液の濃縮工程を要したが、我々が開発した分子鋳型法では 0.1mM 以下の濃度領域においても十分な感度が得られ、皮膚コレステロールの定量が可能になった。さらに、血中濃度との良好な相関が得られたことから、総コレステロール値の測定の可能性も示唆された。しかしながら、妨害が予測される角層、皮脂、表皮、真皮などに存在する種々の物質に対しては、十分な選択性が得られたものと、今後、抽出法や前処理などによる解決法が必要な物質が存在した。例えば、コレ

ステロールと同様にステロイド骨格を有する胆汁酸は、分子鑄型の選択特性に大きな影響を与える値を示したが、生体中では腸で再吸収されて肝臓に戻るといった閉鎖的な循環を行っており、その低い血中濃度(1~8 μM)のために皮膚での存在は計測に関してほとんど影響しない濃度であることが予測される。また、スクワレンや脂肪酸などの疎水性が強い物質の、同じく疎水性の強い分子鑄型膜への非特異吸着が、コレステロール計測に与える影響はほとんど見られなかった。コレステロールのエステル型では、分子鑄型がコレステロールとのわずかな構造の違いを認識していることが示唆されたが、選択特性に与える影響は大きく、今後の検討課題である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- 1) S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Label-Free DNA Detection Based on Opening Bridge Structured Gold Nanoparticle Array, *Anal. Chem.*, **80**(21), 8071-8075 (2008). 査読有
- 2) H. Shiigi, H. Matsumoto, I. Ota, T. Nagaoka, Detection of Skin Cholesterol by a Molecularly Imprinted Electrode, *Journal of Flow Injection Analysis*, **25**(1), 81-84 (2008). 査読有
- 3) S. Takeda, S. Mizuguchi, H. Funahashi, H. Shiigi, T. Nagaoka, ATP Sensing by Using Momecularly Imprinted Overoxidized Polypyrrole for HACCP Application, *Chemical Sensor*, **24**, 70-72 (2008). 査読無
- 4) S. Takeda, Y. Nishide, S. Mizuguchi, H. Funahashi, H. Shiigi, T. Nagaoka, A Highly Sensitive Amperometric Adenosine Triphosphate Sensor Based on Molecularly Imprinted Overoxidized Polypyrrole, *Journal of Flow Injection Analysis*, **25**(1), 77-79 (2008). 査読有
- 5) S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Label-free DNA Detection of Nano-Gapped Gold Nanoparticle Array Electrode, *J. Electrochem. Soc.*, **155**(4), J105-J109 (2008). 査読有
- 6) S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, Preparation of Nano-Gapped Gold Nanoparticle Array for DNA Detection, *Electroanalysis*, **20**(4), 355-360 (2008). 査読有
- 7) S. Takeda, H. Shiigi, T. Nagaoka, A Highly Sensitive Amperometric Adenosine Triphosphate Sensor Based on Molecularly Imprinted Overoxidized Polypyrrole, *Chemical Sensor*, **24**, 103-105 (2008). 査読無
- 8) H. Shiigi, S. Fukazawa, T. Nagaoka, Development of Molecularly Imprinted Sterol Sensor and Non-invasive Detection, *Chemical Sensor*, **22**, 145-147 (2006). 査読無
- 9) 椎木 弘, 深澤 聡, 長岡 勉, コレステロールの簡単検出, バイオインダストリー, **23**(8), 60-66 (2006). 査読無

[学会発表] (計17件)

- 1) I. Ota, H. Matsumoto, H. Shiigi, T. Nagaoka, P-25, Analysis of extractives from a skin by using high performance liquid chromatography, ICFIA (2008年9月28日~10月3日, Nagoya)
- 2) 太田 至, 松本洋昭, 椎木 弘, 長岡 勉, HPLCによる皮膚成分の分析, Y1084, 日本分析化学会第57年会 (2008年9月10~12日, 福岡)
- 3) 武田信太郎, 水口 悟, 舟橋 均, 椎木 弘, 長岡 勉, Y1020, 分子鑄型を持つ過酸化ポリピロールによるATP計測法の開発, 日本分析化学会第57年会 (2008年9月10~12日, 福岡)
- 4) 太田 至, 松本洋昭, 椎木 弘, 長岡 勉, F1012, 分子鑄型コレステロールセンサを用いた非侵襲計測法の開発, 第96回分析化学討論会 (2008年5月15~16日, 名古屋)
- 5) 松本洋昭, 太田 至, 椎木 弘, 長岡 勉, Y1018, 皮膚からの抽出によるコレステロールの非侵襲計測に関する検討, 第96回分析化学討論会 (2008年5月15~16日, 名古屋)
- 6) H. Matsumoto, I. Ota, H. Shiigi, T. Nagaoka, P-21, Detection of a Skin Cholesterol by Using HPLC, International Symposium on Flow Based Analysis VII (2007年12月16~18日, Chiang Mai)
- 7) 武田信太郎, 太田 至, 水口 悟, 八木洋美, 舟橋 均, 椎木 弘, 長岡 勉, C3026, 分子鑄型を持つ過酸化ポリピロールを用いたATPの定量, 日本分析化学会第56年会 (2007年9月19~21日, 徳島)
- 8) 松本洋昭, 深澤 聡, 椎木 弘, 長岡 勉, C3002, 皮膚コレステロールの定量法の開発~その5~, 日本分析化学会第56年会 (2007年9月19~21日, 徳島)
- 9) H. Shiigi, I. Ota, H. Matsumoto, S. Fukazawa, T. Nagaoka, P105, Flow Injection Analysis of Skin Cholesterol Based on Molecularly Imprinted Self-Assembled Monolayer Electrode, 14th International Conference on Flow Injection Analysis (2007年9月3~7日, Berlin)
- 10) H. Shiigi, H. Matsumoto, S. Fukazawa, T. Nagaoka, Fabrication and Characterization of Molecularly Imprinted Self-assembled Monolayer, IVC Vacuum Congress 2007 (2007年7月1~8日, Stockholm)
- 11) 深澤 聡, 松本洋昭, 椎木 弘, 長岡 勉, PS177, 分子鑄型電極を用いた皮膚コレステロールの計測法, ナノ学会第5回大会 (2007年5月21~23日, 茨城)
- 12) 深澤 聡, 松本洋昭, 椎木 弘, 長岡 勉, H1023, 皮膚コレステロールの定量法の開発~その4~, 第68回分析化学討論会 (2007年5月19~20日, 栃木)
- 13) 深澤 聡, 松本洋昭, 椎木 弘, 長岡 勉, 1F26, 分子鑄型膜を修飾したマイクロ電極によるコレステロールの選択的検出, 電気化学会第74回大会 (2007年3月29~31日, 東京)

14) 松本洋昭, 深澤 聡, 椎木 弘, 長岡 勉, G6-29, 分子鑄型コレステロールセンサの開発, 日本化学会第87春季年会(2007年3月25~28日, 大阪)

15) H. Shiigi, S. Fukazawa, T. Nagaoka, 2084, Development of the Skin Cholesterol Sensing Method Using a Molecularly Imprinted Electrode, 210th Meeting of The Electrochemical Society (2006年10月29日~11月3日, Cancun)

16) 深澤 聡, 椎木 弘, 長岡 勉, P3-09-2, 分子鑄型を持つセンサ電極によるコレステロールの非侵襲計測法の開発, 第45回日本生体医工学会大会 (2006年5月15~17日, 福岡)

17) 深澤 聡, 椎木 弘, 長岡 勉, E2003, 皮膚コレステロールの定量法の開発~その2~, 第67回分析化学討論会(2006年5月13~14日, 秋田)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 分子鑄型を有するポリマーを備えたセンサー

発明者: 長岡 勉, 椎木 弘, 武田信太郎他

権利者: 大阪府立大学, 株式会社アテクト

種類: 特願

番号: 2007-223271

出願年月日: 平成19年8月29日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://tokachi.riast.osakafu-u.ac.jp/%7Estant1/home.html>

Esentan1/home.html

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

椎木 弘 (SHIIGI HIROSHI)

大阪府立大学・産学官連携機構・准教授

研究者番号: 70335769