

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月23日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750094

研究課題名（和文） 生物希少資源が不要な酵素増幅型エンドトキシン検出法の開発

研究課題名（英文） Development of enzymatically amplified detection of endotoxin without conventionally available bioreagents

研究代表者

加藤 大 (KATO DAI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：80533190

研究成果の概要（和文）：従来、高価なリムルス試薬を必要とするエンドトキシン（ET）の計測を、ET 認識分子を修飾したナノカーボン電極と、第二の ET 認識基と電気化学活性基からなる ET 認識メディエータの応答を増幅する測定技術を利用することで、安価にかつ高感度に ET を電気化学検出する簡便な方法の開発を行った。上述の目的を達成するため、ET の認識・濃縮が可能な ET 認識ポリマー修飾ナノカーボン電極の作製と、ET 認識メディエータとして、ET 認識分子であるポリミキシン B（PMB）に、①酵素、ならびにフェロセンを標識した PMB の二種類を開発した。以上、得られた修飾ナノカーボン電極・PMB 標識メディエータの組合せから成る測定系において、ET 検出感度（2ng/mL）を達成した。さらには本測定系を微小流路化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed electrochemical endotoxin (ET) detecting system without conventionally available biological reagent. To achieve this requires electrochemical signal amplification on the electrode surface with low noise. We successfully used a sputtered nanocarbon film electrode with extremely ultraflat surface. The nanocarbon surface was modified with ET-recognized polymer which shows high affinity to endotoxin. ET was captured on the polymer modified nanocarbon film electrode, and then polymyxin B (PMB)-based mediator was captured on the ET adsorbed electrode owing to the ET-PMB affinity interaction. We found that the current response of the mediator was in relation to the amount of the captured ET on the electrode surface. As a result, the detection limit was as low as 1.6~2.0 ng/mL, which was superior to those at commercially available glassy carbon electrode.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：電気化学検出、ナノカーボン、エンドトキシン、酵素反応

## 1. 研究開始当初の背景

（1）エンドトキシン（ET）は大腸菌、サルモネラ菌をはじめとするグラム陰性菌の外膜を構成している毒性物質の総称であり、そ

の本体はリポ多糖（LPS）である。ET は医薬品の生産プロセス中に生息する細菌が破壊（死滅・溶菌）することによって遊離し、医薬品に混入する。例えば、輸液や注射製剤な

ど非経口医薬品は主に発酵・遺伝子組換え技術により製造されており、製造工程において宿主細胞壁成分からの混入が懸念される。ETは微量 (ng/ml) でも血液中に混入すると発熱作用、ショック死、血管内血液凝固、敗血症、多臓器不全等を引き起こすため、これらの非経口医薬品中の ET 含有量は特に厳重に管理するように法的に規制されている。したがってこれら医薬品の安全性を確保する上で ET 含有量を簡便かつ高感度に測定することは必須となっている。

(2) ET の定量方法としては、現在、リムルス試験が主流となっている。このリムルス試験はカプトガニの血球抽出液が ET により凝固する現象を利用したものである。リムルス試験の凝固反応は、哺乳類の血液凝固系に類似したカスケード反応で起こる。従って少量の ET のシグナルを増幅して凝固が引き起こされるもので、非常に高感度な測定系である。しかしながら、本法は希少な生物資源を利用するため試薬は高価であること、反応が複雑なためオンサイト測定が困難であること、多段階にわたる反応を経る凝固過程の経時変化を測定原理としていることから、特に低濃度の ET ほどその凝固時間 (測定時間) を要する (一般に数時間) こと、さらには測定者間により測定値にばらつきが生じること、などの問題点がある。

(3) 本申請代表者のグループでは、近年、リムルス試験に替わる新規な ET 測定法として、電気化学的手法による簡便な ET の測定法を開発してきた。電気化学法では、溶液中の目的成分について、その濃度に対応する変化を電極上での電氣的 (例えば電流) 信号として変換、出力することを特徴としており、簡便かつ高感度化の目標に最適の方法である。しかしながら、ET を検出対象とした場合、ET を構成する主要成分は多糖類と脂質類であり、それら自体は何ら電気化学的な活性を示さない。そこで申請代表者のグループでは、ET の多糖鎖部分に着目し、糖鎖と錯体形成することで知られるボロン酸を付加させた酸化還元性のフェロセン誘導体 (メディエータ) を合成し、この化合物が ET と錯体形成を起こす前後で、その酸化電流の大きさが変化することを見出した。さらには、この酸化電流の変化を測定する際、フェロセン化合物の酸化と電極上に固定化した酵素による酵素還元反応とを共役させることにより、フェロセン化合物の上記の電気化学活性の変化を増幅して測定することを可能とし、さらにはその酵素反応のために電極上に設けた酵素膜が、錯体形成したフェロセン化合物を強く抑制することを見出した。その結果、その

変化を引き起こす ET 量を簡便にかつ迅速に (一試料あたり 5 分以内) 定量できることを見出した。(Kato et al., Biosens. Bioelectron, 2007, 22, 1527、加藤ら、特許第 4465452 号)。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来、高価なリムルス試薬を必要とする ET の計測を、ET を認識する分子と、酵素反応によって電気化学的に活性な分子 (メディエータ) の応答を増幅する測定技術を利用することで、安価にかつ高感度に ET を電気化学検出する簡便な方法の実現を目的とする。また、このような新規計測法の定量性能の向上を図るために、表面が原子レベルで平坦で極めてノイズ電流の小さい、スパッタナノカーボン薄膜電極を利用し、ET の極低濃度の検出・定量を試みる。この際、用いるメディエータのナノカーボン薄膜表面での電気化学反応性を明らかにすることで、簡便で高感度な ET 検出システムへと反映させる。

## 3. 研究の方法

このような ET の新規計測法の定量性向上を図るために、以下の点を明らかにする。

(1) リムルス試薬を用いずに ET を認識・濃縮し、シグナルをさらに増幅して定量が可能な電気化学 ET 測定系を新たに構築する。

(2) 上述の増幅型 ET 検出において、メディエータを安定かつ高感度に検出・定量が可能なスパッタナノカーボン電極を導入する。また、検出感度・検出限界をより向上させるためのナノカーボン薄膜電極表面の最適化、ならびに電極のフロー化・微小化を図る。

## 4. 研究成果

### 1. 電気化学 ET 測定系の構築

ET の認識・濃縮を行う反応場をナノカーボン電極上に構築するため、ET 認識ポリマーを電極表面へ安定に固定化する方法を探索した。具体的には、以下の 2 つの方法を検討した。①牛血清アルブミンと認識ポリマーを混合し、市販の架橋剤で架橋した膜を電極上に成膜する物理的固定、および②ナノカーボン表面の酸素官能基 (水酸基) と ET 認識ポリマー中のアミノ基を直接架橋可能な二官能性リンカー (*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルトリエトキシシラン、図 1) を合成し、これによる化学的固定化法を検討した。

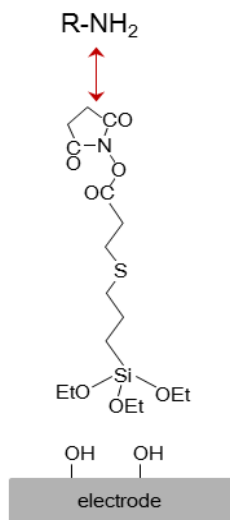
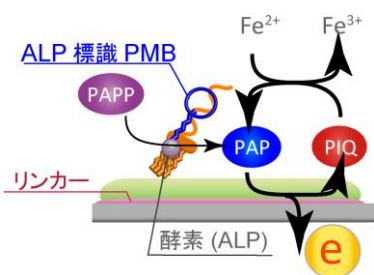


図 1. カーボン表面修飾用二官能性架橋剤

また、ET 認識メディエータとして、ET 認識分子であるポリミキシン B (PMB) に、(a) 酵素 ALP を標識した ALP-PMB、(b) フェロセン (Fc) を標識した FcPMB の二種類を開発した。図 2 に各々のメディエータを用いた ET 測定原理を示した。すなわち、ET 検出のため、この修飾ナノカーボン電極表面にまず ET 試料を吸着させ、続いて合成したメディエータを添加する。メディエータ吸着量は表面に捕捉された ET 濃度に比例して増加する。この捕捉されたメディエータに基づく電気化学測定を行うことで、ET 濃度を測定する原理である。さらに、この溶液中に還元剤を添加することで、電極上で酸化されたメディエータ

(a)



(b)

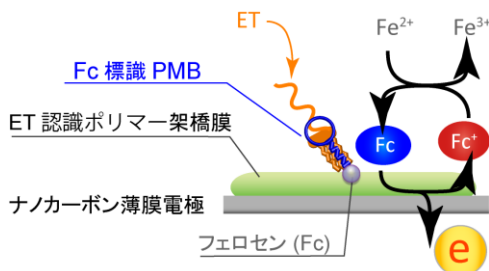


図 2. 本課題で提案した ET 測定原理. (a) ALP-PMB による増幅法、(b) FcPMB による増幅法

分子を再生 (還元) させ、メディエータの酸化/還元反応による再生のサイクルを経ることによって、ET に由来するメディエータ応答を増幅することを目的とした。

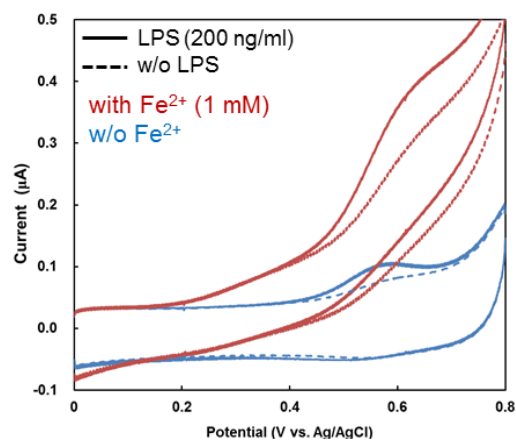


図 3. FcPMB による ET の増幅測定法。点線、実線はそれぞれ 0、200 ng/mL の ET を計測した CV 結果。青線：還元剤なし、赤線：1 mM 還元剤  $Fe^{2+}$  測定溶液：50 mM 酢酸バッファ (pH 5.0)、スキャンレート：100 mV/s.

上述の測定系に基づく ET 測定をサイクリックボルタンメトリー (CV) によって行った結果を図 3 に示した。電極表面に 200 ng/mL ET を 10  $\mu$ L 吸着した後に 200 ng/mL FcPMB を 10  $\mu$ L 添加した場合、53 nA 程度の応答が 0.59 V 付近に観測された (図 3、青色実線)。この応答は、表面に吸着した FcPMB (red) が酸化されて FcPMB (ox) となる酸化反応であると考えられる。一方、ET を吸着させない場合には 30 nA 程度の電流応答に留まったことから (図 3、青色点線)、この電流応答差が電極表面に吸着した ET に起因するものであることが推察された。さらに、ここに還元剤である鉄 (II) イオンを添加すると、酸化電流値が大きく増加した (図 3、赤線)。これは表面近傍で酸化生成した FcPMB (ox) が還元され FcPMB (red) に戻ったためである。この FcPMB の酸化/還元反応による再生のサイクルを経ることによって、FcPMB (red) の電流応答は再生反応を行わない場合に比べておよそ 3~4 倍に増幅された。上述の ET による電流増幅は電極上に添加した ET 濃度に依存しており、図 4 の検量線の結果から、本法での ET の検出下限濃度は 1.6~2.0 ng/mL であった。

同様に ALP 修飾 PMB における増幅系も検討したところ、ALP の酵素反応生成物である PAP の酸化電流が電極表面に吸着した ET 濃度に比例すること、鉄 (II) イオンにより PAP の応答信号が増幅することを確認できた。しかしながら、ALP 自体が修飾ナノカーボン電極上

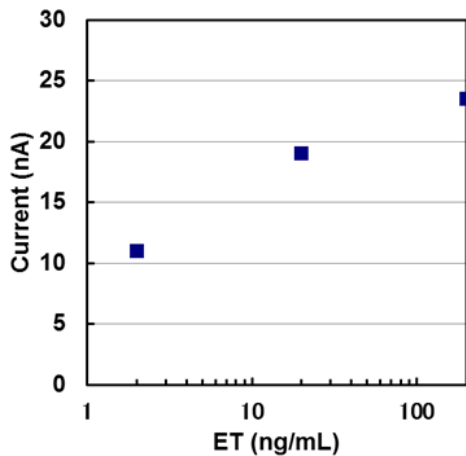


図 4. FcPMB とナノカーボン電極を用いた場合の ET の検量線。測定条件は図 3 と同一。

に非特異吸着し、バックグラウンドノイズが高いことも確認された。この非特異吸着の影響のため、FcPMB による測定系に比べ、ET 検出下限は数 10 ng/mL のオーダーに留まった。以上、得られた修飾ナノカーボン電極・FcPMB の組合せから成る測定系によって、簡便かつより高感度な ET の電気化学測定が構築できることが明らかとなった。

ナノカーボン電極の優位性を示すため、市販カーボン電極（グラッシーカーボン電極（GC））を用いて行った結果を図 5 に示した。GC においても表面修飾、ET 吸着は可能であるが、GC ではバックグラウンド電流が大きく、S/N の悪い結果となった。以上の結果から、より低濃度の ET に由来する電流変化を追うことは GC 電極では困難であることが明らかとなり、ナノカーボン薄膜電極の優位性が実証された。

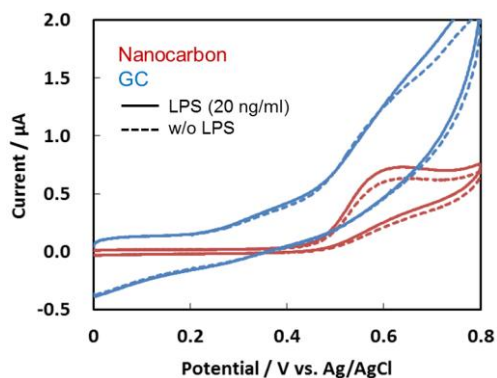


図 5. FcPMB を用いた ET 増幅測定における電極間の比較。赤線：ナノカーボン薄膜電極、青線：GC 電極。点線、実線はそれぞれ 0、20 ng/mL の ET を計測した CV 結果。測定溶液：1 mM 還元剤  $Fe^{2+}$  を含む 50 mM 酢酸バッファ (pH 5.0)、スキャンレート：100

## 2. 測定系のフローシステム化

マイクロ流路と電気化学測定を組合せたマイクロフローシステムを開発した。シリコン基板、ならびにガラス基板上にパタンスパッタしたナノカーボン電極とポリジメチルシロキサンからなる直線流路を貼合せることで、マイクロ流路を形成した。十分な送液と電気化学測定が可能となる様、流路デザインを検討した結果、流路幅 1.2 mm、高さ 40  $\mu$ m のマイクロ流路において、ET 測定で用いる上記 PAP などのメディエータを感度良く測定できることを見出した（図 5）。

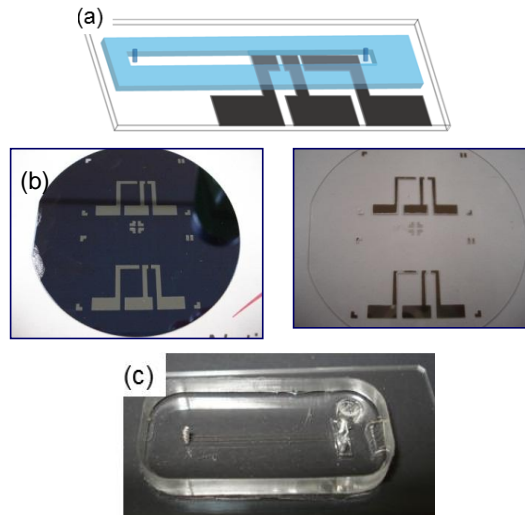


図 5. ET 計測マイクロ流路デバイス。(a) 全体図、(b) 熱酸化シリコン・ガラス基板へスパッタされたナノカーボン、(c) PDMS 直線微細流路。

## 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）

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① “スパッタナノカーボン電極を用いた LPS の電気化学検出”  
加藤大、小田侑、田中睦生、鎌田智之、飯島誠一郎、吉見靖男、廣野滋、丹羽修  
電気化学会第 80 回大会、2013 年 3 月 31 日、東北大学（宮城県）
- ② “スパッタナノカーボン薄膜を用いたエンドトキシンの電気化学的測定法の開発”  
小田侑、加藤大、鎌田智之、田中睦生、吉見靖男、廣野滋、丹羽修  
第 9 回茨城地区分析技術交流会、2012 年 11 月 22 日、いばらき量子ビーム研究センター、（茨城県）
- ③ “Electrochemical LPS detection using a nanocarbon film electrode”

Dai Kato, Atsumu Oda, Seiichiro Iijima,  
Mutsuo Tanaka, Shigeru Hirono, Yasuo  
Yoshimi, Osamu Niwa  
CJK2012、2012年10月17日、上海新国際  
展示場（中国）

- ④ “ナノカーボン電極を用いた電流増幅型  
エンドトキシンの電気化学検出”  
加藤大、小田侑、鎌田智之、田中睦生、飯  
島誠一郎、吉見靖男、廣野滋、丹羽修  
日本分析化学会第61年会、2012年9月20  
日、金沢大学（石川県）
- ⑤ “フェロセン誘導体を用いたエンドトキ  
シンの電気化学検出”  
加藤大、飯島誠一郎、矢吹聡一、水谷文雄、  
丹羽修  
電気化学会第79回大会、2012年3月31  
日、アクティシティ浜松（静岡県）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：エンドトキシンの濃度測定方法および  
エンドトキシンの濃度測定装置  
発明者：加藤大／小田侑／田中睦生／飯島誠  
一郎／丹羽修／戸所正美  
権利者：産業技術総合研究所／JNC株式会社  
種類：特許  
番号：特願2012-195555  
出願年月日：2012.9.5  
国内外の別：国内

〔その他〕

- ① イベント出展  
スパッタナノカーボン電極を用いたエンド  
トキシンの電気化学検出  
第12回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発  
表会  
2013年02月05日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤大 (KATO DAI)  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・主任研究員  
研究者番号：80533190