

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288071

研究課題名(和文) ナノカーボン電極を用いたリムルス試薬非依存型LPS定量デバイスの開発

研究課題名(英文) LAL-free LPS detection device by using a nanocarbon film electrode

研究代表者

加藤 大(Kato, Dai)

国立研究開発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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来、高価な試薬(リムルス試薬)を必要とする lipopolysaccharide (LPS) を、簡易に計測可能な電気化学式LPS定量デバイスの開発を行った。LPS認識分子を標識した電気化学活性分子(フェロセンや亜鉛錯体)をLPSプローブとして合成し、本プローブの電極上での応答増幅現象を利用することで、リムルス試薬が不要な新たなLPS検出法を実現した。また、電極として、表面が原子レベルで平坦で極めてノイズ電流の小さいナノカーボン薄膜を利用することで、極低濃度のLPS(200 pg/ml)検出が可能であった。さらには本系のフロー化、微小流路化により簡易で再現性の高い測定が可能であった。

研究成果の概要(英文)：We developed electrochemical lipopolysaccharide (LPS) detection systems based on a nanocarbon film electrode. We also developed new LPS probes consisting of LPS-affinity molecules and electroactive compounds. The nanocarbon film electrode allowed us to obtain the electrochemically amplified signals, which was dependent on the amount of LPS. The detection limit was 200 pg/mL of LPS even without a conventionally available reagent for LPS detection.

研究分野：分析化学、電気化学

キーワード：ナノカーボン 電気化学 LPS デバイス エンドトキシン

1. 研究開始当初の背景

(1) Lipopolysaccharide (LPS) 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物質である。LPS 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。LPS 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 LPS 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 LPS 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) LPS 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 LPS により凝固する現象を利用する方法である。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 LPS 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の計測を測定原理としており、特に低濃度の LPS 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) 本課題代表者は、近年、リムルス試験に替わる新規な LPS 測定法として、電気化学的手法による簡便な LPS 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、LPS を検出対象とした場合、LPS 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。そこで課題代表者は、LPS 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(メディエーター)を合成し、この化合物が LPS 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 LPS 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)。さらには、LPS との相互作用がボロン酸よりも一段と強いポリミキシン B (LPS に対して 10^8 M^{-1}) を標識したフェロセンを創製し、ボロン酸誘導体よりも、エンドトキシンに対する定量性(選択性ならびに再現性)が著しく向上させることに成功した(Biosens. Bioelectron., 2011, 26, 2080、特許第 4465452 号)。しかしながら、その検出下限は数 10 ng/ml と、目標値に到達していない。

2. 研究の目的

本研究では、従来、リムルス試薬を必要とする LPS を、LPS 認識分子を標識した電気化学的活性分子(メディエーター)によって LPS の応答信号を増幅する技術を駆使することで、安価にかつ高感度に LPS を電気化学検出する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、LPS の極低濃度($\sim 10 \text{ pg/ml}$)の検出をめざす。この際、用いるメディエーター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し、実試料計測可能な簡便で高感度な LPS 検出システムへ発展させる。最終的には本系をフローシステム化、あるいは微小流路化することで更なる高感度化を試みる。

3. 研究の方法

本課題では、より極低濃度の LPS 計測を達成するため、以下の課題に取り組んだ。

(1) LPS 認識分子であるポリリジン(PL)を電極表面へ固定化し、LPS を選択的に回収、さらに第二の LPS 認識分子であるポリミキシン B (PMB) が標識されたフェロセンプローブ(FcPMB)を作用させることで、捕捉した LPS の応答を電極界面で大きく増幅できる LPS センシング電極表面を構築する。

(2) LPS 認識分子を修飾した亜鉛錯体プローブを開発し、亜鉛イオンを電極上で濃縮、応答増幅が可能なアノードックストリッピングボルタンメトリー(ASV)法を採用することで、亜鉛イオンを LPS 量の指標とした LPS 検出系の構築を行う。

これらの新規検出法の達成により、 $\sim 10 \text{ pg/ml}$ レベルの検出限界をめざす。

(3) 増幅法による LPS の電気化学検出において、フェロセンや亜鉛イオンの電気化学活性分子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表面の最適化を図り、安定で高感度な LPS 検出へとフィードバックする。

(4) 電気化学 LPS 測定をフローシステム、

あるいはマイクロ流路デバイス内で行い、さらなる簡易化や高感度化を検討する。

4. 研究成果

(1) フェロセンプローブによる LPS 検出

LPS 認識分子である PL を牛血清アルブミン (BSA) と混合し、市販の架橋剤で架橋した膜をナノカーボン電極表面上に成膜することで、LPS の認識・濃縮を行う反応場を構築した。LPS の測定原理を図 1 に示す。PL 修飾電極上に LPS を捕捉させた後に、FcPMB プローブを添加し、前述の捕捉した LPS に作用させ吸着させた。電極を鉄 (II) イオン溶液中へ挿入し、電気化学測定を行った。最終的に電極上に捕捉されたプローブ量に応じた電気シグナルを計測することで LPS 定量を試みた。その結果、リムルス試薬を用いることなく 2 ng/mL の LPS まで定量できることを実証した。従来カーボン電極 (グラッシカーボン: GC) を用いた本測定系では、電極由来のノイズ電流の影響を受け、2 ng/mL の低濃度 LPS を定量することが不可能であったことから、ナノカーボン電極の有用性が実証された。

また、ドライプロセスによりナノカーボン薄膜表面をフッ素化することで、よりノイズ電流の低い電極を構築することに成功した。その結果、図 2 に示すように低濃度域の LPS 定量性が向上することが分かった。

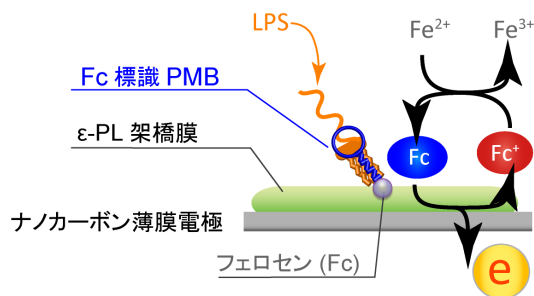


図 1. フェロセンプローブを用いた LPS 測定原理。

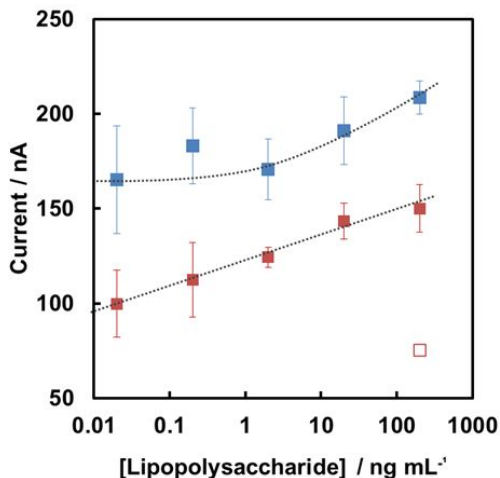


図 2. FcPMB による LPS の検量線。フッ素化ナノカーボン (■)、オリジナルナノカーボン (□)。

尚、本提案原理の正確性を、表面プラズモン共鳴法 (SPR) により評価した。その結果を図 3 に示す。SPR チップ上に固定した PL 膜上に、順次 LPS、FcPMB を送液することで、濃度依存的な SPR 角度変化が得られたことから、本検出系が提案通りに動作していることが実証された。

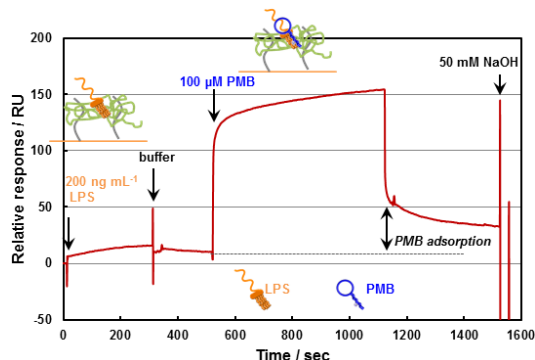


図 3. SPR 法による本提案原理の実証。

(2) 亜鉛錯体プローブによる LPS 検出

さらなる高感度 LPS 計測法の構築に向けて、フェロセンに代替し亜鉛錯体を導入した LPS プローブを設計・開発した。また、それに伴い構築した新規 LPS 測定原理を図 4 に示す。まず、PL が修飾された LPS 捕捉微粒子上に LPS を吸着させた後、ここへ LPS プローブを添加・捕捉した。ここへ酸性溶液を添加することで亜鉛イオンを溶出し、スパッタナノカーボン薄膜電極を用いて亜鉛イオン抽出溶液の電気化学測定 (ASV 法) を行った。その結果、亜鉛イオンの応答電流と LPS 濃度には相関性があり、本法での LPS の検出下限濃度は 200 pg/mL を達成した。本検出原理は、微粒子上への LPS、プローブの濃縮に加え、亜鉛イオンがナノカーボン電極上へ濃縮されることを特徴とする ASV 測定法に起因している。亜鉛イオンを還元堆積させるためには電極に高い電圧を印加する必要があるが、GC 電極ではこの高い印加電圧に対して、耐性が低い。そのため、低濃度の亜鉛イオン検出が困難である。一方で、ナノカーボン電極は sp³ 結合を有しているため、GC に比べ高い印加電圧に対する電極安定性に優れる。このため、より効率的な亜鉛イオンの濃縮が達成できたと考えている。

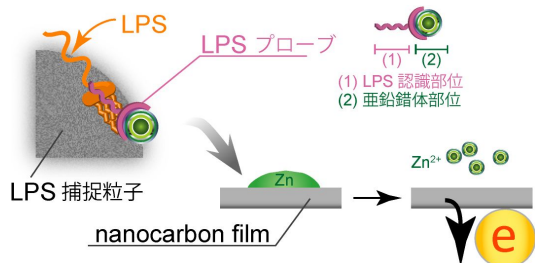


図 4. 亜鉛錯体プローブを用いた LPS 測定原理。

(3) フローシステム化

上述の亜鉛錯体から成る LPS プロブを用いた電気化学 LPS 検出の簡易化を目的に、測定系のフローシステム化に取り組んだ。具体的には、LPS 捕捉微粒子 (30mg) を内径 1 mm のテフロンチューブ内に内包させたミニカラムを作製し、ここに順次、LPS 試料、プローブ、亜鉛脱離溶液を通液させた。溶離してきた亜鉛イオンをナノカーボンで測定することで LPS 計測が可能なフローシステムの開発に成功した。測定結果を図 5 に示したように、0.2 ng/mL の LPS においても十分な応答を得ることに成功した。また、本システムにより、再現性の高い LPS 定量が可能となったこと、さらには従来のリムルス試験との高い相関性を得られることが分かった ($r=0.999$, $p < 0.03$)。

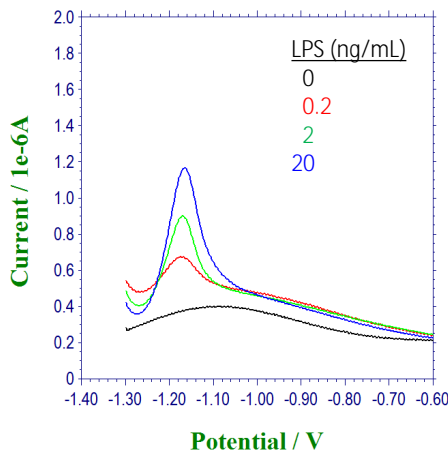


図 5. フローシステムによる LPS 測定の結果.

(4) LPS 計測用マイクロ流路デバイス

これまでに開発した電気化学 LPS 測定をより高感度で行うためにマイクロ空間を反応場としたマイクロ流路デバイスの開発を行った (図 6)。具体的には、スライドガラス

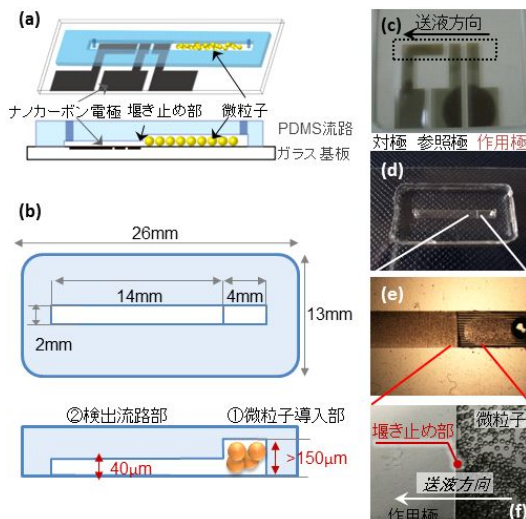


図 6. LPS 計測用マイクロ流路デバイス.

上へパタン化した絶縁シールを貼付し、パタン化されたナノカーボン膜を成膜した。パタン化電極上に着脱可能な直線型の微小流路を PDMS で形成し、これを貼り合わせることで LPS 計測用マイクロ流路デバイスを構築した。さらには、マイクロ流路は深さの異なる流路からなり、図 6(a)(b)のように微粒子を充填できる部分 (150 μm) と電気化学検出を行う部分 (40 μm) から成る。作製された流路デバイスに LPS 捕捉微粒子を導入し、フローシステムと同様の通液操作を行うことで十分な電気化学性能を示すことが確認された。

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 3 件)

加藤大*、小田侑、田中睦生、飯島誠一郎、鎌田智之、戸所正美、吉見靖男、丹羽修、Poly- ϵ -Lysine Modified Nanocarbon Film Electrodes for LPS Detection、*Electroanalysis*, 2014, 26, 618-624.

丹羽修、加藤大、鎌田智之、國武雅司、スパッタナノカーボン薄膜材料を応用したバイオセンサ、*応用物理*, 84, 2015, 908-912.

小田侑、加藤大*、吉岡恭子、田中睦生、鎌田智之、戸所正美、丹羽修、A Fluorinated Nanocarbon Film Electrode Capable of Signal Amplification for Lipopolysaccharide Detection、*Electrochimica Acta*, 2016, 197, 152-158.

[学会発表] (計 18 件)

小田侑、加藤大、田中睦生、鎌田智之、飯島誠一郎、吉見靖男、廣野滋、丹羽修、LAL REAGENT-FREE ELECTROCHEMICAL LPS DETECTION USING A NANOCARBON ELECTRODE、RSC Tokyo International Conference 2013、2013 年 09 月 05 日、幕張メッセ (千葉県)

小田侑、加藤大、田中睦生、鎌田智之、飯島誠一郎、吉見靖男、廣野滋、丹羽修、スパッタナノカーボン電極を用いた電流増幅型 LPS の電気化学検出、2013 年電気化学秋季大会、2013 年 09 月 28 日、東京工業大学大岡山キャンパス (東京都)

小田侑、加藤大、飯島誠一郎、鎌田智之、吉見靖男、丹羽修、 ϵ -ポリリジン修飾ナノカーボン電極を用いた電気化学 LPS 測定法の開発、第 10 回茨城地区分析技術交流会、2013 年 11 月 29 日、いばらき量子ビーム研究センター (茨城県)

加藤大、小田侑、鎌田智之、飯島誠一郎、丹羽修、ナノカーボン薄膜を用いたエンドトキシンの電気化学センシング、化学

とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会、2013 年 12 月 06 日、イーグレ姫路 あいめっせホール(兵庫県)

丹羽修、加藤大、鎌田智之、Qiang Xue、廣野滋、戸所正美、Qiaohui Guo、Tianyan You、Nanocarbon Based Electrochemical Biosensors for Drug Development、65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry、2014 年 09 月 04 日、ローザンヌ(スイス)

小田侑、加藤大、田中睦生、鎌田智之、戸所正美、丹羽修、Poly-lysine modified nanocarbon film electrode for LPS detection without LAL reagent、RSC Tokyo International Conference 2014、2014 年 09 月 04 日、幕張メッセ(千葉県)

小田侑、加藤大、田中睦生、鎌田智之、戸所正美、丹羽修、電気化学 LPS 検出のためのポリ-L-リジン修飾ナノカーボン電極の構築、2014 年電気化学秋季大会、2014 年 09 月 28 日、北海道大学(北海道)

加藤大、A Sputtered Nanocarbon Film Electrode for Detecting Biomolecules、Pittcon2015(招待講演)、2015 年 03 月 09 日、ニューオリンズ(アメリカ)

加藤大、鈴木祥夫、小田侑、吉岡恭子、鎌田智之、佐々木修治、戸所正美、丹羽修、亜鉛錯体プローブを用いたエンドトキシンの電気化学検出、電気化学会第 82 回大会、2015 年 03 月 16 日、横浜国立大学(神奈川県)

加藤大、鈴木祥夫、吉岡恭子、小田侑、鎌田智之、佐々木修治、戸所正美、丹羽修、スパッタナノカーボン電極と亜鉛錯体プローブを用いた LPS 計測、第 75 回分析化学討論会、2015 年 05 月 23 日、山梨大学(山梨県)

加藤大、ナノカーボン薄膜電極の開発と生体分子検出への応用、平成 27 年度日本分析化学会 関東支部 若手交流会(招待講演)、2015 年 06 月 26 日、晴海(東京都)

D. Kato、A Sputtered Nanocarbon Film Electrode as a Platform for Detecting Biomolecules、日本分析化学会第 64 年会/2nd Asian Symposium for Analytical Sciences(招待講演)(国際学会)、2015 年 09 月 09 日、九州大学(福岡県)

吉岡恭子、加藤大、鈴木祥夫、鎌田智之、佐々木修治、戸所正美、丹羽修、亜鉛錯体プローブを用いたエンドトキシンの LAL フリー電気化学検出、2015 年電気化学秋季大会/第 59 回化学センサ研究発表会、2015 年 09 月 11 日、埼玉工業大学(埼玉県)

D. Kato、O. Niwa、Sputtered nanocarbon film electrodes for bioelectroanalysis、2015 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry(CJK2015)(招待講

演)(国際学会)、2015 年 10 月 14 日、プサン(韓国)

D. Kato、Y. Suzuki、K. Yoshioka、T. Kamata、S. Sasaki、M. Todokoro、O. Niwa、Electrochemical lipopolysaccharide detection using zinc complex-based probes and sputtered nanocarbon film electrode、Pacifichem2015(国際学会)、2015 年 12 月 17 日、ホノルル(アメリカ)

加藤大、吉岡恭子、藏屋英介、國武雅司、鎌田智之、戸所正美、丹羽修、フッ素化ナノカーボン電極による食品・生体分子センシング、電気化学会第 83 回大会・第 60 回化学センサ研究発表会、2016 年 03 月 29 日、大阪大学吹田キャンパス

D. Kato、Y. Suzuki、K. Yoshioka、T. Kamata、S. Sasaki、M. Todokoro、O. Niwa、Electrochemical lipopolysaccharide detection using a sputtered nanocarbon film electrode (Oral Talk)、11th Asian Conference on Chemical Sensors (ACCS 2015)(国際学会)、2015 年 11 月 17 日、ペナン(マレーシア)

丹羽修、加藤大、吉岡恭子、栗田僚二、創薬に関連したバイオセンシング技術の開発(招待講演)、センサ・アクチュエータ・マイクロナノ/ウィーク 2015 次世代センサ総合シンポジウム、2015 年 09 月 18 日、東京ビックサイト

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: エンドトキシンの電気化学的濃度測定方法

発明者: 加藤大 / 鈴木祥夫 / 小田侑 / 鎌田智之 / 丹羽修 / 吉岡恭子 / 佐々木修治 / 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 2015-28888

出願年月日: 2015.2.17

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

受賞

1. 加藤大、日本分析化学会 関東支部 新世紀賞、“高性能ナノカーボン薄膜電極の開発と生体成分検出への応用”、2015 年 1 月 7 日

2. 小田侑、RSC Best Presentation Award、RSC Tokyo International Conference 2014、2014 年 09 月 04 日、幕張メッセ(千葉県)

3. 丹羽修、ACCS2015 Best Presenter Award、2015 年 11 月 17 日、ペナン(マレーシア)
http://www.sit.ac.jp/news/2015/10_12/1125_02.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤大 (KATO Dai)
国立研究開発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

(2)研究分担者

吉岡恭子 (YOSHIOKA Kyoko)
国立研究開発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：50358321

鈴木祥夫 (SUZUKI Yoshio)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員
研究者番号：60321907

田中睦生 (TANAKA Mutsuo)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長
研究者番号：70344108

丹羽修 (NIWA Osamu)
埼玉工業大学・先端科学研究所・教授
研究者番号：70392644