

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19850026  
 研究課題名（和文） 藻類細胞アレイバイオセンサーの開発と水質毒性評価への応用  
 研究課題名（英文） Amperometric Algal Array Biosensor for Environmental Water Toxicity Test  
 研究代表者：四反田 功（SHITANDA ISAO）  
 東京理科大学・理工学部・助教  
 研究者番号：70434024

研究成果の概要：藻類細胞の光合成活性を電気化学的にモニタリング可能なバイオセンシングデバイスの開発を行った。スクリーン印刷を用いて藻類細胞を印刷によって安定に電極上に固定化する技術を確立した。固定化した藻類細胞の光合成による酸素発生を電気化学的にモニタリングすることで、除草剤の毒性を 4 min で評価可能となった。また、藻類の鞭毛運動および走光性活性変化を迅速に検知可能な新規細胞バイオセンサを開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,350,000	0	1,350,000
平成 20 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	405,000	3,105,000

研究分野：電気分析化学

科研費の分科・細目：化学・分析化学

キーワード：細胞バイオセンサー，環境毒性，スクリーン印刷

## 1. 研究開始当初の背景

水環境中には多種多様な化学物質が存在し、その中には毒性を持つものもある。それにより生じるリスクを避けるためには、その種類や量を知ることが重要である。その際、特定物質の定量を行うよりも、毒性物質が生体に与える影響の質や程度をとらえる方が有効な場合も多い。このため、生体の毒物に対する応答を利用して毒性を包括的に評価する手法であるバイオア

ッセイが、重要性を増している。そのなかでも、藻類細胞を用いたバイオアッセイは、毒性物質に対する感度や再現性が良い試験法として広く用いられている。しかし、成長阻害を指標とするため、評価までに 3 日程度の時間がかかる。また、サンプリングしたその場でアッセイを行うことができない。このため、より簡便かつ迅速に毒性評価できるデバイスが求められている。

簡便かつ迅速に毒性評価できるデバイスとして、藻類の光合成活性を利用した whole-cell biosensor が注目されている。これまでに、光合成によるクロロフィルの蛍光強度を分光学的に、もしくは酸素発生量の変化を酸素電極により電気化学的に検出するものが開発されている。しかし、高価で、小型化、ディスポーザブル化が困難であるため、両者ともに簡易型デバイスとしては普及していない。環境毒性評価における迅速なバイオアッセイの重要性が増しているにも関わらず、現状で用いられているのは操作が極めて簡単な一部のシステムのみである。従って、バイオセンシング法などを用いた評価法の確立にはまだ多くの課題が残っている。また、藻類細胞の鞭毛運動活性変化を同時にモニタリングすることで、多種多様な化学物質を含む環境試料の有害性を多角的に評価可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、迅速・簡便に使用できる新しいバイオセンサーシステムの開発を目的とした。

(1)スクリーン印刷を用いた藻類細胞バイオセンサーの作製とフローインジェクション分析による毒性評価

本研究では、バイオセンサの作製方法としてスクリーン印刷に着目した。スクリーン印刷には、正確なパターンを作製可能、幅広い種類のインクが使用可能、再現性が良好、低コストといった利点をもつため、スクリーン印刷による電極はバイオセンサなど幅広く用いられている。しかし、藻類細胞の固定化までスクリーン印刷を応用した例はない。本研究では、藻類細胞インクを調製し、全工程スクリーン印刷を用いたバイオセンサの作

製した。また、フローインジェクション分析により、除草剤の毒性評価を行った。

(2)鞭毛藻類の走光性活性を検知するバイオセンサーの作製と評価

藻類の鞭毛運動による局所領域の流体の流れ(生物対流)をリアルタイムに検出することは、細胞の性質を知り、運動の機構を解明するために重要である。また、鞭毛藻類は、光や重力に対する走性を持つ。これらの生理活性は有機化合物や一部の金属イオンによって阻害されることが知られている。したがって、走光性による鞭毛運動をモニタリングすることができれば新たな生態毒性評価法となりうる。そこで本研究では、ボルボックスの走光性による生物対流変化をモニタリングするシステムの開発を行った。

## 3. 研究の方法

(1)スクリーン印刷を用いた藻類細胞バイオセンサーの作製とフローインジェクション分析による毒性評価

バイオセンサに用いるカーボン電極はスクリーン印刷で作製した。PETシート上にリード部分である銀、電極部分であるカーボン、レジストの順に印刷した。それぞれのインクは印刷後、100°Cで30分間乾燥させた。藻類細胞には緑藻類の一種である *Chlorella vulgaris* を用いた。藻類細胞とカーボンナノチューブを4 wt%のアルギン酸ナトリウム水溶液に懸濁させて藻類インクを調製した。スクリーン印刷により調製した藻類インクをカーボン電極上に印刷した。その後0.2 MのCaCl<sub>2</sub>に浸漬させインクを固化させた。

毒性試験は自作のフローセルを用いて行った。クロノアンペロメトリーによって藻類の光合成による酸素還元電流をモニタリングした。測定は3電極法によって行った。対

極，参照極にはそれぞれ白金線，飽和Ag/AgCl電極を用いた．藻類バイオセンサ（作用極）に飽和Ag/AgCl電極に対して-0.7 Vを印加した状態で，断続的に作用極に可視光(光強度，10 mW cm<sup>-2</sup>)を照射した．なお，測定は暗室内で外界からの光は遮断した状態で行った．毒物には除草剤である6-chloro-*N*-ethyl-*N*-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (atrazine) および3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diethylurea (DCMU)を用いた．AtrazineもしくはDCMUを含む溶液を流したときの酸素還元電流の減少率からatrazineの藻類細胞に対する毒性を見積もった．

#### (2)鞭毛藻類の走光性活性を検知するバイオセンサーの作製と評価

藻類細胞には鞭毛藻類の一種である*Volvox Carteri*を用いた．スクリーン刷法によりデュアル電極を作製した．リード部分には銀を用いた．電極部には生物に毒性のある銀の溶出を防ぐためにカーボンを印刷した．ポリオンコンプレックス膜を用いて電極間にボルボックスを固定化した．ボルボックスの生物対流変化をクロノアンペロメトリーにより電気化学的に検出した．電解質溶液にNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液，レドックスマーカには[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>を用いた．電位を-0.1 V vs Ag/AgClに保持しながら[Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>の拡散限界電流をモニタリングした．光源には白色LEDを用いた．

#### 4. 研究成果

(1) スクリーン印刷を用いた藻類細胞バイオセンサーの作製とフローインジェクション分析による毒性評価

作製した藻類細胞バイオセンサの写真を図1に示す．藻類細胞を印刷により固定化し

たことによって薄く，均一な固定化膜を形成することができた．膜との密着性は良好であった．



図1 スクリーン印刷により作製した光合成活性測定型藻類細胞バイオセンサ

図2に藻類細胞バイオセンサの電流応答を示す．光を照射すると電流値が増加した．また，光の照射を止めると電流値が減少した．これは，藻類細胞の光合成による酸素発生と暗呼吸による酸素消費のため，電極近傍の酸素濃度が増減したからである．このことから藻類細胞が光合成活性を保ったまま電極上に固定化されていることがわかった．光を照射したときに電流値が定常値になるまでの時間はカーボンナノチューブを用いなかった場合に比べて2倍程度早くなった．これは，ゲル内で3次元網目上に広がっているカーボンナノチューブが電極として機能し，膜内で生成した酸素が電極まで拡散する時間がより短くなったことが原因と考えられる．

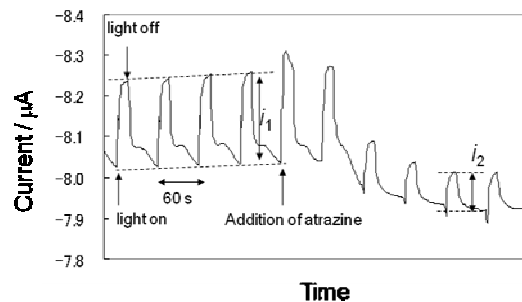


図2 藻類細胞バイオセンサの電流応答

図3に，atrazineとDCMUの用量-作用曲線を示す．図3の結果から，酸素発生を50%阻害する濃度(IC<sub>50</sub>)を算出したところ，atrazine, DCMUのIC<sub>50</sub>はそれぞれ12, 1 μmol dm<sup>-3</sup>となった．これより，除草剤毒性が評価

可能であることが示された。また、従来の酸素電極を用いたセンサと比べて測定時間が大幅に向上した。

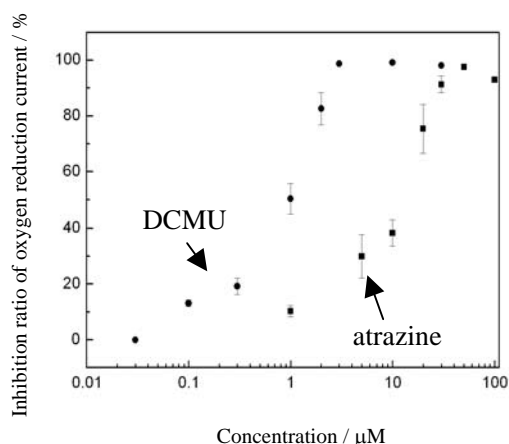


図3 atrazine およびDCMU の用量-作用曲線

## (2) 鞭毛藻類の走光性活性を検知するバイオセンサーの作製と評価

図4に電極間に固定したボルボックスの光学顕微鏡写真を示す。ボルボックスは球体であり全身に鞭毛を有している。光学顕微鏡観察により、ボルボックスが鞭毛運動を保持したまま固定されていることを確認した。ボルボックスの鞭毛運動によって溶液が攪拌されると、電極近傍の拡散層の厚さが薄くなる。拡散層が薄くなることによりレドックスマーカである $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ の拡散が速くなるため還元電流が増加する。このとき、走光性によりボルボックスは光を照射している方向と反対側の鞭毛を動かすので、光を照射した側の電流値が相対的に小さくなる。これにより走行性による鞭毛運動変化を電気化学的に検出できる。

クロノアンペロメトリーの結果を図5に示す。500 s後に光をW1側から照射すると正の走光性によりW2側の鞭毛運動が活発になりW2の還元電流が増加した。また1500 s後に光の照射方向を切り換えると、作用極

1の還元電流が増加し、作用極2の還元電流が減少した。以上の結果によりボルボックスの走光性による生物対流の変化をレドックスマーカを用いて電気化学的に検出できることが示された。

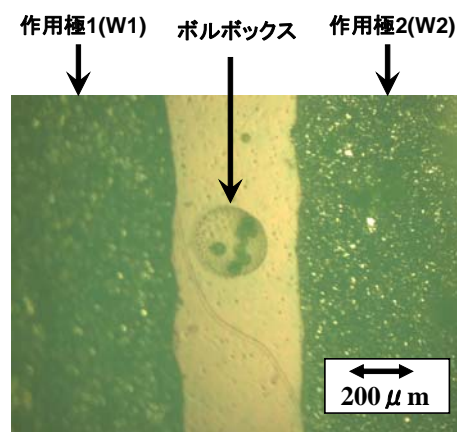


図4 電極間に固定したボルボックス

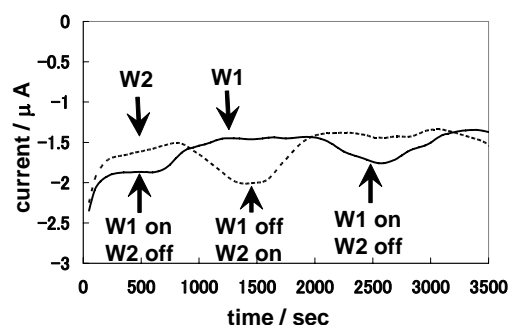


図5 ボルボックスの生物対流変化の電気化学的検出

(W1 on: 作用極1側から光を照射)

## 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 4 件)

論文 (査読有)

1. Isao Shitanda, Satoshi Takamatsu, Kunihiko Watanabe, Masayuki Itagaki  
“Amperometric Screen-printed Algal Biosensor with Flow Injection Analysis System for Detection of Environmental

Toxic Compounds”

Electrochimica Acta, in press.

2. Isao Shitanda, Koji Ishizaki, Masayuki Itagaki, Kunihiro Watanabe

“Electrochemical system for simultaneous monitoring of immobilized algal flagellar movement and phototaxis”

Electrochemistry, 76(8), 566-568 (2008).

プロシーディング (査読有)

1. Isao Shitanda, Satoshi Takamatsu, Masayuki Itagaki, Kunihiro Watanabe

“Screen-printed Algal Biosensor with Flow Injection Analysis System for Toxicity Test”

ECS Transactions, 16(11), 21-25 (2008).

プロシーディング (査読無)

1. Satoshi Takamatsu, Isao Shitanda, Masayuki Itagaki, Kunihiro Watanabe

“Toxicity Test of Amperometric Screen-printed Algal Biosensor with Flow Injection Analysis”

Chemical Sensors, 24, 88-90 (2008)

[学会発表] (計 7 件)

国際学会発表 (口頭発表)

1. Isao Shianda, Satoshi Takamatsu, Masayuki Itagaki, Kunihiro Watanabe

“Screen-printed Algal Biosensor with Flow Injection Analysis System for Water Toxicity Test”

Pacific Rim Meeting On Electrochemical And Solid-State Science (PRiME) 2008.

2008 年 10 月 14 日, Honolulu, Hilton Hawaiian Village.

国際学会発表 (ポスター)

1. Koji Ishizaki, Isao Shitanda, Masayuki Itagaki,

Kunihiro Watanabe

“Simultaneous Monitoring System of Immobilized Algal Flagellar Movement and Phototaxis”

Pacific Rim Meeting On Electrochemical And Solid-State Science (PRiME) 2008.

2008 年 10 月 13 日, Honolulu, Hilton Hawaiian Village.

2. Satoshi Takamatsu, Isao Shitanda, Masayuki Itagaki, Kunihiro Watanabe

“Fabrication of Algal Biosensor by Screen Printing”

213th ECS Meeting.

2008 年 5 月 19 日, Phoenix, Hyatt Regency Phoenix.

国内学会発表 (口頭発表)

1. 石崎浩司, 四反田功, 板垣昌幸, 渡辺邦洋

“ボルボックスの走光性による生物対流変化の電気化学的検出”

電気化学会第 75 回大会, 2008 年 3 月 31 日, 山梨大学

2. 高松聡之, 四反田功, 板垣昌幸, 渡辺邦洋

“藻類細胞バイオセンサーのスクリーン印刷による作製と FIA による評価”

電気化学会第 75 回大会, 2008 年 3 月 29 日, 山梨大学

3. 高松聡之, 四反田功, 板垣昌幸, 渡辺邦洋

“スクリーン印刷法による藻類細胞バイオセンサーの作製と評価”

日本分析化学会第 56 年会, 2007 年 9 月 21 日, 徳島大学

国内学会発表（ポスター発表）

1. 四反田功，高松聡之，板垣昌幸，渡辺邦洋

“光合成活性測定型藻類細胞バイオセンサによる除草剤の毒性評価”

日本分析化学会第 57 年会，2008 年 9 月 10 日，福岡大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名：四反田 功

所属機関：東京理科大学理工学部 助教

研究者番号：70434024