

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23750073

研究課題名(和文) 酵素前駆体を分子認識素子として利用する電気化学バイオセンシング手法の開発

研究課題名(英文) Development of the novel principles of electrochemical sensors using zymogens as sensing elements

研究代表者

井上 久美 (Inoue, Kumi)

東北大学・マイクロシステム融合研究開発センター・助教

研究者番号：20597249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：バイオセンサの素子としてこれまでほとんど注目されていなかった酵素前駆体を利用することにより、新しい電気化学バイオセンシング手法を開発した。まず、エンドトキシンをモデル検出物質として、カプトガニ血清由来の酵素前駆体(リムルス試薬)を用いる検出法を検討した。原理検証に加えて基質や検出法の改良を行った結果、使い捨て可能なスクリーン印刷電極チップで実用に十分な感度をもつセンサ開発に成功したほか、液絡を排した実用的なデバイスでストリッピングボルタンメトリ法による高感度検出が可能であることが示された。さらに、本手法を広く一般展開するために、細胞のアポトーシス検出への応用について検討し、これに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel type electrochemical sensors using zymogens as sensor elements. First, we made electrochemical endotoxin sensors based on the Limulus amoebocyte lysate reagent containing zymogens. We successfully developed a cost effective screen-printed sensor chip with practical sensitivity. We also developed a highly sensitive device with a practical structure for stripping voltammetry. Then, we extended this zymogen-based sensing principle into other assays. We successfully detected the apoptosis of HepG2 cells using electrochemical methods. These results contribute not only the development of the sensor engineering but also the clinical safety and biological studies.

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：バイオセンサ 電気化学 酵素前駆体 チップ型電極 生体機能利用

## 1. 研究開始当初の背景

バイオセンサは分子認識素子として生体起源の物質を用いたセンサであり、生体の持つ高度な分子認識機構をまね、人工的に利用することによって、高感度なセンシングを行うことができる。1962年にClarkらによって最初に提唱されたグルコース測定用のバイオセンサは、現在では使い捨て型の血糖値センサとして工業的に生産され、世界で7000億円以上の市場をもつと推定されている。バイオセンサはその潜在的ニーズの高さから、多くの研究が行われている。特に、認識素子の研究では、酵素やオリゴヌクレオチドプローブ、受容体、抗体、アプタマーなど、分析対象を効果的に認識できる分子の開発が積極的に行われている。

申請者は、酵素前駆体がバイオセンサの認識素子に利用できることに着目し、新しいセンシング手法の構築をしている。酵素前駆体は、加水分解や構造変化によってはじめて活性をもつタイプの酵素である。従って、酵素活性を測定することにより、活性化のトリガーとなる分子を検出することができる。検出に発色法や蛍光法を利用する光学検出方式の酵素前駆体センシング法はこれまでにいくつかの報告がある(T. Nakamuraら, J. Biochem. 103(1988) 370, J.L. Dinら, Trends Biotechnol. 19 (2001) 277 など)。しかし、光学検出方式のセンサは、周辺装置も含めた小型化が困難で高価であり、光を吸収、遮光、放出する材料を使えないといった問題を抱えている。市場で最も成功している血糖値センサが電気化学検出方式であることは、光学式よりも電気化学式の検出法が実用的センサに向いていることを示している。

検出に電気化学検出法を用いた酵素前駆体センサは知る限り、申請者らがElectrochem. Commun誌に投稿した報告が最初である。この新しいコンセプトのセンサには以下に述べる新たなセンシングの可能性がある。

### (1) 新たな分析対象物のセンシング

既存の電気化学酵素センサの技術を応用し、新たな酵素前駆体センシング手法を開発することにより、これまで検出ができなかった分析対象の検出が可能になる。

### (2) 実用型小型センサ

既存の光学式検出方式の酵素前駆体センシング手法を電気化学検出方式にすることにより、実用的な小型ハンディタイプセンサを作製できる可能性である。このようなセンサは、医療、環境、食品分析分野等で多くの需要が見込まれる。

### (3) 新たなセンシング原理

本手法は酵素前駆体とよく似た作用機構をもつ受容体を分子認識素子として用いる手法へと発展する可能性がある。受容体は生体内に存在し、生理活性物質と結合して細胞の反応を開始させる分子であり、多くタイプが存在する。このような分子を認識素子として

用いるセンサは、微量の生体活性物質を検出する技術として、環境、健康、安全問題が顕在化する現在社会において大きなニーズを持っている。

本研究ではエンドトキシンを分析対象とする。エンドトキシンとは、血中に入るとショック症状を起こして死に至る恐れのある発熱性物質である。従って、注射液など血液投与する医薬品では厳重な管理が求められている。特に透析液については、1回の透析で多量の透析液が血液と接触すること、また慢性透析治療では長期間の透析を続ける必要があるため、エンドトキシン混入管理は非常に重要である。しかし、エンドトキシンは、グラム陰性菌の外膜成分のリポ多糖(lipopolysaccharide; LPS)であるために環境中に不偏的に存在し、さらに耐熱性であるために加熱除去が困難であり、混入防止管理は大変に難しい。一般に、慢性血液透析患者には長期透析合併症と呼ばれる透析骨症、透析アミロイド症、MIA症候群(栄養障害; Malnutrition, 慢性炎症状; Inflammation, 動脈硬化; Atherosclerosisの3つが合併した症候群)がみられ、その原因のひとつに極微量のエンドトキシンが挙げられている。糖尿病腎症患者は年々増加傾向にあり、今後透析液のエンドトキシン管理はますます重要になると考えられる。

既存のエンドトキシン検出法であるリムルス試験は日本薬局方や米国薬局方などで公定法として定められている試験方法であり、カプトガニの酵素前駆体を利用する。検出法にはゲル化法、比濁法および比色法が利用されている。申請者は電気化学検出法を利用したりムルス試験の検出法を新たに開発することにより、これまで電気化学センサで測定が困難だったエンドトキシンを高感度に検出できるセンシング手法を確立する。申請者らはこれまでにリムルス試験に含まれる酵素前駆体の一つであるC因子を用いた電気化学的なエンドトキシン検出に成功している。しかし、検出感度があまり高くなく、透析液管理などの実用化は難しい。そこで本研究ではまず、リムルス試験に含まれる複数の酵素前駆体が次々に活性化されるカスケード反応を利用し、実用化可能なレベルに感度を改善する。次に、チップ型の電気化学検出デバイスを作製することにより、実用的ハンディセンサの開発を行う。さらに、本研究で得られた知見を応用し、他の酵素前駆体あるいは受容体を利用するセンシング手法開発への展開を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオセンサの素子としてこれまでほとんど注目されていなかった酵素前駆体を利用することにより、新しい電気化学バイオセンシング手法を開発することである。これにより、電気化学センサで測定が困難だった生理活性物質を高感度に検

出することが可能になる．さらに，既に実用化されている血糖値センサの技術を応用し，医療，環境および食品分野で切望される実用タイプの簡易検出器への応用を図る．

### 3. 研究の方法

平成 23 年度はエンドトキシンをモデル検出物質として，酵素前駆体を用いる電気化学センシング原理の開発を行った．まず，市販の発色基質を利用し，カプトガニ血清由来の酵素前駆体（リムルス試薬）を用いる電気化学センシング手法の検討を行った．また，電気化学測定に有利な基質の開発を行い，最適な電気化学計測法と組み合わせることにより，さらなる高感度の検出を目指すための研究として，新規基質および検出法の開発を行った．さらに，基質と生成物の酸化還元電位の特性から，この基質を用いると銀イオンを利用する変換ストリッピング法が適用できることが分かったため，小型の電極チップデバイスを作製して変換ストリッピング法によるエンドトキシン検出を行った．

平成 24 年度は，平成 23 年に確立したセンシング原理を利用したエンドトキシンの実用センサ開発および試薬改良のための検討を行った．また，本研究で開発している手法が，より一般的なバイオセンシング手法としての展開が可能であることを示すために，エンドトキシン以外の対象物として，アポトーシスの検出を行った．さらに，実用センサ開発に着手し，スクリーンプリント電極を用いた安価なセンサチップによるエンドトキシン検出法の開発を行った．

平成 25 年度（最終年度）は，実用的なエンドトキシン検出の高感度化のために，平成 23 年度に成功した変換ストリッピング法を用いる方法について，液絡を排して簡易なデバイス構造とするための研究を行った．また，昨年度にひきつづき，酵素前駆体や受容体を用いる電気化学センシング手法の一般展開を行うために，カスパーゼ-3 活性の検出に基づく細胞のアポトーシス検出の研究を進めた．昨年度成功をした発色基質 Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline (DEVD-pNA) を用いる方法だけでなく，電気化学計測用の基質として新規に合成した Asp-Glu-Val-Asp-*p*-methoxyaniline (DEVD-pMA) を用いる方法を検討した．

### 4. 研究成果

平成 23 年度は酵素前駆体を用いる電気化学センシング原理の開発を行った．

まず，エンドトキシンをモデル検出物質として，カプトガニ血清由来の酵素前駆体（リムルス試薬）を用いる電気化学センシング手法の検討を行った．96穴プレートでリムルス試薬とエンドトキシンを混合して反応させ，遊離するパラニトロアニリンをダイヤモンドライクカーボンパターン電極チップ上で微分パルスボルタンメトリ法にて検出した．

その結果，1hr で 5 EU/L，2hr で 0.5 EU/L のエンドトキシンを定量的に検出することができた．このことにより，これまでバイオセンサの素子としてほとんど注目されていなかった酵素前駆体を利用すると，従来は電気化学センサで測定が困難だった生理活性物質を高感度に検出できることが示された．さらに複数の酵素前駆体が次々に活性化するカスケード反応を利用すると 1000 倍以上の感度上昇効果があることが分かった．

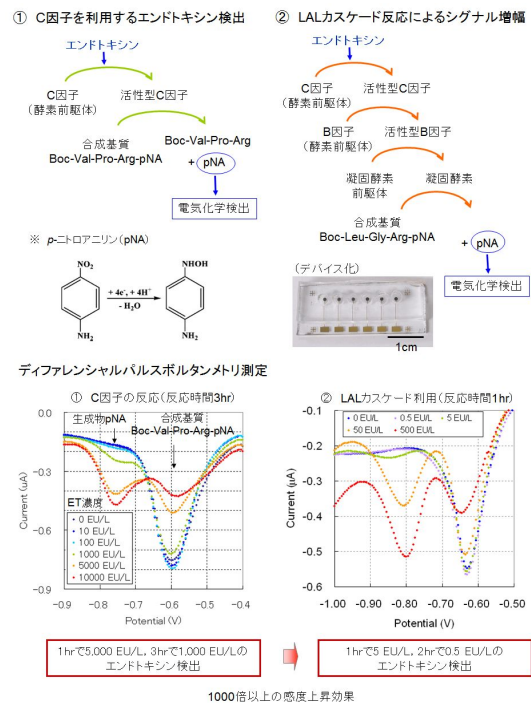


Fig. 酵素前駆体を用いるエンドトキシンの電気化学センシング原理および結果．基質には市販の発色基質を用いた．

次に，新規基質および検出法の開発を行った．これは電気化学測定に有利な基質の開発を行い，最適な電気化学計測法と組み合わせることにより，さらなる高感度の検出を目指すための研究である．検討の結果，Boc-Leu-Gly-Arg-pAP がエンドトキシン検出に利用できることが判明した．この新規基質を用いることにより，微分パルスボルタンメトリ法よりも簡易な分析アルゴリズムであるアンペロメトリ法での計測が可能になった．これは，実用センサを設計する上で有利である．さらに，基質と生成物の酸化還元電位の特性から，この基質を用いると銀イオンを利用する変換ストリッピング法が適用できることが分かった．小型の電極チップデバイスを作製して変換ストリッピング法によるエンドトキシン検出を行った結果，2hr で 0.1EU/L という超高感度のエンドトキシン定量検出に成功した．

平成 24 年度は，平成 23 年に確立したセンシング原理を利用したエンドトキシンの実用センサ開発および試薬改良のための検討

を行った。さらに、エンドトキシン以外の対象物として、アポトーシスの検出が可能であることを確認し、本研究で開発している手法が、より一般的なバイオセンシング手法としての展開が可能であることを示した。

実用センサ開発について、スクリーンプリント電極を用いた安価なセンサチップによるエンドトキシン検出法の開発を行った。センサチップは 6 mm×36 mm の 3 層構造で、1 層目が電極チップ、2 層目が流路、3 層目が流路の天井となる親水性フィルムである。参照電極も Ag/AgCl インクで作製してチップに組み込み、問題なく動作することを確認した。23 年度に開発した新規基質 Boc-Leu-Gly-Arg-*p*-aminophenol と試作したスクリーンプリント電極を組み合わせ、アンペロメトリ法で実用濃度 (10-1000 EU/L) のエンドトキシン検出に成功した。本研究成果をもとに企業と共同で量産化を見据えた計測システムの開発も進み、使い捨て電極チップと計測装置のプロトタイプが完成している。

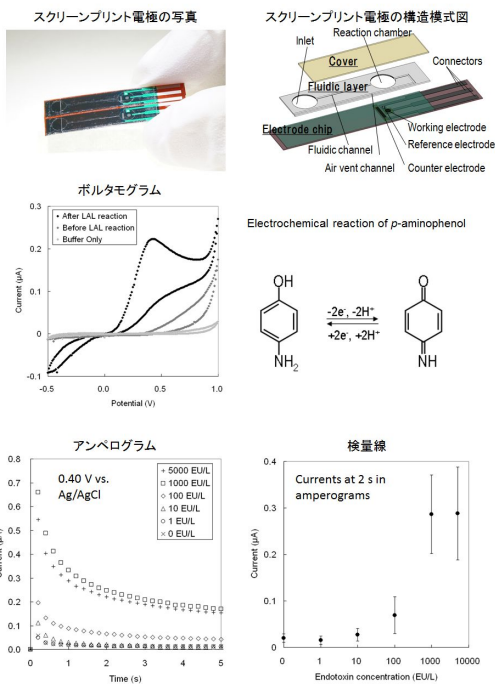
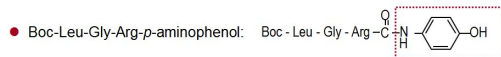
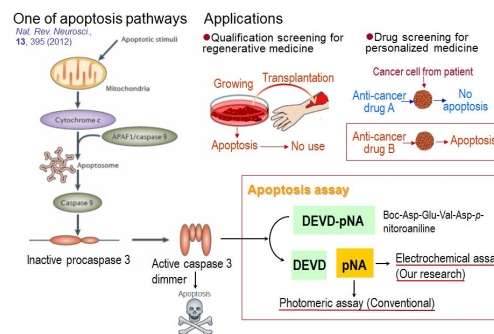


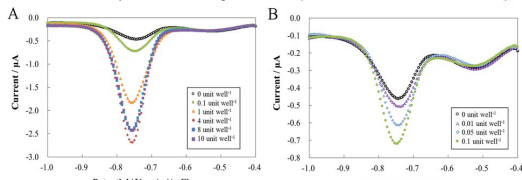
Fig. スクリーンプリント電極チップおよび基質に Boc-Leu-Gly-Arg-*p*-aminophenol を用いた実用的なエンドトキシン検出。チップ材料にエンドトキシンや酵素前駆体が吸着することが原因とみられる再現性の問題があったが、1 時間の反応時間で 10 EU/L のエンドトキシン検出が可能な実用に十分な感度のセンサであることが確認できた。

酵素前駆体を用いる電気化学センシング手法の一般展開に関する研究について、カスパーゼ 3 活性を指標とした細胞アポトーシス検出を試みた。基質に Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline (DEVD-pNA) を用いて、カス

パーゼ 3 の酵素反応によって遊離する pNA を電気化学的に検出し、ヒト肝がん由来細胞株のアポトーシスを検出できることを確認した。同様の手法は他のプロテアーゼ検出にも応用できる。プロテアーゼは細胞のシグナル伝達等の生命活動に広く係わっており、電気化学的手法を用いた新しいセンシング手法の確立は、移植細胞評価等の医療応用だけでなく、生命科学研究のためのツールとしても利用が期待できる。



Electrochemical caspase-3 assay



Electrochemical apoptosis assay using HepG2 cells

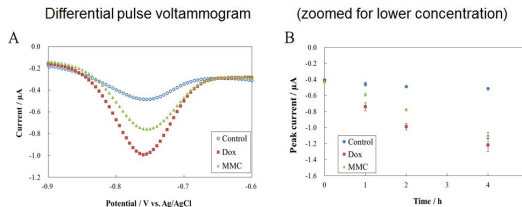


Fig. 電気化学的なアポトーシスアッセイの原理とカスパーゼ 3 アッセイの結果および、ヒト肝がん細胞 (HepG2) にドキソルビシン (Dox) およびマイトマイシン C (MMC) に 24 時間暴露してアポトーシスを誘導し、測定した結果。

平成 25 年度 (最終年度) は、酵素前駆体を分子認識素子として用いるエンドキシンの実用的な検出法について、高感度化のための検出法の開発とチップ型デバイスの開発に取り組んだ。さらに、本手法をエンドトキシン検出だけでなく広く一般展開するために、細胞のアポトーシス検出への応用について検討した。

実用的なエンドトキシン検出の高感度化のために、平成 23 年度に成功した変換ストリッピング法を用いる方法について、液絡を排して簡易なデバイス構造とするための研究を行った。液絡によるイオン移動の代わりに、両セル内に配した電極上での電気化学反応によって各セルの電気的中性を保つこと



が可能であると考え、原理検証を行いこれに成功した。また、チップ型デバイスを作製し、エンドトキシンを検出できることを示した。これにより、エンドトキシンをモデル検出物質とした酵素前駆体を用いる電気化学センシング手法について、原理的にもセンサ工学的にもこれまでにない方法で、実用的かつ高感度な手法を提供できることが示された。3年間の成果に基づくエンドトキシン検出装置の実用化を2年後の上市を目指して企業とともに進めている。

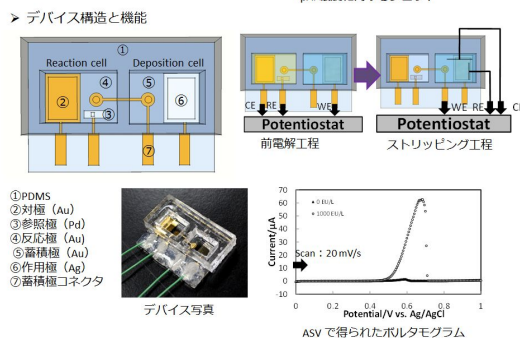
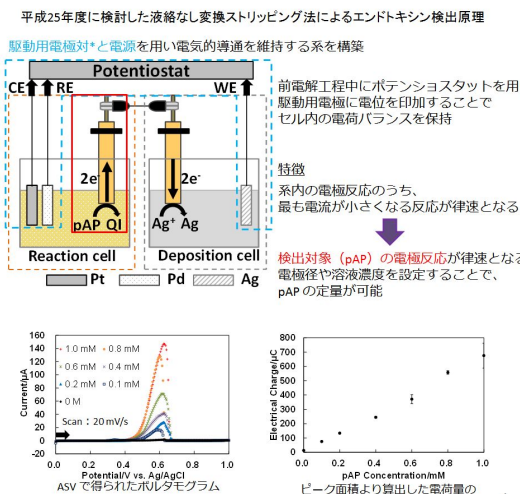
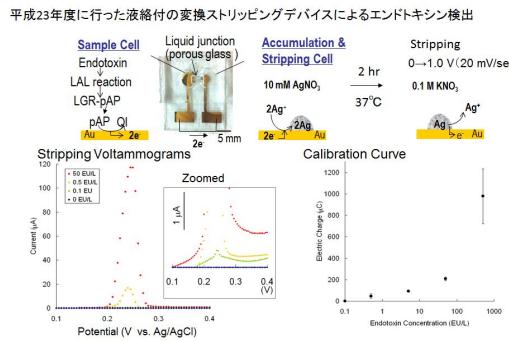


Fig. ストリッピングボルタンメトリ法によるエンドトキシン検出の原理と、新しい原理による液絡を排したストリッピングボルタンメトリデバイスの試作と評価結果。

酵素前駆体や受容体を用いる電気化学センシング手法の一般展開に関する研究について、一般的に用いられる発色基質 Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline (DEVD-

pNA) および新規に合成した電気化学計測用の基質 Asp-Glu-Val-Asp-*p*-methoxyaniline (DEVD-pMA) を用いて、カスパーゼ-3 活性の検出に基づく細胞のアポトーシス検出に成功した。これにより、エンドトキシンだけでなく、一般的なプロテアーゼ検出にも開発した手法を応用することが可能であることが示され、本研究が新しい原理に基づく電気化学センサの発展につながることを期待できる。

### 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5件)

Kumi Y. Inoue, Shinichiro Takano, Satoko Takahashi, Yosuke Ishida, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue、Screen-printed endotoxin sensor based on amperometry using novel *p*-aminophenol conjugated substrate for *Limulus* amoebocyte lysate protease reaction、Analyst、査読有、138 巻、2013 年、6523-6531 DOI: 10.1039/C3AN01202F

井上(安田)久美, 高野 真一郎, 高橋 里子, 石田 洋祐, 伊藤(佐々木)隆広, 伊野 浩介, 珠玖 仁, 末永 智一, 安価な簡易型センサの実用化に向けた電気化学エンドトキシン検出法の開発、エンドトキシン・自然免疫研究、査読なし、16 巻、2013 年、7-11

井上(安田)久美, 医療現場で使うことを目指したチップ型電気化学バイオセンサ、化学センサ、査読なし、28 巻、2012 年、114-121

井上(安田)久美, 高橋 里子, 児玉 隼人, 伊野 浩介, 珠玖 仁, 末永 智一、酵素前駆体を用いる電気化学エンドトキシンセンサのための高感度検出法の検討、Chemical Sensors、査読なし、28 巻 Suppl. A、2012 年、31-33

Kumi Y. Inoue, Satoko Takahashi, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue、Development of an electrochemical *Limulus* amoebocyte lysate assay technique for portable and highly sensitive endotoxin sensor、Innate Immun.、査読有、18 巻、2012 年、343-349.

DOI: 10.1177/1753425911410337

(学会発表)(計7件)

井上(安田)久美、産業の発展に資するセンシング原理および電気化学センサデバイス構築に関する研究、電気化学会第 81 回大会(受賞講演) 2014 年 3 月 29 日、関西大学千里山キャンパス

井上(安田)久美, 高野真一郎, 高橋 里子, 石田 洋祐, 川端 莊平, 水村 光, 小田 俊男, 小川 健一, 坪井 達也, 伊野 浩介, 珠玖 仁, 末永 智一、リムルス試薬を用いた電気化学検出型の小型エンドトキシン検査装

置の開発、第 19 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会（招待講演）2013 年 12 月 7 日、ロイヤルオークホテル スパ&ガーデンズ、大津

井上(安田)久美、高野真一朗、塩本周作、石田洋祐、中村文哉、伊野浩介、珠玖仁、末永智一、プロテアーゼ活性の電気化学測定法の開発と医療応用を目指したアポトーシスおよびエンドトキシンの検出、日本分析化学会 第 62 年会、2013 年 9 月 12 日、近畿大学東大阪キャンパス

Kumi Y. Inoue, Shinichiro Takano, Satoko Takahashi, Yosuke Ishida, Takahiro Ito-Sasaki, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue、Endotoxin assay on electrode chip for portable and easy- to- use sensor system、The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting、2012 年 10 月 24 日、National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan

Kumi Y. Inoue, Satoko Takahashi, Hayato Kodama, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku and Tomokazu Matsue、Development of Electrochemical Detection Method for Highly-Sensitive Endotoxin Assay Based on Zymogen Activation Cascade Reactions、63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry、2012 年 8 月 21 日、Prague, Czech Republic

井上(安田)久美、高橋 里子、児玉 隼人、伊野 浩介、珠玖 仁、末永 智一、酵素前駆体を用いる電気化学エンドトキシンセンサのための高感度検出法の検討、電気化学会第 79 回大会、2012 年 3 月 29 日、アクトシティ浜松

Kumi Y. Inoue, Satoko Takahashi, Kosuke Ino, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue、Zymogen Based Electrochemical Sensor for Endotoxin Assay、The 9th Asian Conference on Chemical Sensors、2011 年 11 月 15 日、Chientan Youth Activity Center, Taipei, Taiwan

〔図書〕(計 1 件)

井上(安田)久美、珠玖 仁、末永智一(分担執筆)、株式会社技術情報協会、「簡易型エンドトキシンセンサの実現に向けた電気化学計測法の開発」『バイオセンサの迅速・簡易・高機能化技術と課題解決書(仮題)』2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：電極チップおよび化学物質の定量方法  
発明者：小川健一、坪井達也、末永智一、井上久美、高野真一朗  
権利者：大日本印刷株式会社、国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：特願 2014-070156 号

出願年月日：2014 年 3 月 28 日

国内外の別：国内

名称：微生物夾雑物の濃度検出方法、電極チップおよびオリゴペプチド

発明者：小川健一、坪井達也、末永智一、井上久美、高野真一朗

権利者：大日本印刷株式会社、国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：特願 2014-047888 号

出願年月日：2014 年 3 月 11 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 久美 (INOUE, KUMI)

東北大学・マイクロシステム融合研究開発センター・助教

研究者番号：20597249