

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410164

研究課題名(和文)健康維持を目的としたコルチゾール検出ストレスセンサの開発

研究課題名(英文)Cortisol detection system for personal stress monitoring

研究代表者

伊藤 健 (ITO, Takeshi)

関西大学・システム理工学部・准教授

研究者番号：50426350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コルチゾールは、ストレスの経時変化を追うのに適したストレスマーカーである。本研究では個人が家庭で操作でき、「その場測定」が可能なコルチゾールの検出・測定装置を実現するための研究開発を行った。具体的には、マイクロ流体デバイス及び毛細管現象を利用したフロー系と水晶振動子マイクロバランス法のアセンブル化である。抗体の選定、競合物質の選定、再生条件の検討を行うことで、計測時間8分、再生時間5分、1測定サイクルが併せて13分となる「コルチゾールのその場計測」システムの構築を実現した。

研究成果の概要(英文)：Cortisol is well known as a stress marker of endocrine system. We focused on quartz crystal microbalance (QCM) method, which is one of label free and real time measurement of antigen-antibody interaction with simplicity, convenience and low cost. No study has been reported on cortisol detection using the QCM method. In addition, we propose a QCM sensor coupled with a passive flow system for on-site monitoring of cortisol. We optimized the condition of cortisol detection such as selecting antibody and tracer, and regeneration solution. As the results, the detection time was within 8 minutes. It took 13 minutes including regeneration step. These results indicate that our proposed cortisol detection system is convenient with highly sensitivity using passive flow system.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：ストレス評価 QCM

1. 研究開始当初の背景

心のストレスは、健康を害し、体調不良や重篤な心身症を引き起こすため、近年我が国の社会問題になっている。そのため、個人がストレスの程度を把握し、日常の健康を管理することが予防医療の観点から求められている。ストレスの指標としていくつかのバイオマーカーが報告されているが、コルチゾールは迅速モニターに適する有効なマーカーであるにも関わらず、現在コルチゾールを簡便に測定できるセンサは存在しない。

2. 研究の目的

個人が家庭で操作でき、「その場測定」が可能なコルチゾールの検出・測定装置を実現するための研究開発を行う。装置が小型で操作が容易な水晶振動子マイクロバランズ(QCM)法を検出手段とし、「その場測定」に適した測定系としての新たなマイクロ流体デバイスの構築を目指す。

3. 研究の方法

目的のコルチゾールの検出には、水晶振動子マイクロバランズ(QCM)法を利用した。QCM法は、比較的分子量の大きい物質の分子間相互作用をラベル化無しでモニタリングできる手法として知られているが、QCM法によるコルチゾール検出において、測定感度やダイナミックレンジ、再現性などの面での課題が存在する。従来のQCMセンサチップは、測定チャンネル数が1電極のみであり、温度変化や非特異吸着の影響を受けやすく正確な濃度測定が難しかったが、1つの水晶基板上に2つの電極を載せたツインQCMチップの登場で、上記問題を克服できる可能性がでてきた。しかし、一般的にマイクロ流体デバイスの送液には、シリンジポンプが使われているため個人での測定では操作性や小型化の面で動力に頼らない測定手法が必要である。本研究では、代表者が蓄積してきた独自のアセンブル化MEMS技術を利用したマイクロ化学分析デバイスを応用して自己吸引型マイクロ流体デバイス中にツインQCMチップをアセンブルすることで高感度を担うマイクロ反応容器のスケールダウンと高速な検出を両立することを目指した。

4. 研究成果

まず、フローインジェクション(FI)法とツインセンサQCMを用いてサンプル中に含まれるコルチゾール濃度を連続的に測定するためのシステムの構築を行った。ツインQCMチップのうち抗体を検出極に固定化した後、非特異吸着防止のためBSAを固定化した。参照極にはBSAのみを固定化した。測定には、競合阻害法を用いた。コルチゾールにBSAを結合したCort-BSAを競合物質とし、任意の濃度のコルチゾールと混合した後サンプルとしてフロー系に導入した。サンプルがセンサ表面に到着すると図1に示すように、抗体極では抗原抗体反応により吸着が生じる

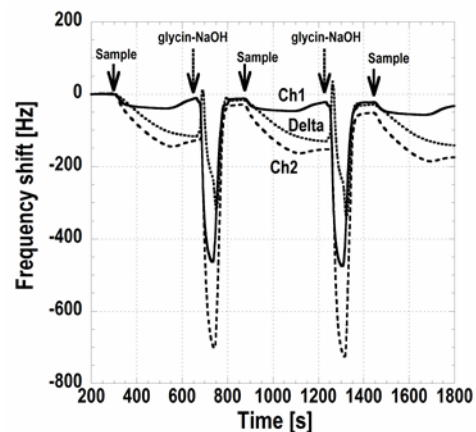


図1 フロー系を用いたコルチゾールの連続測定の例

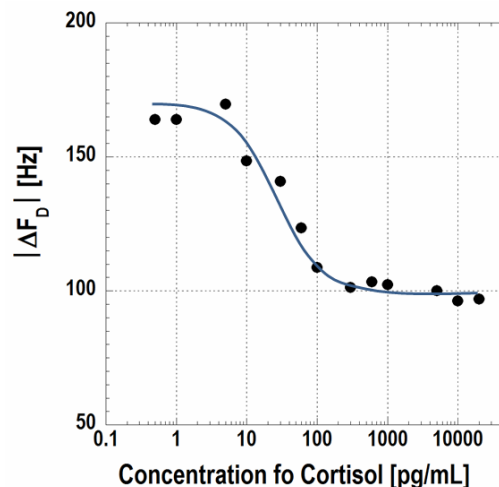


図2 フロー系での検量線

ため共振周波数が低下した。一方、参照極側では抗体との結合が行われなかったため周波数変化が生じなかった。また、Glycine-NaOHを用いること結合した抗原を解離させ、電極表面を再生できることを示した。この検出システムを用いて検量線を作成したところ、図2に示す通り5~100pg/mLのコルチゾール濃度を検出可能であることを示した。

次に、上述した条件を基に、自己吸引型フローデバイスを用いてコルチゾールの測定を試みた。まず、自己吸引型デバイスでの反応例を評価するため、エタノール及びPBSバッファを混合した試薬を滴下すると図3のように抗体極、参照極ともに同じような反応を示し、その差分値はほぼゼロであった。サンプル滴下後の周波数の大幅な低下は流速の変化に伴うものである。また、差分値がゼロということは、リファレンスとして成り立つことを示している。一方、コルチゾール及びCort-BSAを含有したサンプルを滴下すると図4のように抗体極側では徐々に周波数が低下するが、参照極では徐々に周波数が増加した。センサ表面への吸着が拡散に支配されているため時間とともにセンサ表面に抗原が吸着するため周波数が徐々に低下することを意味している。また、周波数の増加は液の流れが徐々に失われることで生じている

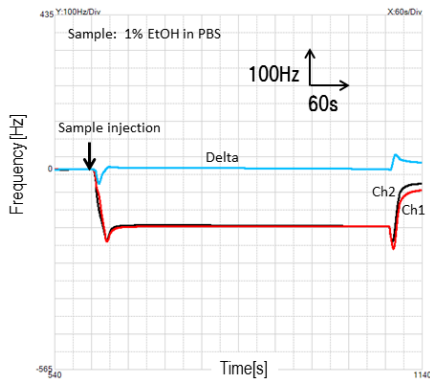


図 3 自己吸引型デバイスにおける抗原を含まないサンプルの滴下による周波数変化

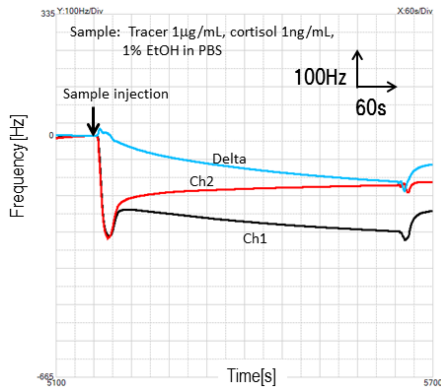


図 4 自己吸引型デバイスにおける抗原を含んだサンプルの滴下による反応例

と考えられた。

次に、自己吸引型デバイスにおいてフロー系と同様の連続測定を試みた。自己吸引型デバイスは図 5 に示すような外観を持つカバーとセンサ用土台を組み合わせ、3D プリンターにより作製した。上部に開いた穴からサンプルを滴下し、吸収パッドによって液を吸収する。自己吸引型デバイスでのサンプル滴下量と吸引速度の関係を評価したところ、流速は約 50 μ L/分と一定であることが分かった。また、コルチゾールの連続測定例を図 6 に示す。サンプル液には人工唾液を用いた。サンプルの滴下から約 7 分で参照極側の周波数変化が一定になることから、測定時間は 8 分とした。また、再生条件を最適化することで再生時間を 5 分とした。以上より、連続したコルチゾールの検出は 1 サイクル 13 分で行えることがわかった。また、本デバイスを用いて検量線を作成したところ、コルチゾール濃度が 50~1000pg/mL の範囲で測定できることが分かった。これは、フロー系に比べて 1 桁以上感度が低下したが、唾液中に含まれ

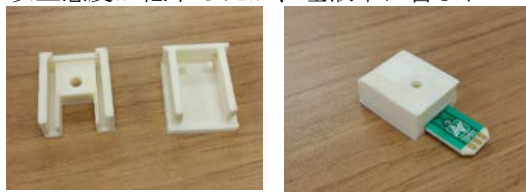


図 5 作製した自己吸引型 QCM デバイスの写真

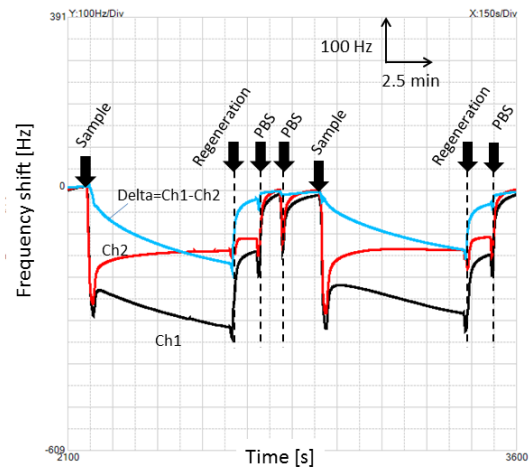


図 6 自己吸引型デバイスを用いたコルチゾールの連続測定例

るコルチゾール濃度を検出するには十分な感度といえる。今後は、実際の人の唾液から得たサンプル中のコルチゾール濃度の評価と HPLC など他の手法との相関などを示していく必要がある。

一方、本技術の応用例としてアレルゲンの検出を試みた。食物アレルギーの中でも乳幼児に多くみられる、牛乳に対するアレルゲン物質として β ラクトグロブリンの測定を試みた。連続フロー系と自己吸引型デバイスでの検量線の比較を図 7 に示す。実線がフロー系、点線が自己吸引型の結果である。自己吸引型では、サンプル滴下後にセンサ表面での滞在時間が増加することから低濃度側での高感度化に寄与することがわかった。

以上のことから、自己吸引型 QCM の測定システムの基盤技術の開発に成功したといえる。

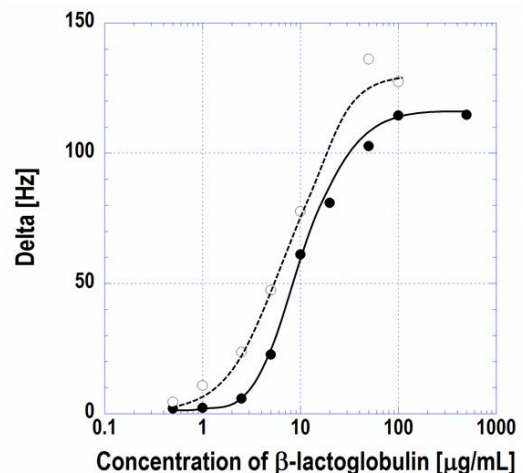


図 7 フロー系及び自己吸引型デバイスを用いた β ラクトグロブリンの検量線

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takeshi Ito, Nobuyoshi Aoki, Akihiisa Tsuchiya, Satoru Kaneko, Koji Suzuki, Chemistry Letters, 44, 2015, 981-983. (査読)

- 有)
2. Takeshi Ito, Nobuyoshi Aoki, Wakako Shinobu, Koji Suzuki, *Procedia Engineering*, 87, 2014, 296-299. (査読無)
 3. Takeshi Ito, Nobuyoshi Aoki, Satoru Kaneko, Koji Suzuki, *Analytical Methods*, 6, 2014, 7469-7474. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 伊藤健、青木信義、忍和歌子、鈴木孝治、自己吸引型 QCM を用いたストレスマーカー測定、第 75 回応用物理学会秋季学術講演会、2014 年 9 月 18 日、北海道大学(北海道)
2. Takeshi Ito, Nobuyoshi Aoki, Wakako Shinobu, Koji Suzuki, Duplicate analysis of cortisol for stress check using QCM with self-suction flow system, *Euroensors 2014*, 2014 年 9 月 8 日, Univ. Brescia, Italy.

[その他]

ホームページ等

http://www.kansai-u.ac.jp/Fc_sci/department/mec/teacher.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 健 (ITO, Takeshi)
関西大学・システム理工学部・准教授
研究者番号：50426350

(3)連携研究者

青木 信義 (AOKI, Nobuyoshi)
神奈川県産業技術センター・主任研究員
研究者番号：10231763

金子 智 (KANEKO, Satoru)
神奈川県産業技術センター・主任研究員
研究者番号：40426359

鈴木 孝治 (SUZUKI, Koji)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：80154540

チッテリオ ダニエル (Citterio, Daniel)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：00458952