マルチナノリアクターを用いたグルコース検出のための競合物質除去

電子技術部　電子デバイスチーム　伊　藤　　健

化学・生化学分析において小型・簡便・連続測定可能な検出システムのニーズは潜在的に存在している．一般的に，検体には測定対象物以外の成分が多く含まれており，時にはそれらが測定を妨害する．本研究では，妨害物質を酵素反応により取り除き，連続的に処理できるデバイスについて検討を行った．具体例として，検出ターゲットにグルコース，競合物質にアスコルビン酸を例として測定を行ったので報告する．

キーワード：バイオリアクター，ナノスケール，グルコース

1　はじめに

微細加工技術の進歩により機械要素部品，センサー，アクチュエーター，電子回路などを小型化，集積化したMEMS (Micro Electro Mechanical Systems)技術が実用化され，化学，生物分野への応用が注目を集めている．MEMS に使われてきた微細加工技術を化学分野に応用することで効率のよい化学反応を行うことが可能となってきた．これは，化学反応は拡散により支配されるため，反応容器が小さくなるに従い反応時間が短縮されると共に廃液量が減少するなど利点が多いためである．化学分析において対象物質を直接的に検出できない場合には，化学反応を用いて測定可能な物質に変換し間接的に検出する手段が日常的に利用されている．特に，生体物質を検出する場合には，酵素が基質に特異的に反応する性質を利用することで特定物質を高い効率で変換し検出することが可能となる．しかしながら，酵素は高価であるため使用量を極力抑えることが必要である．基板に電極をパターニングし，その電極上に酵素を固定化したバイオセンサー[1, 2]は使い捨てなどに向いているが，多検体・長時間測定には向いていない．本研究では，多検体を連続的に測定するため，競合物質を2 段階の酵素反応により取り除き，さらにターゲット物質を酵素反応により変換・検出するマイクロシステムを考案した．具体的な例として，血液中や尿中の糖濃度を測定する場合，これらの検体に含まれるアスコルビン酸（ビタミンC）が競合物質として知られている．そこで，アスコルビン酸をアスコルビン酸酸化酵素及びペルオキシダーゼを用いて除去し，グルコースをグルコース酸化酵素によりグルコノラクトンと過酸化水素に分解し，生成した過酸化水素を電気化学的に検出する測定系について検討を行ったので報告する．

2　実験方法

マルチナノリアクターは，ガラス基板上に感光性樹脂をラミネートし，フォトリソグラフィによりパターニングした基板を上下に張り合わせて流路中に段差構造を形成する手法を用いた．[3-5]試作したマルチナノリアクターの模式図を図1に示す．流路幅は 400μm，段差構造の上流部の深さは 125μm，下流部は 50μmであり，酵素固定化担体(キトサンビーズ，φ=70～105μm)が段差部分でトラップされる構造となっており，カラム体積は約 850nL である．酵素の担体への固定化はグルタルアルデヒド固定化法を用いた．使用した酵素はアスコルビン酸酸化酵素（AsOx），ペルオキシダーゼ(HRP)，及びグルコース酸化酵素(GOD)である．各酵素を固定化した後に，担体を図1に示すように各流路に導入し，ナノバイオリアクターとして利用した．サンプルの測定にはフローインジェクション分析(FIA)法を用いた．また，すべての実験において検体量は 1μL とした．リン酸バッファー(pH=7.0)をキャリアとし，シリンジポンプを用いてデバイスに導入した．流速を 3，5，10μL/min に変化させ，流速に対する応答特性を評価した．

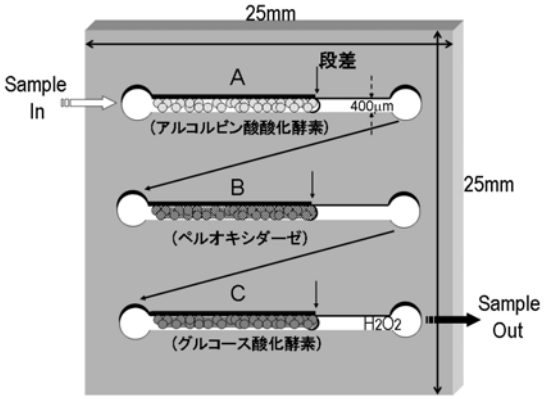

図1　マルチリアクターの概略図

このとき，アスコルビン酸 1mM に対してグルコースを 0.1mM 混合した溶液を利用した．過酸化水素の検出には，ラジアルフローセル（BAS 社製）を用いた．作用極に白金板，対極にステンレス，参照極に Ag/AgCl 電極を用いた．作用極の電位は 0.6V vs. Ag/AgCl とし，アンペロメトリーにより測定した．

3　結果と考察

流速 10μL/min においてリアクターを通らずに(Direct)測定された例を図２に示す．ベースラインから酸化ピークの高さをピーク電流(Ip)とし，ピーク面積を電荷量(Q)と定義した．各リアクターを通過後の流速に対する Ip 及び Q の応答特性について図３に示す．酵素リアクターを通さない場合を基準(100%)としたとき，各リアクターを通った後の Ip 及び Q の基準に対する比率である．Ip，Q のいずれにおいても，1 段目のアスコルビン酸酸化酵素リアクターを通過後に急激な低下が見られ、その後ペルオキシダーゼリアクターを通過するとさらに低下した．この結果は，アスコルビン酸が２つのリアクターを通ることで除去できていることを示している．また，除去率は流速が遅いほど高い傾向が見られた．一般的に流速が遅いほどリアクターでの滞在時間が増加するため，基質が酵素反応により減少し、生成物が増加する．したがって本実験の場合には、基質であるアスコルビン酸は流速が遅いほど多く除去されたと考えられる．その後，サンプル溶液がグルコース酸化酵素リアクターを通過すると Ip，Q 共に増加していることから，この増加はグルコースがグルコノラクトンと過酸化水素に変換され，その過酸化水素を検出した結果といえる．一方，流速が遅くなると検出までの時間が長くなる．そのため、実用化の際には流速に対する反応効率と検出時間の双方の最適な条件で運用する必要がある。以上の結果から，マルチナノリアクターを用いた競合物質の除去は有効な手段であると言える．

なお、本研究は科研費若手(B)21710134 の一部として行われた．

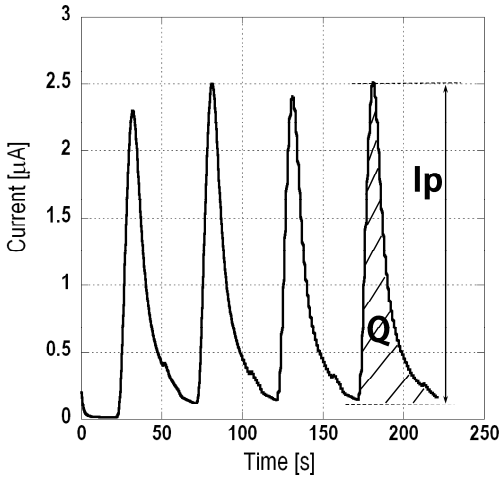

図２　流速 10μL/min，リアクター無しでの測定例

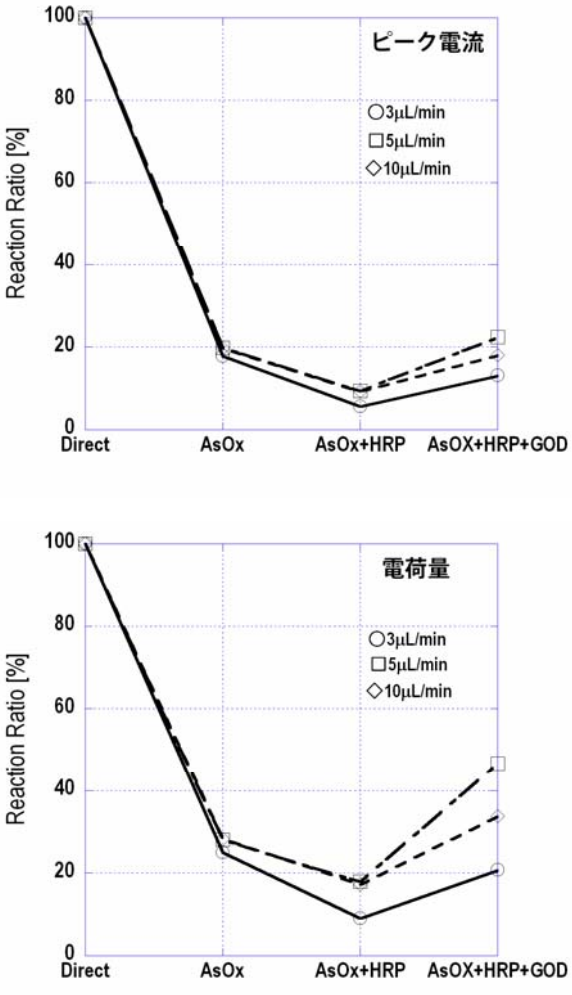

図３　ピーク電流（上図）と電荷量（下図）から算出した反応率

文献

1) Y. Ikariyama et al.; *Bull. Chem. Soc. Japan*, 61, 3525 (1988).
2) A. Heller; *J. Phys. Chem.*, 96, 3579 (1992).
3) T. Ito et al.; *J. Micromech. Microeng.*, 17, 432 (2007).
4) T. Ito et al.; *Anal. Chem.*, 79, 1725 (2007).
5) T. Ito et al.; *Talanta*, 77, 1185 (2009).