

光学的手法による合成脂質膜の味応答検出

三澤顕次・矢久保無用ノ介・横山 徹・有澤準二

北海道工業大学応用電子工学科 006 札幌市手稲区前田 7 条 15 丁目 4-1

(1995年 4 月 17 日受付, 1995年 5 月 11 日掲載決定)

Determination of Taste Responses of Artificial Lipid Membrane by an Optical Method

Kenji MISAWA, Muyonosuke YAKUBO, Toru YOKOYAMA and Junji ARISAWA

Department of Applied Electronics, Hokkaido Institute of Technology
4-1 Maeda 7-15, Teine-ku, Sapporo 006

(Received April 17, 1995 : Accepted May 11, 1995)

This paper describes the optical characteristics of the Monoolein-PVC membrane in five basic taste solutions such as NaCl (salty), HCl (sour), Saccharose (sweet), Quinine hydrochloride (bitter) and mono-Sodium L-glutamate (umami). The Monoolein-PVC membrane was composed of poly(vinyl chloride) and a synthetic lipid, Monoolein. The optical characteristics of the membrane for the taste solutions could be measured quantitatively as an intensity variation of transmitted light of the membrane, using an optical measurement system with optical fiber. Since the optical intensity of transmitted light increased with different patterns for each taste solution, the membrane is supposed to have an optical selectivity. However, the optical characteristics of the membrane such as detection-threshold and dynamic-range did not agree with human taste characteristic. In order to improve the optical characteristics of the membrane, cholesterol or plasticizer was mixed into the membrane. As a result, the optical characteristics become closer to human characteristics in a few taste solutions. By taking advantage of these optical characteristics, some new usages, optical taste sensors and so on, are expected in the field of ion sensing materials.

1. は じ め に

半導体に代表されるエレクトロニクスの分野は、主に無機材料を用いることで著しい発展を遂げてきた。一方、有機材料は、軽量かつ柔軟で低温でも成膜しやすいという素材特性と、電気的・光学的異方性や生体類似機能など無機材料にはない特質を有するため、近年表示デバイスやバイオセンサなど多方面で注目を集めている¹⁾。

最近、このような有機材料の一利用例である人工脂質膜が、外界の分子やイオンを識別する機能膜になりうることを報告され²⁾、開発の遅れている味覚や嗅覚などの生物の化学受容器に相当するトランスデューサとして注目されている。従来の味覚センシングに関する研究では、多チャネル系として人工脂質膜の電位応答³⁾や膜電位感受性色素膜の吸収光変化⁴⁾のパターンを利用しよう

とするものが、また単一チャネル系として微小孔共振素子の振動波形⁵⁾や人工脂質膜の抵抗・容量特性⁶⁾を利用しようとするものがある。しかし、いずれの方式でも有意な出力パターンや出力値は、個々のトランスデューサの感度や選択性と密接に関連しており、トランスデューサ材料の重要性が再認識されている。

こうした一方で、著者らは電気抵抗変化や振動現象を引き起こす合成脂質のうち、モノオレインを用いた膜の光透過率がKCl溶液の濃度条件に対して顕著に変化することを見出している。さらに、膜の支持体をメンブレンフィルタから高分子のポリ塩化ビニル(PVC)に替えることで、膜透過光の検出感度や耐久性を大幅に向上させ、膜の透過光特性を利用した新たなイオンセンシングの可能性について報告している⁷⁾。

従来このモノオレインPVC膜の光透過特性は分光光

度計を用いて測定していたが、本研究では実用性の向上と小型化を図るために、まず光路を光ファイバとした新たな光学測定系を構築した。つぎに、この測定系を用いて基本味溶液の濃度条件に対する膜の応答特性を求め、モノオレインPVC膜の味センシング機能膜としての可能性を検討した。具体的には、塩味、酸味、甘味、旨味、苦味の5種類の基本味溶液に対する膜の透過光強度特性を求め、この特性の応答閾値とヒトの味覚閾値を比較し、応答領域がどの程度の濃度範囲で出現するかを検討した。また、一般に生体の興奮性細胞膜は、複数の脂質から構成されており、この構成比や流動性の違いなどがさまざまな応答パターンを生み出す源になっている⁸⁾。そこで、本研究では応答特性の改善手法として、中性脂質のコレステロールやPVCを柔軟にする可塑剤の膜への混入効果についても検討を行った。

2. 実験方法

2.1 実験材料と膜作製方法

膜は、Moodyらの方法を参考にし⁹⁾、合成脂質のモノオレイン(Monoolein : $C_{17}H_{33}COOCH_2CH(OH)CH_2OH$ = 356.55) 0.4gと支持体のポリ塩化ビニル0.085gを有機溶媒のテトラヒドロフラン 6mlで溶解し、その混合液 2mlを直径 6cmφのシャーレに滴下し、水平な 27℃のサーモプレート上で24時間乾燥させて作製した。

5種類の味物質には、塩味にNaCl、酸味にHCl、甘味にサッカロース(Saccharose)、旨味にL-グルタミン酸ナトリウム(MSG)、苦味に塩酸キニーネ(Quinine)を使用した。溶液の濃度設定は1~1000mMの範囲としたが、塩酸キニーネは水に難溶なため1~100mMとした。

2.2 測定方法

Fig. 1は膜の透過光強度を測定するために本研究で新たに構築した実験装置の概略であり、ここでは、光源光や検出光を誘導する光路として、光ファイバを採用した。この光ファイバには、端面処理などの加工のしやすさ、低価格などの理由から、プラスチック光ファイバ(直径3.0mmφ、三菱レイヨン製エスカSK-120)を使用した。

測定では、まず中央に直径1cmφの穴が開けてあるテフロンシートで膜を挟み、これを縦、横、高さが各2cmの亚克力製セルの底部に平行に挿入し、つぎに被験液を入れた。ハロゲン光源からの光(ピーク波長625nm)は、一方の光ファイバを通して膜へ垂直に照射され、この照射光のうち膜を透過した光は、セル底面に設置した鏡で反射される。この反射光は、再度膜を透過して他方の光ファイバにより光パワーメータ(アドバンテスト製

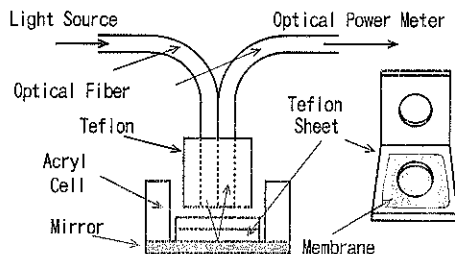


Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus in optical measurements.

TQ8214)の受光部(検出感度630nm)まで導かれ、その光強度が測定される。

なお初期条件としては、セルに膜を装着しないで純水のみを入れたときに、鏡による反射光強度が $100\mu W$ になるように光源強度を調節した。液温は27℃とし、測定値は膜の応答が安定する20分後の値とした。

3. 実験結果

3.1 膜の透過光強度特性と呈色変化の関係

本節では、最初にFig. 1の測定装置を用いて、1価の塩溶液であるKCl溶液の濃度条件に対する膜透過光の強度特性を求めた。その結果をFig. 2に示す。膜の透過光強度は、溶液濃度が50mM未満の場合、ほぼ一定の $43\mu W$ となり、初期設定の $100\mu W$ に比べてかなり低下した。これは、この濃度区間では、膜の呈色状態が不透明な乳白色の状態になっているためである。つぎに、透過光強度は濃度約50mMから増加を始め、150mMでは低濃度区間の約2倍の $82\mu W$ となり、250mM以降ではほぼ初期設定時の $100\mu W$ に近づいた。これらの濃度区間における膜の呈色状態は、250mM以降ではほぼ無色の透明な状態であり、また50~250mMでは不透明な乳白色から無色透明な状態へと移行していた。

つぎにFig. 3は、従来用いていた分光光度計⁷⁾によって、膜の光透過率特性を求めた結果である。なおここでは、後述する検討のために、定電流法¹⁰⁾による膜の電気抵抗特性も合わせて示し、光透過率と電気抵抗の最大値を1として相対表示した。濃度25mM未満では、Fig. 2と同様に、膜が不透明な状態にあるため光の透過度がきわめて低く、透過率は0.007となった。つぎに光透過率は、Fig. 2に比べていくぶん低い濃度である25mMから増加傾向を示し、100mM、150mMではそれぞれ0.1、0.55と急激に増加し、250mM以降ではほぼ1となった。また膜の電気抵抗は、光透過率とは反対に、溶液濃度の上昇によって初期値(400kΩ)の約50分の一まで低下した。Fig. 2とFig. 3の結果を比較すると、二つの光学特性はほぼ相似形をなしており、Fig. 1の測定装置は分光光度計と

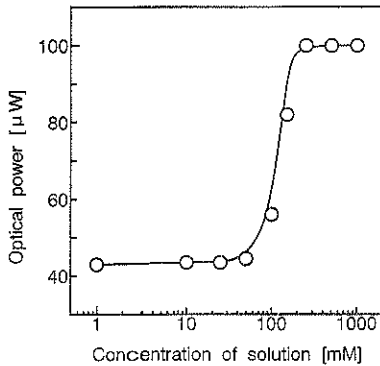


Fig. 2 Change of optical power in the Monoolein PVC membrane with KCl solution.

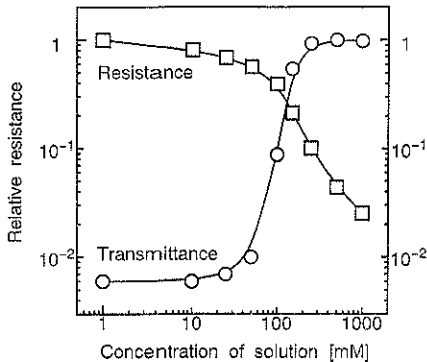


Fig. 3 Characteristics of the electrical resistance and the optical transmittance in the Monoolein PVC membrane with KCl solution.

同様に膜の光学的特性を評価できることがわかった。

3.2 5 基本味に対する膜の透過光強度特性

ここでは、モノオレインPVC膜が新たな味センシングの機能膜になりうるか否かを調べるために、5種類の基本味溶液に対する膜の透過光強度特性について検討した。その結果をFig. 4に示す。

低濃度の各溶液における特性は、光強度が約40μW前後となり、大差が見られなかった。しかし、濃度がおよそ50mM以上になると、5基本味溶液に対する特性は光強度の増加率の違いによって大きく三つに分かれた。まず、最も応答性が良い塩酸キニーネ溶液では、光強度が50mMから増加を始め、100mMで99μWとなり、ほぼ初期設定時の値に達した。そのつぎに応答性が良かった三つの溶液、すなわちNaCl、サッカロースおよびMSG溶液では、光強度が増加を始める濃度は塩酸キニーネ溶液と同じ50mMであったが、特性の増加傾向は塩酸キニーネよりも緩く、500mMで99μWの最大値に達し、その後飽和した。最も応答性が悪いHCl溶液では、光強度が150mMから増加を始め、1000mMでも72μWと他の

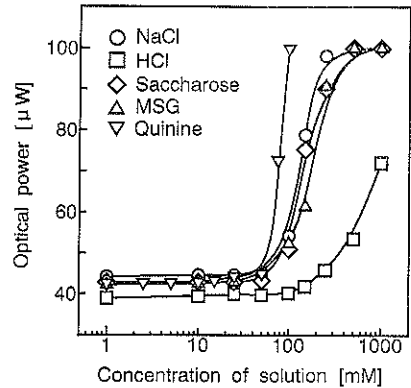


Fig. 4 Changes of optical power in the Monoolein PVC membrane with five taste solutions.

溶液よりも低い光強度を示し、また特性は飽和しなかった。なお、ここでは光強度が増加に転じる濃度を応答閾値と呼び、塩酸キニーネ、NaCl、サッカロース、MSGの各溶液では50mM、HCl溶液では150mMであった。

またすべての特性には、生体の感覚器に見られる対数的な刺激の強さ(味物質の濃度)を線形的な強さ(膜の透過光強度)として感知する、いわゆるWeber-Fechnerの法則¹¹⁾が成立する領域が見られた。このように、モノオレインPVC膜は5基本味溶液に対して有意な透過光強度特性を示すことが判明し、味溶液に対するトランスデューサ材料としての可能性が示唆された。

しかし、Fig. 4の各基本味溶液に対する応答閾値とヒトの味覚閾値(NaCl: 10mM、HCl: 0.9mM、サッカロース: 10mM、MSG: 1.6mM、塩酸キニーネ: 0.008mM)¹²⁾には差異が見られた。そこで本研究では、味溶液に対するこの膜の応答閾値をヒトの味覚閾値に近づけることを目的に、以下の特性改善を試みた。

3.3 膜の脂質量変化による特性改善

基本味溶液に対する応答特性の一つの改善方法として、まず膜の脂質含有量を調節してみた。膜作製時に脂質量を0.2, 0.4, 0.7, 0.9gとすると、膜厚はそれぞれ約20, 40, 70, 90μmに変化した。

Fig. 5は、これらの膜のNaCl溶液に対する透過光の強度特性である。各特性は膜の脂質量の減少に伴って低濃度方向に平行移動し、応答閾値も脂質量の少ないほうから10, 50, 150, 150mMとなった。ここで、脂質量が最も少ない0.2gの膜の応答閾値は10mMとなり、前述のヒトのNaCl溶液に対する味覚閾値¹²⁾と一致していた。また、このような閾値のシフト傾向は、塩酸キニーネ溶液を除く他の三つの溶液でも見られた。

なお、脂質量0.1gでも検討したところ、応答閾値はさらに低下して約1mMになった。しかし、前述の脂質

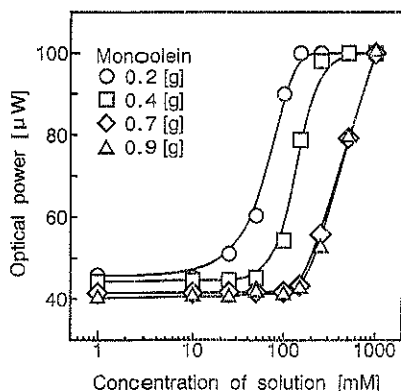


Fig. 5 Effect of Monoolein quantity on optical characteristics of the Monoolein PVC membrane in NaCl solution.

量 0.2~0.9g の膜では光強度の変化が約 40~100 μ W であったのに対し, 0.1g の膜では 80~100 μ W の変化となり, 変化量は前者の三分の一に減少した。

3.4 コレステロール混入による特性改善

ここでは, 広く生体に存在する中性脂質のコレステロールを膜に混入し, 応答特性の改善効果について検討した。なお本論文では以後, モノオレイン PVC 膜をモノオレイン膜, これにコレステロールを混入した膜をコレステロール混入膜と呼ぶ。コレステロール混入膜は, 2.1 節の膜の作製時にさらに適量のコレステロールを混入するだけで, 後の作業はモノオレイン膜と同様である。また, 3.2 節の結果とコレステロールの効果を比較するために, 膜作製時のモノオレインの量は同一の 0.4g とし, コレステロールの量は 0.01~0.20g とした。

Fig. 6 は, 塩酸キニーネ溶液に対するコレステロール混入膜の透過光強度特性の代表例で, 0.07g と 0.20g の場合である。比較のために示したコレステロールの混入

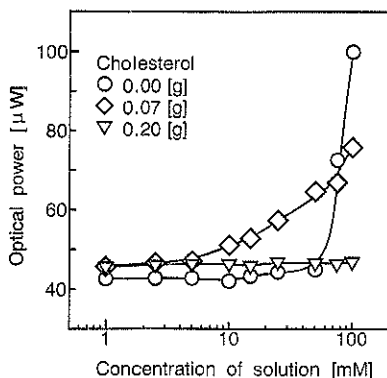


Fig. 6 Effect of cholesterol on optical characteristics of the Monoolein PVC membrane in Quinine hydrochloride solution.

がない 0g の特性, つまりモノオレイン膜では応答閾値が 50mM であったのに対し, コレステロール 0.07g 混入の膜では応答閾値が 5mM へと大幅に低下した。また, これらの応答領域も, 前者では 50~100mM と狭かったのに対し, 後者では 5~100mM と著しく拡大した。なお, 同様な改善効果は HCl, MSG 溶液でも見られた。

このコレステロール混入による効果としては, 混入量 0.07g を境に, これより少ない量では応答閾値の改善効果が小さく, 多い量では光強度がほとんど増加しないという傾向になった。また, 0.20g を越える混入では, 透過光の強度変化がわずかに 2 μ W 程度にしかならず, 測定には適さない膜となった。

3.5 可塑剤混入による特性改善

つぎに, 膜支持体の PVC に柔軟性をもたせる可塑剤を混入し, 応答特性の改善効果を検討した。可塑剤には ジ-n-ブチルフタレート (DBP) を用い, 以後これを混入したモノオレイン PVC 膜を可塑剤混入膜と呼ぶ。この膜では, モノオレインの量は前項と同様な理由で 0.4g とし, 可塑剤の量は 0.01~0.07g とした。

Fig. 7 は, NaCl 溶液に対する可塑剤混入膜の透過光強度特性の代表例で, 0.04g の場合である。また, 図には前節と同様にモノオレイン膜 (可塑剤 0g) の特性も示した。両者の特性を比較すると, モノオレイン膜では応答閾値が 50mM で, 応答領域が 50~250mM であったのに対し, 可塑剤混入膜では応答閾値が 25mM へと低下して, ヒトの味覚閾値 (10mM)¹²⁾ に近づき, 応答領域も 25~1000mM へと拡大した。このような, 可塑剤混入による改善効果は, 他の四つの味溶液でも見られた。

なお, 可塑剤の混入量については, 0.04g を境にこれ以上でも以下でも特性の改善効果は小さく, また多い場合には膜が柔らかすぎて使用困難になった。

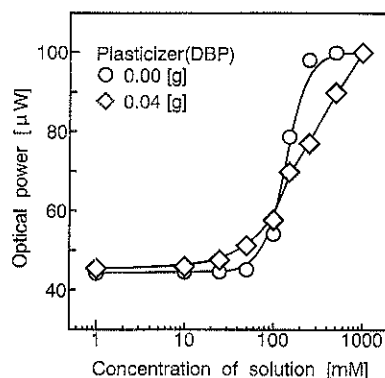


Fig. 7 Effect of plasticizer (DBP) on optical characteristics of the Monoolein PVC membrane in NaCl solution.

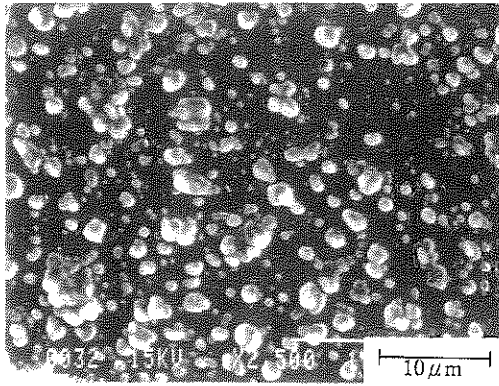


Fig. 8 Surface structure of the Monoolein PVC membrane.

4. 検 討

ここでは、まず3.1節で述べた透過光の強度変化と膜の呈色変化について考察する。Fig. 8の走査型電子顕微鏡(SEM)による作製直後の膜の表面構造観察によれば、膜表面には直径2~3 μm 程度の脂質分子の固まりが存在している。これをもとに膜の内部構造モデルを想定するとFig. 9のようになり、ここでは脂質分子がPVC内の直径数 μm 程度のポアに油滴の状態で保持されている。

一般に脂質分子は、親水基と疎水基の両者からなり、同一分子内のこれらの相対的な強さのバランスによって、その物理・化学的性質および集合状態が支配される。そのため、脂質分子は溶液濃度の影響などでその集合状態が油滴、球形ミセル、板状ミセル、ラメラ相などに変化するとされている¹³⁾。

本研究で使用したモノオレイン分子は塩溶液中で親水

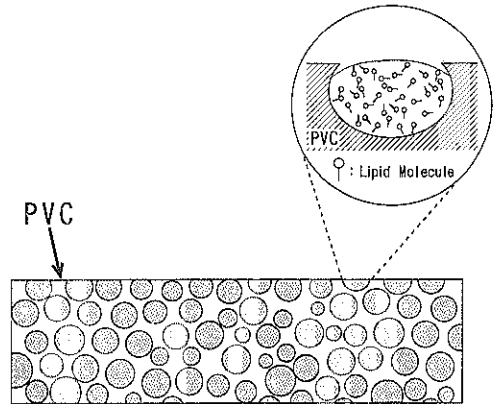


Fig. 9 Inner structure model of the Monoolein PVC membrane.

基の水素イオンを解離して負に荷電する性質を有し、ここに正電荷をもつイオンや分子を吸着・結合させることで、親水基間の静電的反発力が変化し、相転移を引き起こすものと思われる¹³⁾。このため著者らは、Fig. 3のような膜の電気抵抗変化には、前述のような脂質分子の集合状態が関与し、高抵抗状態では油滴に、低抵抗状態ではラメラ相になっているものと考えている^{10,13,14)}。

つぎに、脂質分子の集合状態と膜の光透過性の関係をFig. 10の想定図を用いて考察する。まず膜を低濃度の溶液に浸漬させると、油滴の状態にあった脂質分子のうち、水の相に近い分子は親水基を水相側に向けて熱力学的に安定な1分子配向の状態になる¹³⁾。つぎに溶液の濃度を上昇させると、脂質分子は、油滴、1分子配向、球形ミセル、および2分子配向などが混在する集合状態となり、さらに溶液の濃度が上昇すると、ほぼ全体でラメ

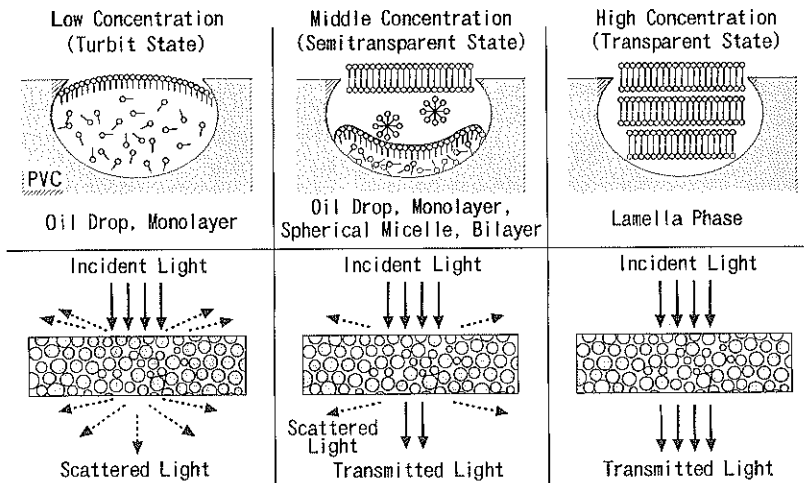


Fig. 10 Relation between the lipid orientation and the transmitted light.

ラ相が形成されるようになる¹³⁾。

これら分子の集合状態と光の透過性の関係は、油滴やラメラ相では透過性が良く、1分子配向や球形ミセルでは散乱によって透過性が悪いとされている^{15,16)}。本研究の塩溶液の濃度条件による膜の呈色変化とこれに伴う光透過性の変化は、上述したような脂質分子の集合状態の変化に起因するものと推定される。

このように何らかの外的な要因で光の透過性が変化する膜の例としては、Matsudaらの脂肪酸混合膜¹⁵⁾と梶山の高分子/液晶複合膜¹⁷⁾が挙げられ、前者は温度に対して、後者は電界に対して呈色変化を引き起こす。

つぎに、3.2節の5 基本味溶液に対する応答特性の差異は、各味物質の分子形状や脂質への作用の仕方が原因と考えられる¹⁸⁾。具体的には、NaCl, HCl, MSGでは陽イオンによる脂質分子の負電荷への静電的相互作用が、サッカロースでは膜内部への浸透作用が、塩酸キニーネでは静電的相互作用と疎水的作用の両者が膜構造に影響を与え¹⁸⁾、その結果として膜の呈色変化とこれに伴う透過光の強度変化が起きたものと推測される。

3.3節の脂質含有量による特性のシフト傾向は、脂質量の減少に伴って膜厚が薄くなり、味物質が膜内部で作用しやすくなったためと思われる。しかし、塩酸キニーネではこのような傾向は見られず、これは一般に苦味物質が強い疎水性と正電荷をもち、その特異的な分子形状のために膜の表面に吸着し、深部には浸透しないためと考えられる¹⁹⁾。

3.4節のコレステロール混入膜では、中性脂質のコレステロールがその強い疎水性と特有の分子構造で脂質膜の疎水部に入り込み^{19~21)}、モノオレインの1分子層や球形ミセルの表面電荷が非混入膜に比べて減少したため、より少ない味物質で相転移が起き、その結果として特性が改善されたものと推測される。なお、コレステロール0.20g混入の膜では、光強度の変化がほとんどなかったが、これはコレステロールが入りすぎて、逆に脂質層の流動性の低下²²⁾を招いたものと思われる。また3.5節の可塑剤混入膜では、フタル基と2本の疎水鎖を有する可塑剤のDBP²²⁾が支持体のPVCを柔軟にさせただけでなく、その強い疎水性で脂質膜の疎水部へ入り込み²¹⁾、コレステロール混入膜と類似の機構によって特性が改善されたものと思われる。なお、コレステロールによる特性の改善はHCl, MSG, 塩酸キニーネの三つの溶液に限られていたのに対し、可塑剤では5種類の味溶液で特性が改善されていた。これは、可塑剤がボアサイズや脂質の流動性にも影響を与えたためと考えられるが、今後詳細に検討したい。

5. お わ り に

本研究では、光ファイバを用いて新たに構築した光学測定系により、5種類の基本味溶液に対するモノオレインPVC膜の透過光強度特性を検討した。その結果、各味溶液の濃度条件に対して膜の透過光強度が有意な変化を示すことが判明し、新たな味センシングの機能膜としての可能性が示唆された。また各溶液に対する応答閾値の改善手法として、膜の脂質含有量を調節する方法、膜にコレステロールを混入する方法および膜に可塑剤を混入する方法が有効であった。今後は膜の時間応答特性やより実際の測定系について検討したい。

文 献

- 1) たとえば、森泉豊栄, 吉野勝美, 森田慎三, 岩本光正: “有機エレクトロニクス” (電子情報通信学会, 1994)。
- 2) たとえば、吉川研一: 膜 **10**(6), 337 (1985)。
- 3) 池崎秀和, 林 健司, 山中章己, 立川理江子, 都甲潔, 山藤 馨: 電子情報通信学会論文誌 **J74-C-2**(5), 434 (1991)。
- 4) 山川進三, 山口晃史: 電気学会論文誌 **112-C**(12), 798 (1992)。
- 5) 謝世明, 中本高道, 森泉豊栄: 電気学会論文誌 **113-C**(4), 284 (1993)。
- 6) 小島洋一郎, 三澤顕次, 有澤準二, 松本伍良: 医用電子と生体工学 **32**(4), 262 (1994)。
- 7) 三澤顕次, 有澤準二: 電気学会論文誌 **113-C**(5), 364 (1993)。
- 8) 大西俊一: “生体膜の動的構造” (東京大学出版会, 1982) 2章。
- 9) G. J. Moody, R. B. Oke and J. D. R. Thomas: Analyst **95**, 910 (1970)。
- 10) 三澤顕次, 有澤準二: 膜 **11**(5), 297 (1986)。
- 11) 栗原堅三: “味覚・嗅覚” (化学同人, 1990) 4章。
- 12) R. F. Schmidt: “感覚生理学” 岩村吉晃他訳 (金芳堂, 1989) p. 249。
- 13) 中垣正幸: “膜物理化学” (喜多見書房, 1987) § 4。
- 14) 都甲潔, 山藤馨: 膜 **12**(1), 12 (1987)。
- 15) G. Matsuda, S. Tanji, A. Tanaka and Y. Hayashi: IS&T's Eighth Int. Congress on Advances in Non-Impact Printing Technologies, 442, (1992)。
- 16) 北原文雄: “コロイドの話” (培風館, 1984) p. 54。
- 17) 梶山千里: 応用物理 **62**(10), 985 (1993)。
- 18) 飯山悟, 都甲潔, 山藤馨: 膜 **12**(4), 231 (1987)。
- 19) 岡畑恵夫: 膜 **16**(1), 26 (1990)。
- 20) 荒磯恒久: 膜 **19**(1), 3 (1994)。
- 21) C. Tanford: “疎水性効果” 妹尾, 豊島訳 (共立出版社, 1984) 11, 12章。
- 22) 大木道則 他編: “化学大辞典” (東京化学同人, 1984)p. 1995b。