
複合酵素膜による医用バイオセンサーの高性能化の研究

(課題番号：08458282)

平成8年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））
研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 安斉 順一
(東北大学薬学部教授)

はしがき

この報告書は、平成8・9年度文部省科学研究費補助金基盤研究（B）（2）（研究課題番号08458282）により、複合酵素膜による医用バイオセンサーの高性能化に関して行った研究成果をまとめたものである。

研究組織

研究代表者：安斉順一（東北大学薬学部 教授）
研究分担者：鈴木 巖（東北大学薬学部 講師）
研究分担者：柏木良友（東北大学薬学部 助手）
研究分担者：前原和平（福島県立医科大学医学部 助教授）

研究経費

平成8年度	5、300	千円
平成9年度	2、500	千円
合計	7、800	千円

東北大学図書



00010139744

附属図書館

<研究発表>

(1) 学会誌等

- 1) Q.Chen, J.Anzai, T.Osa
Adsorption behavior of avidin and streptavidin on the gold electrodes modified with thiol monolayers with different hydrophobicity and polarity
Denki Kagaku, 64, 1254-1255(1996).
(平成8年12月)
- 2) J.Anzai, T.Osa
Avidin-biotin supramolecular complexation for biosensor applications
Adv.Supramol.Chem., 4, 143-161(1997).
(平成9年9月)
- 3) J.Anzai, Y.Kobayashi, H.Takeshita
Enzyme multilayer-modified biosensors. Use of streptavidin and deglycosylated avidin for constructing glucose oxidase and lactate oxidase multilayers
Anal.Sci., 13, 859-861(1997).
(平成9年10月)
- 4) J.Anzai, H.Takeshita, Y.Kobayashi, T.Osa, T.Hoshi
Layer-by-layer construction of enzyme multilayers on an electrode for the preparation of glucose and lactate sensors: aElimination of ascorbate interference by means of ascorbate oxidase multilayer
Anal.Chem., 70, 811-817(1998).
(平成10年2月)
- 5) Q.Chen, Y.Kobayashi, H.Takeshita, T.Hoshi, J.Anzai
Avidin-biotin system-based enzyme multilayer membranes for biosensor applications: Optimization of loading of choline esterase and choline oxidase in the bienzyme membrane for acetylcholine biosensors
Electroanalysis, 印刷中(1998).
(平成10年)

(2) 口頭発表

- 1) 竹下浩生、安斉順一、長 哲郎
GOx/AOx累積膜グルコースセンサー：アスコルビン酸による妨害の除去
第22回化学センサー研究発表会（東京）
(平成8年4月)
- 2) 安斉順一
酵素薄膜の構造制御とバイオセンサーへの応用
日本分析化学会第45年会（仙台）
(平成8年9月)
- 3) 竹下浩生、安斉順一、長 哲郎
アビジン・ビオチン法による酵素累積膜の調製：アビジン類似体の利用
第35回日本薬学会東北支部大会（仙台）
(平成8年10月)
- 4) 安斉順一、竹下浩生、小林由佳
酵素超分子の構築とバイオセンサーへの利用
第42回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会（つくば）
(平成8年12月)
- 5) 安斉順一、小林由佳
酵素累積膜バイオセンサー：レクチン-糖鎖結合の利用
第24回化学センサー研究発表会（神奈川）
(平成9年3月)
- 6) 西村雅裕、安斉順一
アビジン-ポリマー間の特異結合を利用するアビジン・ポリマー交互累積
膜の調製
第12回生体機能関連化学若手シンポジウム（盛岡）
(平成9年9月)

- 7) 小林由佳、竹下浩生、陳 強、安斉順一
タンパク質-リガンド間の特異結合を利用する酵素累積膜の調製
第12回生体機能関連化学シンポジウム (盛岡)
(平成9年9月)
- 8) 小林由佳、中村伸之、安斉順一
Con A/LOx累積膜を用いた乳酸センサー
第25回化学センサー研究発表会 (東京)
(平成9年9月)
- 9) 小林由佳、中村信之、安斉順一
レクチン・酵素累積膜を用いた乳酸センサー
第36回日本薬学会東北支部大会 (仙台)
(平成9年10月)
- 10) 西村雅裕、安斉順一
アビジン・ビオチン特異結合に基づくアビジン・ポリマー交互累積膜の
調製
第36回日本薬学会東北支部大会 (仙台)
(平成9年10月)
- 11) Q.Chen、 H.Takeshita、 J.Anzai、 T.Osa
Acetylcholine biosensors based on a enzyme multilayer composed of ChOx
and ChE
第7回国際分析機器討論会および展示会 (シャンハイ)
(平成9年10月)
- 12) J.Anzai
Preparation of Enzyme Multilayer Biosensors
第3回日韓電気化学セミナー (ソウル)
(平成9年11月)

<研究成果>

バイオセンサーを医療分野へ応用する際に種々の問題を解決しなければならないが、測定対象となる血液中に共存する妨害物質の影響を低減して高選択的に目的物質を測定することを実現することは重要な課題である。本研究では、主に血液中の乳酸濃度を測定するバイオセンサーに焦点を絞り、センサーによる測定に対する血液中のビタミンC（別名；アスコルビン酸）による妨害を低減ないしは完全に除去することを検討した。この目的を達成するために、乳酸酸化酵素（LOx）とアスコルビン酸酸化酵素（AOx）の2種類の酵素を電極上に同時に固定化した複合酵素膜を用いる方法を採用することとした。複合酵素膜を作製するために、アビジンとビオチン標識酵素を交互に固定化する交互累積膜法を実施した。この方法では、アビジンとビオチンとの強固な結合のため、これらのタンパク質がほぼ単分子層を形成して累積固定化されることが判明した。本法により作製した酵素薄膜の構造を重量法や分光法により明らかにすることができた。

はじめに、LOxとAOxを電極上に同時に固定化して乳酸センサーとする際の、それぞれの酵素の固定化量と固定化順序の最適化を実施した。アスコルビン酸は電極により直接酸化され易いため、LOxだけを固定化したセンサーでは、約0.1 mM（血中正常値）のアスコルビン酸が共存すると著しい妨害電流（約20%）が観察された。この結果より、LOxだけを固定化したセンサーでは血液中の乳酸濃度を正確に測定することは不可能であることが判明した。一方、AOxを同時に固定化するとアスコルビン酸がAOxにより分解されるため、乳酸濃度が0.1 mM以上の範囲では0.1 mMのAOxによりほとんど妨害を受けなかった。固定化するAOxの量はLOxの1/10程度で充分であったが、AOxの安定性が元来かなり低いことを考慮すると、LOxとAOxを1:1として固定化するのが現実的であると判断される。また、電極上へのLOxとAOxの固定化順序をかえて、種々の乳酸センサーを作製したが、性能に著しい差異は見られなかった。いずれの複合酵素膜で修飾した乳酸センサーでも、血液中の正常値の乳酸を正確に測定することが可能である。

本研究では、酵素を固定化するに際してアビジン・ビオチン法を採用してきたが、アビジン以外にもストレプトアビジンや脱糖鎖アビジンも使用することができることが判明した。また、レクチンと糖鎖との特異結合を利用して、コンカナバリンAとマンノース標識酵素を用いてLOx とAOxの複合酵素膜を作製することも可能であった。

また、乳酸センサー以外にも複合酵素膜を用いた酵素センサーとして、コリンエステラーゼ (ChE) とコリンオキシダーゼ (ChOx) の複合膜を用いたアセチルコリンセンサーを作製した。ChEとChOxの固定化量の最適化を行い、ChEとChOxを5:2程度に調節すると最も良好な性能のセンサーとすることができた。本法は、多様な複合酵素膜を作製するための汎用的方法として有用であることが明らかになった。

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。