

	かさい しげのぶ
氏 名	葛西 重信
授 与 学 位	博士 (工学)
学位授与 年 月 日	平成 13 年 3 月 2 6 日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科, 専 攻 の 名 称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 応用化学専攻
学 位 論 文 題 目	走査型電気化学/化学発光顕微鏡による 固定化酵素の機能評価と応用
指 導 教 官	東北大学教授 末永 智一
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 末永智一 東北大学教授 内田 勇 東北大学教授 熊谷 泉

## 論 文 内 容 要 旨

本論文では、局所領域のみで化学反応を誘起させ、そこでの反応を検出できる走査型電気化学/化学発光顕微鏡 (SECM/SCLM) を開発し、局所領域に固定化した酵素の活性を酸化還元電流または化学発光によるイメージングとして捉え、その応用としてイムノアッセイへと展開した。

### 第 1 章 序論

本論文の背景として、走査型電気化学顕微鏡 (SECM) の基本原理、不均一反応速度定数の解析、均一反応速度定数の解析、SECM イメージング、単分子検出、解像度、SECM プローブ、生体試料への応用について述べた。また、イムノアッセイに関して概説するとともに、化学発光及び電気化学的検出を利用したイムノアッセイの特徴と近年の研究開発動向を記述し、本論文の目的について述べた。

### 第 2 章 走査型電気化学/化学発光顕微鏡 (SECM/SCLM) の開発と基礎特性

論文全体の基盤となる走査型電気化学/化学発光顕微鏡 (SECM/SCLM) の構成 (Fig.1) 及び 3 種のプローブ (ガラスキャピラリー、マイクロ電極、キャピラリー電極) の作製方法を述べるとともに、システムの基礎特性評価として①ルミノールの電解酸化による化学発光、②過酸化水素の電解生成による化学発光、③ルミノールと過酸化水素の同時インジェクションによる化学発光、④電気泳動インジェクションによる化学発光に関する検討結果を記述し、本システムが局所領域における化学発光反応の誘起や電気化学的な酸化還元電流の検出に有効であることを示した。ガラスキャピラリーによるルミノールのインジェクションでは、極微量 (内径 1  $\mu\text{m}$  で 78 pL/sec) のインジェクション量で発光検出が可能であり、使用するルミノール量が極少量で済むという特長がある。また、インジェクション時間及びインジェクション圧に発光強度がほぼ比例することから、インジェクション量をコントロールすることにより感度を調節できることを示した。

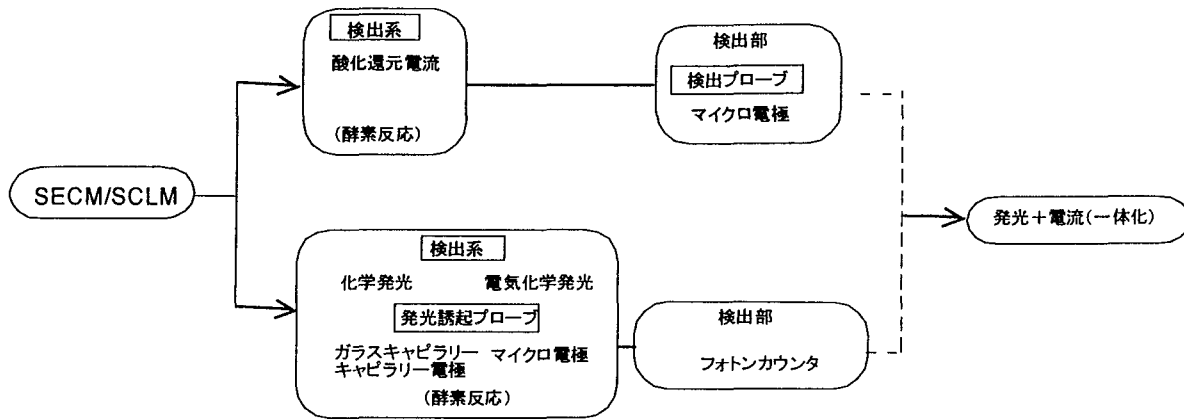


Fig.1 SECM/SCLM system.

### 第3章 SECM/SCLM による固定化酵素のイメージング

ここでは、SECM/SCLM システムを用いて局所領域に固定化した酵素活性のイメージングを行った。数  $10\mu\text{m}$  の領域に固定化した酵素に関して、その活性を3次元画像として捉えることが本章の目的である。空間的に限定した領域にのみ試料を固定化する方法は、基板を溶液中に全面浸漬する方法と比較し、酵素の量が極微量で済み、非特異的な結合を防ぐ効果も兼ね備えている。酵素の固定は、ガラスキャピラリー内に充填した酵素溶液をスポットティングすることで行った。キャピラリーの座標をXYZ方向に制御することにより所定の微小領域に一種あるいは複数種の酵素を容易に固定化できるものであり、固定化酵素のサイズはガラスキャピラリーの内径を規制することでコントロールできる。

本章においては、上に述べた生体試料のパターニング技術を用いて、イムノアッセイのラベル化酵素として汎用される西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 及び血中成分分析で重要なグルコースオキシダーゼ (GOD) やウリカーゼをガラス基板の局所領域に固定化し、電気化学発光、化学発光 (Fig. 2)、電気化学的測定 (Fig. 4) を行うことにより、酵素をイメージングしその評価した。その結果、固定化酵素の活性を化学発光 (Fig. 3) によるイメージとして捉えた。また、マルチ酵素チップを用いた尿酸及びグルコースの同時計測にも成功した (Fig. 5)。

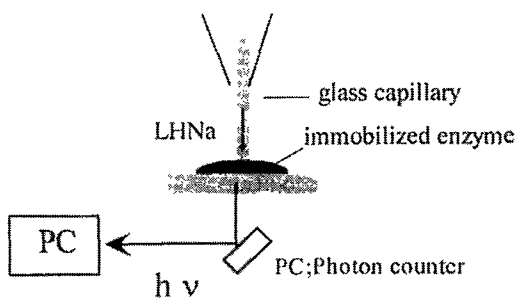


Fig.2 Schematic drawing of operating principle of SECM/SCLM.

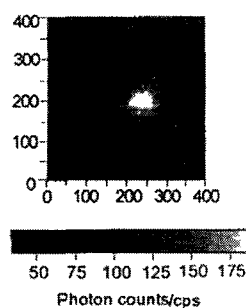


Fig. 3. SCLM image of HRP-immobilized substrate in a 0.2M phosphate buffer solution (pH8.7). Solution inside the capillary, 5.0mM NaLH+25mMH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Injection rate, 78 pL/s. Scan rate, 2.4  $\mu\text{m/s}$ . Inner diameter of capillary, 1 $\mu\text{m}$ . Tip height, 40  $\mu\text{m}$

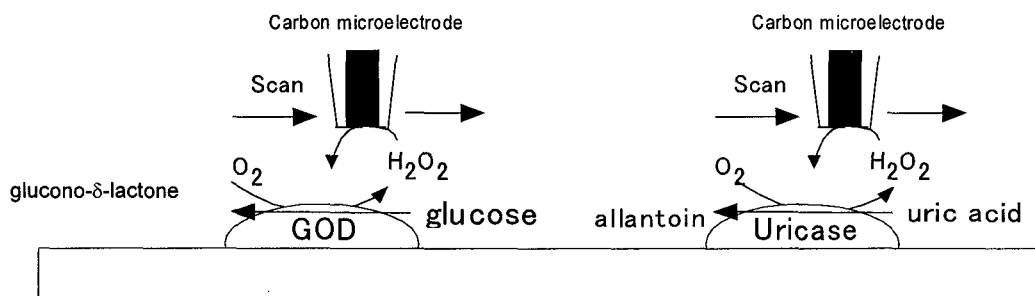


Fig. 4 Schematic drawing of operating principle of SECM/SCLM.

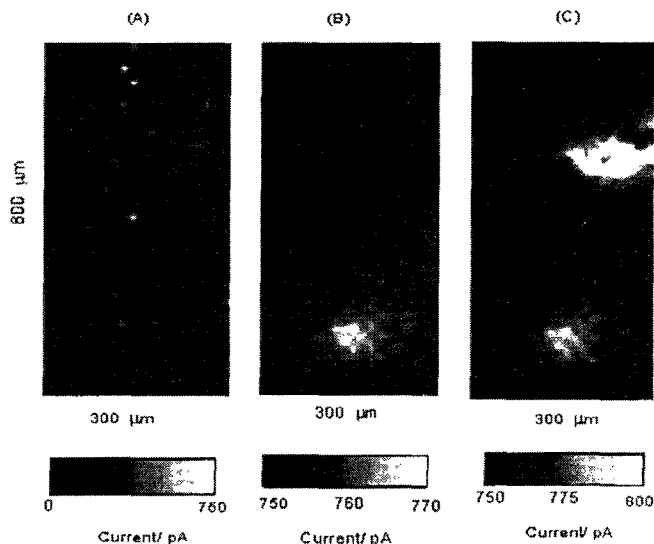


Fig.5 SECM images of GOD-spot and Uricase-spot co-immobilized on a glass plate in (A) pure buffer solution, (B) 1 mM uric acid, (C) 1 mM uric acid + 50  $\mu$ M glucose.

SECM/SCLM システムには、以下に示す特長がある。

- ① 化学反応が局所領域でのみ進行するため副反応が小さく、バックグラウンドと酵素の活性が鮮明に識別可能である。
- ② 電気化学発光を利用した場合には、電流によるイメージ（トポグラフィ）及び化学発光イメージ（酵素の活性）を同時に検出することが可能である。
- ③ 化学発光を利用した場合には、ガラスキャピラリーによってインジェクションすることで、ルミノール試薬が極微量で済む。
- ④ 酸化還元電流を利用した場合は、化学発光を利用した場合に比べて非常に高感度であり、モノレイヤーレベルで固定化した HRP の検出が可能である。

#### 第 4 章 SECM/SCLM による MRSA 関連タンパク質のイムノアッセイ

ここでは、院内感染を引き起こす MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) が産生する毒素タンパク質の一種であるロイコシジンを対象とし、体液中濃度が、数 100~数 10 pg/mL と極めて微量な毒素の検出を目的とした。

HRP を用いたイムノアッセイと SECM/SCLM による酸化還元電流検出を組み合わせることにより、ロイコシジンの極微量分析を行った (Fig. 6)。Fig. 7 は、ロイコシジンのスポット量を約 0.5  $\mu$ L

(直径約 1.3 mm) とした時の SECM イメージである。本システムにより 5.25 pg/mL (Fig. 7 のセル h) と極めて微量な毒素の検出ができることが明らかとなった。この SECM/SCLM-ELISA システムは、電極サイズ、電極-基板間距離のなど計測条件を最適化することによって実用レベルに十分適応できると考えられる。また、HRP 標識抗体を利用することにより化学発光及び電気化学発光イメージングが可能であった。

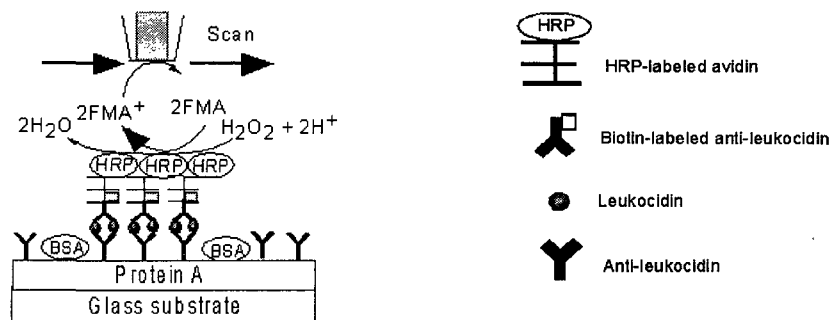


Fig.6 Schematic diagram showing the operating principle of the SECM/SCLM-ELISA system.

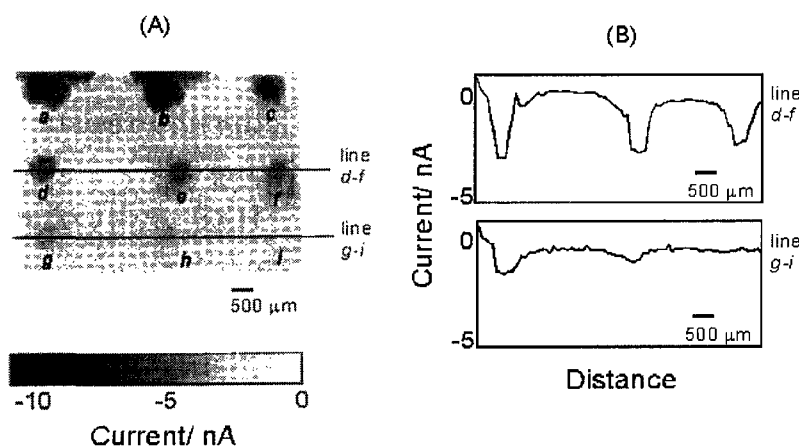


Fig.7(A) A SECM image of leukocidin spots formed at each vial using different concentration of leukocidin; (a)  $52.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , (b)  $5.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ , (c)  $525 \text{ ng ml}^{-1}$ , (d)  $52.5 \text{ ng ml}^{-1}$ , (e)  $5.25 \text{ ng ml}^{-1}$ , (f)  $525 \text{ pg ml}^{-1}$ , (g)  $52.5 \text{ pg ml}^{-1}$ , (h)  $5.25 \text{ pg ml}^{-1}$ , (i)  $0 \text{ pg ml}^{-1}$ . (B) Line data across vials d-f and vials g-i. Au microelectrode (diameter,  $0.3 \mu\text{m}$ ) was scanned at  $73 \mu\text{m sec}^{-1}$  with the tip-substrate distance of  $50 \mu\text{m}$ .

## 第5章 総括

本章においては、主要な研究成果を総括し、今後の展開について述べた。本論文では化学発光と酸化還元電流の検出を同時に行える SECM/SCLM を開発し、局所領域に固定化した酵素のイメージングを行うとともに、新しいアッセイシステムへと展開を図ることができた。ここで開発したアッセイシステムは実用化に向け病院において実証試験がなされており、感染症の早期診断や食品の品質管理など様々な応用展開が図れるものと考えている。

# 論文審査結果の要旨

本論文は、微小領域に誘起した化学反応に起因する酸化還元電流及び化学発光を検出できる走査型電気化学/化学発光顕微鏡 (SECM/SCLM) を開発し、その基礎特性を評価するとともに、局所領域に固定化した酵素の活性をイメージングし、毒素タンパク質のイムノアッセイへと展開した研究をまとめたものであり、全5編よりなる。

第1章は序論であり、本研究の背景及び目的を述べている。

第2章では、本研究で開発した走査型電気化学/化学発光顕微鏡 (SECM/SCLM) の構成を示し、測定溶液中での酵素反応を、酸化還元電流及び化学発光によって検出することにより、SECM/SCLM の基礎特性を評価した結果に関して記述している。

第3章では、SECM/SCLM を用いて局所領域 (数  $10\ \mu\text{m}$  の領域) に固定した西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、グルコースオキシダーゼあるいはウリカーゼを、化学発光及び酸化還元電流測定によりイメージングし、各固定化酵素の活性を評価している。また、マルチ酵素チップを用いた尿酸及びグルコースの同時計測法を提案している。

第4章では、院内感染を引き起こす MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) が産生する毒素タンパク質の一種であるロイコシジンを、SECM/SCLM により極微量分析した結果を記述している。ここで、HRP を用いたイムノアッセイと SECM/SCLM による酸化還元電流検出を組み合わせることにより、 $100\sim$ 数  $10\ \text{pg/mL}$  と極めて微量の毒素を検出できることを明らかにしている。このシステムは現在、実用に向け病院において実証試験がなされており、新しい医療分析システムの構築に重要な指針を与えるものである。

第5章は総括である。

以上、要するに本論文は、化学発光と酸化還元電流の検出を同時に行える SECM/SCLM を開発し、局所領域に固定化した酵素のイメージングを行い、新しいアッセイシステムの展開をはかったものであり、生物学及び応用化学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として合格と認める。