平成 27 年度　博士学位論文

主　論　文

二次元 SPR を用いるマルチ酵素イメージング

センサシステムの開発

生命融合科学教育部博士課程

平成 25 年度入学

氏　名　　　　飛弾　祐平

主指導教員　　　篠原　寛明

平成 28 年 1 月 8 日提出

目次

第 1 章　序章

1-1 バイオセンサについて

　近年、先進国を中心とした国々において高齢化が進んでいる。特に日本、ドイツ、イタリアの 3 ヵ国は「超高齢化社会」として挙げられ、我が国においては 2025 年には約 30%、2060 年には約 40%の高齢化率(65 歳以上の人口が総人口に占める割合)に達するようである【1】。そのため、医療・介護などの社会保障費のさらなる膨張が懸念されている。(図 1-1) このような社会的背景から、健康の増進が益々重要視され、健康管理や病気の早期診断を目的とした小型バイオセンサの開発が盛んに行われている。例えば、糖尿病患者が常用するポータブル血糖値センサや、ストレスの指標となる唾液中のアミラーゼ活性を計測するアミラーゼセンサが既に市販化されている。(図 1-2, 1-3)また、最近ではコンタクトレンズに電極を印刷し、装着している人の涙に含まれるブドウ糖量を分析する小型センサの開発が進められるなど、その発展は目まぐるしい。(図 1-4)【2-4】

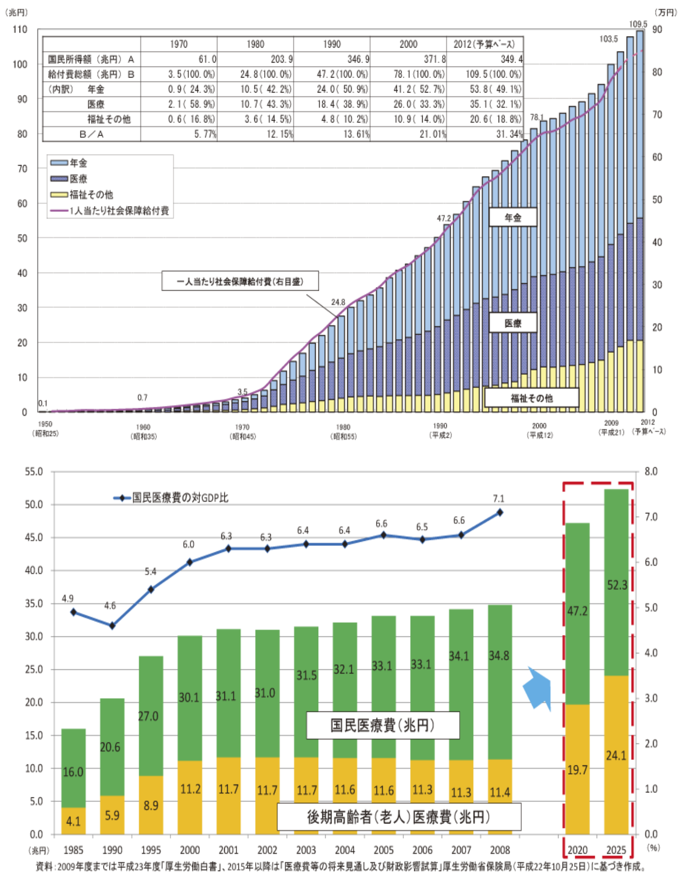


図 1-1　日本における社会保障給付費および国民医療費の推移
総務省ホームページ(出典) 国立社会保障・人口問題研究所「平成 22 年度社会保障費用統計」、総務省「ICT 超高齢社会構想会議報告書」

図 1-2　血糖値センサ
商品名「グルテストエブリ」三和化学研究所(株)より

図 1-3　アミラーゼセンサ
商品名「アミラーゼモニター」ニプロ(株)より

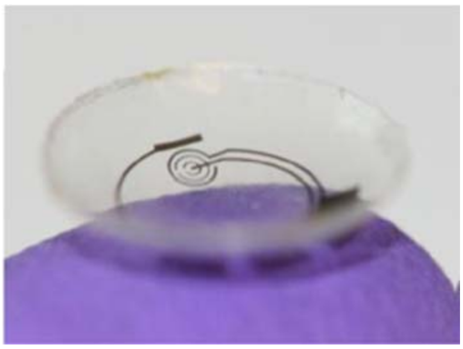


図 1-4　コンタクトレンズ型グルコースセンサ【3】

センサ(Sensor)は、『外界の何らかの物理量や化学量を電気信号に変換して検出するデバイス』と定義される。人の感覚器官をセンサに例えると、眼(視覚)、耳(聴覚)、皮膚(触覚)は外界の物理的変化に応答する物理センサであり、舌(味覚)や鼻(嗅覚)は味や匂いをもたらす化学物質に応答する化学センサである。主な化学センサには溶液中の特定イオンに選択的に応答するイオンセンサ、水素や一酸化炭素、メタンなどを選択的に検出するガスセンサ、生体関連物質を検出するバイオセンサなどがある。いずれのセンサも、物質を認識検知する部分(分子認識部位、レセプター)とそこで生じる変化を信号に変換する部分(トランスデューサ)から構成されている。特に、バイオセンサとは、生体物質が持つ分子認識機能を利用して測定対象となる化学物質を特異的に見つけ出し計測するセンサのことで、酵素や微生物または抗体を用いたセンサが一般的である【5】。その仕組みは、図 1-1 に示すように、測定する物質を特異的に見つけ出す分子認識部位(受容体)と、その見つけ出したという情報を人の読み取り可能な電気信号へ変換を行う各種のトランスデューサ部位から構成される。まず高分子膜などに固定化された分子認識部位で検出しようとする物質を認識し、その際に起こる種々の変化(酵素反応、抗原・抗体結合反応、微生物の呼吸、など)を電流変化、質量変化、屈折率変化、などに変換し、トランスデューサによって電気信号として出力される。分子認識部位には、酵素、抗体、DNA、微生物、などが用いられる【6】。また、トランスデューサにも測定対象に応じて電極、イオン選択性電界効果トランジスタ(Ion Selective Field Effect Transistor:ISFET)、水晶振動子マイクロバランス(Quartz crystal microbalance:QCM)、表面プラズモン共鳴測定装置(Surface Plasmon resonance:SPR)など様々なデバイスが利用されている【5,6】。分子認識部材料としての生体物質については、分子認識機能に関する安定性、再現性、選択性などが重要である。化学修飾や遺伝子組み換えなどを利用することによって、酵素や抗体の耐熱性や選択性といった機能の向上を図ることも行われている。

バイオセンサの発展の起源にさかのぼると、1962 年の Clark らによる酵素反応の電極による測定に端を発する。Clark らの酵素電極は、透析チューブと酸素電極の間に酵素溶液を封入したものであった。続く 1967 年には Updike らによりグルコースオキシダーゼをポリアクリルアミドゲル中に包括固定し、この酵素膜を酸素電極に取り付けて、グルコース添加時の酵素反応による溶存酸素の減少を計ったグルコースセンサが開発され、これが世界初の酵素センサとして認められた【7,8】。このような酵素反応の基質(酸素など)の減少あるいは生成物(過酸化水素など)の増加を計測することを原理とする酵素センサがまず開発され、第一世代の酵素センサと呼ばれている。さらにその後、白金や金の電極表面にグルコースオキシダーゼを固定化し、溶液中にフェリシアン化カリウムな

どの電子メディエータを共存させることにより、溶存酸素の濃度に影響されないグルコースセンサが開発された。現在、カード型血糖値センサとして用いられているのがこのタイプの測定原理を有する。このような電子メディエータを用いる酵素センサは第二世代の酵素センサを呼ばれる。このような背景の中で、既に研究開発が行われていたグルコースセンサをはじめとする酵素センサは、医療機器のセンサとして導入されている。(図 1-2)

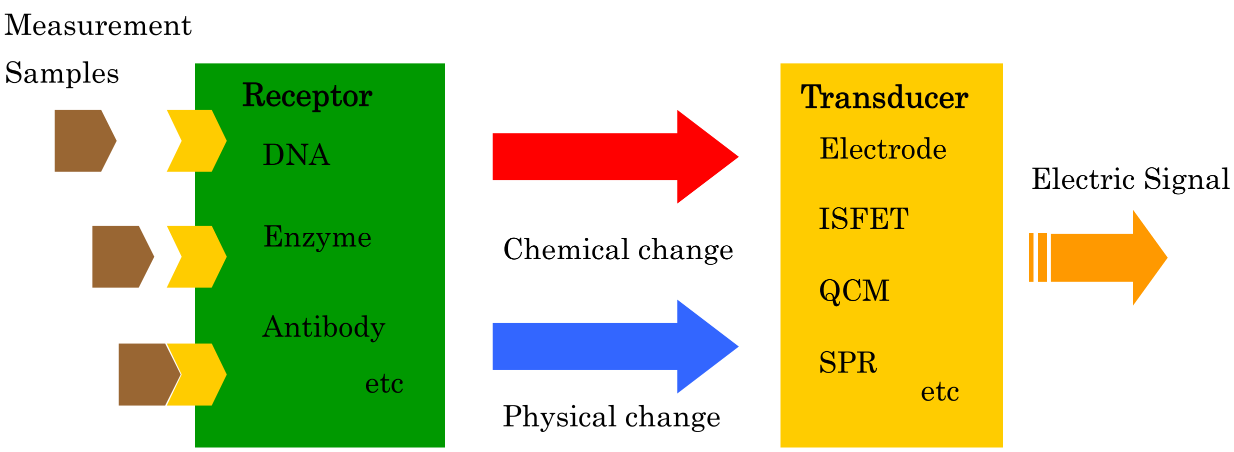


図 1-4　バイオセンサの構成

1-2 表面プラズモン共鳴(SPR)測定法の原理

表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)法とは測定表面の局所的な屈折率変化を敏感に観測する測定法であり、主として生体分子間の結合反応の測定やその速度論的解析が非標識かつリアルタイムで行うことのできる分析法である。例えば、免疫応答シグナル伝達、タンパク質・核酸など様々な物質間の相互作用の研究に大いに利用されている【9-15】。また近年では、オスミウム(Os)ポリマーなどの、その酸化還元状態でそれ自体の屈折率が変化する酸化還元高分子の SPR 観測が報告され、NTT の岩崎氏らは、酸化酵素(グルコースオキシダーゼ)とオスミウムポリマーを組み合わせたブドウ糖 SPR センサの開発を報告している【17-19】。これらの測定に用いられるのは一般に一次元の SPR 測定装置である。しかし、一次元 SPR 測定装置で観測できる領域面積は狭く、複数の物質を固定化し同時に測定することに応用することは難しかった。そこで、より広い領域での SPR 現象を測定するために考案、開発されたのが二次元 SPR イメージャー(2D-SPRi)である。一次元 SPR 測定では入射光が絞ったスポット光であるのに対して、2D-SPRi では光源からの光を並行光として照射することで、観測したい表面で起こる分子間相互作用などの生体分子の脱吸着反応を二次元イメージングとしてリアルタイムに観察することができる。また、表面のパターニング技術と組み合わせれば、マルチチャンネル測定(1 枚の基板で多数の試料を同時測定すること)への使用が可能であり、蛍光色素などの標識化を要しない、かつ極微量の対象物質の測定が可能なバイオセンサアレイとして高い可能性を有する。例えば、アレイ上の生体分子(オリゴヌクレオチド、結合タンパク質、抗体)を用いて標的となる数多くの DNA やリガンド分子、抗原などの特異的結合着を同時検出するマルチセンサに応用されている。

ここで、表面プラズモン共鳴(SPR)について少し説明する。表面プラズモン(SP)とは金属表面を伝播する金属表面に局在した自由電子の疎密波、すなわちプラズマ振動のことを指す。一方、ガラス基板に金薄膜を蒸着した金チップなどへ光を全反射条件で入射したとき、表面に局在するプラズモンと入射した光とが共鳴し、光のエネルギーが金属表面に移動する。この現象を表面プラズモン共鳴(SPR)という。電磁波で表面プラズモンを励起するためには，電磁波の位相速度が表面プラズモンの位相速度に一致しなければならないが、通常の媒質を伝搬する電磁波を表面に入射しても，両者の波数(Ksp)が一致するような条件は得られない。そこで、電磁波が境界面で全反射する時に発生するエバネッセント波が用いられている。このエバネッセント波を用いれば、その位相速度を表面プラズモンのそれに一致させることができ、表面プラズモンを共鳴的に励起することができる【20-22】。

図 1-2-1 はこの条件を満たすために考案され、現在最も広く用いられているクレッチマン(Kretschmann)光学配置を模式的に示したものである。単一波長の P 偏光を全反射条件で光学プリズムに入射するとプリズム裏面にエバネッセント波が染み出し、これが表面プラズモンの波数と一致したときに共鳴励起が生じる。エバネッセント波の波数ベクトルの x 成分 $k_{ev(x)}$は式(1)のように表現される。(n はプリズム屈折率、ω は角周波数、c は光速、θ は入射角度である。)

$$k_{ev(x)} = n\frac{\omega}{c}\sin\theta \qquad (1)$$

また、表面プラズモンの波数(k_{sp})は式(2)のように表される。(ε_m は金属誘電率, n_s は金属薄膜表面の屈折率である。)

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c}\left[\frac{\varepsilon_m n_s^2}{\varepsilon_m + n_s^2}\right]^{\frac{1}{2}} \qquad (2)$$

このエバネッセント波の x 成分の波数と表面プラズモン波の波数が一致する($k_{ev(x)} = k_{sp}$)とき、共鳴現象が起こり、入射波のエネルギーが表面プラズモンの励起によって奪われるため入射光に対する反射光の強度が減少する。このときの入射光の角度 θ は(1)、(2)式から求められ、式(3)のように表現できる。

$$\theta = Sin^{-1}\left\{\frac{1}{n}\left(\frac{\varepsilon_m n_s^2}{\varepsilon_m + n_s^2}\right)^{\frac{1}{2}}\right\} \qquad (3)$$

このように、入射光、金薄膜の誘電率 ε_m が一定であれば、θ は金属薄膜表面の媒体の屈折率 n_s のみに依存するため、θ の変化量(Δθ)を測定することで、金属薄膜表面の屈折率変化を観測することができる。また、励起された SP 波は金属表面に沿って伝播し、伝播距離は通常数 μm~数十 μm であり、エバネッセント波の染み出しの深さは約 200~300 nm 程度(光源波長が 770 nm の場合)と距離に応じて指数関数的に減衰する。すなわち、測定表面(金チップ表面)から 200~300 nm の空間範囲での屈折率変化を観測することになる。図 1-4 にこの入

射角度と反射率の特性(SPR 曲線)を示す。図 1-2-2 では表面プラズモン共鳴の生じる共鳴角度では反射光強度が極端に低下しているのがわかる．この反射光強度が極小となる角度は共鳴角(θr)と呼ばれ、反射光強度の変動が起きる入射角度の範囲が狭く急峻な特性をもっており，屈折率の変化に対して共鳴角は高い感度で反映することがわかる．表面プラズモン共鳴が注目される大きな理由としてはこの感度の高さがあり，界面における吸着反応や結合反応を高感度に検出する応用研究が盛んに行われている【14,15】。

SPR 測定装置の分析法は主に 2 つあり、1 つはプリズムをゴニオメーター上に固定することで、レーザー入射角を走査しながらの共鳴角測定(角度スキャン)がある。この分析により共鳴曲線がシグナルとして出力される。また、もう 1 つの方法は、共鳴角近傍でゴニオメーターを固定し、一定の測定角で反射光強度の変化を経時的に観測する時間変化測定がある。これにより、金チップ表面の屈折率変化を反射光強度のリアルタイム変化として観測することができる。

本研究ではこの 2D-SPR を用いて、種々の酸化還元酵素が触媒する反応をイメージング観測することで、複数の酵素基質を一度に検出する 2D-SPR マルチ酵素センサへの応用を目指した。

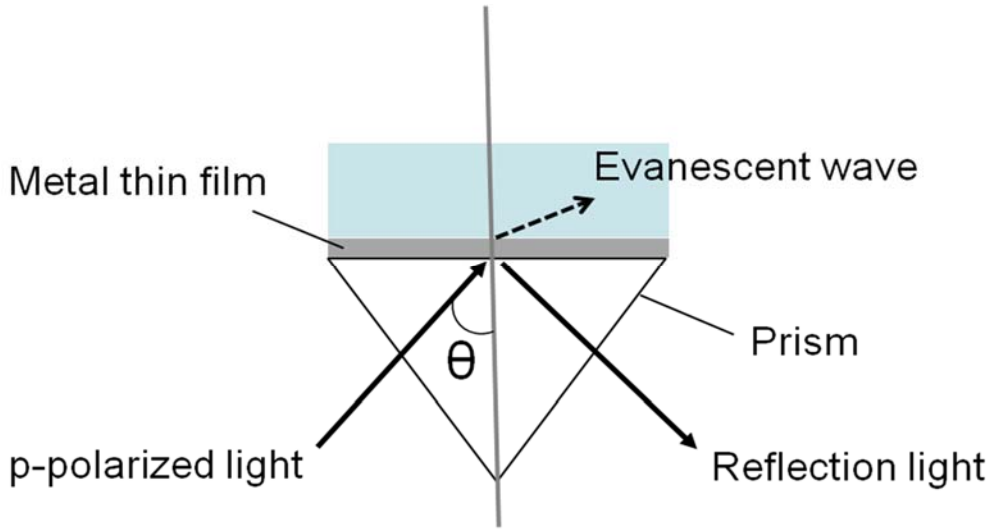


図 1-2-1　クレッチマン光学配置図

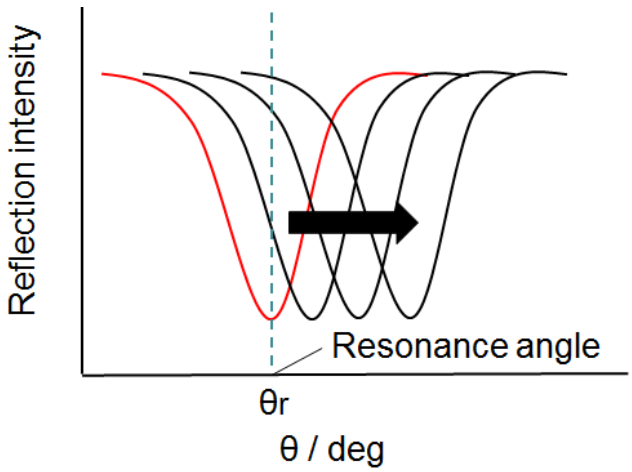


図 1-2-2　角度変化測定による共鳴曲線

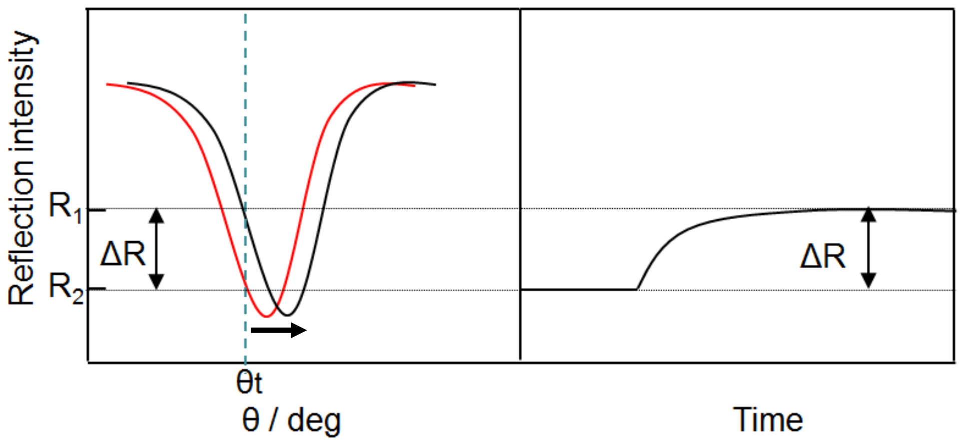


図 1-2-3　共鳴角のシフト及び反射光強度の経時変化測

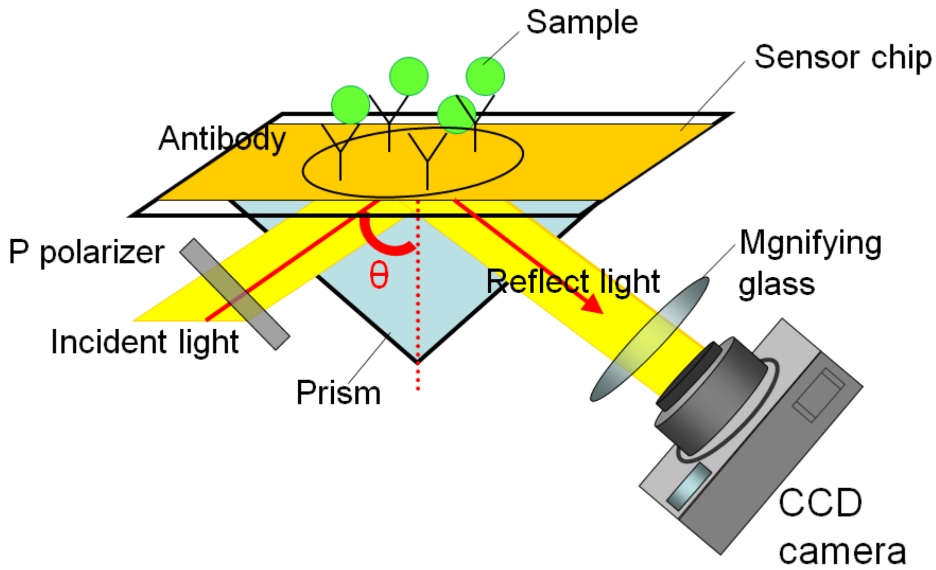


図 1-2-4　2次元表面プラズモン共鳴イメージャー(2D-SPRi)
の測定システム図

1-3 代謝異常症マーカー物質計測の意義

糖・アミノ酸は生体中の重要代謝物質であり、エネルギー生産などにおいても重要な役割を担っている。そのため、食品中における有用成分としての定量評価や、特定の疾患(先天性代謝異常症など)の早期診断への応用から、より簡便で迅速なマルチ計測法の開発が求められている。

例として、血中ブドウ糖濃度が上昇する糖尿病は糖代謝異常症として認知度が高い。その他にも、糖代謝異常症の 1 つにガラクトース血症がある。ガラクトース血症には欠損している酵素の種類の違いで 3 つの型があり、Ⅰ型、Ⅱ型は特に重篤で嘔吐、下痢、肝機能障害、知能障害などの症状がみられ、最悪死亡する場合もある。新生児マススクリーニングでは 8 mg/dL 以上が高ガラクトース血症と診断される【23-25】。現在、フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ガラクトース血症、ホモシスチン尿症などの先天性代謝異常症が新生児マススクリーニングにより、誕生直後に検査されている。

アミノの代謝異常症には非常に様々なものがあり、例えば、リシン代謝過程におけるリシン-ケトグルタル酸還元酵素の欠損により、リシン代謝異常症である高リシン血症が引き起こされる【26-28】。高リシン血症患者の血漿リシン濃度は約 300μM〜と健常人の約 2 倍から数十倍と様々である(正常値は約 250 μM)。高リシン血症の症状としては、精神発達障害、発育遅延、痙攣、痙性四肢麻痺などが挙げられる。その他にも、体内で水酸化反応によりフェニルアラニンをチロシンへと変える酵素であるフェニルアラニン水酸化酵素の遺伝子欠損、もしくは、補酵素のテトラヒドロビオプテリンの異常によりフェニルアラニンが代謝されず体内に過剰に蓄積し尿中に多量のフェニルケトン体が排泄される病気であるフェニルケトン尿症が良く知られている【29】。血中のフェニルアラニン濃度が、0.12 mM(正常値約 60 μM)を超えるとフェニルケトン尿症と診断される。フェニルケトン尿症ではフェニルアラニンやその代謝物であるフェニルケトンの蓄積により脳に障害が起こり、知能障害、脳波異常、痙攣といった症状が起こるため、早期の発見と治療が必要である。日本人では約 11 万人に 1 人の割合で発症がみられる。メープルシロップ尿症は分岐鎖アミノ酸と総称されるロイシン、イソロイシン、バリンの代謝異常により、汗、唾液、尿などがメープルシロップに似た匂いを発し、やはり脳の障害を引き起こす【30,31】。その原因は、分岐鎖アミノ酸の代謝経路にあるα-ケト酸脱水素酵素複合体の活性低下により分岐鎖アミノ酸だけでなくα-ケト酸が体内で過剰に蓄積することによる。メープルシロップ尿症は哺乳開始後、数日で嘔吐などがみられ、その後、痙攣、昏睡、時には死亡することもあり日本では約 60 万人に 1 人の割合で発症がみられる。その他にもヒスチジンの代謝異常によりヒスチジンが蓄積し

発症するヒスチジン血症、メチオニンとホモシステイン代謝異常によるホモシスチン尿症などがある【32-34】。

1-4　バイオマーカーの従来法による分析法

このように、糖・アミノ酸は種々の代謝異常疾患と深く関わっており、先天性代謝異常の患者にとっては日常の食生活の管理のために、その血中濃度を簡便、迅速に定量評価できるセンサの開発が求められている。

現在、こういった生体分子は、主に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって計測されている【35-37】。例えば、アミノ酸濃度の計測はニンヒドリン反応後の HPLC による分析が一般的である。HPLC のアミノ酸分析法には代表的な 2 つの検出方法がある。1 つ目は、プレカラム誘導体化法(プレラベル法)であり、HPLC に注入する前にアミノ酸を誘導体化し、その生成物をカラムで分離して分析する方法である。この方法の利点は、ポストカラム法と比較して反応系が小さいため、試薬の消費量が少なくて済む点、高価な試薬の使用が可能で、低いバックグラウンドと相俟って高感度が可能な点、カラムへの導入以前に誘導体化によりアミノ酸に疎水性の高い官能基を修飾できるため、逆相クロマトグラフィーによる分離が可能な点などが挙げられる。一方で、試料と誘導体化試薬とが直接混ざり合うことから、反応効率(収率)が試料マトリクス(共存成分や溶媒などの種類)の影響を受けやすいというのが欠点である。プレカラム誘導体化試薬には、o-フタルアルデヒド(OPA)、フルオロベンゾオキサジアゾール(BD-F)、フェニルイソチオシアネート(PITC)、フルオレサミン、ダンシルクロライドなどがある。2 つ目はポストカラム誘導体法(ポストカラム反応検出法)であり、先にカラムでアミノ酸を分離した後に、誘導体化試薬と混合しラベル化をして、検出器で検出するという方法である。この方法の利点は、反応が自動化できるため、定量性・再現性に優れる点、反応前に試料成分がカラムで分離されるため、反応効率が試料マトリクスの影響を受けにくく、広範囲の試料への応用が可能である点などが挙げられる。しかし、ポストカラム誘導体化法に比べて反応系が大きいため、試薬の消費量が多い。また、反応試薬が連続的に検出器に流れ込むため、未反応試薬が検出されてはならない。そのため、使用できる誘導体化試薬がニンヒドリンと o-フタルアルデヒドの 2 種類に限定される。現在でも、これらの方法を用いたアミノ酸の定量が使われており、アミノ酸分析法の主流と言える

HPLC を用いるアミノ酸分析法は高感度で、再現性、定量に優れている。一方でクロマトグラフィー用の大量の有機溶媒が必要、時間がかかる、コストがかかるという問題点がある。そのため、より微量のサンプル量でマーカー物質を迅速・簡便に計測できるセンサの開発が求められている。近年この HPLC に代わって、特定アミノ酸の簡便検査に用いられているのが、酵素を用いる吸光測定法もしくは蛍光測定法である。例えば、フェニルケトン尿症の新生児マス

スクリーニングはフェニルアラニン脱水素酵素とジアホラーゼを組み合わせた吸光測定法で行われている【38,39】。しかし、こういった酵素法の場合、複数の基質の同時検出は難しく、分析のマルチ化を行うのが非常に困難であった。

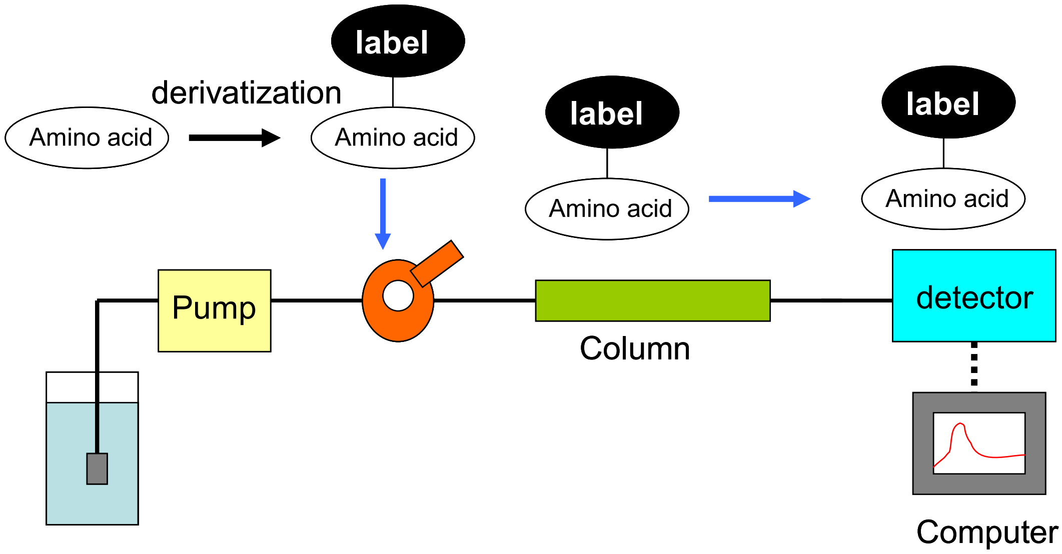


図 1-4-1 プレカラム誘導体化法(プレラベル法)を用いる
アミノ酸分析装置の原理図

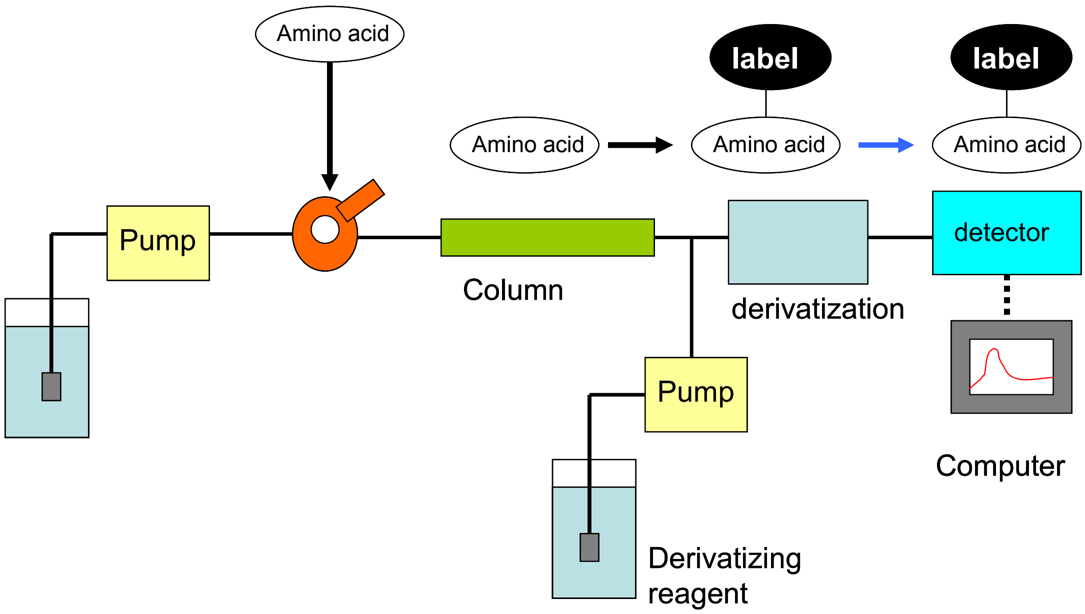


図 1-4-2 ポストカラム誘導体化法(ポストラベル法)を用いる
アミノ酸分析装置の原理図

1-5　マーカー物質のマルチ分析

最近では、血中における遊離アミノ酸は様々な代謝異常症のマーカー物質となるだけでなく、ある種の疾病に対し、その血中アミノ酸パターンの異常が特異的に引き起こされることが報告されている。(アミノインデックス)【40】すなわち、数種類のアミノ酸を同時に分析することにより、様々な疾患の診断に応用されている。例えば、血中の分岐鎖アミノ酸(Val、Leu、Ile)と芳香族アミノ酸(Phe、Tyr)を計測にすることによって肝硬変の診断に利用されている【41,42】。肝硬変はウイルスやアルコールなどの要因によって肝細胞が障害を受け、肝小葉の形が変化する疾患であり、肝硬変患者では、肝臓でのアミノ酸代謝が減少し、骨格筋でのアミノ酸代謝が亢進する。その結果、血漿中の BCAA 濃度が減少し、脳内の Phe、Tyr などの芳香族アミノ酸(AAA)濃度が増加する。そのため、健常者の血漿中の分岐鎖アミノ酸(BCAA) /芳香族アミノ酸(AAA) (フィッシャー比)は、3.5～4 を示すのに対し、肝硬変患者では 2.5 以下を示す

また、急性膵炎は、飲酒、暴飲暴食などさまざまな原因によって、膵臓自体の防御機構が破壊され、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エラスターゼなどの膵酵素が膵臓の細胞周囲の組織に漏れ出し膵臓の自己消化を起こし、膵実質の破壊、脂肪壊死、膵出血などをきたす疾患である。急性膵炎に発症した患者の血漿中では、BCAA 値の低下、アルギニン(Arg)、オルニチン(Orn)、シトルリン(Cit)などの尿素サイクル系のアミノ酸の値の低下、チロシン(Tyr)、グルタミン(Gln)値の低下、そしてフェニルアラニン(Phe)、グルタミン酸(Glu)値の上昇を示す。このうち、Phe/Tyr 比をとると、急性膵炎患者は約 1.7 の値をとり、回復した状態では 0.9 と正常範囲に戻る。また、Gln/Glu 比をとると、健常人は 5～10 の範囲の値を示すが､疾患患者では 1.8 と低い値を示すことがわかっている【43】。

また、糖尿病合併症には血中 Gly、Ser、Thr の濃度パターンの、動脈硬化(高血圧)には BCAA、Tyr、Phe、Glu の血中濃度パターンのモニタリングにより診断が可能となってきている【44-47】。その他にも、がんスクリーニング(図 1-3-1, 1-3-2)をはじめ様々な疾病に対する血中アミノ酸の変動パターンが報告されており、血中におけるバイオマーカーの同時計測の重要性が益々高まってきている【48-50】。

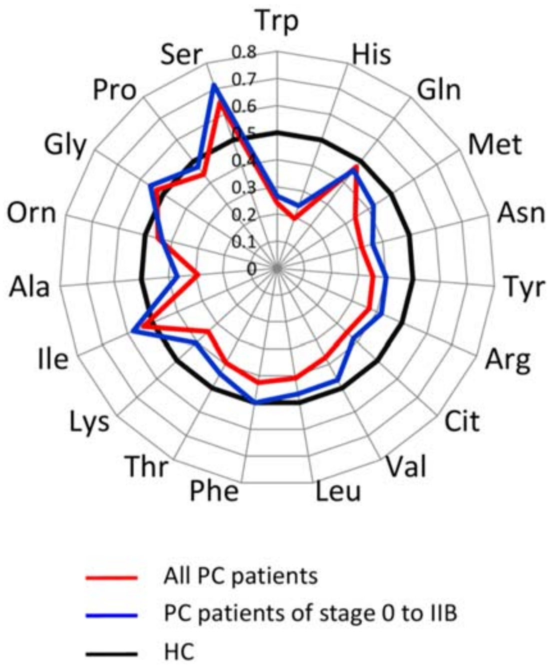


図 1-3-1 膵臓がん患者(PC)と健常者(HC)のアミノグラム【49】

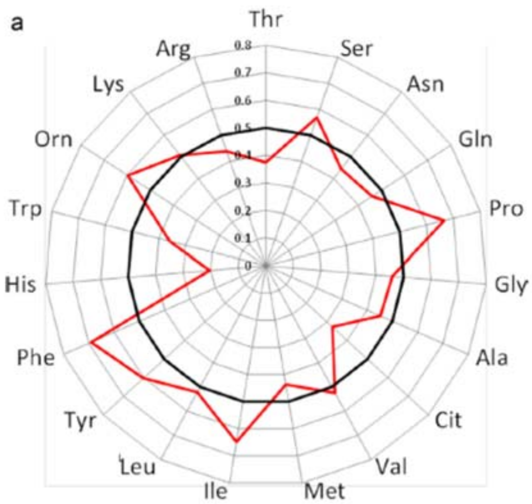
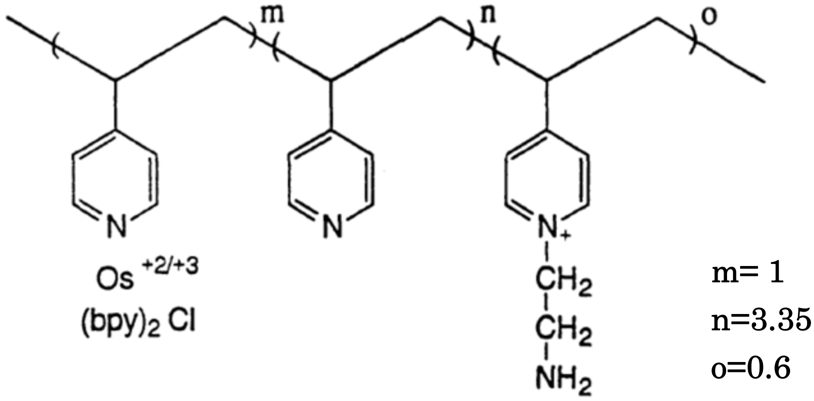


図 1-3-2 肺がん患者(赤線)と健常者(黒線)のアミノグラム【50】

1-6 本研究の目的

本論文では代謝異常症マーカー物質として知られる糖やアミノ酸の新規なマルチ計測法として、二次元 SPR を用いるマルチ酵素センサシステムの開発を目指した。具体的には、それ自体の酸化還元状態でその屈折率が変化する Os ポリマーと測定表面の局所屈折率変化を敏感にイメージング観測する 2D-SPRi を組み合わせることにより、オキシダーゼやデヒドロゲナーゼが触媒する酵素反応をイメージング観察するセンサの設計・開発を行った。図 1-6-1 にオスミウム(Os)ポリマーの構造式を示す。ビニルピリジンを高分子化した骨格をもっており、側鎖にビピリジン配位したオスミウム(+2/+3)をもつ。分子量はおよそ 120,000 と見積もられる【16】。



Os (bpy)$_2$ Cl

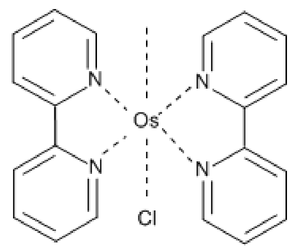


図 1-6-1 オスミウム(Os)ポリマーの構造式【16】

本論文では以下の章立で、構成される。

第1章　序章

第 2 章
「オキシダーゼを用いる 2D-SPRi デュアルセンシングシステムの開発」

第 3 章
「PQQ 依存型フルクトース脱水素酵素(PQQ-FDH)を用いるエクステンド型
SPR 酵素センサシステムの開発」

第 4 章
「電気化学表面プラズモン共鳴イメージャー(EC-SPRi)を用いる
オキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時観測システムの開発」

第 5 章　結章で、本研究の成果をまとめた。

第 2 章

二次元 SPR を用いるデュアルオキシダーゼセンシングシステムの開発

2-1　本章の目的と概要

私は修士論文研究において、酸化還元高分子であるオスミウムポリマーとオキシダーゼを SPR 金チップ上に同時固定化し、その酸化還元酵素反応を SPRi 観測する酵素センサの開発を行ってきた。例えば、リシンオキシダーゼ(LysOx)を用いるリシンセンサ、グルタミン酸オキシダーゼ(GlutOx)を用いるグルタミン酸センサ、ガラクトースオキシダーゼ(GalOx)を用いるガラクトースセンサなどを開発してきた。また、これら酵素スポットを SPR 金チップ上に一緒に並べて、測定基質の同時計測を試みたが、酵素スポット間で金薄膜を介した電子移動によると考えられるクロストークによる妨害が観測された。そこで本章では、LysOx スポットと GalOx スポットを 2 分割した金チップ上にそれぞれ固定化し、代謝異常症マーカー物質であるリシンとガラクトースのデュアルセンシングシステムの開発を行うことにした。

2-2　実験試薬及び測定装置

表 2-1 実験試薬

試薬名称	グレード	販売元
Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	特級	Wako
Disodium hydrogenphosphate 12-Water	特級	Wako
4-aminoantipyrine	特級	Wako
Phenol	特級	Wako
Peroxidase from Horseradish	–	TOYOBO ENZYMES
L(+)-Lysine monohydrochloride	特級	Wako
L-Glutamic acid	特級	Wako
L-Phenylalanine	特級	Wako
L(+)-Arginine	特級	Wako
D-Galactose	特級	Wako
D(+)-Glucose	特級	Wako
D(-)-Fructose	特級	Wako
Lactose monohydrate	特級	Wako
Glutaraldehyde (GA)	50%	TCI
β-Nicotinamide-adenine dinucleotide reduced form (NADH)	≧95%	ORIENTAL YEAST CO.
Os polymer	–	BAS Inc.

試薬名称	グレード	販売元
L-Lysine Oxidase (from *Trichoderma viride*)	–	SIGMA
Galactose Oxidase (from *Dactyliumdendroides*)	–	SIGMA

表 2-2 実験器具及び機器

器具及び機器名
金薄膜チップ(BAS Inc.)
flexiPERM^R (11 × 7 × 10 mm) Greiner Bio One (Germany)
SPR imager 04A, NTT Advanced Technology [NTT–AT], Japan)

2 次元 SPR イメージャー(NTT-AT CO.)

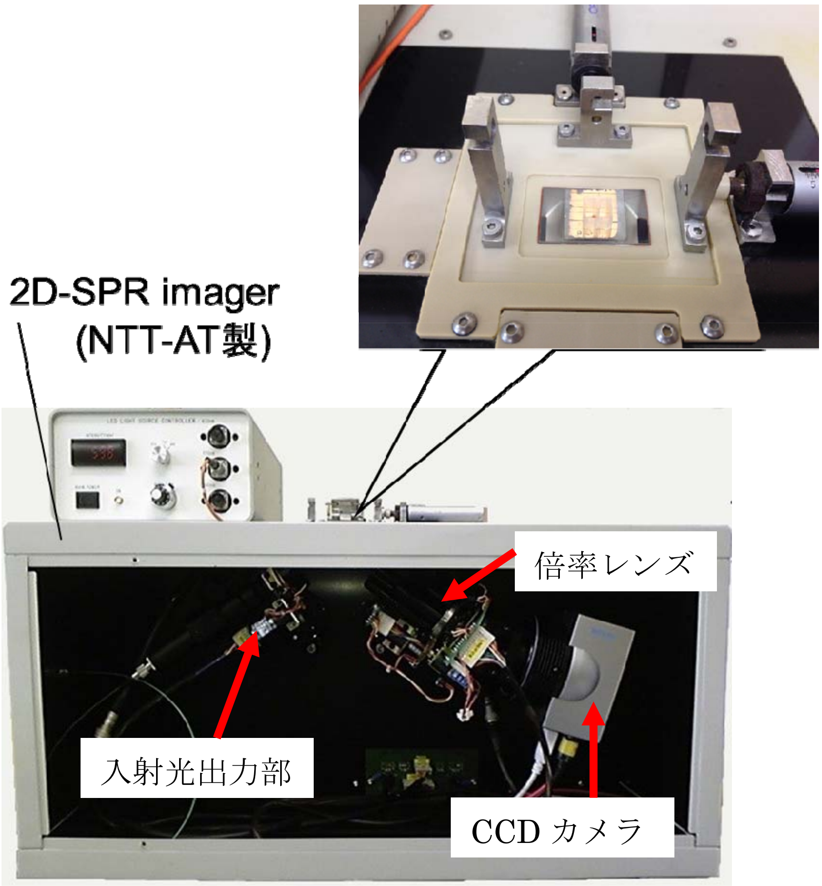


図 2-1 2D-SPRi の外観及び内部

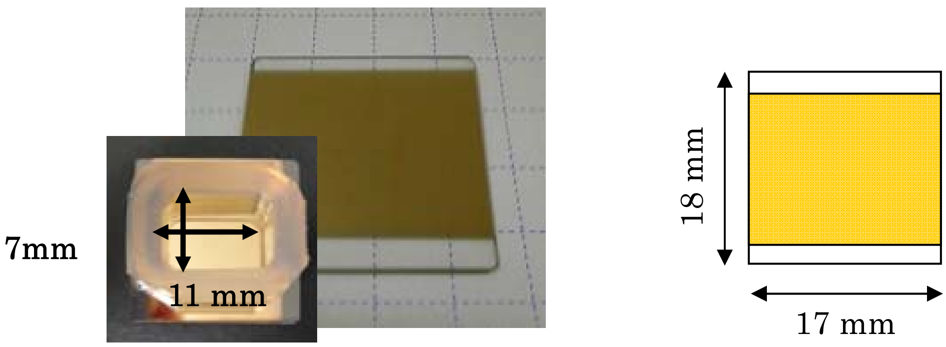


図 2-2 2D-SPRi 測定金チップ

表 2-1 2D-SPRi の性能

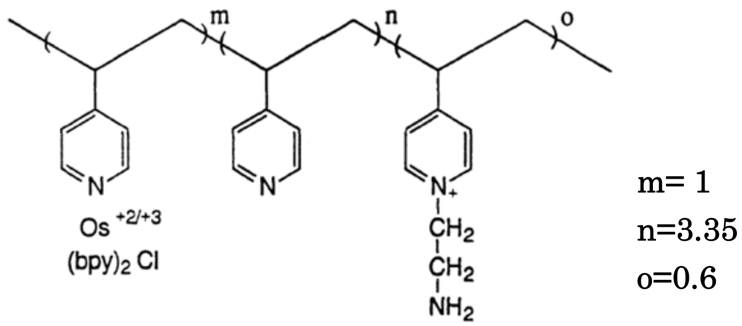
構成		機能
光源	光源	LED 光源(波長 670 nm, 770 nm, 870 nm)
	光源導入	光ファイバーケーブル
ゴニオメーター	軸数	2 軸(入射光軸, 検出軸)
	駆動範囲	49-57°
	駆動分解能	0.0032°
	鼓動速度	2 モード(HIGH: 500 pps, LOW: 66pps)
偏光子	偏光	P-偏光, S-偏光
カメラ	CCD カメラ	モノクロ冷却 1/2” CCD
	冷却	空冷方式
	温度設定範囲	-5~+10℃(分解能 1℃)
	露光時間設定範囲	0.001-20 秒(分解能:0.001)
	倍率	×1, ×2, ×4, ×7 倍
	画像取込範囲	640×480(FULL), 256×256(HALF)
測定モード		2 モード(角度変化測定, 時間変化測定)
	角度変化測定	49-57°
		0.1-2°
	時間変化測定	1-3600 秒
		0.5-600 秒
	画像取込枚数	Max 600 フレーム

2-3　測定原理

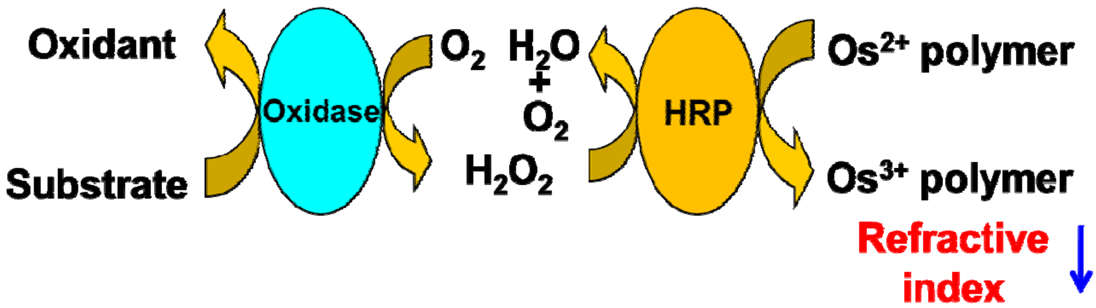
図 2-3 にオキシダーゼとオスミウムポリマーを組み合わせた酵素センサの検出原理を示す。酵素基質はまず、酵素スポット上層にあるオキシダーゼにより酸化され、同時に酵素中の補酵素を介して酸素分子に電子がわたり過酸化水素が生成される。この過酸化水素はペルオキシダーゼの触媒反応によりスポット下層にあるポリマー錯体中のオスミウムを(Ⅱ)から(Ⅲ)へ酸化する。(図 2-2b)このときオスミウム錯体ポリマーの屈折率が低下することにより、SPRi シグナルとしての反射光強度の減少として観測される。

また、図 2-3c にリシンオキシダーゼ反応とガラクトースオキシダーゼ反応の同時検出システムの測定原理を示す。2 分割した SPR 金チップ上の各分割領域にそれぞれの酵素スポットを固定化することにより、両酵素スポット間での電子移動反応の遮断を図った。本センサでは、リシンオキシダーゼスポットでリシンの計測を、ガラクトースオキシダーゼスポットでガラクトースの計測を同時に行えるものと期待した。

a)



b)



c)

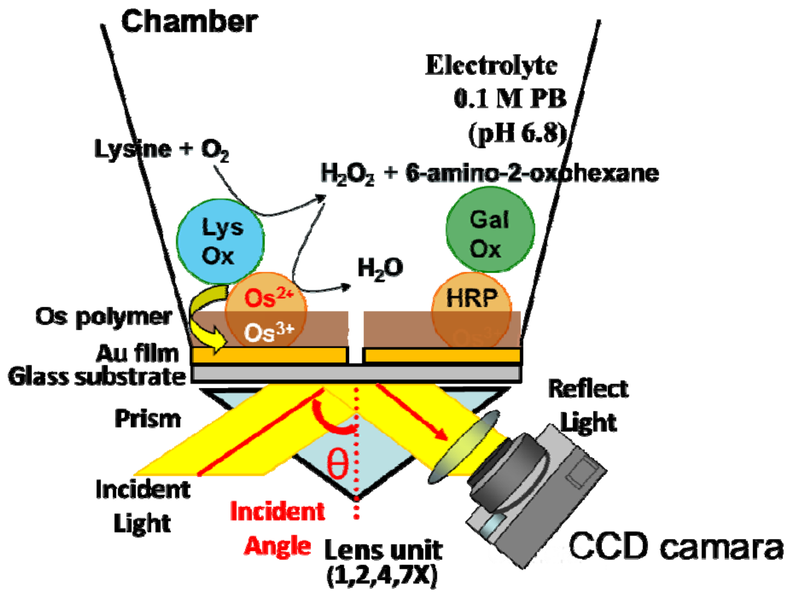


図 2-3SPRi オキシダーゼとオスミウムポリマーを組み合わせた SPRi センサの検出原理

a) オスミウム(Os)ポリマーの構造式

b) オキシダーゼが触媒するオスミウムポリマーの酸化還元反応

c) SPRi によるリシンオキシダーゼ反応とガラクトースオキシダーゼ反応の同時観測システム

2-4　実験方法

2-4-1　デュアルセンシングチップの作製法

測定用センサチップの作製は以下の手順で行った。

2D-SPR 用金チップの金薄膜をカッターナイフで、切断し、2 つの領域に分割

↓

それぞれの領域に HRP-Os ポリマーを滴下

↓ 4℃で乾燥固定

LysOx (from *Trichoderma viride*) / 0.1 M PB(pH 6.8)
または
GalOx (from *Dactyliumdendroides*) / 0.1 M PB(pH 6.8)
+
1% Glutaraldehyde / 0.1 MPB(pH 6.8)

↓

各酵素溶液と GA 溶液を 1:1 で混合し、Os スポットへ滴下

↓ 4℃で乾燥固定

酵素チップにフレキシパームを接着後測定へ

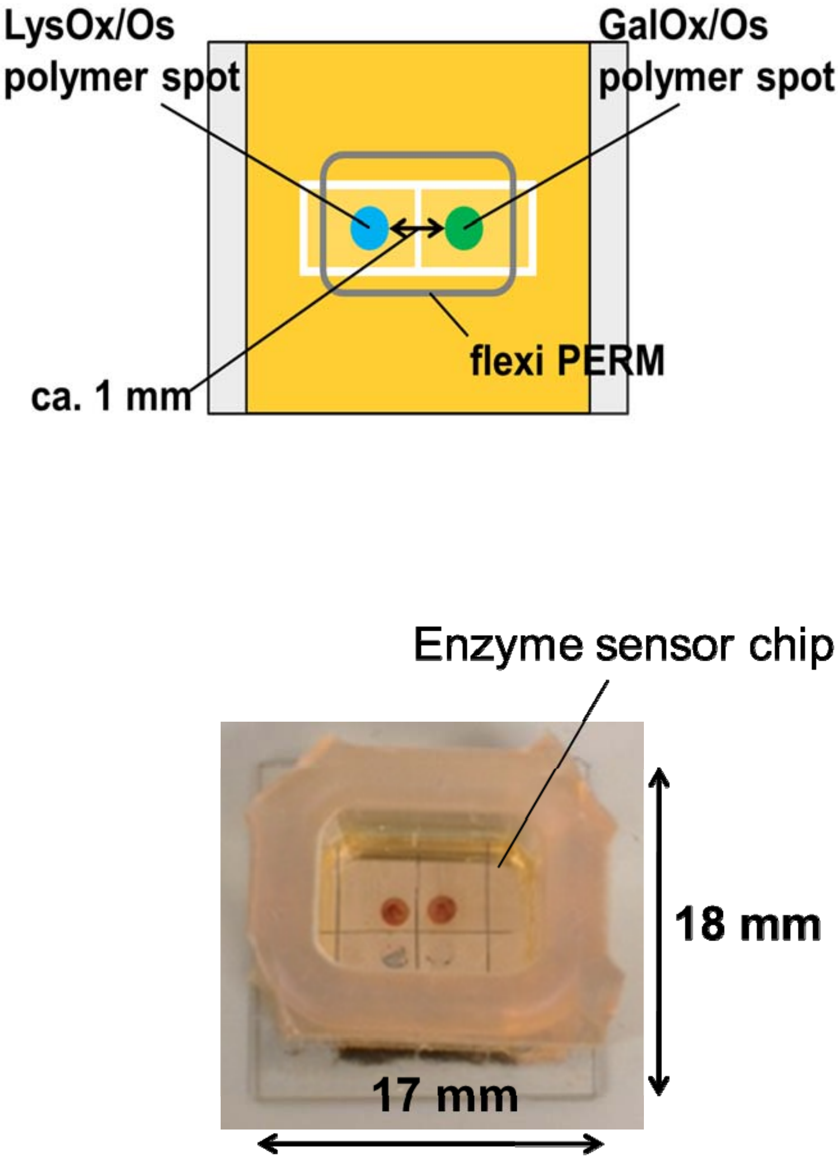


図 2-4 デュアルセンシングチップ

2-4-2　測定操作

SPRi 観測実験は以下の手順で行った。

測定セルに 0.1 M PB (pH 6.8) を添加し、角度変化測定を行い、共鳴曲線を観測した。

固定角で、各スポットの反射光強度の時間変化を観測した。
(測定開始から 1 分のところで、種々のサンプル溶液を滴下した。)

測定後、各酵素スポットの酸化型 Os ポリマーを NADH 溶液により再還元した後、繰り返し測定を行った。

2-5　結果及び考察

図 2-5-1 に角度変化測定における LysOx/Os ポリマースポット、Gal/Os ポリマースポット及び金領域の SPR カーブを示す。共鳴角(θr)はそれぞれ 55.6°, 56.4°, 51.6° であった。共鳴角がより高いということは、その領域における屈折率がより高いことを表している。すなわち、酵素/Os ポリマースポットの屈折率が裸の金領域のものより高いことから、各酵素スポットは確かに固定化されたことが確認された。また、観測結果から GalOx/Os ポリマースポットの θr は LysOx/Os ポリマースポットのものよりも高いことが分かった。これは GalOx と GA との架橋密度が LysOx と GA とのそれよりも高く、より嵩高い酵素の塊がポリマー層へ浸潤していることが予想される。

角度変化測定の結果から、固定角度 55.5° で反射光強度(I_{ref})の経時変化測定を行った。(図 2-5-2)酵素反応後の酸化型 Os ポリマーは還元型よりも屈折率が低下することがわかっており、反応後の θr はネガティブシフトする。【17,18】従って、測定角(θm)55.5° で観測を行った場合、それぞれの酵素基質の添加時には、LysOx/Os ポリマースポットでは I_{ref} の増加が、GalOx/Os ポリマースポットでは I_{ref} の減少が観測されることが予想される。

図 2-5-3 は LysOx/Os ポリマースポットと GalOx/Os ポリマースポットにおける I_{ref} 変化および SPR イメージを示す。リシンを添加した際には、LysOx/Os ポリマースポットにおいて明らかな I_{ref} の増加が観測され、一方で GalOx/Os ポリマースポットでは有意な変化は認められなかった。また、ガラクトースを添加した際には、予期した通り GalOx/Os ポリマースポットでのみ I_{ref} の減少が観測された。

種々の濃度のリシンおよび一定濃度のガラクトース(1 mM)を含む混合サンプルにおけるリシン計測の結果を図 2-5-4 に示す。LysOx/Os ポリマースポットでは添加したリシンの濃度に従ってその I_{ref} が増加した。一方で、GalOx/Os ポリマースポットでの I_{ref} の減少はリシン濃度の増大に関わらずほぼ一定の変化が観測された。また、種々の濃度のガラクトースおよび一定濃度のリシン(100 μM)を含む混合サンプル計測でも同様に、GalOx/Os ポリマースポットではガラクトース濃度に応じた I_{ref} の減少が観測され、LysOx/Os ポリマースポットではほぼ一定の I_{ref} 増加が観測された。

図 2-5-5 は各酵素スポットにおけるリシンおよびガラクトースに対する反応速度の基質濃度依存性を示す。本センサでは LysOx/Os ポリマースポットにおいて 20-200 μM のリシンがガラクトースの影響を受けずに計測することができた。同様に GalOx/Os ポリマースポットでは 50-1000 μM の濃度範囲においてリシンの影響を受けずに計測することができた。デュアルセンシングにおける検量

線はシングルで計測した場合とほぼ同様の結果になった。LysOx/Os ポリマースポットおよび GalOx/Os ポリマースポットにおける 1 つのセンサチップでのレスポンスの平均値および SD 値はそれぞれ 1.26 ±0.141 %/min, 4.55 ±0.392 %/min であった。(LysOx/Os ポリマースポットにおける 100 μM リシン計測および GalOx/Os ポリマースポットにおける 1 mM ガラクトース計測による結果, n=7)また、CV 値はそれぞれ 11.2 %と 8.6%であった。これらの結果から、本デュアルセンシングシステムはこれら 2 つの酵素基質をそれぞれの酵素スポットでクロストークの影響を受けずに同時計測することが可能であるということが示された。図 2-5-6 に他のアミノ酸および糖に対する基質選択性の検討結果を示す。(計測は混合サンプルではなく、単独のアミノ酸および糖に対して行った。）予期した通り、各酵素スポットでは、他のアミノ酸や糖に比べそれぞれリシンとガラクトースに対して高い選択応答性を示した。

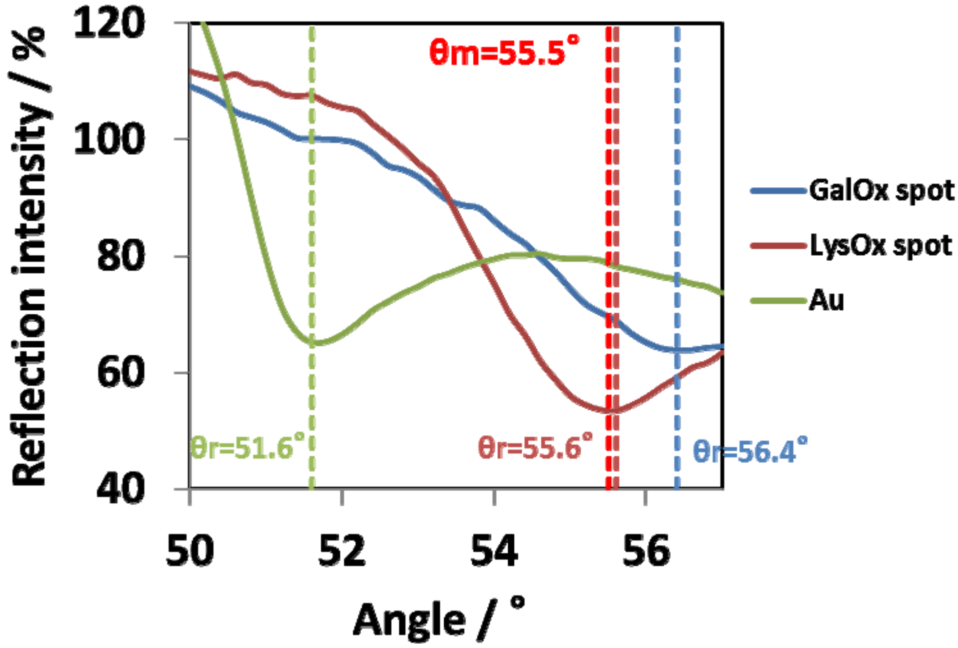


図　2-5-1　LysOx/Os-HRP ポリマースポット，GalOx/Os-HRP ポリマースポットおよび裸の金領域における SPR 曲線

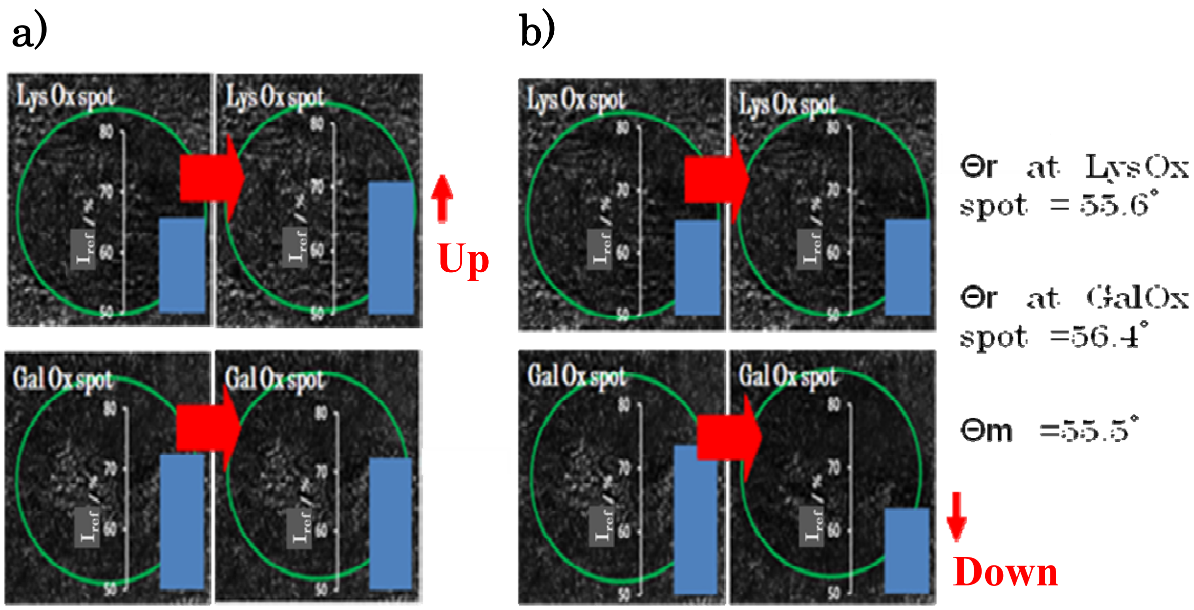


図 2-5-2 各酵素スポットにおける a) 1 mM リシンおよび b) 1 mM ガラクトースの添加前後での SPR イメージおよびその時の反射光強度(I_{ref})

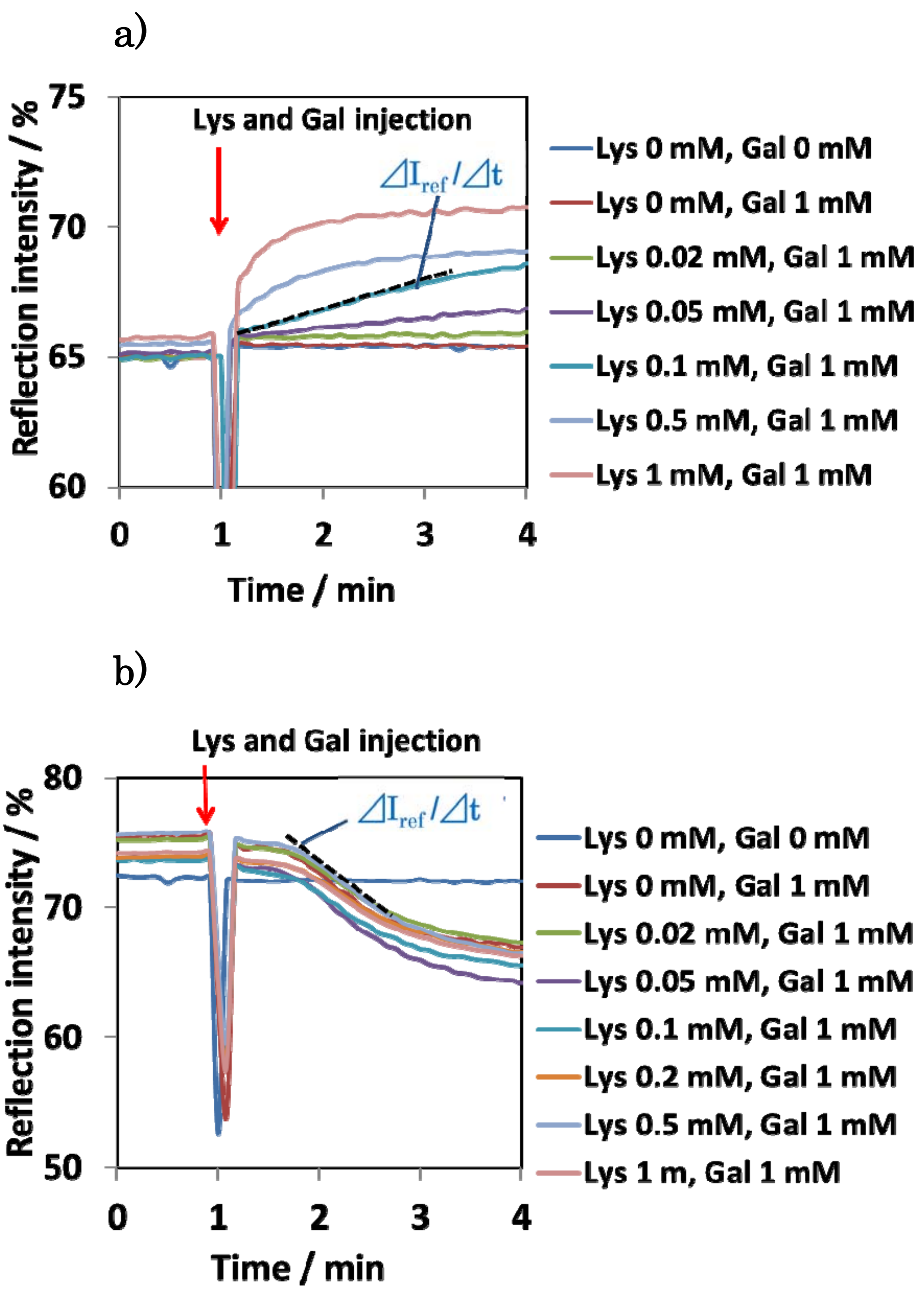
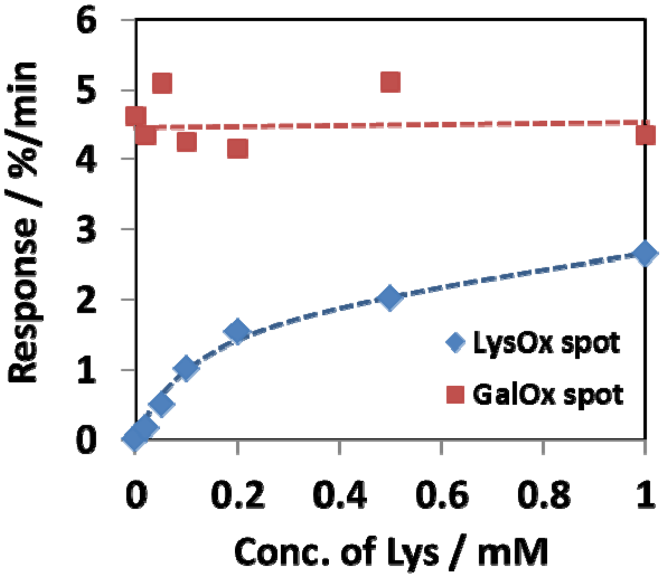


図 2-5-3 種々の濃度のリシンと一定濃度のガラクトースを含む混合サンプルにおける反射光強度(I_{ref})の経時変化測定 (θm=55.5°)

a) LysOx/Os-HRP ポリマースポットおよび

b) GalOx/Os-HRP ポリマースポット

a)



b)

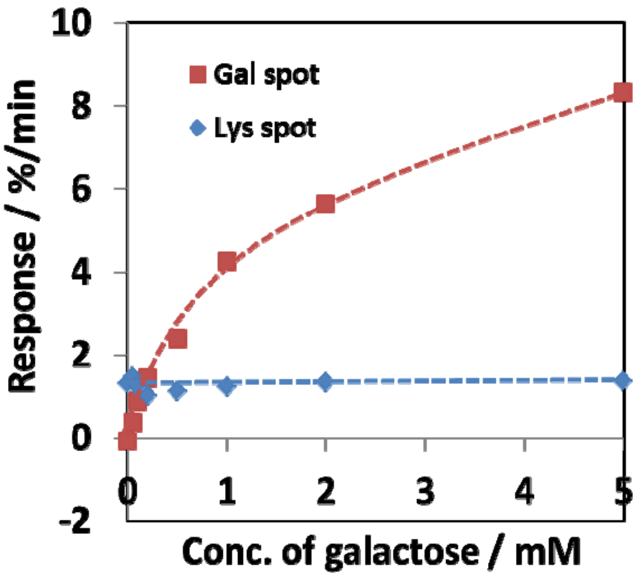


図 2-5-4 混合サンプル溶液におけるリシンとガラクトースの同時定量

a) 種々の濃度のリシンおよび一定濃度のガラクトース(1 mM)

b) 種々の濃度のガラクトースおよび一定濃度のリシン(100 μM)

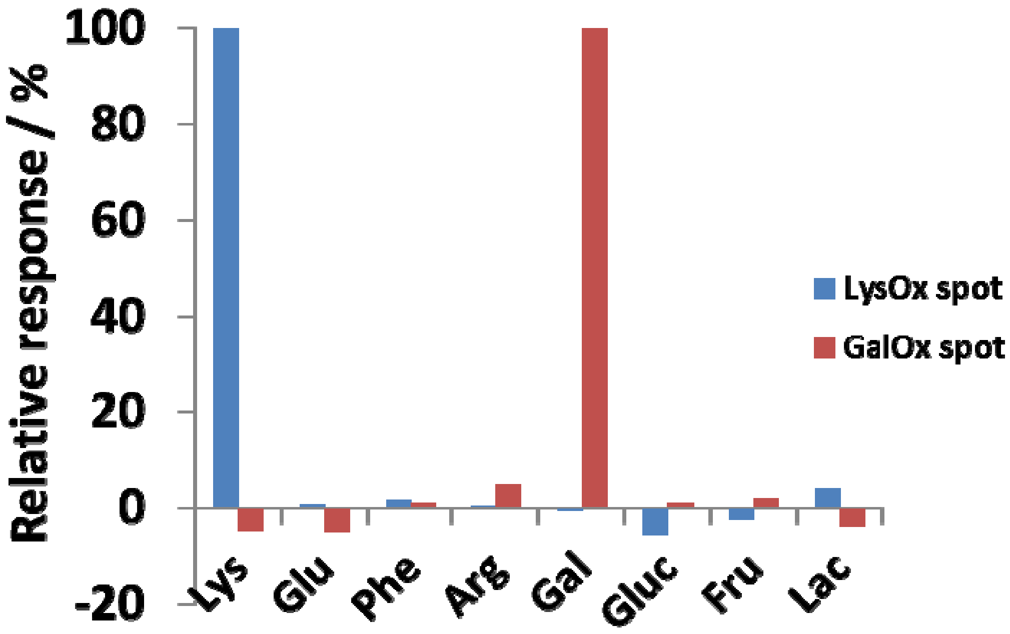


図 2-5-5 本センサのアミノ酸および糖に対する
基質選択応答性の検討

2-6　結論

本章では 2D-SPRi によるオキシダーゼ反応のデュアルセンシングシステムの開発を行い、その特性を評価した。酸化酵素はそれぞれ代謝異常症マーカー物質であるリシンとガラクトースを基質とするリシンオキシダーゼとガラクトースオキシダーゼを選んだ。本センサでは 2 分割した金チップ上にそれぞれ LysOx/Os ポリマースポットと GalOx/Os ポリマースポットを固定化することにより、クロストークによる影響を受けずリシンとガラクトースを検出することができた。リシンとガラクトースは酵素スポット特異的にそれぞれ 20-200 µM, 50-1000 µM の濃度範囲で検量が可能であった。また、本センサは簡便で迅速な計測が期待できる。(測定開始から 2 分以内に計測し、前処理を要しない)
今後は他の分析法(HPLC など)で計測された濃度既知の擬似血漿サンプルでの計測を検証する予定である。

以上の結果から、私が提案する SPRi を用いるデュアルセンシングシステムは医療スクリーニングなどを目指した種々のオキシダーゼ基質のマルチ計測に応用可能と期待できる。

第 3 章

PQQ 依存型フルクトース脱水素酵素(PQQ-FDH)を用いるエクステンド型 SPR 酵素センサシステムの開発

3-1　本章の目的と概要

　これまで、様々な代謝異常症マーカー物質を迅速かつ簡便に計測するために、オキシダーゼ反応による Os ポリマーの酸化還元状態の変化を 2 次元表面プラズモン共鳴（2D-SPR）センサを用いてイメージングすることにより、マルチ酵素センサの開発を行ってきた。

　本章では、基質認識パートと観測パートが離れているエクステンド型 SPR 酵素センサの開発を目的に、電極との直接電子移動が確認されている *Gluconobacter sp.*由来のフルクトース脱水素酵素(PQQ-FDH)【51,52】と Os ポリマーを金チップ上に隣り合わせに固定化後、2 ウェル形のシリコン樹脂を乗せて分断し、FDH 固定化チャンバー側に基質を添加した際の金基板を介する隣のチャンバーの Os ポリマースポットの還元反応を 2D- SPR 観測することで、フルクトースの検出・定量を試みた。

3-2　実験試薬

表 3-1 実験試薬

試薬名称	グレード	販売元
Citric acid monohydrate	特級	Wako
Disodium hydrogenphosphate 12-Water	特級	Wako
Potassium ferricyanide	特級	Wako
Iron(III) sulfate hydrate	特級	Wako
Hydrogen peroxide solution	30 wt. %	Wako
D(-)-Fructose	特級	Wako
D(+)-Glucose	特級	Wako
D-Galactose	特級	Wako
Lactose monohydrate	特級	Wako
Saccharose	特級	Wako
Glutaraldehyde (GA)	50%	TCI
Os polymer	–	BAS Inc.
D-Fructose dehydrogenase (from *Gluconobacter sp.*)	–	TOYOBO ENZYMES

3-3　測定原理

図 3-1-1 に PQQ-FDH を用いるエクステンド型 SPR 酵素センサの検出原理を示す。酵素基質であるフルクトースを基質認識パートに添加すると、FDH により酸化される。同時に、FDH の内在性補酵素である PQQ が電子を受け取り $PQQH_2$ へ還元される。次いで、その受け取った電子が SPR センサチップの金薄膜を介して隣の観測パートに固定化されているオスミウムポリマーへ渡り、その結果錯体ポリマー中のオスミウムが(Ⅲ)から(Ⅱ)へ還元される。このときオスミウム錯体ポリマーの屈折率が増加することにより、共鳴角より少しマイナスの測定角では反射光強度を SPRi シグナルとして観測すると、その増加が観測できることになる。

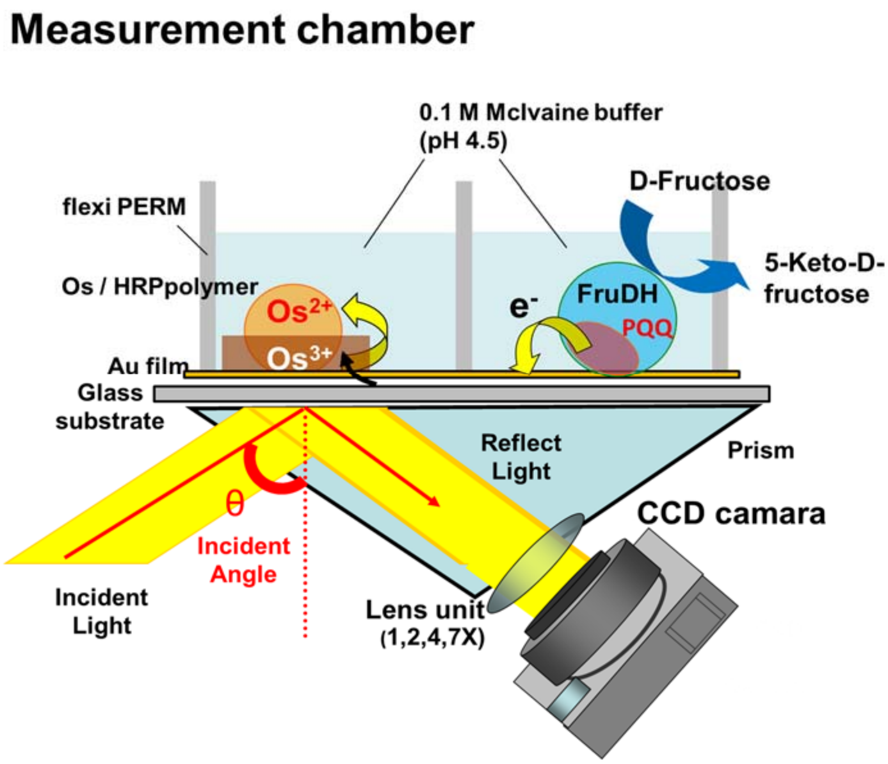


図 3-1-1 PQQ-FDH を用いるエクステンド型
酵素センサの計測原理

3-4　実験方法

3-4-1　エクステンド型センシングチップの作製法

測定用センサチップの作製は以下の手順で行った。

2D-SPR 用金チップの金薄膜をカッターナイフで、
アイランド状に分画

↓

HRP-Os ポリマー及び
FDH (from *Gluconobacter sp.*)を隣り合うように滴下
(スポット間隔は約 1 mm)

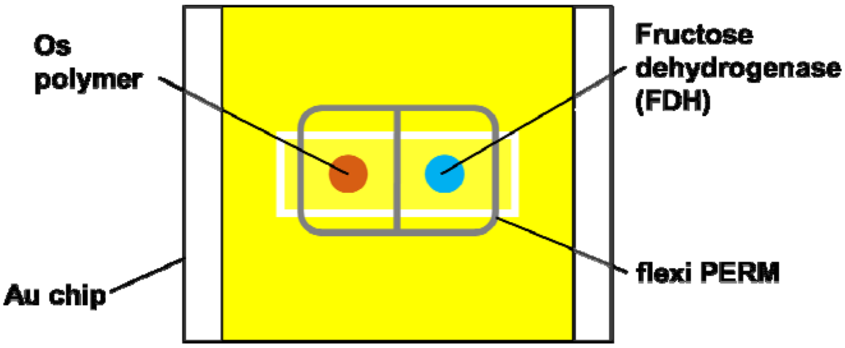
↓ 4℃で乾燥固定

0.5% GA 溶液と BSA 溶液の混合液をそれぞれのスポット上へ滴下

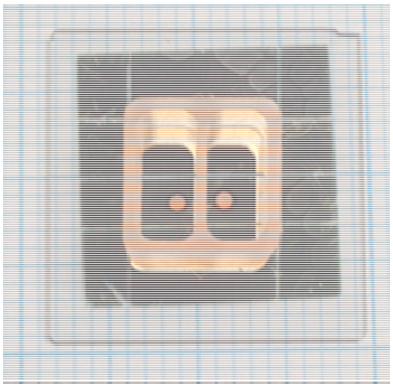
↓ 4℃で乾燥固定

2 ウェル型のフレキシパームを両領域が分断される
ように取り付け、測定を行う

a)



b)



c)

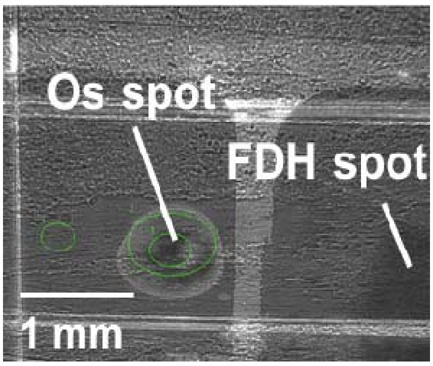


図 3-2-1 エクステンド型酵素センサチップ

a) センサチップ図

b) センサチップ写真

c) センサチップ上の観測スポットと反応スポットの 2D-SPR イメージ

3-4-2　測定操作

SPRi 観測実験は以下の手順で行った。

観測パートに H_2O_2 溶液を添加し、Os ポリマーを酸化型へ

↓

各チャンバーを 0.1 M McIvaine 緩衝液 (pH 4.5)で満たし角度変化測定で共鳴曲線を観測した。

↓

固定角で、観測パートの Os ポリマースポットの反射光強度の時間変化を観測した。
(測定開始から 1 分のところで､種々のサンプル溶液を滴下した。)

↓

測定後、還元型 Os ポリマーを再度 H_2O_2 溶液で処理し、再酸化した後、繰り返し測定を行った。

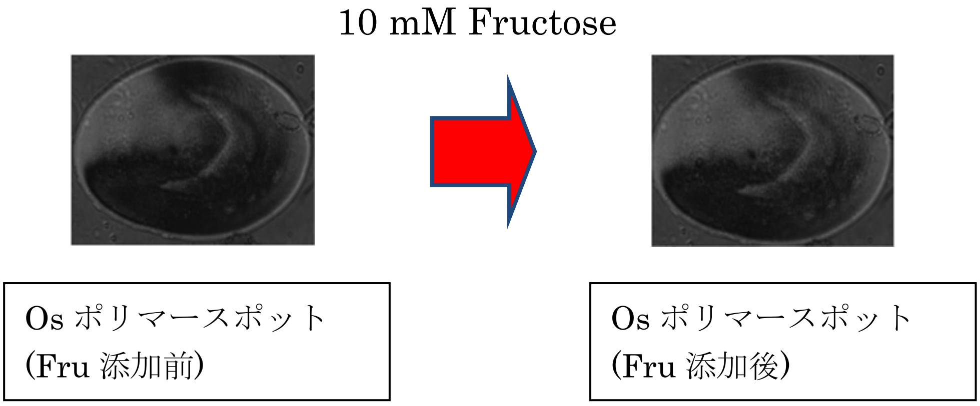
3-5　結果及び考察

図 3-5-1 に観測パートにおける Os ポリマースポットの 2D-SPR イメージ及び角度変化測定による共鳴曲線を示す。H_2O_2 処理後の Os(Ⅲ)では共鳴角(θ_r)は 54.2° であった。フルクトース溶液（終濃度 10 mM）をフルクトース脱水素酵素(FDH)が固定化された基質認識パートへ添加すると、観測パートにおける Os ポリマースポットが還元され、その共鳴角は 53.0° へポジティブシフトした。これは我々が予期した通り、基質認識パートにおける FDH が添加したフルクトースと酵素反応を行い、その過程で還元された FDH の補酵素 PQQ がセンサチップの金薄膜を介して隣の観測パートの Os ポリマーと電子移動反応を起こしたと推察される。

図 3-5-2 は基質認識パートに種々の濃度のフルクトースサンプル溶液を添加した際の Os ポリマーの反射光強度(I_{ref})の経時変化を示したものである。測定角 θ_m は 51.5° である。添加したサンプル溶液のフルクトース濃度に応じて、Os ポリマーの還元反応速度の上昇が観測された。フルクトース溶液添加後の反射光強度の傾きを添加濃度に対してプロットした検量線を図 3-5-3 に示す。本センサは 500-5000 μM の濃度範囲において良い直線性を示した。(R^2=0.984)
また、FDH の酵素基質以外の糖に対する応答性の検討を行ったところ（図 3-5-2）、フルクトースに対して高い選択応答性を示した。しかし、比色法による結果に比べ、やや選択性が下がったことから、GA による架橋反応により酵素の基質認識ポケットが変性を受けたことが考えられる。

また、我々は Os ポリマースポット間における電子移動反応が、そのスポット間距離に依存して減衰するということを既に確認している。(スポット間距離が 8 mm 以上ではその電子移動反応が観測されなかった。）これは、Os ポリマースポット間の距離が離れるに従って、金薄膜を流れる電子に対してより高い抵抗がかかったためであると考察される。今後の課題として、この金薄膜を介するスポット間電子移動距離の延長を図り、基質認識パートと観測パートのより離れた測定系を構築することが挙げられる。

a)



b)

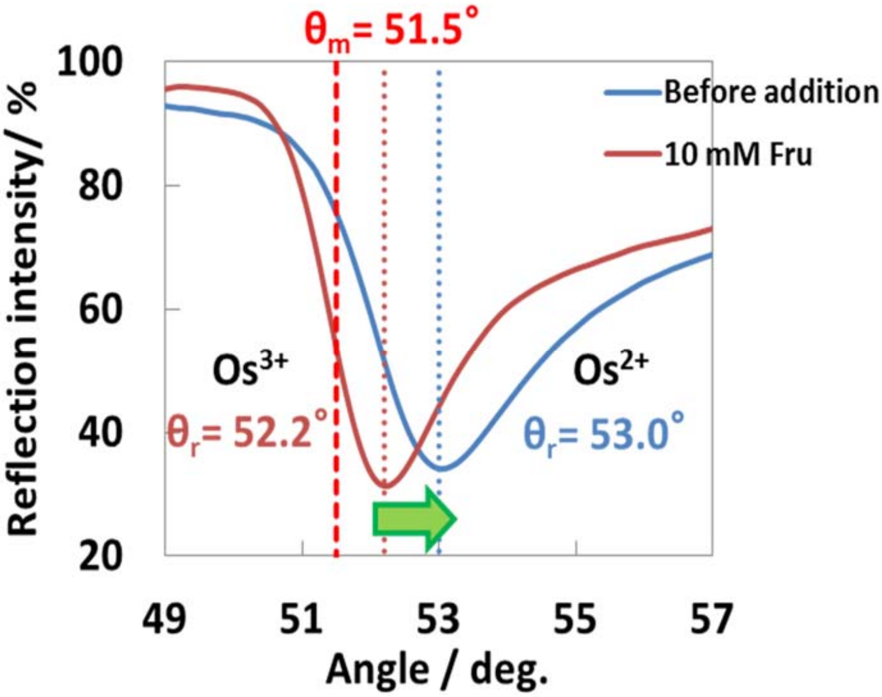


図 3-5-1 観測パートにおける Os ポリマースポットの
フルクトース（10 mM）添加前後の a) 2D-SPR イメージ
およびそのときの b) 共鳴曲線

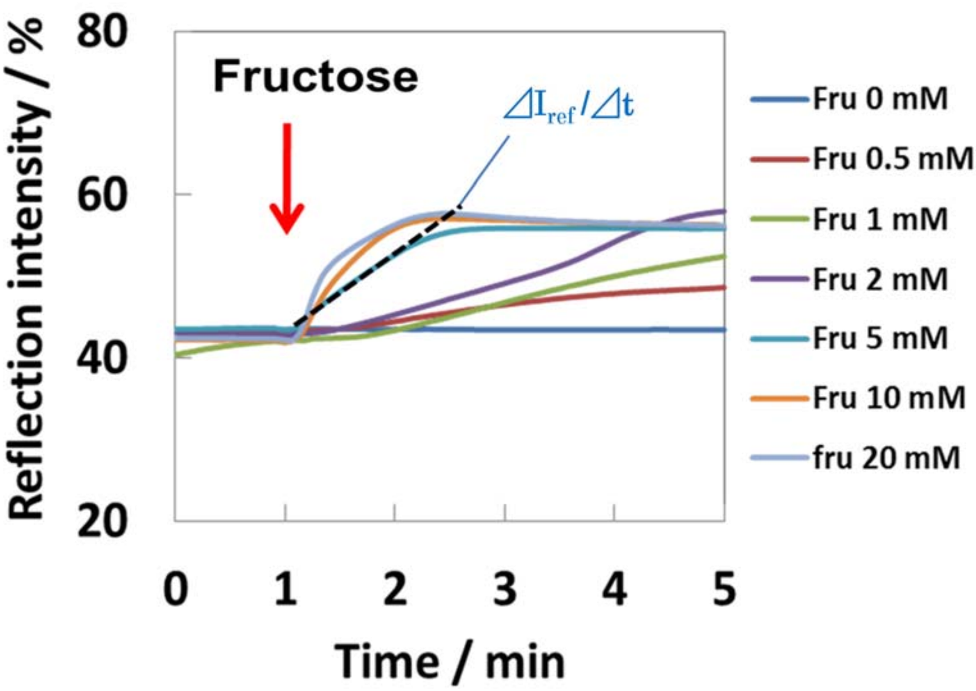


図 3-5-2 種々の濃度のフルクトースを添加した際の
Os ポリマースポットの反射光強度(I_{ref})の継時変化
(θ_m=51.5 °)

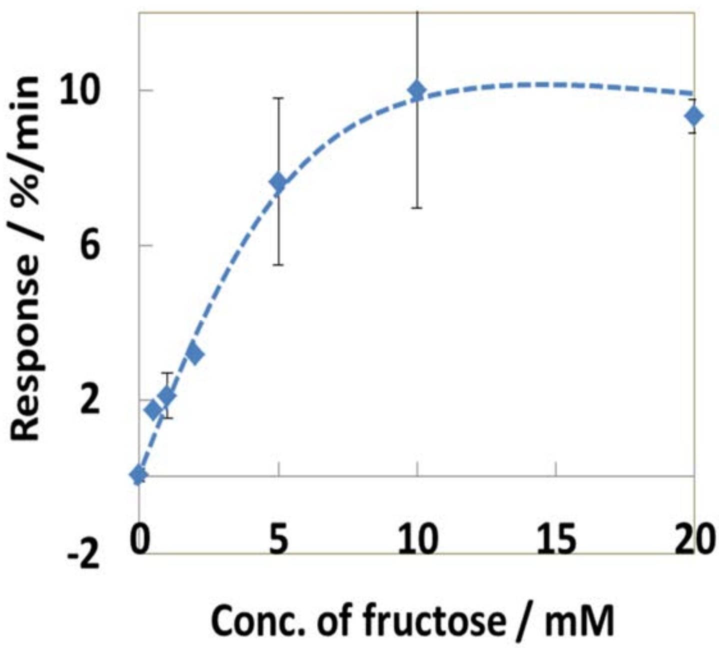


図 3-5-3 FDH/Os ポリマースポットの反射光強度増加速度のフルクトース濃度依存性(フルクトース添加後の I_{ref} の傾きを添加濃度に対してプロットすることで作成した, θ_m=51.5 °, n=2)

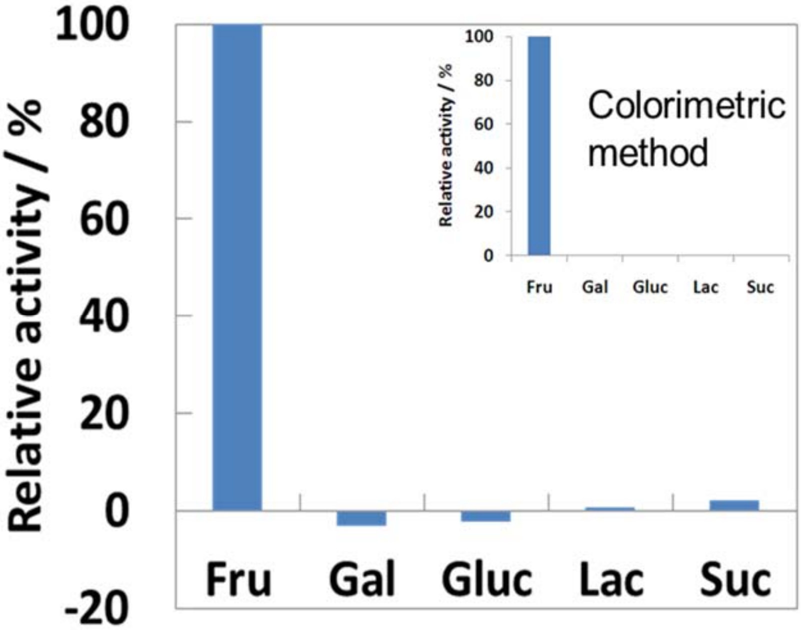


図 3-5-4 FDH を用いたエクステンド型 SPR イメージング
センサの基質選択応答性

3-6　結論

本章では、以前の研究から示唆された SPR 金チップの金薄膜を介した電子移動反応を利用した新規なエクステンド型 SPR 酵素センサの開発を提案した。すなわち、基質認識パートと観測パートを別々に設け、基質認識パートで起こる酵素反応を観測パートでイメージング観測することが可能となった。本研究では、電極との直接電子移動が確認されているフルクトース脱水素酵素 (PQQ-FDH)と Os ポリマーを金チップ上に隣り合わせに固定化することで、両スポット間で起こる金薄膜を介した電子移動反応の 2D-SPR 観測を行った。結果は予期した通り、基質認識パートへのフルクトース溶液の添加に伴い観察パートにおける Os ポリマーへの電子移動が進み、その還元反応を SPRi で観測することができた。本センサはフルクトースに対して高い選択応答性を示し、500-5000 μM の濃度範囲において良い直線性を示した。

また、金基板を介した Os ポリマースポット間電子移動反応はスポット間の距離に依存してその電子移動反応の程度が低下する傾向が既に確認されている。そのため、今後はこの電子移動距離の延長を図る工夫が必要である。このスポット間の電子移動距離を延ばす計測系が確立されれば、基質認識パートを離れたプローブ末端として生体分子の in vivo 計測を SPR によって観測することができるということが期待できる。

第 4 章

電気化学表面プラズモン共鳴イメージャー(EC-SPRi)を用いるオキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時計測システムの開発

4-1　本章の目的と概要

私は修士論文研究において、疾患のバイオマーカーとなる糖やアミノ酸などを従来法よりも迅速で簡便に計測できるセンサの開発を目指し、これらのマーカー物質を基質とするオキシダーゼやデヒドロゲナーゼによる Os ポリマーの酸化還元反応を SPR イメージング観測する酵素センサの開発を行ってきた。例えば、リシンオキシダーゼ(LysOx)を用いるリシンセンサ、ガラクトースオキシダーゼ(GalOx)を用いるガラクトースセンサ、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)を用いる乳酸センサなどである。また、2 種のオキシダーゼを 2 つの領域に分割した金チップ上にそれぞれ Os ポリマーと同時固定化することによって、リシンとガラクトースの同時計測にも成功した。さらに、より多くの種類のマーカー物質を同時にマルチ計測するには、オキシダーゼ反応やデヒドロゲナーゼ反応などの異なるタイプの酸化還元酵素を用いることが必要となる。しかしながら、これらの反応を SPRi で同時検出する場合には、Os ポリマーの酸化・還元反応の方向が逆であるという理由から、SPR 金チップ上にただ並列に固定化するだけでは同時観測によるそれぞれの基質センシングは難しい。

そこで本章では、これらオキシダーゼとデヒドロゲナーゼを 2 つの領域に分画した金チップ上にそれぞれ固定化し、それぞれの酵素層の下の Os ポリマーの酸化還元初期状態を別々に電気化学(EC)制御することにより、2 種類の酵素反応を SPRi によって同時観測することを目指すことにした。

4-2　実験試薬

表 4-1 実験試薬

試薬名称	グレード	販売元
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	特級	NACALAI TESQUE INC.
Hydrochloric Acid	特級	Wako
β-Nicotinamide-adenine dinucleotide reduced (NADH)	≧95%	ORIENTAL YEAST CO.
β-Nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD^+)	≧95%	ORIENTAL YEAST CO.
L(+)-Lysine monohydrochloride	特級	Wako
L-Lactic Acid	特級	Wako
Glutaraldehyde (GA)	50%	TCI
Os polymer	–	BAS Inc.
L-Lysine Oxidase (from *Trichoderma viride*)	–	SIGMA
Lactate dehydrogenase (from rabbit mscle)	–	Roche Diagnostics
Diaphorase (From *Clostridium sp.*)	–	TOYOBO ENZYMES

4-3　測定原理

4-3-1　デヒドロゲナーゼを用いる SPR 酵素センサ

図 4-3-1 にデヒドロゲナーゼとオスミウムポリマーを組み合わせた SPR 酵素センサの検出原理を示す。まず、酵素基質が酵素スポットに固定化されたデヒドロゲナーゼにより酸化される。このとき、その補酵素となる溶液中の NAD^+ が還元され NADH が生成する。この NADH がスポット下層にあるオスミウムポリマーをジアホラーゼの触媒反応と共同してオスミウムを 3 価から 2 価へ還元する。還元型オスミウムポリマーは酸化型のそれよりもその屈折率が高いため、共鳴角のポジティブシフトとして SPRi により基質が検出・定量できる。

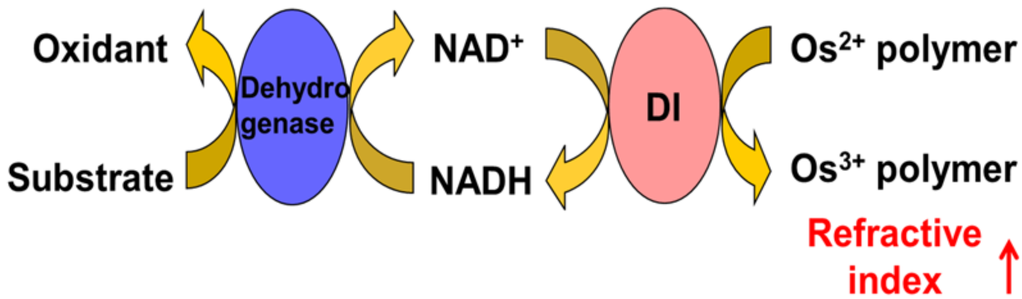


図 4-3-1 デヒドロゲナーゼと Os ポリマーを組み合わせた
SPR 酵素センサの基質検出原理

4-3-2　オキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時観測システム

図 4-3-2 にオキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時観測システムの原理を示す。本センサでは 2 分割した金チップ上の一方にオキシダーゼスポット(LysOx/Os ポリマー)、他方にデヒドロゲナーゼスポット(LDH/Os ポリマー)を前述のように固定化する。オキシダーゼスポットではオスミウムポリマーの酸化反応が、デヒドロゲナーゼスポットではオスミウムポリマーの還元反応がそれぞれの酵素によって触媒される。そのため、オキシダーゼスポットではその下層に固定化したオスミウムの初期状態を還元型に、デヒドロゲナーゼスポットでは酸化型に制御する必要がある。そこで、それぞれの区画の金基板を作用電極とし、計測前にオキシダーゼスポットにはオスミウムの酸化電位をデヒドロゲナーゼスポットにはその還元電位を印加する電気化学処理を行った。その結果、リシンの計測は LysOx/Os ポリマースポットで、乳酸の計測は LDH/Os ポリマースポットでそれぞれ屈折率の減少及び増加として観測される。

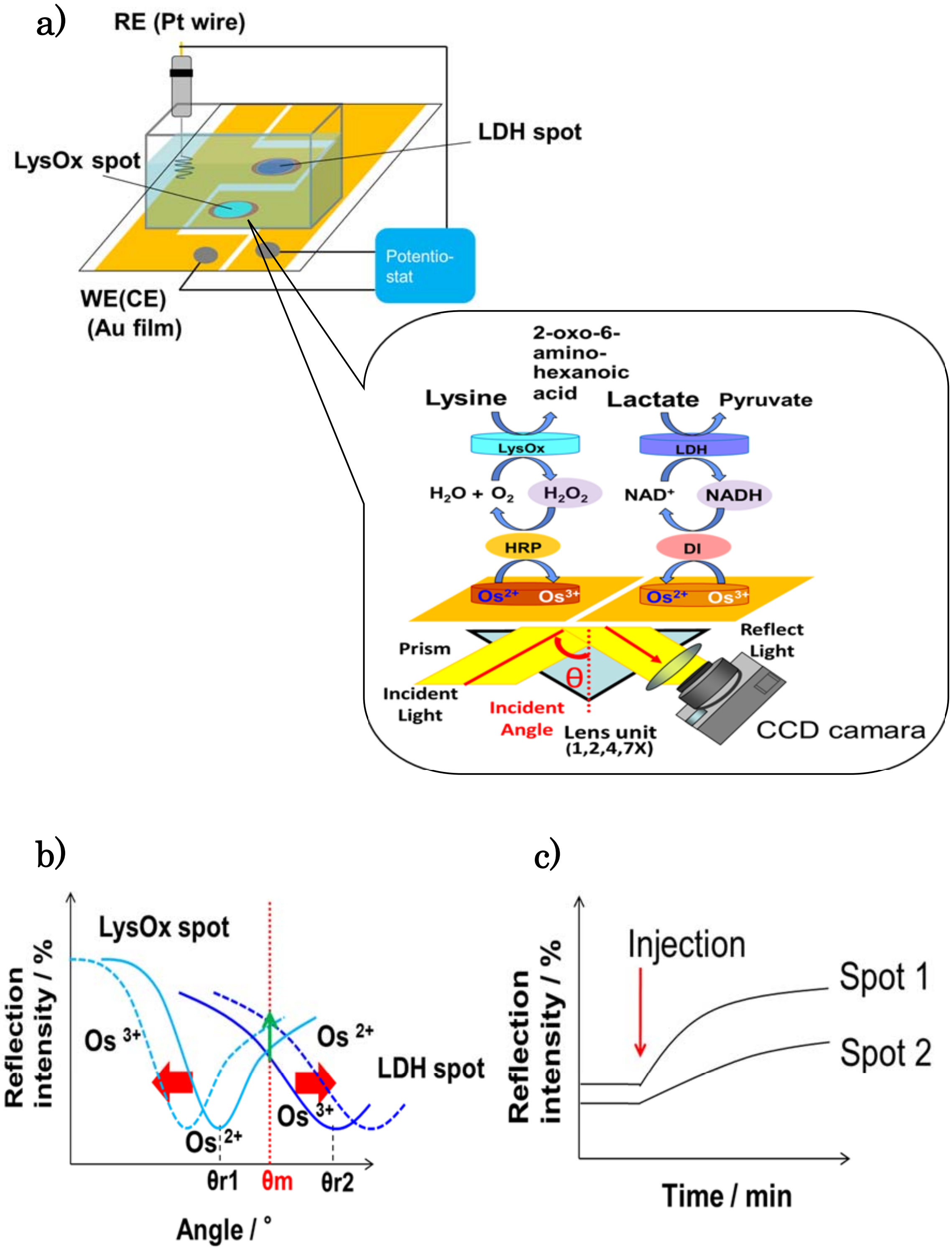


図 4-3-2 a) EC-SPRi によるオキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時観測システムの原理

b) EC-SPRi による角度変化測定

c) EC-SPRi による時間変化測定

4-4　実験方法

4-4-1　EC-SPRi デュアルセンシングチップの作製法

測定用センサチップの作製は以下の手順で行った。

2D-SPR 用金チップの金薄膜をカッターナイフで、
切断し、2 つの領域に分割

↓

それぞれの領域にリード線を繋ぐ（繋目は銀ペーストで固定）

↓

それぞれの領域に HRP-Os ポリマーを滴下

↓　4℃で乾燥固定

LysOx (from *Trichoderma viride*) / 0.1 M PB(pH 6.8)
または
FDH (from *rabbit muscle*) / 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6)
DI (from *Clostridium sp.*) / 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6)
+
1% Glutaraldehyde / 0.1 MPB(pH 6.8)

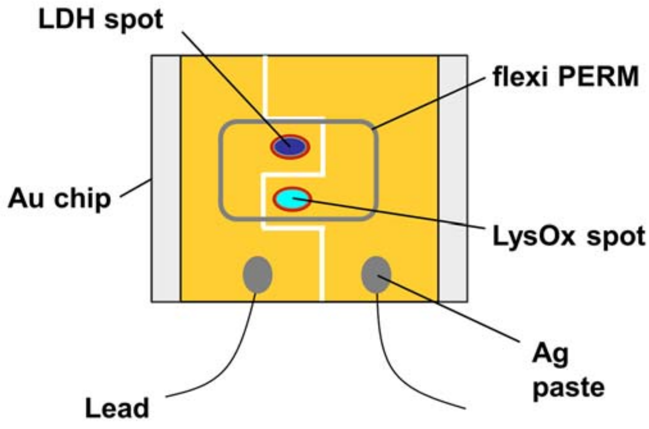
↓

各酵素溶液と GA 溶液を 1:1 で混合し、Os スポットへ滴下

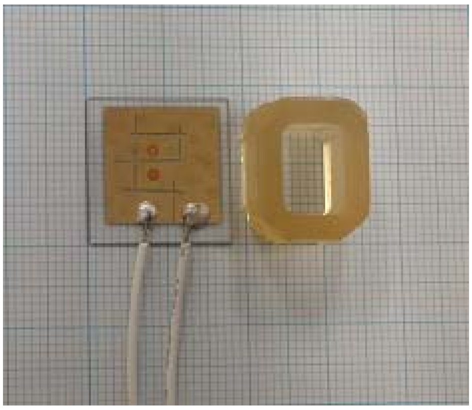
↓　4℃で乾燥固定

酵素チップにフレキシパームを接着後測定へ

a)



b)



c)

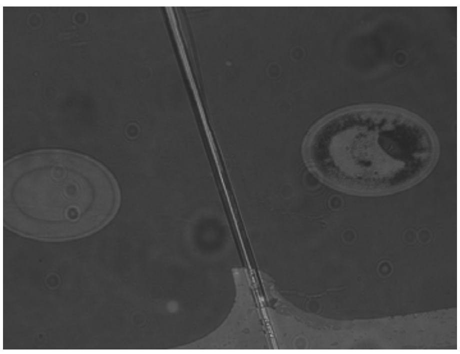


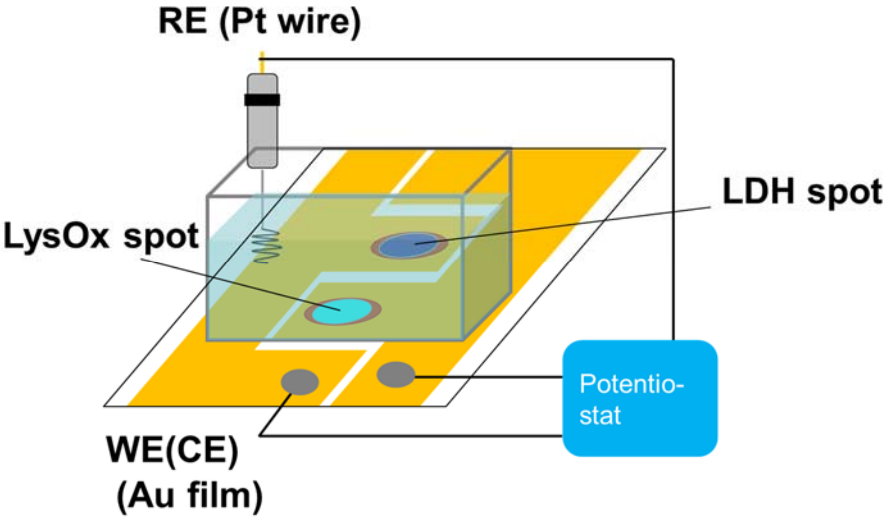
図 4-2-1 EC-SPRi 酵素センサチップ

a) センサチップ図

b) センサチップ写真

c) センサチップ上の 2 つの酵素スポットの 2D-SPR イメージ

a)



b)

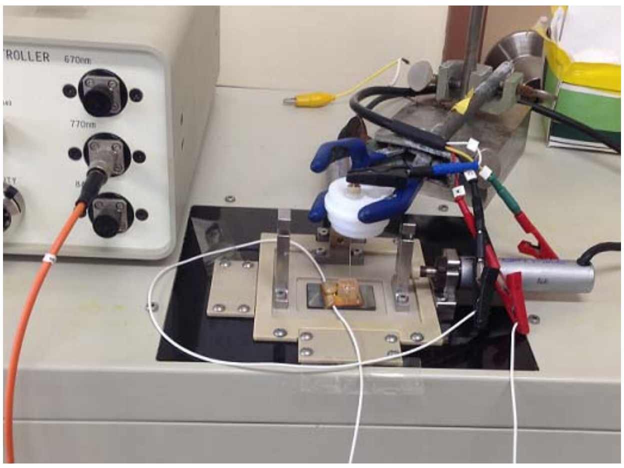


図 4-2-2 EC-SPRi システム
a）システムの模式図
b）システムの写真

4-4-2　測定操作

SPRi 観測実験は以下の手順で行った。

本センサチップは各分割パート(金薄膜)をそれぞれ作用極、対極とし、また白金ワイヤーを偽参照極として 3 電極系を構成した。(図 4-3-2)

↓

測定セルに 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) を添加し、LDH 側電極に+0.3、一方、LysOx 側電極には-0.1 V を印加することにより､それぞれのパートの Os ポリマーを酸化体および還元体に前処理した。

↓

角度変化測定を行い､得られた SPR 曲線から時間変化測定を行う際の固定角を決定した。

↓

固定角で、各スポットの反射光強度の時間変化を観測した。
(測定開始から 1 分のところで、種々のサンプル溶液を滴下した。)

↓

測定後、各酵素スポットの Os ポリマーを酸化型・還元型に電気化学処理を行い、繰り返し測定を行った。

4-5　結果および考察

図 4-5-1 に測定金チップに固定化した Os ポリマーのボルタモグラムを示す。測定結果から固定化 Os ポリマーの酸化還元電位($E^{\circ\prime}$)は+0.1 V (vs Pt) であった。したがって、Os ポリマーの酸化制御には作用極に E=+0.3 V を、還元制御には E=－0.1 V を印加することにした。Os ポリマーの酸化還元状態の屈折率変化を反射光強度(I_{ref})経時変化として SPRi 観測した結果を図 4-5-2 に示す。初期状態(還元型)の Os ポリマーに測定開始から 1 分のところ(T1)で+0.3 V を印加すると速やかな反射光強度の上昇が観測され、またその 1 分後の時刻(T2)で-0.1 V を印加すると明らかな反射光強度の減少が観測された。2D-SPR イメージングにおいても明らかな反射光強度の変化が観察された。(図 2-4-5-2 b) ゆえに SPR 金チップに電気化学処理を行うことで金チップ上に固定化された Os ポリマーの酸化還元状態をコントロールできるということが示された。

実際に電気化学処理後、終濃度 1 mM のリシンおよび乳酸を添加し、センサ応答を調べた。リシンの添加では LysOx/Os ポリマースポットにおいて明らかな反射光強度の増加が観られ、LDH スポットでは有意な変化は観測されなかった。また、乳酸の添加では LDH スポットでのみ、明らかな反射光強度の増加が観られた。(図 4-5-3)

図 4-5-4 に種々の濃度のリシン溶液の添加前後における各酵素スポットの反射光強度の経時変化測定の結果を示す。LysOx/Os ポリマースポットでは添加したリシン濃度の増加に伴って、その基質添加直後の反射光強度の傾き(反応速度)の増大が観測された。一方で、LDH/Os ポリマースポットではリシンの添加前後において、その反射光強度の変化はほとんど認められなかった。また、乳酸計測においても同様の結果が得られた。図 4-5-5 はそれぞれの酵素スポットにおけるリシンと乳酸の計測結果を示す。(尚、検量線は反射光強度の継時変化測定時の、基質添加後におけるシグナルの傾きをレスポンスとし、添加した基質濃度に対してプロットすることで作成した。) それぞれの酵素スポットでは 50-200 μM のリシンおよび乳酸の定量が行えた。また、リシンおよび乳酸の連続添加における各酵素スポットの 2D-SPR 応答観測を行った。(図 4-5-6)結果から、それぞれの酵素基質の添加に際し、一方の基質が他方の基質計測に影響しないということが示された。

以上の結果から、EC-SPRi センサはオキシダーゼとデヒドロゲナーゼの両酵素反応の同時計測に応用可能であるということが示された。

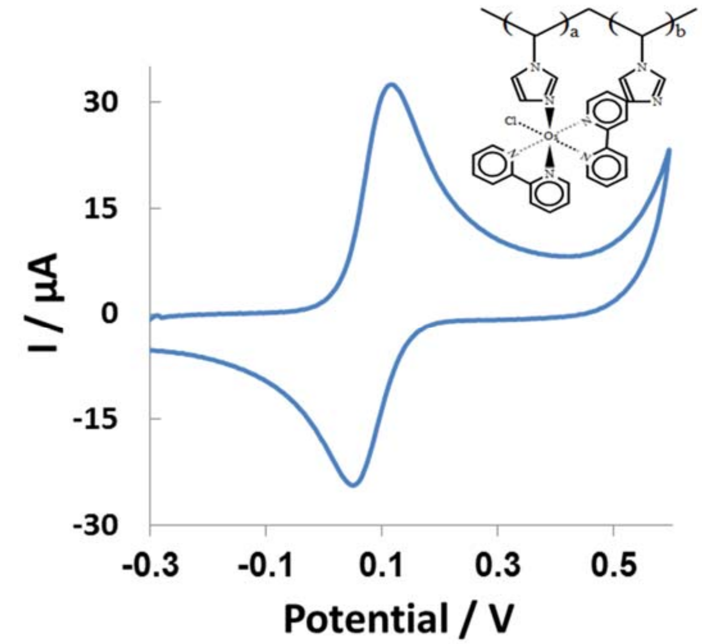
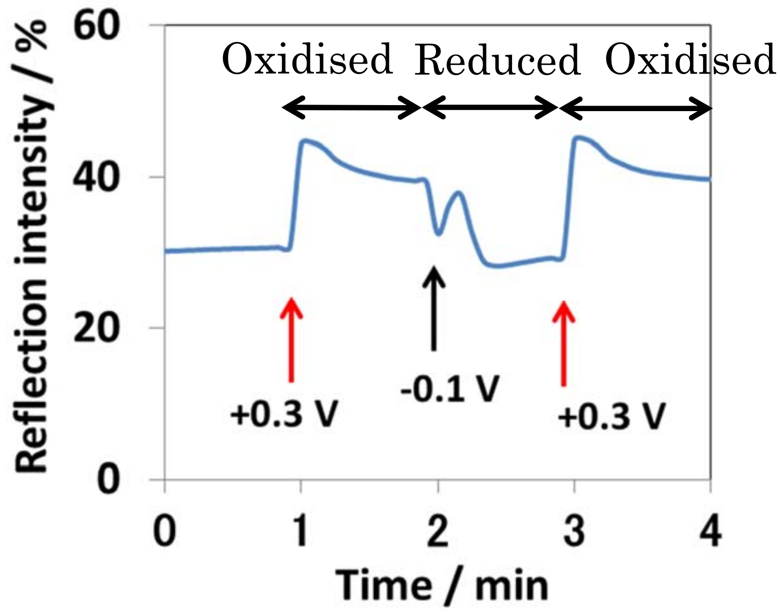


図 4-5-1 EC-SPRi による Os ポリマーのボルタモグラム

a)



b)

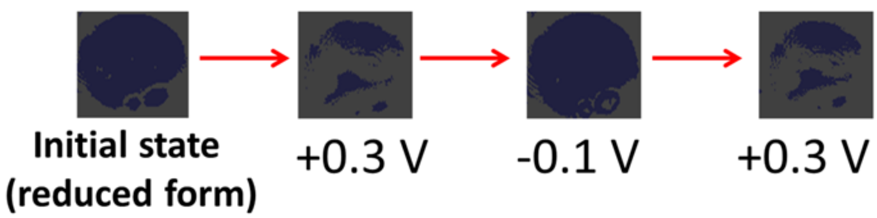


図 4-5-2 Os ポリマーの酸化還元状態の EC-SPRi 観測

a）Os ポリマースポットの反射光強度(I_{ref})の経時変化測定

b）Os ポリマースポットの 2D-SPR イメージ

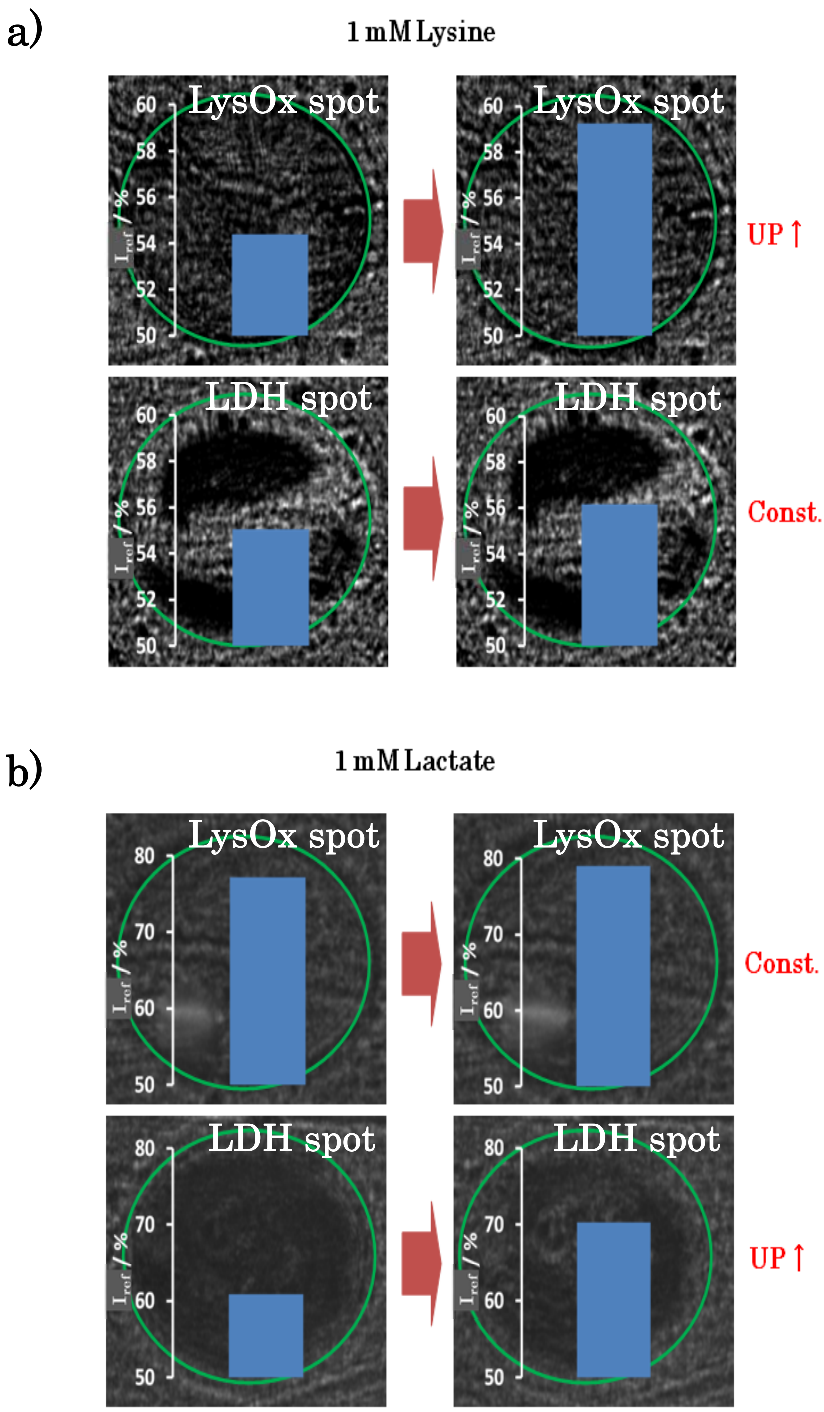


図 4-5-3 リシン a)及び、乳酸 b)の添加前後における
両酵素スポットの SPR イメージとその反射光強度(θ_m=55.0)
反射光強度(Iref)はサンプル添加 4 分後の値を示した。

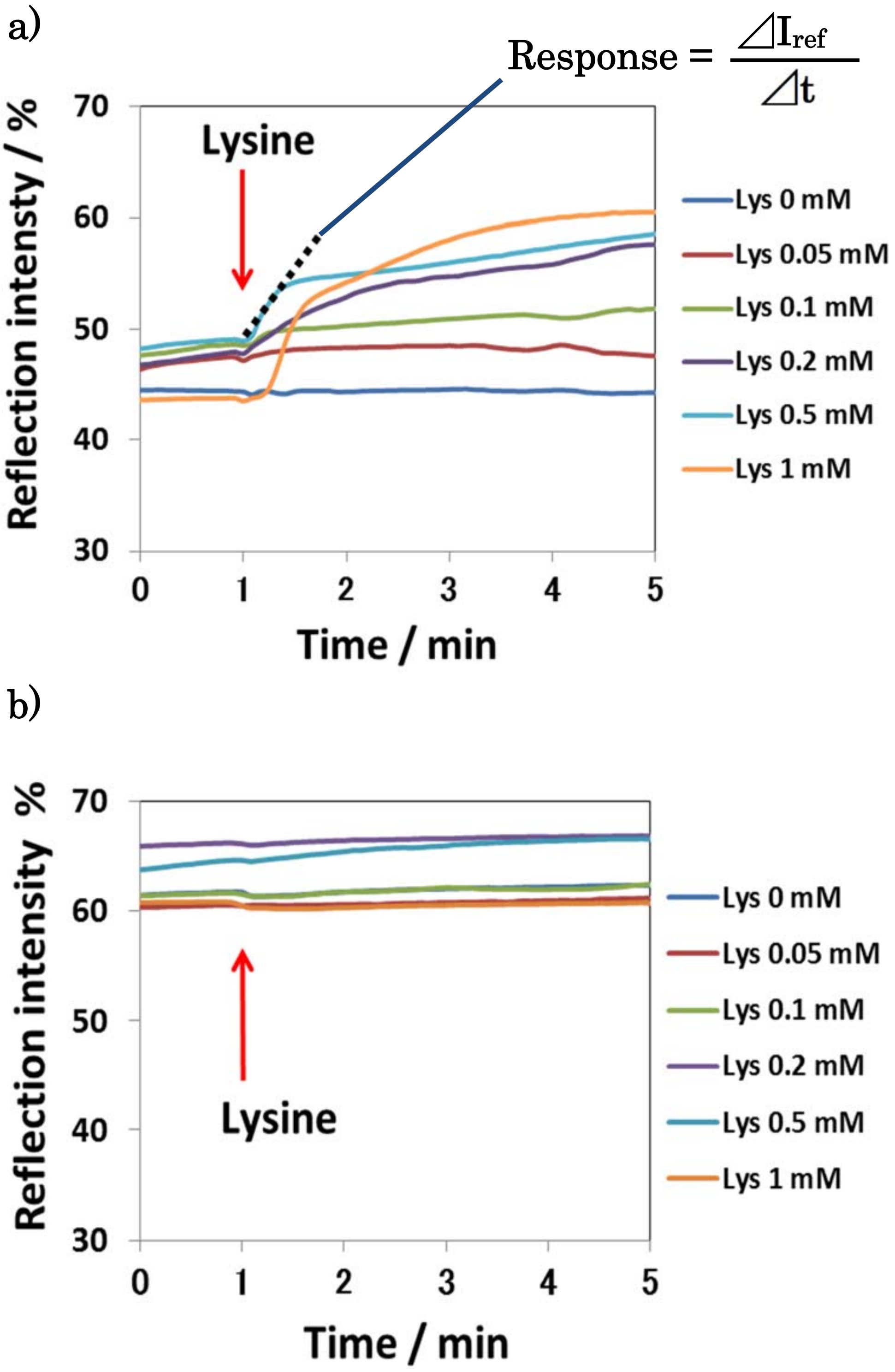


図 4-5-4 リシンサンプル溶液添加前後における各酵素スポットの反射光強度(I_{ref})の経時変化(θ_m=55.0°)
a) LysOx/Os ポリマースポット, b) LDH/Os ポリマースポット

a)

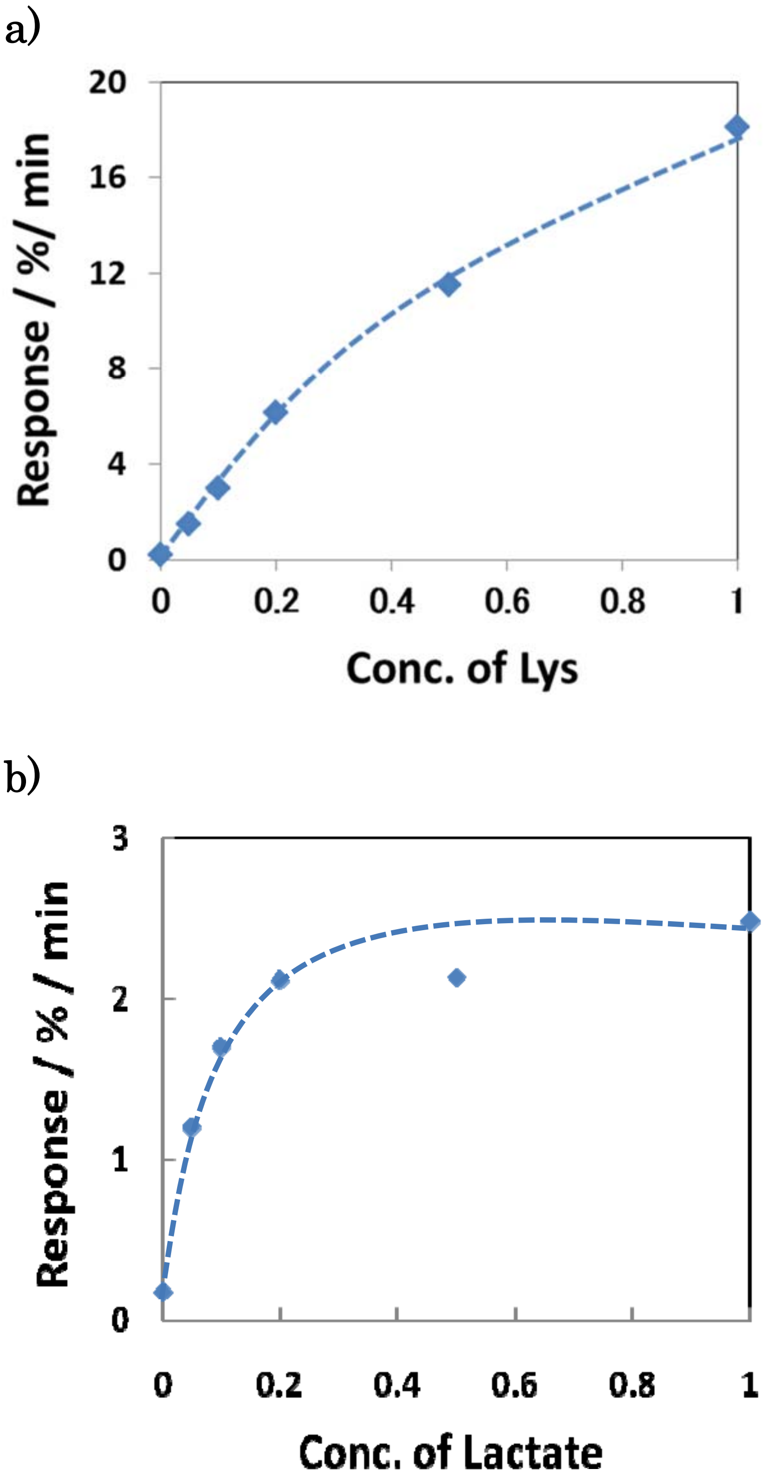


図 4-5-5 各酵素スポットにおけるリシンおよび乳酸の検量線
a) LysOx/Os ポリマースポットにおけるリシン計測
b) LDH/Os ポリマースポットにおける乳酸計測

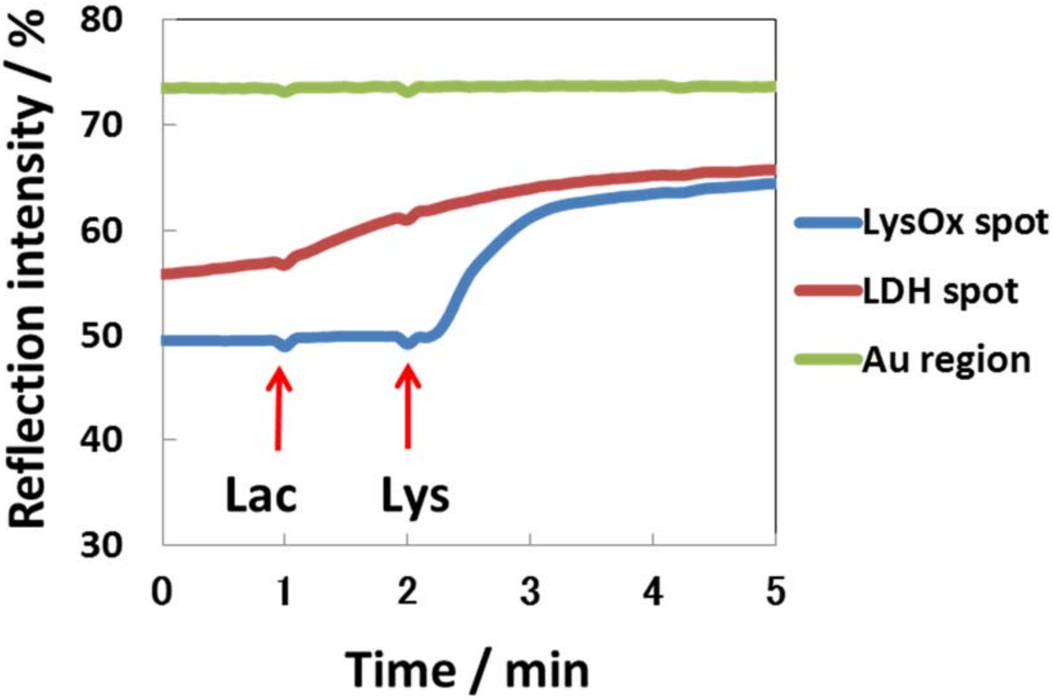


図 4-5-6 乳酸(終濃度 1 mM)及びリシン(終濃度 1 mM)の連続添加による LysOx/Os ポリマー， LDH/Os ポリマー及び金領域の反射光強度(I_{ref})の経時変化(θ_m=55.0)

4-6　結論

本章では2分割したSPR金チップ上にそれぞれLysOx/Osポリマー、LDH/Osポリマースポットを固定化することで、オキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時観測に成功した。オキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応は同一酸化還元メディエータ(Os ポリマー)で観測する場合、真逆の酸化還元反応を触媒するため、それぞれのOsポリマーの初期状態をコントロールする必要があった。EC-SPRi センサでは、各酵素スポットの Os ポリマーの酸化還元状態をチップ金基板を通して電気化学処理することで、それぞれの初期状態を酸化型あるいは還元型に別々に制御することができた。それによって本センサでは、LysOx/Osポリマースポットでリシンの計測を、LDH/Osポリマースポットで乳酸の計測を隣のスポットのクロストークの影響を受けずに行うことができた。それぞれの酵素スポットでは50-200 μMのリシン及び乳酸の定量が可能であった。また、測定後の各酵素スポットのOsポリマーに再度電気化学処理を施すことで、7回程度まで両酵素スポットの繰り返し計測が可能であった。

以上の結果から、我々が考案したEC-SPRiベースの酵素センシングシステムは様々な種類のオキシダーゼ反応およびデヒドロゲナーゼ反応のマルチ計測や繰り返し計測が可能であると示され、医療分析をはじめ様々な分野での生体分子計測に応用できるものと期待できる。

第 5 章　結章

本報での成果を以下にまとめる。

＜第 2 章＞　二次元 SPR を用いるデュアルオキシダーゼセンシングシステムの開発

本章では 2D-SPRi によるオキシダーゼ反応のデュアルセンシングシステムの開発を行い、その特性を評価した。リシンオキシダーゼ(LysOx)とガラクトースオキシダーゼ(GalOx)を用いることで、代謝異常症マーカー物質であるリシンとガラクトースの同時計測を目指した。本センサでは 2 分割した金チップ上にそれぞれ LysOx/Os ポリマースポットと GalOx/Os ポリマースポットを固定化することにより、クロストークによる影響を受けずリシンとガラクトースを検出することができた。リシンとガラクトースは酵素スポット特異的にそれぞれ 20-20 µM, 50-1000 µM の濃度範囲で検量が可能であり本センサのデュアル計測への有用性が示された。

＜第 3 章＞　PQQ 依存型フルクトース脱水素酵素(PQQ-FDH)を用いるエクステンド型 SPR 酵素センサシステムの開発

本章では、SPR 金基板を介した電子移動反応を利用し、基質認識パートと観測パートを別々にもつ新規な SPR 酵素センサを提案した。本研究では、電極との直接電子移動が確認されているフルクトース脱水素酵素(PQQ-FDH)と Os ポリマーを金チップ上に隣り合わせに固定化することで、両スポット間で起こる金薄膜を介した電子移動反応の 2D-SPR 観測を行った。本センサはフルクトースに対して高い選択応答性を示し、500-5000 µM の濃度範囲において良い直線性を示した。また、金基盤を介した Os ポリマースポット間電子移動反応はスポット間の距離に依存してその電子移動反応の程度が低下するため、今後はこの電子移動距離の延長を図る工夫が必要である。このスポット間の電子移動距離を延ばす計測系が確立されれば、基質認識パートを離れたプローブ末端として生体分子の in vivo 計測を SPR によって観測することができるということが期待できる。

＜第 4 章＞　電気化学表面プラズモン共鳴イメージャー(EC-SPRi)を用いるオキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時観測システムの開発

本章では電気化学表面プラズモン共鳴イメージング法(EC-SPRi)を用いることで、オキシダーゼ反応とデヒドロゲナーゼ反応の同時観測を行った。EC-SPRi センサでは、各酵素スポットをチップ金基板を通して電気化学処理することでそれぞれの Os ポリマーの酸化還元状態を別々に制御することができた。本センサでは、LysOx/Os ポリマースポットでリシンの計測を LDH/Os ポリマースポットで乳酸の計測をクロストークの影響を受けずに行うことができた。それぞれの酵素スポットでは 50-200 μM のリシン及び乳酸の定量が可能であった。また、測定後の各酵素スポットの Os ポリマーに再度電気化学処理を施すことで両酵素スポットの繰り返し計測が可能であった。

以上の結果から、我々が提案する EC-SPRi 酵素センシングシステムはオキシダーゼでもデヒドロゲナーゼでも種々の酸化還元酵素のマルチ基質センシングが可能と期待できる。

本論文ではそれ自体の酸化還元状態でその屈折率が変化する Os ポリマーと測定表面の局所屈折率変化を敏感にイメージング観測する 2D-SPRi を組み合わせることにより、オキシダーゼやデヒドロゲナーゼが触媒する酵素反応をイメージング観察するセンシングシステムの設計・開発を行った。我々が提案したセンサシステムはこれらの酵素反応の迅速・簡便な同時観察が可能であり、それらの酵素基質である糖やアミノ酸などの生体分子のマルチ計測への応用性が示された。ゆえに、本 2D-SPRi 酵素センサは医療分野をはじめ様々な生体分子計測を要する研究分野への貢献が可能と期待している。

参考文献

1. 総務省ホームページ(出典) 国立社会保障・人口問題研究所「平成22年度社会保障費用統計」、総務省「ICT超高齢社会構想会議報告書」 http://www.soumu.go.jp/index.html
2. Ming Xing Chu, Kumiko Miyajima, Daishi Takahashi, Takahiro Arakawa, Kenji Sano,Shin-ichi Sawada, Hiroyuki Kudo, Yasuhiko Iwasaki, Kazunari Akiyoshi,Manabu Mochizuki, Kohji Mitsubayashi(2011)Soft contact lens biosensor for in situ monitoring of tear glucose as non-invasiveblood sugar assessment. Talanta 83: 960–965.
3. Huanfen Yao, Angela J. Shum, Melissa Cowan, Ilkka Lahdesmaki, Babak A. Parviz(2011)A contact lens with embedded sensor for monitoring tear glucose level. Biosensors and Bioelectronics 26: 3290–3296.
4. Magnus Falk,Viktor Andoralov, Maria Silow,Miguel D. Toscano,and Sergey Shleev (2013) Miniature Biofuel Cell as a Potential Power Source for Glucose-Sensing Contact Lenses.Anal. Chem. 85: 6342−6348.
5. 軽部征夫　バイオセンサー　シーエムシー出版(2002).
6. 六車仁志　バイオセンサー入門　コロナ社(2003).
7. 鈴木周一　バイオセンサー　講談社サイエンティフィック(1989).
8. S. J. Updike, GP. Hicks (1967)The Enzyme ElectrodeNature 214: 986-988.
9. Yildiz Uludag, Ibtisam E. Tothill (2012) Cancer Biomarker Detection in Serum Samples Using Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance Sensors with Nanoparticle Signal Amplification. Anal. Chem. 84: 5898−5904.
10. Greta J. Wegner, Hye Jin Lee, Gerard Marriott, and Robert M. Corn (2003) Fabrication of Histidine-Tagged Fusion Protein Arrays for Surface Plasmon Resonance Imaging Studies of Protein-Protein and Protein-DNA Interactions. Anal. Chem 75:4740-4746.
11. Takatoshi Sakai, Katsura Shinahara, Akira Torimaru, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Kiyoshi Matsumoto (2004) Sensitive detection of glycyrrhizin and evaluation of the affinity constants by a surface Plasmon resonance-based immunosensor. Anal. Sciences 20: 279-283.
12. Zeynep Altintas a,b, Yildiz Uludaga, Yasar Gurbuzb, Ibtisam E. Tothill(2011)Surface Plasmonresonance based immunosensor for the detectionof the cancer biomarkercarcinoembryonic antigen. Talanta 86:

377– 383.
13. Akihide Hemmi, Ryosuke Mizumura, Ryuta Kawanishi, Hizuru Nakajima, Hulie Zeng, Katsumi Uchiyama, Noriaki Kaneki, Toshihiko Imato (2013) Development of a Novel Two Dimensional Surface Plasmon Resonance Sensor Using Multiplied Beam Splitting Optics. Sensors 13: 801-812.
14. Greta J. Wegner, Alastair W. Wark, Hye Jin Lee, Eric Codner, Tomonori Saeki, Shiping Fang, Robert M. Corn (2004) Real-Time Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements for the Multiplexed Determination of Protein Adsorption/Desorption Kinetics and Surface Enzymatic Reactions on Peptide Microarrays. Anal. Chem 76: 5677-5684.
15. Bryce P. Nelson, Timothy E. Grimsrud, Mark R. Liles, Robert M. Goodman, Robert M. Corn (2001) Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays.Anal. Chem. 73: 1-7.
16. M. Vreeke, R. Maidan, A. Heller (1992) Hydrogen Peroxide and β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Sensing Amperometric Electrodes Based on Electrical Connection of Horseradish Peroxidase Redox Centers to Electrodes through a Three-Dimensional Electron Relaying Polymer Network. Anal.Chem. 64: 3084-3090.
17. Satoshi Koide,Yuzuru Iwasaki,Tsutomu Horiuchi,Osamu Niwa,Eiichi Tamiya, Kenji Yokoyama (2000) A novel biosensor using electrochemical surface plasmon resonance measurements. Chem. Commun.9: 741-742.
18. Yuzuru Iwasaki, Tsutomu Horiuchi, Osamu Niwa (2001) Detection of Electrochemical Enzymatic Reactions by Surface Plasmon Resonance Measurement. Anal. Chem. 73:1595-1598.
19. Yuzuru Iwasaki, Tatsuya Tobita, Kazuyoshi Kurihara, Tsutomu Horiuchi,Koji Suzuki, Osamu Niwa (2002) Imaging of electrochemical enzyme sensor on gold electrode using surface plasmon resonance. Biosens. Bioelectron.17: 783-788.
20. 福井　万寿夫, 大津　元一, 光ナノテクノロジーの基礎 (2003)
21. 三原　和久, 小畠　英理, 馬場　嘉信, ナノバイオ計測の実際　講談社サイエンティフィック(2007)
22. 岡本　隆之, 梶川浩太郎, プラズモニクス-基礎と応用(2010)
23. Neville S, O’Sullivan S, Sweeney B, Lynch B, Hanrahan D, Knerr I, Lynch SA, CrushellE (2015) Friedreich Ataxia in Classical Galactosaemia.

JIMD Reports, DOI: 10.1007/8904_2015_477.

24. David J. Timson (2015) The molecular basis of galactosemia — Past, present and future. Gene http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.077.
25. Brook M. Pyhtila, Kelly A. Shaw, Samantha E. Neumann, Judith L. Fridovich-Keil (2015) Newborn Screening for Galactosemia in the United States: Looking Back, Looking Around, and Looking Ahead.JIMD Reports15: 79-93.
26. Katherine A. Sacksteder, Barbara J. Biery, James C. Morrell,Barbara K. Goodman,Brian V. Geisbrecht,Rody P. Cox,Stephen J. Gould, Michael T. Geraghty(2000) Identification of the a-Aminoadipic Semialdehyde Synthase Gene, WhichIs Defective in FamilialHyperlysinemia.Am. J. Hum. Genet66: 1736–1743.
27. Sander M Houten, Heleen te Brinke, Simone Denis, Jos PN Ruiter, Alida C Knegt, Johannis BC de Klerk, Persephone Augoustides-Savvopoulou, Johannes Häberle, Matthias R Baumgartner, Turgay Coşkun, Johannes Zschocke, Jörn Oliver Sass, Bwee Tien Poll-The, Ronald JA Wanders, Marinus Duran (2013)Genetic basis of hyperlysinemia. Orphanet Journal of Rare Diseases 8: 57.
28. X. L. Wang, C. J. Li, Y. Xing, Y. H. Yang, J. P. Jia, (2015)Hypervalinemia and hyperleucine-isoleucinemia caused by mutations in the branched-chain-amino-acid aminotransferase gene. J Inherit Metab Dis DOI: 10.1007/s10545-015-9814-z.
29. M. Seki, T. Takizawa, S. Suzuki, T. Shimizu, H. Shibata, T. Ishii, T. Hasegawa, N. Suzuki(2015) Adult phenylketonuria presenting with subacute severe neurologicsymptoms.J Clin. Neurosci.http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2015.02.011.
30. J. Y. Lee, M. A. Chiong, S. C. Estrada, E. M. Cutiongco-De la Paz, C. L. T. Silao, C. D. Padilla (2008) Maple syrup urine disease (MSUD)—Clinical profile of 47 Filipino patients. J Inherit Metab Dis 31 (Suppl 2): S281–S285.
31. Alethéa G. Barschak, Angela Sitta, Marion Deon, Estela N.B. Busanello, Daniella M. Coelho, Franciele Cipriani, Carlos S. Dutra-Filho, Roberto Giugliani, Moacir Wajner, Carmen R. Vargas (2008) Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. Clin. Biochem. 42:462-466.
32. Yoko Kawai, Akihiko Moriyama, Kiyofumi Asai, Carrie M.

Coleman-Campbell, Satoshi Sumi, Hideko Morishita, Mariko Suchi(2005) Molecular characterization of histidinemia: identification of four missense mutations in the histidase gene. Hum Genet116: 340–346.

33. Catherine Lynn T. Silao, Terence Diane F. Fabella, Kahlil Izza D. Rama and Sylvia C. Estrada (2015) Novel cystathionine ß-synthase gene mutations in a Filipino patient withclassic homocystinuria. Pediatrics International 57: 884–887.
34. P. Alcaide, J. Krijt, P. Ruiz-Sala, P. Ješina, M. Ugarte, V. Kožich, B. Merinero (2015) Enzymatic diagnosis of homocystinuria by determination of cystathionine-ß-synthase activity in plasma using LC-MS/MS. Clin. Chimica Acta 438: 261–265.
35. Kazutaka Shimbo, Takashi Oonuki, Akihisa Yahashi, Kazuo Hirayama, Hiroshi Miyano (2009)Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom 23: 1483–1492.
36. W.A. Huub Waterval, Jean L.J.M. Scheijen, Marjon M.J.C. Ortmans-Ploemen,Catharina D. Habets-van der Poel, Jörgen Bierau (2009) Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatised amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism. Clin. Chimica Acta 407: 36–42.
37. Fei Cheng, Zhenwu Wang, Yanping Huang, Yixiang Duan, XiaodongWang (2015) Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Clin. Chimica Acta 447: 23–31.
38. R.Gathrie, A Susi (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants.Pediathics32: 318-343.
39. David J.Weiss, Megan Dorris, Amanda Loh, Laura Peterson (2007) Dehydrogenase based reagentless biosensor for monitoring Phenylketonuria.Biosensors and Bioelectronics22: 2436-2441.
40. Yasushi Noguchi, Qing-Wei Zhang, Tetsuya Sugimoto, Yasufumi Furuhata, Ryosei Sakai, Masato Mori, Mitsuo Takahashi, and Takeshi Kimura (2006) Network analysis of plasma and tissue amino acids and the generation of an amino index for potential diagnostic use. Am J Clin. Nutr83: 513S–9S.

41. April D. Lake, Petr Novak, Petia Shipkova, Nelly Aranibar, Donald G. Robertson, Michael D. Reily, Lois D. Lehman McKeeman, Richard R. Vaillancourt, Nathan J. Cherrington (2015) Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. Amino Acids 47: 603-615.
42. Ryoji Yanagisawa, Masaharu Kataoka, Takumi Inami, Yuichi Momose, Takashi Kawakami, Makoto Takei, Mai Kimura, Sarasa Isobe, Minoru Yamakado, Keiichi Fukuda, Hideaki Yoshino, Motoaki Sano, and Toru Satoh (2015)Usefulness of Circulating Amino Acid Profile and Fischer Ratio to Predict Severity of Pulmonary Hypertension. Am J Cardiol 115: 831-836.
43. P. Sandstrom, L. Trulsson, T. Gasslander, T. Sundqvist, U. von Dobeln, J. Svanvik(2008) Serum amino acid profile in atients with acute pancreatitis. Amino Acids 35: 225-231.
44. Stéphanie Chevalier, Shawn C. Burgess, Craig R. Malloy, Réjeanne Gougeon, Errol B. Marliss, and José A. Morais(2006)The Greater Contribution of Gluconeogenesis to Glucose Production in Obesity Is Related to Increased Whole-Body Protein Catabolism. Diabetes 55: 675-681.
45. John Wahren, Philip Felig, Erol Cerasi, Rolf Luft(1972)Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus. J Clin. Invest 51: 1870-1878.
46. Thomas J Wang, Martin G Larson, Ramachandran S Vasan, Susan Cheng, Eugene P Rhee, Elizabeth McCabe, Gregory D Lewis, Caroline S Fox, Paul F Jacques, Céline Fernandez, Christopher J O'Donnell, Stephen A Carr, Vamsi K Mootha, Jose C Florez, Amanda Souza, Olle Melander, Clary B Clish, Robert E Gerszten(2011) Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. NATURE MEDICINE 17: 448-453.
47. Minoru Yamakado, Kenji Nagao, Akira Imaizumi, MizukiTani, Akiko Toda, Takayuki Tanaka, Hiroko Jinzu, Hiroshi Miyano, Hiroshi Yamamoto, Takashi Daimon, KatsuhisaHorimoto, Yuko Ishizaka (2015) Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population. Scientific Reports DOI: 10.1038.
48. Yohei Miyagi, Masahiko Higashiyama, Akira Gochi, Makoto Akaike4, Takashi Ishikawa, TakeshiMiura, Nobuhiro Saruki, Etsuro Bando,

Hideki Kimura, Fumio Imamura, Masatoshi Moriyama, Ichiro Ikeda, Akihiko Chiba, Fumihiro Oshita, Akira Imaizumi, Hiroshi Yamamoto, Hiroshi Miyano, Katsuhisa Horimoto, Osamu Tochikubo, Toru Mitsushima, Minoru Yamakado, NaoyukiOkamoto (2011) Plasma Free Amino Acid Profiling of Five Types of Cancer Patients and Its Application for Early Detection. PLOS ONE 6 (9): e24143.

49. Nobuyasu Fukutake, Makoto Ueno, Nobuyoshi Hiraoka, Kazuaki Shimada, Koichi Shiraishi, NobuhiroSaruki, Toshifumi Ito, Minoru Yamakado, Nobukazu Ono, Akira Imaizumi, Shinya Kikuchi, Hiroshi Yamamoto, Kazuhiro Katayama (2015) A Novel Multivariate Index for Pancreatic Cancer Detection Based On the Plasma Free Amino Acid Profile. PLOS ONE DOI: 10.1371.
50. Hee Joung Kima, Seung Hun Jangb, Jeong-Seon Ryuc, Jeong Eun Leed, Young Chul Kim,Min Ki Lee, Tae Won Jang, Shin-Yup Lee, Hidehiro Nakamura, Natsumi Nishikata,Maiko Mori, Yasushi Noguchi, Hiroshi Miyano, Kye Young Lee (2015) The performance of a novel amino acid multivariate index fordetecting lung cancer: A case control study in Korea. Lung Cancer, http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.10.006.
51. Jan Tkac, Juraj Svitel, Igor Vostiar, Marian Navratil, Peter Gemeiner (2009) Membrane-bound dehydrogenases from Gluconobacter sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis. Bioelectrochemistry 76: 53-62.
52. Ieva Šakinytė, Jurgis Barkauskas, Justina Gaidukevič, Julija Razumienė (2015) Thermally reduced grapheneoxide: The study and use for reagentless amperometric D-fructosebiosensors. Talanta144:1096–1103.
53. Yuhei Hida and Hiroaki Shinohara (2015) Fabrication of a dual-enzyme sensing system based on surface plasmon resonance imager (SPRi) for simultaneous determination of bio-markers. J Anal Bioanal Tech 6:6 http://dx.doi.org/10.4172/2155-9872.1000279.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご指導・ご助言を賜りました篠原寛明　教授(富山大学大学院理工学研究部(工学))に心から厚く御礼申し上げます。

本研究論文作成にあたり、査読を引き受けて頂き、貴重なご助言・ご指導を賜りました北野博巳　教授(富山大学大学院理工学研究部(工学))に深く感謝の意を表します。

同じく、本研究論文作成にあたり、査読を引き受けて頂き、貴重なご助言・ご指導を賜りました森寿　教授(富山大学大学院医学薬学研究部(医学))に深く感謝申し上げます。

また、本論文の審査委員を引き受けて頂き、貴重なご助言・ご指導を賜りました鈴木正康　教授(富山大学大学院理工学研究部(工学))に厚く御礼申し上げます。

同じく、本論文の審査委員を引き受けて頂き、貴重なご助言・ご指導を賜りました樋口弘行　教授(富山大学大学院理工学研究部(理学))に深く御礼申し上げます。

また、研究を進めていくにあたり、終始懇切丁寧なご指導を頂きました須加実助教(富山大学大学院理工学研究部)に厚く御礼申し上げます。

最後に本研究を進めるに当たり様々な討議、多くの励ましをくださった富山大学工学部　生命工学科　篠原・須加研究室の皆様に感謝の意を表します。