

水晶振動子バイオセンサーを用いる ヒト血清アルブミンの定量法

緒方 進・奥村 克純・田口 寛

三重大大学生物資源学部

Determination of Human Serum Albumin Using a Biosensor System Constructed with Piezoelectric Quartz Crystal

Shin OGATA, Katsuzumi OKUMURA and Hiroshi TAGUCHI

Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Abstract

It has been known that a small amount of serum albumin ($30 \mu\text{g/ml}$) is detected in urine at the early stage of diabetes mellitus due to diabetic nephropathy and it is called microalbuminuria. First we tried to develop a biosensor system with a quartz crystal microbalance for simple and rapid detection of such serum albumin. At first, oscillation of the quartz crystal microbalance was not stable in ion-containing solutions such as urine. Then we constructed a flow cell, in which only one side of the electrodes of a piezoelectric quartz crystal is in contact with the liquid. As a result, oscillation was stable and human serum albumin ($10 \mu\text{g/ml}$) was detected with the quartz crystal on which anti-human serum albumin was coated via polyethylenimine. Using this system, we can monitor microalbuminuria, conveniently and rapidly.

Key Words: piezoelectric quartz crystal • biosensor • microalbuminuria •
diabetes mellitus • diabetic nephropathy

緒 言

今日、医療技術は周辺領域における技術革新とともに目ざましい勢いで進歩している。例えば、医療の一分野である臨床検査の場合、その意義は従来の病気の診断、そしてその治療のための情報を得るという点から、病気になる前から対応するといった早期発見、予防という点が重要視されつつある。このことは従来行われていた検査が、その需要の増加により各自動分析装置の開発、改

良が進められ、より迅速化、高感度化、高精度化されたこと、またスクリーニング検査のように、1検体から多数の情報を得ることのできる方法が普及したことに加え、我々の、健康な生活を営みたいという自然な欲求が相乗効果を示した結果といえる。そこで早期発見、予防という観点からは臨床検査が日常的にできることが望ましい。

現在、臨床検査の対象となる血液、尿などの体液中には各種化学物質が非常に多く含まれており、これらの測定は診断に対し極めて重要な情報を与えてくれる。臨床

平成10年7月1日受理

三重大大学生物資源学部生物化学分野

〒514-8507 三重県津市上浜町1515, hiroshi@bio.mie-u.ac.jp

化学分析では、1970年代に従来の化学試薬を用いた発色法による方法から、酵素などの生化学試薬を用いる方法が取り入れられて、より正確な分析が可能となった。すなわち、生体分子の高感度で高選択的な分子認識機能を利用しようとするもので、この方法を用いれば特定成分の分離操作も不要で選択性の高い分析が可能である。例えば、抗原抗体反応を利用する場合については、試料中の微量物質を検出することが可能であるが、実際の検出法としては、蛍光物質、酵素、ラジオアイソトープなどで抗体を標識するRIA法やELISA法などが用いられる。このような従来の検出方法は、操作が煩雑で測定に時間を要し、さらに分析機器が高価であるなどの問題があり、日常検査には適合しにくい。そこで、1980年代より、バイオセンサーを医療用センサーとして用いる試みがなされ始めた。

バイオセンサーの基本構成は、信号変換素子（トランスデューサー）と各生物素子を組み合わせたものである。実際のシステムとしては、トランスデューサーに生物素子の活性を損なわずに固定化する必要がある。これについては、1960年代の末から実用化されたバイオリアクターにおける固定化技術を応用し、様々な固定化法が用いられる。固定化された生物素子は被測定物質に対し特異的吸着や、選択的触媒反応等を行い、その結果誘起される化学種の濃度変化や熱的または光学的な変化などの化学的、物理的变化をトランスデューサーで最終的に電気信号に変換する、というのがバイオセンサーの基本的原理である。

このような生物素子とトランスデューサーを一体化した分析装置を作るというアイデアは1962年にClarkとLyonsにより最初に考え出された。彼らは、酵素溶液をセルロースチューブに封入して、酸素電極の酸素透過膜上に装着することを提案した¹⁾。その後1967年に、UpdikeとHicksによってグルコースオキシダーゼを固定化したポリアクリルアミドゲル膜で酸素電極を被覆した装置が作られ、はじめて固定化酵素膜を用いた酵素センサーが実現した²⁾。以後、酵素以外でも抗体などの生体物質や微生物、動植物細胞等を固定化したセンサーの研究開発が行われるようになったが、実際に実用段階にあるバイオセンサーは少ないというのが現状である。

当研究室においても、以前から様々なトランスデューサーを用いたバイオセンサーについての基礎的研究がな

されており³⁻⁵⁾、特に水晶振動子を用いた場合については、冷水塔におけるファウリング発生傾向を短時間で把握できるスライム、スケールセンサーとして実用段階にある^{6, 7)}。水晶振動子は、本来、水晶発振回路として安定な周波数を得るため、時計、通信機器、コンピュータなどに広く使われている一方で、超微量でてんびんとして化学分析にも使われる。この理論的な取扱いは、1959年、Sauerbreyによりなされ⁸⁾、水晶振動子マイクロバランス（Quartz Crystal Microbalance : QCM）と呼ばれている。これによると、水晶の発振周波数と質量変化との関係は、以下のような式であらわすことができる（式1）。

$$\Delta F = -\Delta m / A \cdot p \cdot t \times F \quad (\text{式1})$$

F (MHz) : 基本周波数, A (cm²) : 水晶振動子上の表面積, Δm (g) : 水晶表面の質量変化, p (g/cm³) : 水晶の密度, t (cm) : 水晶の厚さ

QCM分析に主に用いられている水晶振動子は、常温付近で温度変化による振動数変化の比較的小さいATカットのもので、また一般に基本周波数は低いと感度が悪くなり、逆に高いと水晶板が薄くなり破損しやすくなることから、9 MHzのものが用いられる。従ってこの場合、水晶振動子の電極上に1 ngの物質が付着すれば、周波数が約1 Hz低下することになる。

バイオセンサーを用いて、医療診断システムを構築するにあたり、その内容としてはナトリウム、カリウムといった電解質の測定を目的とするイオンセンサーを組み込んだ電解質分析装置、血液ガスの測定を目的とするガスセンサーを組み込んだ血液ガス分析装置、血糖（グルコース）、尿素、尿酸などの有機成分の測定を目的とする酵素センサー、さらに微生物センサー、免疫センサーなどがあげられる。そのうち特に本研究では、水晶振動子をトランスデューサーとして用い、従来法より迅速かつ簡便に分析しうる臨床検査用の免疫センサーシステムを構築することを目的とした。今回特にその測定対象としては、ヒト血清アルブミン（HSA）とした。3大生活習慣病の一つである糖尿病において、現在なされているその治療対策では、食事療法や投薬による血糖コントロールにより、主にその合併症を予防することが重要視されている。特に合併症の一つである糖尿病性腎症においては、その発症以前に尿中に微量なアルブミンが含ま

れる, いわゆる「微量アルブミン尿」が認められる。この微量アルブミン尿は糖尿病性腎症の早期診断に利用され, その結果, 腎症となる前に迅速な対応が可能となる。しかし, 一般に入手できるタンパク尿試験紙においては, 感度が低くてこの微量アルブミン尿は検出できない。このようなことから, 本センサーを開発することにより, そのシステムの規模からも一般家庭においても簡単に検査をすることが可能となり, 冒頭で述べた「予防医学」の見地からも非常に意義のあることである。

実験方法

1. 水晶振動子と水晶発振回路

水晶振動子は, 東興電子株式会社製で特注品である。直径 8 mm の AT カット水晶板の表裏に 20mm^2 の金電極が蒸着されており, この電極に DC5V の電流を印加すると水晶の逆圧電効果によって, 9 MHz の安定な発振周波数が得られる。また発振回路は Fig. 1 に示すような, TTL-IC (SN7400) からなる回路を自作して用いた。

2. システムの構成

Fig. 2 に示すようなシステムを構築して用いた。水晶振動子を脱着可能な状態で水晶発振回路に接続し, その発振周波数は IWATSU 社製の Universal Counter SC-7202 にてカウントした。SC-7202 と NEC 社製のパーソナルコンピュータ PC-9801VM とを, GP-IB インターフェースを介し接続することにより, 測定データを

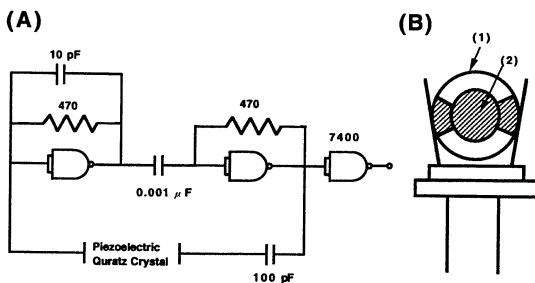


Fig.1. Schematic diagram of electric circuit constructed with transistor-transistor logic circuit (TTL) (A) and Piezoelectric Quartz Crystal (B).

(1): quartz crystal; (2): electrode

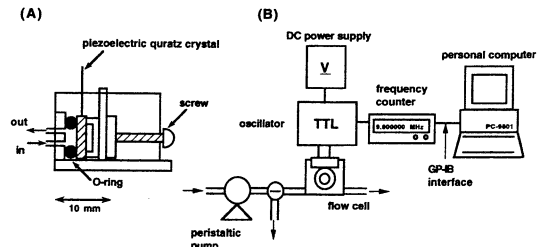


Fig.2. Flow cell (A) and Schematic diagram of experimental system (B). Various solutions were applied to piezoelectric quartz crystal, which the one side of electrode is contact with the liquid by peristaltic pump.

オンラインで処理した。またフローセルは図に示すようなセルを自作して用いた。

3. 抗 HSA 抗体の固定化

抗 HSA ポリクローナル抗体は, コスモバイオ社より入手した。この抗体を水晶振動子の金電極上にポリエチレンイミン (ナカライテスク社製) を介して固定化した。すなわち, 水晶振動子を 2% ポリエチレンイミン溶液に浸し, 薄膜を形成させた。風乾後, さらに 2.5% グタルアルデヒド溶液 (ナカライテスク社製) 中に浸し, 水晶振動子の電極表面にアルデヒド基を導入した。さらに抗体溶液を金電極上に広げ, 1 時間室温にて反応させた。反応後, 水晶振動子を超純水にて洗浄し, 抗 HSA 抗体修飾水晶振動子とした。

4. HSA の測定

抗 HSA 抗体修飾水晶振動子をフローセルにセットし, まず, 生理的リン酸緩衝液 (PBS; $50\text{mM}\text{KH}_2\text{PO}_4 + 0.15\text{MNaCl}$, pH7.5) を流し, 発振周波数が安定するまで送液した。続いて, $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液を流し, 非特異的吸着による周波数の低下を防ぐために水晶表面に対しブロッキングを行った。その後, 生理的リン酸緩衝液を再び流し, 発振周波数が一定であることを確認し, この値をベースライン値とした。それから $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ HSA を流した後, 再び, 生理的リン酸緩衝液を流した時のベースラインとの差を抗原抗体反応による変化量とした。測定は室温にて行い, また送液はペリスタポンプ (IWAKI 社製 PST100) を用い, $1.0\text{ ml}/\text{min}$ にて行った。なお, このシステムにおいて送液を開始してからセルに達するまでに要する

時間は約1分である。

結果と考察

1. 水晶発振回路の溶液中における発振の安定化

この研究を始めるにあたって特に問題となったのが、水溶液中、特に尿などのように各種イオンを多数に含む通電性のある溶液における水晶発振回路の異常発振であった。水晶振動子を用いたマイクロバランスは当初、気相系における利用が主であった。というのも水晶発振回路が乾燥状態でないと発振しないためであった。しかし、1980年代に入って、溶液中においても水晶発振回路は水晶振動子が溶液に浸った状態においても安定に発振することが見出され、QCMを溶液系に適用する試みがなされるに至った⁹⁾。また溶液中における水晶発振回路の発振も基本的にはSauerbreyの式が適用可能である。その際、水晶表面が溶液と接した状態では、水晶振動子は接する溶液相を引きずる形で振動することとなり、その結果溶液相は水晶振動子に対し質量負荷として作用し、発振周波数の低下を招く。しかし、通電性のある溶液中における発振は依然としてFig. 3に示すように極めて不安定であり、このような状態では微量な定量は不可能であった。そこで、我々は、このような現象が起こる原因として、溶液の通電性が発振回路に電気的な影響を与えているのではないかと、従って、水晶振動子の片方の電極のみが溶液と接しているならば安定に発振するのではないかと考え、Fig. 2に示すようなフローセルを

作製した。その結果、Fig. 4に示すように通電性のあるNaCl溶液中においても水晶発振回路が安定に発振するようになった。これは1秒ごとに周波数の時間的変化をプロットしたものである。この際、水晶片面にかかる溶液相の負荷は約8000Hzの周波数の低下に相当する。またFig. 5に示すように、安定な発振が持続し、セル内の溶液の交換も比較的迅速に、約10分で完全に行われていることが周波数の変化からわかる。さらに、水晶振動子の表面に接する溶液相は、振動子の振動に引きずられ質量負荷として働き周波数を低下させることから、溶液の濃度変化が発振周波数に及ぼす影響を検討した。その結果、Fig. 6に示すようにNaCl溶液の濃度に依って、周波数の低下が認められた。以上の結果から、作製したフローセルを用いた場合、NaCl溶液のような通

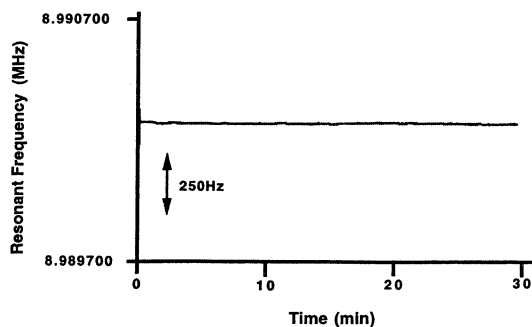


Fig. 4. Resonant frequency response in 0.5M NaCl solution. Only one side of electrode is in contact with the liquid.

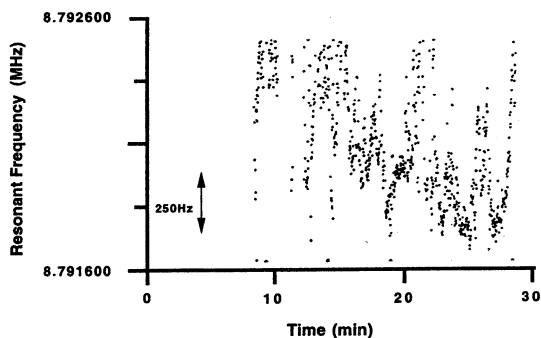


Fig. 3. Resonant frequency response in 0.5M NaCl solution. Both sides of electrode are in contact with the liquid.

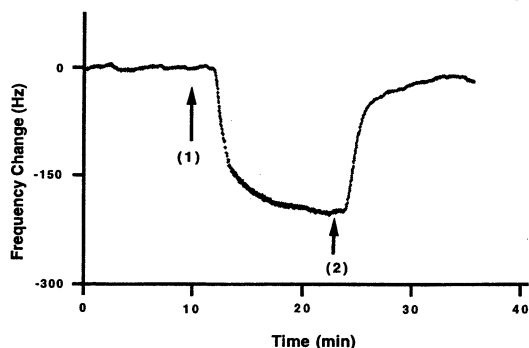


Fig. 5. Typical time course for the frequency change of the crystal when the concentration of NaCl is changed. NaCl concentration (M): (1) 1.0, (2) 0.5

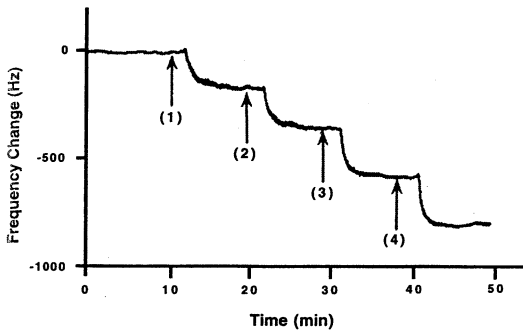


Fig.6. Typical time course for the frequency change of the crystal when the concentration of NaCl is changed.
NaCl concentration (M): (1) 0.5, (2) 1.0, (3) 1.5, (4) 2.0

電性のある溶液においても、水晶発振回路は安定に発振することが見出され、微量なレベルでの定量が可能であることが示唆された。

2. ヒト血清アルブミン (HSA) を測定する免疫センサーの構築

続いて今回構築したシステムを用いて、実際リン酸緩衝液中に含まれる微量な HSA の測定について検討した。その結果、Fig. 7 に示すように、BSA によるブロッキングの後、HSA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) との抗原抗体反応の結果と思われる周波数の低下が観察された。周波数の低下は約 20 Hz で、Sauerbrey の式に従うならば約 20 ng の HSA が検出されたことになるが、定量性に関しては、

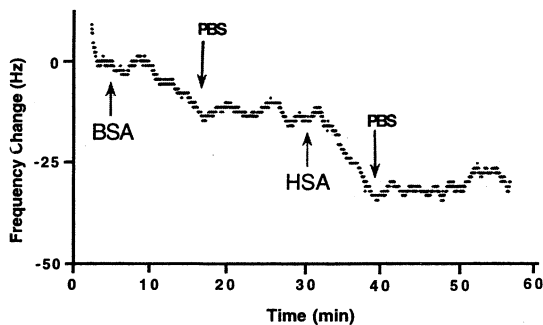


Fig.7. Typical frequency change on the addition of HSA or BSA to the crystal immobilized with anti-HSA.
Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$): BSA 100, HSA 10

実際のどの位の抗原と反応したかはイムノアッセイなど他の手法を併用し検討する必要がある。通常、健康人の尿中には個人差はあるが約 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の血清アルブミンが排出され、糖尿病性腎症をはじめとする各種腎疾患では、発症初期から増加し、約 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合「微量アルブミン尿」といわれ、腎症の早期発見の目安となる¹⁰⁾。従来繁用されている簡易検出法は、試験紙法や比濁法であるが、いずれも感度不足(検出下限: 数百 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のために、検出された時点で既に病気がかなり進行してしまっているという重大な問題点が指摘されてきた。従って、より高感度で簡便な分析法の確立が望まれるわけであるが、本報では特殊な設備や大がかりな測定機器を必要とすることなく、容易に QCM 法によって溶液中の微量な血清アルブミンが検出できることを示した。このシステムは特に大がかりな装置を必要としないためにコンパクト化が可能である。そこで家庭用さらには携帯用のセンサーを作製し、血糖値を測定するバイオセンサーと併用することで、常に糖尿病患者の健康状態をモニターでき、糖尿病性腎症の早期発見に一役を担うものと考えられる。このセンサーシステムを実用化するためにあたって今後の検討課題としては、まず実際の尿中の微量アルブミンが測定可能であるかという点と、センサーの再利用がどの程度可能かという点である。今回、ポリエチレンイミンを介した固定法以外に、 γ -アミノプロピルトリエトキシシランを介した方法についても検討した。この結果、検出感度については大差はなかった。また再利用という点に関してはポリエチレンイミンを用いた方法のほうが優れていたが、それでも数回が限度であった (data not shown)。このように今後は再利用を主眼においた抗体の固定化法について特に検討しなければならない。

1959 年に Sauerbrey により、水晶発振回路が微量でんびんとして利用可能であることが見い出されて以来、気相系、液相系を問わず様々な分野での利用が試みられている。なかでも免疫センサーのトランスデューサーとして QCM 法を用いることはかねてから検討されてきたことであるが、Guilbault らの検討で見られるように¹¹⁾、主に対象は微生物で、我々が検討したような HSA と比べると質量的にみてかなり大きく、また本研究で検討したような電極界面で起こる質量の動的変化を捉えた研究は少ないのが現状である。このように現在で

は QCM 法は単に微量てんぴんとしてのみならず、界面現象のその場測定に利用しようとする試みがなされている¹²⁾。従ってこれらの検討を行うことにより、今まで解明されていなかった多くの界面プロセスが解明できるかもしれない、QCM 法は電気化学の分野において新たな突破口になると考えられる。今後は、我々も単に QCM 法を用いた免疫センサーの開発にとどまらず、このような点を考慮にいたれた検討についても行なっていきたいと考えている。

和 文 要 約

糖尿病の初期には、糖尿病性腎症によって尿中に微量な血清アルブミン ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$) が含まれることが知られており、微量アルブミン尿と呼ばれている。我々はこの血清アルブミンを簡便に迅速に検出するために、水晶振動子マイクロバランスからなるバイオセンサーシステムの構築を試みた。当初、水晶発振回路は尿のようなイオンを含む溶液中において、その発振が不安定であった。そこで我々は水晶振動子の電極の片面のみが接するフローセルを自作し用いたところ、発振は安定となった。またポリエチレンイミンを介して抗アルブミン抗体を電極表面に結合させた水晶振動子を用いたところ、微量な血清アルブミン ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) が検出できた。このシステムを用いることにより、簡便に迅速に微量アルブミン尿をモニターすることが可能となる。

引 用 文 献

- 1) CLARK, L. C., Jr. and C. LYONS. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**: 29-45 (1962).
- 2) UPDIKE, S. J. and G. P. HICKS. The enzyme electrode, *Nature* **214**: 986-988 (1967).
- 3) TAGUCHI, H., N. ISHIHARA, K. OKUMURA and Y. SHIMABAYASHI. Investigation of methods of immobilization on a coated-wire electrode for the development of micro-biosensors, *Anal. Chim. Acta* **228**: 159-162 (1990).
- 4) TAGUCHI, H., N. ISHIHARA, K. OKUMURA and Y. SHIMABAYASHI. Application of a coated-wire electrode to an acetylcholine sensor, *Anal. Chim. Acta* **236**: 441-443 (1990).
- 5) TAGUCHI, H., N. ISHIHARA, K. OKUMURA and Y. SHIMABAYASHI. Biosensor for peptide determination constructed by immobilizing proteolytic enzymes on a coated-wire electrodes, *Anal. Chim. Acta* **239**: 13-17 (1990).
- 6) TAGUCHI, H., K. OKUMURA, Y. SHIMABAYASHI and Y. NOHATA. Investigation of a Scale and Slime Sensor System constructed with Piezoelectric Quartz Crystals, *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1239-1245 (1991).
- 7) NOHATA, Y. and H. TAGUCHI. Investigation of a Foulant Sensor System Constructed with Piezoelectric Quartz Crystals, *Proceedings of 53rd International Water Conference* 370-377 (1992).
- 8) SAUERBREY, G. VERWENDUNG VON SCHWINGQUARTZEN ZUR WÄGUNG DÜNNER SCHICHTEN und zur MIKROWÄGUNG, *Z. Phys.* **55**: 206-222 (1959).
- 9) 野村 俊明, 嶺村 昭子. 水晶発振子の水溶液中における挙動とその微量シアン化物イオン定量法への応用. 日本化学会誌, **10**: 1621-1625 (1980).
- 10) MOGENSEN, C. E. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes, *N. Engl. J. Med.* **310**: 356-360 (1984).
- 11) PRUSAK-SOCHACZEWSKI, E., J. H. T. LUONG and G. C. GUILBAULT. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*, *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 173-177 (1990).
- 12) 益田 秀樹, 馬場 宣良. 水晶振動子微量重量測定法の表面, 界面観測への応用. 表面, **28**: 222-232 (1990).