

第1章 バイオ蛍光ガスセンシングと経皮ガス計測応用

張 耿^{*1}, 市川健太^{*2}, 飯谷健太^{*3}, 三林浩二^{*4}

1 はじめに

近年、呼気や経皮ガスに含まれる揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds, VOCs) は、疾患診断や代謝状態評価のための重要なバイオマーカーとして注目を集めている¹⁾。これらの VOCs は血液中の代謝産物や病態関連物質を反映しており、非侵襲的かつ簡便にサンプリングできることから、リアルタイムモニタリングへの応用が期待されている。従来、呼気や経皮ガス中の VOCs 分析には、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS)、プロトン移動反応質量分析法 (PTR-MS)、選択イオンフローチューブ質量分析法 (SIFT-MS) などの高感度分析手法が用いられてきた²⁾。しかしながら、これらの装置は大型かつ高価で、煩雑な操作を必要とするため、連続的なモニタリングには適さない。

筆者らは、酵素の基質特異性を利用した生化学的ガスセンサ (バイオスニファ, bio-sniffer) の開発を進めている。バイオ蛍光スニファは、酵素反応により生成または消費される還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化還元状態の変化を蛍光検出することで、特定の VOCs 成分を選択的かつ高感度に測定できる特徴を持つ。還元型 NAD (NADH) は 340 nm の紫外光励起により 490 nm の蛍光を発するため、この蛍光強度変化を指標として目的ガス濃度を定量することが可能である。本稿では、酵素反応を利用したバイオ蛍光ガスセンシング技術の原理と特徴について解説し、その経皮ガス計測への応用について詳述する。まず、ホルムアルデヒドとアセトアルデヒドのガス測定を通じてバイオ蛍光法を紹介する。次に、血液由来の揮発性バイオマーカーの経皮ガス計測について、安定かつ連続的な計測が期待される外耳部を対象として開発した小型システムや、その脂質代謝マーカーであるアセトンの計測応用など、ウェアラブル型外耳道アセトンガス計測システムへの展開を概説する。

*1 Geng ZHANG 東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所 センサ医工学分野
プロジェクト研究員

*2 Kenta ICHIKAWA 東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所
センサ医工学分野 助教

*3 Kenta IITANI 東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所 センサ医工学分野
講師

*4 Kohji MITSUBAYASHI 東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所
センサ医工学分野 教授

2 バイオ蛍光法を用いたガスセンシング技術

バイオ蛍光法を用いたガスセンシング技術を構築するため、まずホルムアルデヒドとアセトアルデヒドという2つの重要な揮発性有機化合物の測定システムを開発した。これらの研究を通じて、酵素反応を利用した高感度・高選択的なガス検出の技術基盤を構築した。

2.1 ホルムアルデヒド用バイオ蛍光ガスセンサの開発

ホルムアルデヒドは揮発性有機化合物の一種であり、建材や家具の接着剤、ウレタンフォーム、防腐剤および消毒剤などの工業用途で広く使用されている。世界保健機関（WHO）は居住空間におけるホルムアルデヒド濃度の基準値を80 ppbと定めているが、50 ppb以下の慢性的な曝露でも喘息リスクが増加することが報告されており³⁾、高感度な測定法の開発が求められている。

本研究では、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（FALDH）を用いた酵素反応系を用いた（図1）。FALDHは下式の反応にて、ホルムアルデヒドを酸化触媒する：

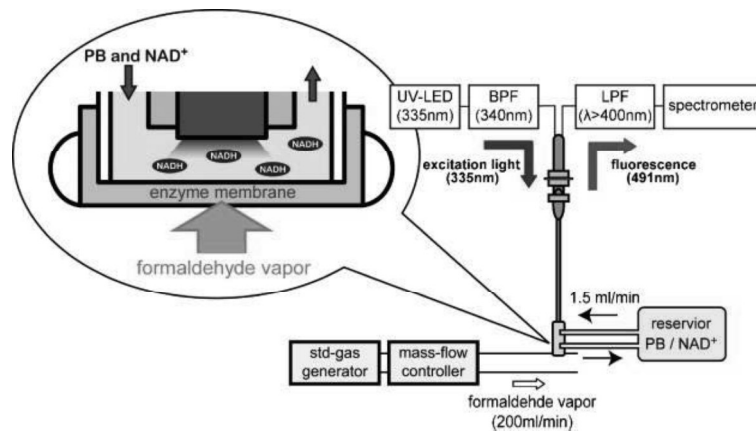
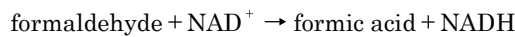


図1 UV-LEDを励起光源に用いたホルムアルデヒドガス用のバイオ蛍光ガスセンサおよび性能評価実験系

(ELSEVIERの許諾に基づき再掲載⁴⁾)

ホルムアルデヒド測定系には、335 nmのピーク波長を持つ紫外LED（UV-LED）を励起光源として用い、光ファイバ分光計により蛍光を検出する構成を用いた。酵素固定化膜は、親水性ポリテトラフルオロエチレン（H-PTFE）膜上に、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）と2-エチルヘキシルメタクリレート（EHMA）の共重合体（PMEH）を用い

て包括固定化法により作製した。この膜をフローセルの末端に装着し、気液隔膜として機能させることで、ガス相のホルムアルデヒドが酵素固定化膜に溶解し、 NAD^+ を含むリン酸緩衝液 (PB, pH 8.0, 80 mM) 中で酵素反応が進行する。

図2に示すように、標準ガス発生装置 (Permeator) を用いた評価により、本センサにて 2.5 ppb~10 ppm の濃度範囲でホルムアルデヒドガスの定量が可能であった。本センサではフローセル方式の採用により、 NAD^+ の連続供給と生成物の除去が可能であり、リアルタイムでの連続測定を行えることから、シックハウス症候群患者の在宅ケアや室内空気質管理への応用が期待される。

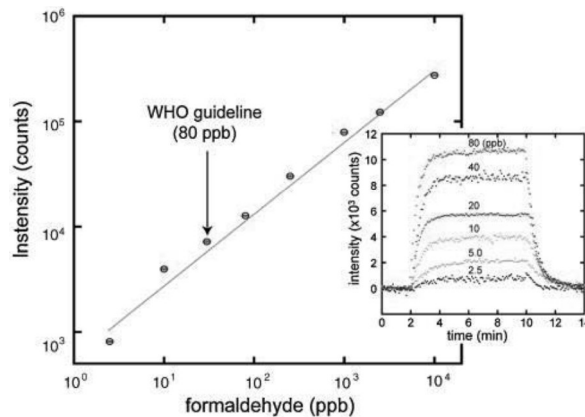


図2 開発したバイオ蛍光ガスセンサのホルムアルデヒドガスの定量性および応答性 (ELSEVIER の許諾に基づき再掲載⁵⁾)

2.2 アセトアルデヒド用バイオ蛍光ガスセンサへの応用

ホルムアルデヒド用のガスセンサシステムの技術をもとに、アセトアルデヒド (AcH) ガスの測定システムへと展開した。AcH は飲酒後にエタノールが酸化し生成される揮発性の中間代謝産物であり、DNA 損傷や腫瘍発生のリスクを高めることが報告されている⁶⁾。アジア人の約 40% はアルデヒド脱水素酵素 2 型 (ALDH2) の活性が低く、飲酒時の血中 AcH 濃度が高くなることが報告されている⁷⁾。呼気中 AcH 測定は非侵襲的な評価法として期待されている。そこで、アルコール脱水素酵素 (ADH) の逆反応を利用した高感度な AcH 用のバイオ蛍光ガスセンサを開発した。測定システムは、紫外 LED (335 nm)、光電子増倍管 (PMT)、二分岐光ファイバにて構成され、ガス検出部には ADH を PMEHL により H-PTFE 膜上に固定した酵素膜 (60 units/cm²) を隔膜とする気液フローセルを用いた。フローセルの液相側には補酵素溶液 (100 μM NADH, pH 6.5) を送液 (1.5 mL/分) することで、補酵素の供給、余剰基質および生成物の除去にて連続的に AcH ガス測定を可能とする。

ガス成分の高度なセンシング情報化

用いたADHは可逆酵素で、pH 8.5~9.5ではエタノール (EtOH) の酸化反応を、またpH 6.0~7.0ではAcHの還元反応(下式)を触媒し、AcHが還元される際にNADHが消費される。NADHは340 nm励起にて490 nmの自家蛍光を発するため、酵素反応での蛍光強度の減少からAcH濃度を測定する。

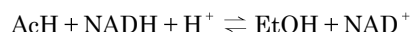


図3は、(a)アルコール脱水素酵素(ADH)による還元反応によるセンサでの各濃度の標準AcHガスに対する出力応答(差分)と、比較のため(b)アセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH)の酸化反応によるセンサでの各濃度の標準AcHガスに対する出力応答(差分)を示したものである。この図に示すように、両測定ともガス濃度に応じた出力応答が得られた。図4(a)に、両センサのAcHガスに対する定量特性を示す。この図に示すように、(a)ADHによるセンサでは20~10,000 ppbの濃度範囲($R=0.997$)で、(b)ALDHによるセンサでは120~5,000 ppbの範囲($R=0.999$)で、(a)ADHを用いたセンサにて高感度かつ広い定量範囲にてAcHガスの測定が可能であった。上記結果に基づき、呼気中のAcH濃度(安静時: 24 ± 17 ppb, 飲酒後: 1.2~6.0 ppm)の計測には、(a)ADHの還元反応によるバイオ蛍光測定が適しているものと考えられる。

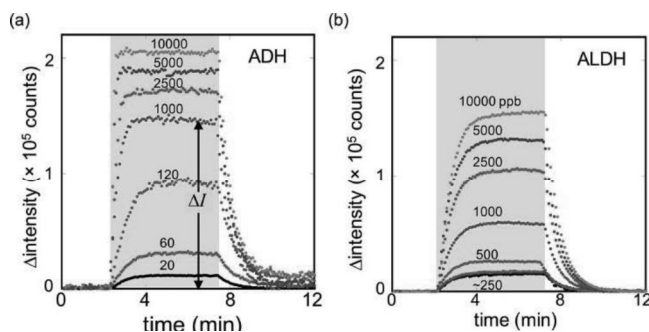


図3 (a)アルコール脱水素酵素(ADH)の還元反応、(b)アセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH)の酸化反応に基づくバイオ蛍光ガスセンサの標準アセトアルデヒドガスに対する出力応答の比較 (ACS Publicationsの許諾に基づき再掲載⁸⁾)

図4(b)に、ADH固定化バイオ蛍光ガスセンサの異なるガス種に対する出力比較を示す。この図に示すように、AcH(3 ppm)と比較して、エタノール(100 ppm)、メタノール(0.1 ppm)、2-プロパノール(0.1 ppm)、アセトン(0.6 ppm)にはほとんど応答を示さず、またエタノールの混合ガスにおいてもAcHガス(98.6%)を高精度に測定でき、本センサのAcHガスに対する選択性が確認された。