

トピックス

高輝度UV-LEDを用いたNADH蛍光検出式アルコール用バイオセンサ

A NADH fiber-optic biosensor for ethanol detection with a UV-LED excitation system

荒川 貴博, 宮島 久美子, 高橋 大志, 工藤 寛之, 三林 浩二
Takahiro ARAKAWA, Kumiko MIYAJIMA, Daishi TAKAHASHI,
Hiroyuki KUDO and Kohji MITSUBAYASHI

Abstract

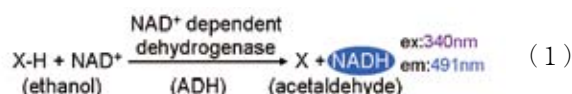
A fluorometric fiber-optic biosensor for ethanol determination was developed and tested. An ultraviolet light emitting diode (UV-LED) was used as a fluorescence excitation source for nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). The use of a UV-LED provided the advantages of low power consumptions and the potential for portable application. The biosensor consists of a UV-LED based portable excitation system ($\lambda = 340$ nm), a fiber optic spectrometer and an optical fiber probe with an alcohol dehydrogenase (ADH) immobilized membrane. These instruments were connected using a Y-shaped optical fiber assembly. According to the experimental assessment, the power consumption was reduced to one percent of general UV light source. The measurement system was useful for 1.00 – 300 μ mol/L of NADH. EtOH measurement was also demonstrated. The wide calibration range of the EtOH biosensor was 0.10 – 100.00 mmol/L, with high selectivity versus other chemical substances. The biosensing system was simplified and miniaturized by use of LED in compare with previous methods. For this advantage, the biosensing system is expected to apply for point-of-care testing applications and daily health care tests.

Key Words : biosensor, fiber-optic, NADH, ethanol, enzymatic sensor, UV-LED

1. はじめに

飲酒により経口摂取されたアルコールは、小腸を中心とする消化管において吸収された後、血流を介して全身に分布する。体内に取り込まれた大半のアルコールの90%以上が肝臓において代謝されて、まずアセトアルデヒドに分解される。この代謝は、肝臓中の細胞質にあるalcohol dehydrogenase (ADH) を介して、補酵素であるnicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) の存在下で行われる。その際、アルコールから水素原子が失われ、NAD⁺に受け渡されNADHが生じる(式1)。アルコールが肝臓に蓄積すると、肝細胞中のNADHが増加し、飲酒後に生じる高乳酸血症、高尿酸血症、高中性脂肪血症などの原因となる¹⁾。アルコール代謝機能は個人差が大きく、飲酒に伴うアルコール摂取量によっては健康障害を

引き起こす可能性もあり、アルコール代謝機能を知ることとは健康管理をする上で重要である。



現在、医療計測や食品検査、環境分析など、多様な領域においてバイオセンサが利用されている。バイオセンサは、各種酸化酵素を認識素子とするセンサが多く、基質である測定対象物質の酸化反応に基づく溶液中の溶存酸素の消費や生成される過酸化水素を検出することで、基質濃度を計測することができる。しかし、酸素を触媒反応での電子受容体として用いるため溶存酸素を必要とすることから、酸素濃度が反応を律速し、定量性が制限される問題点がある。一方、酵素の中には酸化型NAD⁺を電子受容体とし、NADHを生成する脱水素酵素が多数存在する。NADHは蛍光特性(励起波長: 340 nm, 蛍光波長: 491 nm)を有することから、酵素反応に伴うNADH濃度の変化を蛍光測定することで、溶存酸素に依

存しない高感度で定量性に優れた光学バイオセンサの開発が進められている^{2, 3, 4)}。また、近年NADH励起波長領域を含む、短波長領域のUV-LEDが開発され、既存の水銀ランプに比して小型で省エネルギー、高い安定性等の特徴を有している。

本報は、UV-LEDを用いた小型NADH蛍光検出システムを構築し、NAD⁺依存型脱水素酵素の一つであるアルコール脱水素酵素(ADH)を固定化したアルコール用バイオセンサを開発し、エタノールの液相計測に適用した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 UV-LED光源を用いたNADH蛍光検出システムの設計

蛍光検出と従来用いられる水銀ランプなどの大型光源を小型にすることを目的として、まず小型なUV-LEDを用いた励起光システムおよびNADH蛍光検出システムの検討を行った⁵⁾。光源としてUV-LED(UVTOP, $\lambda_p \approx 335$ nm, Sensor Electronic Technology, Inc., Columbia, USA)を使用した。NADHの蛍光検出システムの構成を図1に示す。本システムは、図2に示すUV-LED光源ユニット

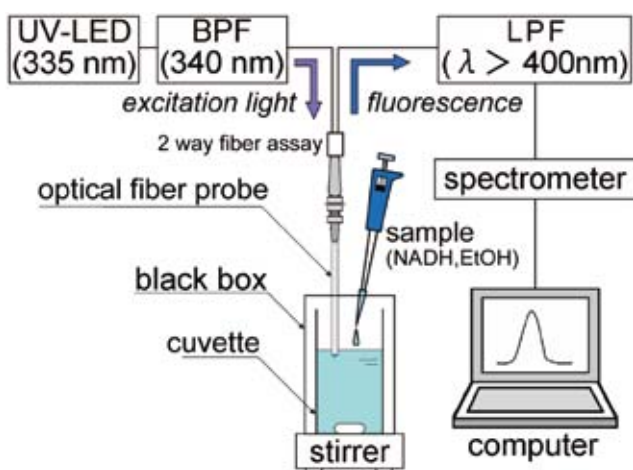


図1 光ファイバを用いたNADH蛍光計測システムの概略図
(Sens. Actuators B Chem, 141, 20-25, 2009)

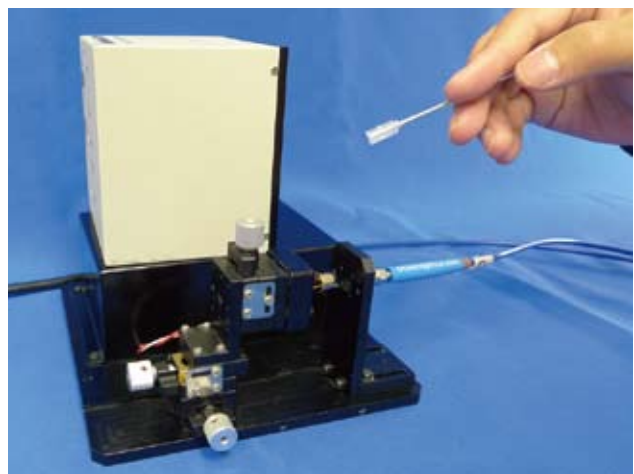


図2 高輝度UV-LEDを用いたバイオセンシングシステムの概観

からの照射光($\lambda = 335$ nm)をband pass filter (BPF: 340 ± 10 nm)及び光ファイバを介して試料溶液中のNADHを励起し、生じた蛍光(ピーク波長 491 nm)をlong pass filter (LPF: $\lambda > 400$ nm)を介して分光器にて検出し、NADH濃度を測定した。励起光導入、蛍光検出に用いる2分岐光ファイバ(BIF600-UV/VIS, SMA-905, Ocean Optics, Inc., FL, USA.)を使用した。

2.2 エタノール用バイオセンサの作製と評価方法

構築した計測システムをエタノール計測に適用するため、NAD⁺依存型脱水素酵素の触媒反応の一つとして生体内に存在するADHを用い、酵素溶液系におけるエタノール溶液計測を行なった。そして、連続測定が可能なセンサに適用するため、ADHおよび光ファイバプローブを用いて、エタノールの検出が可能な酵素溶液系センサを作製し、その特性評価を行った。

次に、エタノール用ADH固定化バイオセンサの作製を行った。アルコール脱水素酵素などの酵素を利用したバイオセンサは、熱や強酸、強アルカリ、有機溶媒に対して不安定であり、酵素反応を行うのに適した環境においても、酵素活性が問題となる。さらに、酵素は水溶性であり、酵素を水に溶かした状態で基質に作用させるバッチ法においては、反応液中から酵素を回収が困難である。したがって、酵素が触媒活性を持ったまま水に不溶性にした状態でセンサとして利用する必要がある。そこで、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)とメタクリル酸2-エチルヘキシル(EHMA)の共重合体(PMEH)を用いた包括法によりADH固定化膜を作製した。固定化材料として用いたPMEHは高い生体適合性を有している。図3にNADH蛍光検出式アルコール用バイオセンサの酵素固定化膜の作製方法を示す。ADH固定化膜の作製では、アルコール脱水素酵素としてADH(EC: 1.1.1.1)を用い、PMEHの混合液(6 units/ μ l)を、予め洗浄し乾燥させた面積4 cm²の親水性の多孔質ポリテトラフルオロエチレン膜(PTFE: thickness 80 μ m, pore size 0.2 μ m)上に含浸・塗布(60 units/cm²)し、冷暗所(4 $^{\circ}$ C)にて3時間乾燥させることで酵素を包括固定

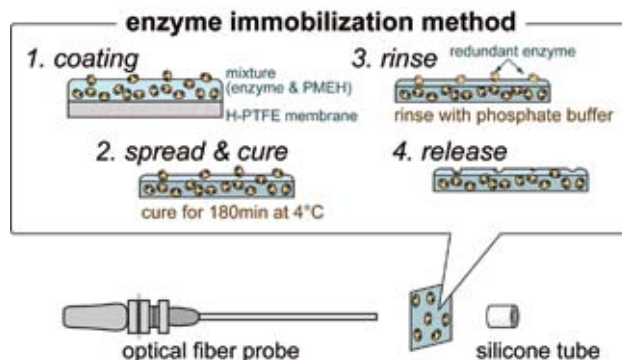


図3 NADH蛍光検出式アルコール用バイオセンサの酵素固定化膜の作製方法
(Sens. Actuators B Chem, 141, 20-25, 2009)

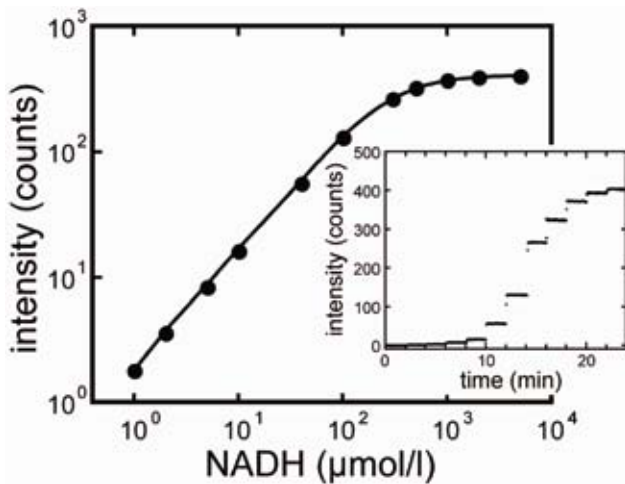


図4 NADH溶液に対する蛍光強度の変化と定量特性
(Sens. Actuators B Chem, 141, 20-25, 2009)

化し, ADH固定化膜を作製した. 2枚のADH固定化膜をシリコンチューブ (LABORAN SILICONE TUBE, 9-869-05, O.D. 2 mm, I.D. 1.5 mm, millipore) を用いて, 光ファイバプローブ (F1000-900 PROBE, Ocean Optics, Inc., FL, USA.) 先端に装着し, エタノール用バイオセンサとした. 暗箱内にて β -NAD⁺ (β -Nicotinamide-adenine dinucleotide, oxidized form, Oriental Yeast Co., LTD, Japan.) 20 mmol/lを混合したリン酸緩衝液 (pH8.0, 80 mmol/l) を満たしたキュベット (容量300 μ l) にバイオセンサの感応部を浸し, スターラーにてキュベット内を攪拌し, UV-LEDにて励起光を照射した状態で, 純水を用いて濃度調節を行ったエタノール溶液をキュベット内のエタノール濃度が目標とする濃度になるように滴下した.

3. 結果および考察

3. 1 UV-LEDを用いたNADH蛍光検出システムの構築と評価

暗箱内にて超純水を満たしたキュベットに励起光を照射した光ファイバ先端を浸し, 標準NADH溶液の滴下に伴う蛍光強度の出力変化を分光器を介し, コンピュータにて計測した. NADH溶液の濃度1.0 ~ 5000 μ mol/lに対するNADH蛍光出力の経時変化を調べたところ, NADH溶液の滴下に伴い, 著しい蛍光強度の出力増加が確認された. NADHに対する検量特性を調べた結果, 純水中のNADH濃度の増加に応じた蛍光強度の増加が確認され, 本システムにてNADH溶液を1.0 - 300.0 μ mol/lの濃度範囲で定量が可能であった(図4).

3. 2 ADHバイオセンサによるエタノールの蛍光計測

まず, 酵素溶液系にてエタノール計測を行った. 実験ではNADH計測で利用した実験系にて, NAD⁺とADHを含むリン酸緩衝液を満たしたキュベットに光ファイバ先端を浸し, 標準エタノール溶液の滴下に伴い, 生成される

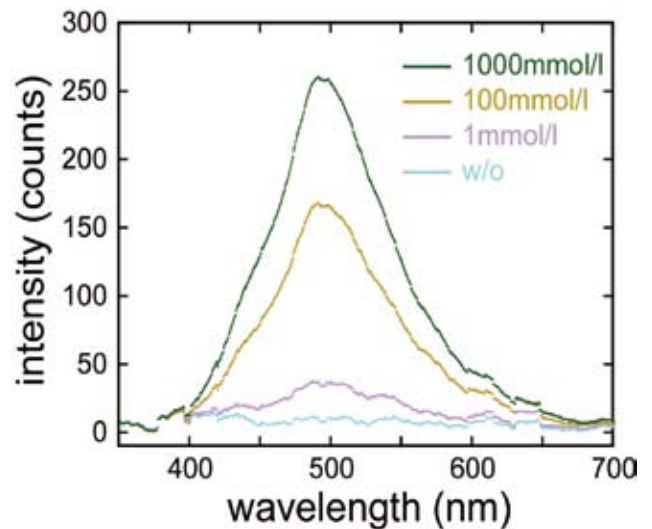


図5 アルコール用バイオセンサにおける各エタノール濃度に対するスペクトル変化
(Sens. Actuators B Chem, 141, 20-25, 2009)

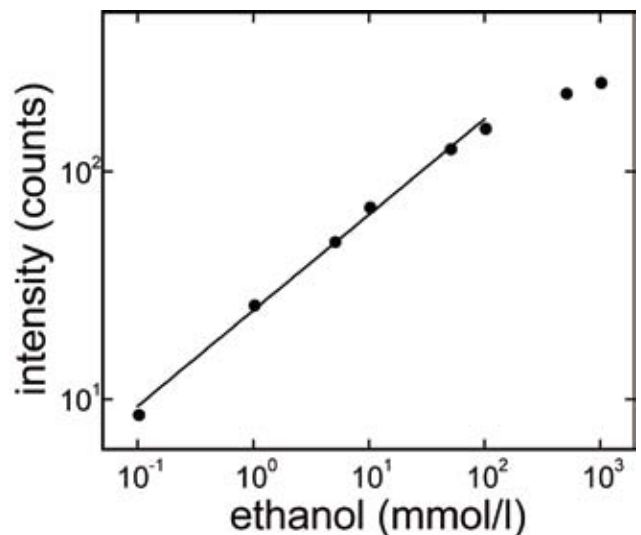


図6 エタノール溶液に対する定量特性
(Sens. Actuators B Chem, 141, 20-25, 2009)

NADHの蛍光出力変化を計測した. 実験の結果, エタノール溶液の滴下に応じた出力が得られ, この結果をもとにエタノール溶液の濃度に対する定量特性を調べたところ, エタノール溶液を5.0~10000 μ mol/lの濃度範囲で定量が可能であった (C.V. : 1.91 %, 1000 μ mol/l, n = 5). また, 本実験系のエタノール溶液に対する95%応答を調べたところ65 secであった.

次に作製したADH固定化バイオセンサのエタノール溶液に対する特性評価を行なった. このとき, キュベット内のエタノール濃度が0.01 ~ 1000 mmol/lとなるように滴下した. 酵素の触媒反応により生成されるNADHの蛍光強度の変化を分光器にて計測した. エタノール溶液に対するNADH蛍光スペクトルの変化を調べたところ, エタノール溶液の滴下に伴い, 濃度に応じた出力の増加が観察された (図5). ADH固定化バイオセンサのエタノール溶液に対する検量特性を調べた結果, エタノール濃

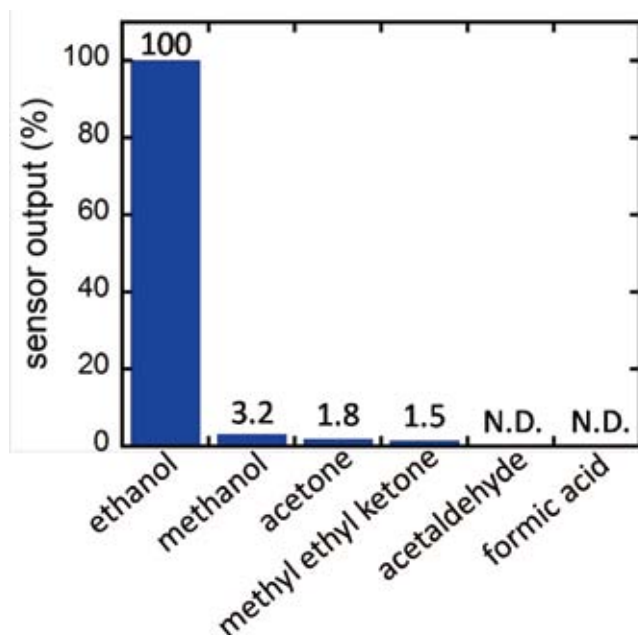


図7 アルコール用バイオセンサの選択性
(Sens. Actuators B Chem, 141, 20-25, 2009)

度の増加に対してセンサ出力の増加が確認され、本センサにてエタノール溶液を0.01~100 mmol/lの濃度範囲で定量が可能であった(図6)。また、本センサのエタノール濃度に対するセンサ出力の相関係数は0.991であり、精度良くエタノール溶液を検出することができた。5.0 mmol/lのエタノール以外の化学物質としてメタノール、アセトンメチルエチルケトン、アセトアルデヒド、ギ酸に対する選択性を評価した(図7)。エタノール溶液以外の成分にはほとんど応答を示さず、メタノールに対しても約30倍の出力差を得られ、酵素の基質特異性に基づく高い選択性が確認された。

4. まとめと今後の展望

本研究では、中心波長340 nmの小型のUV-LEDを用いた励起光システムおよびNADH蛍光検出型バイオセンシングシステムの検討を行った。LEDの利用によって水銀

ランプと比較して小型で制御に優れたシステムの構築が可能であった。構築したシステムを用いて、NADH溶液滴下により著しい蛍光強度の増加が確認され、NADH溶液を1.0~300.0 $\mu\text{mol/l}$ 、ADH固定エタノールバイオセンサを利用することでエタノール溶液を0.01~100 mmol/lの濃度範囲で定量が可能であった。このことからNADH蛍光検出による化学物質の計測が可能であると示唆された。今後は、他種の脱水素酵素と組み合わせることで、多様な化学物質計測が可能となり、医療・環境・食品分野での診断や検査に利用できるものと期待される。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金、科学技術振興機構「東京都地域結集型研究開発プログラム」及び文部科学省特別教育研究経費「センシングバイオロジーにおける基盤技術の戦略的推進事業」の助成により行われました。

参考文献

- 1) 石井裕正. 「アルコールの体内代謝と関連障害」, CLINICIAN, No.396, vol.37, 1990年12月, pp.1048-1055.
- 2) 三林浩二 監修. 「ユビキタスバイオセンシング—健康モニタリング&日常ケアのための計測技術—」, シーエムシー出版, 東京, 2006年1月, pp.31-38.
- 3) 三林浩二. 次世代センサハンドブック, 藍光郎監修, 培風館, 東京, 2008年7月.
- 4) 齊藤浩一, 三林浩二. 第25章 生体臭(生体由来の揮発成分)用センサ, ヘルスケアとバイオ医療のための先端デバイス機器, 三林浩二 監修, シーエムシー出版, 東京, 2009年5月.
- 5) H. Kudo, M. Sawai, X. Wang, T. Gessei, T. Koshida, K. Miyajima, H. Saito, K. Mitsubayashi, NADH-dependent fiber-optic biosensor for ethanol determination with a UV-LED excitation system, Sensors and Actuators B, 141, pp.20-25, 2009