

呼気中の乳酸濃度測定用バイオセンサーの作製

東北大学 安齊順一
(共同研究者) 同 鈴木巖
同 陳強

The Development of Biosensors for the Determination of Lactic Acid in Expiration

by

Jun-ichi Anzai, Iwao Suzuki, Qiang Chen,
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University

ABSTRACT

Electrochemical biosensors were developed for the determination of lactic acid in expiration. The lactic acid biosensors were fabricated using a platinum (Pt) disk electrode coupled with a thin film of immobilized enzyme (lactate oxidase, LOx). The surface of the Pt electrode was modified with LOx thin film by two different procedures; a cross-linking method and a multilayer film method. The cross-linking method employed bovine serum albumin (BSA) and glutaraldehyde together with LOx, in which BSA and LOx were chemically cross-linked with glutaraldehyde to form thin films on the surface of the Pt electrode. On the other hand, in the multilayer method, a mannose-labeled LOx and Con A were deposited alternately on the surface of the Pt electrode to form a layer-by-layer thin films. Both techniques gave useful biosensors to determine lactic acid in solution. Both sensors exhibited useful calibration graphs over the lactate concentration of 0.01-3 mM in solution. For the purpose of using the biosensors to determine lactic acid in expiration, the surface of the sensor was covered with a

dialysis membrane to form an aqueous gel layer adjacent to the electrode surface. The dialysis membrane-covered sensors, unfortunately, showed very small response to expiration, probably due to the low concentration of lactic acid in the expiration. In order to improve the performance of the biosensors, lactic acid should be concentrated in the aqueous gel layer or on the surface of the electrode.

要 旨

乳酸オキシダーゼと白金電極を組み合わせて乳酸を測定するためのバイオセンサーを作製した。架橋法と積層膜法の2通りの方法で白金電極の表面に乳酸オキシダーゼを固定化して乳酸センサーとした。架橋法では酵素と牛血清アルブミンをグルタルアルデヒドで架橋する方法を採用した。また、積層膜法では、マンノース修飾酵素とコンカナバリンAを交互に累積固定化して薄膜とする方法によった。いずれの方法で作成した乳酸センサーも、溶液中の乳酸に対しては良好な応答性を示した。しかし、前者の方法では作成されるセンサーの応答特性の再現性に難があること、また後者の場合には、作製に長時間を要することの欠点を有している。呼気中の乳酸を測定するために、センサーの電極表面をさらに含水ゲル膜（透析膜）で被覆して、電極表面を溶液中と類似の環境にした。含水ゲル膜を用いて電極表面に疑似溶液環境をつくることにより、このセンサーは空気中でも電流測定ができることが明らかになった。しかし、この状態でセンサー表面に呼気を吹きかけてセンサーの応答を検討したが、良好な結果を得ることができなかった。これは、センサーの構造上の欠陥ではなく、呼気中の乳酸濃度が低いことによるものと推定される。呼気中の乳酸を測定するためには、センサー表面で乳酸を濃縮するなど、今後何らかの方策を検討する必要がある。

緒 言

運動負荷時などにおける血液中の乳酸濃度を測定することは骨格筋などへの酸素供給状態を評価するうえで重要であり、運動生理学的に意義のあることである。

運動負荷の増強により、あるレベルから骨格筋は酸素不足に陥り、嫌気性代謝を動員する。このレベルは無酸素閾値と呼ばれ各人の運動能の評価の指標となる。この点で血中乳酸濃度が上昇し始めるので、乳酸を測定すれば無酸素閾値を評価することができる。この目的を達成するためには、運動負荷時などに間欠的に採血を行うことが必要である。しかし、採血には苦痛が伴うことや一定の技術が要求されることなどから、誰もが容易にできる方法とは云いがたい。また、この方法では採血試料は間欠的に得られるために、経時的に連続したデータを得ることは困難である。このような現状を考えると、採血することなく乳酸濃度を連続的に測定できる簡便な方法の確立が望まれる。無酸素閾値を評価するために、現在は呼気中の一酸化炭素や二酸化炭素などのガス分析が代用されることが多いが、誤差も多く改善が望まれている。

このため本研究では、乳酸濃度を測定するための電気化学バイオセンサーの作製を検討した。これまでに研究されている多くのバイオセンサーは、血液などの溶液試料を測定対象とするものなので、バイオセンサーを用いて測定を行う場合にも、血液または唾液などの溶液試料を採取することが必要となる¹⁻⁵⁾。これに対して、本研究では最終的

な目的をバイオセンサーによる呼気中の乳酸濃度測定として、この用途に適合する特性を備えた乳酸測定用バイオセンサーの作製を行った。従来、気体試料中の物質濃度を測定するバイオセンサーの研究例はほとんどなく、実用に供するバイオセンサーの開発は容易でないと予想されるが、ここではバイオセンサー表面を含水膜により被覆する方法を用いて電極表面に疑似溶液環境を作り、気体試料中の乳酸濃度を測定するバイオセンサーの作製を試みた。

1. 実験方法

1. 1 電極材料

本研究では電流を出力信号とする電気化学バイオセンサーを作製して乳酸を測定するものとし、電極材料には白金 (Pt) 電極を用いた。標準試料を用いてバイオセンサーの基本特性を検討する時には、直径3mmのPtディスク電極を直径6mm程度のテフロン棒に封入して自作した (図1 a)。また、バイオセンサー表面を含水膜で被覆する場合には、直径1cmのテフロン棒に直径1mmのPtディスク1本と同じサイズの2本の金 (Au) 電極が封入された電極を用いた (図1 b, BAS社製)。

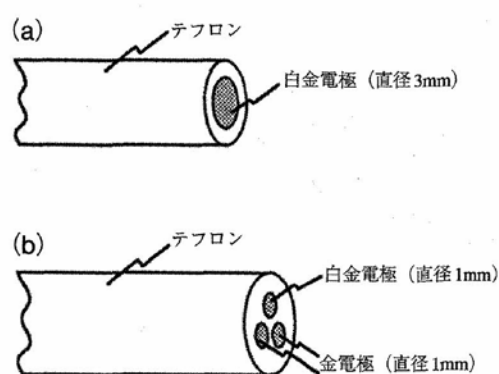


図1 乳酸センサーに用いる白金電極
(a) 自作電極 (b) 市販複合電極

1. 2 タンパク質および試薬類

乳酸オキシダーゼ (LOx, EC.1.1.3.2) は Boehringer Mannheim 社製をそのまま使用した。牛血清アルブミン (BSA) は Sigma 社より購入し

た。コンカナバリリン A (Con A) はナタマメよりの精製品を Vector 社より購入した。そのほかの試薬類は、試薬特級またはそれに準じる等級の市販品を用いた。

1. 3 乳酸測定用バイオセンサーの作製

自作した直径3mmのPtディスク電極をあらかじめアルミナ微粉末 (粒径0.05 μm) 懸濁液により研磨して表面を平滑にした。この表面を蒸留水で十分に洗浄して酵素で修飾した。酵素による修飾は2種類の方法 (架橋法および積層膜法) により行った。まず、架橋法による酵素膜の修飾は以下のように行った。既報に従い電解吸着法により電極表面にBSA薄膜を形成した¹⁾。次にこのBSA修飾電極を25%グルタルアルデヒド水溶液に20分間浸し、さらに5% LOx 溶液 (リン酸緩衝液, pH 7) に20分間浸した。この操作により、BSAとLOxがグルタルアルデヒドにより架橋されて電極表面にLOxが固定化され酵素薄膜が形成される。一方、積層膜法ではCon Aとマンノース修飾LOxを交互に一層ずつ吸着させて酵素薄膜とした。すなわち、Ptディスク電極を100 $\mu\text{g/ml}$ のCon A溶液 (リン酸緩衝液, pH 7) に30分間浸して表面にCon A単分子層を吸着させた。緩衝液で洗浄後、このCon A修飾電極を100 $\mu\text{g/ml}$ のマンノース修飾LOx溶液 (リン酸緩衝液, pH 7) に30分間浸して、Con Aとマンノースとの特異結合⁶⁾によりLOxを固定化した。以上の操作により、Con AとLOxの2層膜が形成されるが、この操作をくり返すことにより任意の層数のLOx積層膜を修飾することができる。

また、市販の複合電極を用いる場合にもほぼ同様の操作により、電極表面にLOx薄膜を固定化した。このようにして作製した乳酸測定用バイオセンサーは、緩衝液で十分に洗浄後使用するまで冷蔵庫内で緩衝液に浸して低温で保存した。

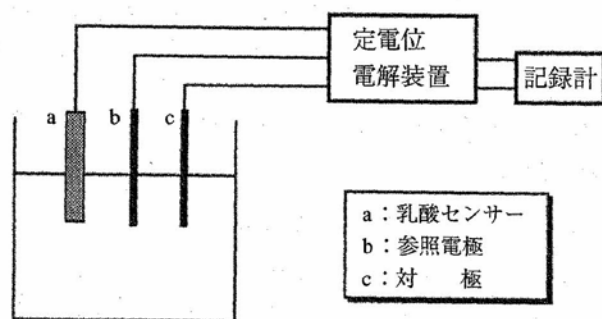


図2 乳酸センサーの応答特性評価の装置

1. 4 バイオセンサーの特性評価

乳酸に対するバイオセンサーの応答特性を評価するための装置の概略を図2に示す。リン酸緩衝液で乳酸標準液を作製して試料として用いた。試料中にLOx 薄膜修飾電極（バイオセンサー）、銀塩化銀参照電極および白金対極を挿入し、各電極を定電位電解装置（NPGFZ-2501, 日厚計測社製）に接続してバイオセンサー電極の電位を参照電極に対して+0.6Vに設定した。この状態で試料液中の乳酸濃度を変化させた時の電流値を測定して記録計に接続して出力信号とした。測定の際に、試料液はおだやかに攪拌した。

呼気または唾液中の乳酸を測定する際には、市販の複合電極を用いて作製したバイオセンサーの表面を透析膜で被覆して含水膜とした。含水膜に呼気を吹きかけることによる出力信号の変化を観察した。

2. 結果と考察

2. 1 溶液系における乳酸センサーの基本特性

2. 1. 1 架橋法により作製した乳酸センサー

作製した乳酸センサーを緩衝液に浸して、試料液に乳酸を順次添加した際のセンサーの電流値を測定した。その結果、試料液中に乳酸を添加すると電流値がすばやく増加し、10秒程度で一定値に達することがわかった。これは、電極表面に固定化されたLOxの触媒活性が保持されていることを示している。すなわち、電極表面のLOxにより(式1)の反応が触媒されて過酸化水素(H_2O_2)

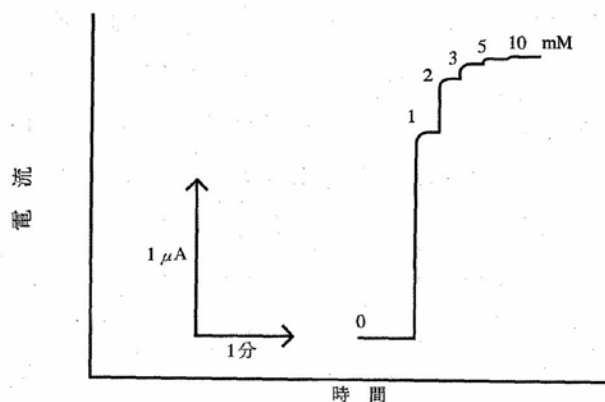
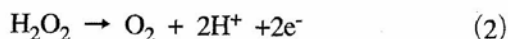
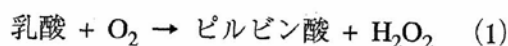


図3 架橋法による乳酸センサーの応答性

が生成し、この H_2O_2 が電極により電解酸化される際に流れる電流が出力信号として観察されたものである(式2)⁷⁾。試料液中の乳酸濃度が増加するにつれて電流値が増大したが、10mM以上の乳酸を添加してもそれ以上電流値の増加は見られなかった(図3)。



以上のように、架橋法により良好な乳酸センサーを作製することが可能であった。しかし、出力電流値が作製時の条件のわずかな差異に著しく依存することが判明した。そのために、作製したセンサー間の応答特性のバラツキが大きいことが問題として残された。

2. 1. 2 積層膜法により作製した乳酸センサー

Con Aとマンノース修飾LOxを電極表面に交互に固定化して積層膜とする方法は、図4のように模式化することができる。この方法の特徴は1回

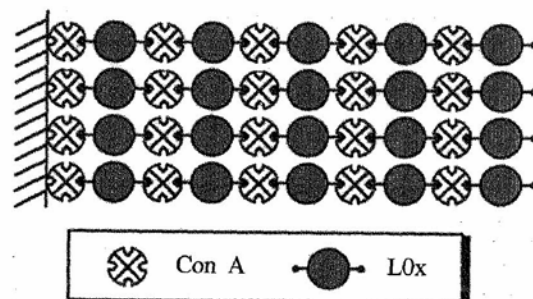


図4 積層膜法による酵素固定化膜の構造

の操作で固定化される LOx の量が一定であるために、作製される乳酸センサーの応答特性が標準化され、性能のバラツキを抑制することが可能であることである。すなわち、前述の架橋法により作製した乳酸センサーの欠点を克服できるものと期待される。また、酵素膜の積層数を加減することにより固定化される LOx 量を制御することができ、センサーの応答特性を調節することもできると思われる。

積層膜法で作製した乳酸センサーの応答を図 5 および図 6 に示した。0.01-3 mM の乳酸に対してすばやい電流応答を示すことが明らかになった。これは、既に述べた (式 1) および (式 2) の反応により、酸化電流が流れていることを示し、LOx が積層膜の中でも触媒活性を保っていることを示している。本研究では血液中の乳酸濃度の測定を直接の目的としている訳ではないが、乳酸の血中濃度は通常 1mM 程度なので、この乳酸セン

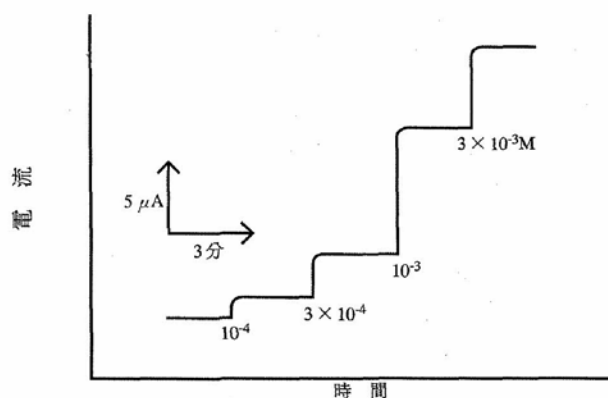


図 5 積層膜法による乳酸センサーの応答性 酵素膜：10 層

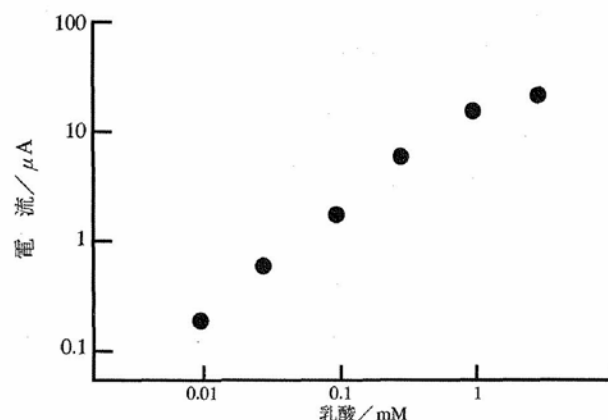


図 6 積層膜法による乳酸センサーの検量線 酵素膜：10 層

サーを用いて血中乳酸濃度を測定することも可能である。以上のように、本法では比較的再現性よく所定の応答性を示す乳酸センサーを作製することが可能であったが、欠点は酵素積層膜を電極表面に修飾する操作に比較的長時間を要することである (1 層の LOx を固定化するのに 1 時間程度必要とする)。

2. 2 呼気に対する応答性

すでに述べたように、架橋法および積層膜法のいずれの方法でも乳酸測定用バイオセンサーを作製することが可能であった。実際に乳酸センサーの呼気に対する応答を検討する際には、センサーを作製する煩雑さや作製に要する時間を勘案して架橋法によりセンサーを作製することとした。市販の複合電極の表面に酵素膜を固定化して、さらに表面を含水ゲル膜で被覆した。含水ゲル膜の材料として、市販透析膜、アセチルセルロース膜、ポリビニルアルコール膜、キトサン膜、ポリヒドロキシエチルメタクリレート膜、およびナフィオン膜を検討した。種々検討した結果、これらのうちで市販の透析膜を用いたときに最も良好な応答を示す乳酸センサーが作製できることがわかった。センサー表面に被覆した透析膜に緩衝液が十分に保持されている時には、このセンサーを緩衝液中から取り出して短時間空気中においても、比較的安定なバックグラウンド電流を与えた。電気化学バイオセンサーは通常は空気中で測定することは原理的に不可能であるが、本センサーは、複合電極の 3 極が透析膜に含浸された緩衝液と接しており、あたかも溶液中に存在するかのような疑似溶液環境にあるために測定ができると考えられる。従来、電流測定型のバイオセンサーは溶液中で使用することを念頭に設計されており、空気中での使用例は報告がなかった。今回、含水ゲル膜で電極表面を被覆するだけの簡便な方法で空気中での測定が可能であることが明らかになったことは呼気を測定対象とするバイオセンサーを開発するう

えで大変に有意義な結果である。この状態で呼気を吹きかけて、その中に乳酸が含まれていれば酵素反応により電流応答が観察されるものと思われる。

含水ゲル膜で被覆した乳酸センサーを被験者の口の前にマスク状に設置して、平静時および運動負荷時に被験者の呼気をセンサーに吹きかける実験を行った。平静時には呼気を吹きかけてもバックグラウンド電流にほとんど応答が見られなかった。一方、運動負荷時には乳酸センサーに接触する呼気の量が増えるに従い、応答電流にわずかな変動が見られたが、再現性に乏しく有意の変化とは認められなかった。次に、透析膜により被覆していることがセンサーの応答に好ましくない影響を与えている可能性を考え、透析膜部分に唾液を一滴塗布したところ、有意の電流値の増加が観察された。この場合には、唾液中に通常0.1-0.2 mM程度の乳酸が含まれているため⁸⁾、この乳酸が透析膜中を拡散して電極表面の酵素と反応して電流値が増大したものと思われる。したがって、呼気に対して有意の応答を示さないのは、乳酸センサーの構造上の問題ではなく、呼気中の乳酸含量が低いためであると推定される。ヒトの安静時の毎分換気量は6~9 lであるが、この値は運動強度に比例してほぼ直線的に増加し、最大で120~140 lに達する。また、この中に含有される乳酸の量は血中濃度から推定して0.1mg/l程度と考えられる。一方、乳酸センサー上の含水ゲル膜中で1 μ M程度の濃度とならないと測定は不可能である(図6)。1 μ Mの濃度となるためには、含水ゲル膜中に3 μ g程度の乳酸が存在すればよい計算になる。上記の換気量から考えて不可能な値ではないが、問題は換気中の乳酸をどのようにして含水ゲル膜中に吸収または濃縮するかであろう。

3. 結 論

2種類の異なる方法により乳酸測定用バイオセ

ンサーを作製した。これらのセンサーは溶液中の乳酸を測定するためには良好に機能した。また、電極表面を含水ゲル膜で被覆することにより、空气中でも測定可能な乳酸センサーとすることに成功したが、呼気中の乳酸を測定するためには感度が充分でなかった。これを解決し当初目的とした呼気中の乳酸を連続的に測定するセンサーとするためには、今後センサー表面で何らかの方法により乳酸を濃縮するなどの方策を考慮する必要がある。

謝 辞

本研究にたいして研究助成を賜った財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Suaud-Chagny. M. F. and Gonon. F. G.; Immobilization of lactate dehydrogenase on a pyrolytic carbon fiber microelectrode, *Anal. Chem.*, **58**, 412-415 (1986)
- 2) 井街 宏; 乳酸の連続測定装置, 臨床水電解質, **7**, 53-60 (1987)
- 3) Palleschi. G. and Turner. A. P. F.; Amperometric tetrathiafulvalene-mediated lactate electrode using lactate oxidase absorbed on carbon foil, *Anal. Chim. Acta*, **234**, 459-463 (1990)
- 4) Hajizadeh. K., Halsall. H. B. and Heineman. W.; Gamma-irradiation immobilization of lactate oxidase in poly (vinyl alcohol) on platinized graphite electrodes, *Anal. Chim. Acta*, **243**, 23-32 (1991)
- 5) Pfeiffer. D., Setz. K., Schulmeister. T., Scheller. F.W., Luck. H. B. and Pfeiffer. D.; Development and characterization of an enzyme-based lactate probe for undiluted media, *Biosensors & Bioelectronics*, **7**, 661-671 (1992)
- 6) Becker. J. W., Reeke, Jr. G. N., Cunningham. B. A. and Elelman. G. M.; New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A, *Nature*, **259**, 406-409 (1976)
- 7) Anzai. J., Takeshita. H., Kobayashi. Y., Osa. T. and

Hoshi. T. ; Layer-by-layer construction of enzyme multilayers on an electrode for the preparation of glucose and lactate sensors: Elimination of ascorbate interference by means of an ascorbate oxidase multilayer, *Anal.Chem.*, 70, 811-817 (1998)

8) Palleschi. G., Faridnia. M. H., Lubrano. G. J. and Guilbault. G. G. ; Determination of lactate in human saliva with an electrochemical enzyme probe, *Anal. Chim.Acta*, 245, 151-157 (1991)