

氏名(生年月日) 小^こ西^{にし}敦^{あつ}子^こ (1987年9月18日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博薬 第221号

学位授与の日付 2021年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 分子インプリントポリマーを感応素子としたグルタチオンおよびヒスタミン電位検出型センサーの開発と血清中ヒスタミンの定量分析への応用

論文審査委員 (主査) 教授 武上 茂彦

(副査) 教授 安井 裕之

(副査) 教授 田中 智之

論文内容の要旨

序論

疾病の予防や診断、治療のために、生体内成分やバイオマーカー、服用中の医薬品の血中濃度を定量することは極めて重要である。化学センサーは分析対象物質のリアルタイムモニタリングが可能であり、かつ簡便に測定できる分析機器である。化学センサーの中でも特に、酵素や抗体を感応素子として用いたバイオセンサーは優れた特異性と選択性を有する。しかし、バイオセンサーは、分析対象物質に制限がある、長期安定性に欠ける、熱やpH変化に弱い、といった欠点を有している。

分子インプリントポリマー(MIP)は、分析対象物質である鑄型分子の化学構造や官能基の位置を三次元的に記憶し、鑄型分子を特異的に認識する。本研究では、MIPを感応素子とした臨床分析用化学センサーの基盤構築を目指し、棒状炭素電極上のプラズマ重合薄膜中にMIPを形成させ、鑄型分子がMIPと相互作用した際に生じるMIPの表面電位の変化を捉える電位検出型センサーの開発を試みた。鑄型分子としては還元型グルタチオン(GSH)およびヒスタミン(HTM)を選択し、これらを分析対象物質とした電位検出型センサーの応答性および定量性について検討した。また、作製した電位検出型センサーで得られた鑄型分子濃度と電位変化量の関係から、電位応答機構の解明を試みた。最後に、最適な条件の下で作製したHTM電位検出型センサーを血清中HTMの定量分析に適用し、本センサーの有用性について検討した。

第1章 グルタチオン電位検出型センサーの開発

MIPを感応素子とした電位検出型センサーの開発に関する基礎的知見を得るために、MIPと相互作用する複数の官能基を分子内に有するGSHを鑄型分子として選択し、GSHを特異的に認識するセンサー(GSHセンサー)の作製を試みた。鑄型分子に対するMIPの特異的な分子認識には、MIPを構成し鑄型分子と相互作用する機能性モノマーが重要な役割を担っている。そこでまず、GSHと機能性モノマーであるメタクリル酸(MAA)の配合比を変化させて作製したGSHセンサーについて、一定濃度のGSHに対する電位変化を測定した。その結果、GSH:MAA=2:32のモル比において、GSHセンサーは最大の電位変化量を示した。しかし、それよりもMAAが少ないあるいは多い配合比ではGSH

センサーの電位変化量は減少した。これは、MAA の増加により、GSH と MAA の複合体の量も増加し、MIP の構成部位である疎水性のプラズマ重合薄膜中に移行する複合体の量も増加するため、MIP の GSH への認識能が向上する傾向にあるが、過剰の MAA は MIP の GSH に対する特異的認識を阻害すると考えられた。したがって、MIP 作製段階における GSH と MAA の配合比は、GSH センサーの応答性に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。また、GSH:MAA=2:32 のモル比で作製した GSH センサーの電位変化量は、GSH の鑄型をもたない non-imprinted polymer センサーと比較すると 8.2 倍であり、GSH センサーが高い特異性を有することが示された。さらに、本 GSH センサーでは、 $1 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ から $2 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$ の GSH 濃度範囲において、GSH 濃度と電位変化量の間で直線性が観測された ($r=0.88$)。以上の結果から、MIP を感応素子として用いることにより、GSH を特異的に認識する電位検出型センサーが作製可能であることが示された。

第2章 ヒスタミン電位検出型センサーの開発および電位応答機構の解明

本章では、MIP を感応素子として用いた電位検出型センサーの測定可能な物質の適用範囲を広げるため、GSH よりも官能基が少なく、イミダゾール環と 1 つのアミノ基を有する HTM を鑄型分子として選択し HTM 電位検出型センサー (HTM センサー) の開発を試みた。第 1 章で、鑄型分子と機能性モノマーの配合比がセンサーの性能に影響を及ぼすことが明らかとなったため、種々の配合比で調製した MIP 粒子に対する HTM の結合量を紫外吸光度法により算出した。その結果、HTM:MAA=2:20 のモル比までは、MAA の増加に応じて HTM の結合量も増加する傾向であったが、HTM:MAA=2:25 では結合量が顕著に減少した。また、HTM:MAA=2:20 のモル比で作製した HTM センサーについて、 1×10^5 、 5×10^5 および $1 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}$ の 3 点の HTM 濃度における電位変化量との間の回帰直線式の傾きの値は 25.7 であった。この値をネルンストの式に適用すると、HTM センサーは 2 価のイオンに反応していることが示唆された。HTM の酸解離定数は 6.15 と 9.84 であることから、HTM は蒸留水中 (pH 5.5) ではプロトン化されたジカチオン体で存在しており、このジカチオン体が MIP に結合していると考えられた。以上より、HTM を特異的に測定可能な電位検出型センサーが作製可能であることが示され、センサーの電位応答には MIP への HTM のジカチオン体の結合が関与していることが明らかになった。

第3章 ヒスタミン電位検出型センサーによる血清中ヒスタミンの定量分析

最終章では、HTM センサーの臨床分析への応用に向けた基礎的検討をおこなった。まず、種々の濃度のウシ血清を含有した 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液中において、一定濃度の HTM に対する HTM センサーの電位変化量を比較した結果、血清含有率が 1% および 3% では、血清非含有リン酸緩衝液と有意な差は見られなかった。最後に、既知濃度の HTM 含有ウシ血清試料を 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液中に添加し HTM センサーで測定した結果、91~104% と良好な回収率を示した。以上より、血清含有率が 1% となるように試料を添加すれば、血清の影響を受けることなく HTM センサーを用いて HTM を定量できることが示された。

総括

本研究で、MIP を感応素子とした電位検出型センサーの開発に成功し、応答性と特異性を評価することでセンサーとしての妥当性を示すことができた。本センサーはバイオセンサーの課題を克服する新たな手段となる。また本研究結果は、臨床分析用センサーとしての応用の可能性も示唆することから、本センサーを用いて医療分野への貢献が期待できる。

論文審査の結果の要旨

《緒言》

疾病の予防や診断、治療のために、生体内成分やバイオマーカー、服用中の医薬品の血中濃度を定量することは極めて重要である。本目的として、酵素や抗体を感応素子としたバイオセンサーが一般に用いられているが、分析対象物質に制限がある等の欠点を有している。本研究で、申請者は分析対象物質を特異的に認識可能な分子インプリントポリマー (MIP) を感応素子とした電位検出型センサーの開発をおこなった。分析対象物質としては、これまで MIP の調製が困難であった水溶性物質である還元型グルタチオン (GSH) およびヒスタミン (HTM) を選択し、これらを分析対象物質とした電位検出型センサーの応答性および定量性について検討した。また、電位検出型センサーで得られた鑄型物質濃度と電位変化量の関係から、電位応答機構の解明を試みた。最後に、HTM 電位検出型センサーを血清中に添加した HTM の定量分析に適用し、本センサーの有用性について検討した。

《審査結果の要旨》

第1章 グルタチオン電位検出型センサーの開発

第1章では、MIP と相互作用する複数の官能基を有する GSH を鑄型物質とした GSH 電位検出型センサー (GSH センサー) の開発を試みた。申請者はまず、MIP の特異的認識能には、MIP の構成成分で鑄型物質と相互作用する機能性モノマーが重要な役割を果たしていると考え、MIP 作製段階における GSH と機能性モノマーであるメタクリル酸 (MAA) の配合比が GSH センサーの電位応答に及ぼす影響について調べた。その結果、GSH と MAA の配合比により両者の複合体形成の割合が変化するため、GSH と MAA の配合比が GSH センサーの電位応答の挙動に影響を及ぼすことを明らかにした。次いで、最適条件下で作製した GSH センサーの電位変化量が、GSH の鑄型をもたない non-imprinted polymer センサーのそれと比較して 8.2 倍であったことから、本センサーが高い特異性を有していることを明らかにした。以上より、申請者は、MIP を用いて GSH を特異的に認識する電位検出型センサーが開発可能であることを実証した。

第2章 ヒスタミン電位検出型センサーの開発および電位応答機構の解明

第2章では、HTM を鑄型物質とした HTM 電位検出型センサー (HTM センサー) の開発を試みた。第1章の知見を基に最適条件下で作製した HTM センサーについて、 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ の3点の HTM 濃度における電位変化量と回帰直線式の傾きの値を求めた結果、25.7であった。この値とネルンストの式から、HTM センサーの電位応答は、センサー表面の MIP の MAA と HTM のジカチオン体との相互作用により生じることを明らかにした。以上より、申請者は、HTM センサーが開発可能であることを示し、かつ HTM センサーの電位応答機構を解明した。

第3章 ヒスタミン電位検出型センサーによる血清中ヒスタミンの定量分析

第3章では、HTM センサーの臨床分析への応用に向け、血清中に添加した HTM の定量分析を試みた。申請者はまず、HTM センサーに対する血清の影響を調べた結果、測定溶媒中の血清が 1%まで希釈されれば、HTM センサーの電位応答は血清の影響を受けないことを明らかにした。次に、既知濃度の HTM 含有血清試料について、測定溶媒中に添加された血清が 1%となる存在下において HTM セ

ンサーでHTM濃度を測定した結果、91～104%と良好な回収率を得ることができた。以上より、申請者は、血清試料においても測定溶媒中の血清が1%に希釈されることで、本センサーを用いてHTMを定量できることを実証した。

《審査の結論》

本研究の新規性は、鑄型物質を特異的に認識できるMIPをセンサーの感応素子として用いることに着目し、これまでMIPの調製が困難であった水溶性物質を分析対象物質としたMIP電位検出型センサーの開発に成功するとともにセンサーの電位応答機構を解明したこと、また本センサーの血清試料測定への応用の可能性を見出したことである。本格的な実試料への本センサーの応用には感度の面において課題は残るものの、新規の臨床分析用化学センサーの開発に向けた足がかりとなる分析法として意義のある研究成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。