

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

2020 年度

小西 敦子

本論文は、以下の報文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、出版社から取得済みである。

基礎となる報文

- 1) Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Tatsuya Kitade. A molecularly imprinted polymer-modified potentiometric sensor for the detection of glutathione. *Anal. Sci.* **2019**, 35, 1111-1115. [第1章]
- 2) Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Tatsuya Kitade. Construction and studies of histamine potentiometric sensors based on molecularly imprinted polymer. *Curr. Anal. Chem.* **2020**, 16, 788-794. [第2章]
- 3) Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Yoko Idosaki, Tatsuya Kitade. Application of molecularly imprinted polymer-modified potentiometric sensor for quantitative determination of histamine in serum. *Anal. Sci.* **2020**, 36, 1561-1563. [第3章]

参考論文

- 1) Atsuko Konishi, Shigehiko Takegami, Shoko Akatani, Rie Takemoto, Tatsuya Kitade. Potentiometric and ^1H NMR spectroscopic studies of functional monomer influence on histamine-imprinted polymer-modified potentiometric sensor performance. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2017**, 8, 1000378.

目次

序論.....	1
第1章 グルタチオン電位検出型センサーの開発.....	5
第1節 緒言.....	5
第2節 実験材料および方法.....	7
第1項 実験材料.....	7
第2項 実験装置.....	7
第3項 GSH センサーの作製.....	7
第4項 GSH センサーの電位差測定.....	8
第3節 実験結果.....	9
第1項 重合開始剤の検討.....	9
第2項 GSH と MAA の配合比の検討.....	10
第3項 GSH センサーの定量性の検討.....	11
第4項 GSH センサーの選択性の検討.....	13
第4節 考察.....	15
第5節 小括.....	18
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.....	19
第1節 緒言.....	19
第2節 実験材料および方法.....	21
第1項 実験材料.....	21
第2項 実験装置.....	21
第3項 HTM センサーの作製.....	21
第4項 紫外吸収スペクトルの測定.....	21
第5項 HTM センサーの電位差測定.....	21
第6項 MIP 粒子の作製.....	21
第7項 MIP 粒子およびNIP 粒子に対する HTM の結合量の測定.....	22
第3節 実験結果.....	23
第1項 鋳型分子の除去の確認.....	23
第2項 プラズマ重合薄膜形成のためのモノマーの種類および重合時間の検討.....	24
第3項 HTM および MAA の配合比の検討.....	26
第4項 HTM センサーの定量性の検討.....	28
第4節 考察.....	30
第5節 小括.....	32
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.....	33
第1節 緒言.....	33
第2節 実験材料および方法.....	35
第1項 実験材料.....	35

第2項	実験装置	35
第3項	HTM センサーの作製	35
第4項	HTM センサーの電位差測定.....	35
第3節	実験結果.....	37
第1項	HTM センサーの応答性に及ぼす測定用溶媒の緩衝液中塩濃度の影響の検討.....	37
第2項	緩衝液中における HTM センサーの定量性の検討.....	38
第3項	緩衝液中における HTM センサーの選択性の検討.....	39
第4項	血清の影響の検討.....	40
第5項	血清に添加した HTM の定量.....	41
第4節	考察.....	44
第5節	小括.....	46
総括.....		47
謝辞.....		49
引用文献		50

なお、本文中および図表中で用いた略語は以下の通りである。

2-AM	:	2-Aminobenzimidazole
EDMA	:	Ethylene dimethacrylate
GSH	:	Glutathione
GSSG	:	Glutathione disulfide
HPLC	:	High performance liquid chromatography
HTM	:	Histamine
LC-MS	:	Liquid chromatography-mass spectrometry
MAA	:	Methacrylic acid
MIP	:	Molecularly imprinted polymer
MS	:	Mass spectrometry
NIP	:	Non-imprinted polymer
PPTF	:	Plasma polymerized thin film
PYR	:	Pyrrole
V-65	:	2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)
V-70	:	2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)

序論

血液検査や環境測定、研究用の一般分析に至るまであらゆる分野において化学物質の定性、定量は重要である。その手法として高速液体クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS)、ガスクロマトグラフィー質量分析計等が汎用され、いずれも高感度かつ特異的に分析対象物質を定量することが可能である。ところがこれらの方法は、いくつかの欠点を有する。例えば、測定には熟練した技術が必要である他、試料の前処理や、溶離液やカラムの選定といった測定条件の決定が必要である。さらに、これらの検査法で用いる測定機器は高価であることから、小規模な検査機関においては検査の導入が困難で外部機関へ委託している。そのため、検体採取から測定結果が得られるまでに時間がかかる。

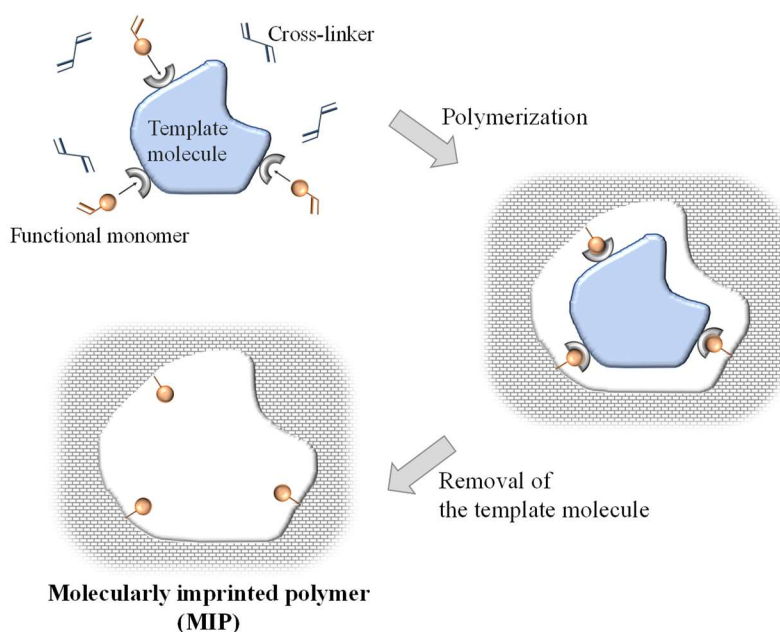
一方、目的とする分析対象物質の種類および量を測定する手段の一つとして化学センサー [1] がある。化学センサーは、分析対象物質を特異的に認識することにより生じた物理的変化や化学的変化を電気信号に変換する装置である。つまり、化学センサーは、分子認識部位である感応素子と、認識した情報を電気信号に変換する信号変換部より構成され、構造が単純である。そのため、安価かつ簡便に利用でき、微小化が容易である。また、化学センサーの取扱いには、上述の検査法と比較して熟練した技術が不要であるため、化学センサーは誰でも簡単に利用可能で、持ち運びのできる検査機器として利用されることも多い。さらに、他の検査法にない一番の利点は、検体から得られた情報を即座に電気信号へ変換するため、リアルタイムな測定が可能という点である。これらの特徴を有する化学センサーには、分析対象物質に合わせて適切な感応素子および信号変換部が組み合わせられ、様々なバリエーションが存在する。今なお新規化学センサーの開発は盛んにおこなわれており、特に感応素子の改良・開発に関しては努力が注がれている。またいかに感応素子を信号変換部へ効果的に組み込むかという点に関してもセンサーの性能を決定するうえで重要である。化学センサーの信号変換方法には、膜電位や酸化還元電流を計測する電気化学的計測、センサーに分析対象物質が結合、解離することにより生じる質量変化や周波数変化を計測する方法、センサーの電極上で起こる反応に伴い生じる熱量の変化を計測する温度計測などがある。具体的には、電気化学的計測としてはポテンショメトリー [2]、質量変化計測としては表面プラズモン共鳴法を用いたセンサー [3-5]、周波数計測としては水晶振動子マイクロバランス [6-8]、温度計測としてはサーミスター [9] がそれにあたる。また、広義的には分子認識部位のみがセンサーと定義される。例えば、測定溶液に電圧や電流を印加することにより生じる電流および電圧を測定するアンペロメトリー [10] やサイクリックボルタンメトリー [11,12] のみならず、分析対象物質の存在により生じる化学反応に伴う光の吸収や蛍光を検出する比色定量 [13,14] および蛍光検出 [15,16] などセンサーとして扱われることもある。また、化学センサーは、感応素子が認識する物質やその認識機構によって、イオンセンサーやガスセンサー [17,18]、バイオセンサーなどに分類される。化学センサーとしてまず開発されたのは、イオン選択性電極 (イオンセンサー) [19,20] である。イオン選択性電極は、分析対象とするイオンに選択的な感応膜の内外に生じる電位差からイオン濃度を測定する手法で、高い感度と選択性を有する。その始まりは、水素イオン濃度に応じた起電力を発生するガラス薄膜を感応膜としたガラス

電極であり、それが発展し他のイオンを計測できる種々のイオン選択性電極が開発された。さらにガスセンサーが開発されるようになる。これらの化学センサーの分析対象は主に無機物質であったが、その後有機物を分析対象とする測定の需要が拡大し、バイオセンサーの開発が進んだ。バイオセンサーは、感応素子として生体関連物質を用いており、酵素-基質反応を利用する酵素センサー [21,22]、抗原-抗体反応を利用する免疫センサー [23,24] などがある。これらの化学センサーは、環境測定や防災用ガスセンサーなどの家庭用および工業用、研究用の一般分析、食品検査や医療用など多岐にわたり利用されている。

医療分野において疾病の予防や診断、治療のために、健康状態の指標となる赤血球や白血球などの生体内成分の量や、疾病の存在や進行度を反映するバイオマーカーの濃度、服用中の医薬品の血中濃度等を測定することは極めて重要である。現在それらを測定する手法として、酵素免疫測定法や LC-MS 等と共にバイオセンサーが利用されている。臨床検査における代表的なバイオセンサーとしては、簡易血糖測定器 [25,26] があげられる。電極に酵素、補酵素、電子伝達物質であるメディエーターを充填しており、グルコースの存在によって生じる電極付近の化学反応から電子が放出され、一定の電圧を印加することで流れる電流値を測定する方法が一般的である。簡易血糖測定器は、血糖値を即座に測定でき、操作が簡単、機器のサイズもコンパクトであることから患者自身が測定可能で、日々の血糖コントロールのために汎用されている。以上のように、バイオセンサーは、酵素-基質反応や抗原-抗体反応など生体内における極めて物質識別能力の高い反応を利用しているため、優れた選択性を有する。ところが、生体関連物質を用いているがゆえ、分析対象となる物質に制限がある、長期安定性に欠ける、用いる試料が高価である、熱や強酸および強塩基性の pH 条件に弱い、といった欠点を有している。

これらの背景から、臨床分析法として新たな化学センサーの開発を試みるに至り、その感応素子として人工抗体とも呼ばれる分子インプリントポリマー (MIP) に着目した。MIP の模式図を Scheme 1 に示す。MIP は分析対象物質の鑄型を内部に包含した高架橋ポリマーで、一般的に以下の手順で作製される。まず、分析対象物質である鑄型分子と、鑄型分子の官能基と相互作用する官能基を有する機能性モノマーの複合体を形成させる。そこに架橋性モノマーを加えて重合し、最後に鑄型分子を除去する。このように作製した MIP は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ており、鑄型分子のみを選択的に認識し結合することができる。1990 年代に Mosbach らが本技術を確立して以降 [27,28]、その高い分子認識能と作製の簡便さから新たな分子認識素子として注目を集めている。これまでに、低分子医薬品 [29,30]、環境汚染物質 [31]、除草剤 [32]、ペプチド [33]、タンパク質 [34,35]、核酸 [36] など種々の物質を鑄型分子とした研究例や、がん細胞 [37] をターゲットとした研究例が報告されている。MIP は酵素や抗体と異なり、単離可能な物質は全て鑄型分子として用いることができるため、広範囲な物質に対してテーラーメイドな作製が可能である。加えて、機械的強度に優れ、熱や pH の変化に対して安定、結合した分析対象物質を除去することで繰り返し利用可能、市販のモノマーを用いて合成するため安価に作製することが可能、といった利点を有する。それゆえ、これらの利点を活かし、混合溶液から目的物質を選択的に抽出する分離媒体として、液体クロマトグラフィー [38,39] や固相抽出 [40-43] のカラム充填剤などへ

の応用が主に報告されている。本研究では、MIP の特異的認識能を利用し、MIP を感応素子としたセンサーの開発を試みた。上述する MIP の特徴から、MIP を感応素子としたセンサーは、バイオセンサーの有する改善点を克服した化学センサーとなることが期待できる。



Scheme 1. Molecularly imprinted polymer.

医療分野への応用に向けた将来的な展望として、新規臨床分析用センサーとして、MIP を感応素子としたセンサーを用い、生体成分をリアルタイムにモニタリングすることを目指している。患者の皮膚に常時穿刺することで、血液検査をいつでも・どこでも・誰でも簡単におこなえるようになる。また、これまでは採血時点の情報しか得られなかった血液検査で経時的変化をとらえることが出来るようになると思われる。それには、MIP センサーの針状超微小化が必須である。著者の所属する研究室では以前に、白金薄膜をコーティングしたガラス板を電極として、MIP を感応素子とした電位検出型センサーの基礎について報告している [44]。このセンサーは、白金薄膜表面に蒸着したプラズマ重合薄膜内部に MIP を含浸固定化することで、不導体である MIP に導電性を付与している。鋳型分子が MIP と相互作用し結合することで生じるセンサーの表面電位の変化を捉えるもので、わずかな電位の変化も素早く検出することができることを報告している。MIP を用いた電位検出型センサーの他の開発例としては、イオン選択性電極の選択性を向上させる目的で、可塑剤に分散させた MIP 粒子をイオン選択性電極の感応膜であるポリ塩化ビニル膜に埋め込む方法が報告されている [45]。それらと比較して、電極表面に MIP を固定化する本方法は、構造がより単純で針状超微小化が容易である。ところが、白金は酸化還元反応を触媒するため、検出したセンサーの電位変化が共存物質の酸化還元電位の影響を受け、センサーの目的物質との相互作用に対する純粋

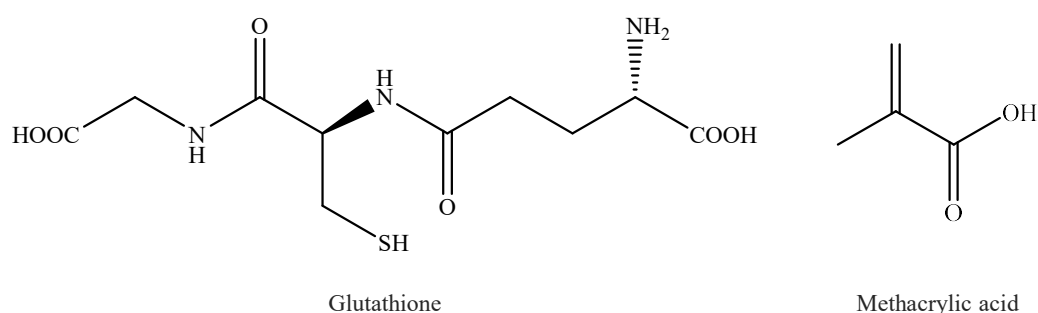
な応答に起因するものではない可能性があった。したがって本研究では、棒状炭素電極を用いてプラズマ重合薄膜内部に MIP を含浸固定化する方法を用いた。MIP を感応素子とした電位検出型センサーの基盤構築と、臨床分析への応用に向けた足掛かりとすべく、詳細な検討をおこなった。分析対象物質としては、低分子かつ水溶性の物質に焦点をあてた。低分子物質は分子が有する官能基が少ないため、センサーの認識する部位に限られる。それゆえ低分子物質を分析対象とする化学センサーの作製は、認識可能な部位を複数有する高分子物質を分析対象とする場合と比較して難しい。また、MIP は一般的に、構成される架橋性モノマーやポロゲンなどが疎水性であるがゆえ、疎水的な環境下である有機溶媒中で合成されている。そのため、適用できる鑄型分子の多くが疎水性物質となり、有機溶媒に溶解しにくい水溶性物質に対する MIP の作製は疎水性物質と比較して困難である。しかし、低分子かつ水溶性の物質を測定できれば、測定対象を広げることにつながり、MIP を感応素子としたセンサーの応用の幅が広がる。例えば、応用例として、薬物血中濃度のリアルタイム計測が挙げられる。治療薬物モニタリング対象医薬品の中には、分子内に有する官能基が少ない低分子医薬品も含まれる。また、腎不全患者における服用薬物の血中濃度や血清クレアチニン値の測定は、投与量の設計や腎機能のモニタリングに有用であり、それらへの応用も期待できる。腎不全患者では服用薬物の血中半減期の延長など体内動態に変化が見られることから、腎機能に応じた適切な投与設計が必要となる。腎排泄型薬物の多くは水溶性であり、MIP を感応素子としたセンサーは、血中の薬物濃度の簡便な測定法として利用できると期待される。さらに、低分子かつ水溶性物質の定量法が確立できれば、低分子疎水性物質および高分子物質を定量する分析法の開発につながると期待できる。そこで本研究では、以下に示す 2 つの水溶性物質を鑄型分子とし、MIP を感応素子としたセンサーの作製が可能であるかを検討した。また、電位差測定法における電極電位は、分析対象物質の濃度の対数値に比例して直線的に変化することがネルンストの式により定義されており、作製したセンサーの電位応答についてネルンストの式を用いて評価をおこなった。第 1 章ではまず、比較的小さな分子でありながら複数の官能基を分子内に有するトリペプチドであるグルタチオン (GSH) を鑄型分子として選択し、GSH 電位検出型センサーの開発をおこなった。まず、GSH を鑄型分子とした MIP の作製条件を検討した後、最適な条件で作製した GSH センサーの定量性および選択性について検討した。第 2 章では、GSH と比較して官能基が少ない物質においてもセンサーの作製が可能であるかを検討するため、分子内の官能基としてイミダゾール環とアミノ基を 1 つ有するヒスタミン (HTM) を鑄型分子として選択し、HTM 電位検出型センサーの開発を試みた。作製条件の検討をおこなった後、HTM センサーの定量性について検討した。第 3 章では、臨床分析への応用に向けた基礎的検討として、塩濃度や血清が HTM センサーの性能に及ぼす影響について検討した後、HTM センサーを用いた血清中 HTM の定量分析を試みた。

以下、各章に分けて詳述する。

第1章 グルタチオン電位検出型センサーの開発

第1節 緒言

棒状炭素電極に感応素子として分子インプリントポリマー (MIP) をコーティングした電位検出型センサーの応答性には、MIP の分子認識能が大きな影響を及ぼす。MIP による分子認識は、MIP の構成成分である機能性モノマーと分析対象物質が相互作用することでおこなわれる。したがって、機能性モノマーと相互作用する官能基を複数有する鑄型分子を用いることで、応答性の優れたセンサーの作製が可能ではないかと考えた。そこで、分子内にカルボキシ基2つ、アミド結合2つ、アミノ基1つ、チオール基1つを有する還元型グルタチオン (GSH) (Scheme 2) 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の作製が可能であるか検討した。また、機能性モノマーとしては、GSH の複数の官能基と相互作用することを期待して、分子内にカルボキシ基を有するメタクリル酸 (MAA) を選択した (Scheme 2)。



Scheme 2. Chemical structures of glutathione and methacrylic acid.

グリシン (Gly)、L-システイン (Cys)、L-グルタミン酸 (Glu) の3つのアミノ酸で構成されるグルタチオンは、ヒトの体内において主に肝臓で合成され、フリー体もしくはタンパク質と結合して細胞内に存在し、抗酸化作用により細胞防御に関与する [46,47]。フリー体で存在するグルタチオンのほとんどは還元型である。しかし、体内が過酸化物質や活性酸素種などの酸化ストレスに晒されると、グルタチオンは還元型から酸化型グルタチオン (GSSG) に変換され、還元剤として過酸化物質や活性酸素種を無毒化した後、グルタチオン還元酵素の働きにより素早く GSH へと戻る。以上のメカニズムにより、GSH は健康を維持するための重要な役割を果たす [48,49]。GSH と GSSG の存在比は、通常おおよそ 100:1 と圧倒的に GSH が多くの割合を占めているが、過剰な酸化ストレスにより 10:1 から 1:1 ほどの割合まで GSSG の存在量が増加する。それに伴う GSH 濃度の低下は、老化やがん、しわやシミ、糖尿病や脂質異常症および動脈硬化症などの生活習慣病、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病などの神経学的障害、リウマチ、AIDS などの疾患の病因と関連がある

と考えられている [50]。またグルタチオンは、種々の酵素やホルモン、アミノ酸の細胞内代謝に必須であり、細胞増殖に重要な役割を果たす。がん細胞中にはグルタチオンが高濃度に存在しており、がん細胞はグルタチオンの異物解毒作用を利用して抗がん剤耐性を獲得し、細胞増殖をおこなっていることが報告されている [51,52]。以上のことより、グルタチオンの細胞内および血中濃度の測定は、身体の健康状態やあらゆる病態の把握につながり、その意義は大きい。

グルタチオンの定量方法としては一般的に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や質量分析計 (MS) を用いた方法、蛍光光度法 [53,54]、キャピラリー電気泳動 [55] が知られる。HPLC や LC/MS では、5,5'-dithio-(bis-2-nitrobenzoic) acid (Ellman's reagent) [56,57] や *N*-ethylmaleimide [58,59]、2,3-naphthalenedialdehyde [60] などによりプレカラム誘導体化もしくはポストカラム誘導体化 [61] し紫外吸光光度法や蛍光光度法により検出する。また他のユニークな GSH 測定法として、Xu らは、GSH を検出する蛍光 turn-on “分子ビーコン” プロープの開発について報告している。GSH が、自己ハイブリダイゼーションしているビーコン DNA 鎖中のチミン-チミン (T-T) ミスマッチ結合と競合的に Hg^{2+} イオンに結合することを利用した方法である。つまり、GSH が選択的に Hg^{2+} イオンと結合することで DNA 鎖の T- Hg^{2+} -T 複合体が解離し、その結果 DNA 鎖の両端に結合させた蛍光物質とクエンチャーに距離が生じるため、蛍光が “on” になるという仕組みである [62]。また Zhang らは、 Mn^{2+} の存在によりシグナル強度が大きく減弱する新規 $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{cpaphen})^{2+}/\text{TPrA}/\text{TiO}_2$ 電気化学発光 (ECL) システムを構築し、GSH の還元作用により MnO_2 が Mn^{2+} に変換されることで生じる ECL 強度の変化から GSH 濃度を定量する方法を報告している [63]。これらの方法は高感度に GSH の定量が可能であるが、高価で大型な機器や熟練した技術が必要、誘導体化などの試料の前処理が必要、実験手順が複雑で時間を要する。加えて、最も重要な欠点は、GSH そのものを直接定量できるわけではないということである。一方、MIP を感応素子とした電位検出型センサーにより GSH を定量できれば、リアルタイムに GSH を直接定量可能となる。

そこで本章では、GSH を特異的に認識可能な GSH センサーの開発を目指した。まず GSH センサーの作製条件の検討をおこなった。第 1 項では、GSH センサーを構成する MIP を作製するために用いる重合開始剤について、適切な重合開始剤の選択をおこなった。第 2 項では、MIP の機能性モノマーとして用いる MAA の配合量を種々に変化させ作製した GSH センサーの応答性の違いを検討し、適切な MAA の配合比を決定した。続いて第 3 項および第 4 項では、最適条件下で作製した GSH センサーの定量性および選択性について検討をおこなった。以下、各項に分けて詳述する。

第2節 実験材料および方法

第1項 実験材料

炭素棒は Strem Chemicals 株式会社製（マサチューセッツ州、アメリカ合衆国）、Gly は東京化成工業株式会社製（東京）、Glu およびトルエンはナカライテスク株式会社製（京都）、エチルベンゼンは関東化学株式会社製（東京）を使用し、その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社製（大阪）を使用した。なお、エチレングリコールジメタクリレート（EDMA）は、含有する重合阻止剤であるヒドロキノン¹を5%水酸化ナトリウム水溶液により除去した後使用した。

第2項 実験装置

電位差測定に用いる電位差計には pH メーター F-52（株式会社堀場製作所製（京都））を用いた。

第3項 GSH センサーの作製

直径 3 mm、長さ 50 mm の炭素棒を、表面に付着した有機物を取り除くため表面が輝くまで紙やすりで十分に研磨し、新しい表面を露出させた。研磨後、蒸留水に浸漬しながら 5 分間の超音波処理を 5 回おこない、炭素棒表面に付着する削り片を取り除いた。浸漬する蒸留水は超音波処理ごとに入れ替えをおこなった。この炭素棒表面に、プラズマ重合装置を用いてエチルベンゼンをモノマーとしたプラズマ重合薄膜（Plasma polymerized thin film; PPTF）を形成した。次に第1膨潤として、重合開始剤、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム 0.16 g (0.55 mmol)、可塑剤であるフタル酸ジブチル 3.8 mL (14.3 mmol) を蒸留水 40 mL 中に分散させ、この懸濁液中に PPTF コーティング炭素棒を浸漬し、24 時間室温で攪拌することで重合開始剤を PPTF 内に浸潤させた。重合開始剤としては、2,2'-アゾビス (2,4-ジメチルバレロニトリル) (V-65) もしくは 2,2'-アゾビス (4-メトキシ 2,4-ジメチルバレロニトリル) (V-70) を用いて、V-65 の場合は 0.34 g (1.37 mmol)、V-70 の場合は 0.42 g (1.37 mmol) 秤量し、混合した。さらに第2膨潤として、鑄型分子である 2 mmol の GSH、機能性モノマーである MAA を種々の量、架橋性モノマーである 25 mmol の EDMA、多孔性溶媒であるトルエン 5 mL を部分けん化型ポリビニルアルコール 1000 水溶液 (10.67 g/500 mL) 45 mL 中に分散させ、この懸濁液中に第1膨潤後の炭素棒を浸漬し 24 時間室温で攪拌することで、MIP を構成する各成分を PPTF 内部へ浸潤させた。ヘリウムガスで脱気後、12 時間加熱することで重合をおこなった。重合温度は用いる重合開始剤によって変化させ、V-65 を用いた場合は 70-75°C、V-70 を用いた場合は、50-55°Cとした。最後に、炭素棒を蒸留水に浸漬し、炭素棒表面に形成された MIP 内部から GSH を除去し、GSH センサーとした。作製した GSH センサーは、測定時を除き蒸留水中に浸漬し保管した。また、GSH を加えずに同様の方法で作製したセンサーを non-imprinted polymer (NIP) センサーとし、比較として用いた。

第4項 GSH センサーの電位差測定

センサーの性能評価は、分析対象物質がセンサーに結合した際の表面電位の変化を計測する電位差測定法によりおこなった。GSH センサーまたは NIP センサーと参照電極を 100 mL の蒸留水に浸漬し、参照電極と各センサー間の電位の差を電位差計により検出した。参照電極には、銀-塩化銀電極を用いた。電位が安定した時点で測定を開始し、測定開始後 1 分において種々の濃度の試料 1 mL を添加した時、それにより生じる電位の変化を測定開始後 25 分間記録した。本測定系の電池式は、 $\text{Ag/AgCl, KCl (3.33 mol/L)} \parallel \text{試料溶液} \mid \text{MIP membrane} \mid \text{炭素}$ である。全ての測定は室温でおこなった。

第3節 実験結果

第1項 重合開始剤の検討

本センサーの性能を決定する大きな因子は感応素子である MIP の性能であり、分子認識部位を適度に保持する MIP の形成には、重合の過程が重要な役割を果たす。MIP は、重合開始剤の働きにより複数の架橋性モノマーおよび機能性モノマーが重合し得られる。すなわち、重合開始剤が熱や光により分解され活性種を生じ、この活性種が架橋性モノマーや機能性モノマーに反応して成長ラジカルを生成する。これが開始反応であり、続けて成長ラジカルが新たな架橋性モノマーや機能性モノマーへの付加を連鎖的に繰り返す成長反応が進行することで、MIP が合成される。この反応において、重合開始剤の分解が遅いと開始反応が律速となり重合が進行しない。一方、重合開始剤の分解速度が成長反応速度を上回れば、成長ラジカル同士の再結合や不均化などの停止反応が盛んになり、重合度の高い MIP を得ることが難しい。したがって、効率的に重合度の高い長鎖の MIP を合成するためには、開始反応と成長反応の反応速度のバランスが重要である。重合開始剤は、種類によりその分解速度が異なっており、重合過程における反応速度を決定することから、適切な重合開始剤を選択する必要がある。

そこで本項では、V-65 および V-70 の2種類のアゾ重合開始剤についてどちらが適切であるかを、各重合開始剤を用いて作製したセンサーの応答性より検討をおこなった。2種類の重合開始剤の特徴は下記の通りである。重合開始剤には、その分解速度の指標として、10時間で50%が分解する温度である10時間半減期温度がある。V-65の10時間半減期温度は51°C、V-70は30°Cである。V-65を用いる場合、室温ではほぼ重合することがなく取り扱いが容易である。ところが、高温による重合のためGSHの分解が危惧される。一方、V-70を用いる場合、低温で重合可能であるためGSHが分解される可能性は低い。しかし、室温でも重合が開始されるため作製手技を素早くおこなうなど取り扱いに注意を要する。

各重合開始剤を用いて作製したGSHセンサーを100 mLの蒸留水中に浸漬し、 $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ のGSH水溶液1 mLを添加した際の電位変化を測定した。GSHセンサーを作製する際のGSHとMAAの配合量は2および16 mmolとした。その結果をFigure 1(a)に示す。横軸に時間、縦軸に測定開始からの電位の変化をプロットしたものである。いずれのGSHセンサーもGSH添加直後に電位がプラス側に変化した。V-70を用いたGSHセンサーの電位変化量が約5 mVであるのに対して、V-65を用いたGSHセンサーが約20 mVと差が見られた。V-65を用いることでより良好な応答性を有するGSHセンサーが得られたため、以降のGSHセンサーの作製においては、重合開始剤としてV-65を用いることとした。

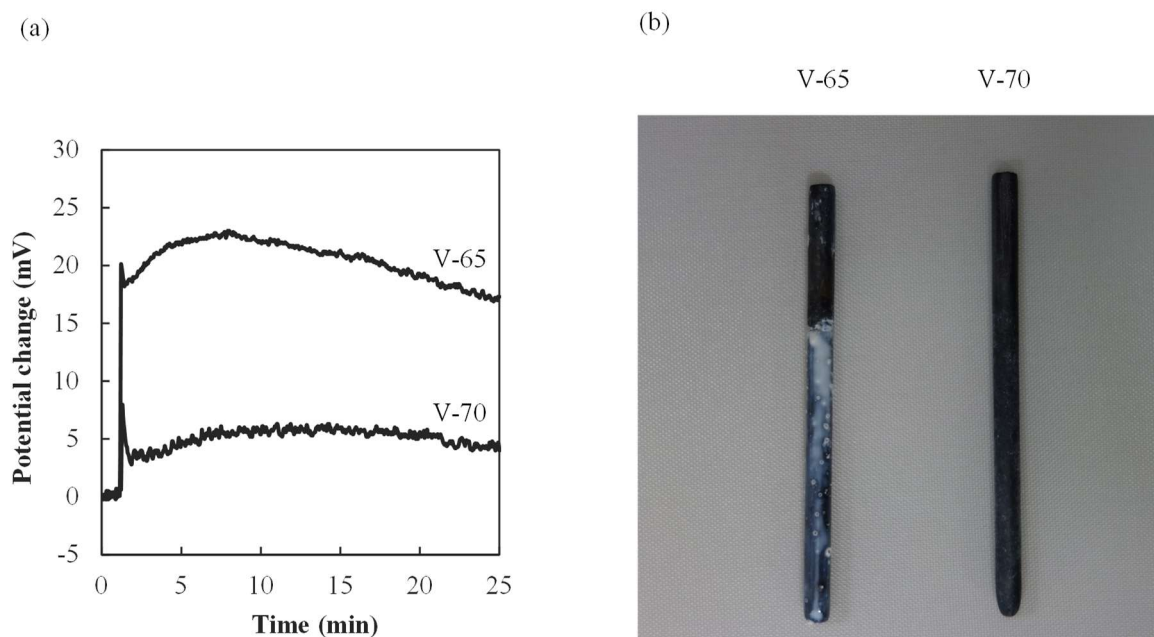


Figure 1. (a) Potential response curves of two glutathione (GSH) sensors composed using different polymerization initiators. After baseline measurement for 1 min, GSH aqueous solution (1 mL, 1×10^{-2} mol L⁻¹) was added to distilled water (100 mL). (*Anal. Sci.* **2019**, 35, 1111-1115., Fig. 2 より一部改変) (b) Two GSH sensors composed using V-65 (left) and V-70 (right) for polymerization initiators.

第2項 GSH と MAA の配合比の検討

MIP における特異的な分子認識は、MIP を構成し鑄型分子と相互作用する機能性モノマーがその一端を担っている。そこで、機能性モノマーとして用いる MAA の配合量を種々に変化させ作製した GSH センサーについて、一定濃度の GSH に対する応答性を比較することで、最適な GSH と MAA の配合比の検討をおこなった。

GSH が 2 mmol に対して、MAA を 4, 8, 16, 32, 64 mmol 配合した 5 種類の GSH センサーを作製した。作製したセンサーを 100 mL の蒸留水中に浸漬し、 1×10^{-2} mol L⁻¹ の GSH 水溶液 1 mL を添加した際の電位変化の様子が Figure 2(a) である。各配合比の GSH センサーを 3 本ずつ作製し測定をおこない、そのうち平均的な電位応答曲線を示した代表的な 1 本のデータを掲載している。いずれの GSH センサーも GSH 添加直後に電位が変化した。電位変化量および変化の様子は MAA の配合量により異なっていた。すなわち、GSH:MAA が 2:8 (B)、2:16 (C)、2:32 (D) のモル比で作製した GSH センサーは、GSH 添加直後に電位が変化し、25 分までおおよそ安定した電位を示した。Figure 2(a) には GSH を加えずに 0:32 (F) のモル比で作製した NIP センサーの電位応答曲線も併せて示しているが、NIP センサーは GSH の添加による電位上昇の後、緩やかに電位が低下した。以上のように、2:32 の GSH センサーと 0:32 の NIP センサーの電位変化の様子は大きく異なっていた。一方、2:4 (A) および 2:64 (E) のモル比で作製した GSH センサーの電位応答

曲線は、NIP センサーの電位応答曲線と類似していた。また、各モル比で作製した GSH センサーの 25 分における電位変化を Figure 2(b) に示す。3 本の平均により算出した本結果から、2:32 のモル比で作製した GSH センサーが再現性良く最も大きな電位変化を示すことが明らかとなった。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。以上の結果より、GSH が 2 mmol、MAA が 32 mmol の配合量で作製した GSH センサーが良好な応答性を有し最適であることが示された。

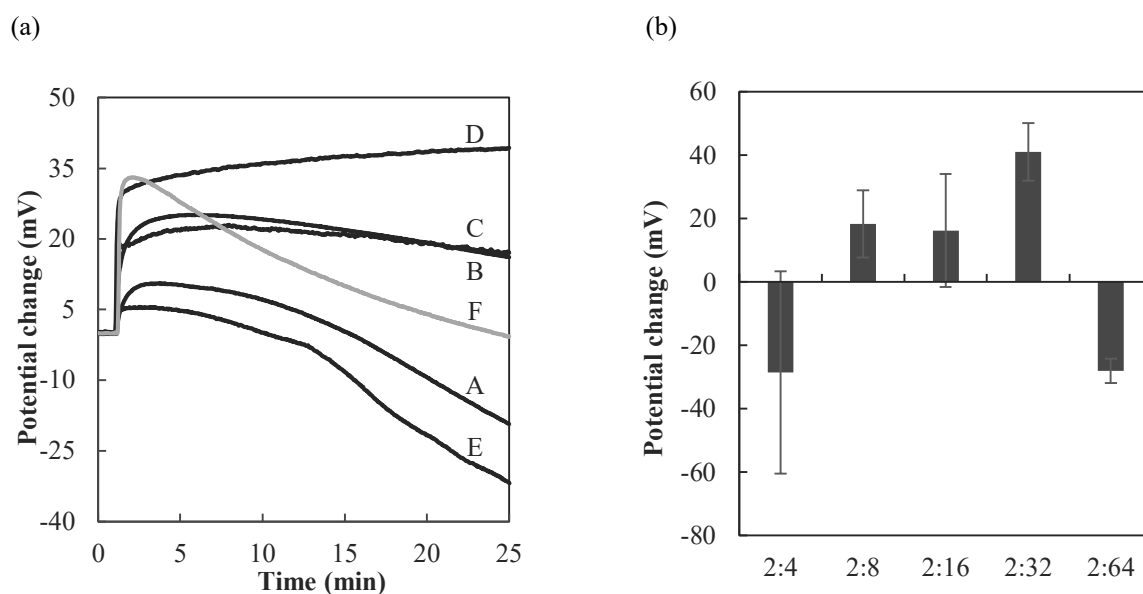


Figure 2. (a) Potential response curves of glutathione (GSH) sensors and non-imprinted polymer sensor as a function of methacrylic acid (MAA). After baseline measurement for 1 min, GSH aqueous solution (1 mL , $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) was added to distilled water (100 mL). GSH:MAA ratios are (A) 2:4, (B) 2:8, (C) 2:16, (D) 2:32, (E) 2:64, and (F) 0:32. (b) Potential changes of each GSH sensor at 25 min from the start of measurement ($n=3$). The ratio on the x-axis represents GSH:MAA content for the polymerization. (*Anal. Sci.* **2019**, 35, 1111-1115., Fig. 3 より一部改変)

第 3 項 GSH センサーの定量性の検討

GSH が 2 mmol、MAA が 32 mmol の配合量で作製した GSH センサーの定量性を検討するため、作製したセンサーを 100 mL の蒸留水中に浸漬し、濃度が $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ から $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ となるように、GSH 水溶液 1 mL を添加した際の電位変化を測定した。Figure 3(a) には、測定をおこなった 3 本の GSH センサーのうち、平均的な電位応答曲線を示した代表的な 1 本のデータを掲載している。GSH 濃度が $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 以上の濃度において、GSH 水溶液添加直後に電位が変化し、25 分までやや安定した電位を示した。さらに、 $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ の濃度を除いて、電位変化量は GSH 濃度の上昇と共に増大した。また、

Figure 3(b) には、各 GSH 濃度における電位変化量をプロットした。明確な応答が見られた $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ から $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ の濃度における測定での 5 分、10 分、15 分、20 分、25 分での電位変化量について、F 検定をおこなったところ有意な差が見られず、かつ各時間における電位変化量のばらつきは 25 分が最も小さかった (Table 1) ことから、25 分における値を用いて検討をおこなった。その結果、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 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、電位変化量と GSH 濃度との間の回帰直線式は、 $y=31.7x+167.2$ であった ($r=0.88$)。これは、GSH センサーが MIP の鑄型に結合した GSH の量を電位変化量として反映していることを示し、この濃度範囲において GSH センサーが定量性を有していることが示された。

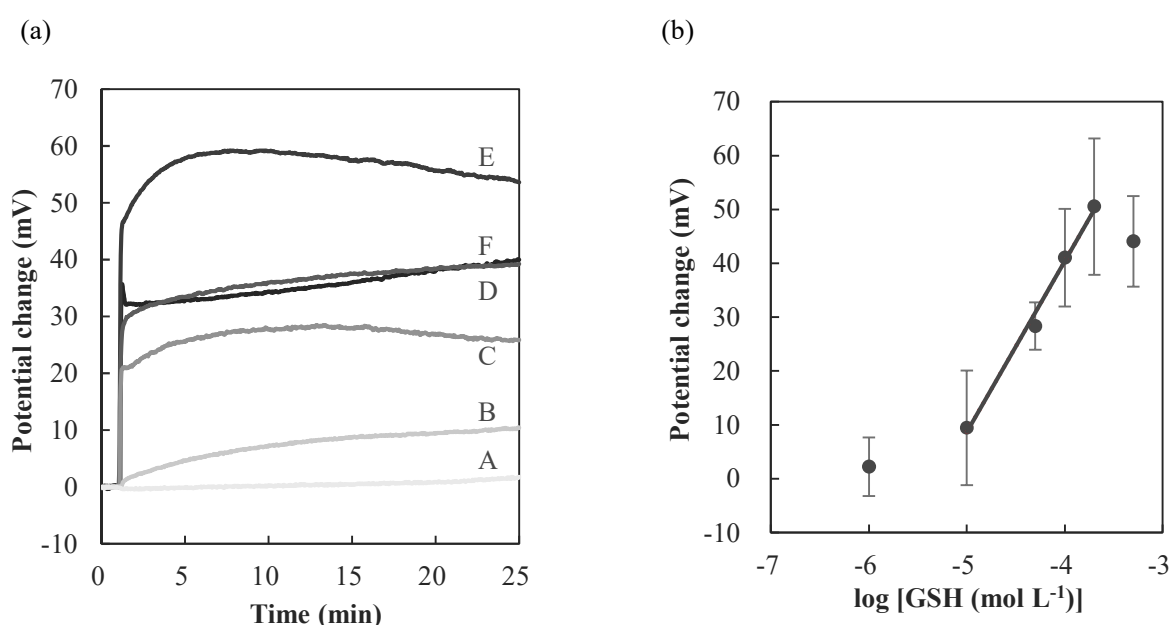


Figure 3. (a) Potential response curves of a glutathione (GSH) sensor with a GSH:methacrylic acid ratio of 2:32 after the addition of GSH aqueous solutions of varying concentration. After baseline measurement for 1 min, GSH aqueous solution (1 mL) was added to distilled water (100 mL). The final GSH concentrations were (A) 1×10^{-6} , (B) 1×10^{-5} , (C) 5×10^{-5} , (D) 1×10^{-4} , (E) 2×10^{-4} , and (F) $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Calibration curve for the GSH sensor as a function of varying the GSH concentrations. Potential changes were determined at 25 min for each GSH concentration ($n = 3$).

(*Anal. Sci.* **2019**, 35, 1111-1115., Fig. 4 より一部改変)

Table 1. Potential changes and correlation coefficients in each measurement time

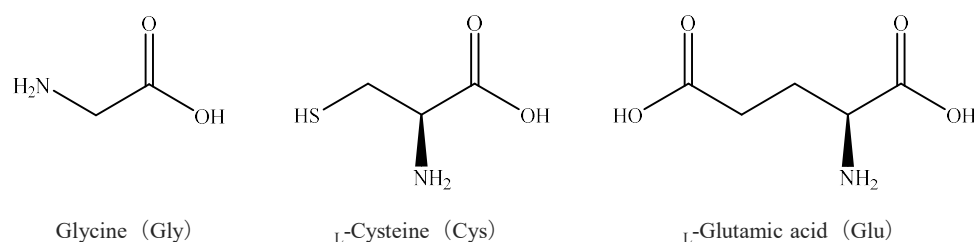
GSH concentration (mol L ⁻¹)	Potential change (mV) ^a				
	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min
1×10 ⁻⁵	5.8 ± 6.8	7.4 ± 8.4	8.3 ± 9.3	8.8 ± 9.9	9.5 ± 10.6
5×10 ⁻⁵	25.4 ± 1.2	27.6 ± 2.8	28.3 ± 3.4	28.4 ± 3.9	28.3 ± 4.4
1×10 ⁻⁴	38.1 ± 10.9	40.4 ± 11.1	41.2 ± 10.5	41.3 ± 9.6	41.1 ± 9.1
2×10 ⁻⁴	50.6 ± 13.9	51.9 ± 14.5	51.7 ± 14.0	51.3 ± 13.5	50.5 ± 12.7
5×10 ⁻⁴	49.4 ± 21.2	49.2 ± 18.5	47.7 ± 15.1	46.2 ± 11.7	44.1 ± 8.4
<i>r</i>	0.83	0.81	0.80	0.79	0.88

r: correlation coefficient

a. Each data represents the mean ± standard deviation (*n*=3).

第 4 項 GSH センサーの選択性の検討

GSH が 2 mmol、MAA が 32 mmol の配合量で作製した GSH センサーの選択性を検討した。GSH を構成する 3 つのアミノ酸、すなわち Gly、Cys、Glu に対する GSH センサーの電位変化を測定し、GSH に対する応答性と比較をおこなった。各物質の構造式を Scheme 3 に示す。



Scheme 3. Chemical structures of glycine, L-cysteine, and L-glutamic acid.

GSH センサーを 100 mL の蒸留水中に浸漬し、各物質の水溶液 1 mL を添加後の濃度が 1×10⁻⁴ mol L⁻¹ となるように添加した際の電位変化を測定した。25 分における電位変化量を Table 2 に示す。GSH センサーは Gly および Cys に対してほぼ応答しなかったが、Glu に対して GSH とほぼ同程度応答し、現段階において、GSH センサーのみで GSH と Glu を分別することは困難であった。Table 2 には、GSH を混合せずに作製した NIP センサーの各物質に対する電位変化を測定した結果も示している。NIP センサーに GSH を添加した際の電位変化は、GSH センサーに GSH を添加した際と比較して著しく減少した。一方、他の 3 種類に対する NIP センサーの電位変化の挙動はそれぞれ異なっていた。つまり、Gly に対してはほぼ応答せず、Cys に対しては負に大きな電位変化を示し、Glu に対しては GSH センサーと比較してわずかに電位変化量が減少した。

GSH センサーに対する電位変化量を NIP センサーに対する電位変化量で除した値 (GSH センサー/NIP センサー比) は、GSH センサーがどの程度 MIP の鑄型により各物

質を認識しているかを判断する指標となる。得られた電位変化から GSH センサー/NIP センサー比を算出した結果 (Table 2)、GSH の GSH センサー/NIP センサー比は 8.2 であり、他の物質と比較して極めて大きな値となった。このことから、本 GSH センサーが GSH を MIP の鑄型により認識していることが示された。

Table 2. Selectivity and specificity of the glutathione sensors (*Anal. Sci.* **2019**, 35, 1111-1115., Table 1 より一部改変)

	Potential change (mV) ^a		$\frac{\text{GSH sensor}}{\text{NIP sensor}}$
	GSH sensor	NIP sensor	
GSH	41.1 ± 9.1	5.0 ± 13.8	8.2
Gly	2.5 ± 1.9	1.1 ± 3.4	2.2
Cys	-2.4 ± 9.8	-101.3 ± 68.3	0.0
Glu	37.0 ± 7.3	21.1 ± 9.7	1.8

a. Each data represents the mean ± standard deviation of three determinations ($n=3$). Final concentration of each substance was 1×10^{-4} mol L⁻¹. GSH: glutathione, Gly: glycine, Cys: L-cysteine, Glu: L-glutamic acid.

第4節 考察

GSH を特異的に認識するセンサーの作製が可能であることを検討するため、種々の検討をおこなった。

まず、2種類のアゾ重合開始剤を用いた GSH センサーを作製し、それぞれの応答性を比較した。その結果、V-65 を用いて作製した GSH センサーの GSH に対する電位変化量は、V-70 を用いた GSH センサーより大きかった。このことより、V-65 は、高温による重合でも GSH の分解や、GSH と MAA の相互作用を阻害することなく、効率よく重合を進行させたと考えられた。これは、Figure 1(b) に示す通り、V-65 を用いた GSH センサーは、視覚的にもより強固に MIP を炭素棒に固定化できていることから確認できる。一方、V-70 では重合が不十分で GSH の鑄型が形成できていなかったと考えられた。

次に、GSH センサー作製段階における GSH および MAA の配合比について検討した。GSH:MAA=2:8、2:16、2:32 のモル比で作製した GSH センサーの電位変化の様子は安定していたことから、これらの GSH センサーは、素早く強い結合力で GSH を認識していると考えられた。一方、0:32 のモル比で作製した NIP センサーの電位変化は安定しておらず、GSH が NIP 表面に存在する MAA のカルボキシ基に非特異的に結合した後、再び緩やかに測定溶液中へと遊離していった結果であると推測された。また、2:4 および 2:64 のモル比では、NIP センサーと類似した電位応答曲線を示しており、これらのモル比では MAA が機能性モノマーとして十分機能していないと考えられた。Nakamura らは、本研究と同様に鑄型分子として GSH、機能性モノマーとして MAA を用いた MIP の GSH に対する親和性について報告している [38]。スキッチャード解析により、MIP および NIP の結合部位の解離定数と鑄型分子に対する最大結合部位数を算出しており、解離定数はそれぞれ $1.81 \mu\text{mol/L}$ および $3.65 \mu\text{mol/L}$ 、最大結合部位数はそれぞれ $212 \mu\text{mol/g}$ および $190 \mu\text{mol/g}$ であった。MIP が NIP と比較して小さな解離定数と高い最大結合部位数を示し、MIP が鑄型分子に対する高い結合親和性を有することを明らかにしている [38]。また Kamel らは、本研究と同様に機能性モノマーとして MAA、架橋性モノマーとして EDMA を用いた MIP を作製し、MIP の粒径から、MIP 内の鑄型の存在について報告している [45]。走査型電子顕微鏡を用いた MIP 粒子および NIP 粒子の表面形態の観察から、MIP 粒子および NIP 粒子の形はいずれも均一な球形で、その直径はそれぞれ $1.32\text{-}2.11 \mu\text{m}$ および $0.69\text{-}0.85 \mu\text{m}$ と、MIP 粒子がやや大きいことを報告している。その粒径の違いは MIP 粒子に鑄型が存在するためであると結論付けている。本研究においてもこれらの報告と同様の機能性モノマーおよび架橋性モノマーを用いて MIP の調製をおこなっており、NIP と比較して MIP 内部に GSH に対する高い親和性を有する鑄型が形成されることで、GSH センサーが GSH を特異的に認識したと考えられる。

さらに、各 GSH センサーの電位変化量は、MAA 量に依存してそれぞれ異なっていた。これは、MAA が少ない場合、MIP 作製段階において MAA と相互作用できる GSH が少なく、分子認識部位が適切に形成できなかったと考えられた。また、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、鑄型がより多く形成され、MIP の GSH への認識能が向

上する傾向にあると考えられる。一方で、過剰の MAA の存在により、鑄型が MIP 内部に埋もれ、MIP の GSH に対する特異的認識を阻害すると考えられた。以上より、MIP 作製段階における GSH と MAA の配合比は、センサーの応答性に大きく影響を及ぼし、機能性モノマー量は多すぎても少なすぎてもいけない最適量が存在することが明らかとなった。MIP における機能性モノマーの配合量に関しては、これまでも同様の見解が述べられている [64-66]。

続いて、GSH センサーの定量性について検討した結果、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ から $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ の GSH 濃度範囲における電位変化量と GSH 濃度との間の回帰直線式の傾きは 31.7 であった。電位差測定法における電極の電位 E を表す式にネルンストの式 (1) がある。

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \quad (1)$$

E^0 : 標準電極電位 (mV)、 R : 気体定数 ($8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

T : 絶対温度 (K)、 n : 移動電荷数、 F : ファラデー定数 (96485 C mol^{-1})、

C_{Red} : 還元剤の濃度 (mol L^{-1}) で通常 1 mol L^{-1} 、

C_{Ox} : 酸化剤の濃度 (mol L^{-1})

これに定数項を代入し常用対数に変換すると式 (2) が得られる。

$$E = E^0 + \frac{59.2}{n} \log[\text{ion concentration}] \quad (2)$$

つまりネルンストの式は、電極の電位は溶液のイオン濃度の対数値に対して直線的に変化し、その傾きは $59.2/n$ となることを意味する。GSH センサーの測定により得られた回帰直線式の傾きから、ネルンストの式を用いて n を算出すると、 n は約 2 と算出される。GSH の等電点は 5.9 [67]であり、測定溶媒である蒸留水中 (pH 5.5) において、アミノ基がプロトン化、ひとつのカルボキシ基が脱プロトン化した状態で存在していると考えられる。したがって、GSH センサーの GSH の認識による電位応答は、GSH が 2 個のイオンを有することにより生じた結果であると考えられる。

これまでに報告されている GSH の定量法のいくつかを Table 3 に示す。これらの手法は、優れた定量範囲や検出限界を達成している。それらと比較して本研究で示した方法は、感度が及ばず定量域も狭い。しかし、生体内における GSH 濃度が細胞内において $5\text{-}15 \text{ mmol L}^{-1}$ [68]、血液中において数百～数千 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、血漿中において数 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [48,69]であることから、本センサーが有する定量性は、生体内 GSH 濃度の定量を目標とすると良好な感度であると考えられる。今回の検討では、GSH に対する MAA の配合量のみ変化させることで、良好な応答性を示す配合比を選択し、定量性を評価した。一方、架橋性モノマーである EDMA の配合量や、第 2 膨潤での懸濁液における GSH、MAA、EDMA の濃度を変化させることで、センサー表面上の MIP 量、あるいは鑄型の数を変化させることができ、感度の向上につながることも期待できる。

Table 3. Literature value of previously reported methods for the determination of glutathione

Detection method	Linear range	Limit of detection	Ref. NO.
Fluorescence	3.3×10^{-9} - 1.0×10^{-7} mol L ⁻¹	1.3 nmol L ⁻¹	54
	2.9×10^{-7} - 1.0×10^{-4} mol L ⁻¹		
Fluorescence	5×10^{-9} - 2×10^{-7} mol L ⁻¹	4.4×10^{-9} mol L ⁻¹	62
Capillary electrophoresis	5.00×10^{-6} - 1.00×10^{-4} mol L ⁻¹	2.3×10^{-6} mol L ⁻¹	55
LC MS/MS	0.02-8.1 μ mol L ⁻¹	ND*	56
LC MS/MS	25-500 μ mol L ⁻¹	0.4 μ mol L ⁻¹	58
LC fluorescence	0.25-5.0 μ mol L ⁻¹	19 nmol L ⁻¹	61
Electrochemiluminescence	5-215 μ mol L ⁻¹	0.33 μ mol L ⁻¹	63

*ND: not detected.

最後に、GSH センサーの選択性について検討した。GSH センサーは、GSH と Glu に対して同程度の電位変化量を示したが、GSH センサー/NIP センサー比は、GSH に対して極めて大きな値となった。ここで、GSH および Glu に対する GSH センサーの特異的および非特異的な認識について考察する。GSH センサーは GSH および Glu に対してほぼ同等の応答を示したことから、両物質が共通して有する 2 個のカルボキシ基が重要な役割を果たしていることが示唆された。機能性モノマーの MAA も分子内にカルボキシ基を有していることから、これらのカルボキシ基同士が水素結合していると考えられた。一方、NIP センサーに対する応答の違いから GSH と Glu は認識機構が異なることができる。ここで、GSH、Gly、Cys および Glu の等電点はそれぞれ、5.9 [67]、6.0、5.1 および 3.2 である。したがって、測定溶媒である蒸留水中 (pH 5.5) において、GSH、Gly、Cys は双性イオンとして電荷はほぼ 0 で存在し、Glu は陰イオンとなり負電荷をもった状態で存在することになる。つまり、GSH と Glu が有するカルボキシ基は蒸留水中において異なる状態であり、GSH の 2 個のカルボキシ基は 1 個が分子型 (-COOH)、1 個が脱プロトン型 (-COO⁻) で存在するのに対し、Glu のカルボキシ基は 2 個とも脱プロトン型 (-COO⁻) で存在する。以上のことから、GSH センサーは分子型と脱プロトン型の 2 個のカルボキシ基を認識しており、その中で脱プロトン型のカルボキシ基との相互作用は非特異的な認識に大きく関与していることが示唆された。これは 1 個の脱プロトン型カルボキシ基を有する Gly および Cys が GSH センサーに対してわずかに応答していること、GSH が NIP センサーにわずかに応答していることから裏付けられる。また、2 個の脱プロトン型カルボキシ基を有する Glu はより非特異的結合が増加し大きな電位変化を示したと考えられる。

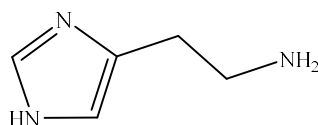
第5節 小括

分析対象物質をリアルタイムかつ簡便に検出可能な方法として、MIP を感応素子とした電位検出型センサーの開発を目指した。本章においては生体内で抗酸化作用により生体恒常性の維持に関与する GSH を分析対象物質として選択し、GSH を特異的に認識するセンサーの作製が可能であるかについて検討をおこなった。MIP による分子認識は、MIP 中に重合された機能性モノマーが、自身の官能基と分析対象物質の官能基との間で相互作用することにより成り立っている。GSH は分子内にカルボキシ基やアミノ基を含む複数の官能基を有していることから、機能性モノマーと容易に相互作用するのではないかということを目指し選択した。まず、2 mmol の GSH に対して、機能性モノマーである MAA の量を種々変化させ作製した各 GSH センサーの GSH に対する応答性を比較した。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、電位変化量が小さいもしくは、GSH 添加後の電位が安定せず鑄型形成が十分できていないといった結果が得られた。以上のように、MIP の作製段階における 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し、多すぎても少なすぎてもいけない最適な配合比が存在する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 を加えずに作製した NIP センサーの電位変化量と比較すると 8.2 倍であり、本センサーが鑄型により GSH を特異的に認識していることが示された。さらに、定量性について評価した結果、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 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には直線性が観測された ($r = 0.88$)。以上より、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センサーの作製が可能であることが示された。また、センサーにおける MIP 作製条件は、センサーの性能に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。

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1節 緒言

第1章において、棒状炭素電極を用いて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目指した基盤研究として、分子内に複数の官能基を有する還元型グルタチオン (GSH) を分析対象物質とした GSH センサーの開発を試みた。その結果、GSH センサーは機能性モノマーであるメタクリル酸 (MAA) が GSH を特異的に認識し、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ から $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ の GSH 濃度範囲において定量性を有することが示された。本センサーの感応素子である MIP は、広範囲な物質に対してテーラーメイドに作製が可能であることが利点である。そこで 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、さらなる検討をおこなった。本章では、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ヒスタミン (HTM) (Scheme 4) を分析対象物質として選択し、HTM 電位検出型センサー (HTM センサー) の開発を試みた。機能性モノマーとしては、HTM と水素結合することを狙い、カルボキシ基を有する MAA を用いた。



Scheme 4. Chemical structure of histamine.

現在 HTM の定量法として、高速液体クロマトグラフィー-蛍光検出 [70] や液体クロマトグラフィー-質量分析計 [71-73]、ガスクロマトグラフィー-質量分析計 [74]、イオンクロマトグラフィー [75] などのクロマトグラフィー法やキャピラリー電気泳動 [76]、薄層クロマトグラフィー [77]、ラジオイムノアッセイ [78] 等が知られる。これらの方法は高価で大型な機器および高度な技術が必要で、測定に時間がかかる他、多くの場合に誘導体化を必要とする。一方で、MIP を用いた電位検出型センサーは HTM をより簡便で安価にリアルタイム測定するための新たな手段となり、食品中や生体内の HTM の定量が容易になると期待できる。

本研究ではまず、より応答性の優れた HTM センサーとするため、HTM センサーの作製条件の検討をおこなった。始めに、不導体の MIP による分子認識を電気信号として検出する目的で炭素棒表面にコーティングするプラズマ重合薄膜 (Plasma polymerized thin film; PPTF) に関して、PPTF の形成に用いるモノマーおよび重合時間の検討をおこなった。次に、第1章の検討において、鋳型分子と機能性モノマーの配合比がセンサーの応答性に影響を及ぼすことが明らかとなったことから、HTM と MAA の最適な配合比の決定をおこなった。種々の配合比で MIP 粒子を作製し、各 MIP 粒子に対する HTM の結合量を紫外吸光

光度法により測定した。最後に、以上の検討により得られた最適な条件で作製した HTM センサーの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。以下、各項に分けて詳述する。

第2節 実験材料および方法

第1項 実験材料

HTM 二塩酸塩およびプロパルギルアルコールは東京化成工業株式会社製（東京）、炭素棒は Strem Chemicals 株式会社製（マサチューセッツ州、アメリカ合衆国）、トルエンはナカライテスク株式会社製（京都）、エチルベンゼンは関東化学株式会社製（東京）を使用し、その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社製（大阪）を使用した。なお、エチレングリコールジメタクリラート (EDMA) は、含有する重合阻止剤であるヒドロキノンを 5%水酸化ナトリウム水溶液により除去した後使用した。

第2項 実験装置

電位差測定に用いる電位差計には pH メーター F-52（株式会社堀場製作所製（京都））を用いた。紫外吸収スペクトル測定には MultiSpec-1500（株式会社島津製作所製（京都））を用いた。

第3項 HTM センサーの作製

基本的に第1章 第2節 第3項に示す GSH センサーの作製方法と同様の方法により作製した。但し、HTM センサーの作製には PPTF を形成させるためのモノマーとして、エチルベンゼンもしくはプロパルギルアルコールを用いた。また、鑄型分子として HTM 二塩酸塩、機能性モノマーとして MAA をそれぞれ 2 mmol、20 mmol の量で配合し、重合開始剤として 2,2'-アゾビス (2,4-ジメチルバレロニトリル) (V-65) を用いて 70-75°C で加熱重合をおこなった。炭素棒表面に重合されたポリマーからの HTM の除去は、炭素棒をメタノールに浸漬することでおこない、メタノールの紫外吸収スペクトルを測定したとき 210 nm における HTM のピークが観測されなくなるまで繰り返した。また、HTM を加えずに同様の方法で作製したセンサーを non-imprinted polymer (NIP) センサーとした。

第4項 紫外吸収スペクトルの測定

紫外吸収スペクトルの測定条件は、波長間隔: 0.5 nm、波長走査範囲: 200-300 nm、スキャン回数 1 回とした。測定セルは、光路長 1.0 cm の石英セルを使用した。

第5項 HTM センサーの電位差測定

第1章 第2節 第4項に示す GSH センサーの電位差測定と同様の方法でおこなった。

第6項 MIP 粒子の作製

100 mL 褐色瓶に HTM 二塩酸塩、MAA を Table 4 の通り量り取り、そこに EDMA を 25 mmol と、重合開始剤として V-65 を 0.34 g (1.37 mmol)、多孔性溶媒としてトルエンを 5 mL、部分けん化型ポリビニルアルコール 1000 水溶液 (10.67 g/500 mL) 45 mL を加え混合した後、3 分間の超音波処理を 3 回繰り返し懸濁させた。この懸濁液をヘリウムガスで

脱気した後、70-75°Cの水浴中で 12 時間加熱することで重合をおこなった。その後室温で静置することで、懸濁液中で作製されたポリマーが褐色瓶の下部に沈殿したことを確認し、その沈殿物をシャーレに取り出し、空気中で乾燥させた。乾燥した塊状のポリマーを乳棒と乳鉢を用いてすりつぶし、ふるいにかけることで粒子径を 38-75 μm に揃えた。最後に、このポリマーをメタノール中で攪拌することでポリマー内部の HTM を除去し、MIP 粒子とした。ポリマーからの HTM の除去は、メタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定したとき、210 nm における HTM のピークが観測されなくなるまで繰り返した。また、HTM 二塩酸塩を加えずに同様の方法で作製した粒子を NIP 粒子とし、比較として用いた。

Table 4. Molecularly imprinted polymer (MIP) and non-imprinted polymer (NIP) particle compositions (Curr. Anal. Chem. 2020, 16, 788-794., Table 1 より一部改変)

	Amount (mmol)	
	Histamine	Methacrylic acid
MIP (H2M2)	2	2
MIP (H2M4)	2	4
MIP (H2M5)	2	5
MIP (H2M10)	2	10
MIP (H2M15)	2	15
MIP (H2M20)	2	20
MIP (H2M25)	2	25
MIP (H5M20)	5	20
MIP (H10M20)	10	20
NIP (M2)	-	2
NIP (M4)	-	4
NIP (M5)	-	5
NIP (M10)	-	10
NIP (M15)	-	15
NIP (M20)	-	20
NIP (M25)	-	25

第7項 MIP 粒子およびNIP 粒子に対する HTM の結合量の測定

MIP 粒子もしくは NIP 粒子 0.1 g を $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ の HTM 二塩酸塩水溶液 100 mL に浸漬し、HTM を各粒子に結合させた。その後、メンブレンフィルターを用いてこの溶液から MIP 粒子もしくは NIP 粒子を除去し、得られた溶液の紫外吸収スペクトルを測定した。各粒子に対する HTM の結合量は、あらかじめ測定した $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ の HTM 二塩酸塩水溶液の吸光度より得られるトータルの HTM 量から、HTM 結合後の溶液の吸光度より得られるフリーの HTM 量を差し引くことで算出した。なお、各吸光度は HTM の吸収極大波長である 210 nm の値を用いた。

第3節 実験結果

第1項 鑄型分子の除去の確認

HTM センサーの作製における最後の工程として、鑄型分子である HTM の除去がある。HTM の除去が不十分であると、センサーの測定時すでに鑄型に HTM が結合している状態であるため、測定試料中の HTM が MIP に結合できず、HTM センサーの応答性が低下する。また、除去されなかった HTM が、測定中に MIP から測定溶媒中に溶出することで、測定の妨害となると考えられる。したがって、MIP 内に存在する HTM を可能な限り取り除くことは、HTM センサーの応答性の向上につながる。本研究において、HTM センサーにおける鑄型分子の除去は、100 mL のメタノールにセンサーを浸漬し、30 分ごとにメタノールを入れ替えることでおこなった。また、鑄型分子の除去の確認は、鑄型分子の除去のために用いたメタノールを紫外吸光度法により測定することでおこなった。HTM の吸収極大波長である 210 nm におけるピークが観測されなくなった時点で、HTM が除去できたと判断した。MAA を機能性モノマーとして用いた HTM センサーの、鑄型分子の除去において測定した紫外吸収スペクトルを Figure 4 に示す。紫外吸収スペクトルの測定は 200-300 nm の波長範囲でおこなったが、250 nm 以上の波長において明らかなピークは認められなかったため、200-250 nm を拡大し掲載している。1 回目の鑄型分子除去の溶媒の吸光度は極めて高く、HTM が多量に除去されていることが分かる。また、回数を繰り返すごとに吸光度が低くなっていき、17 回目の溶媒の吸光度はほぼ 0 を示し、それ以上 HTM が MIP から除去されないことを確認した。

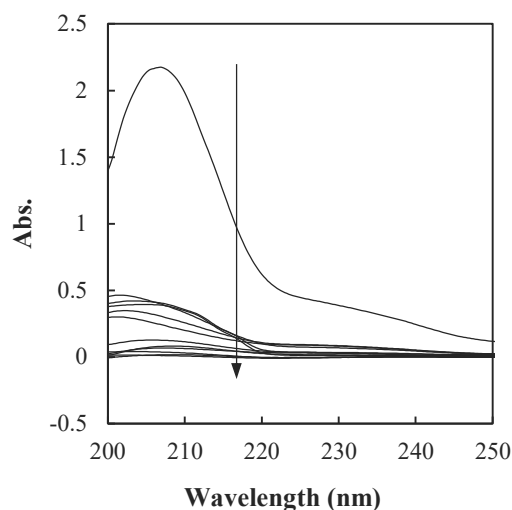


Figure 4. Ultraviolet absorption spectra of methanol for removal of histamine (HTM) from HTM sensor. The arrow shows the number of washing cycle from the first to 17th.

第2項 プラズマ重合薄膜形成のためのモノマーの種類および重合時間の検討

電位検出型センサーは、センサーの感応素子により認識した情報を電気信号に変換する検出方式である。MIP を感応素子とした電位検出型センサーの場合、棒状炭素電極に直接 MIP をコーティングすると、MIP が不導体であることから、電気信号の検出が困難である。そこで、半導体の PPTF 内部に MIP を構築することで電位検出を可能とする方法を用いている [44]。これは炭素棒表面に化学蒸着法により PPTF を形成し、センサー作製方法の第1膨潤および第2膨潤の段階で MIP を構成するための成分を PPTF 内に浸潤させた後、PPTF 内で MIP を重合形成する方法である。以上の構造ゆえ、PPTF の形成に用いるモノマーの種類および PPTF の膜厚は電位検出のしやすさに直結し、センサーの応答性に影響を及ぼすと考えられる。

1) PPTF 形成のためのモノマーの種類を検討

PPTF に MIP を構築するためには、上述のように第1膨潤および第2膨潤において MIP の構成成分、すなわち鋳型分子と機能性モノマーの複合体および架橋性モノマーが PPTF に高い親和性で浸透する必要がある。この親和性には PPTF の形成に用いるモノマーの種類が影響を及ぼすと考えられる。そこで、PPTF 形成のためのモノマーとして疎水性物質のエチルベンゼンもしくは親水性物質のプロパルギルアルコールを用いて HTM センサーを作製し、各 HTM センサーの応答性から適切なモノマーの選択をおこなった。なお、プラズマ重合時間は30分、HTM センサーを作製する際の HTM および MAA の配合量は2 mmol および20 mmol とした。

各モノマーを用いて作製した HTM センサーを100 mL の蒸留水中に浸漬し、 1×10^{-2} mol L⁻¹ の HTM 水溶液1 mL を添加した際の電位変化を測定した。その結果を Figure 5 に示す。横軸に時間、縦軸に測定開始からの電位の変化をプロットした。PPTF 形成モノマーとしてエチルベンゼンを用いて作製した HTM センサーは、HTM 添加直後に大きく電位が変化し、25分まで安定した電位を示した。一方、PPTF 形成モノマーとしてプロパルギルアルコールを用いた HTM センサーは、HTM 添加後の電位の上昇が緩やかであり、かつ25分における電位変化量はエチルベンゼンを用いた場合と比較してやや小さかった。以上の結果から、以降の研究において、PPTF 形成に用いるモノマーとしては、エチルベンゼンを用いることとした。

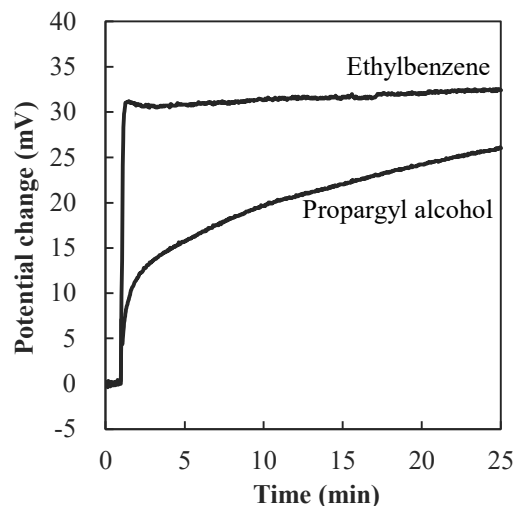


Figure 5. Potential response curves of two histamine (HTM) sensors composed using different monomers for the preparation of plasma polymerized thin films to detect HTM. After baseline measurement for 1 min, HTM aqueous solution (1 mL , $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) was added to distilled water (100 mL).

(*Curr. Anal. Chem.* **2020**, *16*, 788-794., Fig. 3 より一部改変)

2) PPTF 形成のためのプラズマ重合時間の検討

PPTF は MIP 形成の場合であり、その膜厚はセンサーの電位変化に影響を及ぼすと考えられる。PPTF の膜厚が薄すぎると MIP を形成できなくなる。一方、PPTF の膜厚が厚すぎると MIP の膜厚も大きくなるため、センサーの表面で起こった分析対象物質の認識を電気信号としてとらえにくくなり、電位変化が小さくなることや電位検出に時間を要することが予想される。そこで、より応答性の優れた HTM センサーとするため、PPTF の膜厚を決定するプラズマ重合時間の検討をおこなった。PPTF の膜厚はプラズマ重合時間を長くすることで増加する。プラズマ重合時間を 15 分、30 分、45 分おこなった 3 種類の HTM センサーを作製し、各 HTM センサーの応答性を比較した。HTM センサーを 100 mL の蒸留水中に浸漬し、 $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ の HTM 水溶液 1 mL を添加した際の電位変化を Figure 6 に示す。HTM センサーを作製する際の HTM および MAA の配合量は 2 mmol および 20 mmol とした。

いずれの HTM センサーも HTM 水溶液添加直後に大きく電位が変化し、25 分の時点においてほぼ同じ電位変化を示した。しかし、HTM 添加後電位が安定するまでに要した時間は各センサーにより異なっていた。プラズマ重合時間を 45 分とした HTM センサーは HTM による電位上昇後、25 分まで緩やかに電位は低下した。一方、プラズマ重合時間を 15 分および 30 分とした HTM センサーは、電位が上昇した後 25 分まで安定した電位を示した。このように、プラズマ重合時間は HTM センサーの応答性に影響

を及ぼすことが示された。以降の研究では、プラズマ重合時間 30 分とした HTM センサーが、プラズマ重合時間 15 分とした HTM センサーと比較してより安定した電位を示していたため、プラズマ重合時間は 30 分とした。

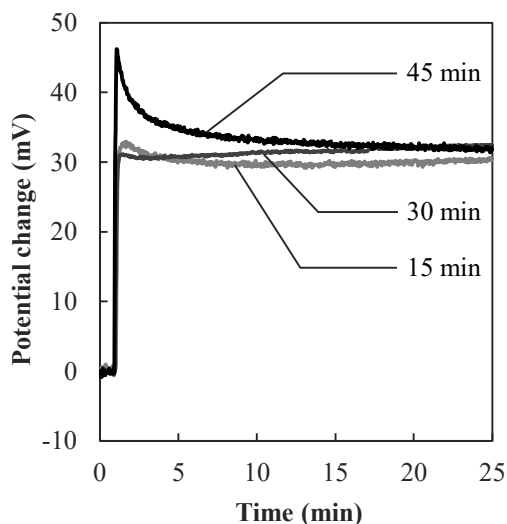


Figure 6. Potential response curves of three histamine (HTM) sensors prepared as a function of plasma polymerized coating time used to detect HTM. After baseline measurement for 1 min, HTM aqueous solution ($1 \text{ mL}, 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) was added to distilled water (100 mL).

(*Curr. Anal. Chem.* **2020**, 16, 788-794., Fig. 4 より一部改変)

第 3 項 HTM および MAA の配合比の検討

第 1 章 第 3 節 第 2 項で述べたように、センサー作製段階での鑄型分子と機能性モノマーの配合比はセンサーの分子認識能に影響を及ぼし、良好な応答性を有するセンサーとするために最適な配合比が存在することが明らかとなった。これは、用いる鑄型分子や機能性モノマーが変われば、最適な配合比も変化すると予想されるため、鑄型分子として HTM、機能性モノマーとして MAA を用いた場合の最適な配合比の検討をおこなった。HTM センサーの HTM に対する応答性は、HTM センサーの MIP に結合した HTM 量に相関すると考えられる。したがって、MIP 粒子に対する HTM の結合量を紫外吸光光度法により測定することで、純粋な MIP の性能、あるいは HTM センサーの性能を比較することにつながると考えた。そこで今回は、HTM および MAA を Table 4 に従い配合した MIP 粒子および NIP 粒子を作製し、各粒子に対する HTM の結合量を測定することで、HTM をより特異的に認識可能な配合比を決定した。

まず、 2 mmol の HTM に対して、MAA を $2 \sim 25 \text{ mmol}$ の配合量で作製した MIP 粒子に対する HTM の結合量を Figure 7 に示す。その結果、5 つの MIP (H2M2、H2M4、H2M5、H2M10、H2M25) に対する HTM の結合量は同程度で約 $1.62 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$ であった。それ

に対し、MIP (H2M15) および MIP (H2M20) に対する HTM の結合量は顕著に多く、特に MIP (H2M20) の HTM 結合量は $6.77 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$ と最大であった。第 1 章 第 3 節 第 2 項において述べた GSH センサーにおける結果と同様に、鑄型分子の認識が機能性モノマーの配合量によって変化しており、本結果は第 1 章の結果を支持するものであった。

さらに、20 mmol の MAA に対して、HTM の配合量を 2、5、10 mmol と変化させて作製した MIP 粒子に対する HTM の結合量を測定したところ、Figure 8 に示すように、HTM 量を 5 mmol、10 mmol と増加させることで HTM の結合量は減少した。

最後に、鑄型による特異的な認識性能を評価するため、MIP 粒子に対する HTM の結合量を NIP 粒子に対する HTM の結合量で除した値 (MIP/NIP 比) を算出した。その結果、Table 5 に示すように、HTM に対して最も高い結合量を示した MIP (H2M20) が最も高い MIP/NIP 比を示した。以上の結果より、鑄型分子として HTM、機能性モノマーとして MAA を用いた MIP の作製においては、HTM が 2 mmol、MAA が 20 mmol とした配合量が、HTM を特異的に認識する最適な配合量であることが示された。

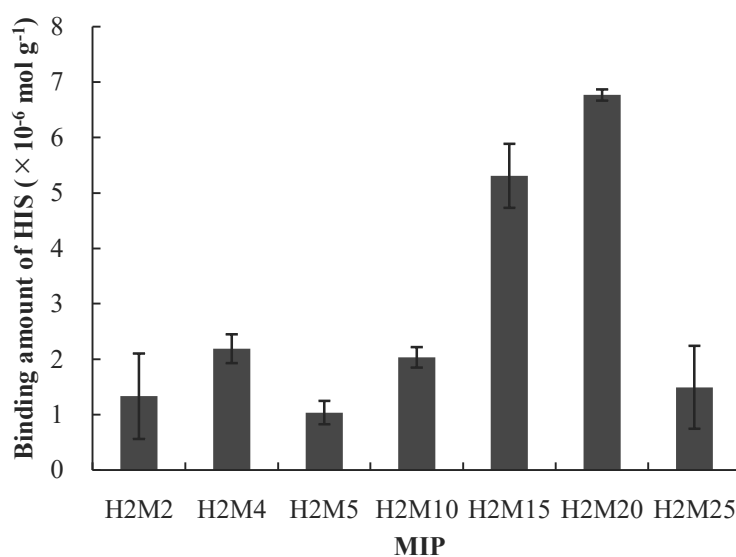


Figure 7. The binding amount of histamine (HTM) toward molecularly imprinted polymer (MIP) particles as a function of methacrylic acid ($n=3$). Each MIP particles (100 mg) was soaked in 100 mL of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ HTM aqueous solution.

(*Curr. Anal. Chem.* **2020**, 16, 788-794., Fig. 2 より一部改変)

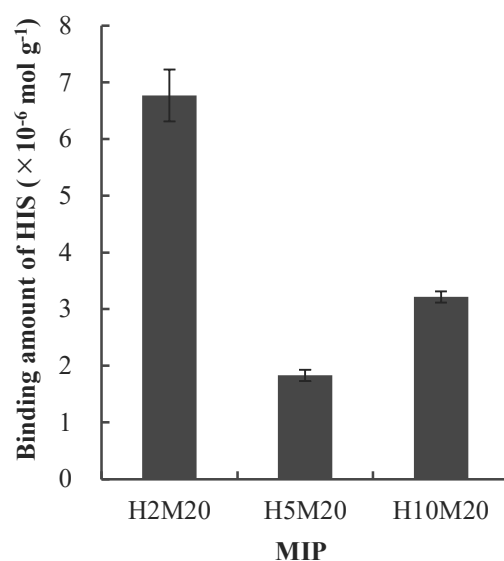


Figure 8. The binding amount of histamine (HTM) toward molecularly imprinted polymer (MIP) particles as a function of HTM ($n=3$). Each MIP particles (100 mg) was soaked in 100 mL of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ HTM aqueous solution.

(*Curr. Anal. Chem.* **2020**, 16, 788-794., Fig. S2 より一部改変)

Table 5. Binding amount ratios of histamine toward molecularly imprinted polymer (MIP) and non-imprinted polymer (NIP) particles

(*Curr. Anal. Chem.* **2020**, 16, 788-794., Table 2 より一部改変)

	MIP/NIP ratio
MIP (H2M2)	1.44
MIP (H2M4)	1.08
MIP (H2M5)	0.42
MIP (H2M10)	1.09
MIP (H2M15)	1.30
MIP (H2M20)	1.72
MIP (H2M25)	0.67

第4項 HTM センサーの定量性の検討

これまでの検討で得られた最適な条件（鋳型分子 HTM と機能性モノマー MAA の配合量: 2 mmol および 20 mmol、PPTF 形成のためのモノマー: エチルベンゼン、プラズマ重合時間: 30 分）により作製した HTM センサーの定量性を検討した。100 mL の蒸留水中

に HTM センサーを浸漬し、濃度が $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ から $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ となるように HTM 水溶液 1 mL を添加した際の電位変化を測定した。その結果を Figure 9(a) に示す。測定をおこなった 3 本の HTM センサーのうち、平均的な電位応答曲線を示した代表的な 1 本のデータを掲載している。HTM 濃度が $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 以上の濃度において、HTM 水溶液添加直後に電位が変化し 25 分まで極めて安定した電位を示した。また、電位変化量は HTM 濃度の増加と共に増大し、電位変化は HTM センサーの MIP に結合した HTM 量を反映していることが示された。さらに、各 HTM 濃度における 25 分の電位変化量を HTM 濃度の対数値に対してプロットした (Figure 9(b))。その結果、 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 ($r = 0.86$)。また、検出限界をシグナルノイズ比が 3 となる濃度として算出すると、 $9.6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ であった。さらに、Figure 9(b) には、NIP センサーの HTM に対する電位変化を示す。NIP センサーの電位変化量は、いずれの濃度においても HTM センサーの電位変化量より小さく、HTM センサーが MIP の鑄型により HTM を認識していることが示された。

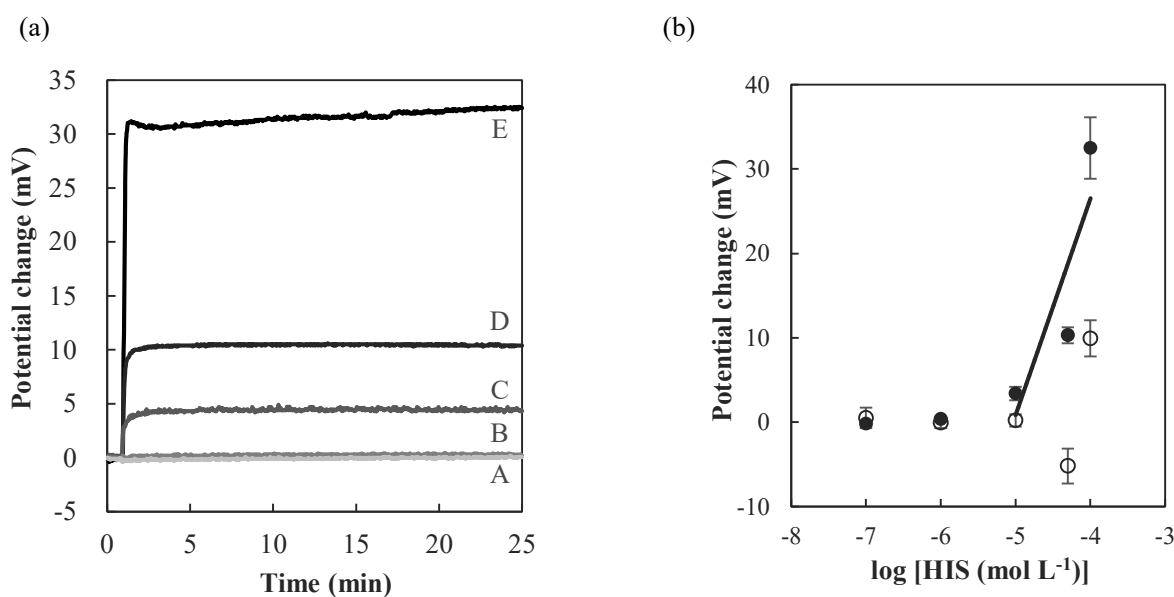


Figure 9. (a) Potential response curves of a histamine (HTM) sensor after the addition of HTM aqueous solutions of varying concentration. After baseline measurement for 1 min, HTM aqueous solution (1 mL) was added to distilled water (100 mL). The final HTM concentrations were (A) 1×10^{-7} , (B) 1×10^{-6} , (C) 1×10^{-5} , (D) 5×10^{-5} , and (E) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Calibration curve for (●) HTM sensor and (○) non-imprinted polymer sensor as a function of varying the HTM concentrations. Potential changes were determined at 25 min for each HTM concentration ($n = 3$).

(*Curr. Anal. Chem.* **2020**, 16, 788-794., Fig. 5, 6 より一部改変)

第4節 考察

HTM を鑄型分子としたセンサーの開発を目指し、種々の検討をおこなった。

まず、MIP に導電性を付与する目的で炭素棒表面に蒸着する PPTF の形成のために用いるモノマーの種類について検討した。その結果、PPTF 形成モノマーとしてエチルベンゼンを用いて作製した HTM センサーの応答性は、モノマーとしてプロパルギルアルコールを用いた HTM センサーと比較して良好であった。以上より、HTM と MAA の複合体および架橋性モノマーが、親水性のプロパルギルアルコールを用いて形成した PPTF と比較して、疎水性のエチルベンゼンを用いて形成した PPTF に、より高い親和性をもって浸潤したことで、効果的に MIP が構築されたと考えられた。これは、架橋性モノマーである EDMA は疎水性物質であるため、疎水性の PPTF 形成モノマーに親和性が高いと考えられる。さらに、HTM と MAA は、複合体を形成することで疎水性が高まったと考えられる。

次に、HTM センサー作製段階における HTM および MAA の配合比について、MIP 粒子に対する HTM 結合量から検討した。第1章の結果と同様に、鑄型分子の認識が MAA の配合量によって変化していた。また、HTM の配合量を増加させることで、HTM の結合量は減少した。これは、架橋性モノマーに対する HTM の量が多すぎることによって、ポリマー中に鑄型を形成するスペースが確保できず鑄型の数および質が共に不十分な形成となったためであると考えられる。

効果的なインプリント効果を示すための MIP の配合比については、報告されている種々の MIP により異なる値が報告されており、適する配合比を決定するための理論づけは未だなされていない。Triikka らは、クロロホルムを溶媒として、鑄型分子、機能性モノマー、架橋性モノマーとして HTM、MAA、EDMA を用いた MIP の作製をおこない、その配合量がそれぞれ 0.85、4.0、20 mmol のとき HTM に対する高い親和性を示す MIP となることを報告している [79]。また、Pratama らは、種々の物質を鑄型分子とした MIP の研究例を総括し、鑄型分子:機能性モノマー:架橋性モノマーが 1:4:20 の時、最適なインプリント効果を得られる可能性が高くなると結論付けている [80]。それと比較して、本研究で得られた最適な配合比は 2:20:25 と、鑄型分子および機能性モノマー量が多い。これは、本研究における MIP の調製を水溶液中でおこなっていることに起因していると考えられる。水溶性物質を鑄型分子とした MIP を作製するために、機能性モノマーとして有機溶媒にも水溶液にも溶解する MAA を用いて、HTM が MAA と複合体を形成することにより疎水性の架橋性モノマー層へ移行することを狙った調製方法である。したがって、MAA が水層と有機層両方に分散して存在するために、適切に鑄型を作製するためにより多くの配合量が必要であったと示唆される。

最後に、HTM センサーの定量性について検討した結果、 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の間の回帰直線式の傾きの値は 25.7 であった。本 HTM センサーの電位応答についてネルンストの式を用いて評価すると、傾きが 25.7 であったことから n は約 2 と計算でき、HTM が 2 価のイオンつまりジカチオン体として HTM センサーに結合していることとなる。HTM の酸解離定数 (pK_a ; 6.15 および 9.84) [81,82] から、蒸留水中 ($\text{pH}5.5$) において HTM はイミダゾール環の第2級アミンおよびアミノ基が

プロトン化されたジカチオン体で存在していると考えられ、このジカチオン体が MIP に結合していると考えられた。

Trikka らは、本研究と同様に、鋳型分子として HTM、機能性モノマーとして MAA を用いた MIP を作製し、pH6 において MIP が鋳型により HTM を認識し結合することを報告している [79]。また、HTM と MAA を混合した水溶液の UV 吸収スペクトルから、pH6 において、HTM がジカチオン体となり、MAA と強く相互作用することを明らかにしている。本研究における HTM センサーの MIP による HTM の認識において、Trikka らが報告する MIP による HTM の認識に関する結果が再現された。これは、Trikka らによる実験条件 pH6 と本研究での実験条件 pH5.5 では、HTM は同様の分子状態で存在していると考えられるためである。一方、本研究における MIP の調製法は、Trikka らによる MIP の調製法と異なっている。Trikka らは、クロロホルムを溶媒として用いて、塊状重合により MIP を調製している。疎水性物質を鋳型分子とした MIP の調製のための溶媒としては、Trikka らの使用するクロロホルムやアセトニトリルといった有機溶媒がしばしば用いられる。しかし、それらの有機溶媒に対して難溶解性の物質を鋳型分子とした場合には、用いることが困難である。また、本研究でのセンサーの作製においては、有機溶媒が炭素棒表面にコーティングした PPTF を溶解してしまうことも問題であった。そこで本研究では、溶媒として水を用いて、MIP を構成する鋳型分子、機能性モノマー、架橋性モノマーを液滴として分散させる独自の懸濁重合により MIP の調製をおこなった。本方法により、PPTF を溶解させることなく、PPTF 内に MIP の構成成分を浸潤固定化させることができた。加えて本法は、クロロホルムのように極性の低い溶媒に溶解しない水溶性の高い物質を鋳型分子とする場合において、より汎用性が高く応用可能であるという点で、Trikka らの MIP 調製法よりも優位であると考えられる。

第5節 小括

MIP を感応素子とした電位検出型センサーにおいて、様々な物質に対応したテーラーメイドなセンサーの開発を目指すため、第1章で分析対象物質として検討した GSH とは異なる物質に対するセンサーの開発を試みた。分子内の官能基としてイミダゾール環と1つのアミノ基を有する HTM を鋳型分子として選択し、GSH センサーと同様に特異的なセンサーの作製が可能であるか検討した。まず、鋳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第1章で示されたため、HTM と MAA の最適な配合比を検討した。HTM センサーの HTM に対する応答性は、HTM センサーの MIP に結合した HTM 量に相関すると考えられる。そこで、MIP 粒子に対する HTM の結合量を紫外吸光光度法により測定することで配合比を決定した。その結果、2 mmol の HTM に対して MAA の量を徐々に増加させるにつれて結合量が增大する傾向を示した。結合量は MAA が 20 mmol の時最大となり、それ以上の MAA 量では再び減少した。第1章と同様、多すぎても少なすぎてもいけない最適な配合比が存在していることが示された。また、HTM が 2 mmol、MAA が 20 mmol の配合量で作製した HTM センサーは、 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} および 1×10^{-4} 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。 $(r=0.86)$ 。これより、本センサーの応答は、HTM のジカチオン体が MIP に結合している結果であると考えられた。

第1章において述べた GSH センサーに引き続き、分子内に有する官能基がより少ない HTM を鋳型分子とした場合においてもセンサーの作製が可能であることが示された。これらの結果は、今後幅広い分析対象物質に対してテーラーメイドにセンサーの作製を可能にすることを示唆するものであった。

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

第1節 緒言

ヒスタミン (HTM) は、抗原による免疫刺激により肥満細胞や好塩基球から放出される [83]。放出された HTM は、4 つの G タンパク質共役型受容体 (H1、H2、H3 および H4 受容体) を活性化し、平滑筋の収縮や血管透過性の亢進を引き起こし、その結果かゆみや発赤、腫脹、発熱といった種々の免疫反応やアレルギー反応を起こす [84-86]。また、HTM の詳細なシグナル伝達メカニズムを明らかにすべく HTM 受容体拮抗薬に関する研究が多数報告されている。例えば、HTM はアレルギーだけでなく、糖尿病性腎症 [87]、関節炎 [88]、大腸炎 [89-91] といった慢性的な炎症にも関与することが明らかとなっている。さらに、アテロームの形成過程において、冠血管炎症と肥満細胞の活性化に明らかな相関があり [92,93]、虚血性心疾患患者における冠血管外膜において肥満細胞が増加していることも報告されている [94]。さらに、Zdravkovic らは、虚血性心疾患患者において HTM の血中濃度が顕著に高いことを報告している。加えて HTM の濃度は虚血性心疾患の種類により増加レベルが異なっていたことから、HTM は心筋虚血の追加的パラメータとして利用できる可能性が示唆されており、虚血性心疾患の程度を示す予後マーカーとして有用であると結論付けている [95]。以上より、HTM の血中濃度を把握することは、HTM が関与する生体内の知見を得ることにつながる。

HTM が関与する疾患において現在おこなわれている臨床検査としては、アレルギー検査があり、プリックテストや皮内テストといった皮膚テストおよび血液抗原特異的 IgE 抗体価検査がある。皮膚テストは特定のアレルゲンを皮膚に接触させ一定時間後に皮膚に生じた膨疹を評価する方法で、真の臨床症状を反映するものであり診断的有用性は高い。しかし、アナフィラキシーショックを引き起こす可能性や、これまでアレルギーを示していなかった物質に対しても、検査により新たにアレルギー反応を示してしまうといった危険性を伴う [96]。また、血液抗原特異的 IgE 抗体価検査は、血液中のアレルゲン特異的な IgE 抗体の量を測定する *in vitro* 試験で、アナフィラキシーショックの心配はなく安全である。しかし本法は、単に感作の有無を示しているものであり、IgE 抗体が関与しないアレルギーも多いことから、必ずしも臨床症状を反映しない。これに対し、HTM 遊離試験 (HRT) は、好塩基球を含む末梢血白血球を抗原と混合し放出される HTM の量を測定する方法で、I型アレルギー反応を引き起こすアレルゲンを特定するために用いられる *in vitro* 試験である [96,97]。HRT は、皮膚への免疫応答の心配がなく、血液抗原特異的 IgE 抗体価検査より生体内の反応を反映している。但し本法は、HTM の定量に HPLC や酵素免疫測定法を用いるため、測定までに数段階の操作を要し、またそれに用いる試料の準備が必要である。さらに、大型な設備機器も必要となる。

また、食品衛生分野においては、鮮度が低下することで HTM が多量に蓄積された魚介類やその加工品を摂取することにより起こる HTM 食中毒が知られている。HTM 食中毒は、頭痛や吐き気、下痢などの症状をきたす他、重症化すると呼吸困難や意識不明となること

もある。食品を常温に放置する等の不適切な管理をすることで、ヒスチジン脱炭酸酵素の作用により HTM を産生する原因菌が食品内で増殖することが原因である。日本ではこれまで死亡例はないものの、2011 年から 2019 年の HTM 食中毒による患者数は、年間約 60 人から 400 人であり、決して無視できないアレルギー様食中毒となっている [98]。食品を漁獲直後から加工・保存に至るまで適切に管理することが最も重要であるが、食品中の HTM 含量を確認することで HTM 食中毒の発生を未然に防ぐことができる。日本では食品中の HTM 含量の規制値は定められていないが、HTM の簡便な測定法の開発により HTM 食中毒発生防止の一助になると考えられる。

上述のように HTM を簡便に測定することができれば、あらゆる分野への貢献が期待できる。そこで、HTM を鑄型分子とした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臨床分析への応用に向けて、さらなる検討をおこなうこととした。第 2 章において、鑄型分子として HTM、機能性モノマーとしてメタクリル酸 (MAA) を用いた MIP を感応素子とした電位検出型センサー (HTM センサー) の開発をおこなった。その結果、HTM センサーは良好な応答性を有し、 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について、ネルンスト応答に近い応答を示したことを報告した。これは蒸留水中でおこなった結果であり、干渉物質やイオン、タンパク質等のない理想環境における検討であった。一方、臨床分析への応用の場においては上記のような共存物質による影響が考えられる。したがって本章では、HTM センサーを臨床分析へ応用するための基礎的検討として、リン酸緩衝液中のイオン強度 (塩濃度) およびウシ血清中での測定が HTM センサーの定量性に及ぼす影響を検討した。さらに、既知濃度の HTM を添加したウシ血清をサンプルとし、HTM センサーを用いた血清中 HTM の定量を試みた。以下、各項に分けて詳述する。

第2節 実験材料および方法

第1項 実験材料

ウシ血清は日本バイオテスト株式会社製（埼玉）、L-ヒスチジン（His）およびピロール（PYR）は富士フィルム和光純薬株式会社製（大阪）、L-リシン（Lys）は東京化成工業株式会社製（東京）、2-アミノベンズイミダゾール（2-AM）は Sigma-Aldrich 株式会社製（ミズーリ州、アメリカ合衆国）を使用した。また、リン酸緩衝液の調製にはリン酸水素二ナトリウム・十二水和物（富士フィルム和光純薬工業株式会社製、大阪）およびリン酸二水素ナトリウム二水和物（関東化学株式会社製、東京）を使用した。その他の試薬は第2章第2節第1項と同じ試薬を使用した。

第2項 実験装置

電位差測定に用いる電位差計には pH メーター F-52（株式会社堀場製作所製（京都））を用いた。

第3項 HTM センサーの作製

HTM センサーは第2章第2節第3項と同様の方法により作製した。但し、プラズマ重合薄膜（PPTF; Plasma polymerized thin film）を形成させるためのモノマーとしてエチルベンゼンを用いた。

第4項 HTM センサーの電位差測定

センサーの性能評価は、電位差測定法によりおこなった。HTM センサーと参照電極を 100 mL の測定用溶媒に浸漬し、参照電極と各センサー間の電位の差を電位差計により検出した。参照電極には、銀-塩化銀電極を用いた。電位が安定した時点で測定を開始し、測定開始後 1 分において種々の濃度の試料 1 mL を添加した時、それにより生じる電位の変化を測定開始後 25 分間記録した。本測定系の電池式は、Ag/AgCl, KCl (3.33 mol/L) || 試料溶液 | MIP membrane | 炭素棒である。全ての測定は室温でおこなった。

本章の実験において、上述の測定用溶媒および添加する測定試料を種々に変化させ測定をおこなったため、以下詳述する。

1) 測定用溶媒の緩衝液中塩濃度の影響の検討

測定用溶媒として蒸留水および 1、10、100 mmol L⁻¹ リン酸緩衝液（pH7.4）を用い、測定試料として 1×10⁻¹ mol L⁻¹ HTM 水溶液を用いた。

2) 緩衝液中における HTM センサーの定量性の検討

測定用溶媒として 1 mmol L⁻¹ リン酸緩衝液（pH7.4）を用いて、測定試料として 1×10⁻² mol L⁻¹ から 1 mol L⁻¹ の濃度の HTM 水溶液を用いた。

3) 緩衝液中における HTM センサーの選択性の検討

測定用溶媒として 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて、測定試料として $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ の His、2-AM、PYR および Lys 水溶液を用いた。

4) 血清の影響の検討

測定用溶媒として、ウシ血清を 1, 3, 5, 10% 含有した 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液 (pH7.4) を用い、測定試料として $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ HTM 水溶液を用いた。

5) 血清に添加した HTM の定量

測定用溶媒として 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液 (pH7.4) を用い、測定試料として HTM を種々の濃度で添加したウシ血清を用いた。ウシ血清中の HTM の濃度は、0 から 1 mol L^{-1} となるように調製した。

第3節 実験結果

第1項 HTM センサーの応答性に及ぼす測定用溶媒の緩衝液中塩濃度の影響の検討

分析対象物質の活量はイオン強度により変化するため、電位差測定法における一般的なセンサーの測定は測定用溶媒として用いる緩衝液のイオン強度、つまり塩濃度の影響を受ける。そこで、HTM センサーの応答性に及ぼすリン酸緩衝液の塩濃度の影響を検討するため、測定用溶媒として 100 mL の蒸留水および種々の濃度のリン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて、 $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ HTM 水溶液を添加した際の電位変化を比較した。その結果を Figure 10 に示す。横軸に時間、縦軸に測定開始からの電位の変化をプロットした。その結果、測定用溶媒として蒸留水を用いた場合と同様に、リン酸緩衝液中での測定においても HTM 添加直後に電位が変化し、HTM センサーが MIP の鑄型への HTM の結合を検出していることが示された。一方で、電位変化量はリン酸緩衝液の塩濃度の増加に従い明らかに減少した。その大きさは、蒸留水中での測定と比較すると、1、10、100 mmol L^{-1} のリン酸緩衝液中において、それぞれ 67%、45%、3%であった。

以上のことから、リン酸緩衝液中での電位差測定は塩濃度の影響を受けることが明らかとなったものの、測定溶液中の pH を維持するため、以降の実験では測定用溶媒として 1 mmol L^{-1} のリン酸緩衝液 (pH7.4) を用いることとした。

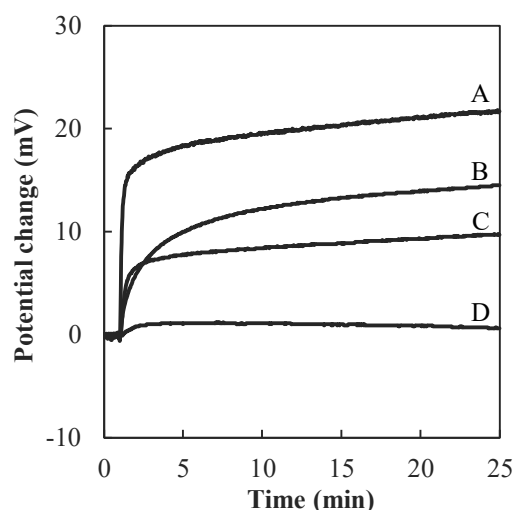


Figure 10. Potential response curves of histamine (HTM) sensor in (A) distilled water, and (B) 1, (C) 10, and (D) 100 mmol L^{-1} phosphate buffer (pH 7.4). After baseline measurement for 1 min, HTM stock solution (1 mL, $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) was added to distilled water or phosphate buffer (100 mL).

(*Anal. Sci.* **2020**, 36, 1561-1563., Fig. S2 より一部改変)

第2項 緩衝液中における HTM センサーの定量性の検討

100 mL のリン酸緩衝液中における HTM センサーの定量性を検討するため、種々の濃度の HTM 水溶液 1 mL を添加した際の電位変化を測定した。その結果を Figure 11(a) に示す。測定をおこなった 3 本の HTM センサーのうち、平均的な電位応答曲線を示した代表的な 1 本のデータを掲載している。添加後の HTM 濃度が $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 以上の時、HTM 添加直後に電位が変化し、約 15 分でプラトーに達した。さらに、HTM 濃度の上昇に伴い電位変化量は増大し、HTM センサーが HTM 濃度の変化を認識し応答していることが示された。また、25 分における電位変化量を HTM 濃度の対数値に対してプロットしたのが Figure 11(b) である。HTM 濃度 $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ から $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ の範囲において、HTM 濃度の対数値と電位変化量との間に直線性が得られ ($r=0.92$)、検量線の式は $y=22.7x+86.3$ であった。さらに、検出限界をシグナルノイズ比が 3 となる濃度として算出すると、 $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ であった。

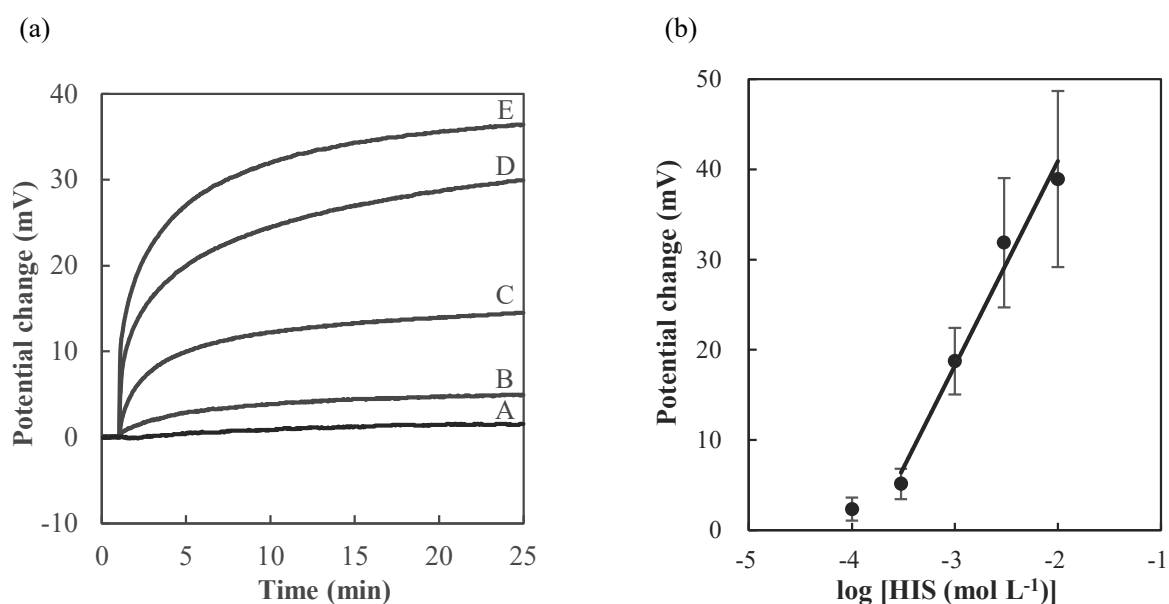
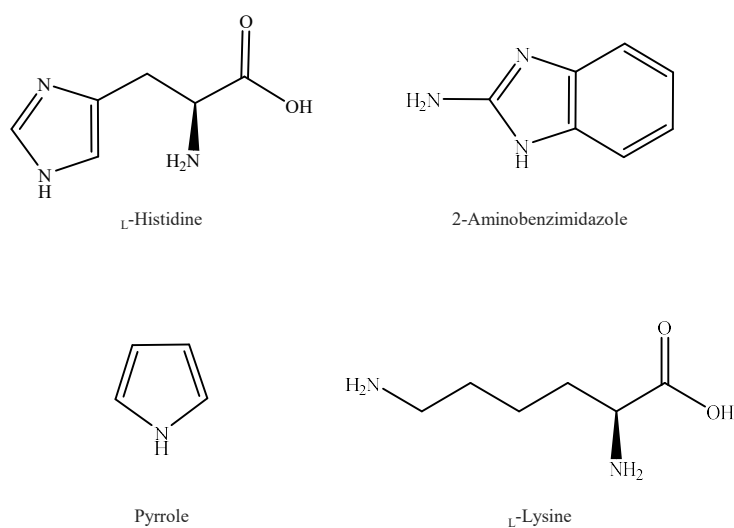


Figure 11. (a) Potential response curves of histamine (HTM) sensor in $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.4) with varying HTM concentrations. After baseline measurement for 1 min, HTM aqueous solution (1 mL) was added to phosphate buffer (100 mL). The final HTM concentrations in the phosphate buffer were (A) 1×10^{-4} , (B) 3×10^{-4} , (C) 1×10^{-3} , (D) 3×10^{-3} , and (E) $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Calibration curve of HTM sensor as a function of varying HTM concentration. Potential changes were determined after 25 min for each HTM concentration ($n = 3$).

(Anal. Sci. 2020, 36, 1561-1563., Fig. S5, Fig 1 より一部改変)

第3項 緩衝液中における HTM センサーの選択性の検討

測定用溶媒として 100 mL の 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液 (pH7.4) を用い、濃度が $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ となるように His、2-AM、PYR および Lys を添加した際の電位変化を測定することで、HTM センサーのリン酸緩衝液中における選択性について評価した。各物質の構造式は Scheme 5 に示すとおりである。Figure 12(a) には、3 本作製した HTM センサーのうち代表的な 1 本の各物質に対する電位応答曲線を、Figure 12(b) には各物質を添加した際の 25 分における電位変化量を示す。HTM を添加すると添加直後に大きく電位が変化したのに対し、2-AM および PYR を添加すると時間をかけて徐々に電位が変化し、His および Lys に対してはほぼ電位変化を示さなかった。どの物質に対する電位変化量も、HTM に対する電位変化量と比較して有意に小さく、HTM センサーが MIP の鑄型により HTM を選択的に認識していることが示された。



Scheme 5. Chemical structures of four chemical substances for selectivity.

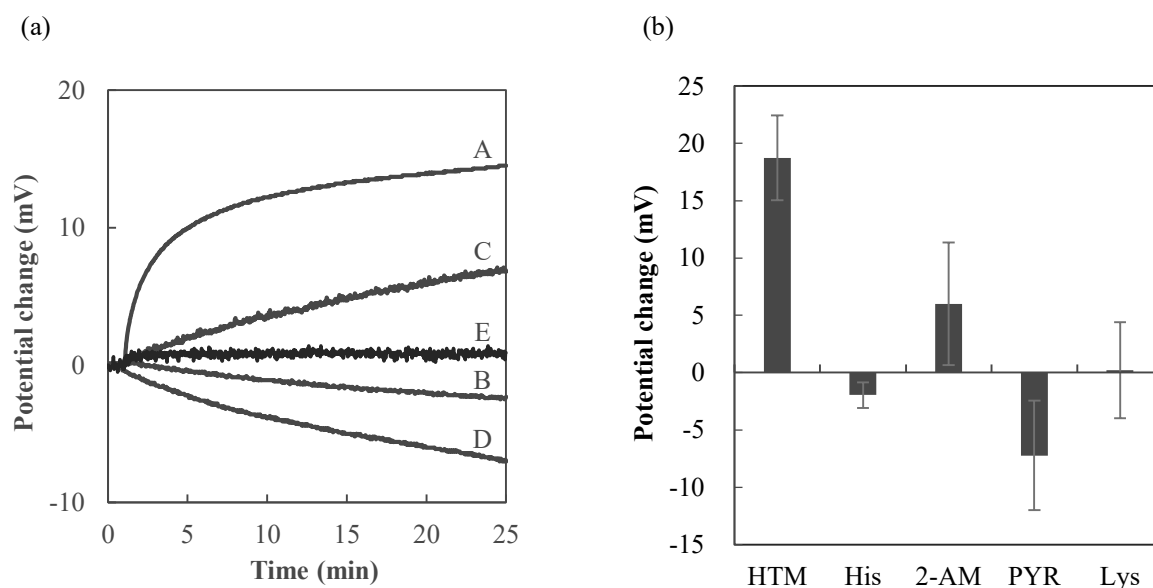


Figure 12. (a) Potential response curves of histamine (HTM) sensor in 1×10^{-3} mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4) to (A) HTM, (B) L-histidine (His), (C) 2-aminobenzimidazole (2-AM), (D) pyrrole (PYR), and (E) L-lysine (Lys). After baseline measurement for 1 min, each substance aqueous solution (1 mL, 1×10^{-1} mol L⁻¹) was added to phosphate buffer (100 mL). (b) Comparison of potential change values of HTM sensor for HTM, His, 2-AM, PYR, and Lys after 25 min from the start of measurement ($n=3$). (*Anal. Sci.* **2020**, 36, 1561-1563., Fig. S3, S4 より一部改変)

第4項 血清の影響の検討

HTM センサーの測定はこれまで水溶液中の HTM の測定をおこなってきた。そこで、生体試料測定への応用の可能性を探るため、HTM センサーの応答性に及ぼす血清の影響を検討するべく、測定用溶媒として種々の濃度で血清を含有した 100 mL の 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて HTM に対する電位変化を測定した。その結果を Figure 13(a) に示す。測定をおこなった 3 本の HTM センサーのうち、平均的な電位応答曲線を示した代表的な 1 本のデータを掲載している。血清を含有したリン酸緩衝液中における HTM を添加した際の電位変化の様子は、血清を含有していないリン酸緩衝液中での電位変化と類似していた。一方、電位変化量は血清の含有率によって異なっており、血清含有率の増加に従って電位変化量は減少した。

また、より血清の影響を分かりやすくするため、血清を含有したリン酸緩衝液中で HTM を添加した時の 25 分における電位変化量を、血清を含有しないリン酸緩衝液中で測定した際の電位変化量で除した相対電位変化を算出し、その結果を Figure 13(b) に示す。血清含有率が 1% および 3% の時、血清を含有しないリン酸緩衝液中での測定における電位変化と差は見られなかったが、血清含有率が 5% 以上では相対電位変化が明らかに低下した。以上のことから、以降の実験では血清非含有リン酸緩衝液中と同等に HTM に対して応答することが示された血清含有率 1% のリン酸緩衝液条件下においておこな

うこととした。

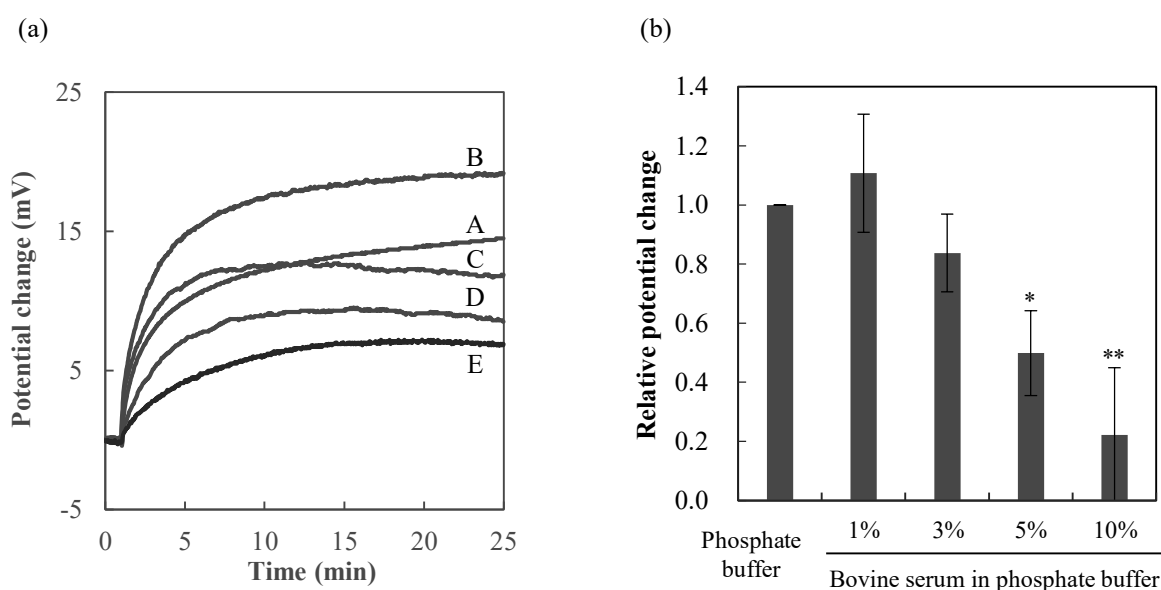


Figure 13. (a) Potential response curves of the histamine (HTM) sensor in (A) $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.4), and phosphate buffers containing (B) 1%, (C) 3%, (D) 5%, and (E) 10% bovine serum. After baseline measurement for 1 min, HTM stock solution (1 mL, $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$) was added to each solution (100 mL). (b) Effect of bovine serum ratio in phosphate buffer on the relative potential change of the HTM sensor at a HTM concentration of $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($n=3$). The relative potential change value was calculated from the potential change value of the HTM sensor in phosphate buffer containing bovine serum compared with that in the phosphate buffer alone. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. phosphate buffer alone.

(Anal. Sci. 2020, 36, 1561-1563., Fig. S6, Fig. 2 より一部改変)

第5項 血清に添加したHTMの定量

既知濃度のHTMを添加したウシ血清を測定試料とし、 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液中での定量を試みた。測定用溶媒であるリン酸緩衝液100 mLに測定試料1 mLを添加することで、測定環境中におけるウシ血清が1%となるようにし、その際生じる電位変化を測定した。HTM濃度は測定溶媒中において、0、 1.0×10^{-3} 、 3.0×10^{-3} 、 5.0×10^{-3} 、 $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ となるようにウシ血清に添加した。その結果をFigure 14に示す。ウシ血清サンプルを添加した際の電位変化の様子は、HTM水溶液を添加した際の電位変化と類似しており、ウシ血清中HTMの濃度の上昇に伴い電位変化量は増大した。また、HTMを添加していないウシ血清を添加した際はほぼ電位変化は示さず(A)、HTMセンサーが血清の影響を受けず

HTM にのみ応答していることが分かる。この結果は前項で示したウシ血清含有率 1% リン酸緩衝液中においては血清の影響を受けずに測定可能であったことから裏付けられる。以上のことより、本 HTM センサーはウシ血清中試料においても HTM の濃度変化を認識し応答することが示された。

さらに、Figure 14 の 25 分における電位変化量と、Figure 11(b) より得られた検量線の式を用いて、検出された HTM 濃度を算出し、実際に血清に添加した HTM 濃度に対する回収率を求めた。その結果を Table 6 に示す。HTM 濃度が 1.0×10^{-3} 、 3.0×10^{-3} 、 5.0×10^{-3} 、 $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ となるように血清に添加した試料における回収率は、それぞれ 91、96、94、104% であり、良好な回収率を示した。これより HTM センサーは血清中に存在する HTM を認識し応答することが示された。また、固相抽出や脱プロトン化といった試料の前処理をせずとも、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。

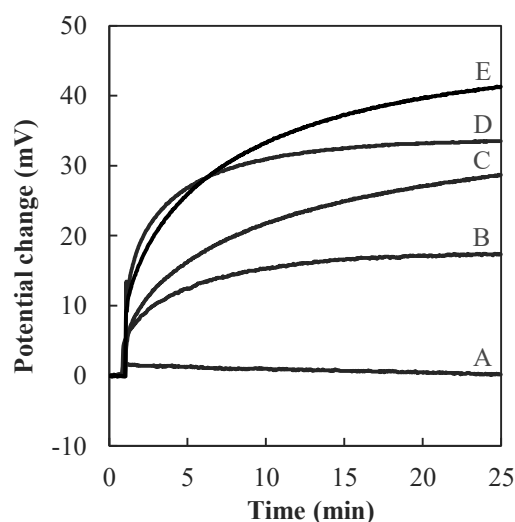


Figure 14. Potential response curves of the histamine (HTM) sensor in $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7.4) with varying HTM concentrations contained in bovine serum. After baseline measurement for 1 min, bovine serum spiked with (A) 0, (B) 1×10^{-3} , (C) 3×10^{-3} , (D) 5×10^{-3} , and (E) $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ HTM (1 mL) was added to phosphate buffer (100 mL).

(*Anal. Sci.* **2020**, 36, 1561-1563., Fig. 3 より一部改変)

Table 6. Recovery (%) of histamine (HTM) concentration in bovine serum samples

Spiked (mol L ⁻¹)	Found (mol L ⁻¹)	Recovery (%)
1.0×10 ⁻³	9.07×10 ⁻⁴	91
3.0×10 ⁻³	2.89×10 ⁻³	96
5.0×10 ⁻³	4.70×10 ⁻³	94
1.0×10 ⁻²	1.04×10 ⁻²	104

Recovery was calculated using the potential change values of the HTM sensor when bovine serum samples (1 mL) with different HTM concentrations were added to phosphate buffer (100 mL), and the regression equation obtained from the potential change values in phosphate buffer.

(*Anal. Sci.* **2020**, 36, 1561-1563., Table 1)

第4節 考察

まず、HTM センサーの応答性に及ぼす緩衝液中塩濃度の影響について検討した。その結果、緩衝液の塩濃度の増加に従い、HTM センサーの電位変化量は減少した。これは3つの要因が関与していると考えられる。一点目は、HTM の分子状態の変化である。HTM の酸解離定数は、イミダゾール環の第2級アミンおよびアミノ基においてそれぞれ6.15および9.84である [81,82]。つまり、蒸留水中 (pH5.5) においてHTM は両方がプロトン化されたジカチオン体で存在するが、pH7.4 のリン酸緩衝液中においてはアミノ基のみがプロトン化されたモノカチオン体で存在する。ジカチオン体のHTM は、アミノ基のみがプロトン化されたモノカチオン体のHTM と比較して、水溶液中においてMAA とより容易に複合体を形成することが報告されている [79,99]。したがって、蒸留水中においてより容易にHTM がMAA と結合することができるため、リン酸緩衝液中における測定では蒸留水中と比較して電位変化が小さくなったと考えられた。二点目は、HTM センサーはフリー体で存在するHTM を認識し電位応答を示すが、そのフリー体のHTM の減少である。pH7.4 のリン酸緩衝液中においてモノカチオン体で存在するHTM の一部は、カウンターイオン (H_2PO_4^- および HPO_4^{2-}) と複合体を形成していると考えられる。つまりリン酸緩衝液中におけるHTM の総濃度 $[\text{HTM}]_t$ は、フリー体のHTM の濃度 $[\text{HTM}]_f$ と複合体を形成しているHTM の濃度 $[\text{HTM}]_b$ の和で表される。リン酸緩衝液の塩濃度の増加に伴い、 $[\text{HTM}]_b$ が増加することで $[\text{HTM}]_f$ が減少し、電位変化の低下につながったと考えられた。三点目の要因として、活量係数の低下である。リン酸緩衝液の塩濃度の増加に伴い、活量係数は低下すると考えられる。活量 X は、活量係数を γ とした時 $X = \gamma \cdot [\text{HTM}]_f$ で表され、 X が実際にHTM センサーへ結合するHTM 濃度である。したがって、上述のように $[\text{HTM}]_f$ 、 γ 共に低下していると考えられることから、HTM センサーの応答性が低下したと示唆された。

次に、 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液中におけるHTM センサーの定量性を評価した。第2章 第3節 第4項に示すように、蒸留水中においてHTM センサーは、 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、検出限界は $9.6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ であった。リン酸緩衝液中では蒸留水中での応答性より劣ることにより、検出限界および定量濃度域は $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ から $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ と、高濃度側にシフトした。また、リン酸緩衝液中 (pH7.4) においてHTM はモノカチオン体で存在すると考えられるため、ネルンストの式に適用した時 n は1となり、検量線の傾きは約59.2を示すことが予想された。しかし、測定したHTM センサーの検量線の傾きは22.7で、ネルンストの式に適用すると、 n は約3となる。これは、測定用溶媒であるリン酸緩衝液の濃度の低さに起因すると考えられる。リン酸緩衝液の濃度は、 1 mmol L^{-1} であるため、HTM 濃度が $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ より高濃度では緩衝能が弱まり、実際の溶液のpHは低下していることが危惧される。そのため、高濃度のHTMは、一部がジカチオン体で存在していると推察される。このことから、HTM の高濃度域においては、HTM センサーが、2価のイオンとしてHTM を認識することで、予想されるより大きな n になったと考えられる。本結果から、上述した緩衝液の塩濃度の増加に伴うHTM センサーの電位変化量の減少についての要因として、一点目のHTM の分子状態の変化は否定される。したがって、HTM センサーの電位変化量

の減少は、二点目および三点目として挙げた、フリー体の HTM の減少および活量係数の低下が大きな要因である可能性が高いと考えられる。応答性を向上させ、より低濃度での測定を可能にすることが今後の課題である。

さらに、HTM センサーの応答性に及ぼす血清の影響について検討した。その結果、測定溶媒中の血清含有率が 5%以上では、HTM センサーの電位変化量は顕著に減少した。これは血清中のタンパク質が HTM センサーの表面に吸着するといった、血清中の物質が影響を及ぼしていると考えられる。MIP を構成する架橋性モノマーが疎水性であることから、HTM センサーの表面は疎水性であり、タンパク質の疎水部と HTM センサー表面の間で疎水性相互作用が働いたと考えられる。

最後に、既知濃度の HTM を添加したウシ血清を測定試料とし、 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液中での定量を試みた。その結果添加した HTM 濃度に対して良好な回収率を示した。HTM センサーはフリー体で存在する HTM を認識し応答するため、HTM が血清中の物質と結合することにより HTM センサーの応答性は低下すると考えられる。アルブミンは血清中に存在する主要タンパク質であり、種々の物質と結合することが知られている。Wang らは、HTM とウシ血清アルブミン (BSA) の相互作用に関して、HTM と BSA の結合様式には高親和性部位と低親和性部位の 2 種類存在するが、低親和性部位がより優位に働いていると報告している [100]。ウシ血清含有率 1%リン酸緩衝液中という今回の実験条件下において、BSA のモル濃度は HTM のモル濃度に対して 0.6%以下であり、BSA と HTM の結合はほぼ無視でき、HTM は大半がフリー体で存在していると考えられる。その結果、添加した HTM 濃度に対して 100%に近い回収率が得られたと考えられた。

一方で、本 HTM センサーは今後もより改善が求められる。例えば、成人健常者における HTM 血中濃度は $44.87 \pm 1.09 \text{ ng mL}^{-1}$ ($4.04 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)、安定狭心症患者、不安定狭心症患者および ST 上昇型心筋梗塞患者における HTM 血中濃度は健常者より上昇しそれぞれ、 $74.8 \pm 4.1 \text{ ng mL}^{-1}$ から $79.7 \pm 3.1 \text{ ng mL}^{-1}$ ($6.73\text{-}7.17 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)、 $90.85 \pm 6.34 \text{ ng mL}^{-1}$ ($8.17 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)、 $127 \pm 6.34 \text{ ng mL}^{-1}$ ($1.14 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) と報告されている [95]。HTM は体内においてほとんどが肥満細胞および好中球に蓄積されており、血漿および血清中の HTM 濃度は全血濃度より低い。したがって、現在の HTM センサーの定量域は生体内 HTM 濃度よりはるかに高濃度であるため、臨床検査への応用に向けてはより低濃度での測定が可能となるよう改良する必要がある。また、測定試料中の血清含有率が上昇すると HTM センサーの応答性が低下し試料の希釈が必要であることから、その点の改良も今後必要である。

第5節 小括

本章において、MIP を感応素子とした HTM 電位検出型センサーを臨床的に応用するために、まず塩濃度および血清が HTM センサーの性能に与える影響を検討した。その結果、測定溶媒であるリン酸緩衝液 (pH 7.4) の濃度の上昇に伴い、HTM センサーの応答性が低下することが明らかとなった。この原因は、リン酸緩衝液中のカウンターイオンが HTM と複合体を形成しフリー体の HTM が減少すること、および HTM の活量係数の低下によるものであることが示唆された。以上より、以降の実験においては比較的影響が少ない 1 mmol L^{-1} のリン酸緩衝液を用いることとした。次に、 1 mmol L^{-1} のリン酸緩衝液中における HTM センサーの定量性を検討したところ、HTM 濃度が $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ から $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ の HTM 濃度範囲において電位変化量との間に直線性が得られ、検出限界は $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ であった。さらに、測定溶媒に血清を添加し HTM センサーの応答性を確認したところ、血清濃度が 3%以下では応答性に影響を及ぼさないことが示された。そこで最後に、 1 mmol L^{-1} リン酸緩衝液中において、ウシ血清試料中に添加した HTM の定量をおこなったところ、血清に添加した HTM の回収率は 91-104%と良好であった。

以上より、低濃度の HTM の定量や、血清試料における希釈の必要性など、臨床応用に向けての課題は残っており今後も検討を続けていく必要があるものの、本 HTM センサーは固相抽出などといった手間を要する前処理の必要なく、血清中の HTM を直接定量できることが示された。

総括

医療分野や環境分野などあらゆる分野において、目的とする物質の定性分析および定量分析は重要である。本研究では、バイオセンサーが有する課題を克服する新規臨床分析用化学センサーの基盤構築を目指し、MIP を感応素子とした電位検出型センサーの開発を試みた。本センサーは、棒状炭素電極上に MIP を形成させることで、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リアルタイムに捉えることができ、安価かつ簡便に作製が可能である。本研究により、作製したセンサーの応答性と特異性を評価することで、MIP を感応素子とした電位検出型センサーのセンサーとしての妥当性を示すことができた。本研究において、2 種類の物質を鑄型分子として用いたセンサーの開発をおこなった。これらの結果は、今後、他の物質を分析対象物質とするセンサーの作製への応用へつなげることができる。また、本センサーを血清中試料の定量分析に適用し、臨床分析用センサーとしての応用の可能性が示唆された。現在用いられる血液中試料の定量には、除タンパク操作が必要なことが多い。また除タンパク操作は、目的物質の化学種を変化させてしまう可能性があることから、さらなる分析方法の工夫が要求されることもある。したがって、本研究で開発した前処理不要な定量方法は、それらの手間を一挙に省略できることから、簡便さが格段に向上することが期待できる。

一方、本センサーの定量濃度域をより低濃度かつ広範囲にすることは今後の課題である。それにはセンサーの感度を向上させる必要がある。MIP の調製における第 2 膨潤の懸濁液中の鑄型分子、機能性モノマー、架橋性モノマーの濃度の増減により、センサーの応答性に変化をもたらすと考えられる。あるいは、導電性ポリマーを用いる、ポリマー内にカーボンナノチューブなどの導電性物質をドーピングするなど、MIP 自身に電気伝導性を付与することで改善可能ではないかと考えている。加えて、電位差測定法における電位変化の検出では、分析対象物質のイオン価数が電極電位に反映される。また、測定環境における pH 条件が MIP の分子認識能に影響を及ぼすことが報告されている。今回の検討では、作製条件の pH 制御はおこなわなかったが、測定条件と同じ pH 条件でセンサーを作製することで、測定時の鑄型分子と機能性モノマー間の相互作用がより容易になり、応答性の向上につながることを期待できる。現在その研究についても着手している。

さらに、センサーの応答速度の改良も必要である。応答速度は、鑄型分子と機能性モノマーの親和性の高さに相関すると考えられる。今回の検討では、1 種類の機能性モノマーにより MIP を作製しているが、複数の機能性モノマーを用い、またその配合量を検討することで、より鑄型分子に対する親和性を高めることができると考えられる。

また、針状超微小化することにより医療分野における応用の幅が広がる。現在、指示電極である MIP をコーティングした棒状炭素電極と参照電極は別々であるが、針状超微小化するためにはそれらを一本化することが望ましい。指示電極と参照電極を一本化した複合電極の作製方法については、著者の所属する研究室において既に考案されており、その性能についての基礎的知見は得られている。

MIP を感応素子とした針状超微小電位検出型センサーを確立することができれば、特にリ

リアルタイムの検出に価値を見出せる。例えば、今回鑄型分子として選択した HTM は、アナフィラキシーショックにおいて血中濃度が上昇する場合のあることが知られるが、その上昇は短時間で消失し、元の濃度にもどる。また、現在、治療薬物モニタリングは採血時 1 点のみの測定値から血中濃度を概算している。本センサーを用いて、目的とする生体内成分や服用された医薬品の血中濃度をリアルタイムに経時的変化をとらえることができれば、患者個々に対応した治療設計や病態把握につなげることができると期待できる。

謝辞

本研究をおこなうにあたり、丁寧にご指導ご鞭撻いただき、また学位論文の執筆にあたり、私を励まし様々なご尽力をいただきました京都薬科大学 薬品分析学分野 武上茂彦教授に心より感謝申し上げます。

長きにわたりご指導ご鞭撻を賜りました京都薬科大学 名誉教授 北出達也先生に謹んで深謝申し上げます。

本論文をご精読いただき、丁寧なご指導を賜りました京都薬科大学 薬理学分野 田中智之教授、京都薬科大学 代謝分析学分野 安井裕之教授に深く御礼申し上げます。

本研究をおこなうにあたり、協力していただいた京都薬科大学 薬品分析学分野の学生諸氏に感謝致します。

研究室活動において、多大なるご協力と日々の癒しを頂いた事務補助職員 岡山茜氏に謝意を表します。

最後に、これまで数多くのサポートをしていただいた家族、親族に、特に学位取得への道を一番喜び私の背中を押してくれた祖父 外村留吉氏と、いつも温かく見守り続けてくれた父 彰、母 泰江に、論文執筆で悩んでいる私に笑顔をくれた姪 知花ちゃんに、心より感謝致します。

引用文献

1. 化学センサー—その基礎と応用—, 清山哲郎, 塩川二朗, 鈴木周一, 笛木和雄編. 講談社, 1982.
2. Yujie Liu, Rocío Cánovas, Gastón A. Crespo, María Cuartero. Thin-layer potentiometry for creatinine detection in undiluted human urine using ion-exchange membranes as barriers for charged interferences. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 3315-3323.
3. Takumi Komikawa, Masayoshi Tanaka, Kentaro Yanai, Benjamin R. G. Johnson, Kevin Critchley, Takeshi Onodera, Stephen D. Evans, Kiyoshi Toko, Mina Okochi. A bioinspired peptide matrix for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 153, 112030.
4. Ekaterina Makhneva, Zdeněk Farka, Matěj Pastucha, Adam Obrusník, Veronika Horáčková, Petr Skládal, Lenka Zajíčková. Maleic anhydride and acetylene plasma copolymer surfaces for SPR immunosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 411, 7689-7697.
5. Sang H. Lee, Yae E. Park, Ji E. Lee, Hye J. Lee. A surface plasmon resonance biosensor in conjunction with a DNA aptamer-antibody bioreceptor pair for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 concentrations in colorectal cancer plasma solutions. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 154, 112065.
6. Farabi Temel. One novel calix[4]arene based QCM sensor for sensitive, selective and high performance-sensing of formaldehyde at room temperature. *Talanta* **2020**, 211, 120725.
7. Veli C. Ozalp, Gulay Bayramoglu, Zehra Erdem, Arica M. Yakup. Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to aptamer functionalized core-shell type magnetic separation. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 853, 533-540.
8. Kazuya Matsumoto, Brylee D. B. Tiu, Akifumi Kawamura, Rigoberto C. Advincula, Takashi Miyata. QCM sensing of bisphenol A using molecularly imprinted hydrogel/conducting polymer matrix. *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* **2016**, 48, 525-532.
9. Maria Yakovleva, Sunil Bhand, Bengt Danielsson. The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 766, 1-12.
10. Zong Dai, Simona Serban, Huangxian Ju, Nabil E. Murr. Layer-by layer hydroxymethyl ferrocene modified sensor for one-step flow/stop-flow injection amperometric immunoassay of α -fetoprotein. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 1700-1706.
11. Anqing Wang, Yaping Ding, Li Li, Dingding Duan, Qianwen Mei, Qi Zhuang, Shiqiang Cui, Xinyu He. A novel electrochemical enzyme biosensor for detection of 17β -estradiol by mediated electron-transfer system. *Talanta* **2019**, 192, 478-485.
12. Yuji Tani, Katsuhito Tanaka, Tomoki Yabutani, Yuji Mishima, Haruhiko Sakuraba, Toshihisa Ohshima, Junko Motonaka. Development of a D-amino acids electrochemical sensor based on immobilization of thermostable D-Proline dehydrogenase within agar gel membrane. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 619, 215-220.
13. Peixin Tang, Nadia Kaspersky, Gang Sun. Robust, rapid, and ultrasensitive colorimetric sensors through dye chemisorption on poly-cationic nanodots. *Talanta* **2020**, 219, 121149.

14. Jean C. Munyemana, Jia Chen, Xin Wei, Mohammad C. Ali, Yangxia Han, Hongdeng Qiu. Deep eutectic solvent-assisted facile synthesis of copper hydroxide nitrate nanosheets as recyclable enzyme-mimicking colorimetric sensor of biothiols. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, 412, 4629-4638.
15. Yanqiu Zhang, Jiayang Liu, Xiaohan Wu, Wenquan Tao, Zhuo Li. Ultrasensitive detection of Cr(VI) ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}/\text{CrO}_4^{2-}$) ions in water environment with a fluorescent sensor based on metal-organic frameworks combined with sulfur quantum dots. *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1131, 68-79.
16. Fei Fu, Yaqing Zhang, Linyao Li, Hong Wang, Qingjin Li, Xiaoqi Tao, Yang Song, Erqun Song. Intracellular Pathogen detection based on dual-recognition units constructed fluorescence resonance energy transfer nanoprobe. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 11462-11468.
17. Hongru Mou, Yue Sun, Zhigang Zeng, Hongbin Zhao, Baoli An, Jiaqiang Xu, Xiaohong Wang. Low-temperature hydrogen detection sensor based on CeO_2 -DOPED SnO_2 . *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* **2020**, 31, 15785-15793.
18. Jean-Baptiste Sanchez, Angela Sanchez-Sanchez, Maria T. Izquierdo, Sandrine Mathieu, Jaafar Ghanbaja, Franck Berger, Alain Celzard, Vanessa Fierro. Nanostructured tin oxide materials for the sub-ppm detection of indoor formaldehyde pollution. *Talanta* **2020**, 208, 120396.
19. Diana K. Fahem, Ola M. E. Houssini, Mohamed K. Abd El-Rahman, Hala E. Zaazaa. Screen printed potentiometric sensor for therapeutic monitoring of rocuronium at the point of care. *Talanta* **2019**, 196, 137-144.
20. Jeffrey G. Bell, Maral P. S. Mousavi, Mohamed K. Abd El-Rahman, Edward K. W. Tan, Shervanthi Homer-Vanniasinkam, George M. Whitesides. Paper-based potentiometric sensing of free bilirubin in blood serum. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 126, 115-121.
21. Saranya Shanmugam, Kavitha Thandavan, Sakthivel Gandhi, Swaminathan Sethuraman, John B. B. Rayappan, Uma M. Krishnan. Development and evaluation of a highly sensitive rapid response enzymatic nanointerfaced biosensor for detection of putrescine. *Analyst* **2011**, 136, 5234-5240.
22. Francesca Costantini, Roald Tiggelaar, Simona Sennato, Francesco Mura, Stefan Schlautmann, Federico Bordi, Han Gardeniers, Cesare Manetti. Glucose level determination with a multi-enzymatic cascade reaction in a functionalized glass chip. *Analyst* **2013**, 138, 5019-5024.
23. Jun P. Kim, Byung Y. Lee, Seunghun Hong, Sang J. Sim. Ultrasensitive carbon nanotube-based biosensors using antibody-binding fragments. *Anal. Biochem.* **2008**, 381, 193-198.
24. Ekaterina Makhneva, Zdeněk Farka, Matěj Pastucha, Adam Obrusník, Veronika Horáčková, Petr Skládal, Lenka Zajíčková. Maleic anhydride and acetylene plasma copolymer surfaces for SPR immunosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 411, 7689-7697.
25. John C. Pickup, Faeiza Hussain, Nicholas D. Evans, Nabihah Sachedina. *In vivo* glucose monitoring: the clinical reality and the promise. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 20, 1897-1902.
26. Stuart J. Updike, George P. Hicks. The enzyme electrode. *Nature* **1967**, 214, 986-988.
27. Dario Kriz, Klaus Mosbach. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 300, 71-75.
28. Dario Kriz, Olof Ramström, Anders Svensson, Klaus Mosbach. Introducing biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymer as recognition elements. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2142-

2144.

29. Qiaohui Luo, Neng Yu, Chunfei Shi, Xiaoping Wang, Jianmin Wu. Surface plasmon resonance sensor for antibiotics detection based on photo-initiated polymerization molecularly imprinted array. *Talanta* **2016**, 161, 797-803.
30. Shirinaz I. Khan, Rakesh R. Chillawar, Kiran K. Tadi, Ramani V. Motghare. Molecular imprinted polymer based impedimetric sensor for trace level determination of digoxin in biological and pharmaceutical samples. *Curr. Anal. Chem.* **2018**, 14, 474-482.
31. Abhijit C. Roy, V. S. Nisha, Chetna Dhand, Md. Azahar Ali, Banshi D. Malhotra. Molecularly imprinted polyaniline-polyvinyl sulphonic acid composite based sensor for para-nitrophenol detection. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 777, 63-71.
32. Silke Kröger, Anthony P. F. Turner, Klaus Mosbach, Karsten Haupt. Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3698-3702.
33. Lucia Cenci, Maddalena Bertolla, Andrea Anesi, Emmanuele Ambrosi, Graziano Guella, Alessandra M. Bossi. Micro- versus nano-sized molecularly imprinted polymers in MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409, 6253-6261.
34. Wei Li, Qi Zhang, Yijia Wang, Yanyan Ma, Zhanchen Guo, Zhen Liu. Controllably prepared aptamer–molecularly imprinted polymer hybrid for high-specificity and high-affinity recognition of target proteins. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 4831-4837.
35. Suticha Chunta, Roongnapa Suedee, Peter A. Lieberzeit. High-density lipoprotein sensor based on molecularly imprinted polymer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410, 875-883.
36. Olena Slinchenko, Alexandre Rachkov, Hirotaka Miyachi, Masayo Ogiso, Norihiko Minoura. Imprinted polymer layer for recognizing double-stranded DNA. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 1091-1097.
37. Lukuan Liu, Kaiguang Yang, Hang Gao, Xiao Li, Yuanbo Chen, Lihua Zhang, Xiaojun Peng, Yukui Zhang. Artificial antibody with site-enhanced multivalent aptamers for specific capture of circulating tumor cells. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 2591-2594.
38. Yukari Nakamura, Shizuka Masumoto, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka. Molecularly imprinted polymer for glutathione by modified precipitation polymerization and its application to determination of glutathione in supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 144, 230-235.
39. Yan Zhang, Jiandu Lei. Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymeric microspheres for chloramphenicol by aqueous suspension polymerization as a high performance liquid chromatography stationary phase. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, 34, 1839-1844.
40. Ivona Lhotská, Aneta Kholová, Andrea Machyňáková, Katarína Hroboňová, Petr Solich, František Švec, Dalibor Šatínský. Preparation of citrinin-selective molecularly imprinted polymer and its use for on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 411, 2395-2404.
41. Sijia Tan, Hailong Yu, Yahui He, Miao Wang, Guiqiao Liu, Sihui Hong, Feiyan Yan, Yanli Wang, MengQiang Wang, Tengfei Li, Jing Wang, Ei-Aty A. M. Abd, Ahmet Hacımuftuoğlu, Yongxin

- She. A dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for selective determination of four pyridine carboxylic acid herbicides in milk. *J. Chromatogr. B* **2019**, 1108, 65-72.
42. Manal Bitar, Philippe Cayot, Elias Bou-Maroun. Molecularly imprinted polymer solid phase extraction of fungicides from wine samples. *Anal. Methods* **2014**, 6, 6467-6472.
 43. Javier L. Urraca, José F. Huertas-Pérez, Guillermo A. Cazorla, Jesus Gracia-Mora, Ana M. García-Campaña, María C. Moreno-Bondi. Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 408, 3033-3042.
 44. Tatsuya Kitade, Keisuke Kitamura, Tomoyuki Konishi, Shigehiko Takegami, Takayoshi Okuno, Michie Ishikawa, Manabu Wakabayashi, Kayoko Nishikawa, Yoko Muramatsu. Potentiometric immunosensor using artificial antibody based on molecularly imprinted polymers. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 6802-6807.
 45. Ayman H. Kamel, Abd E.-G. E. Amr, Nashwa H. Ashmawy, Hoda R. Galal, Abdulrahman A. Almehezia, Teraze A. Youssef, Mohamed A. Al-Omar, Ahmed Y. A. Sayed. Validation of a novel potentiometric method based on a polymeric PVC membrane sensor integrated with tailored receptors for the antileukemia drug cytarabine. *Polymers* **2020**, 12, 1343.
 46. Vikas K. Singh, Pradeep K. Yadav, Subhash Chandra, Daraksha Bano, Mahe Talat, Syed H. Hasan. Peroxidase mimetic activity of fluorescent NS-carbon quantum dots and their application in colorimetric detection of H₂O₂ and glutathione in human blood serum. *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6, 5256-5268.
 47. Sonia Sentellas, Oriol Morales-Ibanez, Miriam Zanuy, Joan J. Albertí. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicol. In Vitro* **2014**, 28, 1006-1015.
 48. Anna Pastore, Giorgio Federici, Enrico Bertini, Fiorella Piemonte. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* **2003**, 333, 19-39.
 49. Yingshu Guo, Hao Wang, Yuanshun Sun, Bin Qu. A disulfide bound-molecular beacon as a fluorescent probe for the detection of reduced glutathione and its application in cells. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3221-3223.
 50. Roger R. Perry, Joann Mazetta, Mark Levin, Sam C. Barranco. Glutathione Levels and Variability in Breast Tumors and Normal Tissue. *Cancer* **1993**, 72, 783-787.
 51. Jeffrey S. Armstrong, Kirsten K. Steinauer, Brita. Hornung, J. M. Irish, Philip Lecane, Geoff W. Birrell, Donna M. Peehl, Susan J. Knox. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ.* **2002**, 9, 252-263.
 52. Moran Benhar, Iart L. Shytaj, Jonathan S. Stamler, Andrea Savarino. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV. *J. Clin. Invest.* **2016**, 126, 1630-1639.
 53. Jun Yang, Hongtao Chen, Iontcho R. Vlahov, Ji-Xin Cheng, Philip S. Low. Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.* **2006**, 103, 13872-13877.
54. Zhenzhen Chen, Qingling Li, Xu Wang, Zhiyuan Wang, Ruirui Zhang, Miao Yin, Lingling Yin, Kehua Xu, Bo Tang. Potent method for the simultaneous determination of glutathione and hydrogen peroxide in mitochondrial compartments of apoptotic cells with microchip electrophoresis-laser induced fluorescence. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2006-2012.
 55. Wenrui Jin, Xiujun Li, Ning Gao. Simultaneous determination of tryptophan and glutathione in individual rat hepatocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection at a carbon fiber bundle-Au/Hg dual electrode. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 3859-3864.
 56. Lucie Bláhová, Jiří Kohoutek, Jana Lebedová, Luděk Bláha, Zbyněk Večeřa, Marcela Buchtová, Ivan Míšek, Klára Hilscherová. Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in tissues by a novel liquid chromatography-mass spectrometry method: application in an inhalation study of Cd nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 5867-5876.
 57. Xiangming Guan, Brianna Hoffman, Chandradhar Dwivedi, Duane P. Matthees. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 31, 251-261.
 58. Tereza Moore, Anthony Le, Anna-Kaisa Niemi, Tony Kwan, Krinstina Cusmano-Ozog, Gregory M. Enns, Tina M. Cowan. A new LC-MS/MS method for the clinical determination of reduced and oxidized glutathione from whole blood. *J. Chromatogr. B* **2013**, 929, 51-55.
 59. Daniela Giustarini, Isabella Dalle-Donne, Roberto Colombo, Aldo Milzani, Ranieri Rossi. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human BLOOD. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, 35, 1365-1372.
 60. Inmaculada Andujar-Ortiz, Maria Á. Pozo-Bayón, M. V. Moreno-Arribas, Pedro J. Martín-Álvarez, Juan J. Rodríguez-Bencomo. Reversed-phase high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor γ -glutamyl cysteine in wines and model wines supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. *Food Anal. Methods* **2012**, 5, 154-161.
 61. Constantinos K. Zacharis, Paraskevas D. Tzanavaras, Theano D. Karakosta, Demetrius G. Themelis. Zwitterionic hydrophilic interaction chromatography coupled with post-column derivatization for the analysis of glutathione in wine samples. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 795, 75-81.
 62. Hui Xu, Maria Hepel. "Molecular Beacon"-based fluorescent assay for selective detection of glutathione and cysteine. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 813-819.
 63. Rui Zhang, Xia Zhong, An-Yi Chen, Jia-Li Liu, Sheng-Kai Li, Ya-Qin Chai, Ying Zhuo, Ruo Yuan. Novel $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{cpaphen})^{2+}/\text{TPrA}/\text{TiO}_2$ ternary ECL system: an efficient platform for the detection of glutathione with Mn^{2+} as substitute target. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 3681-3686.
 64. Yingchun Li, Han Song, Lu Zhang, Peng Zuo, Bang-ce Ye, Jun Yao, Wen Chen. Supportless electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer modified nanoporous microrod for determination of dopamine at trace level. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 78, 308-314.
 65. Huiping Bai, Chunqiong Wang, Jing Chen, Jun Peng, Qiue Cao. A novel sensitive electrochemical sensor based on in-situ polymerized molecularly imprinted membranes at graphene modified

- electrode for artemisinin determination. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 64, 352-358.
66. Chao Zhang, Yongxin She, Tengfei Li, Fengnian Zhao, Maojun Jin, Yirong Guo, Lufei Zheng, Shanshan Wang, Fen Jin, Hua Shao, Haijin Liu, Jing Wang. A highly selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole-modified gold electrode for the determination of glyphosate in cucumber and tap water. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409, 7133-7144.
 67. Yudong Gao, Lu Wang, Yulong Zhang, Shuo Li, Lina Zou, Baoxian Ye. Greenly synthesized graphene with L-glutathione-modified electrode and its application towards determination of rutin. *RSC Adv.* **2016**, 6, 94024-94032.
 68. André-Patrick Arrigo, Wance J. J. Firdaus, Grégory Mellier, Maryline Moulin, Catherine Paul, Chantal Diaz-latoud, Carole Kretz-remy. Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods* **2005**, 35, 126-138.
 69. Zhe-Bin Zheng, Guozhang Zhu, Heekyung Tak, Erin Joseph, Julie L. Eiseman, Donald J. Creighton. *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymers of a glutathione (GSH)-activated glyoxalase I inhibitor and DNA alkylating agent: synthesis, reaction kinetics with GSH, and *in vitro* antitumor activities. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 598-607.
 70. Shimako Yoshitake, Soichiro Ijiri, Jan Kehr, Takashi Yoshitake. Inhibition of histamine release by local and intracerebroventricular infusion of galanin in hypothalamus, hippocampus and prefrontal cortex of awake rat: A microdialysis study. *Neurosci. Lett.* **2013**, 534, 58-63.
 71. Shaodong Jia, Yun P. Kang, Jeong H. Park, Jeongmi Lee, Sung W. Kwon. Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Chem.* **2012**, 132, 1185-1190.
 72. Emmanuel Bourgogne, François X. Mathy, David Boucaut, Hilmar Boekens, Olivier Laprêvôte. Simultaneous quantitation of histamine and its major metabolite 1-methylhistamine in brain dialysates by using precolumn derivatization prior to HILIC-MS/MS analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 449-459.
 73. Anna-Marie Hogan, Conor Crean, Una M. Barrett, Elizabeth Guihen, Jeremy D. Glennon. Histamine determination in human urine using sub-2 μm C18 column with fluorescence and mass spectrometric detection. *J. Sep. Sci.* **2012**, 35, 1087-1093.
 74. José O. Fernandes, I. C. Judas, Maria B. Oliveira, Isabel M. Ferreira, Margarida A. Ferreira. A GC-MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. *Chromatographia Supplement* **2001**, 53, S-327-S-331.
 75. Xiaorong Yang, Bingsheng Yu, Lihua Nie, Shouzhuo Yao. Ion chromatographic determination of histamine in fish with series bulk acoustic wave detection. *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, 36, 29-32.
 76. Luciano Vitali, Andressa C. Valesse, Mônia S. Azevedo, Luciano V. Gonzaga, Ana C. O. Costa, Marcel Piovezan, Jacqueline P. Vistuba, Gustavo A. Micke. Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electroheresis. *Talanta* **2013**, 106, 181-185.
 77. Hui Yu, Daina Zhuang, Xingjuan Hu, Shuang Zhang, Zhiyong He, Maomao Zeng, Xubo Fang, Jie

- Chen, Xiaoe Chen. Rapid determination of histamine in fish by thin-layer chromatography-image analysis method using diazotized visualization reagent prepared with *p*-nitroaniline. *Anal. Methods* **2018**, 10, 3386-3392.
78. Caroline Poli, Mathieu Laurichesse, Octavie Rostan, Delphine Rossille, Pascale Jeannin, Martine Drouet, Gilles Renier, Alain Chevailler, Karin Tarte, Claude Bendavid, Céline Beauvillain, Patricia Amé-Thomas. Comparison of two enzymatic immunoassays, high resolution mass spectrometry method and radioimmunoassay for the quantification of human plasma histamine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 307-314.
79. Foteini A. Trikka, Keiichi Yoshimatsu, Lei Ye, Dimitrios A. Kyriakidis. Molecularly imprinted polymers for histamine recognition in aqueous environment. *Amino Acids* **2012**, 43, 2113-2124.
80. Kelvin F. Pratama, Maretty E. R. Manik, Driyanti Rahayu, Aliya N. Hasanah. Effect of the molecularly imprinted polymer component ratio on analytical performance. *Chem. Pharm. Bull.* **2020**, 68, 1013-1024.
81. Na Sun, Alex Avdeef. Biorelevant pKa (37°C) predicted from the 2D structure of the molecule and its pKa at 25°C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 56, 173-182.
82. Takeshi Baba, Toru Matsui, Katsumasa Kamiya, Masayoshi Nakano, Yasuteru Shigeta. A density functional study on the pKa of small polyprotic molecules. *Int. J. Quantum Chem.* **2014**, 114, 1128-1134.
83. Noriyasu Hirasawa. Expression of histidine decarboxylase and its roles in inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 376.
84. Kelley L. Morse, Jiang Behan, Thomas M. Laz, Robert E. West, Scott A. Greenfeder, John C. Anthes, Shelby Umland, Yuntao Wan, R. William Hipkin, Waldemar Gonsiorek, Niu Shin, Eric L. Gustafson, Xudong Qiao, Suke Wang, Joseph A. Hedrick, Jonathan Greene, Marvin Bayne, Frederick J. Monsma. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 296, 1058-1066.
85. Anna C. Calvielli Castelo Branco, Fábio Seiti Yamada Yoshikawa, Anna J. Pietrobon, Maria N. Sato. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediators Inflammation* **2018**, Article ID 9524075.
86. Ekaterini Tiligada, Madeleine Ennis. Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, 177, 469-489.
87. Alessandro Pini, Cristina Grange, Eleonora Veglia, Monica Argenziano, Roberta Cavalli, Daniele Guasti, Laura Calosi, Corrado Ghè, Roberto Solarino, Robin L. Thurmond, Giovanni Camussi, Paul L. Chazot, Arianna C. Rosa. Histamine H₄ receptor antagonism prevents the progression of diabetic nephropathy in male DBA2/J mice. *Pharmacol. Res.* **2018**, 128, 18-28.
88. Jeffery M. Cowden, Fuqu Yu, Homayon Banie, Mandana Farahani, Ping Ling, Steven Nguyen, Jason P. Riley, Mai Zhang, Jian Zhu, Paul J. Dunford, Robin L. Thurmond. The histamine H₄ receptor mediates inflammation and Th17 responses in preclinical models of arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, 73, 600-608.
89. Bastian Schirmer, Thomas Rezniczek, Roland Seifert, Detlef Neumann. Proinflammatory role of

- the histamine H₄ receptor in dextrane sodium sulfate-induced acute colitis. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, 98, 102-109.
90. Ping Zhao, Haitao Guan, Lei Dong, Jinyan Luo, Jun Gong. Role of mast cells and eosinophils in different stages of trinitrobenzenesulphonic acid-induced rat colitis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2019**, 12, 498-506.
 91. Csaba Varga, Krisztina Horvath, Aniko Berko, Robin L. Thurmond, Paul J. Dunford, Brendan J. R. Whittle. Inhibitory effects of histamine H₄ receptor antagonists on experimental colitis in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 522, 130-138.
 92. Ken A. Lindstedt, Mikko I. Mäyränpää, Petri T. Kovanen. Mast cells in vulnerable atherosclerotic plaques - a view to a kill. *J. Cell. Mol. Med.* **2007**, 11, 739-758.
 93. Petri T. Kovanen, Maija Kaartinen, Timo Paavonen. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* **1995**, 92, 1084-1088.
 94. Jan Steffel, Matthias Hermann, Helen Greutert, Steffen Gay, Thomas F. Lüscher, Frank Ruschitzka, Felix C. Tanner. Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-Jun terminal NH₂ kinase phosphorylation. *Circulation* **2005**, 111, 1685-1689.
 95. Vladimir Zdravkovic, Suzana Pantovic, Gvozden Rosic, Aleksandra Tomic-Lucic, Nemanja Zdravkovic, Maja Colic, Zdravko Obradovic, Mirko Rosic. Histamine Blood concentration in ischemic heart disease patients. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, Article ID 315709.
 96. Hidenori Suzuki, Yuhki Yanase, Tomoko Tsutsui, Kaori Ishii, Takaaki Hiragun, Michihiro Hide. Applying surface plasmon resonance to monitor the IgE-mediated activation of human basophils. *Allergol. Int.* **2008**, 57, 347-358.
 97. Akio Tanaka, Toshihiko Tanaka, Hiroshi Suzuki, Kaori Ishii, Yoshikazu Kameyoshi, Michihiro Hide. Semi-purification of the immunoglobulin E-sweat antigen acting on mast cells and basophils in atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* **2006**, 15, 283-290.
 98. 厚生労働省報告 ヒスタミンによる食中毒発生状況
 99. Xizhi Shi, Aibo Wu, Guorun Qu, Rongxiu Li, Dabing Zhang. Development and characterisation of molecularly imprinted polymers based on methacrylic acid for selective recognition of drugs. *Biomaterials* **2007**, 28, 3741-3749.
 100. Xiao M. Wang, Ming Guo, Min Guo, Yan Zhang. Study on interaction of histamine, tyramine and phenethylamine with bovine serum albumin using isothermal titration calorimetry. *Asian J. Chem.* **2016**, 28, 2188-2192.