

博士学位論文

魚類のためのストレス応答測定用
バイオセンサの開発に関する研究

平成 28 年度
(2016 年 9 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
応用環境システム学専攻

呉 海雲

魚類のためのストレス応答測定用バイオセンサの開発に関する研究

目 次

I 序論.....	1
I.1 緒言.....	1
I.2 魚類資源の不足による食糧問題及び養殖場現状	2
I.3 血中成分を指標とした魚類のストレス状態の評価.....	4
I.4 ストレス指標の測定法の現状	5
I.5 バイオセンサ	6
I.5.1 バイオセンサの原理.....	6
I.5.2 酵素センサ	7
I.5.3 イムノセンサ.....	8
I.6 本研究の目的及び意義	9
第一章 各種ストレス因子によるストレス応答の測定	14
1.1 緒言.....	14
1.2 実験方法.....	19
1.2.1 試薬.....	19
1.2.2 試薬の調製.....	19
1.2.2.1 リン酸緩衝液 (PB) の調製.....	20
1.2.2.2 ELISA 用緩衝液の調製	20
1.2.2.3 グルコース標準液の調製 (5000 mg dl ⁻¹ , 0.1 M, pH 7.8)	20
1.2.2.4 コルチゾル標準試料の調製	20
1.2.2.5 グルコースオキシダーゼ溶液の調製 (1462 unit ml ⁻¹ , pH 7.8)	21
1.2.2.6 ELISA 用洗浄液の調製	21
1.2.2.7 AChE 標識抗原の調製.....	21
1.2.2.8 抗-Cort 抗体の調製.....	22
1.2.3 試験魚及び実試料の調製.....	22
1.2.3.1 試験魚	22
1.2.3.2 血漿試料の採取.....	22
1.2.4 グルコース測定用バイオセンサの作製.....	23
1.2.5 無線式測定システムによるグルコースの測定	24
1.2.5.1 測定用ソフトウェアの設定	24
1.2.5.2 無線式ポテンショスタット回路の防水処理.....	25

1.2.5.3	バイオセンサの魚体への装着	26
1.2.5.4	従来法によるグルコースの測定	26
1.2.5.5	測定値の校正	26
1.2.5.6	従来法によるコルチゾル測定	27
1.2.6	ストレス応答の測定	27
1.2.6.1	ストレス応答に及ぼす試験区間の移動の影響 (対照実験)	27
1.2.6.2	ストレス応答に及ぼす酸素濃度の影響	28
1.2.6.3	ストレス応答に及ぼす pH の影響	29
1.2.6.4	ストレス応答に及ぼすアンモニア性窒素化合物の影響	29
1.2.6.5	ストレス応答に及ぼす魚体間の相互作用の影響	31
1.3	結果及び考察	37
1.3.1	物理・化学的变化におけるストレス応答測定	37
1.3.1.1	試験区間の移動に伴うストレス応答 (対照実験)	37
1.3.1.2	ストレス応答に及ぼす酸素濃度の影響	38
1.3.1.3	ストレス応答に及ぼす pH の影響	38
1.3.1.4	ストレス応答に及ぼすアンモニア性窒素化合物の影響	39
1.3.2	ストレス応答に及ぼす魚体間の相互作用の影響	41
1.4	結言	43
第二章 コルチゾル測定のためのイムノセンサの開発		52
2.1	緒言	52
2.2	実験方法	59
2.2.1	試薬	59
2.2.2	試薬の調製	60
2.2.2.1	リン酸緩衝液 (PB) の調製	60
2.2.2.2	MES 緩衝液の調製	60
2.2.2.3	ELISA 用緩衝液の調製 (pH 7.4)	60
2.2.2.4	ELISA 用洗浄液の調製	61
2.2.2.5	単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の還流	61
2.2.2.6	MPA 溶液の調製 (10 mM)	61
2.2.2.7	希硫酸溶液の調製 (0.5 M)	62
2.2.2.8	水酸化カリウム溶液の調製 (0.1 M)	62
2.2.2.9	5.0mM フェリシアン化カリウム溶液の調製	62
2.2.2.10	AChE 標識抗原の調製	62
2.2.2.11	抗-Cort 抗体の調製	62
2.2.2.12	コルチゾル標準試料の調製	63
2.2.3	試験魚及び実試料の調製	63
2.2.3.1	試験魚	63

2.2.3.2	試験魚に対するストレス因子の負荷.....	63
2.2.3.3	血漿試料の採取.....	64
2.2.4	非標識イムノセンサの作製.....	64
2.2.4.1	電極の前処理.....	64
2.2.4.2	抗-Cortisol 抗体及び SWCNT の固定化.....	64
2.2.5	サイクリックボルタンメトリー (CV) を用いて測定.....	65
2.2.5.1	測定システム.....	65
2.2.5.2	システムのセットアップ.....	65
2.2.5.3	測定プロトコルの設定.....	66
2.2.5.4	測定.....	67
2.2.6	センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響.....	67
2.2.6.1	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応温度の影響.....	67
2.2.6.2	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響.....	68
2.2.6.3	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響.....	68
2.2.7	コルチゾル標準試料を用いた測定.....	68
2.2.8	センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響.....	69
2.2.9	イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定.....	69
2.2.9.1	センサを用いた測定.....	69
2.2.9.2	従来法(ELISA)を用いた測定.....	69
2.3	結果及び考察.....	71
2.3.1	非標識イムノセンサの電気化学的評価と応答性.....	71
2.3.2	センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響.....	72
2.3.2.1	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応温度の影響.....	73
2.3.2.2	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響.....	74
2.3.2.3	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響.....	74
2.3.3	コルチゾル標準試料の検量線.....	75
2.3.4	センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響.....	76
2.3.5	イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定.....	76
2.4	結言.....	78
第三章	コルチゾル連続測定用フロー式バイオセンサシステムの開発.....	87
3.1	緒言.....	87
3.2	実験方法.....	90
3.2.1	試薬.....	90
3.2.2	試薬の調製.....	91
3.2.2.1	リン酸緩衝液 (PB) の調製.....	91
3.2.2.2	MES 緩衝液の調製.....	91
3.2.2.3	ELISA 用緩衝液の調製 (pH 7.4).....	91

3.2.2.4	ELISA 用洗浄液の調製	92
3.2.2.5	MPA 溶液の調製 (10 mM)	92
3.2.2.6	5.0mM フェリシアン化カリウム溶液の調製	92
3.2.2.7	AChE 標識抗原の調製	92
3.2.2.8	抗-Cort 抗体の調製	92
3.2.2.9	コルチゾル標準試料の調製	93
3.2.3	試験魚及び実試料の調製	93
3.2.3.1	試験魚	93
3.2.3.2	試験魚に対するストレス因子の負荷	93
3.2.3.3	血漿試料の採取	94
3.2.4	非標識イムノセンサの作製	94
3.2.4.1	電極の作製	94
3.2.4.2	抗体の固定化	94
3.2.5	フローシステムの構成	95
3.2.6	測定	95
3.2.6.1	測定システム	95
3.2.6.2	システムのセットアップ及び測定プロトコルの設定	96
3.2.6.3	測定方法	96
3.2.7	センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響	97
3.2.7.1	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響	97
3.2.7.2	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響	97
3.2.8	コルチゾル標準試料を用いた測定	98
3.2.9	センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響	98
3.2.10	イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定	98
3.2.10.1	センサを用いた測定	98
3.2.10.2	従来法 (ELISA) を用いた測定	99
3.3	結果及び考察	102
3.3.1	センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響	102
3.3.1.1	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響	102
3.3.1.2	センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響	103
3.3.2	コルチゾル標準試料の検量線	103
3.3.3	センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響	104
3.3.4	イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定	104
3.4	結言	106
第四章 体内測定に適したコルチゾル測定用酵素/イムノセンサの開発		113
4.1	緒言	113
4.2	実験方法	115

4.2.1	試薬.....	115
4.2.2	試薬の調製.....	116
4.2.2.1	リン酸緩衝液 (PB) の調製.....	116
4.2.2.2	MES 緩衝液の調製.....	116
4.2.2.3	ELISA 用緩衝液の調製 (pH 7.4)	116
4.2.2.4	ELISA 用洗浄液の調製.....	117
4.2.2.5	MPA 溶液の調製 (10 mM)	117
4.2.2.6	希硫酸溶液の調製 (0.5 M)	117
4.2.2.7	水酸化カリウム溶液の調製 (0.1 M)	117
4.2.2.8	グルコース標準溶液の調製.....	117
4.2.2.9	AChE 標識抗原の調製.....	118
4.2.2.10	抗-Cort 抗体の調製.....	118
4.2.2.11	コルチゾル標準試料の調製.....	118
4.2.3	試験魚及び実試料の調製.....	119
4.2.3.1	試験魚	119
4.2.3.2	試験魚に対するストレス因子の負荷.....	119
4.2.3.3	血漿試料の採取.....	119
4.2.4	酵素を利用した非標識イムノセンサの作製.....	119
4.2.4.1	電極の前処理	120
4.2.4.2	抗-Cortisol 抗体及び Gox の固定化.....	120
4.2.5	サイクリックボルタンメトリー (CV) を用いてセンサの電気化学的評価... 120	
4.2.5.1	測定システム	120
4.2.5.2	システムのセットアップ及び測定プロトコルの設定	121
4.2.5.3	イムノセンサ作製過程における CV 測定.....	121
4.2.6	アンペロメトリーを用いたセンサの測定	121
4.2.6.1	測定システム	121
4.2.6.2	システムのセットアップ及び測定プロトコルの設定	121
4.2.7	センサの電流減少率に及ぼす諸条件の影響.....	122
4.2.7.1	センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応温度の影響.....	122
4.2.7.2	センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響.....	122
4.2.7.3	センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応時間の影響.....	122
4.2.8	コルチゾル標準試料を用いた測定	123
4.2.9	センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響	123
4.2.10	イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定	123
4.2.10.1	センサを用いた測定	124
4.2.10.2	従来法(ELISA)を用いた測定	124
4.3	結果及び考察	126
4.3.1	非標識イムノセンサの電気化学的評価と応答性	126

4.3.2 センサの電流減少率に及ぼす諸条件の影響.....	127
4.3.2.1 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応温度の影響.....	127
4.3.2.2 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響.....	128
4.3.2.3 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応時間の影響.....	128
4.3.3 コルチゾル標準試料の検量線.....	129
4.3.4 センサの電流減少率に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響	130
4.3.5 イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定	130
4.4 結言.....	132
結論.....	142
謝辞.....	144
参考文献	145

I 序論

I.1 緒言

世界の水産物需要は、近年の日本食ブーム、発展途上国の人口増加や経済成長に伴う食生活の変化等により拡大する傾向にある¹⁾。しかし、近年では水産資源の枯渇が問題視されており、養殖による漁業生産量が着実に増加している。1988年以來、日本においても海水面養殖は年間25万トン前後で安定的に推移しており（2011年の東日本大震災からの2年間を除く）、養殖への期待は高まっている²⁾。

日本では、種苗生産や飼養技術の発展、配合飼料の開発、魚病対策などにより、今日まで100種以上の魚介類の種苗生産を可能にしてきた³⁾。しかしながら、実際の水産養殖場では生産効率を上げるために、過密飼育や過剰投餌などが行われており、感染症や飼育環境の悪化（富栄養化、汚染など）による大量死がしばしば発生している。また、養殖場周辺の工場などにおける内分泌かく乱物質⁴⁾や重金属による汚染⁵⁾、飼育水の酸性化⁶⁾、酸欠条件⁷⁾、水温の異常上昇⁸⁾などの環境変化が、養殖魚にとって大きなストレスとなり、これによって魚の血液成分や内分泌系などの生理的変動を引き起こすことが報告されている⁹⁾。そのため、養殖場における環境汚染を防止し、安全な養殖魚の生産を行うためには、養殖魚のストレス状態を常に把握し、その健康状態及び飼育環境を管理することは非常に重要であるといえる。

これまで養殖魚のストレス状態を明らかにするための手段として、血中のグルコースやコルチゾル濃度の変動がストレスの指標となることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。特に、コルチゾルは、ストレス反応の初期段階で血中において急速に分泌されることから、非常に重要な指標であるといえる。また、コルチゾルの分泌により促進される糖新生によって生成されるグルコースも、ストレス指標

として広く知られている¹³⁾。魚のストレスを早期に把握することによって、健康被害を未然に防ぎ、ストレスによる魚の体内変動を解明するためにも、これらストレス指標物質の迅速かつ連続的な検出方法の確立が急務といえる。しかしながら、現在これら物質の測定には、高価な装置をはじめ、血液の採取、分析のために前処理などの煩雑な操作が必要であった。

一方、近年になって生体の持つ優れた機能とエレクトロニクス技術を組み合わせた「バイオセンサ」の開発研究が、国内外において精力的に進められ、様々な物質の測定が可能になってきた¹⁴⁻¹⁶⁾。バイオセンサは、測定したい物質を識別する生体触媒（分子識別素子）とその触媒反応を電気信号に変換する物理化学デバイス（信号変換素子）より構成され、目的となる物質を迅速・簡便に測定できる計測機器である¹⁷⁾。

そこで本研究では、このバイオセンサの技術に着目し、上記ストレス指標物質の迅速・簡便なモニタリング法の確立を目的として、酵素反応、免疫反応、電気化学反応を組み合わせた新しいバイオセンサの開発を試みた。本序論では、水産分野においてコルチゾル及びグルコースの迅速かつ連続的に測定が必要とされている背景を述べるとともに、これら物質の検出方法の現状と課題点をまとめた後、本研究の目的を明らかにする。

I.2 魚類資源の不足による食糧問題及び養殖場現状

戦後、日本国民の食生活は水産物による海洋資源生物の動物タンパク質の供給に大きく依存してきた。しかし、商捕鯨業の停止、排他的経済水域などの問題による遠洋漁業の衰退により、漁業生産量はこの30年で半減した。また、漁業就業者の減少・高齢化の進行は著しく、将来にわたって周辺水域の水産資源を持続的に利用し、国民に安定的に水産物を供給していくための物的・人的基

盤が年々脆弱化しているため、漁業の経済状況は著しく悪化している¹⁸⁾。

一方、漁業生産量とは異なり増養殖漁業の生産量は年々増加している。これは、上記の理由から養殖漁業が捕獲漁業に代わる地位に押し上げられたためである¹⁸⁾。水産養殖業分野は、魚介類を人為管理下において効率的に生産できるため「安心・安全で高品質」な養殖魚の生産に期待が高まっている。しかしながら、現在の水産養殖法の大半は、養殖魚に生餌や配合飼料を積極的に与える「給餌養殖」となっている。この方法は魚の養殖を高い密度で行うため、食べ残しや糞が池底に蓄積され、水質の富栄養化に伴って飼育水の悪化を引き起こしている。これにより、近年になって魚体の免疫力低下や異常な生理変動がしばしば発生し、魚病や感染症も多発している¹⁹⁾。そのため水産養殖業者は、抗生物質や抗菌剤を投与することにより魚病による大量死を予防または治療を行っているが、抗生物質が体内に残留し、環境汚染、薬剤耐性菌の発生及び食物連鎖による人体への蓄積など、人・環境に及ぼす影響が懸念されている。

一方、近年になって環境に優しい養殖方法である「環境保全型養殖」が注目されている²⁰⁾。この方法は、魚病対策に抗生物質による治癒を水産用ワクチン接種による予防に置き換え、抗病性を向上させる天然物質を添加した配合飼料を使用している。また、魚が食べたいときに魚自らがスイッチを作動させ、給餌機から落下する少量の餌を摂餌させる食欲対応型給餌システムの研究も進められている²¹⁾。しかし、この環境保全型の養殖においても、魚自身の物理的なストレス（外傷など）や化学的なストレス（酸化ストレスなど）が魚体内で生理的反応を引き起こし、病気や死に至るという例がしばしば報告されている²²⁻²³⁾。

安心・安全な養殖魚を市場に提供するためには、魚類の育成に対して必要なデータを集積して適切な飼育環境を整える必要がある。すなわち、目視で確認が可能な体長、体重の変化や体色の異変以外に、魚類の健康状態、成長、繁殖

などを左右する魚体内の様々な生理状態をモニタリングする必要があると考えられる。

I.3 血中成分を指標とした魚類のストレス状態の評価

魚の血液には、様々な栄養素、代謝による老廃物、酵素、ホルモン、無機成分などが含まれており、外部からの摂取、体内での合成・消費、排泄に因ってその値が変動するため、血液中の特定の物質（ホルモン、酵素、タンパク質など）の濃度変化から、各器官の機能の変化や生理状態の変化を推定することが可能である²⁴⁾。血液成分の検査項目にはグルコース、中性脂肪、総コレステロール、尿素窒素、アルブミンなどが用いられるが、生化学反応では複数の反応が複雑に作用し合っているため、単一の物質を指標とした診断より、多種の指標物質を総合的に評価することが重要であると考えられる。こうしたことから、魚類のストレス応答の測定においても、血中コルチゾル及びグルコースを指標とした分析が主に行われてきた。

血中コルチゾルは、脳下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモンによって副腎皮質から分泌されるホルモンであり、ステロイドホルモンの一種である。魚類がストレスを受けた直後、ストレス因子の強さによって血中コルチゾル濃度が一時的に上昇することが知られている。この上昇は肝臓における糖新生作用を促進させ、グルコースを分泌させる。一方、糖新生作用により生成されたグルコースはストレスの二次応答物質として知られている。肝臓で生成したグルコースは血液により全身に運ばれ、ストレスに対処するためのエネルギー源として使われる²⁵⁾。そのため、血中コルチゾル及びグルコース濃度の変動をモニタリングすることにより、養殖魚のストレス状態を早期に把握し、飼育環境を改善していくことが可能になる。

I.4 ストレス指標の測定法の現状

血中グルコース濃度の測定手法としては、現在、酵素反応を利用した比色定量法が広く用いられている。例えば、和光純薬工業株式会社製の Test Wako[®] は次のような測定原理でグルコースを定量している。まず、試料に発色試液を作用させると、試料中のグルコースは発色試液中に含まれるムタロターゼの作用により α 型から β 型へすみやかに変換される。この β -D-グルコースは、グルコースオキシダーゼ (Gox) の作用を受けて酸化され、同時に過酸化水素を生じる。この生成した過酸化水素をペルオキシダーゼの発色反応を利用してその吸光度を測定することにより試料中のグルコース濃度を求めることができる。しかしながら、この方法は試料を 1 検体ずつ酵素反応させながら吸光度分析を行う必要があり、魚の血中グルコース濃度を迅速・かつ連続的に測定することは困難であった。

一方、コルチゾルをはじめとするステロイドホルモンの測定については、液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography: LC) や高速液体クロマトグラフィー (High-performance Liquid Chromatography: HPLC) と質量分析法 (Mass Spectrometry: MS) を組み合わせたクロマトグラフ質量分析計がよく利用されている^{26,27)}。MS は、分子やイオンの質量電荷比を求めるときに使用される分析法である。高電圧をかけた真空中で試料をイオン化すると、静電力によって試料は装置内を飛行する。飛行しているイオンを電氣的・磁氣的な作用等により質量電荷比に応じて分離し、その後それぞれを検出することで、質量電荷比を横軸、検出強度を縦軸とするマススペクトルを得ることができ、高い測定感度が期待できる。さらにこの分析法を、上記クロマトグラフィーと組み合わせることにより、特異性と再現性が高くなる。しかしながら、これらの

分析装置は大型かつ高価であり、煩雑な前処理が必要であるなどの課題がある。さらに、測定試料ごとに最適な試料分離剤の選択や測定条件の模索などの専門的な知識が求められるため、養殖場などの現場では実用化することは難しいと考えられる。また、ステロイドホルモン系の抽出操作を省略できる高感度な測定法として、放射性物質と抗原抗体反応を利用した放射免疫測定法（Radioimmunoassay: RIA）が1960年に Yalow と Berson らによって考案され、テストステロンやエストラジオール等のステロイドホルモンの定量に利用されている²⁸⁾。RIA は、放射性同位元素を利用して、微量の抗原（例えば血中のホルモンなど）量を測定できる免疫学的手法である。RIA は、高い特異性と検出感度を持つ優れた測定法であるが、放射性物質を使うために細心の注意が必要である。

一方、近年になって放射性物質の代替えに酵素を標識剤として発展した酵素免疫測定法（Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA）がしばしば用いられている²⁹⁾。ELISA は特異性の高い抗原抗体反応を利用し、酵素反応に基づく発色・発光をシグナルに用いることで、RIA のように特別な施設が必要なく、はるかに簡便な測定を可能にした。しかし、ELISA は免疫反応の際に洗浄などの煩雑な操作と時間を要するなどの課題点が残されている。そこで近年になって、生物体内の指標を迅速かつ連続的に測定する手法としてバイオセンサが注目されている。

I.5 バイオセンサ

I.5.1 バイオセンサの原理

バイオセンサの基本構成及び一例を Fig.I-1 に示す。バイオセンサは、測定

対象物質の情報を電気信号に変換するデバイスであり、目的物質を識別する生体触媒（分子識別素子）とその触媒の生化学反応を電気信号に変換する物理化学デバイス（信号変換素子）より構成されている¹⁷⁾。前者は、測定対象となる物質に対応する酵素、抗体、DNA、細胞、微生物などの生体触媒が利用され、後者は、電極、サーミスタ、受光デバイス、水晶振動子、音波検知器などの物理化学デバイスが用いられる。バイオセンサは、試料中の対象物質と特異的に生化学反応する分子識別素子を利用しているため、試料の抽出や分離等の煩雑な前処理操作が不要であり、迅速かつ簡便な測定が可能である。

1.5.2 酵素センサ

酵素を用いる生化学分析は、1940年代から行われていたが、1962年 Clarkらによって最初の酵素電極（enzyme electrode）が提案された³⁰⁾。Clarkらの酵素電極は、透析チューブと酸素電極の間に酵素溶液を封入したものであったが、1967年に Updikeらは、グルコース酸化酵素をポリアクリアルアミドゲルで固定化し、酸素電極と組み合わせた固定化酵素センサにより、グルコースの定量を試み、グルコース濃度の迅速測定を可能にした³¹⁾。その後、酵素のもつ基質特異性と、電気化学分析の迅速性・簡便性などを巧みに利用した多くの酵素センサが報告され、そのいくつかは現在実用化に至っている。

本研究室においても、魚類の血糖値を測定するために種々の酵素センサを開発しており、分子識別素子であるグルコースオキシダーゼ（Gox）と信号変換素子である白金-イリジウム電極より構成されている³²⁾。この電極に固定化された Gox はグルコースを加水分解し、それによって生じた過酸化水素は+650 mV の電圧を印加することにより分解され、その際に放出される電子はセンサの出力電流値として測定される。この電流値は加水分解されたグルコースの濃

度と比例関係にあるため、グルコース濃度の迅速・簡便な測定が可能となる。

I.5.3 イムノセンサ

イムノセンサは、識別素子として抗体が使われており、その基本原理は 1975 年に Janata らによって考案された³³⁾。初期のイムノセンサは、抗原の免疫反応において標識物質を用いて間接的に測定する標識免疫法と、抗原の免疫反応により生じる物理量の変化をとらえる非標識免疫法の 2 種類に大別される。

標識法は酵素、蛍光物質、放射性物質などで標識した抗体（または抗原）を抗原抗体反応に用いることで、反応後の標識剤の活性から目的抗原（または抗体）を間接的に定量する手法である。標識法の測定原理を Fig. I-2 に示す。図中 (a) はサンドイッチ式測定法を示し、抗原を電極上に過剰量の固定化抗体で捕捉した後、更に標識抗体を新たに反応させて検出するので、高い測定感度が得られる。この方法は、抗原結合部位が異なる 2 種類の抗体を使用するため、多数の抗原決定基を持つ高分子抗原（細菌やタンパク質など）の測定に使用されている^{34,35)}。しかし、ハプテン（合成医薬品やステロイドホルモンなど）では、同時に 2 種の抗体を結合できないため、サンドイッチ式測定法を適用することができない。この場合は Fig. I-2 (b) に示すような競合式測定法が用いられる。これは、電極上に固定化した抗体に対して、試料中の目的抗原抗体と標識抗原を競合反応させる方法である。これら標識型イムノセンサの大きな利点として、電極活性物質の生成を伴わない抗原抗体反応に標識剤を取り入れることで高感度な測定が可能になることが挙げられる。しかし、標識法では抗原抗体反応過程における洗浄操作や基質溶液の注入などの煩雑な操作が必要となってくる。

一方、非標識法は標識剤を使わずに抗原抗体反応を直接検出する手法である。

非標識法の基本構成を Fig. I-3 に示す。非標識法では、デバイス（電極，水晶振動子など）上に抗体を固定化し，これが目的抗原と結合することにより生じる物理化学的な変化から抗原の定量を行う^{37,38)}。この方法を用いた測定では，標識剤の添加や洗浄などの煩雑な作業が省略でき，迅速かつ簡便な測定が期待できる。

I.6 本研究の目的及び意義

本研究は，魚類のストレス指標となるコルチゾル及びグルコース濃度の測定において，これまで課題となっていた煩雑な操作や長時間の分析等を解決するために，これらの指標物質を迅速・簡便かつ高感度に測定可能なバイオセンサシステムを構築することを目的とするものである。以下各章毎に，その目的及び意義について述べる。

第一章では，ティラピア（*Oreochromis niloticus*）に各種ストレス因子（化学的因子，行動生理学的因子）を負荷することにより，試験魚の血中コルチゾル及びグルコース濃度の経時的変化をそれぞれの手法（コルチゾル：ELISA；グルコース：バイオセンサ）を用いてモニタリングを行う。そして魚体のストレス応答に及ぼす両指標物質の変動を考察する。

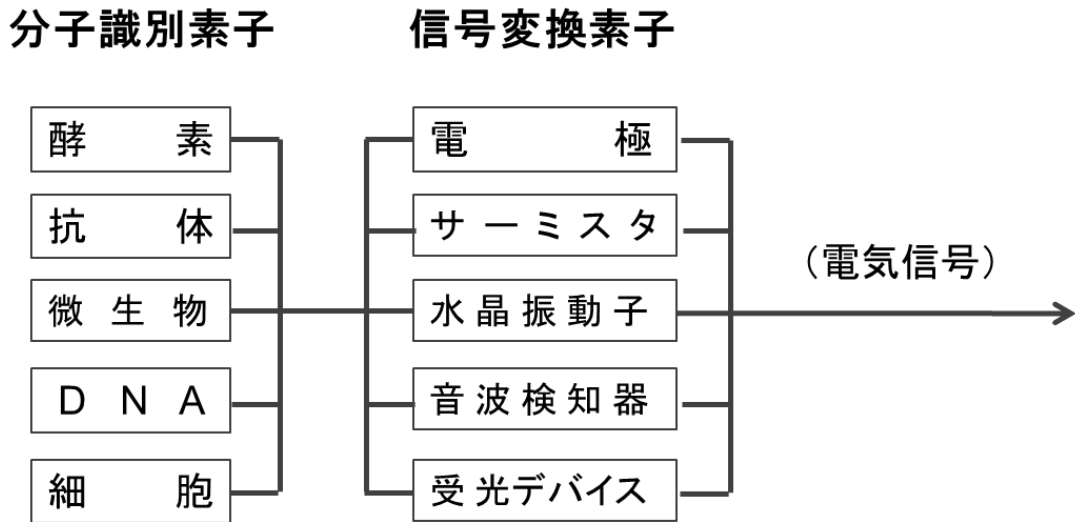
第二章では，第一章で得られた知見から，魚類血中コルチゾル濃度を迅速かつ簡便に測定できる新しい手法の確立を目的に，免疫反応と電気化学測定法を用いたイムノバイオセンサの製作を試みる。すなわち，自己組織化単分子膜を利用して抗-コルチゾル抗体を電極表面に固定化し，さらにセンサの出力を増幅するために導電性が高い単層カーボンナノチューブを修飾することによりコルチゾル測定のための非標識イムノセンサを製作する。このセンサを用いて電気化学的な解析法から，魚類血漿中のコルチゾルの定量を試みる。

第三章では、コルチゾル濃度の連続測定を可能にするために、第二章で得られた知見を基盤として、センサの迅速交換が可能なフローチェンジャーシステムと微小イムノセンサを設計・製作し、コルチゾル濃度を連続的に測定できるフロー式イムノセンサシステムを構築することを試みる。

第四章では、酵素反応を利用した生体に優しいコルチゾル測定用センサシステムの製作を試みる。すなわち、電極表面上に抗-コルチゾル抗体と共にグルコースオキシダーゼを固定化することによって、細胞への毒性がほとんど無い新しいイムノバイオセンサの構築を試みる。

以上述べたように本研究は、魚類のストレス指標の迅速・簡便な測定法の確立を目指したものであり、将来的には魚の健康状態を総合的に評価できる手法の確立に貢献できるものと考えられる。

(a)



(b)

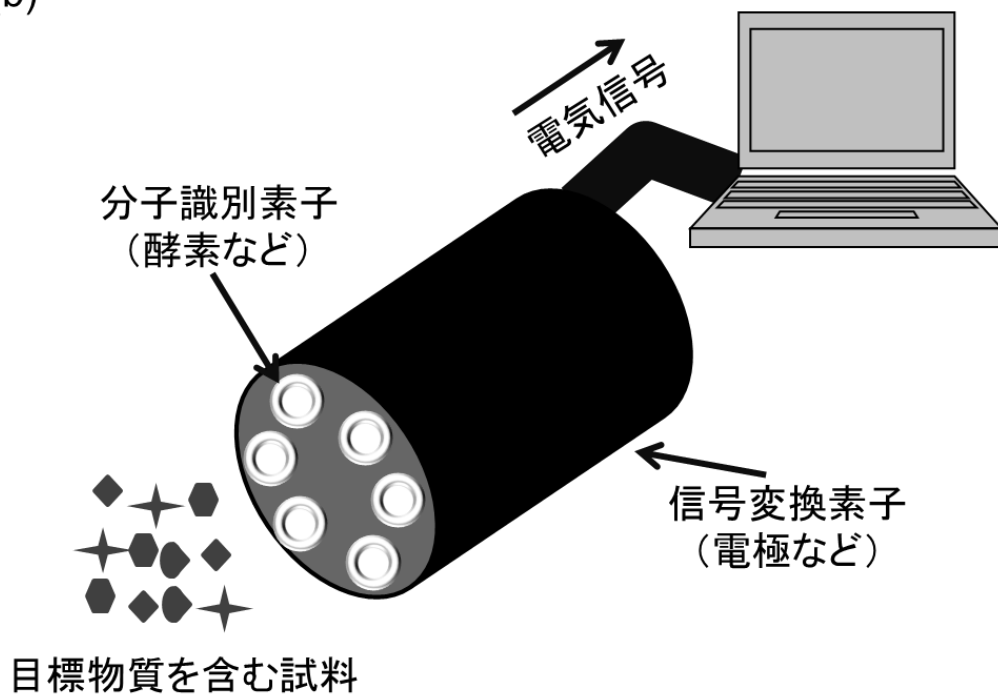
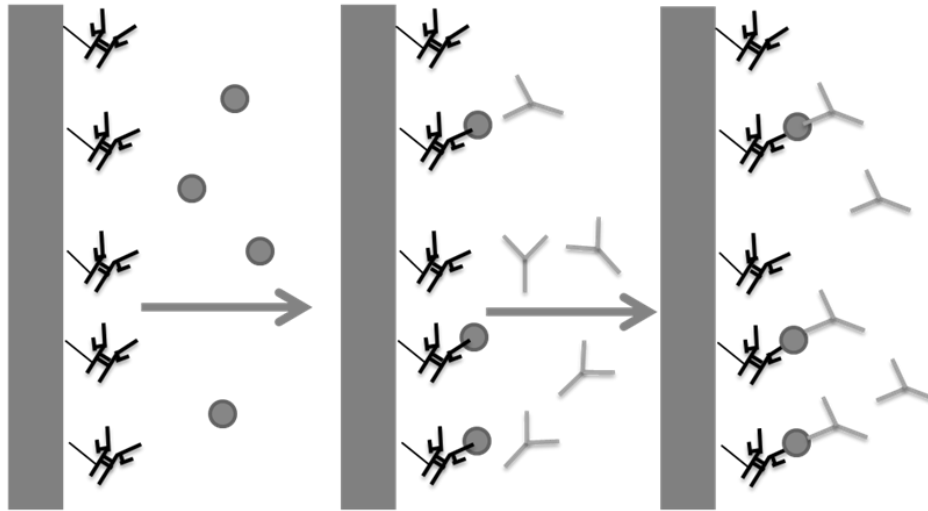


Fig. I-1 バイオセンサの基本構成及び一例
(a): バイオセンサの基本構成; (b): バイオセンサの一例

(a)



(b)

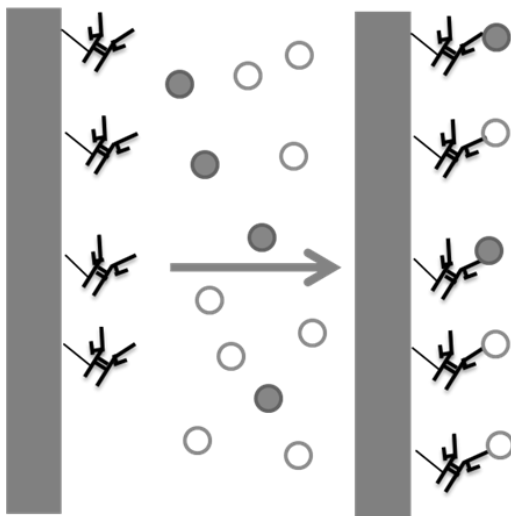






Fig. I-2 標識イムノセンサの基本構成
(a): サンドイッチ式測定法; (b) 競合式測定法

 : 抗体  : 抗原  : 標識抗原  : 標識抗体

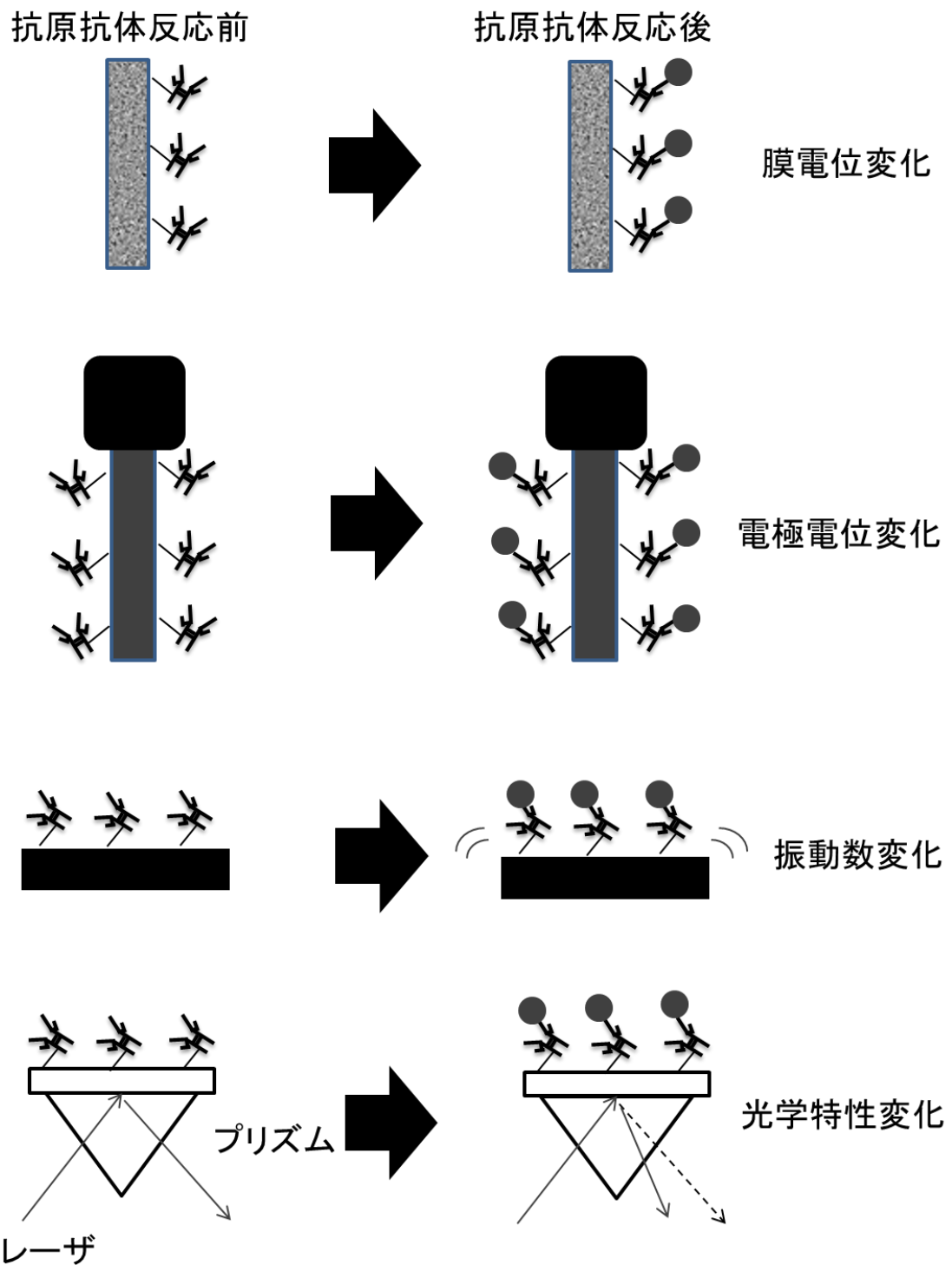


Fig. I-3 非標識イムノセンサの基本構成

第一章 各種ストレス因子によるストレス応答の測定

1.1 緒言

序論で述べたように、魚類のストレス状態を把握するには、血中コルチゾル及びグルコース濃度が重要なストレス指標として用いられている。自然界に生息する脊椎動物が受けうる大半のストレスは、外傷や疾病をはじめとした身体的ストレスによるものであると考えられてきた。しかし、Seligmann の犬を用いた「学習性無力感」³⁶⁾や Brady らによる「管理職ザル」³⁷⁾の研究が行われ、これらの動物を用いたストレス実験の結果から、ヒトが感じるような精神的ストレスを動物も受けることが判明した。このことから、魚類を含むより下等な動物のストレス研究においても種々のストレス因子を考慮して考察しなければならないと考えられる。そこで本章では、どのような環境が魚類にとってストレス因子となるのか、体内のストレス指標濃度の変動をモニタリングすることによりその解析を試みる。

一般にストレスとは、外的刺激により引き起こされる非特異的・生物学的な緊急状態の現象全般のことを指す²⁵⁾。ストレスの応答は、まず1次応答として血中にコルチゾルなどのコルチコステロイドホルモンが放出され、続く2次応答ではコルチゾルの分泌によって促進された糖新生作用による血中グルコース濃度の上昇、そして以降は、ストレス因子の強さ及び継続時間によって生理機能や生体防御能などに悪影響を及ぼす (Fig. 1-1-1)¹³⁾。魚類においても、高密度飼育やハンドリングなどのストレス因子を与えた場合、血中コルチゾルやグルコース濃度の変動し、生理機能や成長に悪影響を及ぼすことが報告されている²⁵⁾。

魚類のストレス因子としては、外敵から威嚇されたときのような行動生理的

要因³⁸⁾をはじめ、酸素欠乏、流速、温度、接触などの物理的要因、pH 変化、アンモニア性窒素化合物、毒物などの危害物質による生化学的要因^{4・8, 39・41)}などが考えられる。これらストレス因子に関して、現在まで多くの研究が報告されてきたが、ストレス因子が多岐にわたることもあり、依然として明確な結論が得られていないのが現状である。

一方、血中グルコース濃度の変動を実際に知るための測定手法としては、酵素反応を利用した比色定量法が現在のところ広く用いられている。しかしながら前章でも述べたように、この測定法は試料を 1 検体ずつ酵素反応させながら吸光度分析を行う必要があり、魚の血中グルコース濃度を連続的に測定することは困難であった。一方、当研究室では、魚を自由に遊泳させた状態で血中グルコース濃度を測定可能なワイヤレスバイオセンサシステムを先行研究で開発している^{32,42,43)}。このシステムは、生体刺入型バイオセンサ、小型無線ポテンシオスタット（送信機）及び電波受信機から構成されており、魚体に負荷をかけることなく、魚の「真のストレス応答値」をリアルタイムにモニタリングすることができる。本システムは、分子識別素子としてのグルコースオキシダーゼ（Gox）を白金イリジウム製の電極上に固定化することにより、酵素反応によって生成した過酸化水素を電気化学的に測定する原理に基づいている。すなわち、発生した過酸化水素に+650 mV の電圧を印加し、これが還元された時の電流値を測定することにより、元のグルコースを定量することができる（Fig 1-1-2）。一般にバイオセンサを用いて生体内測定を行う場合、タンパク質をはじめとする多くの夾雑物質が問題となってくる。例えば、センサをそのまま生体内に挿入すると、生体はセンサを異物と認識し、測定が困難になってしまう恐れがある。特に血液中には多量のタンパク質をはじめ、フェブリノーゲンなどの血液凝固因子が存在するため、それらがバイオセンサの電極表面の固定化酵素に付着し、酵素活性が失活してしまう。そこで当研究室では、魚類の眼球

外膜に存在する間質液（EISF）に着目した。EISF は、網膜と眼球外膜の間に存在する細胞外液で、血液と比較して前述の夾雑物質が少なく、EISF 中のグルコース濃度は血中グルコース濃度との間に、よい相関があることが確認されている³²⁾。この EISF 中にグルコースセンサを留置することにより、夾雑物質の影響を受けることなく、魚体内でのグルコース濃度の連続測定が可能になった。

一方、血中コルチゾル濃度の測定手法としては現在のところ Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) が広く用いられている。ELISA は抗体を使った免疫学的測定法（イムノアッセイ, Immunoassay）の一種であり、市販のコルチゾル濃度測定用キットでは免疫測定系の競合反応を利用してコルチゾルを定量することができる。

本章では、ストレスとされる行為が魚体に及ぼす影響を検討するため、グルコース濃度の測定においてはワイヤレスバイオセンサシステムを、コルチゾル濃度の測定においては ELISA 法を用いて、ストレス負荷に伴うグルコースおよびコルチゾル濃度の経時的変動を測定し、魚のストレス応答と両指標物質の関連性を検討する。すなわち、生化学的ストレス因子として酸素濃度の変化、pH・アンモニア窒素化合物濃度の変化による刺激、行動生理的ストレス因子として個体同士の接触がある状況下における刺激を魚に負荷し、これら因子とストレス応答との関係を解明することを目的とする。

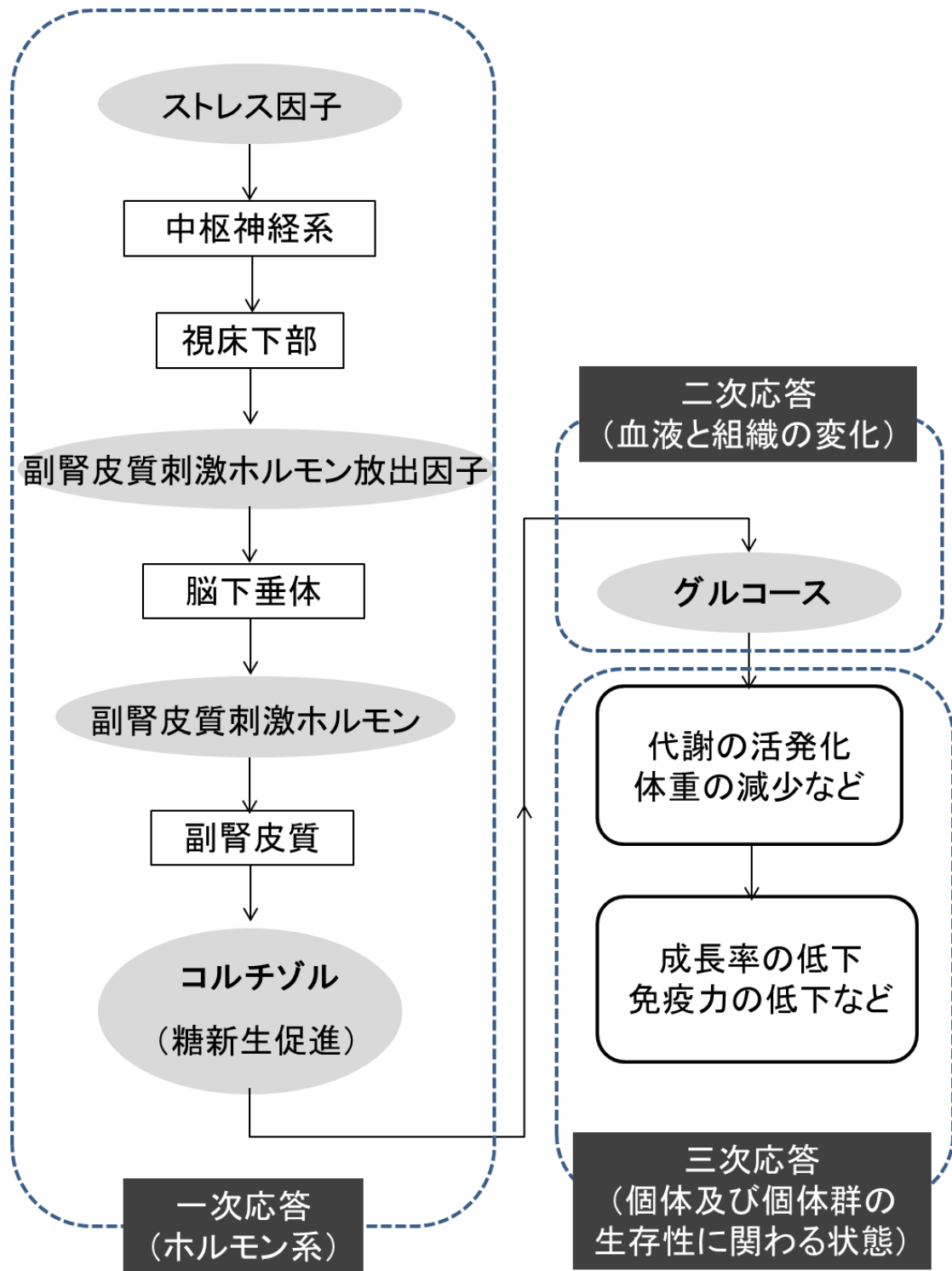


Fig. 1-1-1 魚類のストレス応答

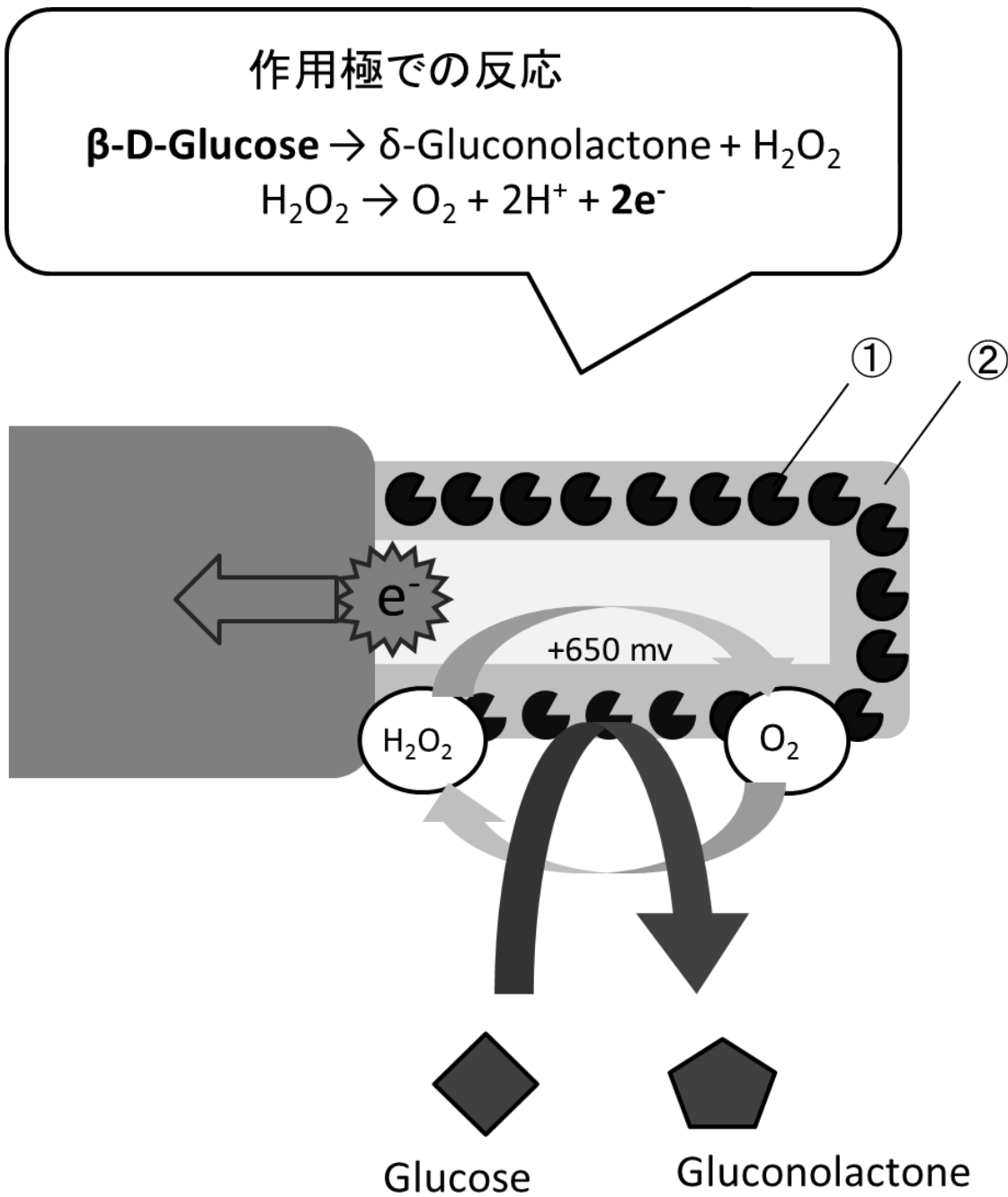


Fig. 1-1-2 バイオセンサの作用極における反応

①:酵素 (Glucose oxidase); ②:酵素膜

1.2 実験方法

1.2.1 試薬

Glucose Oxidase (Gox) (158,900 units G^{-1} , from *Aspergillus niger*), アジ化ナトリウム (NAN_3), エチレンジアミン四酢酸 (Ethylene diamine tetra acetic ACID tetra sodium salt hydrate, Sigma Ultra: tetra sodium EDTA) 及びウシ血清アルブミン [Albumin, bovine serum, Fraction V, Approx. 99% :BSA]は, Sigma 社製 (ミズーリ州, U.S.A.) を使用した. コルチゾル (Cortisol EIA Standard:400 ng ml^{-1}), コルチゾルモノクローナル抗体 (Cortisol EIA Monoclonal Antibody : 抗-Cortisol 抗体), コルチゾルアセチルコリンエステラーゼ標識抗原 (Cortisol AChE Tracer : AChE 標識抗原) 及び酵素免疫測定法 (ELISA) 用発色試薬 (Ellman's Reagent) は Cayman chemical 社製 (ミシガン州, U.S.A.) を使用した. ヘパリンナトリウム, Nafion 分散溶液 (5 wt%), 25% glutaraldehyde, グルコース測定キット (グルコース CII-テストワコー), 25% アンモニア水, 亜硝酸ナトリウム, 硝酸ナトリウム, LC-MS 用超純水 (H_2O), 2-フェノキシエタノール (2-Phenoxy ethanol) 及び塩化カリウムは, 和光純薬工業社製 (大阪, 日本) を使用した. リン酸水素二ナトリウム \cdot 12 水 ($Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$), リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$) は国産化学社製 (東京, 日本) を使用した. Tween-20 は関東化学社製 (東京, 日本) を, 無水エタノールは日興製薬株式会社製 (東京, 日本) を使用した. その他の試薬は, 全て特級試薬を用いた.

1.2.2 試薬の調製

1.2.2.1 リン酸緩衝液 (PB) の調製

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3.121 g とリン酸水素二ナトリウム・12 水 7.164 g を秤量し, それぞれを 100 ml メスフラスコに超純水で定容し, 0.2 M リン酸二水素ナトリウム, リン酸水素二ナトリウム溶液を調製した. 次に, pH メーター (F-52, HORIBA 社製, 東京) を用いて pH を測定し, 0.2 M リン酸水素二ナトリウム溶液と 0.2 M リン酸水素二ナトリウム溶液を pH 7.4 及び pH 7.8 になるように混合した. 調製した PB はガラス瓶に入れて室温で保存し, 使用する際に同量の超純水で希釈した.

1.2.2.2 ELISA 用緩衝液の調製

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 10.0 ml にアジ化ナトリウム 10.0 mg, 塩化カリウム 2.3 g, tetrasodium EDTA 37.0 mg 及び BSA 100 mg を超純水で溶解させた後, 100 ml 容フラスコに定容した.

1.2.2.3 グルコース標準液の調製 (5000 mg dl⁻¹, 0.1 M, pH 7.8)

グルコース 2.5 g を秤量し, PB (0.1 M, pH 7.8) を加えて 50 ml 容メスフラスコに蒸留水で定容した. 調製したグルコース標準液は, 溶液中のグルコース分子 (α 型と β 型) の平衡が安定するまで, 4°C の冷蔵庫内にて 24 時間以上静置した.

1.2.2.4 コルチゾル標準試料の調製

マイクロテストチューブ (1.5 ml) に 99.8 %エタノールを分注し、ピペッティングを十分に行った。このピペットを用いて、 -20°C で保管しておいた 400 ng ml^{-1} のコルチゾル標準試料 $100\ \mu\text{l}$ を取り出し、超純水 $900\ \mu\text{l}$ を加えて試料を 10 倍希釈した。この操作をもう一度繰り返し、コルチゾル濃度が 4000 pg ml^{-1} の標準試料を調製した。次にこの試料 $250\ \mu\text{l}$ をマイクロテストチューブに取り、 $\text{pH } 7.4$ リン酸緩衝液 $750\ \mu\text{l}$ を加えて 1000 pg ml^{-1} に調製した。その後、同様の操作を繰り返して、最終的に $6.6\sim 4000\text{ pg ml}^{-1}$ のコルチゾル標準試料を調製した。

1.2.2.5 グルコースオキシダーゼ溶液の調製 (1462 unit ml^{-1} , $\text{pH } 7.8$)

Gox 2.3 mg , BSA 6.0 mg を秤量してエッペンドルフチューブ中に入れ、PB (0.1 M , $\text{pH } 7.8$) 0.25 ml を加えて溶解した。調製した酵素液は冷蔵庫内 ($4\ ^{\circ}\text{C}$) で保存した。

1.2.2.6 ELISA 用洗浄液の調製

0.1 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.4$) 2.0 ml に Tween-20 を $100\ \mu\text{l}$ 加え、 200 ml メスフラスコを用いて超純水で定容した。なお、Tween-20 の分注作業では Gilson 社製の粘性液体用ピペット (Microman[®] M250, WI, 米国) を使用した。

1.2.2.7 AChE 標識抗原の調製

-20°C で保管しておいた AChE 標識抗原に ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分に攪拌した後、使用するまで 4°C で保管した。

1.2.2.8 抗-Cort 抗体の調製

-20°Cで保管しておいた抗-Cort 抗体に，ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分に攪拌した後，使用するまで 4°Cで保管した．

1.2.3 試験魚及び実試料の調製

1.2.3.1 試験魚

試験魚は，東京海洋大学内にて養殖されたティラピア（*Oreochromis niloticus*，全長 19～25 cm）を用い，水槽（1200×600×450 mm，324 L）で常時 25 尾程度の密度で，実験に使用するまで飼育した．水槽内の飼育水は，水道水を中和剤（テトラコントラコロライン，テトラ社製，ニーダーザクセン州，ドイツ）により中和して使用した．飼育環境は，水温（26 ± 0.5 °C）の維持，上部濾過槽（物理濾過及び生物濾過）による濾過，エアープンプによる曝気を常時行い，照明時間を 9 時間（9:00～18:00）に設定した．

1.2.3.2 血漿試料の採取

試験魚を網で捕獲し，2-フェノキシエタノール溶液（350 ppm）に個体を浸漬させて麻酔を施した．次に 23 G（0.60×25 mm）の注射針を 2.5 ml 容量のテルモシリンジ（テルモ社製，東京）に装着後，3000 unit ml⁻¹のヘパリンナトリウム溶液をシリンジ内部に適量塗布した．麻酔を施した個体を湿ったキムタオル上に置き，尾鰭基部から脊椎骨に向けて注射針を挿入した．脊椎骨周辺

の尾動静脈を傷つけながら血液を約 0.5 ml 採取した。採取した血液はマイクロテストチューブに分注後、直ちに遠心分離（450 × g, 3000 rpm, 10 min, 4 °C）を行い、上澄みの血漿を採取した。血漿試料は使用するまで、-20 °C の条件下で保存した。

1.2.4 グルコース測定用バイオセンサの作製

バイオセンサには、最初に作用極を白金イリジウム（Pt-Ir）とし、対極を銀塩化銀（Ag/AgCl）とした 2 電極より構成される生体刺入用小型電極を作製した（Fig. 1-2-1）。まず、テフロン被膜された白金イリジウム線（Φ0.178 mm，ニラコ社製，東京，日本）を 1 cm 切り取り，片端のテフロンコートに 1 mm 剥ぎ取った。次に，赤色のリード線（Φ0.4 mm，ユニークメディカル社製，東京，日本）を 15 cm 切り取り，白金イリジウム線のテフロンを剥ぎ取った部分にハンダで接合した。また，銅線（Φ0.1 mm，ユニークメディカル社製，東京，日本）を 1 cm，黒色のリード線（Φ0.4 mm，ユニークメディカル社製）を 15 cm 切り取り，ハンダで接合した。白金イリジウム線のテフロンコート上に銅線を螺旋状に巻きつけ，巻きつけた部分に参照電極用銀塩化銀インク（BAS 社製，東京，日本）を塗布し，90 °C の乾熱滅菌機（三洋電機社製，東京，日本）で 20 分間乾燥させた。この銀塩化銀インクの塗布及び乾燥を 2 回行った。その後，熱収縮チューブ（協和ハーモネット社製，京都，日本）を 1 cm 切り取り，電極の接合部を被覆し，Alardite®（ハンツマン・アドバンスト・マテリアルズ社製，兵庫，日本）を用いて防水加工を施した。

次に，作製した電極の作用極部に，Nafion®膜，酵素膜を被覆した。Nafion®膜の使用は，測定の際に低電位で反応する生体内物質が，センサの出力電流値に影響を及ぼすことを抑制するためである。また，酵素の固定化には弱アルカ

り性下で化学反応する Schiff 塩基の形成を利用した。これは、Glucose oxidase と BSA のリジン残基を glutaraldehyde と縮合反応させることにより、電極上に酵素を固定化する原理に基づいている (Fig. 1-2-2)。まず、5 %Nafion®分散溶液に電極の作用極を 1 分間浸漬し、室温 (23℃) で 10 分間乾燥させた。この電極をさらに酵素液中に 1 分間浸漬し、室温 (23℃) で 10 分間乾燥させた。この操作を 2 回行った後、シャーレ内に 25 %glutaraldehyde 溶液を 50 μ l 滴下し、その近傍に電極を置いてパラフィルムで密封した。これを 35 °C で 6 時間静置することにより、グルコースバイオセンサを作製した。製作したセンサは PB 中に浸漬し、冷蔵庫内 (4℃) で保存した。

1.2.5 無線式測定システムによるグルコースの測定

1.2.5.1 測定用ソフトウェアの設定

無線式測定システムは、無線式ポテンシオスタット (無線型定電圧装置, Model : 3102BP, Pinnacle technology 社製, カンザス州, U.S.A.), 無線型電波受信機 (Model: 3100RX, Pinnacle technology 社製, カンザス州, U.S.A.) 及び専用の測定用ソフトウェア Pinnacle acquisition laboratory (PAL) を用いた。PAL は電極への印加電圧の設定をはじめ、測定に関するほとんどの操作が可能である。以下に、測定システムの操作手順を示す。

①無線式ポテンシオスタットに電池を入れた後、PAL のメインウィンドウの左上のメニューから「Settings」をクリックし、GET/SET ID を選択した。その後、実験に使われる無線式ポテンシオスタット (送信用) の裏目に刻印された番号を入力した。この操作により、本ポテンシオスタットを無線受信機に認識させることができる。

②メインウインドウの左上のメニューから「Settings」をクリックし、AD Auto Zero を選択した。AD Auto Zero 終了後、「OK」をクリックした。次に、再度「Settings」をクリックし、DA Zero をクリックした。クリック後、アナログ出力校正を行いたいチャンネル（本章の場合、チャンネル 1 のみとする）以外を「Skip」にし、「OK」をクリックした。この操作により、外部装置（センサ）からのアナログ信号とパソコンで処理できるデジタルデータの入出力の校正を行った。

③測定開始時にはメインウインドウの左下の「Log」をクリックし、「Logging」にし、記録を開始した。測定終了後、メインウインドウの左上の「File」から「Export」をクリックし、「To spread sheet」を選択した。この操作によりデータのエクスポートを行った。

1.2.5.2 無線式ポテンシオスタット回路の防水処理

まず、ポリエチレンビニルの袋の角を切り取り、直径 2 mm 程度の穴を開けた。そこに約 1 cm に切り取ったポリエチレン製のチューブ（ $\varnothing 3$ mm）を通し、Alardite®を用いて固定した。次に、袋の中にポテンシオスタットを収め、グルコースセンサのリード線をチューブの中に通してポテンシオスタットと接続した。その後、再度 Alardite®でチューブとリード線の隙間を埋め、シーラー（シユラシーラー NL-101J、石崎電機製作所社製、東京、日本）を用いて袋の口を熱圧着して防水加工を施した。なお、センサと無線ポテンシオスタットの接続には 2 mm のピッチコネクタ（ヒロセ電機社製、東京、日本）とキャップを用いた（Fig. 1-2-3）。

1.2.5.3 バイオセンサの魚体への装着

魚のストレス応答測定は、グルコースセンサを魚の眼球近傍に存在する EISF 中に挿入することにより行った(Fig. 1-2-4). まず、飼育水 5 L に 2-フェノキシエタノール溶液を溶解し、400 ppm の麻酔液を調製した. 試験魚を麻酔液に 5 ~ 10 分間浸漬し、麻酔を施した後、キムタオルを用いて手が魚体に直接触れないように魚を麻酔液から取り出し、眼球付近の水を拭き取った. 次に、20 G シールド付きサーフロー（テルモ社製，東京，日本）及び錐を用いて、眼球外膜に直径 0.7 mm 程度の穴を開けた. 穴から眼球に沿ってゆっくりとバイオセンサを刺入し、キムワイブにアロンアルファ（東亜合成社製，東京，日本）を塗布してセンサを魚体に固定した. さらに、タッカーを用いてセンサのリード線の一部を魚体に固定した. 魚体にバイオセンサを装着した直後は、そのストレスにより各指標が急激に増加することが予備実験により明らかにされていたため、本章の実験ではセンサを魚体に装着して 15 時間以上経過した後に、ストレス応答の測定を行った. 以上の方法により、魚体にセンサを装着した後、魚体内のグルコース濃度の変動を測定した.

1.2.5.4 従来法によるグルコースの測定

従来法によるグルコースの測定には、比色定量法（グルコース測定キット：グルコース CII-テストワコー，和光純薬工業社製，大阪，日本）を用いた.

1.2.5.5 測定値の校正

一般に、生体内測定におけるセンサの出力電流値の校正には、1 点校正法

(One-point calibration method)と2点校正法(Two-point calibration method)が知られている⁴²⁾。当研究室の先行研究により、魚類のためのバイオセンサの測定では、実際のグルコース濃度の値とセンサのグルコース換算値との相関性をはじめ、測定の簡便性においても1点校正法が優れていることが明らかにされているため、本章では1点校正法を採用した。

本校正法は、以下の式によりグルコース濃度を算出できる。

$$G(t) = I(t) / S$$

$$S = I_1 / G_1$$

1点校正法は、採血によって従来法で得られた1点の血液サンプルの測定値を基に校正を行い、各測定値をグルコース濃度に換算する方法である。センサ感度 S ($\text{nA} / \text{mg dl}^{-1}$) は、採血によって得られた血液サンプルのグルコース濃度及びその時のセンサの出力電流値から導かれる。グルコース濃度 G (mg dl^{-1}) は、連続的に得られるセンサの出力電流値 I (nA) によって算出される。

1.2.5.6 従来法によるコルチゾル測定

試験魚の血中コルチゾル 1.2.6.1 の定量は ELISA (Cortisol ELISA Kit, Cayman chemical 社製, ミシガン州, U.S.A.) を用いて行った。コルチゾルの濃度は、ストレス負荷後に急激に変化する¹³⁾ことが知られているため、採血等の作業はできる限り迅速に行った。

1.2.6 ストレス応答の測定

1.2.6.1 ストレス応答に及ぼす試験区間の移動の影響 (対照実験)

本章では、魚類のストレス応答に及ぼす水環境変化の影響を検討するために、各々異なった環境（試験区）に魚体を移動させることにより、そのストレス応答を経時的に測定した。しかし、環境変化の影響を正確に調べるためには、試験区間の移動に伴うストレス応答の有無を確認する必要がある。そこで対照実験として、まず、同一水質条件の試験区（水槽、45×30×30 cm）を2区画用意し、通常の飼育水を10 Lずつ注入した。次に、試験魚のティラピア（全長23.0 cm、体重177.8 g）を片方の試験区Aに収容し、絶食させた状態で2日以上遊泳させた。次に、バイオセンサを1.2.5.3に従って試験魚に装着し、この操作によるストレスを緩和するために、15時間以上経過させてセンサの出力電流値が安定したことを確認して実験を開始した。開始から30分後、一度目の採血と同時に試験魚をもう片方の試験区Bに移した。その後、測定を110分間継続して再度採血を行い、グルコース及びコルチゾル濃度を従来法で測定した。

1.2.6.2 ストレス応答に及ぼす酸素濃度の影響

試験区（45 × 30 × 30 cm）に飼育水を10 L入れ、ティラピア（全長：22.5 cm、体重165.6 g）を収容した。測定開始から10分後にエアープンプを止め、試験区内に窒素を添加することによって、飼育水中の酸素濃度を7.8 ppm（測定開始から30分後）から3.1 ppm（測定開始から約90分後）まで低下させた。酸素濃度はUSB 2000及びUSB-LS-450（両者ともOcean Optics社製、フロリダ州、U.S.A.）及びDOプローブ(FOX-R FOXY-AF-MG, Ocean Optics社製、フロリダ州、U.S.A.)を用いて測定した。その後、再びポンプによる曝気を行い、飼育水中の酸素濃度が7.5 ppmに戻るまでストレス応答を測定した。なお、採血は測定開始時から0, 35, 90, 110分後に行った。また、各時間における酸素濃度は、それぞれ0分：7.8 ppm, 5.8 ppm（35分）、3.1 ppm（90分）、7.5 ppm

(120分)であった。採血及び血中グルコース/コルチゾル濃度の定量については、1.2.6.1と同様に行った。

1.2.6.3 ストレス応答に及ぼす pH の影響

飼育水の pH 変化における、ティラピアのストレス応答の測定を行った。まず、同じ容積の試験区（水槽，45×30×30 cm）を 2 つ用意し、1.2.7.1 と同様の手順で測定準備を行った。片方の水槽には通常の飼育水（pH 6.8），もう片方には pH が 4.5 になるように 0.1 M 酢酸を添加した飼育水を調製した。飼育水の pH は、pH メーター（F-52，HORIBA 社製，東京）を用いて確認した。以降、前者を試験区 A，後者を試験区 B と称す。次に、試験魚として用いるティラピア（全長 24 cm，体重 220.7 g）を試験区 A に収容し、1.2.6.1 と同様の手順で測定準備を行った。測定開始から 30 分後、一度目の採血と同時に試験魚を試験区 A から B に移し、pH が 4.6 の飼育水で魚を遊泳させた。なお、採血は測定開始時から 0, 70, 210, 330 分後に行った。採血及び血中グルコース/コルチゾル濃度の定量については、1.2.6.1 と同様に行った。

1.2.6.4 ストレス応答に及ぼすアンモニア性窒素化合物の影響

1) アンモニア濃度

飼育水のアンモニア濃度変化における、ティラピアのストレス応答測定を行った。試験区（水槽，45×30×30 cm）を 2 つ用意し、1.2.6.1 と同様の手順で測定準備を行った。試験区 A には通常の飼育水（アンモニア濃度 0.25 mg L⁻¹）を入れ、試験区 B にはアンモニア濃度が 25.00 mg L⁻¹になるように上記飼育水

に 25%アンモニア水を添加して調製した。次に、ティラピア（全長 25 cm，体重 206.6 g）を試験区 A に収容し，1.2.6.1 と同様の手順で測定準備を行った。測定開始から 20 分後，一度目の採血と同時に試験魚を試験区 A から B に移し，アンモニアを添加した飼育水に魚を遊泳させた。なお，採血は測定開始時から 20, 45, 75, 120 後に行った。採血及び血中グルコース/コルチゾル濃度の定量については,1.2.6.1 と同様に行った。

2) 亜硝酸濃度

飼育水の亜硝酸濃度変化における，ティラピアのストレス応答の測定を行った。はじめに，同じ容積の試験区（水槽，45×30×30 cm）を 2 つ用意し，1.2.6.1 と同様の手順で測定準備を行った。片方の試験区には通常の飼育水（亜硝酸濃度 0.00 mg L⁻¹），もう片方には亜硝酸の最終濃度が 25.00 mg L⁻¹になるように上記飼育水に亜硝酸ナトリウムを添加した。以降，前者を試験区 A，後者を試験区 B と称す。次に，試験魚となるティラピア（全長 25 cm，体重 213.4 g）を試験区 A に収容し，絶食させた状態で 2 日間以上飼育した。試験魚にセンサを装着し，センサの出力電流値が安定するまで一晩以上放置した後測定を開始した。測定開始から 20 分後，一度目の採血と同時に試験魚を試験区 A から B に移し，亜硝酸ナトリウムを添加した飼育水に魚体を暴露した。なお，採血は測定開始時から 20, 60, 100, 130, 170 分後に行った。採血及び血中グルコース/コルチゾル濃度の定量については,1.2.6.1 と同様に行った。

3) 硝酸塩濃度

飼育水中硝酸塩濃度の変化による，ティラピアのストレス応答の測定を行っ

た. はじめに, 同じ容積の試験区 (水槽, 45×30×30 cm) を 2 つ用意し, 1.2.6.1 と同様の手順で測定準備を行った. 片方の試験区には通常の飼育水 (硝酸塩濃度 0.00 mg L⁻¹), もう片方は硝酸塩濃度が 25.00 mg L⁻¹になるように硝酸ナトリウムを添加した飼育水である. 以降, 前者を試験区 A, 後者を試験区 B と称す. 次に, 試験魚となるティラピア (全長 24.5 cm, 体重 220.6 g) を試験区 A に收容し, 絶食させた状態で 2 日間以上飼育した. 試験魚にセンサを装着し, センサの出力電流値が安定するまで一晩以上静置した後測定を開始した. 測定開始から 20 分後, 一度目の採血と同時に試験魚を試験区 A から B に移し, 硝酸ナトリウムを添加した飼育水に魚体を暴露した. なお, 採血は測定開始時から 20, 75, 140 分後に行った. 採血及び血中グルコース/コルチゾル濃度の定量については, 1.2.6.1 と同様に行った.

1.2.6.5 ストレス応答に及ぼす魚体間の相互作用の影響

同じ容積の試験区 (45×30×30 cm, 20L) を 2 つ用意し, 一方には中型個体 (ティラピア α, 全長 18.1 cm, 体重 88.72 g) を, もう一方に小型個体 (ティラピア β, 全長 16.7 cm, 体重 70.36 g) を收容し, 絶食させながら 2 日以上遊泳させることにより飼育環境に馴化させた. 次にティラピア β にセンサを装着し, 1.2.6.1 と同様の手順で測定準備を行った. 測定開始から約 1.5 時間後, β を α が收容されている試験区に投入して両者を対面させた. 一方, 空いたもう片方の試験区には, 大型個体 (ティラピア γ, 全長 19.7 cm, 体重 116.01g) を收容した. 測定開始から 6 時間後に, β を試験区から取り出し, α との対面を終了させた. その 6 時間後 (測定開始から 12 時間後), γ を α が收容されている試験区に投入し, 再度 α と対面させた. そして 4 時間後 (測定開始から 16 時間後) に γ を試験区から取り出し, 実験を終了した. 測定中にはティラピア α

に採血を数回行い、グルコース及びコルチゾル濃度を従来法で測定した。なお、採血は測定開始時から 3.5, 14.5, 16.5, 21 時間後に行った。

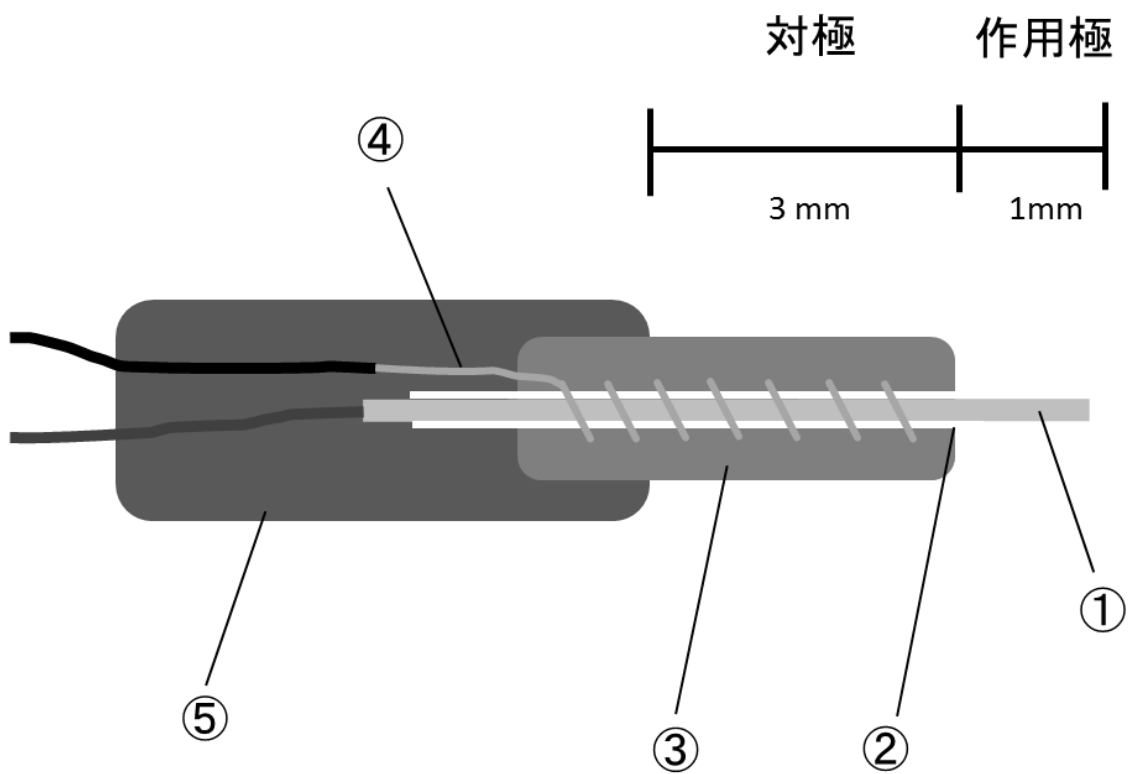
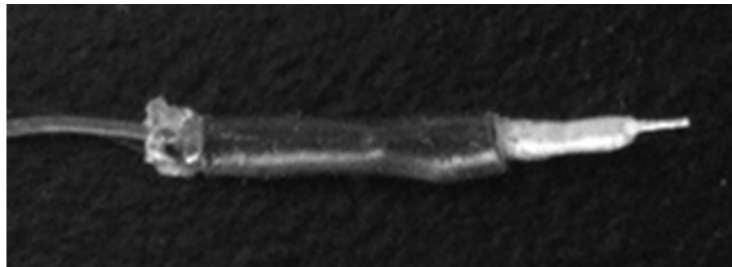


Fig. 1-2-1 グルコースセンサの概略図

- ①Pt-Ir 線 ②テフロンコート ③Ag/AgCl ペースト
- ④Cu 線 ⑤ 熱収縮チューブ

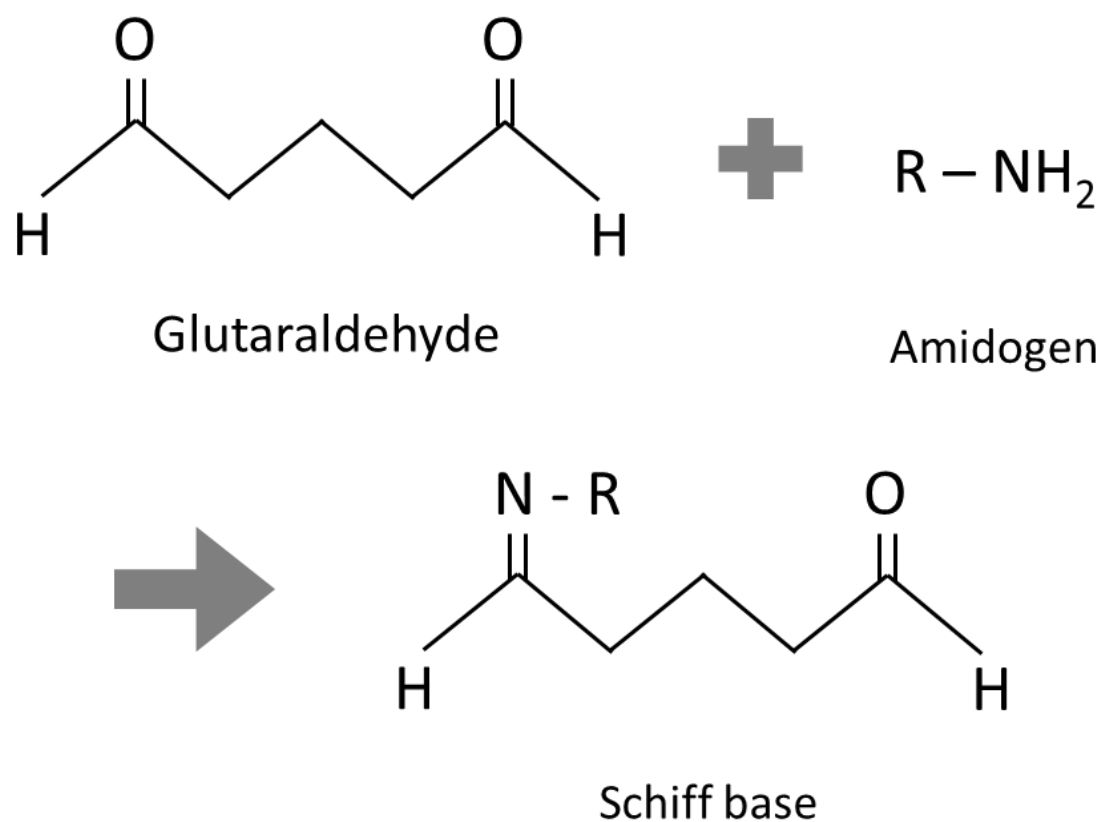


Fig. 1-2-2 Glutaraldehydeの縮合反応

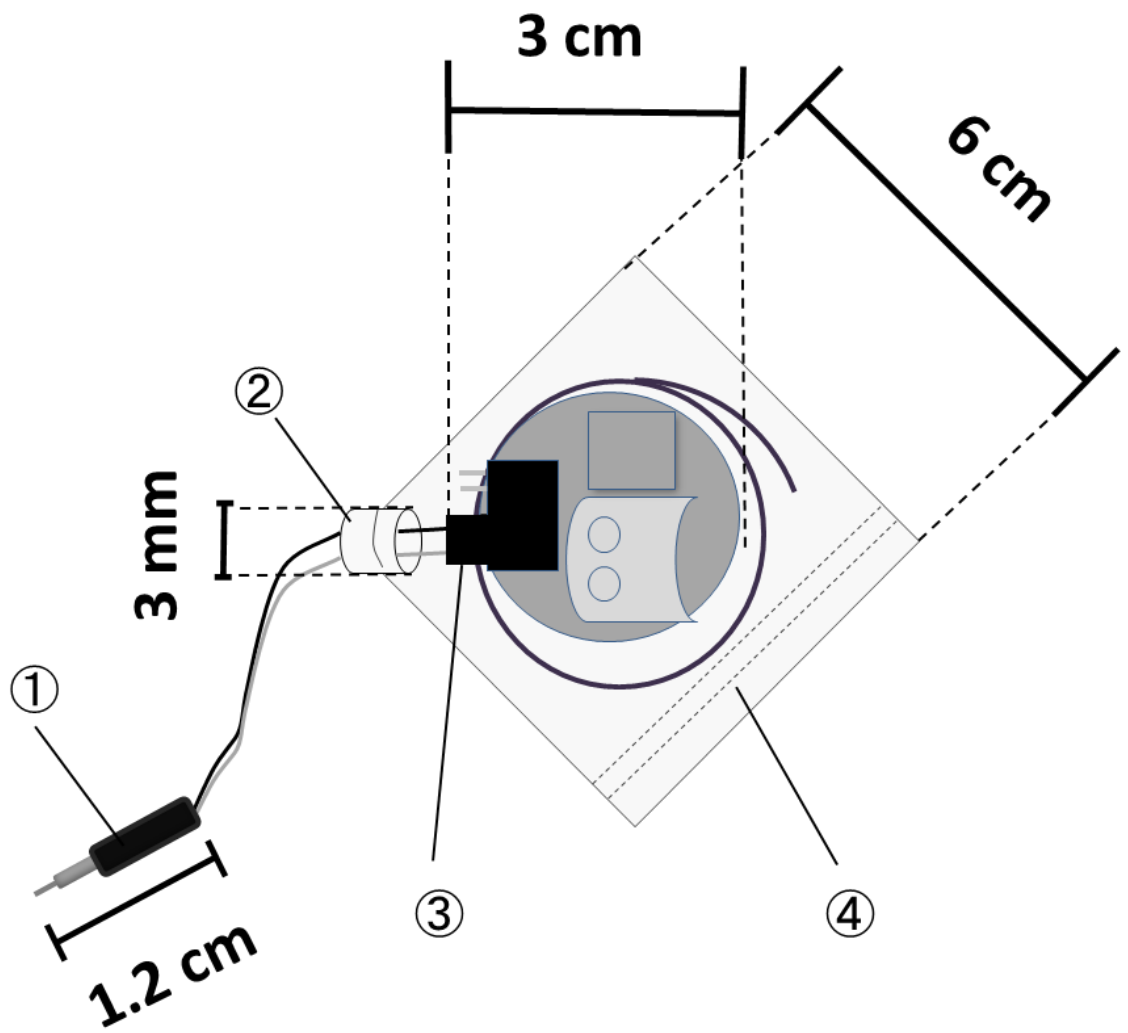


Fig. 1-2-3 送信機の防水加工

- ①グルコースバイオセンサ ②ポリエチレンチューブ
- ③ピッチコネクタピン・キャップ ④ポリエチレンビニル(熱圧着線)

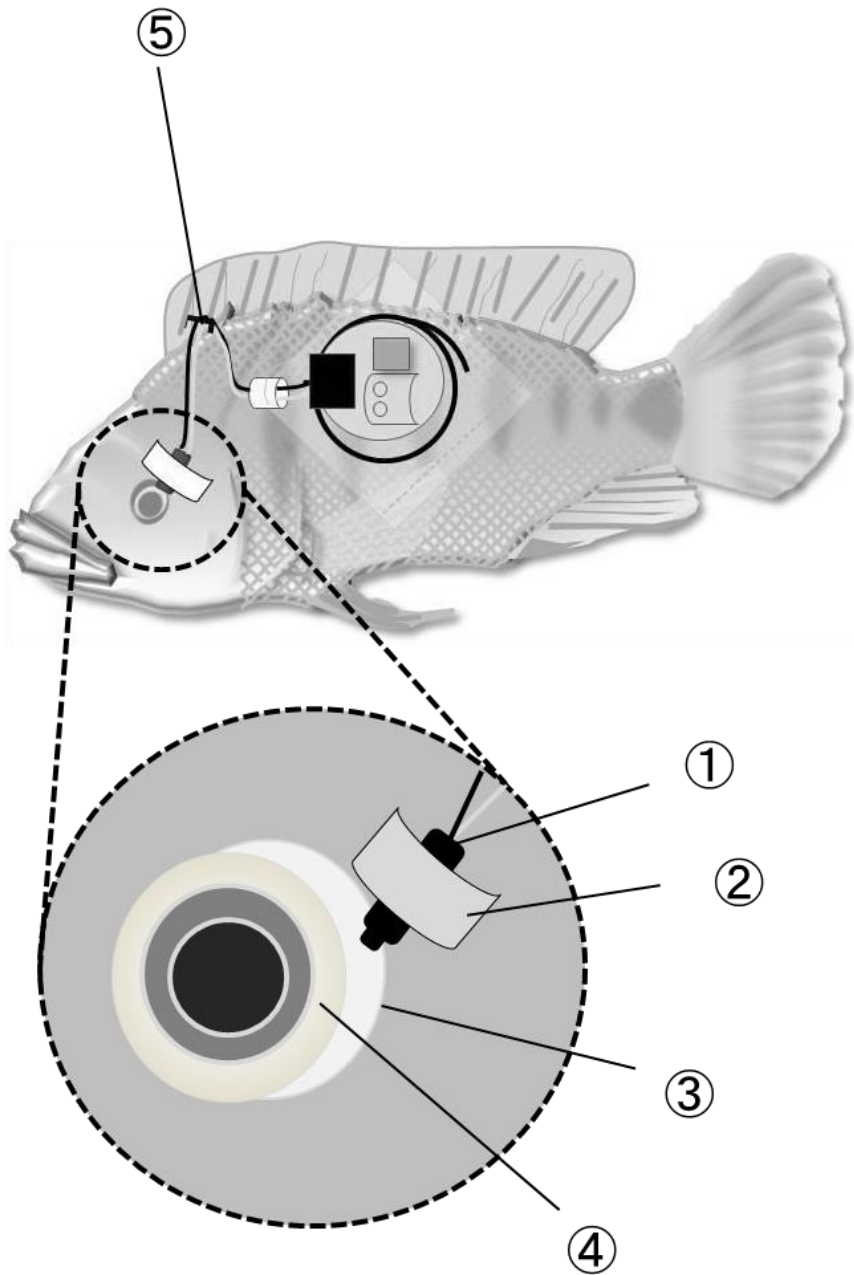


Fig. 1-2-4 魚体へのセンサの装着

- ①グルコースバイオセンサ ②キムワイプ及び接着剤(アロンアルファ)
 ③眼球外膜間質液(EISF) ④眼球 ⑤タッカー

1.3 結果及び考察

1.3.1 物理・化学的变化におけるストレス応答測定

1.3.1.1 試験区間の移動に伴うストレス応答（対照実験）

本実験では、魚類のストレス応答に及ぼす水環境の変化の影響を検討するために、各々異なった環境（試験区）に魚体を移動させることにより、そのストレス応答の経時変化を測定した。しかし、より正確な環境因子の影響を検討するためには、試験区間の移動に伴うストレス応答の有無を予め確認する必要がある。そこで対照実験として、同一水質条件の試験区を2区画用意し、試験魚のストレス応答に及ぼす魚体の移動の影響を調べた。本章では、ストレス指標物質として、一次応答の指標となる血中コルチゾル濃度をELISA（1.2.5.6）を用いて測定し、二次応答の指標となる血中グルコース濃度をグルコース測定用バイオセンサおよび比色定量法（1.2.5.4）を用いて測定した。

Fig.1-3-1に結果を示す。図中の矢印（a）は、採血後に魚を試験区Aから試験区Bに移した点を示す。センサの校正点には測定開始から30分後の値を用いた（血糖値： 48 mg dl^{-1} ，出力電流値 16.93 nA ）。この図より、バイオセンサによって測定されたグルコース濃度は、従来法から得られた値とほぼ一致しており、本センサを用いることでグルコースのリアルタイム測定が可能であることがわかった。一方、試験区の移動に伴う血中コルチゾル及びグルコースの濃度の変化はほとんど認められなかった。したがって、試験区間の移動は試験魚のストレス応答にあまり影響を与えていないと推察される。以上の結果より、本手法を用いることにより、各種ストレス因子による魚のストレス応答を測定することができると考えられる。

1.3.1.2 ストレス応答に及ぼす酸素濃度の影響

水中の酸素濃度が極端に低くなった場合，魚類の生体の基本機能に必要な最小限のエネルギーが供給できなくなり，魚体は大きなストレスを受け，最終的には死に至る恐れもある²⁵⁾．そこで，試験魚のストレス応答に及ぼす酸素濃度の影響を、血中グルコース及びコルチゾル濃度を指標として調べた．

測定結果を Fig.1-3-2 に示す．図中の矢印（a）は，試験区に窒素を添加した点を示す．センサの校正点には測定開始から 0 分後の値を用いた（血糖値： 135.1 mg dl^{-1} ，出力電流値 4.36 nA ）．この図より，酸素濃度の減少に伴いグルコース及びコルチゾル濃度の増加が認められる．これらのストレス指標濃度の変動は，水中の酸素濃度の低下によって試験魚が酸素欠乏状態に陥り，魚体がストレスを受けたものと推察される．一方，血中グルコース濃度は測定時間の経過に伴って上昇し続けたが，コルチゾル濃度は 90 分以降には減少した．この理由として，コルチゾルは魚類のストレス応答における第 1 段階の分泌物であり，ストレス応答の進行と共に消費される一過性の特徴を持つホルモンである^{10,13)}こと，また血中グルコースは，コルチゾルなどのホルモンにより糖新生した生産物であり，ストレス因子が除去されても，すぐにはその濃度が変動しないことが原因であると考えられた．

1.3.1.3 ストレス応答に及ぼす pH の影響

飼育水の pH 変化は魚に対して大きなストレス要因となり，魚の日常の飼育にも大きな影響を与えているといわれている⁴⁴⁾．そこで試験魚のストレス応答に及ぼす pH の影響を調べた．

測定結果を Fig. 1-3-3 に示す。図中の矢印 (a) は、試験魚を pH 4.5 の試験区に移動させた点を示す。センサの校正点には測定開始から 0 分後の値を用いた (血糖値: 108.3 mg dl^{-1} , 出力電流値 6.27 nA)。この図より、グルコース及びコルチゾル濃度が最初の 20 分間で大幅に上昇し、70 分以降徐々に減少していく傾向が認められた。この現象の理由は、pH が中性から弱酸性に変化したことで、魚は一時的にストレスを受けたが、次第にそのストレスに慣れ、測定時間の経過と共にストレス指標濃度が平常値に戻ったためであると推察される。

1.3.1.4 ストレス応答に及ぼすアンモニア性窒素化合物の影響

自然環境下において、生物の排泄物を始め、生物死骸、残餌等などの蓄積によるアンモニア性窒素化合物 (アンモニア、亜硝酸、硝酸塩) が魚の生育環境に流入することは珍しくない。魚類は、環境水のアンモニア濃度が 2.79 mg L^{-1} 以上になると、呼吸障害、食欲の低下が生じ、場合によっては死に至ることもあるといわれている。また、亜硝酸は硝化プロセスにおけるアンモニアと硝酸塩の中間産物であり、その毒性はアンモニアよりも高いといわれている。硝酸塩は、アンモニア、亜硝酸に比べて魚に対する毒性は低いといわれているが、水中に高濃度に蓄積すると魚の呼吸に影響を与えることが知られている^{13,25)}。以上の点から本実験では、試験魚のストレス応答に及ぼすこれらアンモニア性窒素化合物の影響を調べた。

1) ストレス応答に及ぼすアンモニア濃度の影響

アンモニア濃度の変化によるストレス応答の測定結果を Fig. 1-3-4 に示す。図中の矢印 (a) は、アンモニア (25.00 mg L^{-1}) を添加した試験区に試験魚を

移した点を示す。センサの校正点には測定開始から 20 分後の値を用いた（血糖値： 93.7 mg dl⁻¹，出力電流値 4.18 nA.）

この図より，血中コルチゾル値は試験区間の移動を行った直後に上昇し，その後減少してから一定のレベルを維持する傾向が確認された。一方，血中グルコース濃度の上昇は，コルチゾル濃度の増加より遅れて上昇し続けることが確認できた。この現象は，魚の生存に関わる TCA サイクルに必要な物質を競争的に利用する際に，暴露時間の経過と共に細胞内にアンモニアが侵入して ATP の生成を妨げ，呼吸能力に影響を与えること⁴⁵⁾が，大きなストレス要因となっていると推察される。

2) ストレス応答に及ぼす亜硝酸濃度の影響

亜硝酸濃度の変化によるストレス応答の測定結果を Fig. 1-3-5 に示す。図中の矢印（a）は，亜硝酸（25.00 mg L⁻¹）を添加した試験区に試験魚を移した点を示す。センサの校正点には測定開始から 20 分後の値を用いた（血糖値 45.1 mg dl⁻¹，出力電流値 6.27 nA）。

この図より，亜硝酸を添加した試験区に魚を移した直後に，コルチゾル及びグルコース濃度の上昇が認められた。一方，130 分の時点から両物質濃度の減少が認められた。しかしながらグルコースの減少幅はコルチゾルに比べて小さくなっているため，ストレスにおける二次応答がその後も継続していると考えられる。これらの現象は，亜硝酸が魚体に対して酸素の運搬障害という内面的な障害を起こしたもので，亜硝酸の体内濃度の上昇に伴ったヘモグロビンとの結合により酸素を効率よく運搬できなくなったため⁴⁶⁾であると推測される。

3) ストレス応答に及ぼす硝酸塩の濃度の影響

硝酸塩量の変化によるストレス応答の測定結果を Fig. 1-3-6 に示す。図中の矢印 (a) は、硝酸塩を添加した試験区に試験魚を移した点を示す。センサの校正点には測定開始から 20 分後の値を用いた (血糖値 : 73.6 mg dl^{-1} , 出力電流値 3.88 nA)。

この図より、試験魚を硝酸塩を添加した試験区に移した後、グルコース濃度の僅かな上昇が確認された。一方、コルチゾル濃度については移動の直後に一時的に高い値を示したが、その後は緩やかに減少する傾向が認められた。この現象は、硝酸塩はアンモニアや亜硝酸に比べ毒性が低く、魚体へのストレスが少ないことが原因であると推察される。

以上、各種アンモニア窒素性化合物をストレス因子として負荷した場合の結果より、アンモニアや亜硝酸などの毒性の高いストレス因子を受けた直後は、コルチゾル及びグルコース濃度が高いレベルに増加し、強いストレスを受けていることが推察される。また比較的毒性の低い硝酸塩の場合は、一時的にコルチゾル濃度の上昇が認められたものの、全体としてはグルコース濃度と同様に低い値に戻ることから、アンモニアや亜硝酸と比べて、受けているストレスは小さいと考えられる。

1.3.2 ストレス応答に及ぼす魚体間の相互作用の影響

本実験で用いているティラピアは、雄性同士で強い縄張り争いをする習性を有している。そこで魚類の行動生理学的観点から、試験魚にストレス応答に及ぼす魚体間の相互作用の影響を調べた。結果を Fig. 1-3-7 に示す。センサの校

正点は測定開始から 3.5 時間後の値を用いた（血糖値：47.3 mg dl⁻¹，出力電流値 4.62 nA）。図中の矢印（a, b, c, d）は，試験魚を移した点を示す。

まず試験魚 α（中型，全長 18.1 cm）を測定用水槽に遊泳させ，センサの出力電流値が安定してから，試験魚 β（小型，全長 16.7 cm）を試験魚 α が遊泳している水槽に投入して対面させた（a）。その 5 時間後，試験魚 β を測定用水槽から取り出した（b）。この間，試験魚 α が試験魚 β を追いかけて攻撃する行動が確認されたが，試験魚 α のストレスの指標となる血中グルコース及びコルチゾル濃度はほとんど上昇しなかった。一方，試験魚 β を取り出して，その 6 時間後に試験魚 γ（大型，全長 19.7 cm）を測定用水槽に投入した（c）。その結果，試験魚 α のグルコース及びコルチゾル濃度が急激に上昇し，大きなストレス応答が確認された。この現象は，試験魚 α の縄張りに対する力が優勢から劣勢になり，大型の個体からストレスを受けたことが理由として考えられる。最後に，試験魚 γ を測定用水槽から取り出したところ（d），試験魚 α の血中コルチゾル及びグルコース濃度は徐々に減少し，20 時間後には平常値に近い値に戻った。

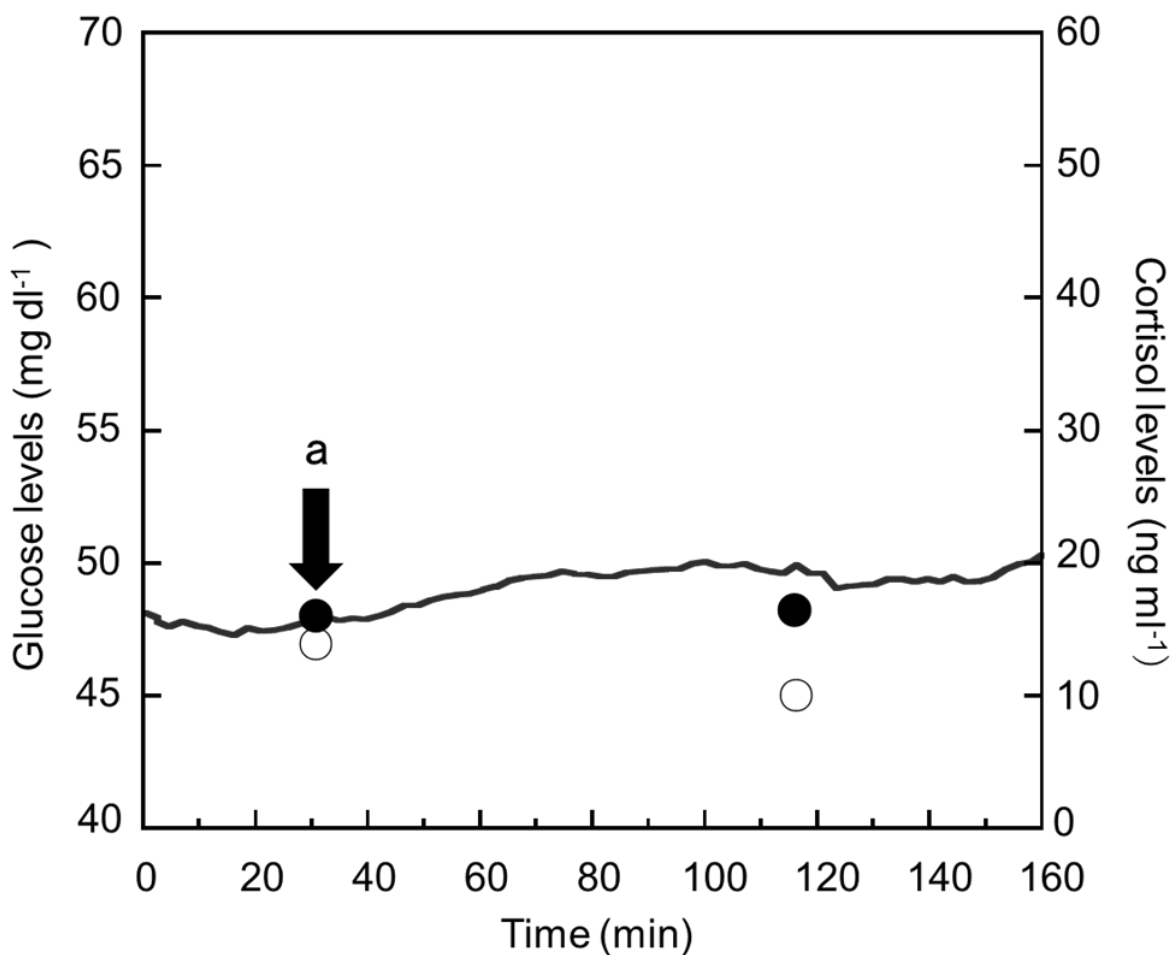
縄張り争いのような行動生理学的なストレスが生じた場合，劣勢になった魚は食欲の減少や体色の変化などのネガティブな生理活動が現れ，最終的に魚全体の成長や健康などに悪い影響を与えることが報告されている³⁸⁾。そのため，魚類の飼育には，物理的，化学的なストレス因子をはじめ，このような行動生理学的な因子も考慮しながら，飼育環境を整える必要があるといえる。

1.4 結言

本章の結果を要約すると以下のようなになる。

- 1) 魚類のストレス応答において、コルチゾルとグルコースの両ストレス指標を測定することにより、多くのストレス因子の存在を明らかにすることができた。ストレス応答を測定するには、魚の行動観察だけではなく、その体内において常に変動する血中コルチゾル及びグルコース濃度をモニタリングすることが適切なアプローチであると考えた。特に血中コルチゾル濃度は、ストレス負荷後、ストレスの強度に合わせ急激かつ一時的に増加する傾向が強く、その応答に必要な濃度を維持し、グルコースの生成に関わる糖新生作用などを刺激する。そのため、コルチゾルの迅速・短間隔での測定は、ストレス応答の強さ、特に急性ストレス因子によるストレスを知る上で重要な指標となり、ストレス応答を早期把握するために有効な指標であると考えられる。
 - 2) 血中グルコース濃度の変化は、魚類のストレスの度合いをはじめ、呼吸障害、栄養状態を反映することが近年の研究によって明らかにされている。血中のグルコースは、前述のようにストレスを受けた後に糖新生作用により生成される物質であるため、ストレス負荷直後には上昇しないが、やがて時間の経過と共に徐々に増加する。よって、本章で作製したバイオセンサシステムを用いて血中グルコース濃度の変化を測ることで、魚を遊泳させた状態でそのストレス応答をリアルタイムに経時的にモニタリングできることを確認した。
- 以上の事項から、魚類のストレス応答をより総合評価するには、コルチゾル及びグルコースの両指標物質濃度を迅速かつ同時に測定できることが望まし

い。魚の血中グルコース濃度の測定については、当研究室の先行研究で開発されたバイオセンサを用いることによって迅速なリアルタイムモニタリングが可能であった。しかしながら、コルチゾルの迅速な測定に関しては未だに迅速かつ簡便な方法が確立していないのが現状である。そこで次章では、コルチゾル濃度の迅速・簡便な測定が可能なバイオセンサシステムの試作を試みた。



**Fig. 1-3-1 同一試験区間における
ストレス応答に及ぼす移動の影響**

- Glucose levels (Biosensor)
- Glucose levels (Colorimetry)
- Cortisol levels (ELISA)
- a Transfer from aquarium A to aquarium B

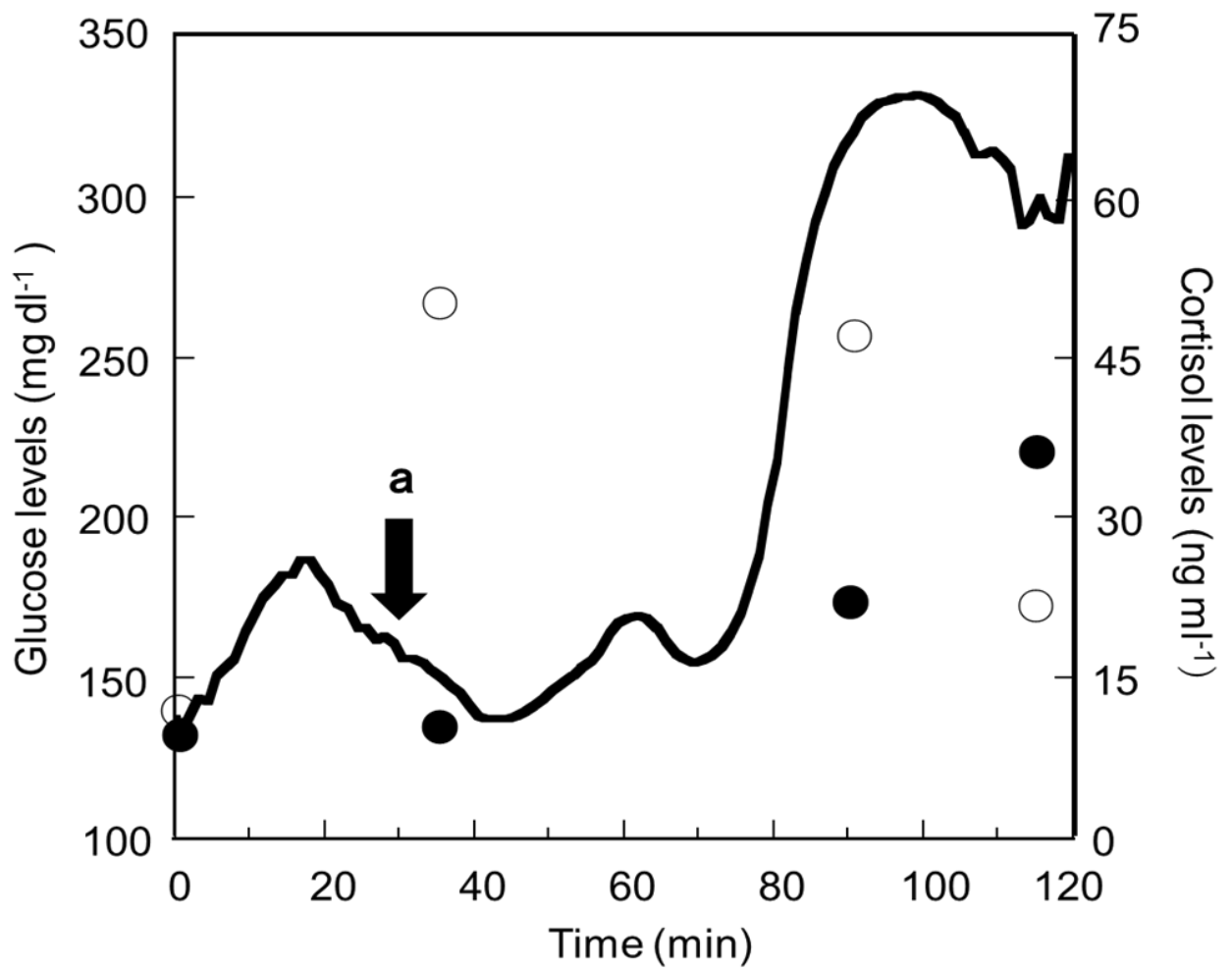


Fig. 1-3-2 ストレス応答に及ぼす溶存酸素濃度の影響

- Glucose levels (Biosensor)
- Glucose levels (Colorimetry)
- Cortisol levels (ELISA)
- a Aerating nitrogen

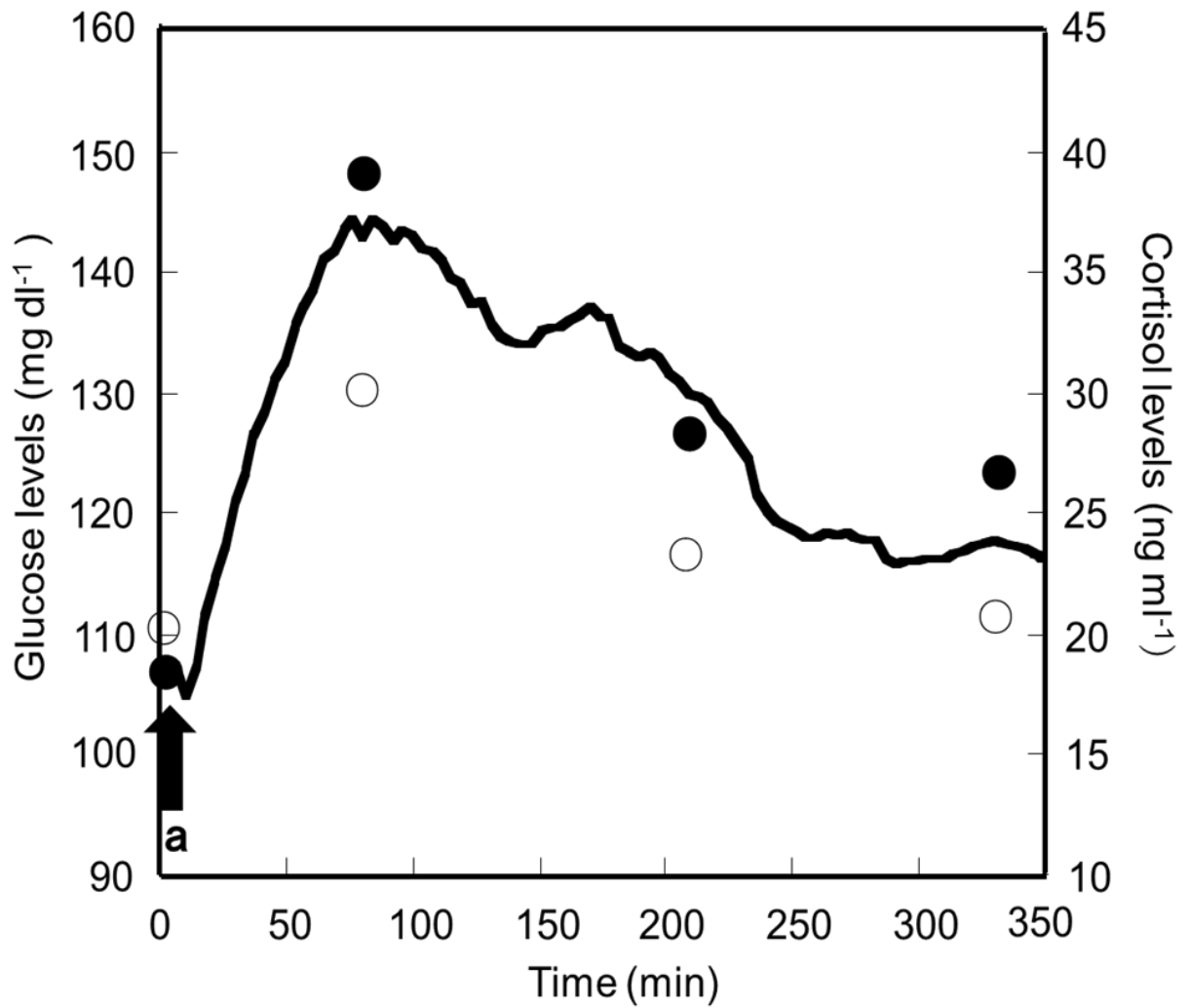


Fig. 1-3-3 ストレス応答に及ぼすpHの影響

- Glucose levels (Biosensor)
- Glucose levels (Colorimetry)
- Cortisol levels (ELISA)
- a pH change to 4.5

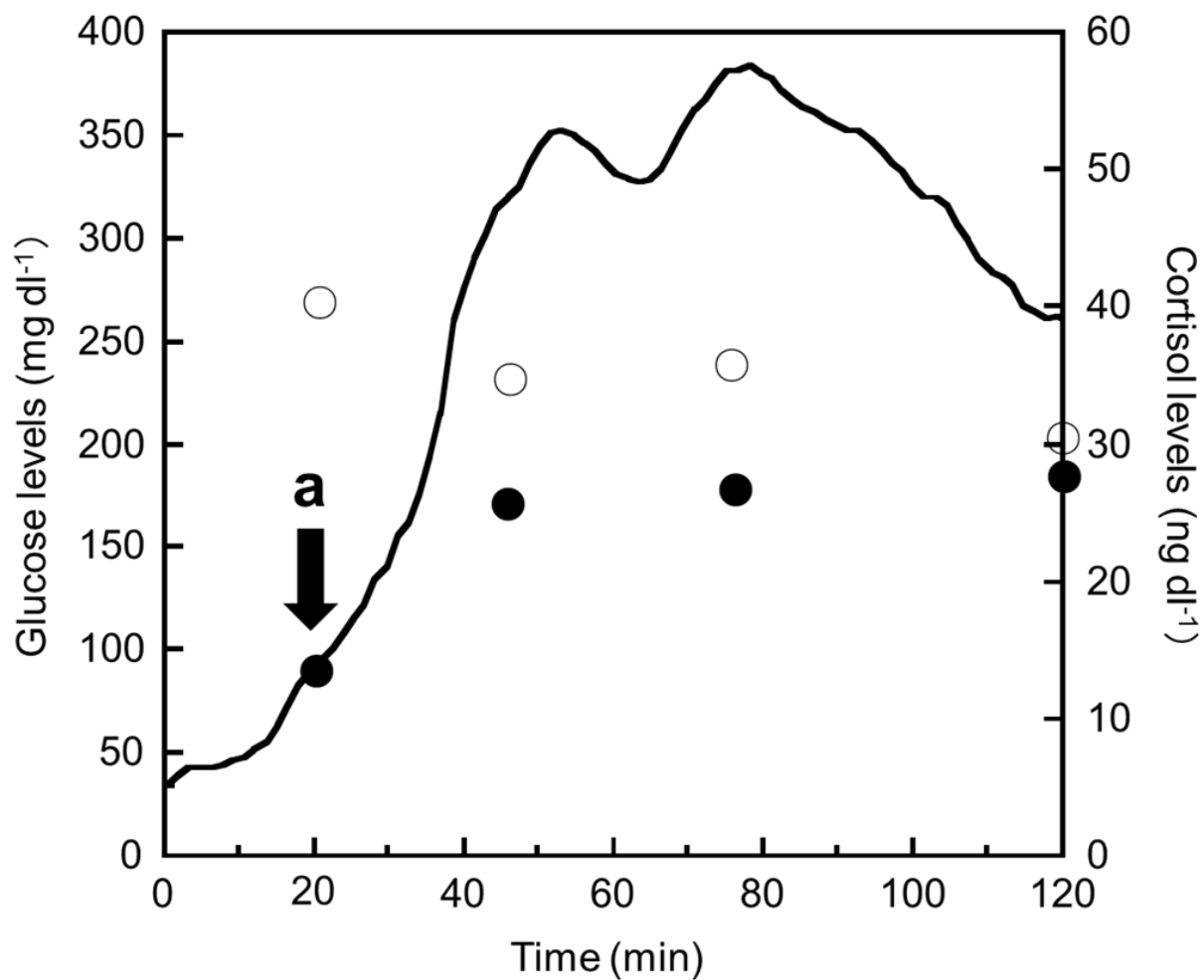


Fig. 1-3-4 ストレス応答に及ぼすアンモニアの影響

- Glucose levels (Biosensor)
- Glucose levels (Colorimetry)
- Cortisol levels (ELISA)
- a NH₃ concentration change to 25 mg L⁻¹

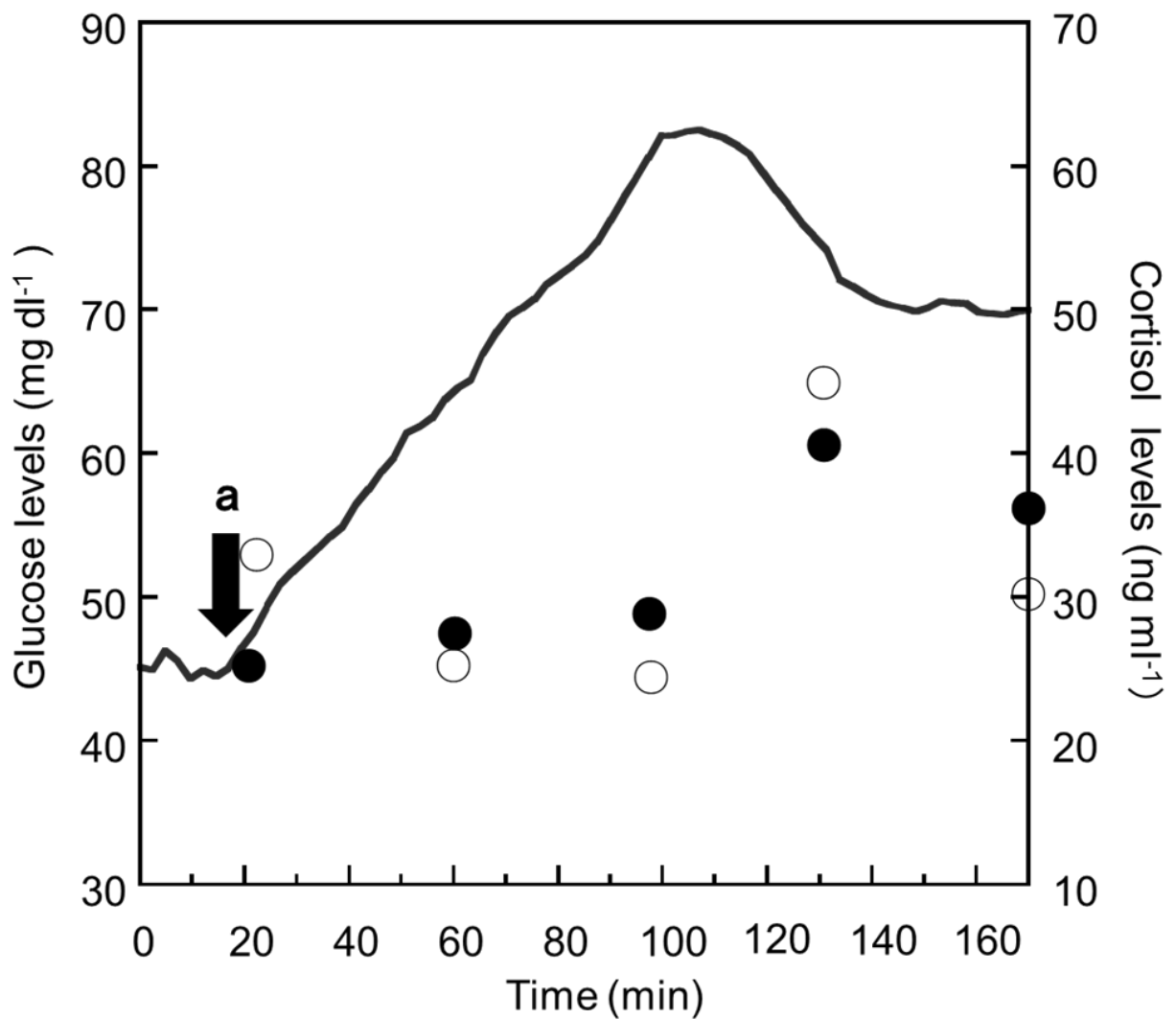


Fig. 1-3-5 ストレス応答に及ぼす亜硝酸塩の影響

- Glucose levels (Biosensor)
- Glucose levels (Colorimetry)
- Cortisol levels (ELISA)
- a NO_2^- concentration change to 25 mg L^{-1}

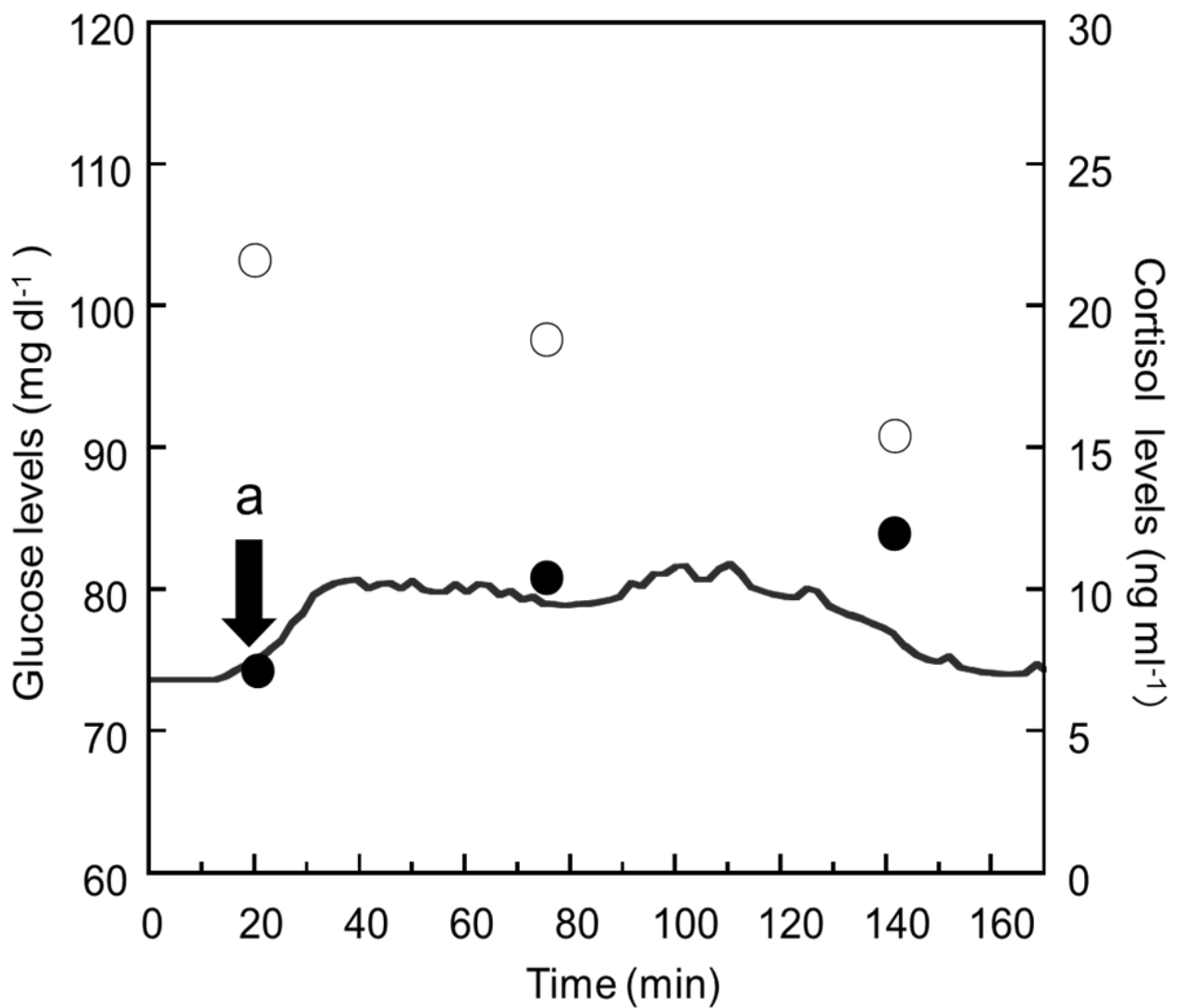


Fig. 1-3-6 ストレス応答に及ぼす硝酸塩の影響

- Glucose levels (Biosensor)
- Glucose levels (Colorimetry)
- Cortisol levels (ELISA)
- a NO_3^- concentration change to 25 mg L⁻¹

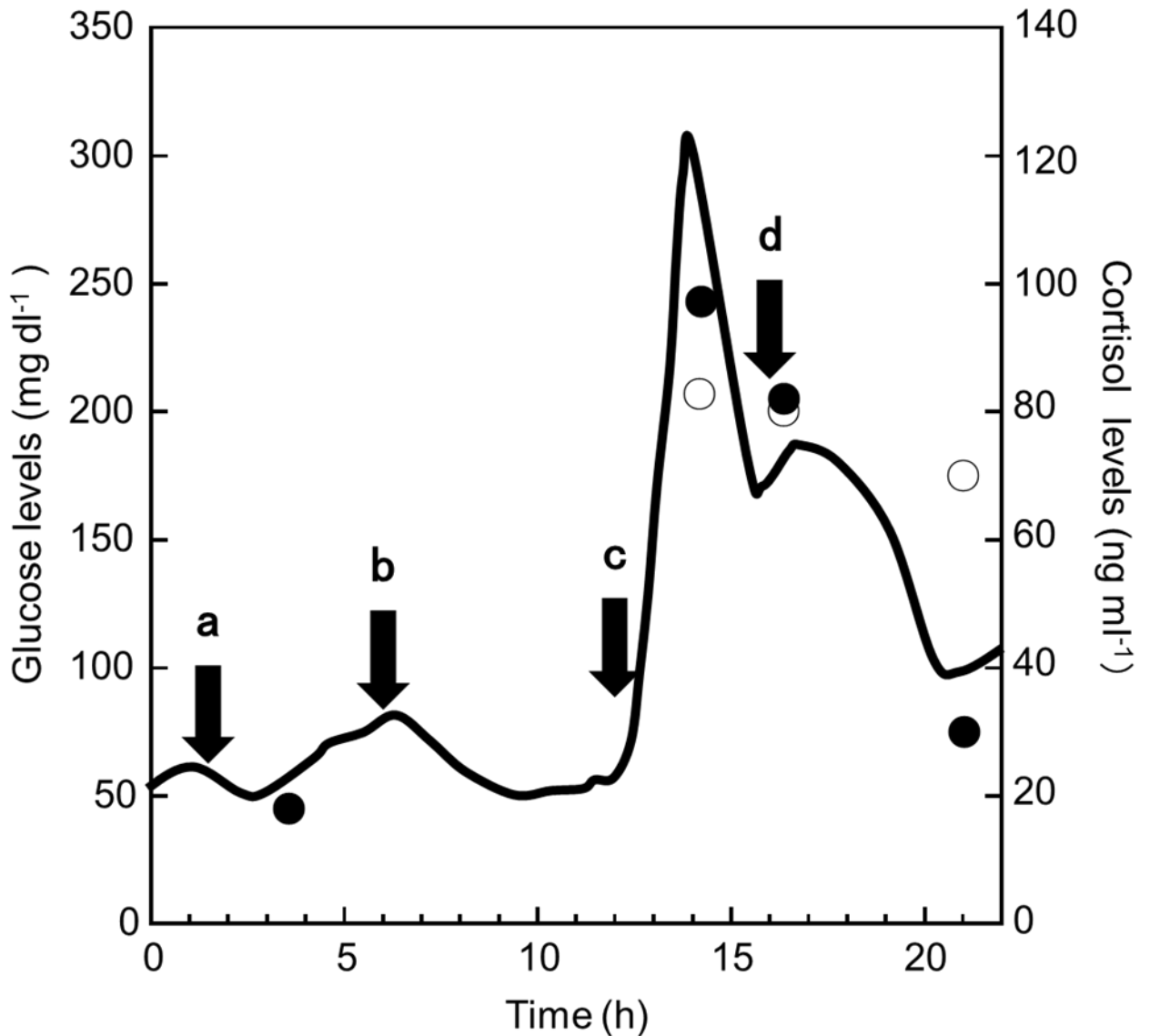


Fig. 1-3-7 ストレス応答に及ぼす魚体間の相互作用の影響

— Glucose levels (Biosensor)

● Glucose levels (Colorimetry)

○ Cortisol levels (ELISA)

- a Test Fish β was placed into the aquarium
- b Test Fish β was taken out from the aquarium
- c Test Fish γ was placed into the aquarium
- d Test Fish γ was taken out from the aquarium

第二章 コルチゾル測定のためのイムノセンサの開発

2.1 緒言

第一章では、各種ストレス因子が魚体に及ぼす影響を血中グルコース及びコルチゾル濃度の経時的な変化から調べた。その結果、ストレス応答の第一段階で分泌される血中コルチゾル濃度の変動は、非常に重要な指標であることがわかり、コルチゾル濃度を迅速かつ高感度で測定できるシステムの開発が必須であることが明らかとなった。そこで本章では、序論で述べた非標識イムノセンサに着目した。このセンサは、デバイス上に固定化された抗体が目的抗原と結合することで生じる物理化学的变化から抗原の定量を行う原理に基づいているため、未反応物質を洗浄するなどの煩雑な操作が不要であり、迅速かつ簡便な測定が期待できる。しかし、非標識法イムノセンサは、抗原抗体反応の際のデバイス表面における単分子層レベルで発生する微小な変化を捉えているため、標識法に比べると測定感度は低いと予想される。したがって高感度な測定を行うためには、固定化する抗体の特異的結合力が保持された状態であることが理想的であり、抗体の固定化方法には、その配向性や密度を考慮した手法を検討しなければならない。

一方、近年になって、抗体をデバイス表面に固定化する方法の一つとして自己組織化単分子膜（SAM）法が注目されている。SAMとは、有機分子が固体表面に自発的に集合して形成される高密度・高配向な有機薄膜である。Fig. 2-1-1に示すように、各種基板材料と反応性有機分子の組み合わせを検討し、これを有機分子の溶液あるいは蒸気中に置いておくと、有機分子が基板表面に化学吸着する。この化学吸着過程において、有機分子同士の相互作用によって吸着分子が密に集合し、分子の配向性のそろった有機単分子膜が基板表面上に形成さ

れる。ここで、基板が分子によって被覆され、基板表面の反応サイトがなくなると、それ以上吸着反応が起こらないため、単分子膜ができたところで膜の成長が停止する。これにより、基盤表面に SAM を均一に固定化することができる。また、SAM 法に使用する有機分子の結合部としては、チオール基 (-SH)、シラン基 (-Si₃X)、カルボキシル基 (-COOH) が代表的な物質として知られているが、中でもチオール分子 (R-SH) は金 (Au) に対して配位結合 (Au-S 結合) し、チオール基の S に属していた電子が、Au の軌道に入り、電子が共有されることにより安定化する。構築されたチオールの単分子膜では、隣り合うチオール分子のアルキル鎖間においてファンデルワールス力が働くため、高密度かつ高配向な単分子膜を形成することができる。さらに、末端にカルボキシル基、アミノ基などの機能性官能基を有するチオールを利用することにより、抗体を共有結合によって固定化することができる。バイオセンサ分野においては、金とチオール基の反応を用いた SAM 形成の研究が今日まで多数報告されている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。非標識法においては、上述したように抗原抗体反応する際のデバイス表面上の物理化学的性質の微小な変化を検出する必要があるため、高感度測定を実現するには固定化する抗体の密度及び配向性を高く保つことが理想である。そのため SAM 法は、その配向性を高めたまま高密度の状態ですべて単分子膜を容易に構築できると考えられる。

一方、デバイス表面における単分子層レベルで発生する微小な変化を電気化学的に測定するために、本章ではサイクリックボルタンメトリー (Cyclic Voltammetry: CV) に着目した。CV 法は電気化学の分野において最も基本的な電気化学的解析法であり、これまで多くのイムノセンサの開発に利用されてきた⁵⁰⁾。CV 法では、Fig.2-1-2 に示すような酸化還元溶液中に作用電極、参照電極及び対極を電解質溶液に浸漬させた測定用セルを準備する。作用電極には参照電極 (水素電極や銀塩化銀など) を基準とした印加電位を一定電位範囲内

で繰り返すこと (Fig. 2-1-3) により, Fig. 2-1-4 のような CV 曲線が得られる. 図中の「Red」は還元体を, 「Ox」は酸化体を示している. まず, Fig. 2-1-3 に示したように印加電位を正方向に掃引すると, 電極近傍では還元体から電子が奪われて酸化体が生成し, 酸化電流が流れる. そして, 電極界面での電子移動により活物質が消費されることによる界面濃度の変化と界面への拡散による物質供給速度が釣り合った時に酸化電流値は最大となり, 酸化ピーク電流が観察される. この酸化ピークに出現する電位は, 使用する酸化還元体と電極の材質, 電極表面の吸着状態などにより異なった値を示す. そこで, 電極表面に抗-コルチゾル抗体を固定化することにより, 抗原となるコルチゾルとの間に形成される抗原抗体複合体に起因する電子移動の変化を CV で解析することによりコルチゾルが定量できると考えた. また, より安定した計測を実現するために, 高い電気伝導性を有する金属型の単層カーボンナノチューブ (Single-wall Carbon Nanotubes : SWCNT) をセンサの部材として使用することを考えた.

本章では迅速・簡便なコルチゾル測定法の確立を目的に, 新しい非標識イムノバイオセンサの構築を目指す. まず, 金電極, SAM, 抗-コルチゾル抗体, SWCNT を用いてイムノセンサを試作し, これに CV を組み合わせることにより, コルチゾル測定用バイオセンサシステムを製作する. 次に, 製作したセンサの最適使用条及びその特異性について検討した後, 試験魚にストレスを負荷し, その血漿試料のコルチゾル濃度の測定を試みる.

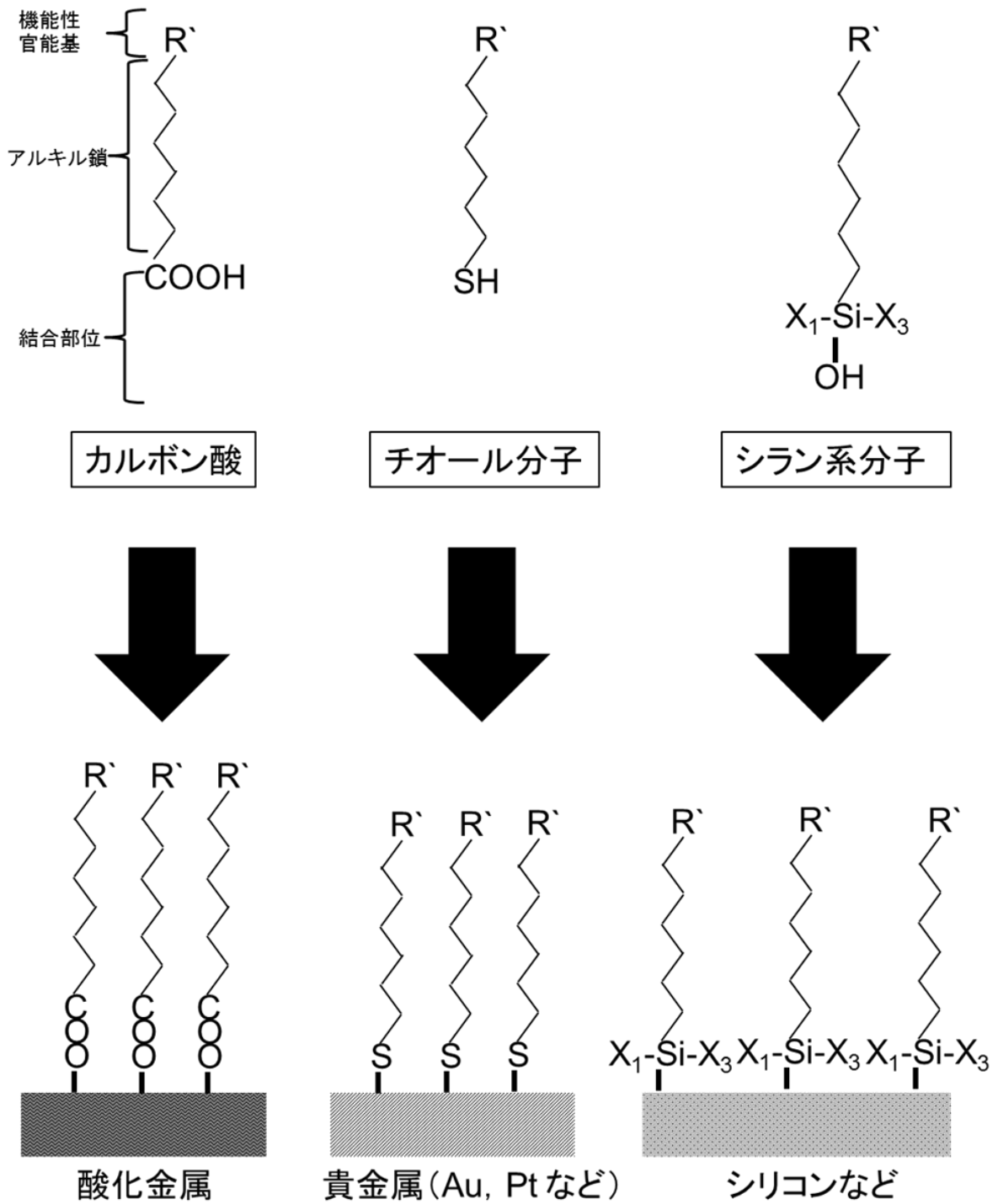


Fig. 2-1-1 自己組織化単分子膜 (SAM) 法

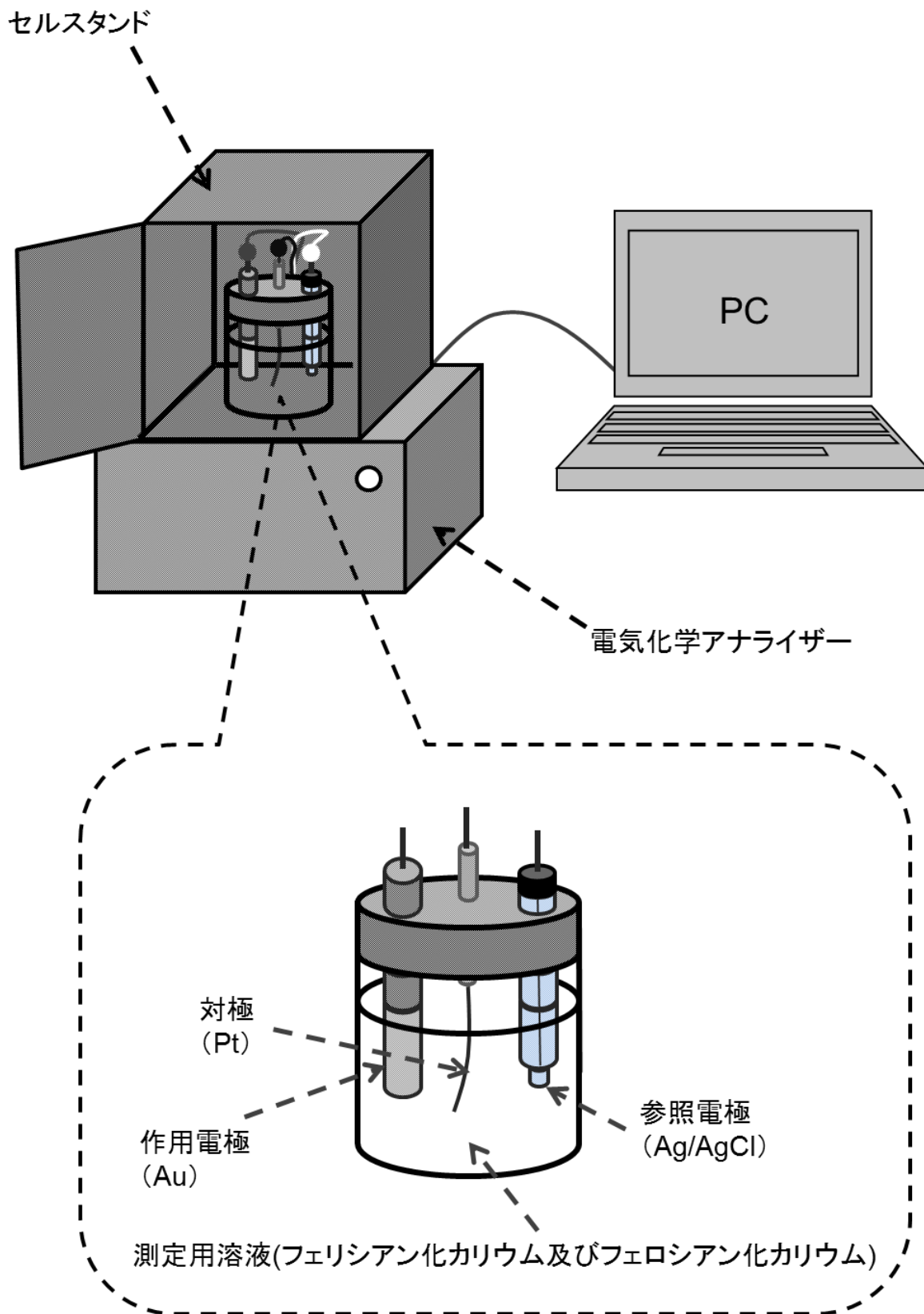


Fig. 2-1-2 サイクリックボルタンメトリーシステム

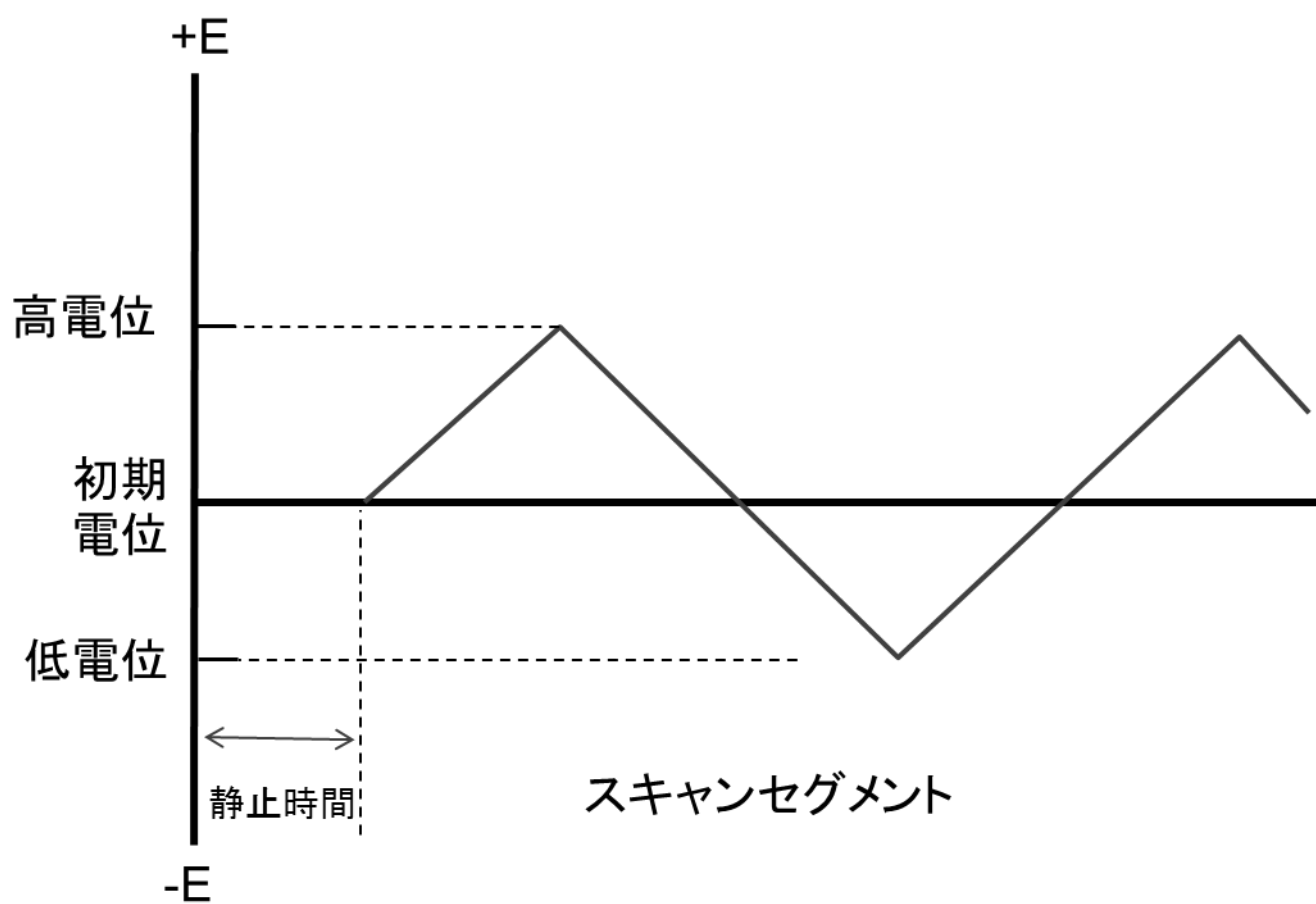


Fig. 2-1-3 CV法の掃引方法

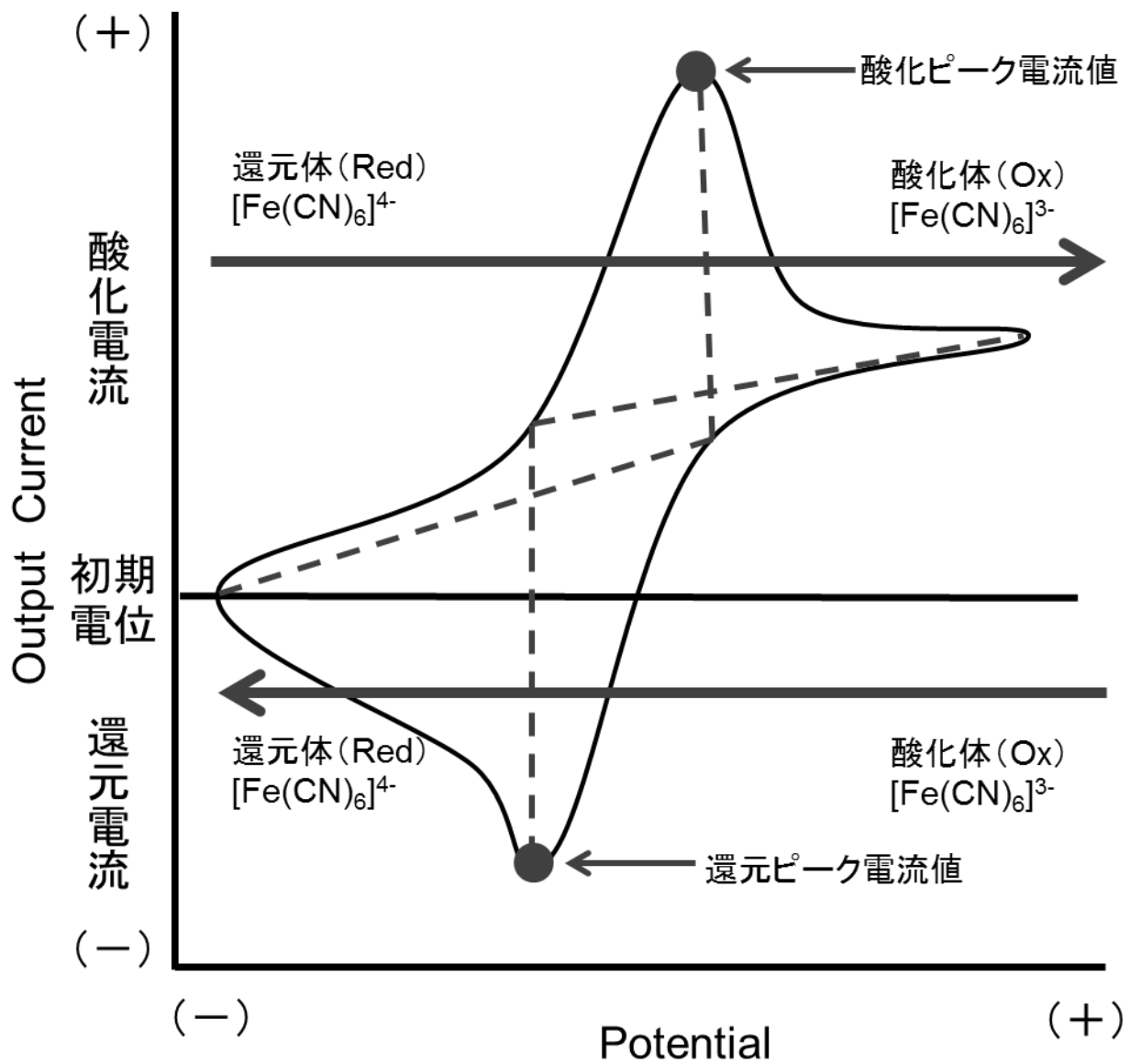


Fig. 2-1-4 CV曲線の一例

2.2 実験方法

2.2.1 試薬

3-メルカプトプロピオン酸 (3-Mercaptopropionic acid : MPA), N-ヒドロキシコハク酸イミド (N-Hydroxysuccinimide: NHS), アジ化ナトリウム (NaN_3), エチレンジアミン四酢酸 (Ethylene diamine tetra acetic ACID tetra sodium slat hydrate, Sigma Ultra: tetra sodium EDTA) 及びウシ血清アルブミン (Albumin, bovine serum, Fraction V, Approx. 99%: BSA) は Sigma 社製 (ミズーリ州, U.S.A.) を使用した. コルチゾル (Cortisol EIA Standard: 400 ng ml^{-1}), 卵成熟誘起ステロイド (サケ科由来) [Maturation-Inducing Steroid (salmonid) EIA Standard: DHP], 黄体ホルモン (Progesterone EIA Standard), エストリオール (Estriol EIA Standard), テストステロン (Testosterone EIA Standard), エストラジオール (Estradiol EIA Standard), コルチゾルモノクローナル抗体 (Cortisol EIA Monoclonal Antibody : 抗-Cortisol 抗体), コルチゾルアセチルコリンエステラーゼ標識抗原 (Cortisol AChE Tracer : AChE 標識抗原) 及び酵素免疫測定法 (ELISA) 用発色試薬 (Ellman's Reagent) は Cayman chemical 社製 (ミシガン州, U.S.A.) を使用した. フェリシアン化カリウム ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), LC-MS 用超純水 (H_2O), 2-フェノキシエタノール (2-Phenoxyethanol) 及び塩化カリウムは和光純薬工業社製 (大阪, 日本) を使用した. リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4), リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4), 水酸化カリウム (KOH), 水酸化ナトリウム (NaOH) 及び硫酸 (H_2SO_4) は国産化学社製 (東京, 日本) を使用した. 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride : EDC] 及び MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid,

monohydrate) は同仁化学研究所製 (熊本, 日本) を使用した. Tween-20 は関東化学社製 (東京, 日本) を使用した. 無水エタノールは日興製薬株式会社製を使用した. 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は信州大学カーボン科学研究所の八名純三氏より分譲されたものを使用した. その他の試薬は, 全て特級試薬を用いた.

2.2.2 試薬の調製

2.2.2.1 リン酸緩衝液 (PB) の調製

リン酸水素二カリウム 26.6 g とリン酸二水素カリウム 6.43 g を秤量し, それぞれ 200 ml メスフラスコに超純水を用いて定容した. pH メーターを用いて pH を測定し, 1.0 M の PB (pH 7.4, pH 7.0) を調製した.

2.2.2.2 MES 緩衝液の調製

MES 2.13 g と水酸化ナトリウム 0.4 g を秤量し, それぞれを 100 ml メスフラスコに超純水で定容した. pH メーター (F-52, HORIBA) を用いて MES 溶液の pH を測定しながら, 水酸化ナトリウムを滴下し, 最終的に 0.1 M MES 緩衝液 (pH 5.5) を調製した.

2.2.2.3 ELISA 用緩衝液の調製 (pH 7.4)

1.0 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 10.0 ml にアジ化ナトリウム 10.0 mg, 塩化カリウム 2.3 g, tetrasodium EDTA 37.0 mg 及び BSA 100 mg を超純水で溶解さ

せた後，100 ml メスフラスコに超純水で定容した．

2.2.2.4 ELISA 用洗浄液の調製

1.0 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 2.0 ml に Tween-20 100 μ l を加え，200 ml メスフラスコに超純水で定容した．なお，Tween-20 の分注作業では Gilson 社製の粘性液体用ピペット (Microman[®] M250, WI, U.S.A.) を使用した．

2.2.2.5 単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の還流

SWCNT を 20 mg 秤量してビーカーに入れ，60 ml の混酸 (硫酸 : 硝酸 = 3 : 1) と混合した．そのビーカーを超音波洗浄機 (Shape UT-205, 東京, 日本) 内に入れ，ドラフト内において超音波分散を 6 時間行った．なお，超音波分散の際に出た熱を抑えるため，ビーカーの周りには氷を入れた．その後，蒸留水で約 20 倍に希釈し，pH が中性になってからポリカーボネートメンブレン (TYPE HHTP 0.4 μ m, Merck Millipore 社製, マサチューセッツ州, U.S.A.) で濾過を行った．その後，ポリカーボネートメンブレンから SWCNT を取り出し，デシケーター中で乾燥させた．

2.2.2.6 MPA 溶液の調製 (10 mM)

MPA(比重 : 1.22 g ml⁻¹) 8.7 μ l を無水エタノールで 10 ml に定容し，10 mM の MPA 溶液を調製した．

2.2.2.7 希硫酸溶液の調製 (0.5 M)

95%硫酸溶液 (比重: 1.84 g ml^{-1}) 2.81 ml を 100 ml メスフラスコに蒸留水で定容し, 0.5 M の希硫酸溶液を調製した.

2.2.2.8 水酸化カリウム溶液の調製 (0.1 M)

水酸化カリウム 561 mg を 100 ml メスフラスコに蒸留水で定容し, 0.1 M の水酸化カリウム溶液を調製した.

2.2.2.9 5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液の調製

フェリシアン化カリウム 164.6 mg 及び塩化カリウム 746 mg を 100 ml メスフラスコに超純水で定容し, 5 mM のフェリシアン化カリウム溶液を調製した.

2.2.2.10 AChE 標識抗原の調製

-20°C で保管しておいた AChE 標識抗原に ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分に攪拌した後, 使用するまで 4°C で保管した.

2.2.2.11 抗-Cort 抗体の調製

-20°C で保管しておいた抗-Cort 抗体に ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分に攪拌した後, 使用するまで 4°C で保管した.

2.2.2.12 コルチゾル標準試料の調製

マイクロテストチューブ（1.5 ml）に 99.8 %エタノールを分注し，ピペッティングを十分に行った．このピペットを用いて， -20°C で保管しておいた 400 ng ml^{-1} の コルチゾル標準試料 $100\text{ }\mu\text{l}$ を取り出し，超純水 $900\text{ }\mu\text{l}$ を加えて 40 ng ml^{-1} に希釈した．さらに，コルチゾル標準試料（ 40 ng ml^{-1} ） $250\text{ }\mu\text{l}$ をマイクロテストチューブに取り，超純水 $750\text{ }\mu\text{l}$ を加えて 10000 pg ml^{-1} になるように希釈した．次に，コルチゾル標準試料（ 10000 pg ml^{-1} ） $500\text{ }\mu\text{l}$ をマイクロテストチューブに取り，超純水 $500\text{ }\mu\text{l}$ を加えて 5000 pg ml^{-1} に希釈した．同様の操作を繰り返して，最終的に $156\sim 10000\text{ pg ml}^{-1}$ の コルチゾル標準試料を調製した．

2.2.3 試験魚及び実試料の調製

2.2.3.1 試験魚

試験魚の飼育は 1.2.3.1 と同様に行った．

2.2.3.2 試験魚に対するストレス因子の負荷

血中コルチゾルの濃度は魚のストレスにより変化するため，本章ではストレス因子を試験魚に負荷し，試験魚の血中コルチゾル濃度を測定した．ストレス因子として，網を用いて試験魚を飼育水槽からすくい上げて，空気中で一定時間（10 分間）暴露する手法を用いた．なお，コントロールとしてストレス因子を負荷していない個体も採用した．

2.2.3.3 血漿試料の採取

血漿試料の採取は 1.2.3.2 と同様に行った。

2.2.4 非標識イムノセンサの作製

2.2.4.1 電極の前処理

まず、 $\phi 6.0$ mm のディスク型金電極 (BAS 社製, 東京) を 0.1 M 水酸化カリウム溶液中で 50 回掃引 (掃引範囲: $-1.2 \sim -0.2$ V, 掃引速度: 0.1 V s⁻¹) を繰り返すことで, 電極表面からのチオール基の脱離を行った。次に, 電極の表面を, $\phi 1.0$ μ m のダイヤモンドペースト及び $\phi 0.05$ μ m のアルミナ溶液 (BAS 社製, 東京) を用いて研磨し, 無水エタノール及び蒸留水中で 5 分間, 超音波洗浄した。さらに, 0.5 M 希硫酸溶液中で 50 回掃引 (掃引範囲: $-0.2 \sim +1.5$ V) を繰り返すことで, 電極表面での酸素発生及び酸化被膜の形成の繰り返しによる電気化学的洗浄を行った。

2.2.4.2 抗-Cortisol 抗体及び SWCNT の固定化

電極の作製手順を Fig. 2-2-1 に示す。洗浄済の金電極を 10 mM MPA 溶液に 8 時間 (室温) 浸漬し, 電極表面へ MPA の自己組織化単分子膜 (SAM) を形成させた。次に, 上記の電極を 0.25 ml の EDC 溶液 (200 mg ml⁻¹, MES に溶解) に 15 分間浸漬させた。その後, 上記の EDC 溶液に 0.25 ml の NHS 溶液 (200 mg ml⁻¹, MES に溶解) を混合し, その中に電極を 105 分間浸漬させる (合計 120

分間) ことにより, MPA 末端のカルボキシル基を高活性エステル基に置換した. 置換後, PB で調製した抗-Cortisol 抗体溶液(タンパク濃度: 0.06~0.07 mg ml⁻¹) に浸漬し, 4°Cで一晩静置した. その後, 電極を 1%の BSA 溶液中に 2 時間浸漬し, ブロッキングを行った. 最後に, 還流作業 (2.2.2.5) を行った SWCNT を Nafion®に 25 mg ml⁻¹分散させた. そこに電極の作用極を 1 分間浸漬させ, 室温で 10 分間乾燥させた. 以上の操作より, 非標識イムノセンサを作製した.

2.2.5 サイクリックボルタンメトリー (CV) を用いて測定

2.2.5.1 測定システム

測定システムは非標識イムノセンサ, 高感度デュアル電気化学アナライザー (802 ALS, BAS 社製, 東京, 日本), セルスタンド (CS-3, BAS 社製, 東京, 日本) 及び測定用パーソナルコンピューター (PC) によって構成された.

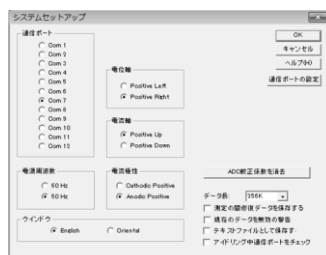
2.2.5.2 システムのセットアップ

PC と電気化学アナライザーの初期作動を確認するため, 以下の操作を行った. 測定用ソフトウェアは BAS 社製の ALS/CHI 802B を用いた. まず, ツールバー (①) のセットアップメニューからシステムのコマンドを選択した. システムセットアップ画面 (②) 中の通信ポットの番号が PC のデバイスマネージャー中に示すデバイス番号と一致したところで, 電位軸を「Positive Right」, 電流軸を「Positive Up」, 電流極性を「Anodic Positive」に設定した. 次に, ツールバーのセットアップメニューからハードウェアテストのコマンドを選択した. “Link Failed”というメッセージが表示された場合は, 各種ケーブルの接

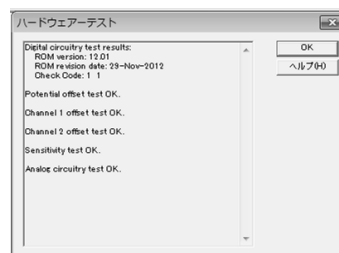
続やポートの設定を再確認した。ハードウェアテスト (③) における「Potential offset test」, 「Channel 1 offset test」, 「Sensitivity test」, 「Analog circuitry test」の全ての結果が“OK”と表示されるまでこの操作を行った。



①メイン画面上部のツールバー



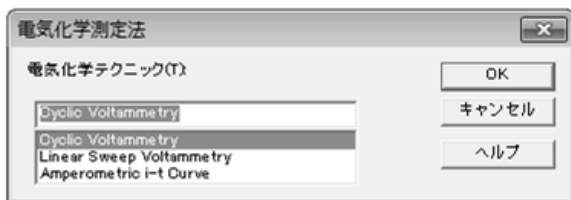
② システムセットアップの画面



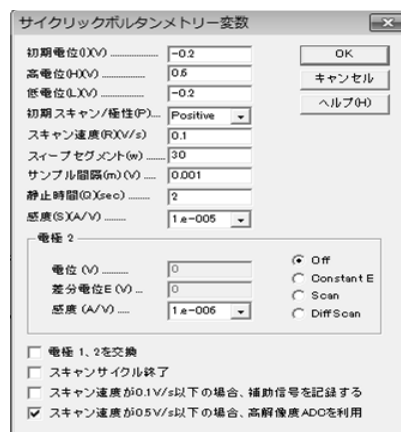
③ ハードウェアテストの結果

2.2.5.3 測定プロトコルの設定

測定テクニックのメニューから“Cyclic Voltammetry”を選択した (④)。次に、測定プロトコルとして初期電位を -0.2 V, 掃引範囲を -0.2 V ~ 0.6 V (高電位を 0.6 V, 低電位を -0.2 V), 掃引方向を Positive, 掃引速度を 0.1 V s^{-1} , 掃引回数を 30 回及び測定感度を $1.0 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1}$ に設定した (⑤)。



④ 測定テクニックの選択



⑤ 測定プロトコルの設定

2.2.5.4 測定

窒素ガスで脱気した 5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液 15 ml 中に、抗原抗体反応前あるいは抗原抗体反応済の非標識イムノセンサ（作用電極）、5.0 cm の白金線（対極，φ6.0 mm），銀塩化銀[Ag/AgCl]電極（参照電極，BAS 社製，東京）を浸漬し，電気化学アナライザーを各ケーブルと接続した．その後，微小ノイズを軽減するため測定セルをセルスタンドに収納し，スタートコマンドを選択して測定を開始した．

2.2.6 センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響

2.2.6.1 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応温度の影響

作製した非標識イムノセンサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後，10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C の恒温槽内でコルチゾル標準試料（156 pg ml⁻¹，pH 7.0）0.5 ml 中に浸漬させ，抗原抗体反応時間を 10 分間に設定した．その後，5.0 mM

フェリシアン化カリウム及び溶液で CV 測定を行った。

2.2.6.2 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響

まず、pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を用いて 156 pg ml⁻¹ のコルチゾル標準試料を調製した。次に作製したセンサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後、30℃の恒温槽で各 pH のコルチゾル標準試料 0.5 ml 中に浸漬させ、抗原抗体反応時間を 10 分間に設定した。その後、5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液で CV 測定を行った。

2.2.6.3 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

センサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後、30℃の恒温槽内でコルチゾル標準試料（156 pg ml⁻¹, pH 7.0）0.5 ml 中に浸漬させ、抗原抗体反応を 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 分間に設定した。その後、5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液中で CV 測定を行った。

2.2.7 コルチゾル標準試料を用いた測定

センサの検出部を窒素ガスにより乾燥させた後、30℃の恒温槽内で調製した (2.2.2.13) 各種濃度のコルチゾル標準試料 0.5 ml 中に 10 分間浸漬させ、センサ上で抗原抗体反応を行った。その後、5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液中で CV 測定を行った。

2.2.8 センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響

卵成熟誘起ステロイド (DHP), 黄体ホルモン(Progesterone), エストラジオール (Estradiol), エストリオール(Estriol)及びテストステロン(Testosterone)の各種ステロイドホルモンを pH 7.0 リン酸緩衝液を用いて 156 ~10000 pg ml⁻¹に調製した. センサの検出部を窒素ガスにより乾燥させた後, 30°Cの恒温槽内で調製した各種ステロイドホルモン溶液 0.5 ml 中に 10 分間浸漬させ, センサ上で抗原抗体反応を行った. その後, 5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液中で CV 測定を行った.

2.2.9 イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定

2.2.9.1 センサを用いた測定

空気中に暴露 (暴露時間: 10 分間) してストレス因子を与えた試験魚と, ストレス因子を負荷していない試験魚から採血を行い, 遠心分離により血漿化した (1.1.3.2 と同様). その血漿試料を pH 7.0 のリン酸緩衝液を用いて 100 倍希釈した. 次に, センサを血漿試料 0.5 ml 中に浸漬し, センサ上で抗原抗体反応を行った. その後, 5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液中で CV 測定を行った.

2.2.9.2 従来法(ELISA)を用いた測定

ELISA を用いた実試料の測定は 1.2.5.6 と同様の方法で行った.

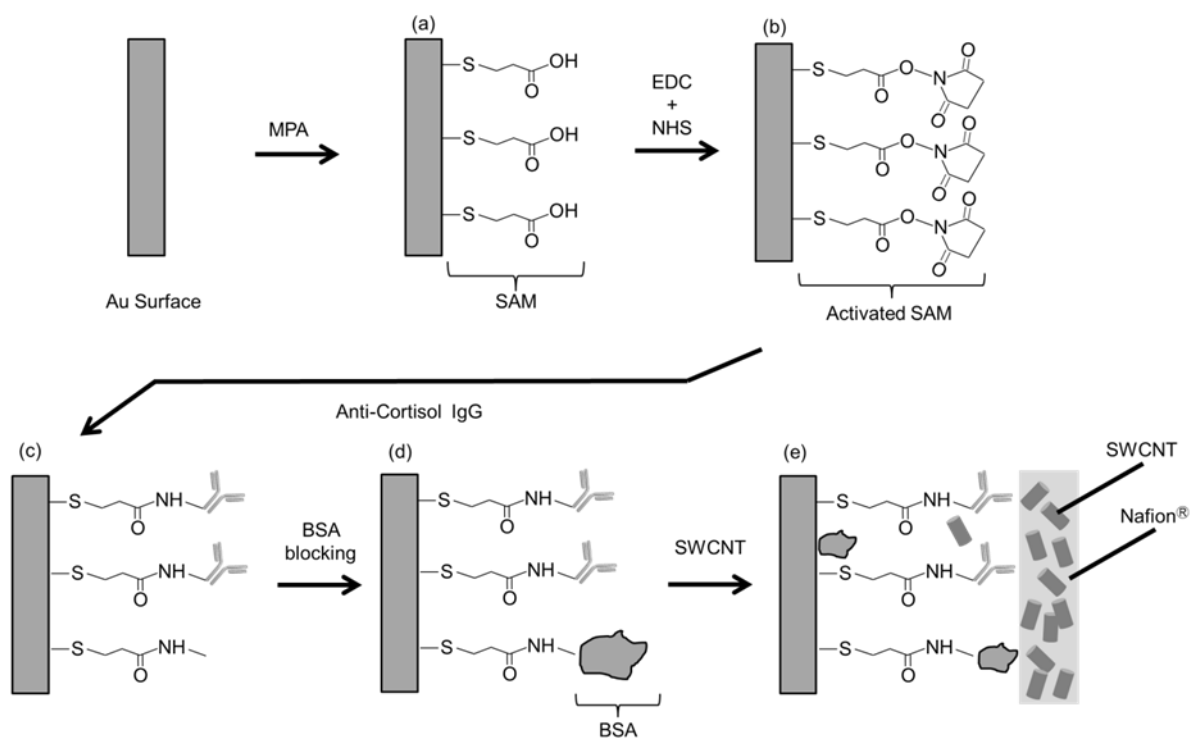


Fig. 2-2-1 非標識イムノセンサの作製手順

2.3 結果及び考察

2.3.1 非標識イムノセンサの電気化学的評価と応答性

2.2.4.3 で述べたように, SWCNT を利用した非標識イムノセンサの作製では, まず裸電極, MPA を用いた電極表面での SAM の形成, EDC-NHS 反応による抗体の固定化, 及び SWCNT の固定化の 3 段階の物理化学的な修飾を行った. 電極上に修飾された MPA, 抗-Cortisol 抗体は, いずれも電気的に不活性な性質を示すが, SWCNT の種類によっては電極の導電率に大きな影響を与えるという報告がある^{51,52)}. したがって最初に, CV 測定を用いて, 各段階修飾における電極の状態を電気化学的に解析し, 各分子層の電極上への修飾の有無を確認した. Fig.2-3-1 (A) に CV 測定の結果を示す. 鏡面状に処理した裸電極の CV 曲線 (a) に対して, 抗体を固定化した際の電極の CV 曲線 (b) においては, その酸化ピーク電流値が減少した. これは電気的に不活性物質である MPA や抗体などが電極上に形成することにより, 電極表面と酸化還元基質であるフェリシアン化カリウム溶液との間で電子の移動が阻害されたためであると考えられる. 一方, 抗体を固定化した電極の CV 曲線 (b) に対し, SWCNT を固定化した電極の CV 曲線 (c) においては, その酸化ピーク電流値は大幅に増加した. これは SWCNT を固定化したことにより, 上記 MPA, 抗体などに阻害されていた電極表面とフェリシアン化カリウム溶液中の酸化還元による電子移動の一部が, 導電性の高い SWCNT を通じて行われたため, 電子移動が加速されたためであると考えられる. 以上の結果より, 各作製段階の分子層は電極表面に確実に形成されたと考えられる.

次に, 作製したイムノセンサの応答性を確認するために, 各濃度のコルチゾール標準試料に電極を 10 分間浸漬させた後の CV 測定の結果 (拡大図) を Fig.

2-3-1 (B) に示す. この図より, コルチゾル標準試料に浸漬する前の CV 曲線 (c) とコルチゾル標準試料に浸漬した後の CV 曲線 (d) との間で, 酸化ピーク電流値の減少が認められる. この現象は, 抗-Cortisol 抗体とコルチゾル分子が導電性のない抗原抗体反応複合体を形成したことにより, 電極表面と酸化還元基質間の電子移動が阻害されたため生じたものと考えられる. したがって, 本実験では, 抗原抗体反応前の非標識イムノセンサの酸化ピーク電流値 (c) をブランク値とし, これと抗原抗体反応後の酸化ピーク電流値 (d) との差をセンサの応答値とした.

2.3.2 センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響

本システムの測定原理は, センサを試料溶液に浸漬した際に形成される抗原抗体反応複合体が, 電極表面の電子移動を阻害するため, この時の電流減少値から抗原濃度を測定する原理に基づいている. そのため, より効率的な測定を実現するためには, センサの出力に及ぼす最適な抗原抗体反応条件を設定する必要がある.

一般に, 抗原抗体反応は「質量作用の法則」が成り立ち, 結合の強さ (親和性=アフィニティー=affinity) を結合定数 (association constant) 及び解離定数 (dissociation constant) で表す. これらの定数から抗原と抗体との結合速度 (式 2.3.1) 及び解離速度 (式 2.3.2) が求められる⁵³⁾.

$$\text{複合体の形成速度} = K_1 * [\text{Ab}] * [\text{Ag}] \quad (2.3.1)$$

$$\text{複合体の解離速度} = K_2 * [\text{Ab} - \text{Ag}] \quad (2.3.2)$$

(K1: 結合定数, K2: 解離定数, Ab: 抗原, Ag: 抗体)

多くの抗原抗体反応では、結合速度が解離速度よりも高い状態であるため、抗体と抗原の結合力（親和力）は解離速度によって判断される。解離定数は抗体の種類や反応条件（温度、pH等）によっても大きく異なることが Mason と Williams らによって報告されている⁵⁴⁾。また抗原抗体反応が平衡に達した状態は、以下の式（式 2.3.3）に示すように結合速度と解離速度に依存しており、この平衡状態で測定を行うのが最も適切と考えられる。そこで、本研究では上記反応条件の検討を行い、抗原抗体反応の最適条件（反応温度、反応 pH、反応時間）の検討を行った。

$$K_{eq} = K_1/K_2 = [Ab \cdot Ag] / [Ab] [Ag] \quad (2.3.3)$$

（K1：結合定数，K2：解離定数，Ab：抗原，Ag：抗体）

2.3.2.1 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応温度の影響

センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応温度の影響を検討するため、コルチゾル標準溶液（濃度：4000 pg ml⁻¹）を用い、温度を 10 ～ 45℃の 8 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 2-3-2 に示す。この図より、温度 30℃までは電流減少率の増加が確認されたが、それ以上の温度では減少した。これは、反応温度が 10 ～ 30℃の間において上昇するに伴って、抗原抗体間の分子運動が速くなり、抗原と抗体の遭遇率が上昇するためであると考えられる。一方、反応温度が 30℃を超えた場合には、電極に固定化した抗体が温度上昇の影響で変性したか、あるいは高温により複合体の解離速度が増加して抗体と抗原との親和力が低下したため、センサの出力が減少したと考えられる。したがって本実験では、抗原抗体における最適反応温度を 30℃に設定した。

2.3.2.2 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響

センサの出力電流値に及ぼす pH 影響を検討するため、コルチゾル濃度が 4000 pg ml^{-1} の標準溶液を用い、反応溶液の pH を 5.5 ~ 8.5 までの 7 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 2-3-3 に示す。この図より、pH 7.0 の際に最大の電流減少率を示した。この現象は次の理由から推測できる。抗体のようなタンパク質は、アミノ酸のポリペプチド結合により構成される両性電解質であり、抗-Cortisol 抗体のような IgG の等電点は一般的に pH 5.0 ~ 5.5 の間にある。もし、抗体を自身の等電点より高い値の pH の溶液に浸漬し、抗原と反応させれば、抗原抗体間の電氣的引力（静電力）が強くなるため、抗原抗体複合体が形成しやすくなる。これにより、pH 7.0 までは電流減少値の増加が認められたと考えられる。一方、pH 7.0 以上においては、抗原溶液のイオン強度が増加し、電極に固定化されている抗体の親和力が低下したためと考えられる。したがって本実験では、抗原抗体反応における最適反応 pH を 7.0 に設定した。

2.3.2.3 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響を検討するため、コルチゾル標準溶液（濃度： 156 pg ml^{-1} ）を用いて、反応時間を 8~15 分間の 8 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 2-3-4 に示す。この図から反応時間が 10 分間を超えると電流減少率は一定の値になり、平衡状態に達していることが示唆される。したがって、抗原抗体反応の最適反応時間を 10 分間に定めた。

2.3.3 コルチゾル標準試料の検量線

上記の最適使用条件の下で、コルチゾル標準試料を用いて本センサの検量線を作成した (Fig. 2-3-5)。なお、1 検体の分析所要時間は約 15 分で可能であった。図中、横軸はコルチゾル濃度を、縦軸は電流減少率を示す。この図より、コルチゾル標準試料 $156 \sim 10,000 \text{ pg ml}^{-1}$ の範囲内で良好な直線関係 ($R = 0.965$) が確認された。次にこの結果を基に、シグナルノイズ比 (S/N) から検出限界算出法⁵⁵⁾を用いて、本システムの測定限界値を検討した。本実験では、ブランク値から抗原抗体反応後の酸化ピーク電流値の差である減少値をシグナル (S) とし、以下の式 (式 2.3.4) に示すように、ブランクの平均値からブランクの標準偏差 (σ_b) の 3 倍以上のシグナルを測定限界 (Limited of detection: LOD) と定めた。

$$S_{\text{LOD}} = 3\sigma_b \quad (2.3.4)$$

この式を用いて LOD を算出したところ、 78 pg ml^{-1} であった。しかしながら、より再現性の良い測定を実現するためには、定量下限 (Limit of quantitation: LOQ) を算出する必要がある。LOQ とは、最終的に分析値として信頼できる最低の値を示している。通常 LOQ は LOD より大きな数値であることはいうまでもないが、LOQ の S/N は LOD のそれより良い値 ($S/N > 5\sigma_b$) が望まれている。そこで、本システムの LOQ を算出したところ、 156 pg ml^{-1} であった。

一方、SWCNT を固定化していないセンサの測定範囲はコルチゾル濃度 $6.6 \sim 422.3 \text{ pg ml}^{-1}$ であったのに対し、本章の SWCNT を固定化したセンサの測定範囲は $156 \sim 10000 \text{ pg ml}^{-1}$ となった。この結果から、コルチゾルの測定最大値が 422.3 pg ml^{-1} から 10000 pg ml^{-1} の約 24 倍に向上したことになり、SWCNT 固定化の有効性が認められた。しかし、実際の魚類の血漿中のコルチゾル濃度は、数十から数百 ng ml^{-1} まで変動する^{13,25)}ため、実際の試料測定においては、

血漿試料を 10 倍程度希釈する必要があると考えられる。

2.3.4 センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響

魚類の血漿中には、コルチゾル以外にも多種多様なステロイドホルモンが存在する。特に卵成熟後期に濾泡組織で生成される主要なホルモン（DHP, 黄体ホルモン等）をはじめ、魚類の生殖腺の分化や発生に関わるエストロゲンホルモン（エストラジオール, エストリオール）、コレステロールからエストロゲン合成の前駆体としてのテストステロンなどが挙げられる⁵⁶⁾。これらステロイドホルモンは、生理時期（排卵期等）によって血漿中に分泌され、コルチゾルの構造と類似している。したがって、魚類の血漿中コルチゾルの測定では、センサの出力電流値に及ぼす上記ステロイドホルモンの影響を検討する必要がある。本実験では、DHP, 黄体ホルモン, エストラジオール, エストリオール, テストステロンの標準試料を用いて、センサの出力電流値に及ぼす影響を検討した。結果を Fig. 2-3-6 に示す。この図から、コルチゾルに対しては濃度と共にセンサ出力の増加が認められるが、他種ステロイドホルモンを用いた測定においてセンサの応答は確認されなかった。したがって、本センサは、コルチゾルに対して高い特異性を有し、その定量が可能であることがわかった。

2.3.5 イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定

実試料への適用として、本イムノセンサを用いて魚類（ティラピア）の血中コルチゾル濃度を測定し、従来法（ELISA）の測定結果と比較検討した。結果を Fig.2-3-7 に示す。図中、(●) はストレス因子を負荷した個体の測定結果を示し、(○) は負荷していない個体の測定結果を示す。ストレス因子を負荷して

ない個体の血漿コルチゾル濃度は、本システムを用いた測定結果では 30.05 ~ 46.56 ng ml⁻¹の濃度範囲であった。一般にテラピアのコルチゾル濃度は 10 ng ml⁻¹程度と報告されており¹³⁾、本測定結果は文献値と比較してやや高い値を示した。この原因として、本実験では魚を網で捕獲し、麻酔後採血を行ったため、これらの操作がストレス因子となり、結果に反映された可能性があると考えた。

一方、ストレス因子を負荷した個体(空気暴露：10 分間)の血漿中コルチゾル濃度は、急激な上昇を確認することができた。本システムで測定されたコルチゾルの値は、68.97 ng ml⁻¹ ~ 178.24 ng ml⁻¹の濃度範囲であった。これらの値は、ストレス因子を負荷していない個体の測定結果と比較すると、約 2 ~ 5 倍となった。したがって、本システムを用いてコルチゾルの濃度を測定することにより、魚のストレス状態の把握が可能であることが明らかとなった。

一方、本システムの測定値と ELISA の測定結果を比較したところ、高い相関関係が認められた(相関係数：0.999)が、ELISA に比べセンサで得られた測定値の方がやや高い値を示した。実験方法でも述べたように、本研究では、ELISA の測定結果を算出する際に、試料サンプルの吸光度から NSB ウェルの平均値を差し引くことにより校正操作を行っている。一方、本システムでは、標識試薬を使用せず試料を直接検出しているため、センサの検出部が非特異的吸着等の影響を受けている可能性があり、測定値に若干の差異が生じたものと考えられる。しかしながら、本センサを用いることにより、ELISA に比べて迅速・簡便に魚類の血漿中のコルチゾル濃度の測定が可能となり、新しいコルチゾルの定量法が確立できたと考えられる。

2.4 結言

本章では、魚類血中コルチゾル濃度を迅速かつ簡便な測定法の確立を目的に、電極への抗体固定化に SAM を、導電性の増幅に SWCNT を利用して、新規の非標識イムノセンサを作製した。すなわち、抗原抗体反応によりセンサ表面で生じる電気化学的変化をサイクリックボルタンメトリーで解析することでコルチゾルの検出を試みた。以下に本章の結果を要約する。

- 1) SWCNT を固定化した非標識イムノセンサの電気化学的評価を行ったところ、SWCNT を固定化していないセンサと比較して大幅な酸化ピーク電流値の上昇が認められた。
- 2) SWCNT を固定化したセンサの出力電流値に及ぼす抗原抗体条件の影響を検討したところ、温度：30℃，pH：7.0，時間：10 分間の条件が最適であった。
- 3) 上記最適反応条件下で、コルチゾル標準試料を用いて検量線を作成したところ、156～10000 pg ml⁻¹ の範囲においてセンサの電流減少率との間に直線関係が認められた（相関係数：0.992）。なお、抗原抗体反応を含む 1 検体の分析所要時間は約 15 分で可能であった。
- 4) 魚類の血中に存在する各種ステロイドホルモンを用いてイムノセンサの特異性を検討したところ、本センサはコルチゾル以外のホルモンには応答しないことが確認できた。

5) 本システムを用いて試験魚（ティラピア）の血漿コルチゾル濃度の測定を行い、従来法（ELISA）の測定結果と比較検討したところ、両測定値との間には良い相関性（ $R=0.999$ ）が認められた。

以上の結果から、SWCNT を固定化することによりセンサの感度が向上し、SWCNT を固定化していないセンサと比較して、測定最大値を約 24 倍に向上させることができた。また、試験魚の血漿試料を用いた測定では、SWCNT を利用した非標識イムノセンサを用いることで、従来法のように煩雑な前処理及び洗浄操作を必要とせず、血中コルチゾル濃度を迅速かつ簡便に測定することができた。

しかしながら、本章で開発されたイムノセンサは抗原抗体反応を利用しているので、抗体と抗原が一度結合してしまうと反応が完了してしまうため、測定毎に作用極を交換する操作が必要である。一方、魚類のコルチゾルの測定においては、迅速・簡便性はもちろん、かつ連続的な測定法の確立が望まれている。そこで次章では、コルチゾルを連続測定できるフロー式バイオセンサシステムの試作を試みた。

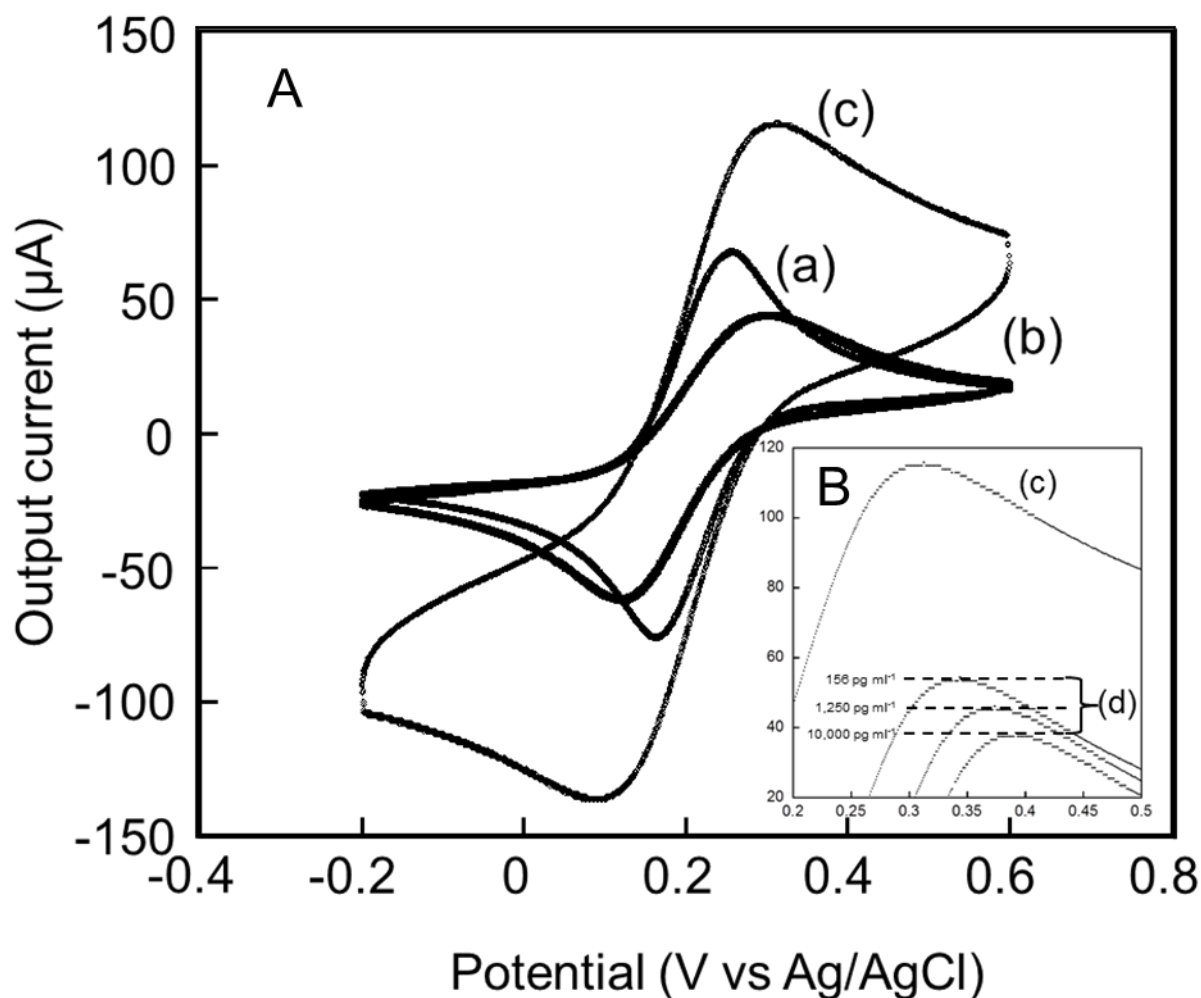


Fig. 2-3-1 非標識イムノセンサの電気化学的評価

(反応温度:30°C ; 掃引範囲:-0.2~0.6 V; 掃引速度:0.1 V sec⁻¹)

A 各作製段階の電極を用いたCV曲線の比較

- (a) Au電極
- (b) BSA/抗体/SAM/Au電極
- (c) SWCNT/BSA/抗体/SAM/Au電極

B 非標識イムノセンサの応答性

- (c) 抗原抗体反応前(SWCNT/BSA/抗体/SAM/Au電極)
- (d) 抗原抗体反応後(SWCNT/BSA/抗体/SAM/Au電極)

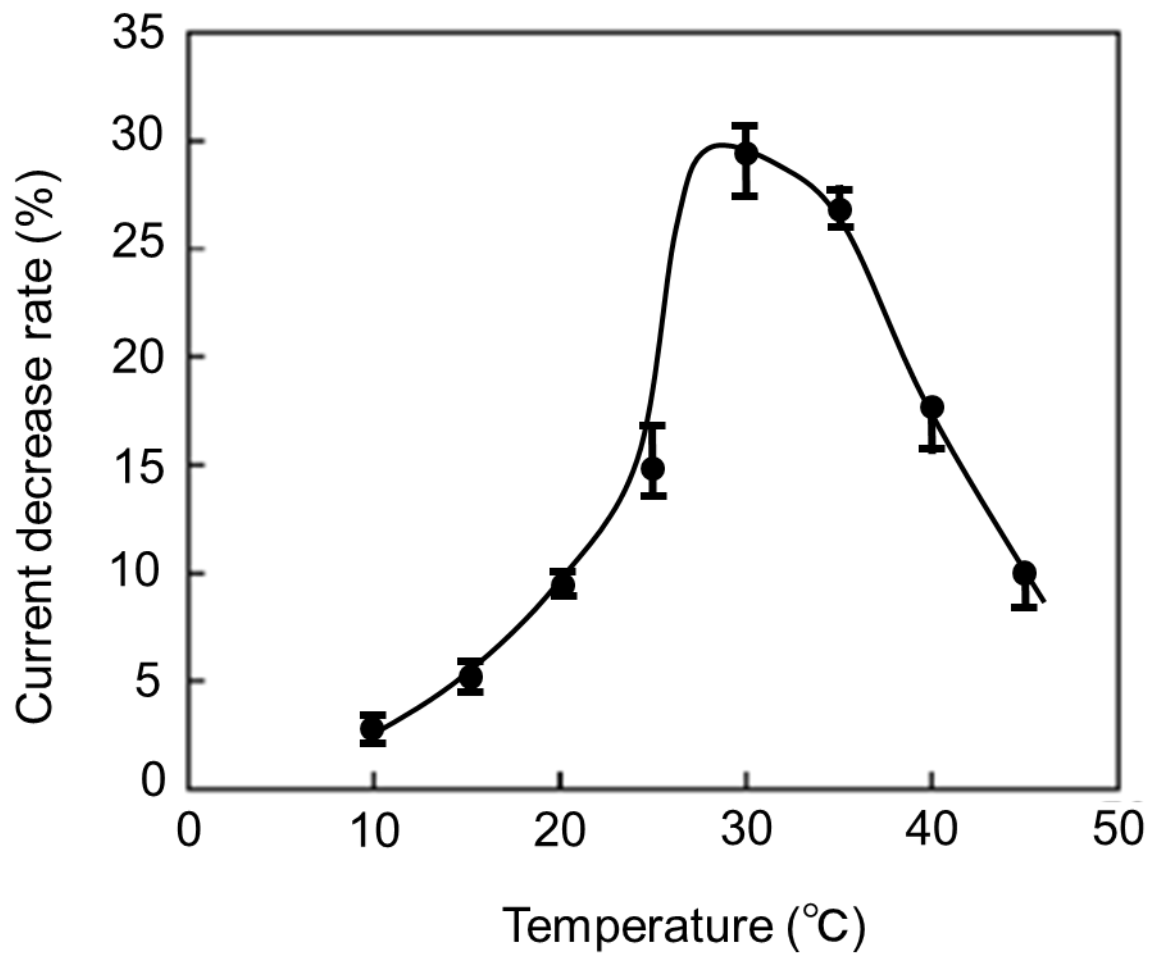


Fig. 2-3-2 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応温度の影響

コルチゾル濃度: 4000 pg ml^{-1} ; 反応時間: 10 min;
pH 7.0; 掃引範囲; $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$; 掃引速度: 0.1 V sec^{-1}

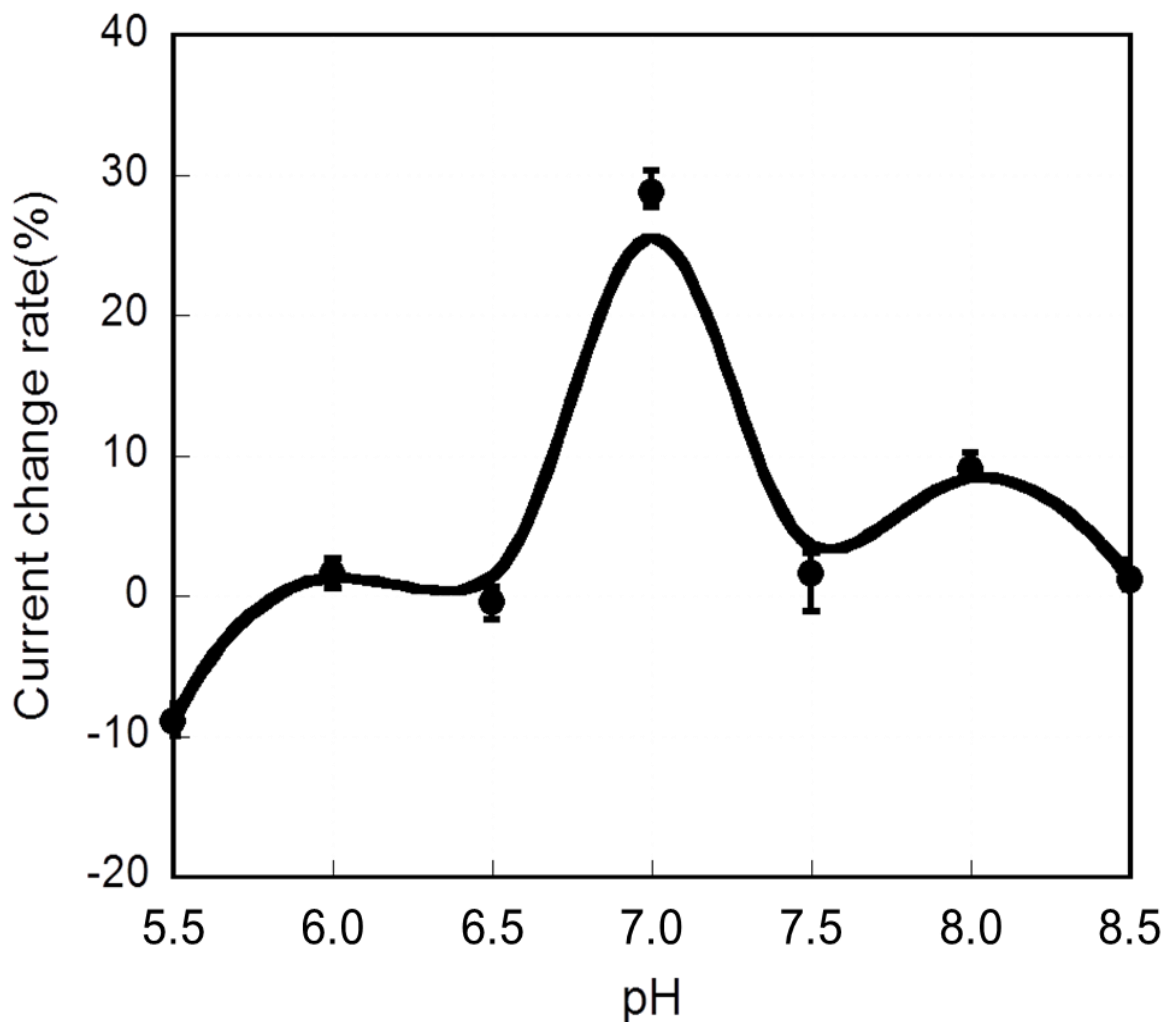


Fig. 2-3-3 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応pHの影響

コルチゾル濃度: 4000 pg ml⁻¹; 反応時間: 10 min;

反応温度: 30°C; 掃引範囲: -0.2~0.6 V;

掃引速度: 0.1 V sec⁻¹

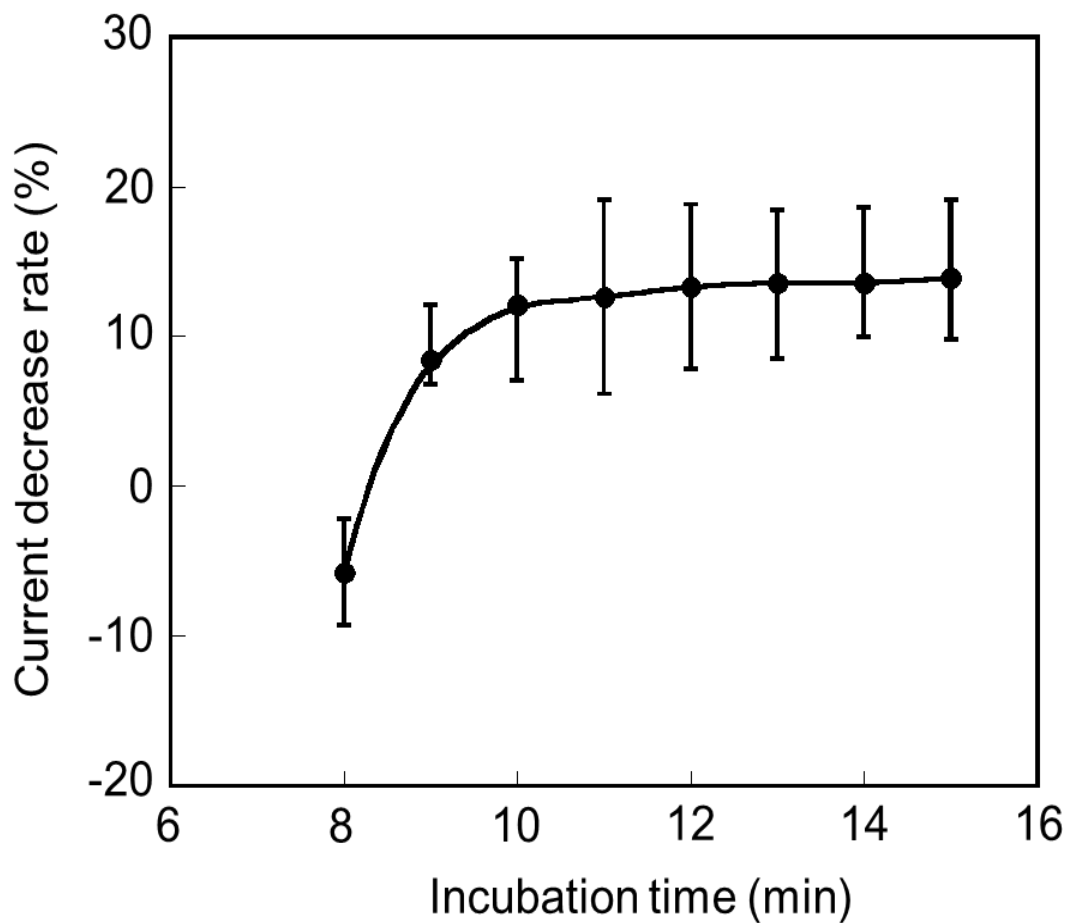


Fig. 2-3-4 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

コルチゾル濃度: 156 pg ml^{-1} ; 反応pH: 7.0;
 反応温度: 30°C ; 掃引範囲: $-0.2 \sim 0.6 \text{ V}$;
 掃引速度: 0.1 V sec^{-1}

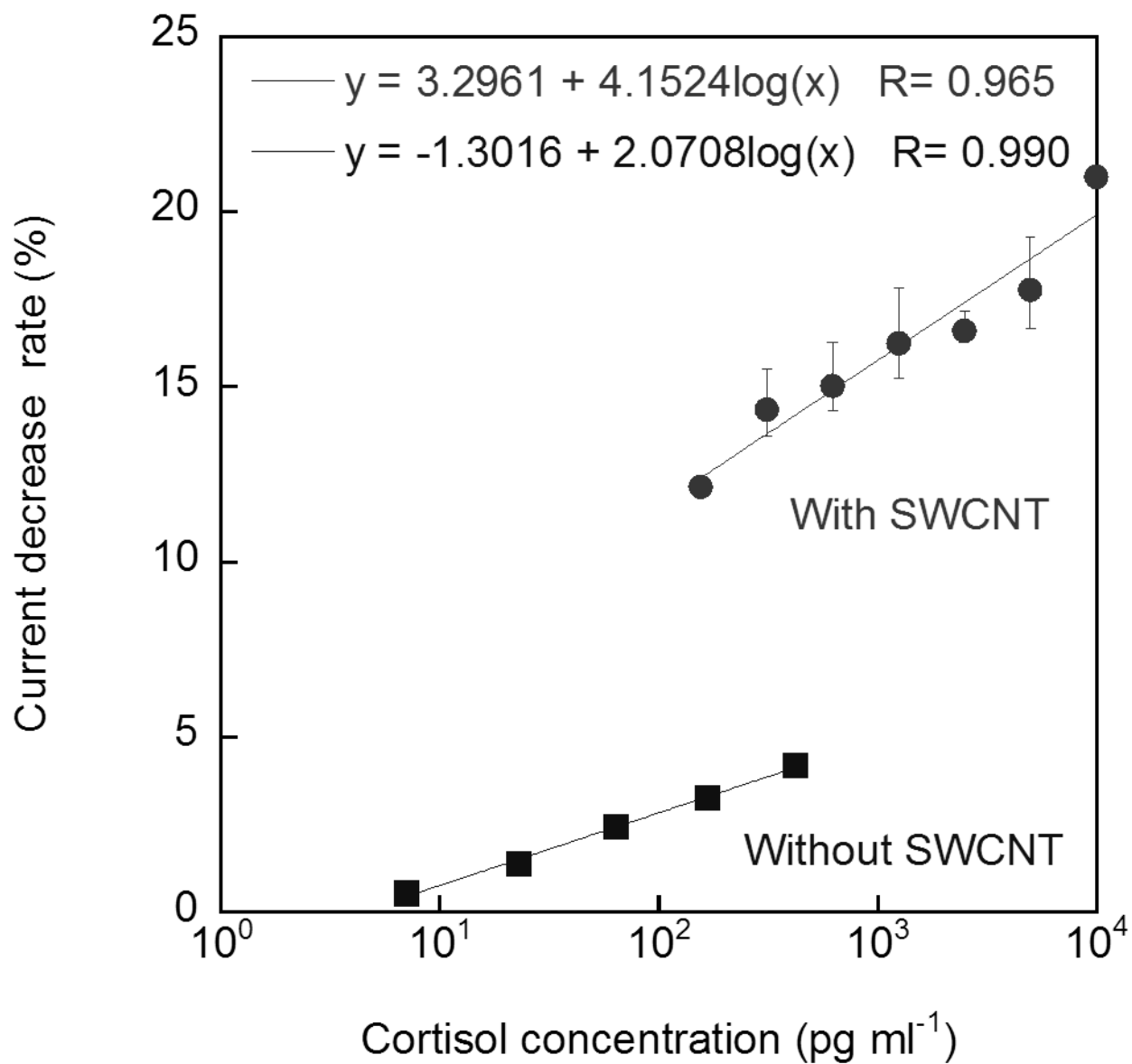


Fig. 2-3-5 コルチゾル濃度と電流減少率の相関

反応温度: 30 °C; 反応pH: 7.0; 反応時間: 10 min;
 掃引範囲: -0.2 ~ 0.6 V; 掃引速度: 0.1 V sec⁻¹

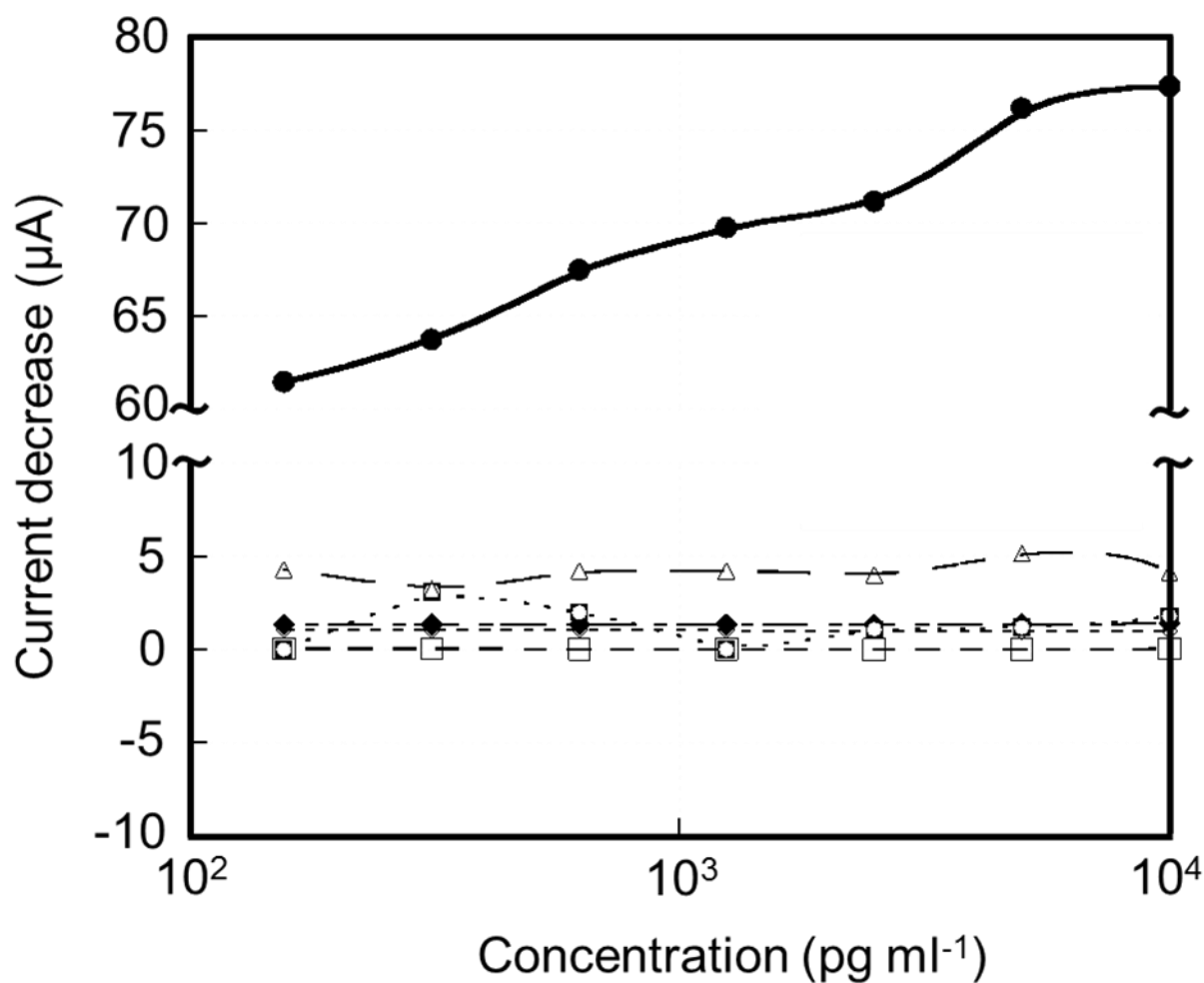


Fig. 2-3-6 非標識イムノセンサの特異性

反応温度: 30 °C; 反応pH: 7.0; 反応時間: 10 min;
 掃引範囲: -0.2 ~ 0.6 V; 掃引速度: 0.1 V sec⁻¹

●: Cortisol; ◆: DHP; □: Progesterone;

◇: Estradiol; ◻: Estriol; △: Testosterone

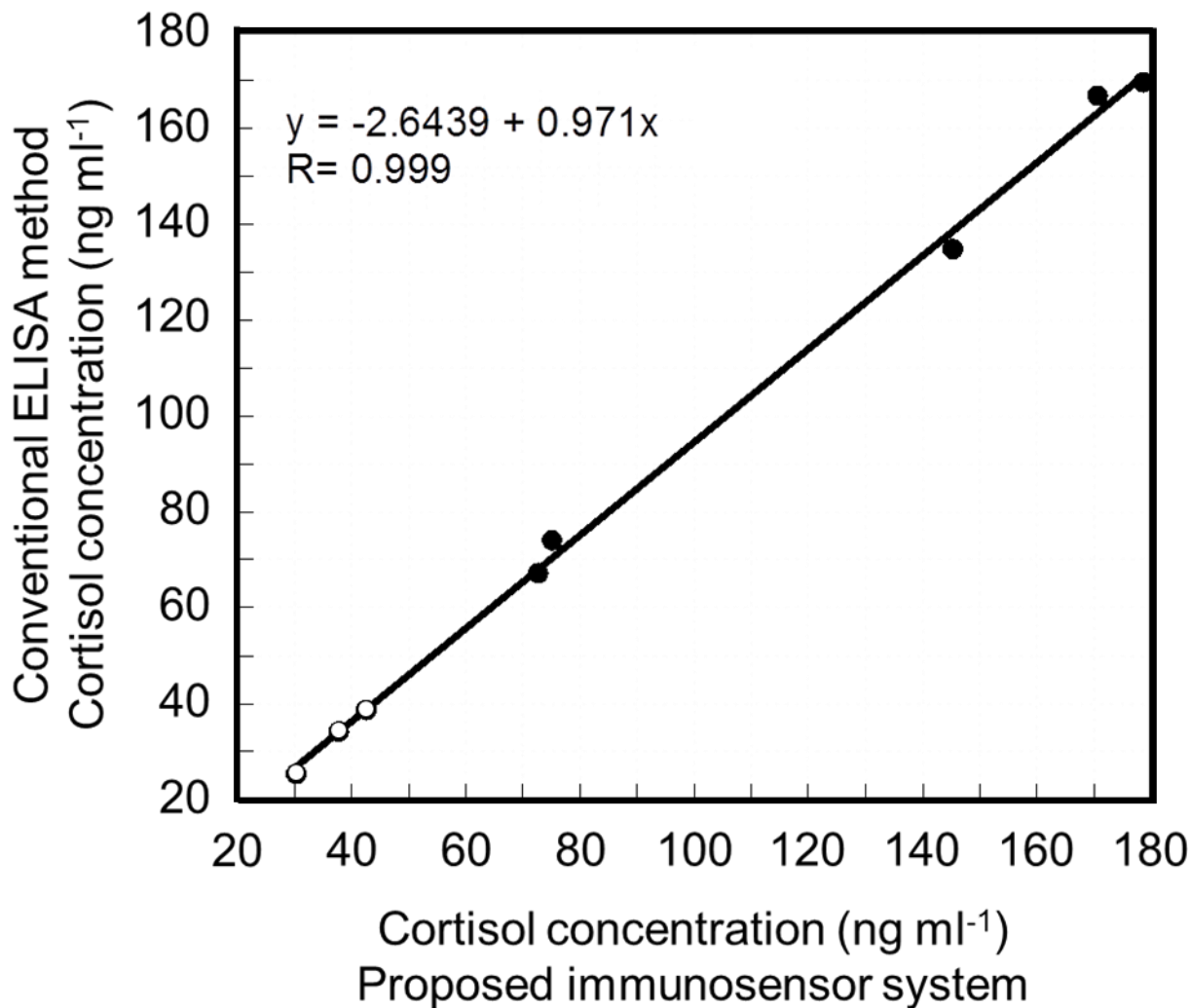


Fig. 2-3-7 本システムと従来法による測定値の相関性

反応温度: 30 °C; 反応pH: 7.0; 反応時間: 10 min;
掃引範囲: -0.2 ~ 0.6 V; 掃引速度: 0.1 V sec⁻¹

- : Unstressed fish (control)
- : Stressed fish (air exposure)

第三章 コルチゾル連続測定用フロー式バイオセンサシステムの開発

3.1 緒言

前章の研究では、魚類血中コルチゾル濃度の迅速かつ簡便な測定法の確立を目的として、電極上に抗体を均一かつ効率的に固定化するために SAM を、電子メディエーターと電極間との効率的な電子移動を実現するために SWCNT を利用して、新規の非標識イムノセンサを作製した。しかしながら、このイムノセンサは抗原抗体反応を利用したため、抗原と抗体が一度反応すると結合してしまい、測定毎にセンサを交換しなければならない問題が残されていた。

そこで本章では、コルチゾル濃度をより迅速に測定するためにフローインジェクション分析法 (Flow injection analysis, FIA) に着目した。FIA は 1975 年に開発された連続分析法である。移送する反応溶液に一定量の試料液を添加して、一定時間経過後にその吸光度、電流などの変化を測定する手法である⁵⁷⁾。一般に FIA は、樹脂製細管 (テフロンチューブなど) の中に分析試料を注入し、試料が細管内を流れている間に試薬と混合し、反応させ、下流に配した検出器で目的物質を検出、定量する原理に基づいている⁵⁷⁾。したがって、送液ポンプ、試料注入器、反応コイル、検出器など主要なパーツを組み合わせることで、目的に合ったシステムを容易に自作することができる。FIA の特徴・利点としては、1) 試料を注入するだけの簡単な操作で質の高い迅速な分析が可能であり、熟練を要さず初心者でも簡単に扱うことができる、2) 高性能な送液ポンプを用いることにより、精密に制御された反応セルを創り出すことが可能となり、分析の高感度化、高精度化を実現することができる等が挙げられる⁵⁷⁾。そのため、FIA はコルチゾル濃度の迅速かつ簡便で連続的な測定を構築する上で最も適した方法と考えられる。

そこで本章では、微小免疫センサ（コルチゾル固定化した微小金電極）を迅速に交換可能なフローチェンジャーシステムの設計・製作を考案した（Fig. 3-1-1）。図に示すように、チェンジャー部は、複数の免疫センサをセンサホルダー内に収納できるようになっており、1回目の測定が終了後、次のセンサを順次移動させることにより次の測定を行うことを可能にしている。また本システムには、抗原抗体反応の電気化学的な検出方法にアンペロメトリー（Amperometry）を採用する。一般に、多くの電気化学的手法では、作用電極、参照電極、および対極の3種の電極を使用し、参照電極を基準に作用電極の電位を制御し、電極上で変化する電流値を測定している⁵⁰⁾。アンペロメトリーは、電極に一定の電位を印加することで、CVに比べて容易に電流値を測定することができる。したがって先行研究の結果より得られた酸化ピークの電位（+250 mV）⁵⁸⁾を、イムノセンサの電極上に定電位として印加することにより、CVよりもはるかに簡便にコルチゾルの測定が実現できると考えた。

本章では、微小免疫センサを迅速に交換可能なイムノセンサを新たに設計・製作し、これをFIAシステムに組み込むことにより、コルチゾル濃度の迅速・簡便な測定法の確立を試みる。次に、イムノセンサシステムの最適反応条件及び測定可能範囲を検討した後、センサの特異性について検討する。また、実試料への適用として、ストレス因子を与えた試験魚の血漿試料のコルチゾル濃度の測定を試みる。

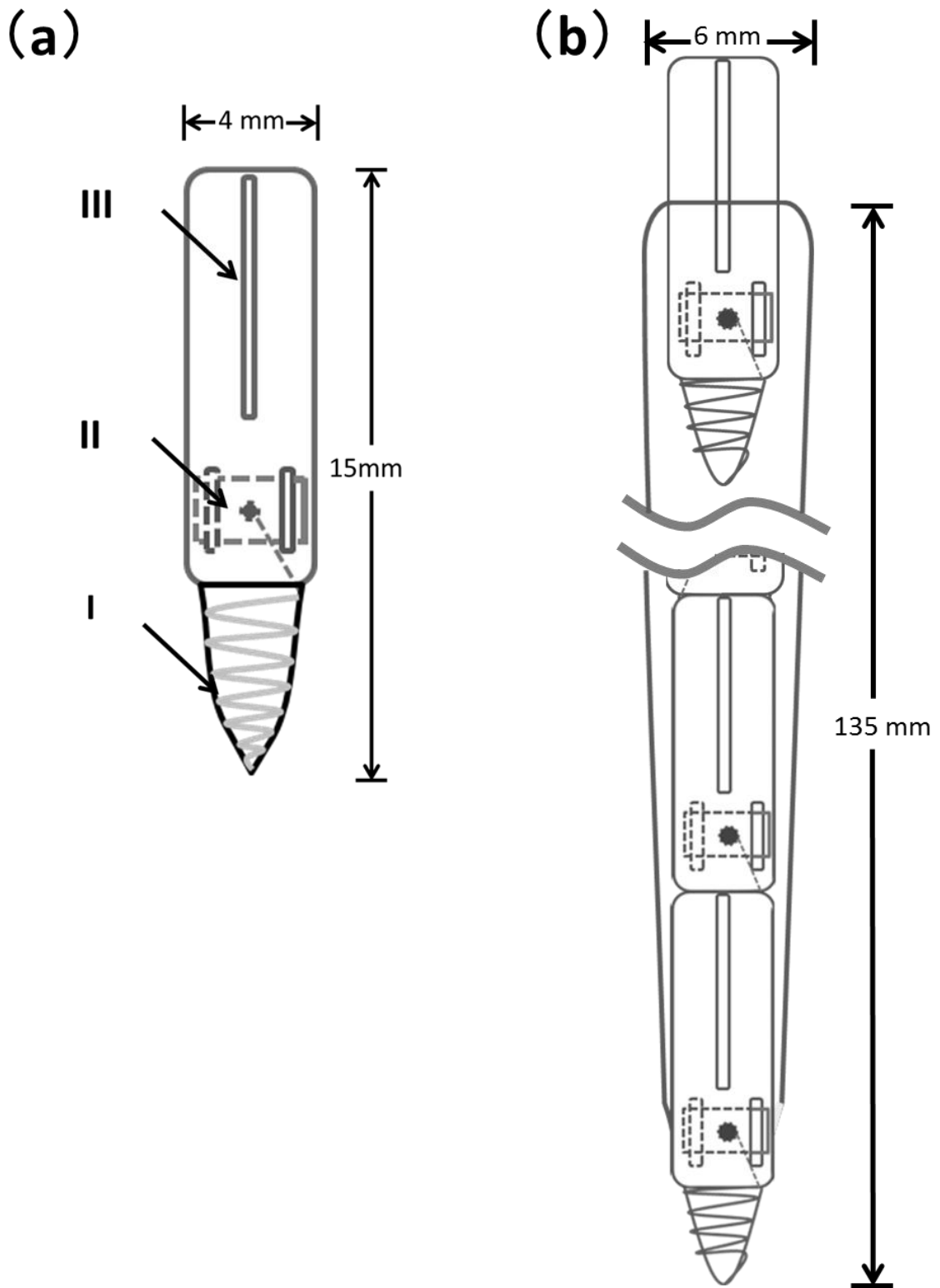


Fig. 3-1-1 センサチェンジャーの概略図

a:イムノセンサ :I 金線 ;II コネクタ;III; 滑り止め

b:センサチェンジャー

3.2 実験方法

3.2.1 試薬

3-メルカプトプロピオン酸 (3-Mercaptopropionic acid: MPA), N-ヒドロキシコハク酸イミド (N-Hydroxysuccinimide: NHS), アジ化ナトリウム (NaN_3), エチレンジアミン四酢酸 (Ethylene diamine tetra acetic ACID tetra sodium slat hydrate, Sigma Ultra: tetra sodium EDTA) 及びウシ血清アルブミン (Albumin, bovine serum, Fraction V, Approx. 99%: BSA) は Sigma 社製 (ミズーリ州, U.S.A.) を使用した. コルチゾル (Cortisol EIA Standard: 400 ng ml^{-1}), 卵成熟誘起ステロイド (サケ科由来) [Maturation-Inducing Steroid (salmonid) EIA Standard: DHP], 黄体ホルモン (Progesterone EIA Standard), エストリオール (Estriol EIA Standard), テストステロン (Testosterone EIA Standard), エストラジオール (Estradiol EIA Standard), コルチゾルモノクローナル抗体 (Cortisol EIA Monoclonal Antibody : 抗-Cortisol 抗体), コルチゾルアセチルコリンエステラーゼ標識抗原 (Cortisol AChE Tracer: AChE 標識抗原) 及び酵素免疫測定法 (ELISA) 用発色試薬 (Ellman's Reagent) は Cayman chemical 社製 (ミシガン州, U.S.A.) を使用した. フェリシアン化カリウム ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), LC-MS 用超純水, 2-フェノキシエタノール (2-Phenoxyethanol) 及び塩化カリウムは和光純薬工業社製 (大阪, 日本) を使用した. リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4), リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4), 水酸化カリウム (KOH), 水酸化ナトリウム (NaOH) 及び硫酸 (H_2SO_4) は国産化学社製 (東京, 日本) を使用した. 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride: EDC] 及び MES

(2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate) は同仁化学研究所製（熊本，日本）を使用した。Tween-20 は関東化学社製（東京，日本）を使用した。無水エタノールは日興製薬株式会社製を使用した。その他の試薬は，全て特級試薬を用いた。

3.2.2 試薬の調製

3.2.2.1 リン酸緩衝液（PB）の調製

リン酸水素二カリウム 26.6 g とリン酸二水素カリウム 6.43 g を秤量し，それぞれ 200 ml メスフラスコに超純水を用いて定容した。pH メーターを用いて pH を測定し，1.0 M の PB（pH 7.4, pH 7.0）を調製した。

3.2.2.2 MES 緩衝液の調製

MES 2.13 g と水酸化ナトリウム 0.4 g を秤量し，それぞれを 100 ml メスフラスコに超純水で定容した。pH メーターを用いて MES 溶液の pH を測定しながら，水酸化ナトリウムを滴下し，最終的に 0.1 M MES 緩衝液（pH 5.5）を調製した。

3.2.2.3 ELISA 用緩衝液の調製（pH 7.4）

1.0 M リン酸緩衝液（pH 7.4）10.0 ml にアジ化ナトリウム 10.0 mg，塩化カリウム 2.3 g，tetrasodium EDTA 37.0 mg 及び BSA 100 mg を超純水で溶解させた後，100 ml メスフラスコに超純水で定容した。

3.2.2.4 ELISA 用洗浄液の調製

1.0 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 2.0 ml に Tween-20 100 μ l を加え, 200 ml メスフラスコに超純水で定容した. なお, Tween-20 の分注作業では Gilson 社製の粘性液体用ピペット (Microman[®] M250, WI, U.S.A.) を使用した.

3.2.2.5 MPA 溶液の調製 (10 mM)

MPA (比重: 1.22 g ml⁻¹) 8.7 μ l を無水エタノールで 10 ml に定容し, 10 mM の MPA 溶液を調製した.

3.2.2.6 5.0 mM フェリシアン化カリウム溶液の調製

フェリシアン化カリウム 164.6 mg 及び塩化カリウム 746 mg を 100 ml メスフラスコに超純水で定容し, 5 mM のフェリシアン化カリウム溶液を調製した.

3.2.2.7 AChE 標識抗原の調製

-20°C で保管しておいた AChE 標識抗原に ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分に攪拌した後, 使用するまで 4°C で保管した.

3.2.2.8 抗-Cort 抗体の調製

-20°C で保管しておいた抗-Cort 抗体に ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分

に攪拌した後，使用するまで 4℃で保管した．

3.2.2.9 コルチゾル標準試料の調製

マイクロテストチューブ (1.5 ml) に 99.8 %エタノールを分注し，ピペッティングを十分に行った．このピペットを用いて，-20℃で保管しておいた 400 ng ml⁻¹の コルチゾル標準試料 100 μl を取り出し，超純水 900 μl を加えて 40ng ml⁻¹ に希釈した．さらに，コルチゾル標準試料 (40 ng ml⁻¹) 750 μl をマイクロテストチューブに取り，超純水 250 μl を加えて 30 ng ml⁻¹ になるように希釈した．次に，コルチゾル標準試料 (40 ng ml⁻¹) 500 μl をマイクロテストチューブに取り，超純水 500 μl を加えて 20 ng ml⁻¹ に希釈した．同様の操作を繰り返して，最終的に 0～40 ng ml⁻¹ のコルチゾル標準試料を調製した．

3.2.3 試験魚及び実試料の調製

3.2.3.1 試験魚

試験魚の飼育は 1.2.3.1 と同様に行った．

3.2.3.2 試験魚に対するストレス因子の負荷

血中コルチゾルの濃度は魚のストレスにより変化するため，本章ではストレス因子を試験魚に負荷し，試験魚の血中コルチゾル濃度を測定した．ストレス因子として，網を用いて試験魚を飼育水槽からすくい上げて，空気中で一定時間 (10 分間) 暴露する手法を用いた．なお，コントロールとしてストレス因子

を負荷していない個体を採用した。

3.2.3.3 血漿試料の採取

血漿試料の採取は 1.2.3.2 と同様に行った。

3.2.4 非標識イムノセンサの作製

3.2.4.1 電極の作製

電極の作製手順を Fig. 3-2-1 に示す。まず、直径が 4 mm の PLA 製チューブを 10 mm に切断した (a)。次に、熱した針をチューブの内側に当て、表面に直径が 0.5 mm、長さが約 0.7 cm の溝（センサ固定用滑り止め）を作製した (b)。その後、そのチューブの先端部位と同径の充填用部品（リフィル）を差し込んで (c)、リフィルとチューブの隙間に、直径が 0.2 mm、長さが 2.5 cm の金線（ニラコ社製、東京、日本）を挿入した (d)。その金線をリフィルに巻きつけ (e)、先端部分を接着剤で固定した。さらに、チューブの下端に切れ込みを入れ、金線をその部分から取り出し、ハンダを用いて金属フレークと接合した。接合したフレークを PLA 製チューブの切れ込みに入れ、金属フレークの両端が 1 mm ずつ露出するように調整し、接着剤で固定した。

3.2.4.2 抗体の固定化

作製したセンサを 10 mM MPA 溶液に 8 時間（室温）浸漬し、電極表面へ MPA の自己組織化単分子膜（SAM）を形成させた。次に、上記の電極を 0.25 ml

の EDC 溶液 (200 mg ml^{-1} , MES に溶解) に 15 分間浸漬させた。その後、上記の EDC 溶液に 0.25 ml の NHS 溶液 (200 mg ml^{-1} , MES に溶解) を混合し、その中に電極を 105 分間浸漬させる (合計 120 分間) ことにより、MPA 末端のカルボキシル基を高活性エステル基に置換した。置換後、PB で調製した抗-Cortisol 抗体溶液 (タンパク濃度: $0.06 \sim 0.07 \text{ mg ml}^{-1}$) に浸漬し、 4°C で一晚静置した。その後、電極を 1% の BSA 溶液中に 2 時間浸漬し、ブロッキングを行った。以上の操作より、非標識イムノセンサを作製した。最後に、作製した非標識イムノセンサをホルダー内に順次垂直に設置し、センサの導電部をホルダー内にある導電部に接合した (Fig. 3-1-1)。

3.2.5 フローシステムの構成

本フローシステムの模式図を Fig. 3-2-2 に示す。本システムでは測定に二極法を採用した。作用電極は抗体固定化金電極 (直径: 2 mm) を用い、対極は白金線 (直径: 0.5 mm , length: 2.5 cm) 及び Ag/AgCl paste を用いた。また、フローシステムの動力源としては、マイクロポンプ (mp6, bartels mikrotechnik, Germany) を用い、流速を 5 ml min^{-1} になるように調整した。

3.2.6 測定

3.2.6.1 測定システム

本測定システムはマルチポテンショスタット (3104, Pinnacle 社製, U.S.A) 及びデータ解析ソフトウェア Sirenia Acquisition (Pinnacle Technology 社製, U.S.A) より構成されている。

3.2.6.2 システムのセットアップ及び測定プロトコルの設定

ポテンショスタットを PC につなぎ、電源を入れデスクトップから **Sirenia Acquisition** を起動した。メインウィンドウ上の左上のメニューから「**File**」を開き、「**New Experiment**」を選択した。次に、「**Analog Input Autozero**」を選択し、アナログの入力校正を行った。その後、「**Analog Output Autozero**」を選択し、アナログの校正を行った。最後、入出力の校正が終了した後、**Channel** にセンサとケーブルを接続し、「**Set Voltage and Gain**」を選択した。使用する各 **Channel** に印加する電圧を入力し、それぞれ「**Set**」を選択した後「**OK**」を選択した。メインウィンドウ左上のボタンを選択して記録を開始し、測定終了と同時にデータを保存した。

3.2.6.3 測定方法

- 1) 5 mM フェリシアン化カリウム 10 ml を保存用タンク (5 ml) に注入し、15 分間脱気した。さらに、parafilm で密封した。
- 2) マイクロポンプを用いて保存用タンクから溶液を吸い上げ、反応用タンクに注入した。第二章の結果より、センサの酸化ピーク (出力電流値が最大) の電位は +250 mV 付近であったため、センサに (+250 mV) を印加し、出力電流値が安定するまで 5 分間静置し、4 分 30 秒から 5 分までの出力電流値の平均値をセンサのブランク値 (100%) とした。
- 3) マイクロポンプを用いて反応タンクからフェリシアン化カリウムを移送し、再利用できるように反応タンク内に保存した。
- 4) 試料注入口に試料を注入し、スターラーを用いて攪拌しながら抗原抗体反

応させた。

- 5) マイクロポンプを用いて試料溶液を廃液タンクに移送した。
- 6) マイクロポンプを用いて保存用タンクからフェリシアン化カリウム溶液を移送し、反応用タンクに注入した。センサの出力電流値が安定するまで 5 分間静置し、4 分 30 秒から 5 分までの出力電流値の平均値を 2) で得られたブランク値から差し引いた。その電流値の変化率をセンサの応答値とした。
- 7) 2) ~6) の操作を再度繰り返し、各試料を用いて測定を行った。

3.2.7 センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響

3.2.7.1 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響

20 ng ml⁻¹ のコルチゾル標準試料を pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を用いて各々調製した。次に作製したセンサを測定セル内に設置し、フェリシアン化カリウム溶液中でブランク電流値を測定した。その後、センサを室温 (26±1°C) で各 pH のコルチゾル標準試料 0.5 ml 中に浸漬させ、抗原抗体反応時間を 10 分間に設定した。最後に、再度フェリシアン化カリウム溶液中で電流値を測定した。

3.2.7.2 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

作製したセンサを測定セル内に設置し、フェリシアン化カリウム溶液中でブランク電流値を測定した。その後、センサを室温 (26±1°C) でコルチゾル標準試料 0.5 ml 中に浸漬させ (20 ng ml⁻¹, pH 7.0), 抗原抗体反応時間を 1, 5, 10, 15, 20 分間に設定した。最後に、再度フェリシアン化カリウム溶液中で出力電

流値を測定した。

3.2.8 コルチゾル標準試料を用いた測定

作製したセンサを測定セルに設置し、フェリシアン化カリウム溶液中でブランク電流値を測定した。次に、センサを室温でコルチゾル標準試料 0.5 ml 中に 10 分間浸漬させ (pH 7.0)、センサ上で抗原抗体反応を行った。最後に、再度フェリシアン化カリウム溶液中で出力電流値を測定した。

3.2.9 センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響

卵成熟誘起ステロイド (DHP)、黄体ホルモン (Progesterone)、エストラジオール (Estradiol)、エストリオール (Estriol) 及びテストステロン (Testosterone) の各種ステロイドホルモンを pH 7.0 リン酸緩衝液を用いて 5 ~ 40 ng ml⁻¹ に調製した。センサを測定セル内に設置し、フェリシアン化カリウム溶液中でブランク電流値を測定した。次に、センサを室温で各種ステロイドホルモン標準試料 0.5 ml 中に 10 分間浸漬させ (pH 7.0)、センサ上で抗原抗体反応を行った。最後に、再度フェリシアン化カリウム溶液中で出力電流値を測定した。

3.2.10 イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定

3.2.10.1 センサを用いた測定

空気中に暴露 (暴露時間 : 10 分間) してストレス因子を負荷した試験魚

と、ストレス因子を負荷していない試験魚から採血を行い、1.1.3.2に従って遠心分離により試料を血漿化した後、pH 7.0のリン酸緩衝液を用いて10倍希釈した。その後、センサを測定セル内に設置し、フェリシアン化カリウム溶液中でブランク電流値を測定した。次に、センサを室温で各試料0.5 ml中に10分間浸漬させ、抗原抗体反応を行った。最後に、再度フェリシアン化カリウム溶液中で出力電流値を測定した。

3.2.10.2 従来法（ELISA）を用いた測定

ELISAを用いた実試料の測定は1.2.5.6と同様に行った。

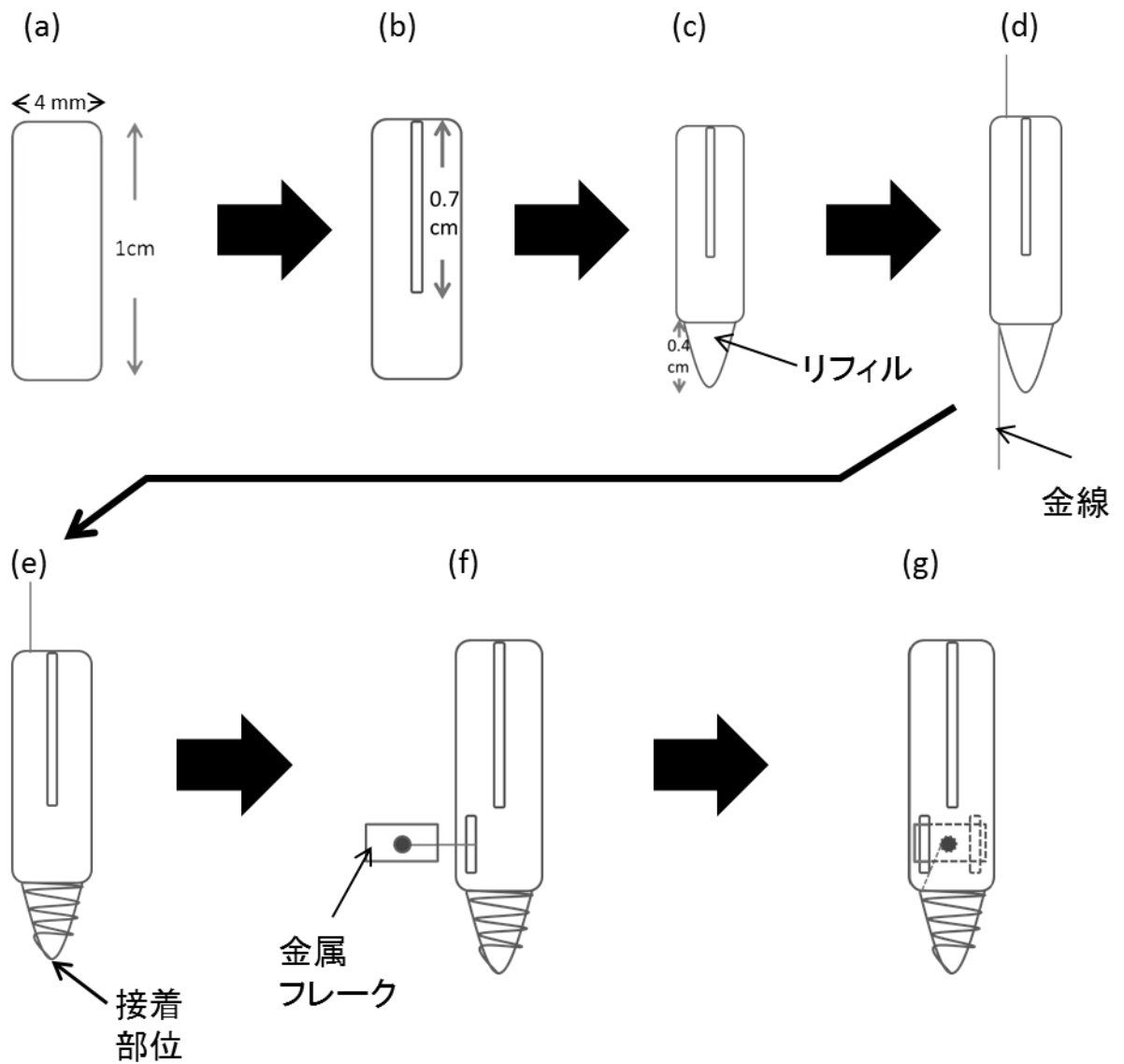


Fig. 3-2-1 微小金電極の作製手順

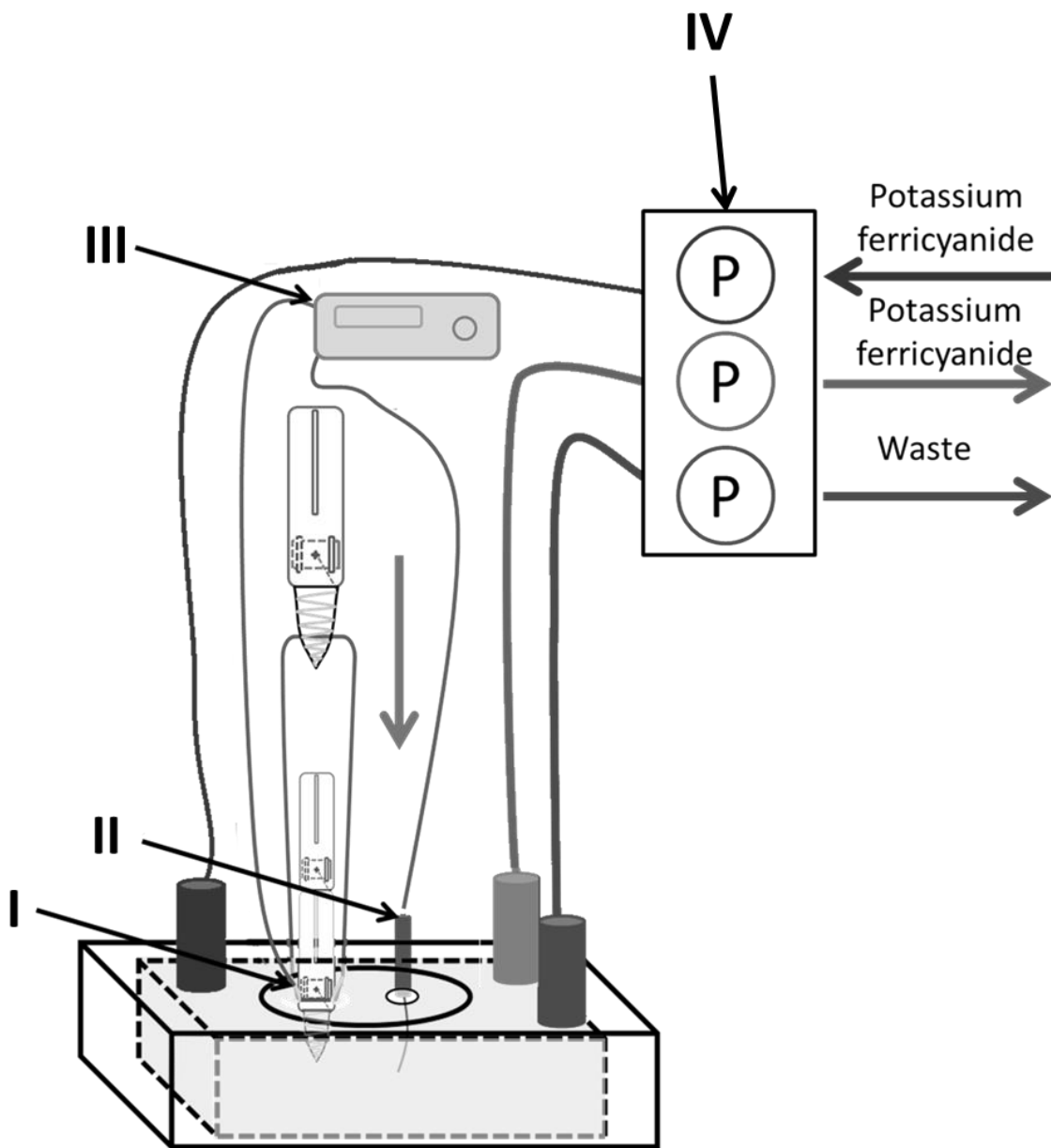


Fig. 3-2-2 フローシステムの概略図

- I:作用極(センサチェンジャー)
- II:対極(Pt)
- III:ポテンシオスタット
- IV:マイクロポンプ

3.3 結果及び考察

3.3.1 センサの出力電流値に及ぼす諸条件の影響

本システムの測定原理は、イムノセンサを試料溶液に浸漬した際に形成される抗原抗体反応複合体が、電極表面の電子移動を阻害するため、この時の電流減少率から抗原濃度を測定する原理に基づいている。そのため、より効率的な測定を実現するためには、センサの出力に及ぼす最適な抗原抗体反応条件を確認する必要がある。

本章ではまず、前章と同様にイムノセンサシステムの最適反応条件（pH，時間）について検討した。

3.3.1.1 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響

センサの出力電流値に及ぼす pH 影響を検討するため、コルチゾル濃度が 20 ng ml^{-1} の標準溶液を用い、反応溶液の pH を 6.0～8.5 までの 6 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 3-3-1 に示す。この図より、pH 7.0 の際に最大の電流減少率が認められ、その前後の pH では小さな値を示した。しかしながら、第二章においてもセンサの最大減少率は pH7.0 で得られていたが、今回の変化曲線は前回のそれと比べて、やや異なる曲線を示した。この現象は次の理由から推測できる。第二章では、高導電性を持つ SWCNT を利用したため、センサの出力電流値の増加が実現できたが、その増幅は pH7.0 の条件下においてさらに増幅されたため、他の pH の条件下よりも大きな変動幅を示したものと考えられる。

すなわち、第二章の条件下では、pH7.0 の条件下で、抗原抗体複合体が最も

多く生成され、pH 及び SWCNT の相互作用により効果的に電流減少値が最大の応答を示したものと考えられる。一方、本章では電極表面に抗体のみが固定化されるため、電流減少率の変動は抗原抗体反応のみに起因すると予想される。そして、抗体を自身の等電点（IgG の等電点は一般的に pH 5.0 ~ 5.5）より高い値の pH の溶液に浸漬させると抗原抗体複合体が形成しやすくなるため、pH7.0 まで、電流減少の幅は大きくなった。一方、pH 7.0 以上においては、抗原溶液のイオン強度が増加し、電極に固定化されている抗体の親和力が低下したため、電流減少の幅は小さくなったものと考えられる。したがって本実験では、抗原抗体反応における最適反応 pH を 7.0 に設定した。

3.3.1.2 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響を検討するため、コルチゾル標準溶液（濃度：20 ng ml⁻¹）を用いて、反応時間を 1~20 分の 5 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 3-3-2 に示す。この図から反応時間が 10 分を超えると電流減少率は一定の値になり、平衡状態に達していることが示唆される。したがって、抗原抗体反応の最適反応時間を 10 分間に定めた。

3.3.2 コルチゾル標準試料の検量線

上記の最適使用条件の下で、コルチゾル標準試料を用いて本センサの検量線を作成した（Fig. 3-3-3）。なお、抗原抗体反応を含め、1 検体の分析所要時間は約 15 分であった。図中、横軸はコルチゾル濃度を、縦軸は電流減少値を示す。この図より、コルチゾル標準試料 0~40 ng ml⁻¹ の範囲内で良好な直線関係（R = 0.982）が確認された。また、製作したチェンジャーにおける免疫センサの交

換は数秒で可能であり，迅速・簡便な測定を実現できた．

一方，第二章で作製したセンサの最大測定可能値は，コルチゾル濃度が 10 ng ml^{-1} であったのに対し，本章の非標識イムノセンサの最大測定可能値は 40 ng ml^{-1} となった．この結果から，コルチゾルの最大測定値が 10 ng ml^{-1} から 40 ng ml^{-1} の 4 倍に向上したことが確認できた．その理由として，第二章で作製したセンサの表面積が約 12.56 mm^2 であったことに対し，本章で試作したセンサの表面積は約 10 倍の 125.6 mm^2 であった．そのため，電極表面に固定化できる抗体の量も増え，より多くのコルチゾルと結合ができ，ダイナミックレンジの拡大ができたと推測できる．しかし，実際の魚類の血漿中のコルチゾル濃度は，数十から数百 ng ml^{-1} まで変動する^{13,25)} ため，実際の実試料測定においては，血漿試料を 10 倍程度希釈する必要があると考えられる．

3.3.3 センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響

本実験では，第二章と同様に DHP，黄体ホルモン，エストラジオール，エストリオール，テストステロンの標準試料を用いて，センサの出力電流値に及ぼす影響を検討した．結果を Fig. 3-3-4 に示す．この図から，コルチゾルに対しては濃度と共にセンサ出力の増加が認められるが，他種ステロイドホルモンを用いた測定においてセンサの応答は確認されなかった．したがって，本センサはコルチゾルに対して高い特異性を有し，その定量が可能であることがわかった．

3.3.4 イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定

イムノセンサシステムの実試料への適用として，魚類（ティラピア）の血中

コルチゾル濃度を測定し、従来法（ELISA）の測定結果と比較検討した。結果を Fig.3-3-5 に示す。図中、(●) はストレス因子を負荷した個体の測定結果を示し、(○) は負荷していない個体の測定結果を示す。ストレス因子を負荷していない個体の血漿コルチゾル濃度は、本システムを用いた測定結果では 60.73 ~ 110.32 ng ml⁻¹ の濃度範囲であった。一般にティラピアのコルチゾル濃度は 10 ng ml⁻¹ 程度と報告されており¹³⁾、本測定結果は文献値と比較して高い値を示した。この原因として、本実験では魚を網で捕獲し、麻酔後採血を行ったため、これらの操作がストレス因子となり、結果に反映された可能性があると考えられる。

一方、ストレス因子を負荷した個体(空気暴露：10 分間)の血漿中コルチゾル濃度は、急激な上昇が確認された。本システムで測定されたコルチゾルの値は、144.73 ng ml⁻¹ ~ 251.22 ng ml⁻¹ の濃度範囲であった。これらの値は、ストレス因子を負荷していない個体の測定結果と比較すると、約 2.38~4.13 倍となった。したがって、本システムを用いてコルチゾルの濃度を測定することにより、魚のストレス状態の把握が可能であることが明らかとなった。

一方、本システムの測定値と ELISA の測定結果を比較したところ、両者の間には高い相関関係が認められた（相関係数：0.976）が、センサで得られた測定値は、ELISA の結果と比較してやや高い値を示した。その理由として、本システムでは、試料を直接検出しているため、センサの検出部が非特異的吸着等の影響を受けて、測定値が実測値よりもやや大きな値を示したものと考えられる。一方、本センサシステムを用いることにより、作用極（センサ）の迅速な交換が実現でき、ELISA と比較して迅速・簡便に魚類の血漿中のコルチゾル濃度の測定が可能となった。

3.4 結言

本章では，第二章で得られた知見を基盤として，コルチゾル濃度の連続測定を可能にするために，イムノバイオセンサの迅速交換が可能なフローチェンジャーシステムを設計・製作し，コルチゾル濃度を連続的に測定できるシステムの構築を試みた．以下に本章の結果を要約する．

- 1) 製作したチェンジャーデバイスにおけるセンサの交換は数秒で可能であり，コルチゾル測定用イムノセンサの迅速・簡便な交換ができ，連続測定が可能になった．
- 2) 作製したセンサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応条件の影響を検討したところ，pH 7.0，時間：10分間の条件が最適であった．
- 3) 上記最適反応条件下で，コルチゾル標準試料を用いて検量線を作成したところ， $0\sim 40\text{ ng ml}^{-1}$ の範囲においてセンサの電流減少値との間に直線関係が認められた（相関係数：0.982）．また，この時の最大測定可能値は第二章のそれと比べて，約4倍の値を示した．さらに，抗原抗体反応を含む1検体の分析所要時間は約15分であった．
- 4) 魚類の血中に存在する各種ステロイドホルモンを用いてイムノセンサの特異性を検討したところ，本センサは高い基質特異性を示した．
- 5) 本システムを用いて試験魚（ティラピア）の血漿コルチゾル濃度の測定を行い，従来法（ELISA）の測定結果と比較検討したところ，両測定値との

間には良い相関性 ($R=0.999$) が認められた。

以上のように、本章ではフローチェンジャーシステムと微小電極を用いることにより、コルチゾル濃度の連続測定が可能なイムノセンサシステムを構築し、迅速・簡便な定量法を確立することができた。

一方、魚類の血漿コルチゾル濃度は、数十～数百 ng ml^{-1} と幅広い濃度範囲で変動するため、本システムの測定ダイナミックレンジでは希釈操作が必要となる。また、電極上での電子メディエーターとして用いたフェリシアン化カリウムは、生物に対して毒性があるため、将来的にセンサを体内に留置することを考えた場合、魚類にとって最適なシステムとはなっていない。したがって、生体にやさしく（生物毒性が低い、環境負荷が少ない）かつ希釈操作が不要（更に広いダイナミックレンジ）なセンサの構築が必要であると考えられる。

そこで次章では、この問題を克服するために、免疫反応に酵素反応を組み合わせた新規のバイオセンサの構築を試みる。

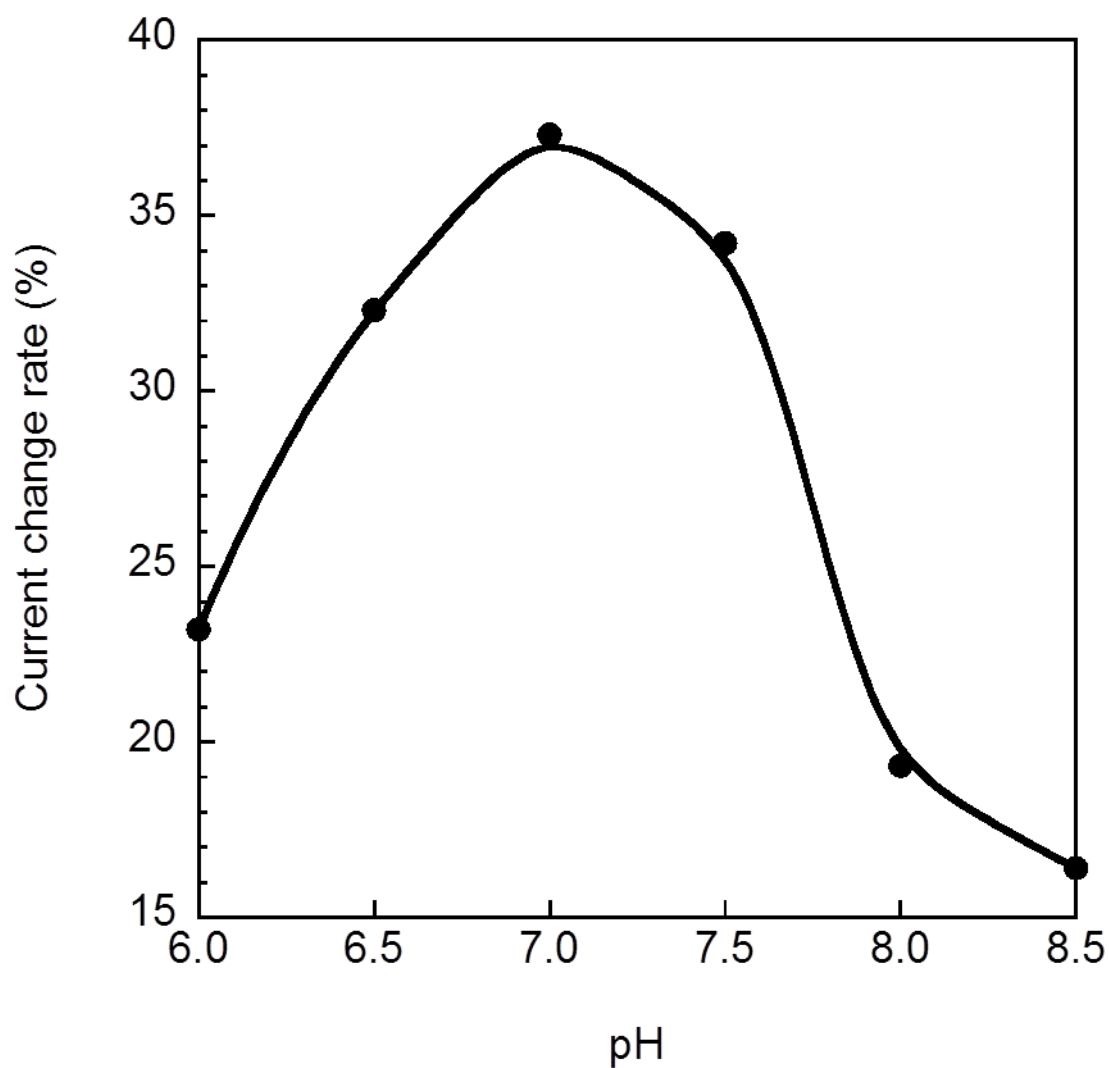


Fig. 3-3-1 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応pHの影響

コルチゾル濃度: 20 ng ml^{-1} ; 反応時間: 10 min

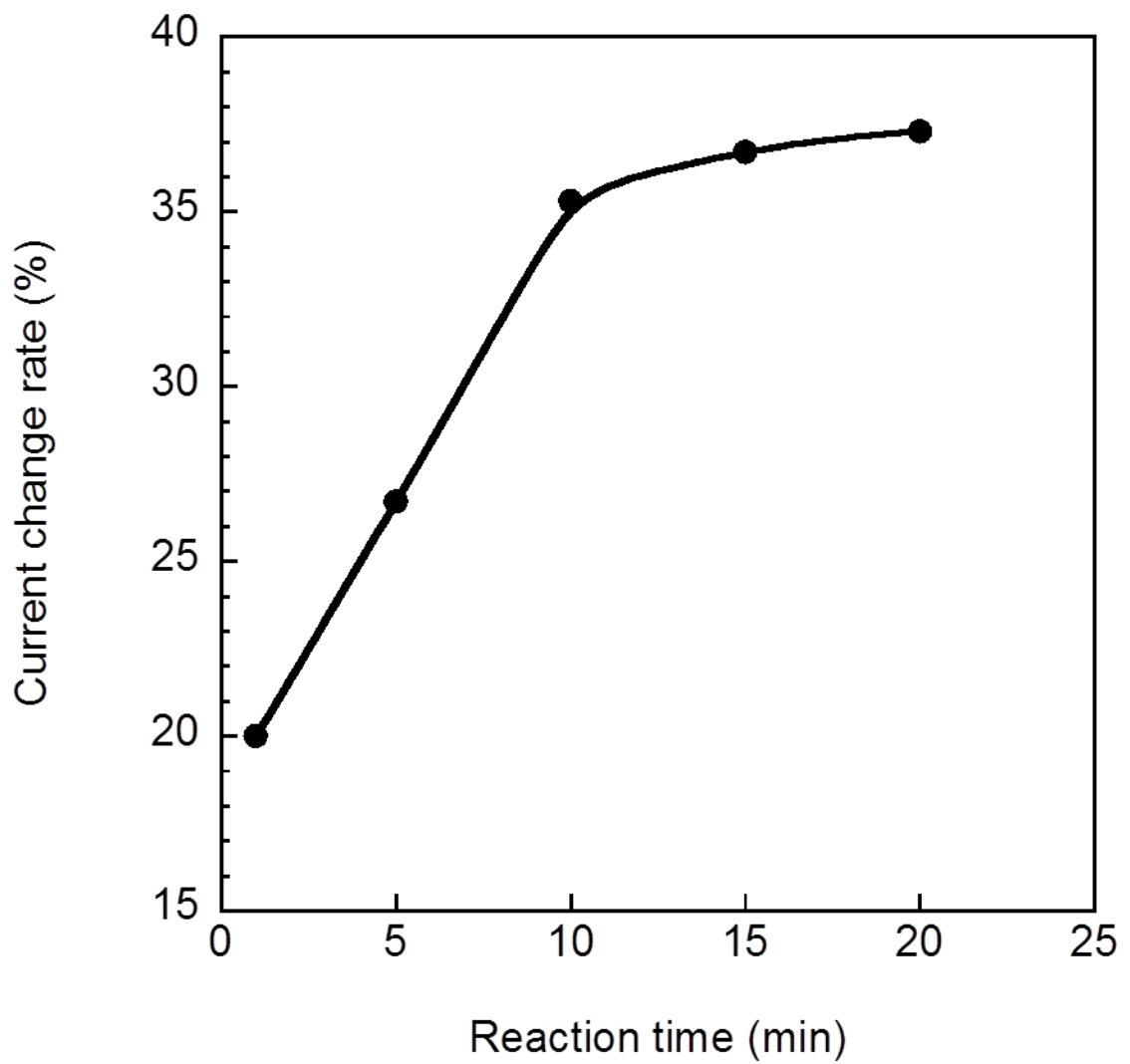


Fig. 3-3-2 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

コルチゾル濃度: 20 ng ml^{-1} ; pH: 7.0

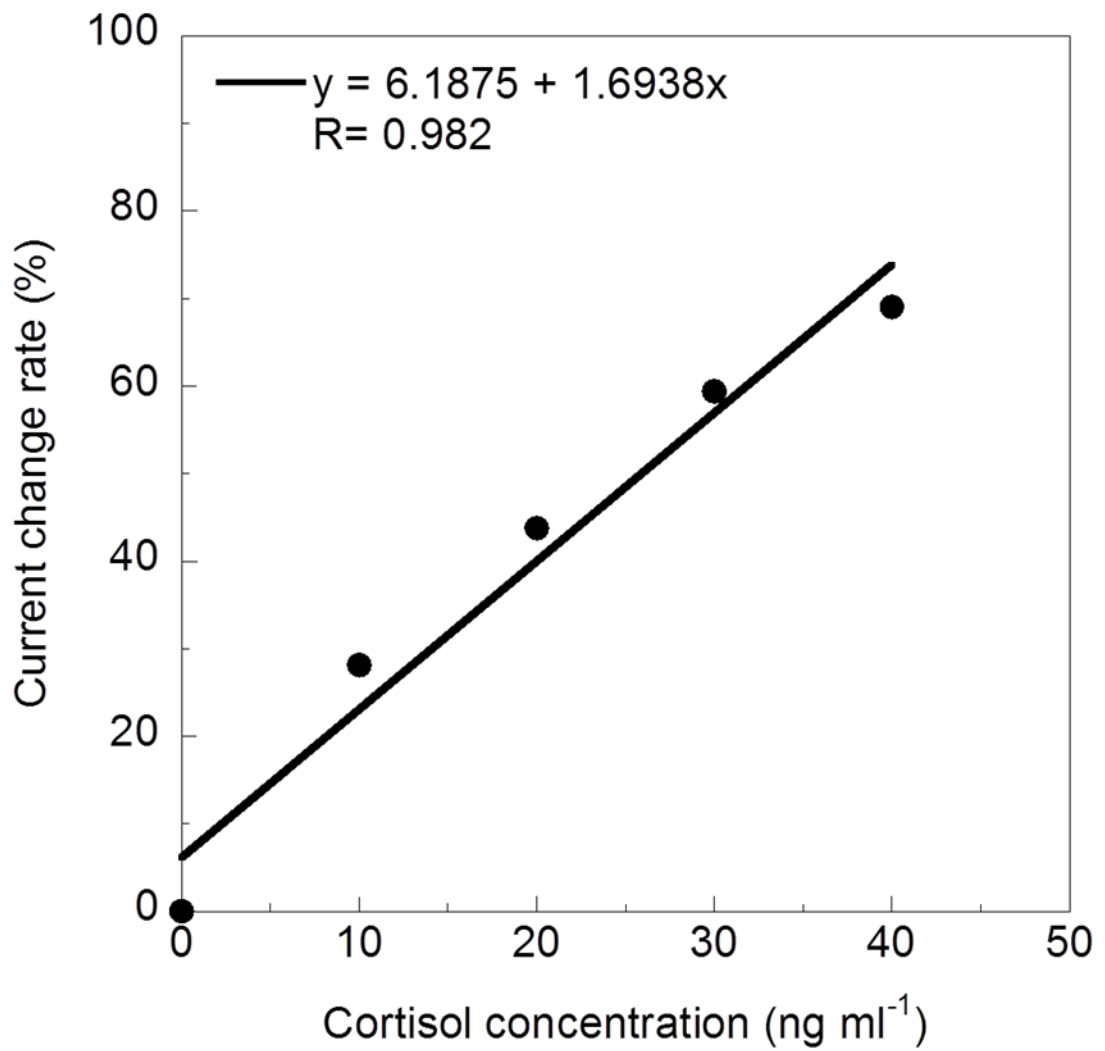


Fig. 3-3-3 コルチゾル濃度と電流減少率の相関

pH: 7.0; 反応時間: 10 min

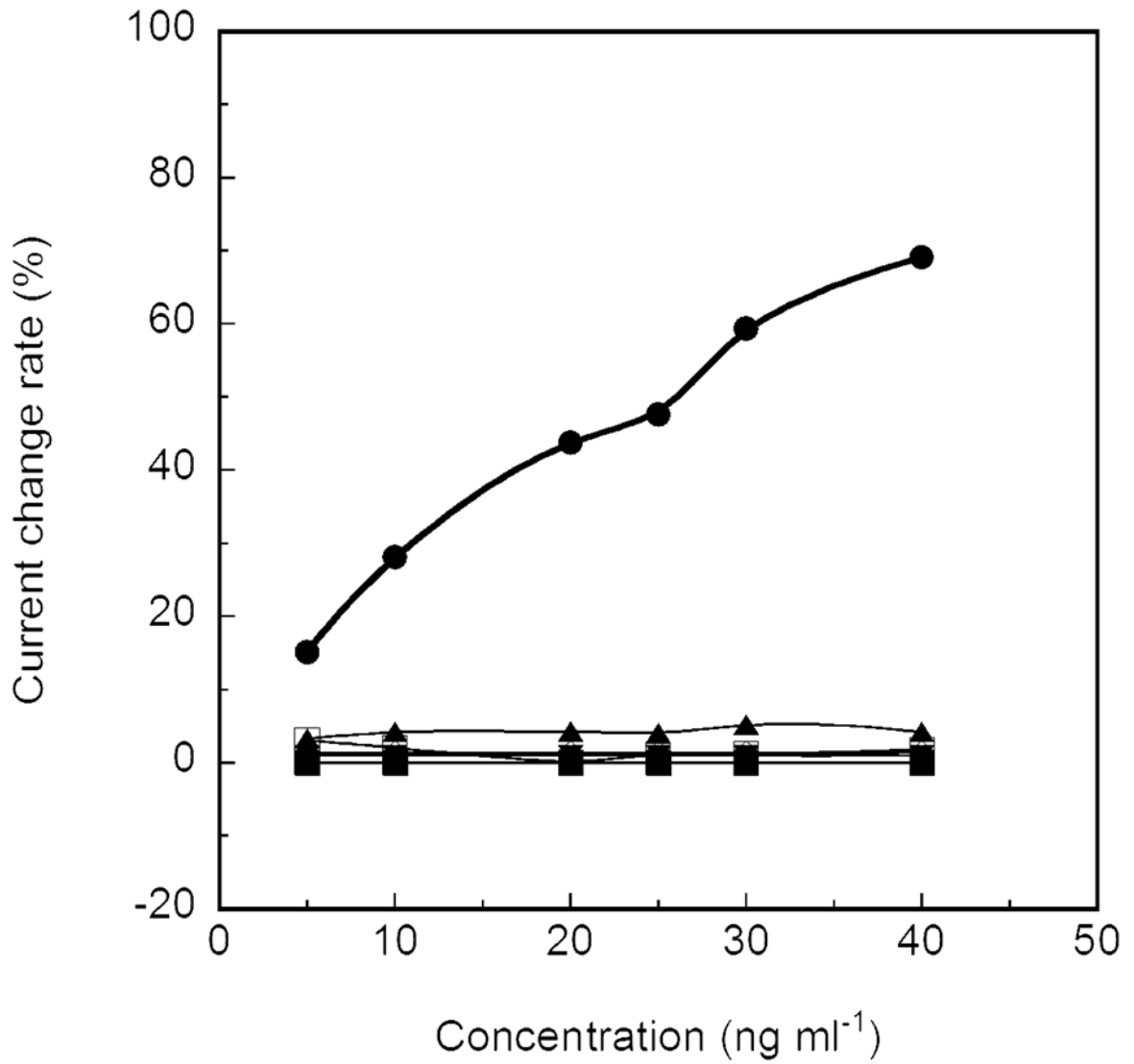


Fig. 3-3-4 非標識イムノセンサの特異性

pH: 7.0; 反応時間: 10 min

● : Cortisol; ◇ : DHP; ■ : Progesterone;
 ▼ : Estradiol; □ : Estriol; ▲ : Testosterone

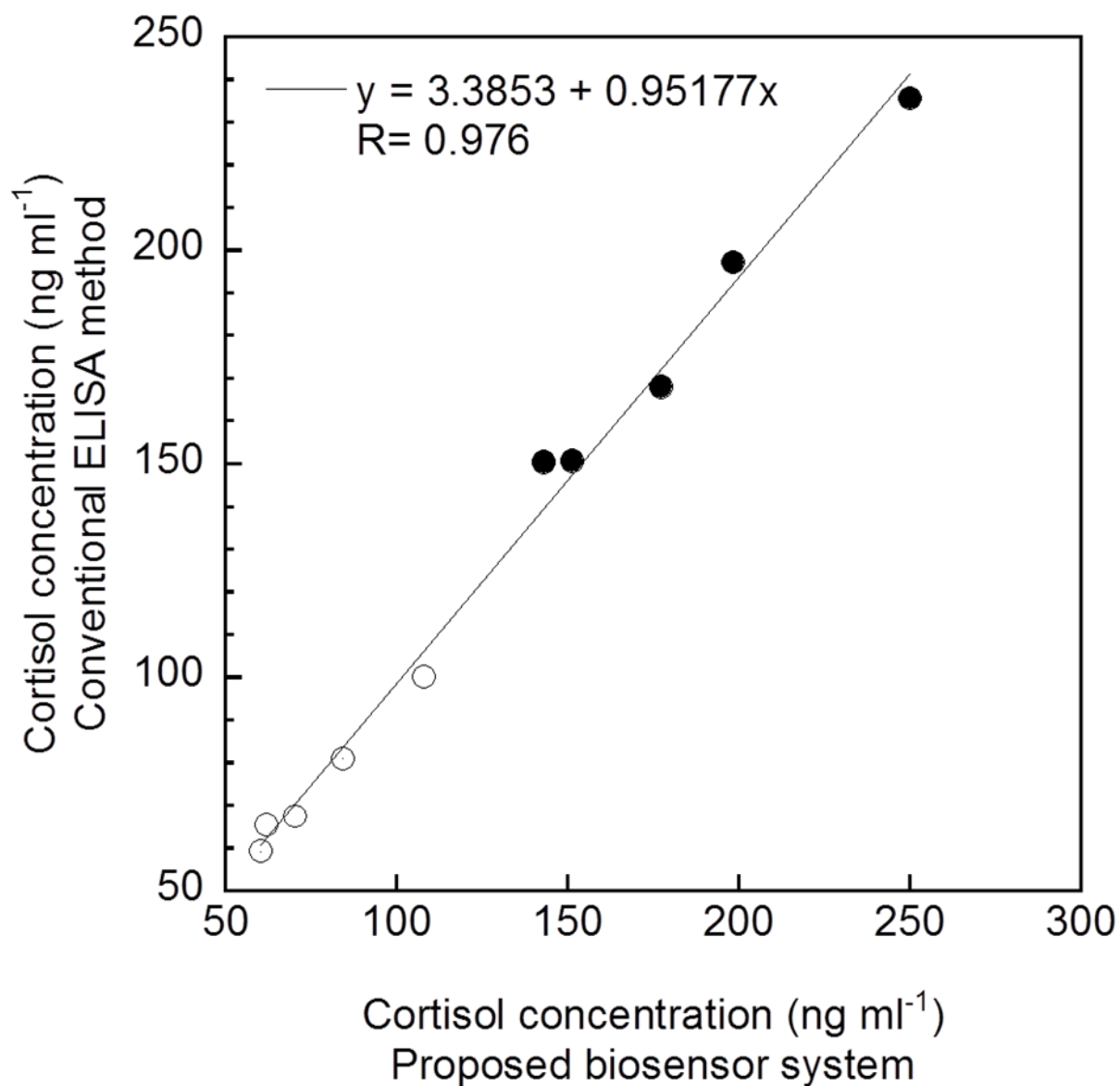


Fig. 3-3-5 本システムと従来法による測定値の相関性

- : Unstressed fish (control)
- : Stressed fish (air exposure)

第四章 体内測定に適したコルチゾル測定用酵素/イムノセンサの開発

4.1 緒言

第三章では，第二章で得られた知見を基盤として，コルチゾルの連続測定を可能にするために，イムノバイオセンサの迅速交換が可能なフローチェンジャーシステムを設計・製作し，コルチゾル濃度を連続的に測定できるシステムの構築を試みた．本システムを用いてコルチゾルを連続的に測定した結果，0～40 ng ml⁻¹の濃度範囲でその定量が可能であった．また，製作したチェンジャーにおけるバイオセンサの交換は数秒で可能であり，迅速・簡便な測定を実現できた．

しかしながら，魚類の血漿コルチゾル濃度は，数十～数百 ng ml⁻¹と幅広い濃度範囲で変動するため^{13,25)}，本システムの測定範囲においても希釈操作が必要となる課題が残っていた．これまでの研究では，センサの電子メディエーターとして酸化還元対をもつフェリシアン化カリウムを利用していたが，フェリシアン化カリウムは光によって配位子の一部が解離することで微量のシアン化物イオンを生じる．これは，配位中心の鉄(III)イオンが光(主に紫外線)により鉄(II)イオンへ還元されることに起因する⁵⁹⁾．光解離によるシアン化物イオンは，動物プランクトンをはじめとする水生生物に毒性を示すため，生物体をはじめ，水質環境にも負荷を与えてしまう．そのため，将来においてコルチゾル測定用イムノバイオセンサの魚体内への留置を目指すためには，この課題を解決しなければならない．

そこで本章では，生体に負担をかけないセンサの作製のため，フェリシアン化カリウム溶液の酸化還元反応の代わりにGoxによるグルコースの酸化反応に着目した．グルコースオキシターゼ(Gox)の酵素反応を利用した測定は，こ

れまで抗原抗体複合体が電子メディエーターによる基質の酸化還元反応への阻害を検出することと異なり，抗原抗体複合体の形成による Gox の酵素反応への阻害を検出という原理に基づいているため，既存のセンサと比べ，環境・生体に優しいバイオセンサの構築が期待できる．

本章ではまず，Gox の酵素反応を利用したコルチゾル測定用イムノセンサを試作し，このセンサの最適反応条件及び測定可能範囲を検討する．次に，本センサの電気化学的評価を検討した後，センサの特異性について検討する．さらに，実試料への適用として，様々なストレス因子を与えた試験魚の血漿試料のコルチゾル濃度の測定を本センサを用いて検討する．

4.2 実験方法

4.2.1 試薬

Glucose Oxidase (Gox, 158,900 units g^{-1} , from *Aspergillus niger*), 3-メルカプトプロピオン酸 (3-Mercaptopropionic acid: MPA), N-ヒドロキシコハク酸イミド (N-Hydroxysuccinimide: NHS), アジ化ナトリウム (NaN_3), エチレンジアミン四酢酸 (Ethylene diamine tetra acetic ACID tetra sodium salt hydrate, Sigma Ultra: tetra sodium EDTA) 及びウシ血清アルブミン (Albumin, bovine serum, Fraction V, Approx. 99%: BSA) は Sigma 社製 (ミズーリ州, U.S.A.) を使用した. コルチゾル (Cortisol EIA Standard: 400 ng ml^{-1}), 卵成熟誘起ステロイド (サケ科由来) [Maturation-Inducing Steroid (salmonid) EIA Standard: DHP], 黄体ホルモン (Progesterone EIA Standard), エストリオール (Estriol EIA Standard), テストステロン (Testosterone EIA Standard), エストラジオール (Estradiol EIA Standard), コルチゾルモノクローナル抗体 (Cortisol EIA Monoclonal Antibody: 抗-Cortisol 抗体), コルチゾルアセチルコリンエステラーゼ標識抗原 (Cortisol AChE Tracer: AChE 標識抗原) 及び酵素免疫測定法 (ELISA) 用発色試薬 (Ellman's Reagent) は Cayman chemical 社製 (ミシガン州, U.S.A.) を使用した. LC-MS 用超純水 (H_2O), 2-フェノキシエタノール (2-Phenoxyethanol) 及び塩化カリウムは和光純薬工業社製 (大阪, 日本) を使用した. D(+)- グルコース ($C_6H_{12}O_6$), リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4), リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4), 水酸化カリウム (KOH), 水酸化ナトリウム (NaOH) 及び硫酸 (H_2SO_4) は国産化学社製 (東京, 日本) を使用した. 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

hydrochloride : EDC] 及び MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate) は同仁化学研究所製 (熊本, 日本) を使用した. Tween-20 は関東化学社製 (東京, 日本) を使用した. 無水エタノールは日興製薬株式会社製を使用したその他の試薬は, 全て特級試薬を用いた.

4.2.2 試薬の調製

4.2.2.1 リン酸緩衝液 (PB) の調製

リン酸水素二カリウム 26.6 g とリン酸二水素カリウム 6.43 g を秤量し, それぞれ 200 ml メスフラスコに超純水を用いて定容した. pH メーターを用いて pH を測定し, 1.0 M の PB (pH 7.4, pH 7.8) を調製した.

4.2.2.2 MES 緩衝液の調製

MES 2.13 g と水酸化ナトリウム 0.4 g を秤量し, それぞれを 100 ml メスフラスコに超純水を用いて定容した. pH メーターを用いて MES 溶液の pH を測定しながら, 水酸化ナトリウムを滴下し, 最終的に 0.1 M MES 緩衝液 (pH 5.5) を調製した.

4.2.2.3 ELISA 用緩衝液の調製 (pH 7.4)

1.0M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 10.0 ml にアジ化ナトリウム 10.0 mg, 塩化カリウム 2.3 g, tetrasodium EDTA 37.0 mg 及び BSA 100 mg を超純水で溶解させた後, 100 ml メスフラスコに超純水を用いて定容した.

4.2.2.4 ELISA 用洗浄液の調製

1.0 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 2.0 ml に Tween-20 100 μ l を加え, 200 ml メスフラスコを用いて超純水で定容した. なお, Tween-20 の分注作業では Gilson 社製の粘性液体用ピペット (Microman[®] M250, WI, U.S.A.) を使用した.

4.2.2.5 MPA 溶液の調製 (10 mM)

MPA(比重: 1.22 g ml⁻¹) 8.7 μ l を無水エタノールで 10 ml に定容し, 10 mM の MPA 溶液を調製した.

4.2.2.6 希硫酸溶液の調製 (0.5 M)

95%硫酸溶液 (比重: 1.84 g ml⁻¹) 2.81 ml を 100 ml メスフラスコに蒸留水を用いて定容し, 0.5 M の希硫酸溶液を調製した.

4.2.2.7 水酸化カリウム溶液の調製 (0.1 M)

水酸化カリウム 561 mg を 100 ml メスフラスコに蒸留水で定容し, 0.1 M の水酸化カリウム溶液を調製した.

4.2.2.8 グルコース標準溶液の調製

D(+)-グルコース 2.5 g を秤量し，上記の PB (1.0 M, pH 7.8) を加えて 50 ml メスフラスコに超純水を用いて定容し，5000 mg dl⁻¹ のグルコース標準溶液を調製した．調製したグルコース標準液は，24 時間以上静置して溶液中のグルコース分子の平衡 (α 型及び β 型) が安定するまで冷蔵庫 (4°C) にて保存した．

4.2.2.9 AChE 標識抗原の調製

-20°C で保管しておいた AChE 標識抗原に ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分に攪拌した後，使用するまで 4°C で保管した．

4.2.2.10 抗-Cort 抗体の調製

-20°C で保管しておいた抗-Cort 抗体に ELISA 用緩衝液を 6.0 ml 加えて十分に攪拌した後，使用するまで 4°C で保管した．

4.2.2.11 コルチゾル標準試料の調製

マイクロテストチューブ (1.5 ml) に 99.8 %エタノールを分注し，ピペッティングを十分に行った．このピペットを用いて，-20°C で保管しておいた 400 ng ml⁻¹ のコルチゾル標準試料 750 μ l を取り，これに超純水 750 μ l を加えて 200 ng ml⁻¹ に希釈した．さらに，コルチゾル標準試料 (200 ng ml⁻¹) 375 μ l をマイクロテストチューブに取り，超純水 150 μ l を加えて 150 ng ml⁻¹ になるように希釈した．次に，コルチゾル標準試料 (200 ng ml⁻¹) 500 μ l をマイクロテストチューブに取り，超純水 500 μ l を加えて 100 ng ml⁻¹ に希釈した．その後，希釈操作を繰り返して，最終的に 1~200 ng ml⁻¹ のコルチゾル標準試料を調製した．

4.2.3 試験魚及び実試料の調製

4.2.3.1 試験魚

試験魚の飼育は 1.2.3.1 と同様に行った。

4.2.3.2 試験魚に対するストレス因子の負荷

本章では，ストレスを負荷または負荷していない個体を用いてコルチゾルの測定を行った。魚にストレスを負荷する方法として，①魚を網ですくい上げ，麻酔液に入れる前に 10 分間空気中に暴露する；②簡易ストロボスコープを 10 Hz に設定し，暗室の状態では魚に 15 分間照射する；③魚を 25 mg L⁻¹の亜硝酸塩含有の水槽中に 20 分間暴露する；④全長差がある供試魚（S：19.00 cm B：24.5 cm）を用いて同じ水槽内（45 × 30 × 30 cm）で 30 分間混遊させる（5 分間隔で 6 回採血）という手法を採用した。また，コントロールとしてストレスを負荷していない個体の採血も行った。

4.2.3.3 血漿試料の採取

血漿試料の採取は 1.2.3.2 と同様に行った。

4.2.4 酵素を利用した非標識イムノセンサの作製

4.2.4.1 電極の前処理

電極の前処理は 2.2.4.1 と同様に行った。

4.2.4.2 抗-Cortisol 抗体及び Gox の固定化

電極表面での抗体及び酵素の固定化手順を Fig. 4-2-1 に示す。まず、洗浄済の金電極を 10 mM MPA 溶液に 8 時間（室温）浸漬し、電極表面へ MPA の自己組織化単分子膜（SAM）を形成させた。次に、上記の電極を 0.25 ml の EDC 溶液（200 mg dl⁻¹, MES に溶解）に 15 分間浸漬させた。その後、上記の EDC 溶液に 0.25 ml の NHS 溶液（200 mg dl⁻¹, MES に溶解）を混合し、その中に電極を 105 分間浸漬させる（合計 120 分間）ことにより、MPA 末端のカルボキシル基を高活性エステル基に置換した。置換後、PB（1.0 M, pH 7.4）で調製した抗-Cortisol 抗体（タンパク濃度：0.06～0.07 mg ml⁻¹）及び Gox（718 units g⁻¹, 4.52 mg ml⁻¹）の混合溶液に浸漬し、4℃で一晩静置した。その後、電極を 1%の BSA 溶液中に 2 時間浸漬し、ブロッキングを行った。以上の操作より、非標識イムノセンサを作製した。

4.2.5 サイクリックボルタンメトリー（CV）を用いてセンサの電気化学的評価

4.2.5.1 測定システム

本実験で使用した測定システムは、酵素反応を利用した非標識イムノセンサ、高感度デュアル電気化学アナライザー（802 ALS, BAS 社製，東京，日本），セルスタンド（CS-3, BAS 社製，東京，日本）及び測定用パーソナルコンピュー

ター (PC) によって構成した。

4.2.5.2 システムのセットアップ及び測定プロトコルの設定

システムのセットアップは 2.2.5.2 に準じて操作した。なお、測定プロトコルは、初期電位を -0.2 V 、掃引範囲を $-0.2\text{ V}\sim 0.8\text{ V}$ (高電位を 0.8 V 、低電位を -0.2 V)、掃引方向を Positive、掃引速度を 0.1 V s^{-1} 、掃引回数を 30 回及び測定感度を $1.0\times 10^{-5}\text{ A V}^{-1}$ に設定した。

4.2.5.3 イムノセンサ作製過程における CV 測定

窒素ガスで脱気した 10 mM のグルコース溶液 15 ml 中に、各作製過程における非標識イムノセンサ (作用電極) を浸漬し、電気化学アナライザーを各ケーブル [5.0 cm の白金線 (対極, $\phi 6.0\text{ mm}$), 銀塩化銀 [Ag/AgCl] 電極 (参照電極, BAS 社製, 東京)] と接続した。その後、微小ノイズを軽減するため測定セルをセルスタンドに収納し、スタートコマンドを選択して測定を開始した。

4.2.6 アンペロメトリーを用いたセンサの測定

4.2.6.1 測定システム

3.2.6.1 と同様の測定システムを用いた。

4.2.6.2 システムのセットアップ及び測定プロトコルの設定

システムのセットアップは 3.2.6.2 と同様に操作した。

4.2.7 センサの電流減少率に及ぼす諸条件の影響

4.2.7.1 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応温度の影響

作製した非標識イムノセンサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後、500 mg dl⁻¹のグルコース溶液を用いてアンペロメトリー測定を行った。次に、20, 25, 30, 35, 40°Cの恒温槽内で、センサを 0.5 ml コルチゾル標準試料（10 ng ml⁻¹, pH 7.5）中に浸漬し、25 分間抗原抗体反応時間をさせた。その後、500 mg dl⁻¹のグルコース溶液中に再度浸漬して、アンペロメトリーによる測定を行った。

4.2.7.2 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響

作製した非標識イムノセンサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後、500 mg dl⁻¹のグルコース溶液を用いてアンペロメトリーによる測定を行った。次に、pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 の 0.1 M リン酸緩衝液を用いて 10 ng ml⁻¹のコルチゾル標準試料を調製した。その後、センサを 30°Cの恒温槽で各 pH のコルチゾル標準試料 0.5 ml 中に浸漬させ、25 分間抗原抗体反応させた。最後に、500 mg dl⁻¹のグルコース溶液中に再度浸漬して、アンペロメトリーによる測定を行った。

4.2.7.3 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

作製した非標識イムノセンサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後、500 mg

dl⁻¹ のグルコース溶液を用いてアンペロメトリーによる測定を行った。次に、センサを 30℃の恒温槽内でコルチゾル標準試料（10 ng ml⁻¹, pH 7.5）0.5 ml 中に浸漬させ、10, 15, 20, 25, 30 分間で抗原抗体反応させた。500 mg dl⁻¹ のグルコース溶液中に再度浸漬して、アンペロメトリー測定を行った。

4.2.8 コルチゾル標準試料を用いた測定

作製した非標識イムノセンサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後、500 mg dl⁻¹ のグルコース溶液を用いてアンペロメトリー測定を行った。次に、30℃の恒温槽内で調製した（4.2.2.11）各種濃度のコルチゾル標準試料（pH 7.5）0.5 ml 中に 25 分間浸漬させ、センサ上で抗原抗体反応を行った。その後、500 mg dl⁻¹ のグルコース溶液中に再度浸漬して、アンペロメトリー測定を行った。

4.2.9 センサの出力電流値に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響

作製した非標識イムノセンサの検出部を窒素ガスで乾燥させた後、500 mg dl⁻¹ のグルコース溶液でアンペロメトリー測定を行った。次に、卵成熟誘起ステロイド（DHP）、エストラジオール（Estradiol）、エストリオール（Estriol）及びテストステロン（Testosterone）の各種ステロイドホルモンを pH 7.5 リン酸緩衝液（0.1 M）を用いて 1~32 ng ml⁻¹ に調製した。その後、センサを 30℃の恒温槽内で調製した各種ステロイドホルモン溶液（0.5 ml）中に 25 分間浸漬させ、センサ上で抗原抗体反応を行った。その後、500 mg dl⁻¹ のグルコース溶液中に再度浸漬して、アンペロメトリー測定を行った。

4.2.10 イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定

4.2.10.1 センサを用いた測定

4.2.3.2 においてストレス因子を負荷した試験魚と、負荷していない試験魚から、1.1.3.2 に準じて採血を行い、遠心分離により血漿化した。次に、作製した非標識イムノセンサを 500 mg dl^{-1} のグルコース溶液に浸漬し、アンペロメトリー測定を行った。その後、センサを採取した血漿試料 0.5 ml 中に 25 分間浸漬し、センサ上で抗原抗体反応を行った。その後、再び 500 mg dl^{-1} のグルコース溶液中に再度浸漬して、アンペロメトリー測定を行った。

4.2.10.2 従来法(ELISA)を用いた測定

ELISA を用いた実試料の測定は 1.2.5.6 と同様に行った。

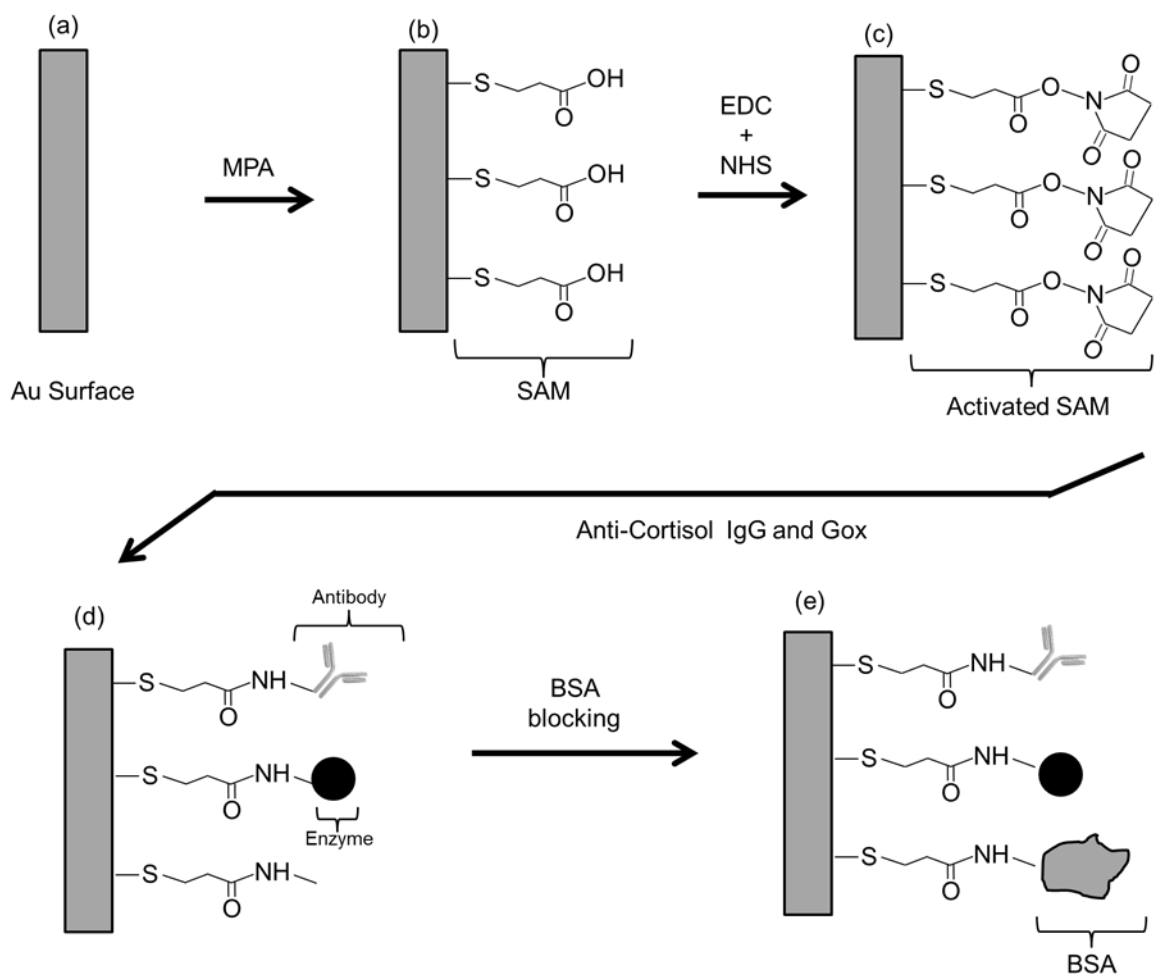


Fig. 4-2-1 電極表面での抗体及び酵素の固定化手順

4.3 結果及び考察

4.3.1 非標識イムノセンサの電気化学的評価と応答性

4.2.4.2 で述べたように、酵素を利用した非標識イムノセンサの作製では、裸電極、MPA を用いた電極表面での SAM の形成、EDC-NHS 反応による抗体及び酵素の固定化の 3 段階の過程における物理化学的な修飾を行った。本実験ではまず、CV 測定を用いて各段階修飾における電極の状態を電気化学的に解析し、各分子層の電極上への修飾の有無及び応答性を確認した。Fig.4-3-1 に CV 測定の結果を示す。この図から、鏡面状に処理した裸電極の CV 曲線 (a)、抗体を固定化した際の電極の CV 曲線 (b) に比べて、抗体及び酵素を固定化した電極の CV 曲線 (c) において、酸化電流の大幅な増加が認められる。CV を正方向に掃引した際に +0.65 V 付近に酸化ピーク電流が生じているのは、電極表面に酵素 (Gox) 及び抗体 (抗-Cort 抗体) を固定化したことによるものと考えられる。また、中国山東大学の Wu らの報告から推察すると、負方向掃引すると +0.3V 付近において現れたピークは低電位の際の触媒活性によるものと考えられる⁶⁰⁾。次に、抗原抗体反応前後の CV 曲線 (c) と (d) を比較すると、+0.65 mV の電位において酸化電流値の減少が認められる。これは、抗原抗体反応によって生成された複合体により、電極と基質 (グルコース) 間の電子移動が阻害されたためと考えられる。すなわち、抗原抗体複合体の生成により、グルコースと Gox の反応を妨げるような立体障害が生じたことと、複合体の生成による電気二重層の増加により電子移動が阻害されたためと推察される。一方、抗原抗体反応後の CV 曲線 (d) と (e) を比較すると、グルコースが存在しない CV 曲線 (e) においては電流値の大きな変化が認められないことから、CV 曲線 (c) 及び (d) において生じた酸化電流がグルコースの酸化反応によるものと推察で

きる。

以上の結果より，イムノセンサの各作製過程における電極上の分子層は，電極表面に確実に形成され，それが CV の応答として現れたものと考えられる。

4.3.2 センサの電流減少率に及ぼす諸条件の影響

本システムの測定原理は，イムノセンサを試料溶液に浸漬した際に形成される抗原抗体反応複合体が，電極表面の電子移動を阻害するため，この時の電流減少率から抗原濃度を測定する原理に基づいている。そのため，より効率的な測定を実現するためには，センサの出力に及ぼす最適な抗原抗体反応条件を確認する必要がある。

本章ではまず，前章と同様にイムノセンサシステムの最適反応条件（温度，pH，時間）について検討した。

4.3.2.1 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応温度の影響

センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応温度の影響を検討するため，コルチゾル標準溶液（濃度：10 ng ml⁻¹）を用い，温度を 20～40℃の 5 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 4-3-2 に示す。この図より，温度 30℃までは電流減少値の増加が確認されたが，それ以上の温度では減少した。これは，10～30℃の間において温度が上昇するに伴って，抗原抗体間の分子運動が速くなり，抗原と抗体の遭遇率が上昇するためであると考えられる。一方，反応温度が 30℃を超えた場合には，電極に固定化した抗体が温度上昇の影響で変性したか，あるいは高温により複合体の解離速度が増加して抗体と抗原との親和力が低下したため，センサの出力が減少したと考えられる。したがって本章では，抗原

抗体における最適反応温度を 30℃ に設定した。

4.3.2.2 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応 pH の影響

センサの電流減少率に及ぼす pH 影響を検討するため、コルチゾル標準溶液（濃度：10 ng ml⁻¹）を用い、反応溶液の pH を 6.5 ～ 8.5 までの 5 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 4-3-3 に示す。この図より、pH 7.5 の際に最大の電流減少率が認められ、その前後の pH では小さな値を示した。これは pH の変化が抗原抗体反応における解離速度に影響し、抗体の抗原に対する親和力が低下したためと考えられる。したがって本章では、抗原抗体反応における最適反応 pH を 7.5 に設定した。

4.3.2.3 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応時間の影響を検討するため、コルチゾル標準溶液（濃度：10 ng ml⁻¹）を用いて、反応時間を 10～30 分の 5 段階に設定して測定を行った。結果を Fig. 4-3-4 に示す。この図から反応時間が 25 分を超えると電流減少値は一定の値になり、平衡状態に達していることが認められる。この結果は第二章で行った同様の実験結果と比べると大きな差がある。その理由として、電極表面に固定化された分子が抗体だけではなく、酵素も固定されていることが原因であると考えられる。すなわち、酵素の固定化により電極表面の分子構造が複雑になると、抗体と抗原との反応効率がそれらの立体障害により低下することが予想される。そのため、抗原抗体反応が平衡状態になるためには、第三章の結果と比べて長い時間を必要としたと考えられる。以上の結果から本章においては、抗原抗体反応の最適反応時間を 25 分に設定した。

4.3.3 コルチゾル標準試料の検量線

上記最適使用条件の下で，コルチゾル標準試料を用いて本センサの検量線を作成した (Fig. 4-3-5)．図中，横軸はコルチゾル濃度を，縦軸は電流減少率を示す．この図より，コルチゾル標準試料 $1 \sim 200 \text{ ng ml}^{-1}$ の範囲内で良好な直線関係 ($R = 0.964$) が確認された．また，1検体の分析所要時間は，センサの出力電流値が得られるまでに5分，抗原抗体反応時間を含めても約30分で可能であった．

一方，第三章におけるイムノセンサの測定範囲はコルチゾル濃度 $1 \sim 40 \text{ ng ml}^{-1}$ であったのに対し，本章の酵素を利用したセンサの測定範囲は $1 \sim 200 \text{ ng ml}^{-1}$ となった．この結果から，コルチゾルの最大測定値が 40 ng ml^{-1} から 200 ng ml^{-1} の約5倍に向上したことになり，酵素を利用することで測定ダイナミックレンジの拡大が認められた．前章でも述べたように，実際の魚類の血漿中のコルチゾル濃度は，数十から数百 ng ml^{-1} まで変動するため，第二章で製作したセンサを用いて実際の試料を測定する場合，試料となる血漿を希釈する操作が必要であった．しかし，本イムノセンサは，測定最大値が 200 ng ml^{-1} であるため，ストレス因子によるコルチゾルの変動範囲に対して^{13,25)}，実試料を希釈せずとも血漿試料をそのまま測定できる可能性がある．また，第三章のシステムは電子メディエーターとしてフェリシアン化カリウムを用いていたため，生体や環境への毒性が懸念されていたが，本システムはGoxとグルコースの酵素反応を利用しているため，生体や環境に対してやさしいセンサの構築ができたといえる．

4.3.4 センサの電流減少率に及ぼす各種ステロイドホルモンの影響

コルチゾル以外の各種ステロイドホルモン (DHP, Estradiol, Estriol, Testosterone) の標準試料を用いて, センサの電流減少率に及ぼす影響を検討した. 結果を Fig. 4-3-6 に示す. この図から, コルチゾルに対しては濃度と共にセンサ出力の増加が認められるが, 他種ステロイドホルモンを用いた測定においてセンサの応答は確認されなかった. したがって, 本センサは, コルチゾルに対して高い特異性を有し, その定量が可能であることがわかった.

4.3.5 イムノセンサを用いた魚類血中コルチゾル濃度の測定

実試料への適用として, 本イムノセンサを用いて魚類 (ティラピア) の血中コルチゾル濃度を測定し, 従来法 (ELISA) の測定結果と比較検討した. 前述のように, 本センサシステムは測定最大値が 200 ng ml^{-1} であったため, 血漿試料を希釈せずに測定が可能であると考えられる. まず, 魚がストレスを受けた時のコルチゾルの経時的変化をモニタリングするために, 個体間の相互作用 (4.2.3.2-④) によるストレス応答を測定した. 結果を Fig.4-3-7 に示す. 図中の点は試験魚 S の血漿試料を用いて本システム (●) と ELISA (○) による測定結果を示す. この図より, 実験開始後, 試験魚 S が直ちにストレスを受け, 一時的にコルチゾルの濃度が増加し, 時間の経過と共に, 血中コルチゾル濃度が徐々に減少する傾向が認められた. このコルチゾルの変動は第一章で行った実験 (1.2.7.5) と類似している傾向が認められた. そのため, 本システムを用いることで従来法である ELISA と同様に魚の血中コルチゾルの変動を把握することができると思われる.

一方, 個体間の相互作用以外にも, 各種ストレス因子 (空気暴露, 閃光刺激,

亜硝酸塩暴露)を魚に負荷し、その血中コルチゾル濃度の変動を測定した。その結果を Fig. 4-3-8 に示す。結果より、本システムの測定値と ELISA の測定結果との間には、17.30~183.93 ng ml⁻¹ の濃度範囲において高い相関関係が認められる (相関係数 : 0.981)。また、ストレス因子の種類によるコルチゾル濃度の変動に着目すると、「空気暴露 > 閃光刺激 ≧ 亜硝酸塩暴露 > コントロール) の順になっている。魚のストレス因子を見分けるには、外観だけではなく、コルチゾルをはじめ体内のストレス指標の変化を総合的に考えることが大切であると考えられる。

4.4 結言

本章では、魚類血中コルチゾル濃度の迅速かつ簡便な測定法の確立を目的に、電極上に抗体及び酵素を固定化し、新規の非標識イムノセンサを作製した。すなわち、コルチゾルと抗-コルチゾル抗体の抗原抗体反応により生じた抗原抗体複合体の形成によって、Gox とグルコースの酵素反応から得られた電極活性物質の電子移動が阻害され、電流値が変化する現象を利用することで、コルチゾルの定量を試みた。以下に本章の結果を要約する。

1) 酵素を固定化した非標識イムノセンサの各作製過程において電気化学的評価を行ったところ、電極上の分子層は電極表面に確実に形成されていることがわかった。

2) 本センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応条件の影響を検討したところ、温度：30℃、pH：7.5、時間：25分間の条件が最適であった。

3) 上記最適反応条件下で、コルチゾル標準試料を用いて検量線を作成したところ、1~200 ng ml⁻¹の範囲においてセンサの電流減少値との間に直線関係が認められた（相関係数：0.964）。また、1検体の分析所要時間は、抗原抗体反応時間を含めても約30分で可能であった。

4) 魚類の血中に存在するコルチゾル以外の各種ステロイドホルモンを用いてイムノセンサの特異性を検討したところ、本センサはコルチゾル以外のホルモンには応答しないことが確認でき、高い特異性を有していることがわかった。

5) 本システムを用いて試験魚（ティラピア）の血漿コルチゾル濃度の測定を行ったところ、従来法（ELISA）による測定値との間に高い相関性が認められた（ $R=0.981$ ）。また、本センサの測定最大値が 200 ng ml^{-1} であったため、血漿試料を希釈せずに測定することが可能であった。

以上より本章では、電極上に抗体と酵素を同時に固定化することにより高い測定ダイナミックレンジを有するイムセンサが構築でき、酵素反応を利用することにより、第二章及び第三章で作製したセンサに比べて、生体や環境にやさしい測定法を確立することができた。

今後は、本章で試作したセンサの原理を前章のフローチェンジャーシステムに適用し、これを小型化することにより、魚体に装着可能な連続測定システムの構築を目指すことを試みたいと考えている。

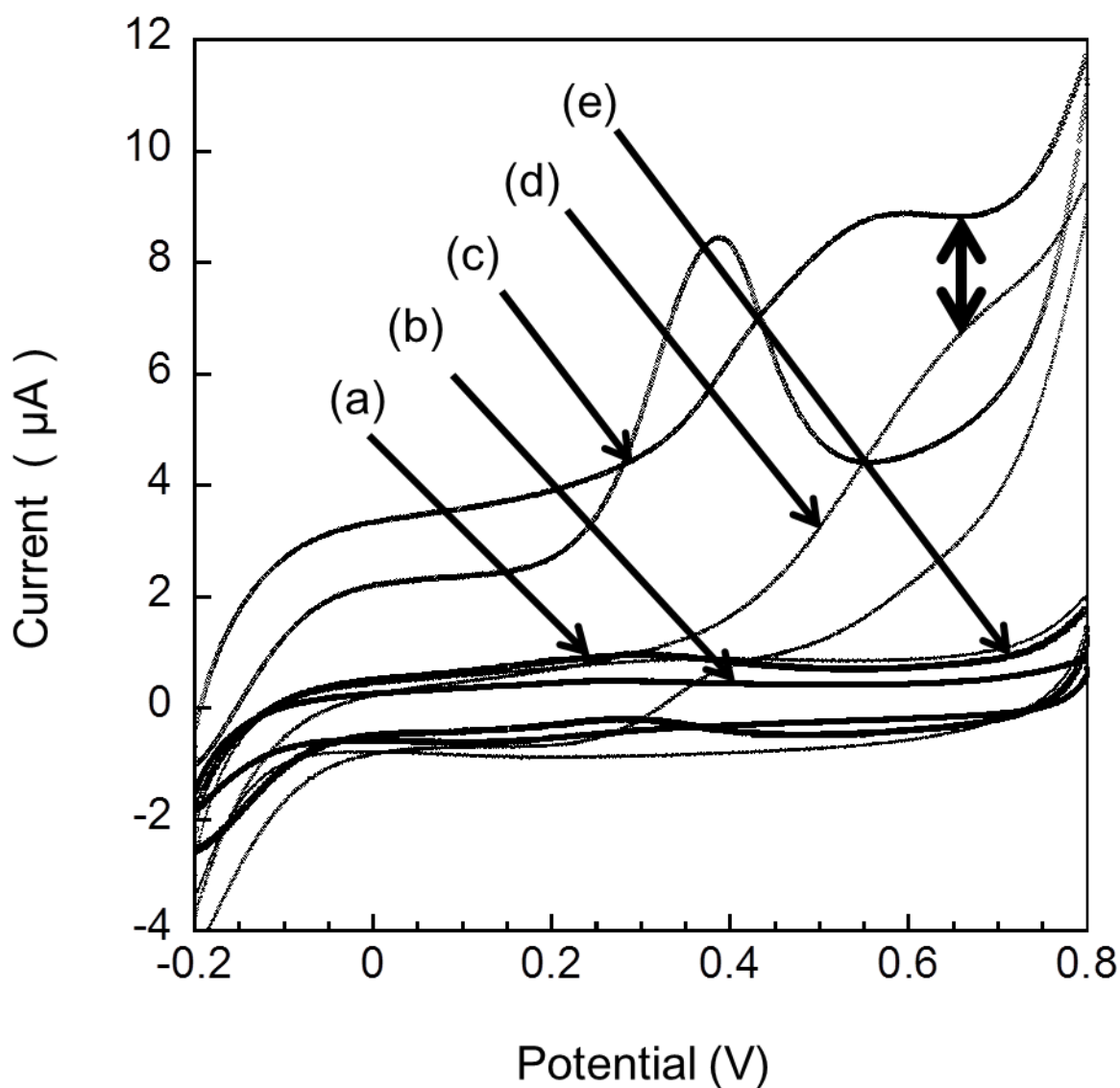


Fig. 4-3-1 非標識イムノセンサの電気化学的評価
 (掃引範囲: -0.2~0.8 V; 掃引速度: 0.1 V sec⁻¹)

- (a) Au電極
- (b) SAM/Au電極
- (c) 抗原抗体反応前 (BSA/抗体及び酵素/SAM/Au電極)
- (d) 抗原抗体反応後 (BSA/抗体及び酵素/SAM/Au電極)
- (e) 抗原抗体反応後 (BSA/抗体及び酵素/SAM/Au電極, グルコースフリー)

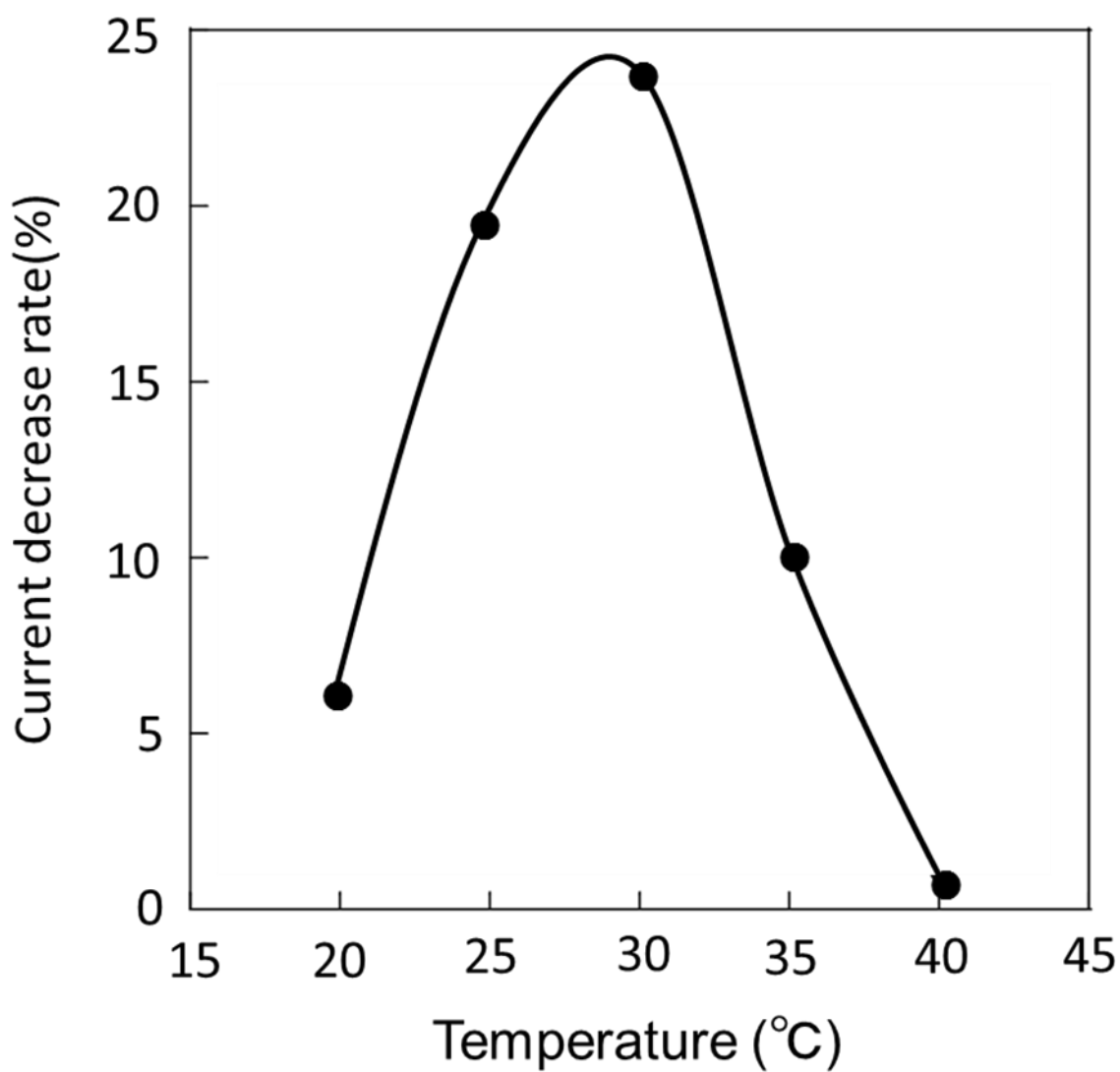


Fig. 4-3-2 センサの電流減少率に及ぼす抗原抗体反応温度の影響

コルチゾル濃度: 10 ng ml^{-1} ; 反応時間: 25 min; pH 7.5

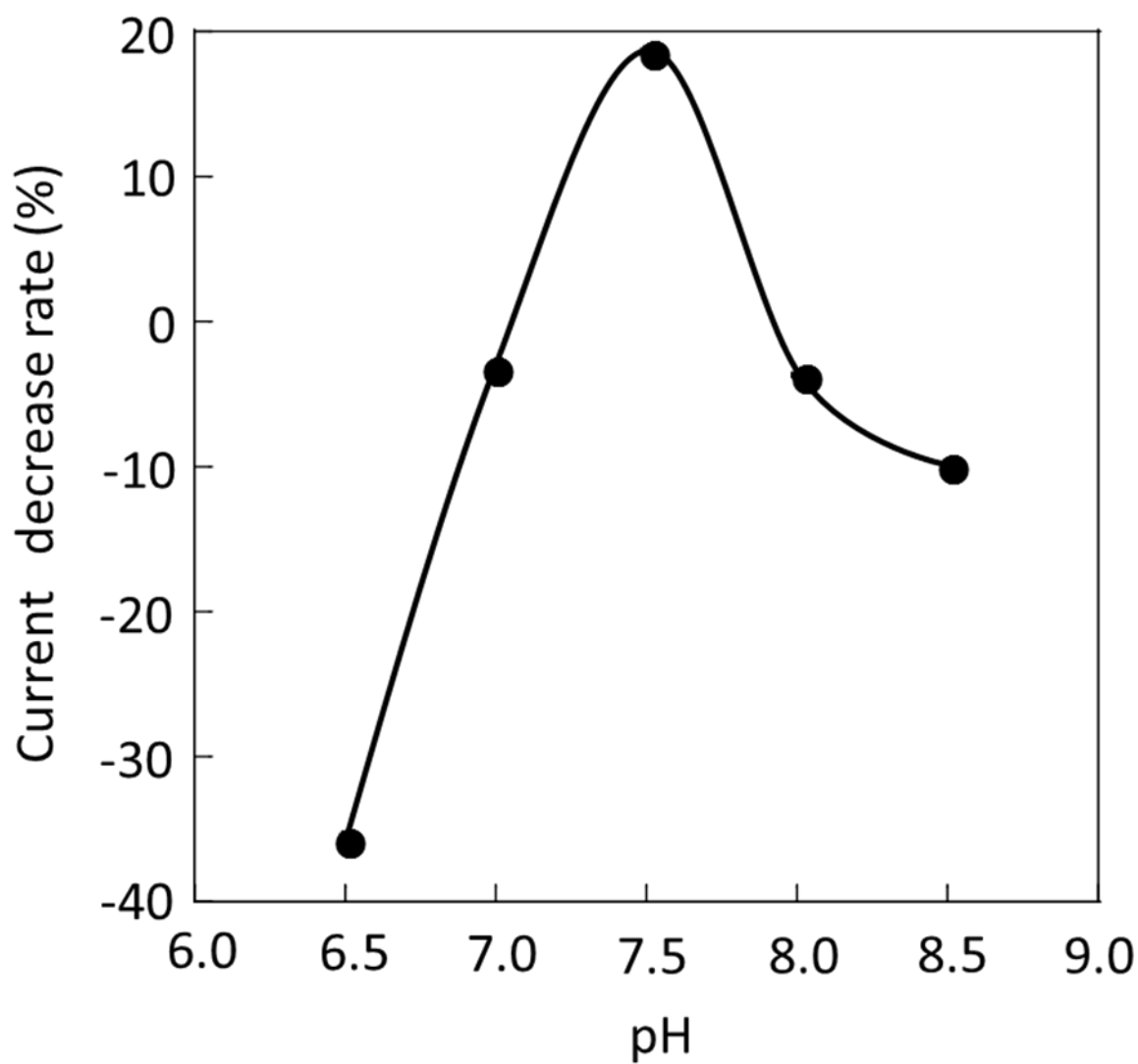


Fig. 4-3-3 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応pHの影響

コルチゾル濃度: 10 ng ml^{-1} ; 反応時間: 25min;
反応温度: 30°C ;

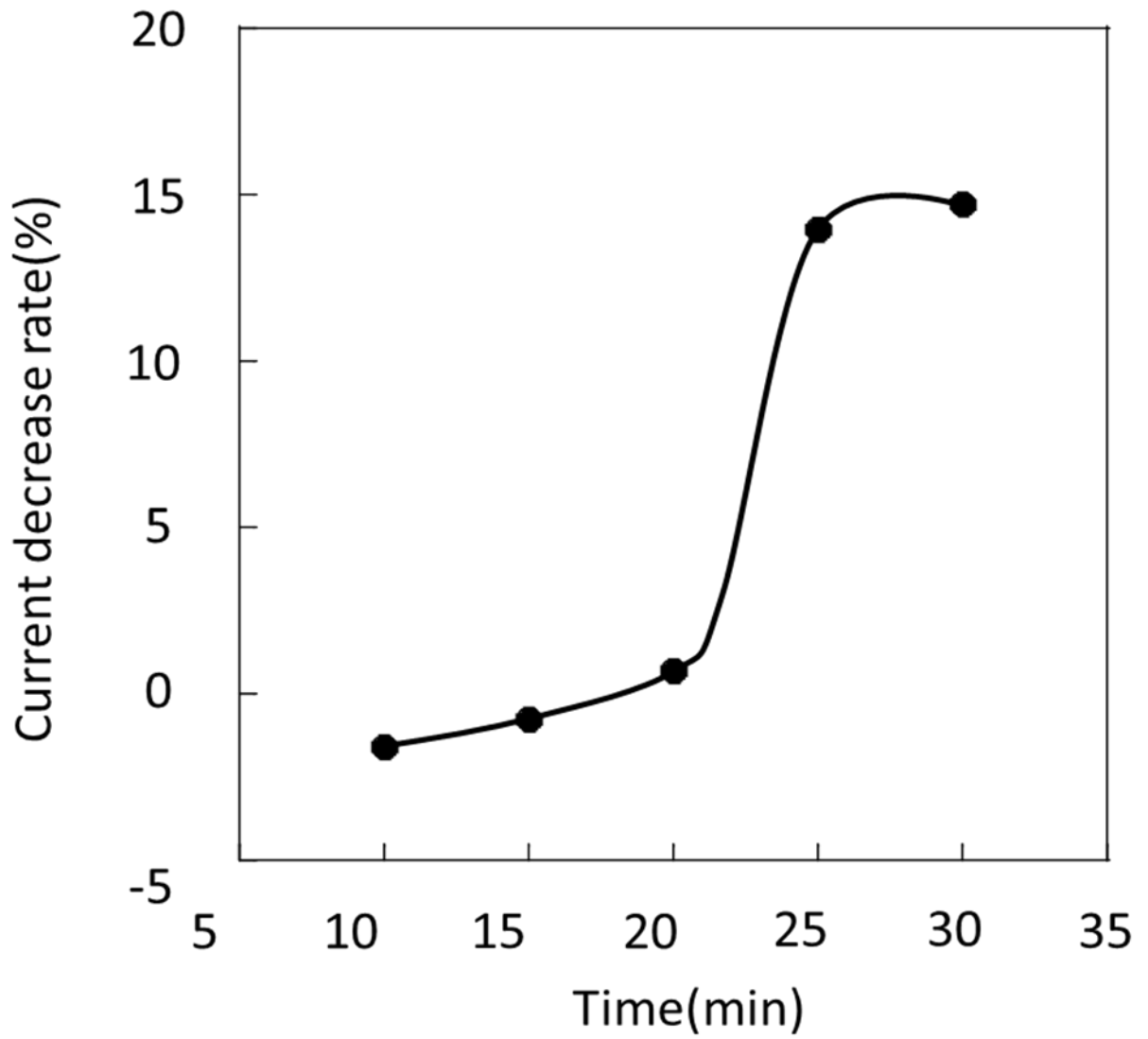


Fig. 4-3-4 センサの出力電流値に及ぼす抗原抗体反応時間の影響

コルチゾル濃度: 10 ng ml^{-1} ; 反応pH: 7.5;
反応温度: 30°C ;

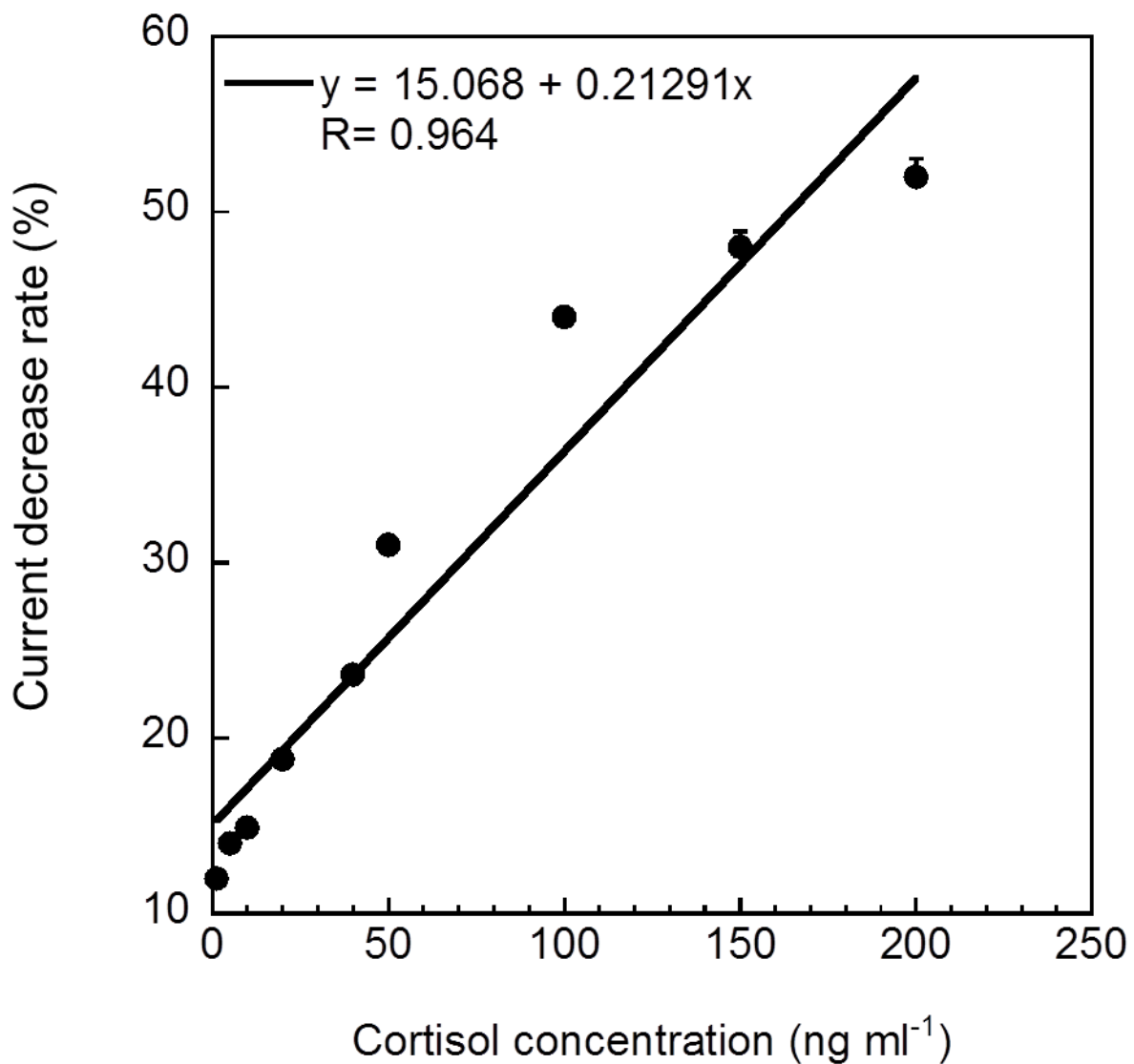


Fig. 4-3-5 コルチゾル濃度と電流減少率の相関

反応温度: 30 °C; 反応pH: 7.5; 反応時間: 25min;

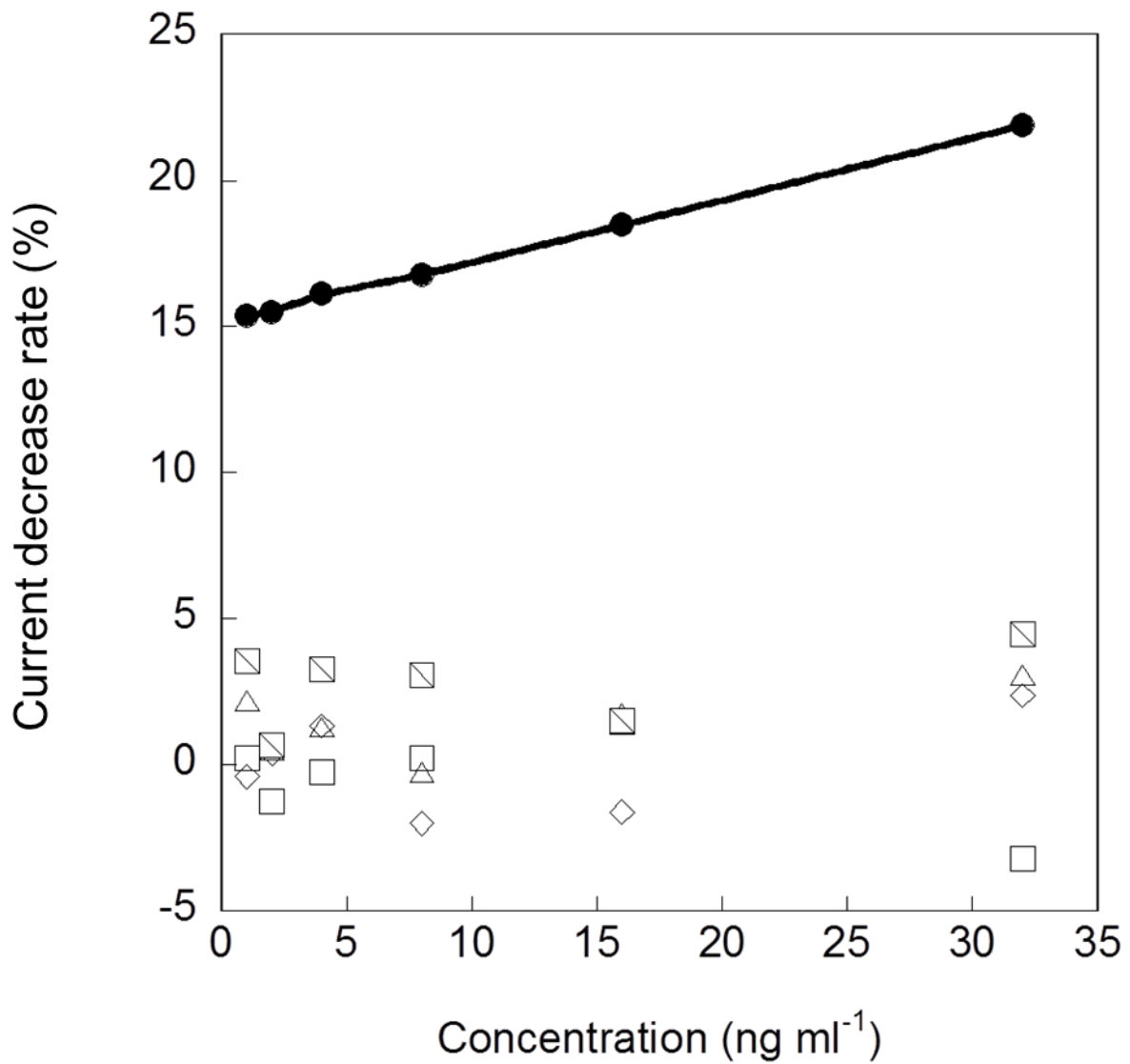


Fig. 4-3-6 非標識イムノセンサの特異性

反応温度: 30 °C; 反応pH: 7.5; 反応時間: 25min;

● : Cortisol; □ : DHP; ◇ : Estradiol;
 △ : Estriol; ◼ : Testosterone

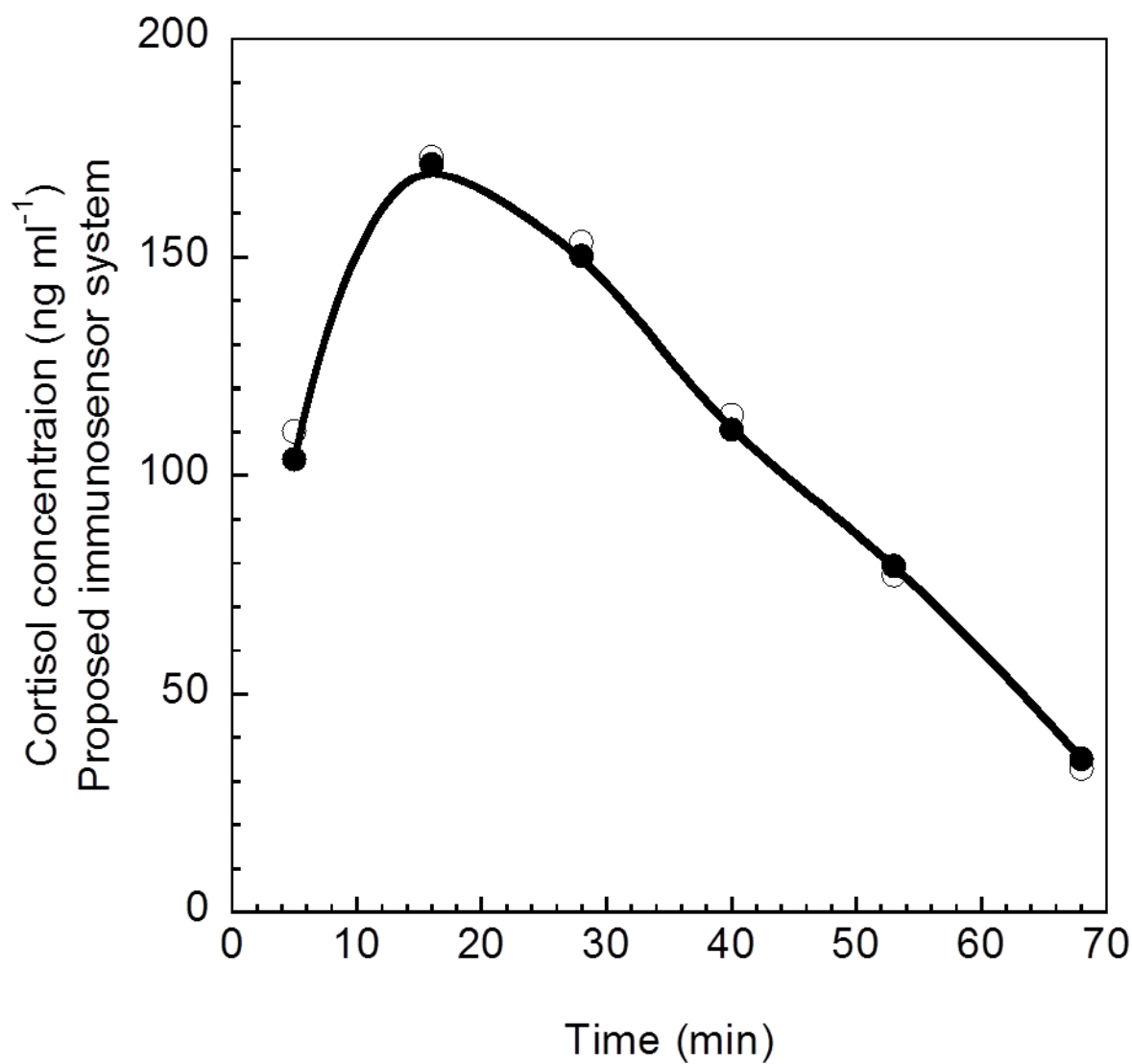


Fig. 4-3-7 本システムと従来法による測定値の相関性

反応温度: 30 °C; 反応pH: 7.5; 反応時間: 25 min;

- : proposed immunosensor system
- : conventional ELISA method

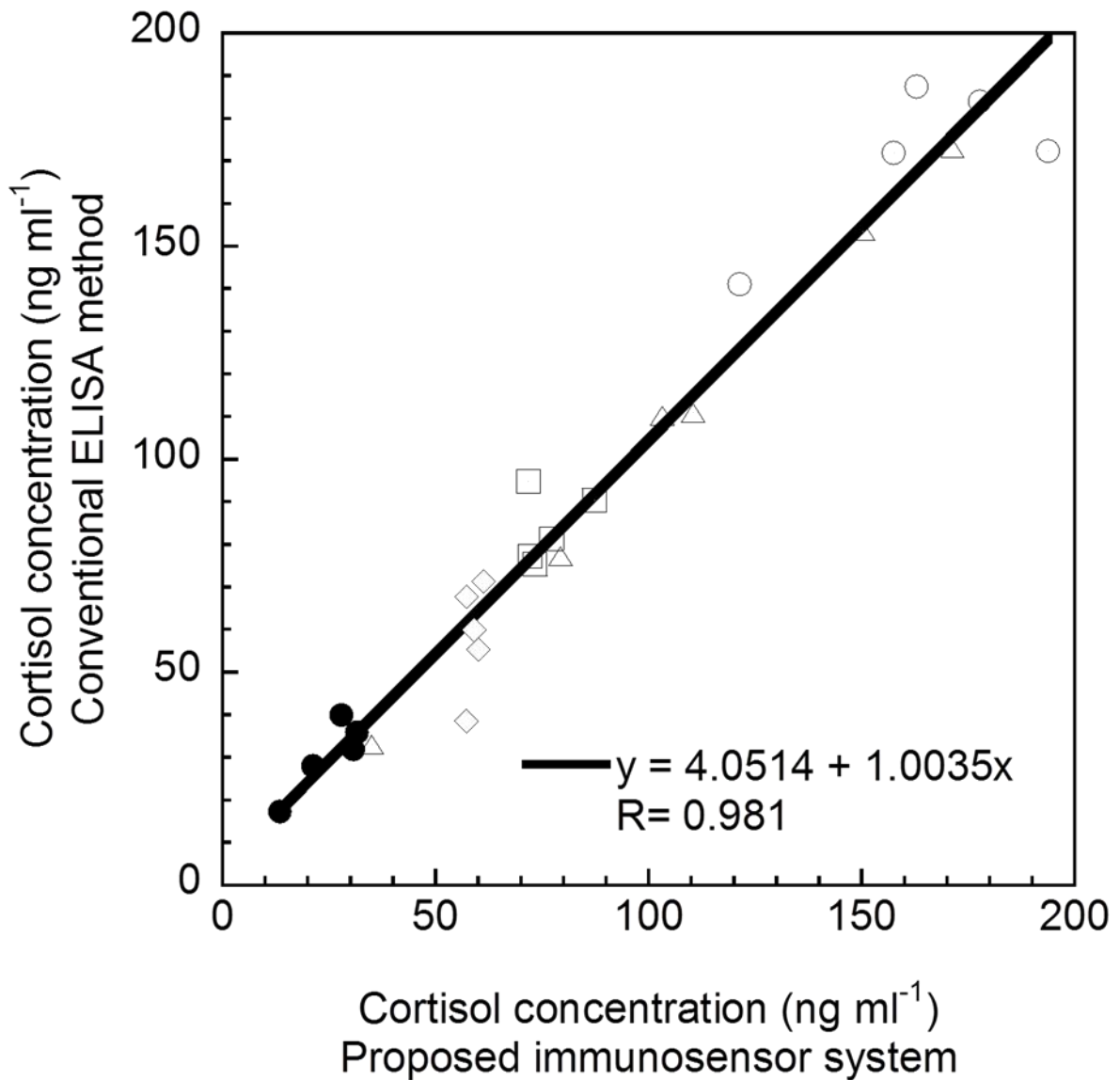


Fig. 4-3-8 本システムと従来法による測定値の相関性

反応温度: 30 °C; 反応時間: 25 min;

- : Unstressed fish (control)
- : Stressed fish (air exposure)
- : Stressed fish (light stimulation)
- ◇ : Stressed fish (nitrite exposure)
- △ : Stressed fish (interaction with other individual)

結論

本研究は、魚のストレス指標の物質を迅速かつ簡便な測定を実現するため、抗体を分子識別素子として電極表面に固定化し、これに CV 及びアンペロメトリーという電気化学的手法を組み合わせることで、新しいストレス応答測定用バイオセンサシステムを構築した。以下、本研究で得られた知見を述べる。

1) ティラピア (*Oreochromis niloticus*) に各種ストレスを負荷することにより、試験魚の血中コルチゾル及びグルコース濃度の経時的モニタリングを試みた。その結果、コルチゾル濃度はストレスを受けた直後に増加し、その後すぐに減少する変動が認められた。一方、グルコース濃度については、コルチゾル濃度が減少し始めた頃から徐々に増加し、その後の減少も緩やかに変化した。以上の結果より、魚類の総合的なストレス応答を正確に把握するには、両指標物質の経時的変動を把握する必要があることが明らかとなり、特に迅速・簡便な血中コルチゾル濃度測定用バイオセンサの開発が必須であることがわかった。

2) コルチゾル測定のための新しい手法の確立を目的に、免疫反応と電気化学測定法を応用したイムノバイオセンサの開発を行った。まず、自己組織化単分子膜を利用して抗-コルチゾル抗体を金電極表面（センサ表面）に固定化し、さらにセンサの出力を増幅するために導電性が高い単層カーボンナノチューブ (SWCNT) をセンサ表面に修飾することにより、イムノバイオセンサを製作した。このセンサをコルチゾルが含まれる試料溶液に浸漬し、サイクリックボルタンメトリーで解析することによりコルチゾルの定量を試みた。その結果、SWCNT を固定化することによりコルチゾル濃度が $156\sim 10,000\text{ pg ml}^{-1}$ の範囲において、センサの電流減少値との間に良い相関関係が認められた。また、試験魚の血漿試料を用いた測定では、SWCNT を利用した非標識イムノセンサを用いることで、従来法のように煩雑な前処理及び洗浄操作を必要とせず、血中コルチゾル濃度を迅速かつ簡

便に測定することを可能にした。

3) コルチゾルの連続測定を可能にするために、イムノバイオセンサの迅速交換が可能なフローチェンジャーシステムを設計・製作し、コルチゾル濃度を連続的に測定できるシステムを構築した。本システムを用いてコルチゾルを連続的に測定したところ、 $0\sim 40\text{ ng ml}^{-1}$ の濃度範囲でその定量が可能であった。また、製作したチェンジャーにおけるバイオセンサの交換は数秒で可能であり、コルチゾルの迅速・簡便かつ連続的な測定を実現できた。

4) イムノバイオセンサの魚体内への留置を目的に、酵素反応を利用した生体に優しいコルチゾル測定用センサシステムの開発を試みた。すなわち、電極表面上に抗コルチゾル抗体と共にグルコースオキシダーゼを固定化することによって、細胞への毒性が極めて低い新しいイムノバイオセンサを構築した。本センサを用いてコルチゾルの測定を試みたところ、 $1\sim 200\text{ ng ml}^{-1}$ の濃度範囲での定量が可能であり、魚類の血漿試料を希釈せずに測定することができた。

以上より本研究では、抗原抗体反応を利用したイムノバイオセンサを製作し、魚類の重要なストレス指標であるコルチゾルの迅速・簡便な測定を可能にした。次に、イムノセンサを新規に開発したフローシステム組み込むことにより、コルチゾルの連続的な測定を可能にした。また、酵素反応を用いて、生体に優しく、広いダイナミックレンジを有す新しいバイオセンサシステムを構築することができた。これからの水産分野での研究の方向性を鑑みると、魚類のストレス指標を迅速・簡便にモニタリングできるバイオセンサの開発研究は更に盛んになっていくものと考えられる。本研究で得られた成果は、魚類のストレス応答の研究をはじめ、魚類行動学、魚類生理学、魚類養殖学などの分野における研究発展に新たな知見を提供できる可能性があり、その学術的意義は極めて大きいと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始，懇篤なる御指導及び鞭撻を賜りました東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科 生体機能利用学研究室 遠藤英明教授に心より感謝の意を表します．また，有益な御意見と激励を賜りました同大学院電子デバイス研究室 大貫等教授及び同大学院生体機能利用学研究室 任恵峰准教授に厚く御礼を申し上げます．

本論文をまとめるにあたり，校閲を賜った同大学院 水圏生態化学研究室 永井宏史教授に心より御礼を申し上げます．また，研究を遂行するあたり，貴重なご助言を頂きました，同大学院 魚群行動学研究室 有元貴文教授，東北大学大学院 農学研究科 水産資源化学研究室 中野俊樹助教，ならびに東京大学大学院 農学生命科学研究科 水産化学研究室 潮秀樹教授，無線測定のための機器及びソフトウェアについてご協力いただきました，北海道立函館工業技術センター 村田 政隆氏，単層カーボンナノチューブを提供して頂いた信州大学カーボン科学研究所 八名純三氏に深く感謝の意を表します．

さらに，いつも本研究をご支援下さった國學院大学栃木短期大学 家政学科 日比香子准教授，生体機能利用学研究室の櫻井太郎氏を始めとする学生の皆様，電子デバイス研究室の王慧慧氏，次村海輝氏に改めて感謝申し上げます．

最後に，本研究を行うにあたり，多大なご理解とご支援を頂いた両親ならびに，愛妻王琳に心から感謝の意を表とともに，お礼申し上げます．

参考文献

- 1) Food and Agriculture Organization, Glossary of Aquaculture, Rome, 2008.
- 2) 水産庁, 水産白書 (平成 27 年度), 2016.
- 3) 水産庁, 水産白書 (平成 26 年度), 2015.
- 4) M.M. Vijayan, G. Feist, D.M.E. Otto, C.B. Schreck, T.W. Moon, Tetrachlorobiphenyl affects cortisol dynamics and hepatic function in rainbow trout, *Aquat. Toxicol.* **37**, 87-98 (1997)
- 5) H. Bleau, C. Daniel, G. Chevalier, H.V. Tra, A. Hontela, Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, T3, T4, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat. Toxicol.* **34**.221-235 (1996)
- 6) K. Ogawa, F. Ito, M. Nagae, T. Nishimura, M. Yamaguchi, A. Ishimatsu, Effects of Acid Stress on Reproductive Functions in Immature Carp, *Cyprinus Carpio*. *Water Air Soil Pollut.* **130**. 887-892 (2001)
- 7) H. Ishioka, Changes of haematological constituents of red sea breams exposed to ambient oxygen reduction, *Nippon Suisan Gakkaishi* **48**. 165 -170 (1982)
- 8) H. Ishioka, Stress reactions in marine fish, *Nippon Suisan Gakkaishi* **46**. 523-531 (1980)
- 9) B.A. Barton, G.K. Iwama, Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids, *Annu. Rev. Fish. Dis.* **1**. 3-26 (1991)
- 10) P. Thomas and L. Robertson, Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate, *Aquaculture* **96**.

69-86 (1991)

- 11) S.E. Fevolden, T. Refstie, B. Gjerde, Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout, *Aquaculture* **118**. 205-216 (1993)
- 12) E.K. Silbergeld, Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress in fish, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **11**. 20-25 (1974)
- 13) 会田 勝美 (編), 金子 豊二 (編), 魚類生理学の基礎, 恒星社厚生閣 (東京), 2013.1.
- 14) 川村 吉也, 佐藤 猛, 久保 伸, 赤野 裕文, 黒沢 尋, 中村 和夫, 天野 義文, 伊藤 誉志男, 藤巻 正生, バイオセンサ法による食品中の亜硫酸の測定, *日本食品工業学会誌* **3**. 233-238 (1992)
- 15) A.H. Nguyen, S.J. Sim, Nanoplasmonic biosensor: Detection and amplification of dual bio-signatures of circulating tumor DNA, *Biosens. Bioelectron.* **67**. 443-449 (2015)
- 16) J.T. Baca, V. Severns, D. Lovato, D.W. Branch, R.S. Larson, Rapid Detection of Ebola Virus with a Reagent-Free, Point-of-Care Biosensor, *Sensors* **15**. 8605-8614 (2015)
- 17) 軽部 征夫 (監修), バイオセンサー, シーエムシー出版 (東京), 2002.5.
- 18) 水産庁, 水産白書 (平成 25 年度), 2014.
- 19) N.M. Abu-Elala, R.M. Abd-Elsalam, S. Marouf, M. Abdelaziz, M. Moustafa, Eutrophication, Ammonia Intoxication, and Infectious Diseases: Interdisciplinary Factors of Mass Mortalities in Cultured Nile Tilapia, *J. Aquat. Anim. Health* **28**. 187- 198 (2016)
- 20) 中田 誠, ぜひ知っておきたい日本の水産養殖～人の手で育つ魚たち～, 幸書房 (東京), 2008.2.
- 21) 出村 雅晴, 魚類養殖における環境問題と対応の現状, *調査と情報*, **11**, 4-8 (2015)

- 22) 山本 義博, 森 京子, 環境改善型複合養殖実証事業, 大分県農林水産研究センター水産試験場事業報告, 115-117 (2008)
- 23) 三吉 泰之, 福田 穰, 安心・安全で環境に優しい養殖推進事業, 大分県農林水産研究センター水産試験場事業報告, 107-119 (2011)
- 24) M. Maita, K. Satoh, Y. Fukuda, H. K. Lee, J. R. Winton, N. Okamoto, Correlation between plasma component levels of cultured fish and resistance to bacterial infection. *Fish Pathol.* **33**. 129-133 (1998)
- 25) 川本 信之編, 魚類生理, 恒星社厚生閣 (東京), 1977.1
- 26) S. Rodriguez-Mozaz, M. J. L. Alda, D. Barcelo, Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry Method, *Anal. Chem.* **76**, 6998-7006 (2004)
- 27) A. Yamamoto, N. Kakutani, K. Yamamoto, T. Kamiura, H. Miyakoda, Steroid Hormone Profiles of Urban and Tidal Rivers Using LC/MS/MS Equipped with Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization Sources, *Environ. Sci. Technol.* **40**. 4132-4137 (2006)
- 28) R. S. Yalow, S. A. Berson, Immunoassay of endogenous plasma insulin in man, *J. Clin. Invest.* **39**, 1157-1175 (1960)
- 29) 岩崎 辰夫 (著), 単クローン抗体—ハイブリドーマと ELISA, 講談社 (東京), 1983.2.
- 30) L.C. Clark Jr., C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of The New York Academy of Sciences* **102**. 29-45 (1962)
- 31) S.J. Updike, G.P. Hicks, The enzyme electrode, *Nature*, 214. 986-988 (1967)
- 32) H. Endo, Y. Yonemori, K. Hibi, H. Ren, T. Hayashi, W. Tsugawa, K. Sode, Wireless enzyme sensor system for real-time monitoring of blood glucose levels in fish,

- Biosens Bioelectron. **24**. 1417-1423 (2009)
- 33) J. Janata, Immuno-electrode, J. Am. Chem. Soc. **97**, 2914-2916 (1975)
- 34) G. K. Ahirwal, C. K. Mitra, Gold nanoparticles based sandwich electrochemical immunosensor, Biosens. Bioelectron. **25**, 2016-2020 (2010)
- 35) A. L. Ghindilis, R. Krishnan, P. Atanasov, E. Wilkins, Flow-through amperometric immunosensor: Fast sandwich scheme immunoassay, Biosens. Bioelectron. **12**, 415-423 (1997)
- 36) M.E. Seligmann, Learned helplessness, Ann. Rev. Med. **23**. 407-412 (1972)
- 37) J.V. Brady, R.W. Porter, D.G. Conrad, J.W. Mason, Avoidance behavior and the development of gastroduodenal ulcers, J. Exp. Analysis Behav. **1**. 69-72 (1958).
- 38) H.E. Fox, S.A. White, M.H. Kao, R.D. Fernald, Stress and dominance in a social fish, J. Neurosci. **17**. 6463-6469 (1997)
- 39) H. Tewari, T.S. Gill, J. Pant, Impact of chronic lead poisoning on the hematological and biochemical profiles of a fish, *Barbus conchoni* (Ham), Bull. Environ. Contam. Toxicol. **38**. 748-752 (1987)
- 40) W. Davison, The Effects of Exercise Training on Teleost Fish, a Review of Recent Literature, Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. **117**. 67-75 (1997)
- 41) S. Smith, L. Bernatchez, L.B. Beheregaray, RNA-seq analysis reveals extensive transcriptional plasticity to temperature stress in a freshwater fish species, BMC Genomics **14**. 375 (2013)
- 42) M. Takase, E. Takahashi, M. Murata, H. Ohnuki, K. Hibi, H. Ren, H. Endo, Development of a biocompatible glucose biosensor for wireless and real time blood glucose monitoring of fish, Int. J. Environ. Anal. Chem. **93**. 125-139 (2013)
- 43) M. Takase, Y. Yoneyama, M. Murata, K. Hibi, H. Re, H. Endo, Carbon nanotube

- enhanced mediator-type biosensor for real-time monitoring of glucose concentrations in fish, *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1187-1190 (2012)
- 44) P.O. Fromm, A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress, *Environ. Biol. Fishes.* **5**, 79-93 (1980)
- 45) A. Arillo, C. Margiocco, F. Melodia, P. Mensi, G. Schenone, Ammonia toxicity mechanism in fish: Studies on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) , *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **5**, 316-328 (1981)
- 46) S.E.W. Bonga, The stress response in fish, *Physiol. Rev.* **77**, 591-625 (1997)
- 47) A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chem. Rev.* **96**, 1533-1554 (1996)
- 48) N. K. Chaki, K. Vijayamohanan, Self-assembled monolayers as a tuneable platform for biosensor applications, *Biosens. Bioelectron.* **17**, 1-12 (2002)
- 49) W. Limbut, P. Kanatharana, B. Mattiasson, P. Asawatreratenakul, P. Thavarungkul, A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed for thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid, *Biosens. Bioelectron.* **22**, 233-240 (2006)
- 50) 電気化学会 (編), 電気化学測定マニュアル (基礎編), 丸善株式会社, 1998.7.
- 51) C.M Tilmaci, M.C. Morris, Carbon nanotube biosensors, *Front Chem.* **3**, 59 (2015)
- 52) N. Yang, X. Chen, T. Ren, P. Zhang, D. Yang, Carbon nanotube based biosensors, *Sens. Actuators, B* **207**, 690-715 (2015)
- 53) 松本 泰人, 抗原抗体反応, 文芸社 (東京), 2002.4.
- 54) D. W. Mason, A.F. Williams, The kinetics of antibody binding to membrane antigens in solution and at the cell surface, *Biochem. J.* **187**, 1-20 (1980)
- 55) 上本 道久, 検出限界と定量下限の考え方, 入門講座 (分析の信頼性を支えるもの), 日本分析化学会, 2010.05.

- 56) 板沢 靖男 (著), 田村 保 (著, 編集), 小栗 幹郎 (著), 羽生 功 (著), 魚類生理学概論, 恒星社厚生閣 (東京), 1991.3
- 57) 桐榮 恭二, フローインジェクション分析法を考える, TCI メール, **1**. 101 (1999)
- 58) 呉 海雲, 魚類のためのコルチゾル測定用非標識バイオセンサに関する研究, 東京海洋大学修士学位論文, 2013.
- 59) G.E. Burdick, M. Lipschuetz, Toxicity of ferro- and ferricyanide solutions to Fish, and determination of the cause of mortality, *Trans. Am. Fish. Soc.* **78**. 192-202 (1950)
- 60) C. Wu, H. Sun, Y. Li, X. Liu, X. Du, X. Wang, , P. Xu, Biosensor based on glucose oxidase-nanoporous gold co-catalysis for glucose detection, *Biosens. Bioelectron.* **66**. 350-355 (2015)