

博士学位論文内容要旨

Abstract

専攻 Major	応用環境システム学	氏名 Name	呉 海雲
論文題目 Title	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		

水産養殖場の飼育水の酸素欠乏や水質変化などによる飼育環境の悪化は、養殖魚にとって大きなストレス要因となり、魚体の生理的な変動を引き起こし、魚病や感染症の発生原因ともなっている。健康な養殖魚を育てるためには、そのストレス状態を常に把握し、飼育環境を改善していくことが必要である。これまで魚のストレス状態を知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。これら指標物質は、ストレス応答に対して分泌される時期と変動が異なるため、両指標を総合的に解析することにより、ストレス状態を判断することが望ましいといわれている。これまで、グルコースやコルチゾルの定量にはヒト臨床用キットが用いられていたが、血液の採取及びその前処理などに煩雑な操作を伴う問題が残っていた。こうしたことから、これらの物質を迅速・簡便かつ高感度にモニタリングできる新しい測定システムの開発が求められている。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と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。バイオセンサは、測定対象物質を識別するための生体触媒（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、目的物質を迅速・簡便に測定できる計測機器である。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に、酵素反応、免疫反応、電気化学反応を組み合わせた新しいストレス応答測定用バイオセンサシステムの開発を試みた。

以下、各章毎に、その目的及び意義について述べる。

序論では、コルチゾル及びグルコース濃度の迅速かつ連続的な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した。

第一章では、ティラピア (*Oreochromis niloticus*) に各種ストレス（溶存酸素濃度及びアンモニア性窒素化合物濃度などの化学的要因、個体同士の相互作用などの行動生理学的要因）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総合的に把握する必要があることがわかった。しかしながら、魚類のコルチゾル濃度測定については、未だに迅速かつ連続的な測定法が確立しておらず、新しい手法の構築が必要であることが認識された。

第二章では、第一章で得られた知見から、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試みた。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、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 ($R=0.965$) が認められた。この現象は、抗原と抗体が複合体を形成することによって、測定基質（フェリシアン化カリウム）とセンサ表面の間にある電気二重層の幅（電子移動に必要な距離）が増加し、酸化還元反応で生成した電子の移動を阻害したためと考えられる。なお、1検体の分析所要時間は約 15 分で可能であった。

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、 $0\sim 40\text{ ng ml}^{-1}$ 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、迅速・簡便な測定を実現できた。

第四章では、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試作した。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った。この値は、第二章におけるイムノセンサの測定最大限界値の約 20 倍の値であった。また、本センサを用いてティラピア血漿中のコルチゾル濃度の測定を行ったところ、ELISA で得られた値との間に良い相関性が認められた。

以上述べたように本研究は、魚類の重要なストレス指標であるコルチゾルの迅速・簡便な連続測定法の確立を目指したものであり、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。