

博士学位論文の要約

Summary

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		

健康な養殖魚を育成し、安全で持続的な養殖を行うためには、常に養殖魚のストレス状態を把握しながら、飼育環境をコントロールすることが重要である。魚の生理的なストレスは、血中コルチゾルを代表するホルモン系の変化よりなる一次応答から始まり、これらのストレスホルモンの代謝活性化によって生じる血中グルコースなどの濃度変化としての二次応答、生き続けられるかどうかを決める三次応答に分類される。魚類のストレス応答の研究では、上記のコルチゾルやグルコースの濃度変化を指標とされ、現在までこれらの物質は、主にヒト用臨床キットを用いて測定される。このため、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。また、これを魚に適用した場合、ハンドリングストレスそのものが魚のストレス因子の一つとなっており、必ずしも適切な方法とはいえなかった。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。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。

本研究ではまず、魚類のストレスの二次応答の指標となる血中グルコースに着目し、グルコースオキシダーゼ固定化酵素膜と微小白金電極より構成されるグルコース測定用バイオセンサを製作した。そして魚を自由に遊泳させながら物理的、生化学的、さらには行動生理学的なストレス因子の負荷状態で血中グルコース濃度をモニタリングし、各因子とそれに伴う生理状態、行動変化との関係を調べた。その結果、血中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、血中グルコース濃度については、血中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。

一方、上記実験を行う過程で、魚類の総合的なストレス応答をより正確に把握するためには、一次応答の指標となる血中コルチゾル濃度のモニタリングも必須である。そこ

で次のステップとして、免疫反応における電子メディエーター基質（フェリシアン化カリウム）の酸化還元電流の変動を利用したコルチゾル測定用イムノバイオセンサの製作を試みた。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って非標識イムノセンサを製作した。このセンサをコルチゾルが含まれる試料溶液に浸漬し、フェリシアン化カリウムを電子メディエーター基質として、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、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た。1検体の分析所要時間は約 15 分で可能であり、ELISA のようなこれまでの測定法に比べて、極めて短時間の測定を可能にした。次に、実試料（空气中に暴露してストレスを負荷したティラピアと、ストレスを負荷していない個体）の血中コルチゾル濃度の測定に本システムを適用することにも成功した。

しかしながら、ストレスを受けた後の血中コルチゾル濃度の変化は一過性の上昇が多く、軽い負荷などの原因となるものを取り除ければ、血中コルチゾルの濃度が比較的速やかに回復するため、魚の一過性ストレスの測定が困難である。そのため、血中コルチゾルが連続可能なシステムが望まれている。一方、上記のシステムでは、作用極の交換が不可欠であり、連続測定に適しているとは言えなかった。そのため、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。

ところで、上記コルチゾル測定用非標識イムノセンサを実際に魚体内に留置することを想定した場合、基質にフェリシアン化カリウムを用いていたため、生体への悪影響が懸念された。また、測定上限値が $10,000\text{ pg ml}^{-1}$ では体液における濃度レベルを大幅に下回るため、希釈をすることなくモニタリングすることは不可能である。そこで体内への留置に適合したイムノセンサの構築を目的に、免疫反応と酵素反応を組み合わせた全く新しいセンサシステムを考案した。すなわち、電極上に抗-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し、生物体への毒性が低いグルコースを基質として用いることにより、測定濃度範囲が広く、かつ生体に優しいセンサシステムの製作を試みた。その結果、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、先の非標識イムノセンサの測定最大限界値の約 20 倍の値を示し、魚の血漿試料を直接測定しても希釈操作が不要であることを示している。

る。また、センサの特異性を検討したところ、他のステロイドホルモンには応答しないことが確認され、コルチゾルの特異的検出が可能であることがわかった。さらに、本センサを用いてテト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及びグルコースの迅速・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。