

10 cm/sと仮定)²⁾。対する酸化剤(カソードの反応物)である溶存酸素の濃度は0.1 mM(動脈血)、0.04 mM(静脈血)、皮下組織では0.04 mM程度^{9),10)}と薄い、セル形状や電極形状の工夫によって実効電流値を増大できる余地がある。グルコースと酸素の組み合わせで実際に得られる単セル電圧は1V以下であるが、スタッキングやチャージポンプICとの組み合わせなどで、実用レベルへの昇圧が可能かもしれない。デバイス側の省電力化が急速に進む状況を考え合わせると、「出力特性」よりもむしろ、「安全性」と「耐久性」の向上がバイオ燃料電池の医療応用を拡充するためのキーポイントと言えそうである。

酵素を利用するバイオ燃料電池の研究

3.1 研究動向

一般の燃料電池との対応で見れば、バイオ燃料電池は白金などの金属触媒が生体触媒(酵素)に置き換わったものである。現在、酵素を利用するバイオ燃料電池に世界各国で多くの研究グループが取り組んでおり、国内では、京都大学¹¹⁾、松下電器産業(株)の先端技術研究所¹²⁾、熊本大学¹³⁾、東京農工大学¹⁴⁾などから精力的な成果発表がなされている。それぞれ、酵素やメディエータの種類、およびそれらの固定方法で特徴づけられる。たとえば、京都大学の池田、加納、辻村らは¹¹⁾、カソード極の反応である酸素還元触媒としてゼリルビンオキシダーゼ(BOD)を見出し、中性条件での酵素による酸素還元を可能とした。テキサス大学のHellerらは、オスミウム錯体を修飾したポリマーがグルコースオキシダーゼ(GOD)のメディエータとして優れた性能を発揮することを見出し、昨今のバイオ燃料電池研究に対して先導的な貢献を果たした^{3),15)}。そもそもHellerらは、オスミウム錯体とGODを組み合わせたグルコースセンサで重厚な業績を積み上げており、事業化にも成功している⁴⁾。そこで蓄積した技術を発展させて燃料電池の開発に取り組んでおり、両者を組み合わせた自立型のセンサを目指した研究開発が進められている⁴⁾。

3.2 ジアフォラーゼを用いる複合酵素アノード

筆者らは、ジアフォラーゼとデヒドロゲナーゼ、2種類の酵素を組み合わせた複合酵素系を検討してきた^{16),17)}。ジアフォラーゼ(Dp)は、NADH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)と酸化型色素との電子移動反応を触媒する酵素の一般名称であり、筆者らは高熱菌由来のフラビン酵素(EC 1.6.99.)を用いている。Dpと適当なメディエータ(Med)が共存すれば、電極で連続的にNAD⁺を生成できることになる(図2(a))。一方、NAD⁺を補酵素とするデヒドロゲナーゼは非常に種類が多く、このバリエーションに富むNAD⁺依

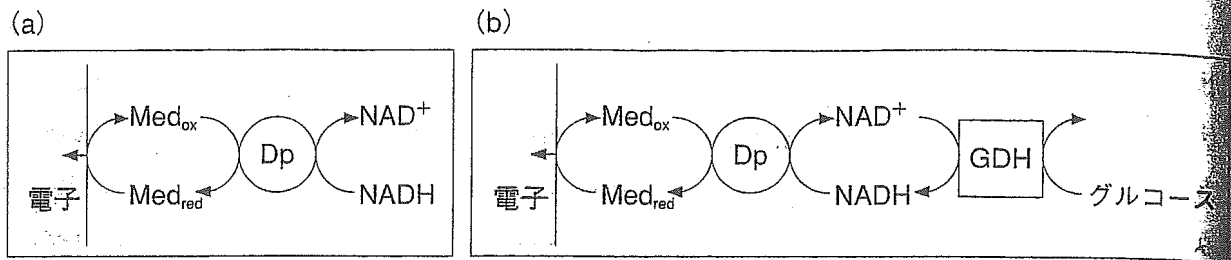


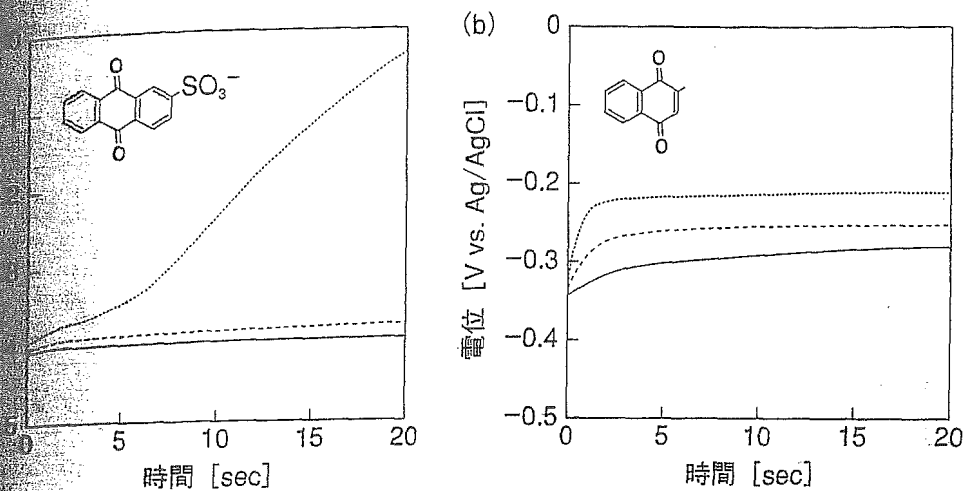
図2 ジアフォラーゼ (Dp) とグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を用いる酵素電極反

存性酵素の反応と Dp 電極は共役させることができる。ここでは、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を用いて「グルコース→グルコノラクトン」の酸化反応と共役させる (2(b))。単一酵素と比べて複雑で、NADH の固定が困難などの欠点はあるが、デヒドロゲナーゼの種類によって多様な燃料に対応できる拡張性が、Dp を基盤とする電極触媒系重大なメリットである。Palmore らは、アルコール、アルデヒド、ギ酸、それぞれのデヒドロゲナーゼ 3 種類を用い、ジアフォラーゼによる電気化学的な NAD^+ 再生系と共役させて「メタノール→ホルムアルデヒド→ギ酸→ CO_2 」という一連の反応を進行させることに成功し、燃料電池への応用も検討している¹⁸⁾。

3.3 ビタミン K_3 をメディエータとする複合酵素アノードの特性

図2の反応スキームを円滑に進めるためには、適切なメディエータ分子の選定、およびメディエータ分子や酵素を固定化した状態で働かせるための電極修飾技術の開発が必要となる。バイオ燃料電池の利点はセパレータを要しないシンプルな構造にあるので、メディエータおよび酵素の電極上への固定は必須ともいえる検討項目である。

Dp のメディエータはフェロセン誘導体¹⁹⁾およびキノン誘導体²⁰⁾について詳細に調べられている。電池電圧を決めるのはメディエータのフォーマル電位 (E^0) なので、アノード電極においては E^0 がマイナス側 (卑) にあるメディエータを選択するのが基本方針となる。筆者らは、生体や環境への負荷が比較的低いと考えられるキノン類の利用を考えてきた。キノン系化合物の E^0 は全般的に卑であるが、中でも、アントラキノンスルホン (AQS) の E^0 (pH 7) は約 $-0.4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ であり、Dp の活性中心フラビンモノヌクオチド (FMN) とほぼ同じである。すなわち、最も電位 (エネルギー) 損失の少ない高率なメディエータの1つであり、重要な研究対象である¹⁶⁾。しかしながら、 E^0 が近いだけに、Dp と AQS の間の電子移動速度は比較的遅い²⁰⁾。図3(a)は、NADH 過剰の条件下で電極に一定の酸化電流を印加した場合の電極電位の推移を示している。比較的小さな電流 ($1.43 \mu \text{ A/cm}^2$) においては AQS の E^0 付近 (約 -0.4 V) で安定しているが、10 倍の電流



3 定電流通電時の分極挙動

Dp 0.1 μM 、NADH 0.1 mM、メディエータ ((a) AQS、(b) VK₃) 0.1 mM
を含むN₂飽和のPBS (pH 7.0、37°C)

電流密度：1.43 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (—)；4.29 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (-----)；14.3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (.....)

が保たれず、貴側への急激な電位シフトが起こる。これは、DpとAQSの間の電位差が律速する限界を、間接的・定性的にはあるが、反映した結果である。図3(b)はキノン系化合物であるビタミンK₃ (VK₃) の場合である。AQSに比べると電位は安定になるが、14.3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ の電流も安定に流すことができている。さらには、他のキノン化合物も含めて、E⁰とDpとの反応速度の関係を定量的に検討している。電池電圧と電流のいずれを重視するかによって、メディエータの選択は異なる。

第一化学薬品(株)の協力を得て、VK₃にカルボキシル基を導入した誘導体を合成し、ポリアリルアミン (PAA) のアミノ基の20%に修飾し(図4(a))、架橋剤を用いてカーボン電極上に固定した。その際に、炭素粉末(Ketjen-Black)を混入することで実効面積が増大して電流が百倍以上に増大する。さらにその上に、GDHとポリリジンとともに塗布し架橋剤で固定化することで、酵素の二重膜構造を作った(図4(b))。1層目の役割はNADHの酸化であり、2層目の酵素反応(グルコースの酸化)でNAD⁺を連続的に再生する。VK₃の電極反応と2種類の酵素反応が連携する。この反応はグルコースの電解酸化となる。図4(c)は、作製した酵素二重膜電極(0.5 mM NADH + 20 mMグルコースの添加前後に測定したサイクリックボルタグラムのCV)である。NADHおよびグルコースの存在下では、図2の反応スキームに示すようにVK₃の酸化電流が増加している。0.2 Vにおける電流の増加分は、添加するグルコースの濃度(～20 mM)に比例した。反応効率の観点からすると二重構造は望ましくな

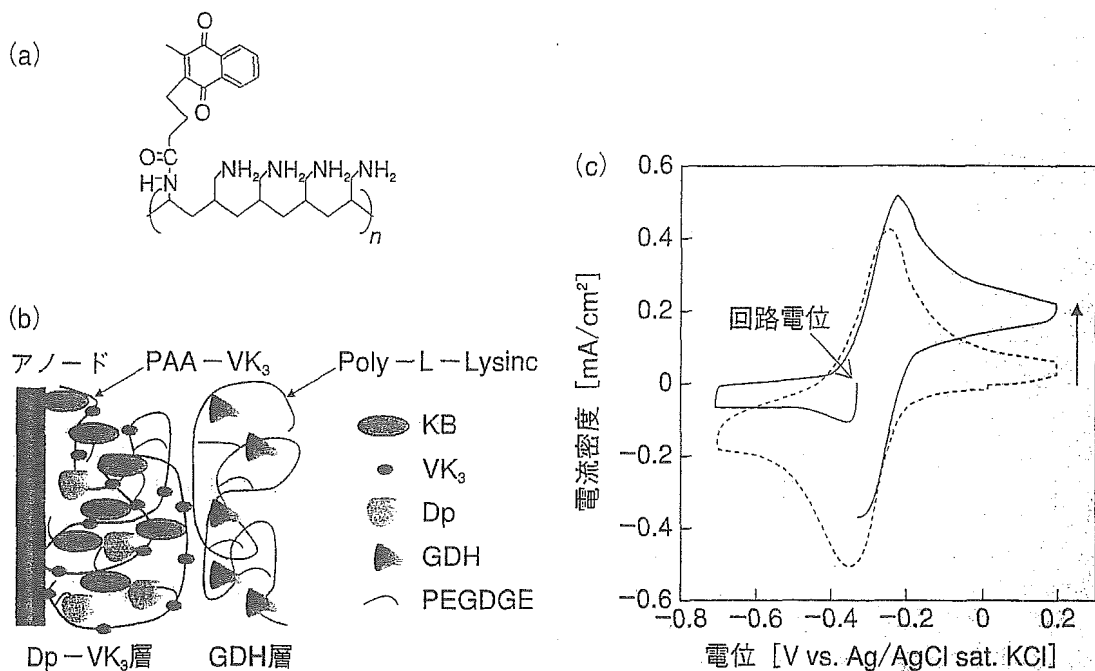


図4 (a) VK₃を修飾したポリマーと、(b) DpおよびGDHによる酵素二重膜構造、(c) 酵素修飾電極のCV (5 mV/s)、PBS溶液中 (-----) およびNADH 0.5 mMとグルコース20 mMを添加後 (—)

いが、2層に分離して各々を個別に最適化することで、再現性に優れた触媒特性が得られるようになった。ジアフォラーゼを用いる利点は他のデヒドロゲナーゼへの拡張性である。その点でも、Dp層を基盤とする2層構造は的を得た設計だと考えている。

体内埋め込みのグルコース燃料電池などを考えた時には、NADHも修飾膜内に固定化されていることが望ましい。筆者らは酵素2重膜のマトリックスとしてアミン系の高分子を用いており、そのカチオン性を利用したNADHの静電的な固定を試みている。数日間は触媒活性が保たれる (NADHが保持される) ことを確認しているが、まだまだ改善の必要性を残す検討項目である。

3.4 グルコース/酸素燃料電池の出力特性

複合酵素アノードと、O₂選択性のカソードを組み合わせて電池を構成し、NADHおよびグルコースを含む溶液中で測定すると、50 μW/cm²程度 (at 0.4 V) の出力が再現性良く得られた (図5(a))。ただし、4日後には30%に減少した (毎日1回測定)¹⁷⁾。ここで用いたカソードは、PDMSのディパージョンを塗布した白金箔である。このPDMS膜は微細孔を有し、酸素などの溶存ガスに比べてアスコルビン酸などのイオン種が透過し難いため、実質上酸素選択性が得られる²¹⁾。ピリルビンオキシダーゼ (BOD) などの酵素を触媒

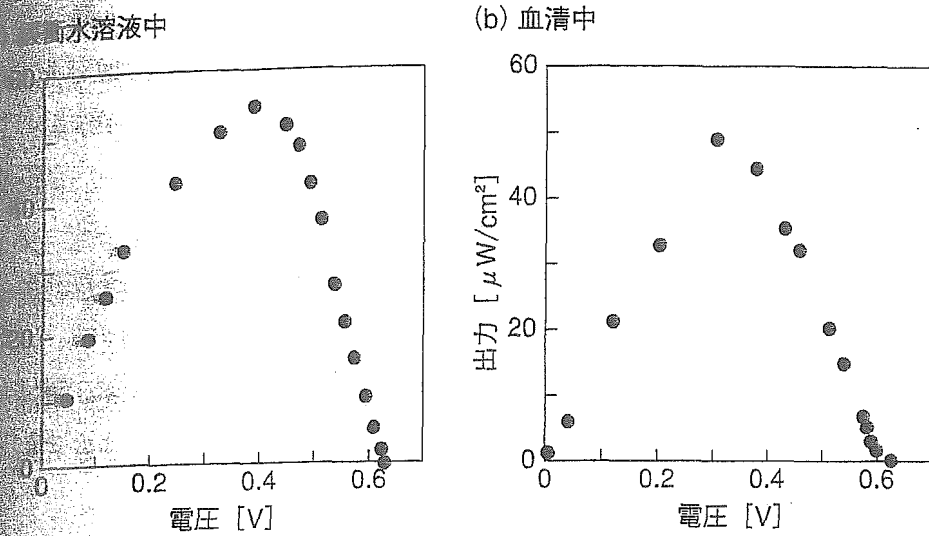


図5 複合酵素アノードとPDMS被覆Ptカソードで構成した電池の出力特性

(a) PBS溶液 (空気飽和、NADH 0.5 mMとグルコース20 mM添加、37°C)

(b) ウシ胎児血清 (空気飽和、NADH 0.5 mM添加、37°C)

アノードも開発されており、良好な特性が得られている^{3),11)}。それらのバイオカソードを組み合わせれば、より高電圧で高い出力が得られると期待できる。

ウシ胎児血清 (空気飽和、+0.5 mM NADH) を用いた予備的な発電実験でも上述の程度の出力が得られ (図5(b))、この性能は数時間後もほとんど変わらなかった。血液から血球やフィブリンなどを除いた液体成分で、糖質 (5 mM程度) のほかタンパク質や無機塩、脂質などを含み、さらに長時間の使用のためには電極の洗浄が必要と予想される。血液 (ヒト静脈) を使った実験では半分程度の出力しか得られなかった。血栓様の生物付着が顕著であった。循環器系医療器具の表面処理技術の進歩を待たず、血液からの安定な発電と将来の埋め込みを目指していきたい。

バイオマイクロ燃料電池を支える周辺技術

バイオマテリアルの活用

生体と直接接触する医療用バイオ燃料電池では、[3.4] 項でも述べたように、生体適合性、かつ効果的に駆動させるための適合性が必要であり、バイオマテリアル科の進歩した抗血栓技術を活用することになる^{22),23)}。従来の燃料電池とは無縁の技術領域であり、医療応用を考えた途端に浮上する重大で困難な問題である。血栓は一連の血

液凝固反応により形成され、これは血液中の多数成分が巧妙に関与する複雑なカスケード反応である。不溶性フィブリンの生成、血小板凝集、補体系による白血球粘着という3とおりのシステムがタンパク質の吸着によって誘起され、互いに共同して作用した結果と考えられている。タンパク質の吸着を防ぐために、ポリエチレンオキシド (PEO) のグラフト化、ヘパリンやアルブミンといった抗血栓性生理活性分子の固定化、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) の塗布による生体膜類似構造の形成などが有効とされている^{22),23)}。筆者らも、PDMS被覆PtカソードにMPC処理を行い、タンパク質の吸着が劇的に減少して電極活性の保持に有効であることを確かめている。電池としての性能を保ちつつ、いかにして血液適合性を長期保証するかは、電池技術としてのバイオマテリアル科学であり、重要で面白い研究課題だと思う。

4.2 微細加工技術によるシステム化

マイクロ燃料電池の作製に際しては、セル本体、流路、電極の構造が出力や燃料の利用効率などに大きく影響するので、柔軟で生体適合性に優れたポリマー材料を精密に加工して用いる必要がある。

ポリマーで微細構造を実現する方法 (図6) には、①金型を用いるプレス成形、②ドライエッチングによる直接加工、③光造型が挙げられる^{24),25)}。プレス成形法は、すでに産業用のプラスチック部品の製造において実績を有し、大量一括生産に向いている。ドライエッチング加工法はシリコン、石英の加工で実績があり、高アスペクト比の微細構造を作製できるが、ポリマーへの適用は未だ限られている。光造型法は、装置が市販化されていることから技術へのアクセスが容易であり、今後の応用展開が注目される技術である。しかし、材料が限定されることや、成形法と比較すると大量生産に向かないなどの欠点もある。

製作したポリマー板を積層し、熱プレスや溶剤を溶かした接着剤を用いて接着させることで目的のチップを得ることができる。その際に、位置合わせ、変形、接着面の均一性などの技術面のノウハウの蓄積を多く必要とするが、ポリマー製マイクロチップ製造技術は μ TASや生体埋め込みチップ全般に必要な基盤技術なので、今後急速に発展し、一般化すると期待できる。

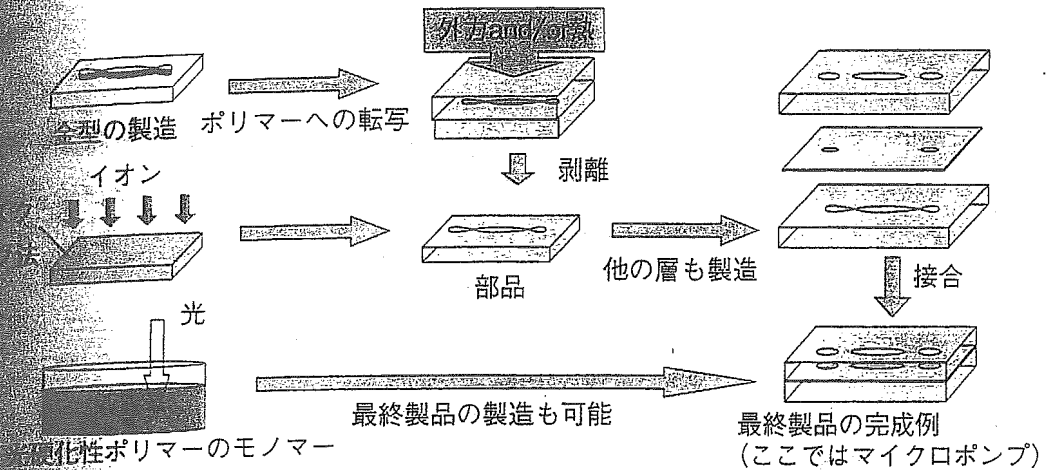


図6 ポリマーの微細加工と接合

おわりに

バイオマイクロ燃料電池を想定して周辺動向や周辺技術を概説しながら、筆者ら
 が紹介した複合酵素アノードのグルコース酸化特性を紹介した。体液を利用する発電
 装置であっても、 μ TASとしての検査チップから、皮膚パッチ型、皮下組織への短
 時間血管への埋め込みなど、多様なバリエーションがあり、その侵襲性の程度に
 応じて可能性や検討課題はさまざまである。体内深部への埋め込みを考えた場合に
 は、やはりむしろ、「耐久性」と「安全性」に支えられた「信頼性」が高度に要求
 される。現時点では、たいがいの酵素電極は緩衝水溶液中でも数週間程度で顕著に劣化し
 てしまう。すなわち、酵素電極自体（酵素自体）の安定化が、血液適合性への配慮と並ん
 だ重要な課題である。最近、酵素の固定化法を工夫して劣化を低減する技術²⁶⁾や、遺伝子
 工学を用いた酵素の耐久性を改善した報告¹⁴⁾などが相次いでいる。これら、耐久性向上の
 開発の進展が、バイオ燃料電池の応用を拓げる条件である。「安全性」にも妥
 協できない。酵素、メディエータ、電極材料をはじめとする電池の構成要素が無毒な
 必要がある。医療用電池にとって、安全性は重要な性能の1つである。

謝辞

本稿で紹介したVK₃誘導体は、第一化学薬品(株)の小菅順一氏と深作昇氏との共同研究で得られました。本研究は、厚生労働省萌芽的先端医療技術推進研究事業ナノメディシンプロジェクトの支援で行われました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) エコインダストリー, 特集バイオ電池の現状と展望, 4, シーエムシー出版 (2005).
- 2) S. C. Barton et al. : *Chem. Rev.*, **104**, p.4867 (2004).
- 3) A. Heller : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, p.209 (2004).
- 4) A. Heller : *AIChE J.*, **51**, p.1054 (2005).
- 5) Special Issue : *The Bionic Human, Science*, **295**, p.995 (2002).
- 6) C. F. Holmes : *The Electrochem. Interface*, **26**, Fall (2003).
- 7) G. Pistoia : Batteries for Portable Devices, Elsevier, Chapter 6 (2004).
- 8) 小柳光正 : 日経サイエンス, **8**, p.45 (2005).
- 9) 須藤雅夫 : 人工臓器 (II), 日本エム・イー学会, p.121 (2003).
- 10) 中林宣男他 : バイオマテリアル, 日本エム・イー学会, p.96 (1999).
- 11) T. Tsujimura et al. : *J. Electroanal. Chem.*, **496**, p.69 (2001) ; *Electrochemistry*, **70**, p.940 (2002) ; *Electroanal. Chem.*, **576**, p.113 (2005) など.
- 12) A. Brune et al. : *Langmuir*, **20**, p.8366 (2004) など.
- 13) I. Taniguchi et al. : *Chemical Sensors*, **20** (Suppl. B), p.338 (2004) など.
- 14) N. Yuhashi et al. : *Biosens. Bioelectron.*, **20**, p.2145 (2005).
- 15) N. Mano et al. : *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, p.6588 (2003).
- 16) M. Nishizawa et al. : Ab#1201, 204th Meeting of Electrochemical Society, Orland (2003).
- 17) F. Sato et al. : *Electrochem. Commun.*, **7**, p.645 (2005).
- 18) G. T. R. Palmore et al. : *J. Electroanal. Chem.*, **443**, p.155 (1998).
- 19) T. Matsue et al. : *Biochem. Biophys. Acta*, **1038**, p.29 (1990).
- 20) K. Takagi et al. : *J. Electroanal. Chem.*, **445**, p.211 (1998).
- 21) F. Mizutani : *Anal. Chim. Acta*, **441**, p.175 (2001).
- 22) 中林宣男他 : バイオマテリアル, 日本エム・イー学会, p.77 (1999).
- 23) 石原一彦他 : バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人, p.117 (2003).
- 24) マイクロマシン技術総覧, 産業技術サービスセンター (2003).
- 25) 北森武彦他 : マイクロ化学チップの技術と応用, 丸善 (2004).
- 26) C. M. Moore et al. : *Biomacromolecules*, **5**, p.1241 (2004).

第5節

リポソームの固定化

1. はじめに

リン脂質二重層からなるリポソームの有効性は他節にて解説されている。リポソームの多機能性を利用する場合、担体への固定化は非常に重要な操作の一つとなる。そのリポソームを固定化(図1)する技術は、①膜タンパク質の機能を解析する、または、②膜と薬剤との相互作用を解析するための分離基材として発展してきた¹⁾²⁾。従来より Langmuir-Blodgett膜を用いた研究が報告されているものの、①膜圧が高い、②流動性(ゆらぎ)が低いなど、通常の生体膜と比較して異なる挙動が予想され、数十nmからサブミクロンオーダーである球形の intact なリポソームを固定化する必要性が指摘されていた。1980年代、SwedenのUppsala大学のLundahl/Yangらのグループによりリポソーム固定化技術並びに応用例が報告されて以来²⁾、Miyake/Yangのグループ³⁾、あるいは、Kuboiらのグループ⁴⁾により、主としてクロマト担体等の分離基材への固定化技術並びに応用例に関する一連の研究が報告された。また、リポソームを検出素子として利用したセンサー設計への応用例も報告されている⁵⁾。近年、生体膜のダイナミクスを解析し、工業的な応用を目指すメンブレンストレスバイオテクノロジー⁶⁾の一環として、特殊な環境条件(ストレス条件)における生体膜の挙動を解析する必要性が生じている。そのために、過酷な条件においても安定に存在しうるリポソーム固定化方法についても検討されつつある。ここでは、リポソームの固定化方法について概説し、近年の動向として、センサー開発を目的として、固体表面へのリポソームを固定化した例について紹介する。

2. 各種のリポソーム固定化方法の特徴

これまでに多くのグループでリポソームをゲルや固体表面上へ固定化する手法が提案されている。その用途としては、バイオリクターとしての利用から、検出感度向上のためのセンサー増感剤としての利用まで幅広い。しかし、特定の組成のリポソーム懸濁液を固体表面上に滴下すると、リポソームが自壊していく過程が原子間力顕微鏡で観察されており、リポソームの機能を引き出すにも、その特性を維持したまま固定化する手法が望ましい。現在までに報告されている固定化方法は、(a)担体表面処理、(b)リポソーム表面処理(修飾)、(c)固定化処理、(d)担体表面のマスキング処理の四つの工程に分けられる。担体、固定化するリポソームの特性、活性化基の中間体の状況に応じて、上記の工程を取捨選択している。特に、(c)の固定化処理に違いが見られ、現在、リポソーム固定化方法として、大きく分けて四つの手法が提案されている⁷⁾。一般的には、リポソームを固定化する工程の種類に応じて分類されている。微細な細孔を有する担体などの材料の場合、①物理的封じ込め法⁸⁾、一般的な担体に関しては②抗原抗体反応による固定化⁹⁾¹⁰⁾、③共有結合法¹¹⁾、④疎水結合法¹²⁾などがある。また、固定化する担体によってもリポソームの固定化処理の操作条件が異なってくる。現在、確認されている担体として、(i)ゲル浸透クロマトグラフィー用担体(agarose, Sephadex系ゲル担体ほか)¹³⁾¹⁴⁾、(ii)キャピラリー、電極などの各種固体表面(主として無機材料)¹⁵⁾、(iii)精密ろ過用分離膜(cellulose系担体ほか)が挙げられる。(i)(iii)の場合は、担体マトリックスは三次元的であり、多点で固定化することも可能である

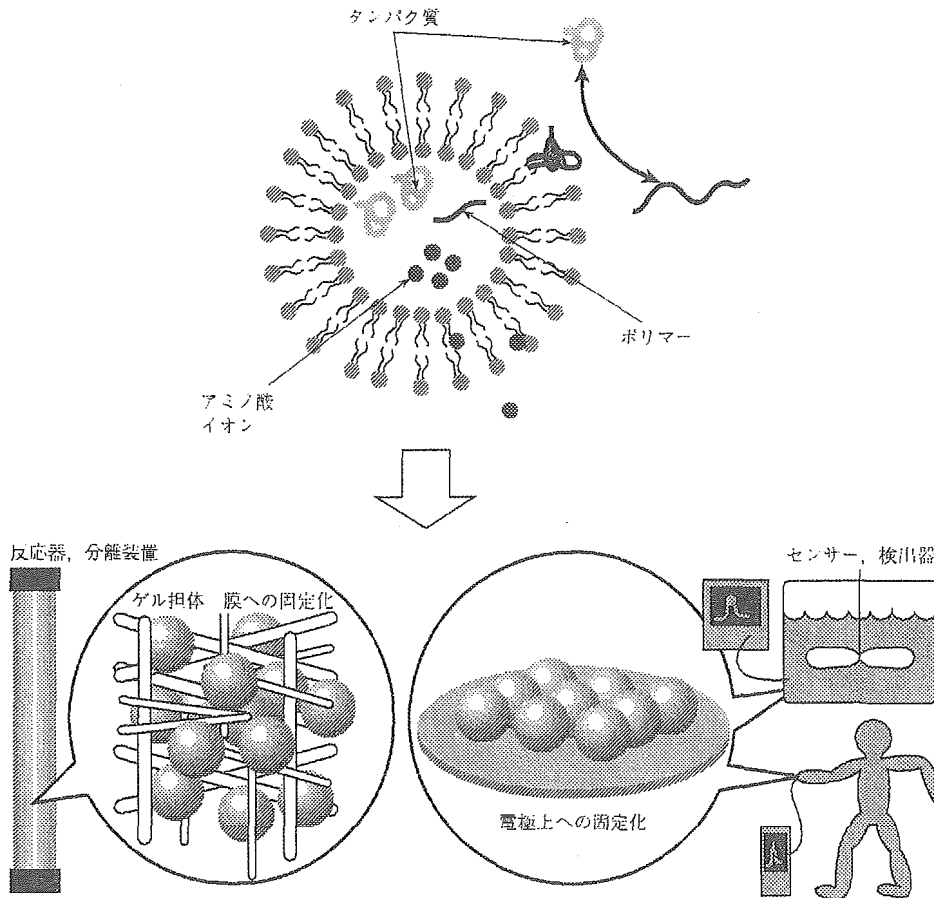


図1 リボソーム固定化技術とその応用

ため、リボソームのサイズとゲルの分子排除限界を考慮すれば、比較的安定に固定化しやすい。しかし、(ii)の場合、平滑な固体表面に固定化することから、リボソームと固体表面の架橋点が少なく、それらを使用する場合、固定化リボソームの不安定や、場合によっては、リボソームの破壊、リン脂質の付着などの問題点も生じてくる。以下では、主として、三次元的なマトリックスを有する担体へのリボソームの固定化を対象として、リボソームの固定化手法について概説し、その延長として特殊な前処理を必要とするセンサー表面への固定化方法について概説する。

3. 三次元マトリックスを有する担体への固定化

ゲル浸透クロマトグラフィー用の担体、あるいは、精密分離膜として利用されるセルロース系の担体は、強度を付与するための成分の混入はあるが、基本的には agarose, dextran, セルロースなどの天然高分子やポリエチレングリコール、アクリルアミドなどの合成高分子が三次元状のマトリックスを形成している。このような三次元マトリックスでは、リボソーム表面とマトリックス表面が多点で架橋されることが可能である。このようなマトリックスに固定化する手法として下記の四種類が報告されており(図2)、それらの特徴について概説したい。各種方法を用いたリボソーム固定化量を表1に比較した。

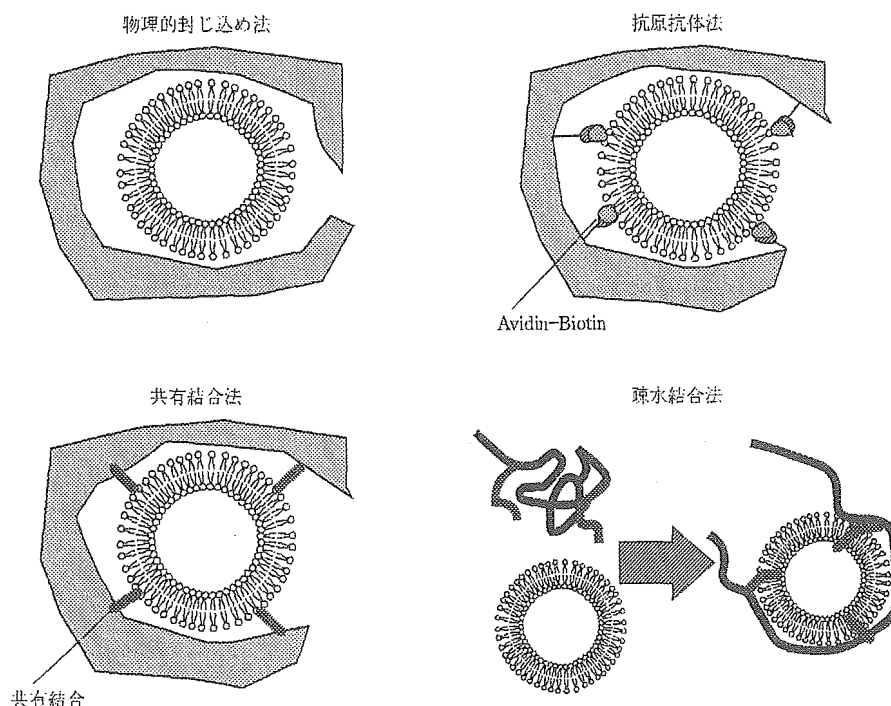


図2 リポソームの固定化方法の分類

3.1 物理的封じ込め法

液体クロマトグラフィー用のゲル担体の細孔内部にリポソームを物理的に封じ込める固定化方法である。Lundahlらのグループにおける初期の研究でこの手法が採用されている。Superdex 200およびTSK 6000 PWゲルなど比較的細孔径の大きなゲルが選択される。大きく分けて、凍結融解法¹⁶⁾並びに透析法¹⁷⁾の2種類に大別される。両者に共通しているのは、細孔内部にリポソームを浸潤させたうえで、リポソームの粒径を増加させる処理を行う点にある。この固定化手法は、原理的には、リポソームと担体表面を架橋しないために、リポソーム膜と試料物質との相互作用に、固定化処理時に使用する第三物質の影響を受けない点で有利である。したがって、プロテオリポソームあるいは赤血球ゴーストを固定化して、それらの表層に存在する膜タンパク質の機能を解析する際に有利である^{18)~21)}。しかし、固定化処理後にリポソーム粒径が変化するために、リポソームの粒径が均一でない可能性があり、また、他の固定化方法と比較して固定化量が低いという欠点がある。

3.2 抗原抗体法

リポソームと薬剤の相互作用を解析する場合、単位ゲル体積中のリポソーム固定化量は重要な因子である。固定化量を改善するために検討されたのが、抗原抗体法である。Miyake/Yangらを中心に、avidin-biotin結合を利用して固定化する手法が提案された⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾。この方法では、従来の方法と比較して固定化量が5倍程度まで改善されている。具体的な操作は、ゲルのavidin処理とリポソーム表面のbiotin処理から成る。前者の場合、Sephacryl, Sephacryl,あるいはTSK gelなどの水酸基を有するゲル担体表面を活性化し、streptoavidinを共有結合にて固定化処理している。その後、biotinyl化したリン脂質(PE)にて修飾したリポソームを添加し、リポソームを固定化している。その他にも、Gottschalkらは、アガロース表面に修飾したレクチンと赤血球との相互作用を用いて固定化した手法についても報告している¹⁸⁾。通常の脂質組成だけでなく、光合成活性中心cytochrome c(表1のEPC-RC)や、グルコーストランスポーターを組み込んだプロテオリポソーム(表1のEPC-Glut)も本手法により固定化が可能であることが報告されている。セファ

表1 代表的なゲル担体へのリポソームの固定化量

手法	ゲル	リポソーム (SUV)	固定化量 [$\mu\text{mol-lipid/ml-gel}$]	文献
共有結合法	TSKG 6000 PW	EPC/cap-PE	35 ± 2	4)
		POPC/cap-PE	26	22)~24)
		EPC, DMPC, DOPC, POPC	33 ± 2	4)
	TSK-Tresyl-650M	EPC/cap-PE EPC	12 ± 2 2	4) 4)
セファロース4B	EPC/cap-PE	5.1 ± 1.7	4)	
	EPC, DMPC, DOPC, POPC	1.4 ± 0.3	4)	
Superdex 200	EPC	42 ± 1	4)	
avidin-biotin 法	TSKG 6000 PW	EPC	n.d.	3)
		EPC	33.6 ± 1.2	10)
		POPC	35 ± 0	3)
		DOPC	n.d.	3)
	セファロース4B	EPC(avidin)	47 ± 8	3)
EPC		40 ± 4.9	10)	
EPC(streptavidin)		47 ± 9	3)	
EPC-RC		4.2	9)	
セファクリル	EPC	43 ± 2	3)	
	EPC	33.2 ± 3.8	10)	
	EPC/EPE/cholesterol(7/2/3)	n.d.	3)	
	EPC/BPS(1/1)	n.d.	3)	
Superdex 200	EPC/cPE(98/2, 非ビオチン化)	n.d.	9)	
	EPC-RC	14 ± 4	9)	
物理的封じ込め法	Superdex 200	POPC	27 - 33	16)
		POPC/POPS	16 - 19	16)
疎水結合法	capillary	EPC	$1.0 \pm 0.3 \mu\text{mol}/10 \mu\text{l-bed}$	15)

コース4Bに着目すると、通常のEPCの場合、 $40 \mu\text{mol/ml-gel}$ 程度の固定化量であるのに対して、EPC-RCの場合、 $4.2 \mu\text{mol/ml-gel}$ という低い固定化量であるものの、pH2~8.5での試験に耐えうる事が示されている。

3.3 共有結合法

上記の固定化手法は、あまり測定条件に変動のない場合の解析に適している手法である。近年、熱あるいはpHなどの環境のストレス条件を制御して分離するストレス応答型バイオセパレーションプロセス⁶⁾²²⁾が提案されており、リポソーム固定化担体(ゲル担体/分離膜)がツールとして利用されている²³⁾²⁴⁾。

その場合、リポソーム固定化量のみならず、固定化の際の架橋点についても注意する必要がある。上記の抗原抗体法を用いた場合、条件変動により、抗体タンパク質の構造が変化する可能性がある。共有結合法は、上記の欠点を克服されるためにMiyake/Kuboiらのグループにより開発された⁴⁾。原理としては、第一級アミン基を有するcap-PEを混合したリポソームを活性化ゲル担体と混合することで、アミン窒素とゲル担体とが共有結合する。固定化量は上述のavidin-biotin法に匹敵し、 $35 \mu\text{mol/ml-gel}$ のEPCがTSKG 6000 PWゲル担体に固定化される(表1参照)。Cap-PEを用いない場合でも、リン酸基由来酸素原子とクロロホルメート活性化ゲルとが共有

結合する機構が提案されている。その固定化量は cap-PE を用いた場合とほぼ同じである(表1参照)。固定化量は上述の avidin-biotin 法に匹敵し、さらには、調製法が簡便という利点がある。この手法を用いた場合、固定化するリポソーム内部に低分子量マーカー物質を封入した場合、それが数日間で漏出してしまおうという難点がある。しかし、この共有結合により固定化した担体を用いて、ストレス応答型タンパク質分離プロセスの開発例²⁴⁾、あるいは、高濃度の変性剤を含む試料溶液を使用するストレス応答型リフォールディングプロセスの開発例²²⁾²³⁾などが報告されている。以上の点を考慮すると、リポソーム内封物は漏出したとしても、リポソーム自身は固定化されており、長期間の使用には耐えられる有効な固定化方法の一つであるともいえる。近年、エアリフト型バイオリクターへの応用を目的として、キトサンゲル担体に酵素封入リポソームを固定化した例も報告されている²⁵⁾。その場合も、リポソームを共有結合で固定化しており、長期間バブルに晒されるという過酷な条件でも、安定に酵素機能を発現している²⁶⁾。工業利用に耐えうる固定化方法の一つとなりえる。

3.4 疎水結合法

疎水結合法は、オクチル基などの単鎖疎水基をゲル担体表面に固定化し、リポソームを吸着・固定化する手法であり、Lundahlらによるリポソーム固定化担体開発当初から利用されてきた²⁾。当初のゲルは比較的細孔径の大きいアガロースゲルを担体とし、その表面をオクチル基などの直鎖のアルキル基で修飾し、アルキル基にリポソームを固定化する手法が検討された¹³⁾。Sephacryl ゲル表面をオクチル基で修飾した例についても報告されている²⁾。また、キャピラリーカラム表面への固定化についても報告がある。Hjertenらは、Lundahlとの共同研究で、直鎖アルキル基を修飾したシリカ表面にリポソームを固定化したキャピラリーカラムを調製し、Drug-膜間の相互作用に利用可能であることを示した¹⁵⁾。また、担体への固定化とは異なるが、オクタデシル基とアクリルアミドの共重合ポリマーを用いてリポソーム間を架橋する試みもあり、リポソームの固定化密度を改善するための一つの戦略としては有効であると考えられる²⁷⁾。

4. 固体表面へのリン脂質膜の固定化方法

二次元状に広がる固体表面へのリポソームの固定化は、リポソームと固体表面との架橋点が少ない、あるいは、脂質膜と固体表面が相互作用しやすいなどの問題があり、intact なリポソームの固定化には基板表面の前処理などが必要となる。これまでにも脂質膜をモデル細胞膜ととらえ、センサー感応膜材料への応用が様々に検討されてきた。従来から利用されているセンサー感応膜として利用するための脂質分子の電極表面への吸着、固定化方法には主に次の三つの方法がある。(a)基板上で脂質溶液から有機溶媒を蒸散させ、非組織的な脂質膜を形成するキャスト法^{28)~30)}、(b)気液界面に形成した脂質単分子層を固体基板に移し取り、組織的な脂質単分子、多重累積膜を形成する Langmuir-Blodgett (LB) 法²¹⁾²²⁾、(c)基板上でリポソームを融合し、二分子膜を再構成させるベシクル融合法²³⁾²⁴⁾である(図3参照)。

キャスト法は、最も簡便な方法であり、本手法で作成した脂質膜への検知物質の吸着、溶解を利用したにおいセンサー²⁸⁾²⁹⁾、味覚センサー³⁰⁾などに応用され、成功している。しかしながら、キャスト法の場合、膜内での脂質分子の配向性は低く、必ずしも実際の細胞膜の構造を反映しているとは言い難い。一方、LB法で作成した脂質膜は、展開単分子膜の表面圧、展開溶媒、単分子層の累積方法の違いにより、さまざまな配向性の脂質膜を作成することが可能であり、実際の細胞膜に近い構造を基板上に形成することも可能である。ただし、その作成法から、LB膜は動的特性に乏しく、比較的剛性の脂質膜となる。現在、この分野の研究の中心は、機能性脂質や界面活性剤の配向性を制御した膜を作成し、これをバイオセンサーなどの種々のセンサーとして応用することである。最後のベシクル融合法は、ベシクル、リポソーム溶液に電極などの基板を浸漬した際に基板との接触に伴いベシクルが融合し、表面に二分子膜が再形成することを利用している。水中で作成するため基板と脂質膜との間に多くの水和水を含有しており、LB膜よりも流動的な細胞膜様の組織化膜を固定化でき、バイオセンサー材料としての膜タンパク質の固定化担体などとして検討されている

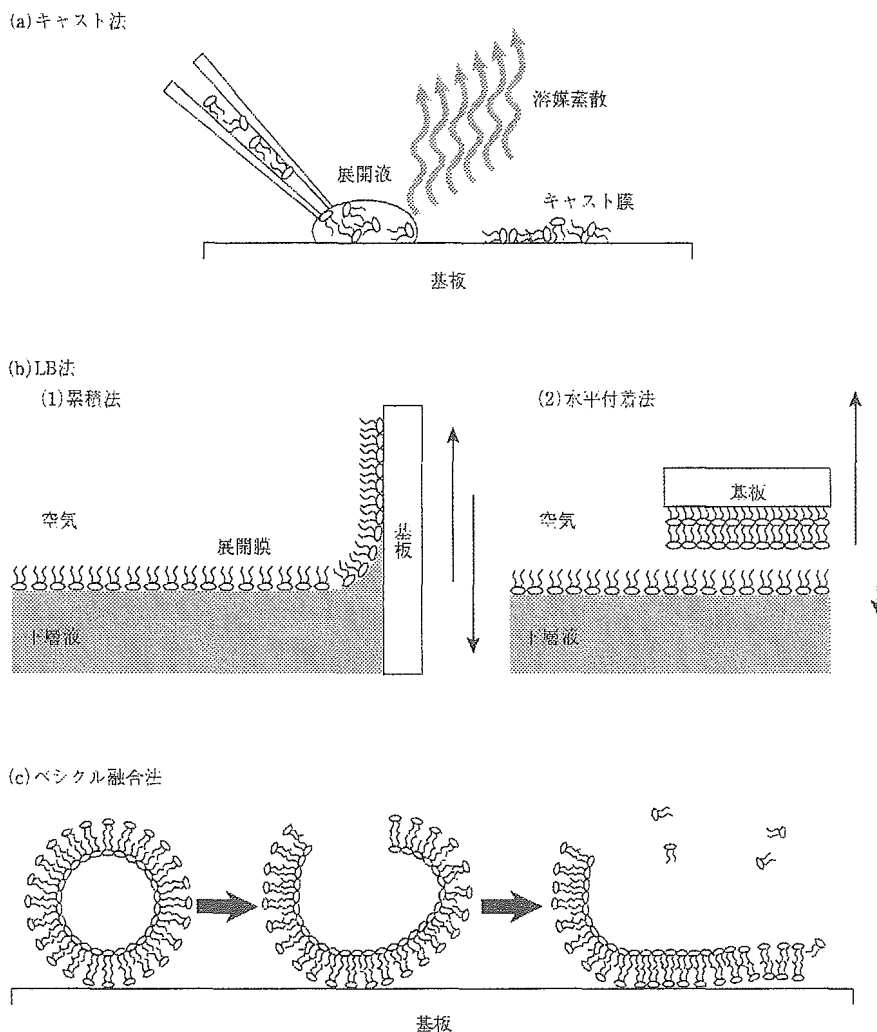


図3 基盤表面の疎水性と脂質膜吸着形態

る。しかし、リボソーム膜表層に微小な欠損がある可能性、膜の不均一性などの問題があり、さらに検討が必要とされる。

5. センサー利用を目的とした intact リボソームの固定化方法

脂質分子は、分子内に親水性の頭基と疎水性の尾部を有するため、水中にある濃度以上存在すると自発的に疎水性尾部を隠すように二分子膜の閉鎖小胞構造を形成する。この閉鎖小胞構造を保持した状態で固定化された intact リボソームは、水溶液に懸濁、分散されたリボソームと同等の特性・機能を保持で

きると期待できる。すなわち、十分な膜流動性を有し、また、水相/膜/水相の界面および水溶性物質を保持可能な内水相を固体表面上に保持できると期待できるため、先に挙げた脂質膜固定化法よりも固定化細胞膜モデルとして望ましいと考えられる。これまでもベシクル融合法による脂質膜固定化の際に、①二分子膜形成の前段階で親水性の基板上に相当量のベシクルが吸着する^{35)~37)}、あるいは、②二分子膜(もしくは単分子膜)形成後の親水性の表面にベシクルがさらに吸着する³⁸⁾という現象が観察されていた。しかし、その詳細な機構は不明であり、固体表面の疎水性物質による汚染状態が影響していると定性的に考えられている。したがって、リボソ-

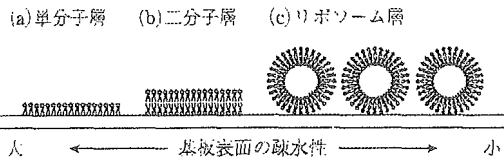


図4 基板表面の疎水性と脂質膜吸着形態⁴⁰⁾

ム水溶液に金属電極のような基板を接触させる場合をまとめると、図4に示すように吸着対象の表面疎水性に応じて、その吸着形態が異なると考えられる³⁵⁾³⁹⁾。例えば、アルキルチオールの単分子層で修飾した電極にリポソームの溶液を接触させると脂質分子は疎水性尾部を基板へ向けて再配向し、脂質単分子層を形成する³⁵⁾。一方、SiO₂³⁵⁾⁻³⁷⁾などの場合は、ベシクルの崩壊が起こるものの、基板表面の親

水性が比較的大きく脂質分子は親水性の頭基を基板に向けて再配向し、脂質二分子膜が形成される(ベシクル融合)。さらに基板表面の親水性が大きくなればベシクルは崩壊しないと予測される。例えば、酸化金³⁵⁾やSi(Ti)O₂³⁶⁾などの表面は十分に親水性であるが、この基板表面では、二分子膜形成に相当する量以上の脂質の吸着が観察され、リポソームが壊れることなくそのままの状態では吸着している可能性が報告されている(表2参照)。森田らもQCM(quartz crystal microbalance水晶振動子)を利用した研究において、金電極表面をカルボキシチオールの自己集合単分子層で親水的に一次修飾し、これをリポソーム水溶液に接触させるとリポソームの調製粒径に依存した質量増加を確認している(図5参照)⁴⁰⁾。また、同様の手法を用いてリポソームを固定化した金電極を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて

表2 固体表面へのリポソーム膜固定化例

固体表面の種類	リポソーム	結合/吸着様式	周波数変化 (比較のため 吸着質量に 変換)	文献
1-Octadecanethiol SAM SiO ₂ Oxidized Au	EggPC(25 nm)	Physical adsorption	2.3 ng/mm ^{2a)} 4.6 ng/mm ^{2b)} 16 ng/mm ²	35)
DSPC SAM (on hexanethiol) DNA	SoyPC/cholesterol/eggPG (Con A modified)	Lectin coupling	max. 48 ng/mm ²	41)
Avidin adsorbed 1-Propanethiol SAM	PA/PC(220 nm) (biotin-DNA modified)	DNA	max. 38 ng/mm ²	42)
1-Octadecanethiol SAM	DPPC LUV(100 nm) (biotin modified)	Avidin-biotin	max. 100 ng/mm ²	43)
DSPC SAM (on hexanethiol) SiO ₂ TiO ₂ SiO ₂ Oxidized Si ₃ N ₄ TiO ₂ Oxidized Pt	DPPC MLV(?-100 nm) DPPC SUV(?-45 nm) SoyPC (Con A modified) EggPC(25~200 nm) EggPC(25~200 nm)	Physical adsorption Lectin coupling Physical adsorption Physical adsorption	max. 93 ng/mm ^{2c)} max. 31 ng/mm ² 4.6 ng/mm ^{2b)} 18~64 ng/mm ^{2d)} 4.6 ng/mm ^{2b)} 18~64 ng/mm ^{2d)}	38) 44) 36) 37)

a)脂質単分子層の吸着に対応
b)2 step process. ベシクルの吸着について融合が誘導
c)2 step process. 脂質単分子層の速度吸着ついでベシクルの吸着
d)ベシクルサイズ(粒径)に依存

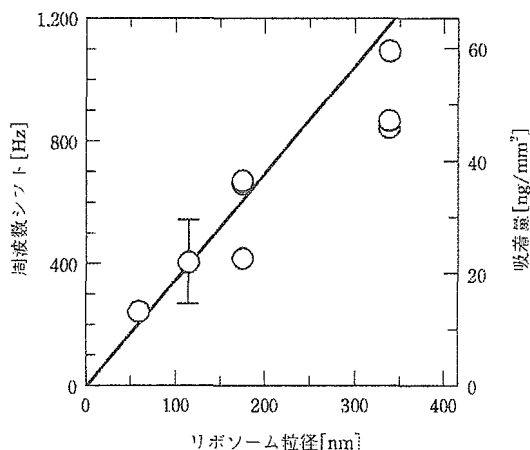


図5 リポソーム粒径と固定化量の関係⁴⁰⁾

観察した結果、リポソームの粒径とほぼ同じの高さの集合体の固定化が確認され、リポソームがそのまま電極表面上に修飾されていることと考察されている(図6参照)。このとき一次修飾した表面カルボキシル基に活性エステル化処理を行うと、アミノ修飾したリポソームの吸着量が大きく増加することも分かっており、リポソームの化学結合(アミノカップリング)による固定化が可能であることを示している。また、amino/biotinyl化処理したリポソームをアミノカップリングによりQCM電極に固定化後、streptavidin, biotinyl化リポソームを順次作用させると、リポソームによる電極被覆率が大幅に向上することも確かめている。このほかにも、QCMの振動数変化がintactリポソームの吸着に相当すると考

えられる例^{41)~44)}が報告されているばかりでなく、ヒスチジンタグ修飾リポソームとニトリロ三酢酸修飾基板とのNi⁺を介したキレート形成による可逆的吸着⁴⁵⁾やアルキルチオール修飾リポソームの金電極への固定化⁴⁶⁾など、積極的にintactリポソームを電極表面上に固定化し、新規なモデル細胞膜(モデル細胞システム)として利用する試みが検討され始めている。

以上のように、二次元の固体表面上に固定化する場合には、表面の親水化処理・官能基の露出などの処理が必要となってくる。様々なストレスに晒されるセンサーとしての用途を考慮した場合、より安定かつ高密度に固定化する手法の確立が望まれている。

6. おわりに

三次元マトリックスおよび二次元固体表面へのリポソーム固定化方法について解説した。三次元マトリックスへの固定化方法は体系的に研究されている。最近の動向として、操作条件の変動にも耐えうる安定な固定化方法の開発が望まれており、その端緒となる研究も報告されている。また、最近のQCMを用いた研究から、金属表面にintactリポソームを化学的に固定化できる可能性を示した。両者に共通しているのは、固定化量と安定性の問題である。今後、リポソームの固定化密度、固定化後の形態変化⁴⁷⁾の制御、結合のストレス安定性などの問題を解決できれば、ストレス応答型バイオプロセスへの応用を始め、マイクロアレイセンサーへの固定

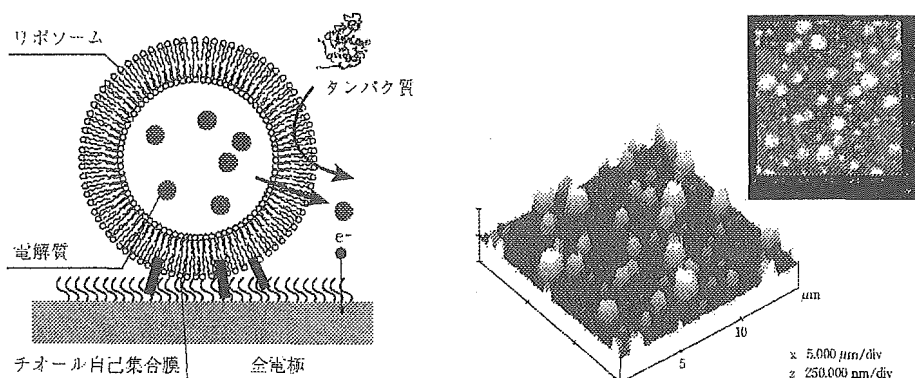


図6 金電極表面へのリポソーム固定化の概念図とAFM観察結果⁵⁾(口絵参照)

マイクロリアクタテクノロジー

～限りない可能性と課題～

化リポソームの導入によるモデル細胞膜チップの開発まで、幅広く応用できるものと考えられる。そして、リポソーム固定化センサーを用いて脂質二分子膜-タンパク質間の相互作用をリアルタイムモニタリングし、活況のストレス強度のモニタリングにも応用できるストレス応答センサーとしての利用が可能になると考えられる。それらのセンサーは、固定化リポソームクロマトグラフィーを用いたストレス応答型バイオプロセスへの応用をはじめ、医療生体工学などの分野への応用も可能になると考えられる。

【参考・引用文献】

- 1) G. Froman, F. Acevedo, P. Lundahl and S. Hjerten : *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 489 (1980).
- 2) Q. Yang, M. Wallsten and P. Lundahl : *Biochim. Biophys. Acta*, **938**, 243 (1988).
- 3) Q. Yang, X.-Y. Liu, S. Ajiki, M. Hara, P. Lundahl and J. Miyake : *J. Chromatogr. B*, **707**, 131 (1998).
- 4) Q. Yang, X.-Y. Liu, M. Yoshimoto, R. Kuboi and J. Miyake : *Anal. Biochem.*, **268**, 354 (1999).
- 5) H.-S. Jung, H. Umakoshi, S.-Y. Son, T. Shimanouchi and R. Kuboi : *Solv. Extr. Res. Dev. Japan*, **10**, 123 (2003).
- 6) 久保井亮一 : 生物工学会誌, **82**, 191 (2004).
- 7) P. Lundahl and Q. Yang : *J. Chromatogr.*, **544**, 283 (1991).
- 8) M. Wallsten, Q. Yang and P. Lundahl : *Biochim. Biophys. Acta*, **982**, 47 (1989).
- 9) Q. Yang, X.-Y. Liu, M. Hara, P. Lundahl and J. Miyake : *Anal. Biochem.*, **280**, 94 (2000).
- 10) X.-Y. Liu, C. Nakamura, Q. Yang and J. Miyake : *Anal. Biochem.*, **293**, 251 (2001).
- 11) S. Wang, M. Yoshimoto, K. Fukunaga and K. Nakao : *Biotechnol. Bioeng.*, **83**, 444 (2003).
- 12) Q. Yang, M. Wallsten and P. Lundahl : *J. Chromatogr.*, **506**, 379 (1990).
- 13) Q. Yang and P. Lundahl : *Anal. Biochem.*, **18** (1), 210 (1994).
- 14) G.T. Viel, Q. Yang, P. Lundahl, K. Ensing and R.A. de Zeeuw : *J. Chromatogr. A*, **776**, 101 (1997).
- 15) Y. Zhang, C.M. Zeng, Y.M. Li, S. Hjerten and P. Lundahl : *J. Chromatogr. A*, **749**, 13 (1996).
- 16) T. Österberg, M. Svensson, P. Lundahl : *Eur. J. Pharra. Sci.*, **12**, 427 (2001).
- 17) H. Manfred, W. Milsman, R.A. Schwendener and H.-G. Weder : *Biochim. Biophys. Acta*, **512**, 147 (1978).
- 18) I. Gottschalk, C. Lagerquist, S.S. Zuo, A. Lundqvist and P. Lundahl : *J. Chromatogr. B*, **768**, 31 (2002).
- 19) P. Lundahl, C.M. Zeng, H.C. Lagerquist, I. Gottschalk and E. Greijer : *J. Chromatogr. B*, **5**, 722 (1999).
- 20) A. Lundqvist and P. Lundahl : *J. Chromatogr. A*, **776**, 87 (1997).
- 21) L. Lu, A. Lundqvist, C.M. Zeng, C. Lagerquist and P. Lundahl : *J. Chromatogr. A*, **776**, 81 (1997).
- 22) M. Yoshimoto, R. Kuboi, Q. Yang and J. Miyake : *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **712**, 59 (1998).
- 23) M. Yoshimoto, T. Shimanouchi, H. Umakoshi and R. Kuboi : *J. Chromatogr. B*, **743**, 93 (2000).
- 24) T. Shimanouchi, S. Morita, H. Umakoshi and R. Kuboi : *J. Chromatogr. B*, **743**, 85 (2000).
- 25) S. Wang, M. Yoshimoto, K. Fukunaga and K. Nakao : *Biotechnol. Bioeng.*, **83**, 444 (2003).
- 26) M. Yoshimoto, S. Wang, K. Fukunaga, D. Fournier, P. Walde, R. Kuboi and K. Nakao : *Biotechnol. Bioeng.* in press (2005).
- 27) M. Hara, H.-Q. Yuan, M. Miyake, S. Iijima, Q. Yang and J. Miyake : *Mater. Sci. Eng. C*, **13**, 117 (2000).
- 28) Y. Okahata, O. Shimizu and H. Ebato : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 3082 (1986).
- 29) T. Nakamoto and T. Moriizumi : *Sens. Mater.*, **4**, 111 (1992).
- 30) K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko and K. Yamafuji : *Sens. Actuators B*, **2**, 205 (1990).
- 31) 石井淑夫 : 日本表面科学会編, 表面・薄膜分子設計シリーズ9, よいLB膜をつくる実践的技術, 共立出版 (1989).
- 32) S.M. Chang, B. Ebert, E. Tamiya and I. Karube : *Biosens. Bioelect.*, **6**, 293 (1991).
- 33) A.A. Brian and H.M. McConnell : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6159 (1984).
- 34) E. Kalb, S. Frey and L.K. Tamm : *Biochim. Biophys. Acta*, **1103**, 307 (1992).
- 35) C.A. Keller and B. Kasemo : *Biophys. J.*, **75**, 1379 (1998).
- 36) E. Reimhult, F. Höök and B. Kasemo : *J. Chem. Phys.*, (2002).
- 37) E. Reimhult, F. Höök and B. Kasemo : *Langmuir*, **19**,

- 1681 (2003).
- 38) Tai H. Ha and K. Kim : *Langmuir* **17**, 1999 (2001).
- 39) C. Csúcs and J.J. Ramsden : *Biochim. Biophys. Acta*, **1369**, 61 (1998).
- 40) 森田誠一, 久保井亮一 : ケミカルエンジニアリング, **47**, 45 (2002).
- 41) M. Liebau, G. Bendas, U. Rothe and R.H.H. Neubert : *Sens. Actuators B*, **47**, 239 (1998).
- 42) F. Patolsky, A. Lichtenstein and I. Willner : *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 418 (2000).
- 43) B. Pignataro, C. Steinem, H.-J. Galla, H. Fuchs and A. Janshoff : *Biophys. J.*, **78**, 487 (2000).
- 44) A. Hildebrand, A. Schaedlich, U. Rothe and R.H.H. Neubert : *J. Colloid Interface Sci.*, **249**, 274 (2000).
- 45) T. Stora, Z. Dienes, H. Vogel and C. Duschl : *Langmuir*, **16**, 5471 (2000).
- 46) D. Xu and Q. Cheng : *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14314 (2002).
- 47) U. Seifert and R. Lipowsky : *Phys. Rev. A*, **42**, 4768 (1990).

<馬越 大 / 森田 誠一 / 久保井亮一>

2	熱レンズ分光分析装置の開発	322
	●熱レンズ分光法の原理 ●熱レンズ顕微鏡と熱レンズ検出デバイス	
3	熱レンズ分光分析装置による測定例	328
4	今後の展望	331
4-14	マイクロリアクタアレイを用いたケミカル・ラボ・オン・チップの構造	
1	マイクロ流体デバイスとマイクロリアクタ	333
2	マイクロ流体デバイスの特徴	334
3	マイクロ流体デバイスを用いた微量液体操作とマイクロリアクタアレイ	335
4	微量液体の定量的なディスペンシング	335
5	微量液体の合一による定量的反応とその並列化	337
6	マイクロリアクタアレイを用いたHTS系	338
4-15	マイクロリアクタを用いた薬物代謝評価系の構築	
1	はじめに	343
2	生体での薬物代謝と肝臓・腎臓	343
3	薬物代謝をシミュレートするためには—マクロからとマイクロからのアプローチ—	347
	●マクロからのアプローチ：動物実験系、バイオ人工臓器 ●マイクロからのアプローチ：肝ミクロソーム、初代肝細胞、肝由来細胞株の利用	
4	マイクロリアクタを用いた薬物代謝評価系構築の試み	348
	●センサとしての細胞選定・構築 ●測定環境設定	
5	おわりに	352
4-16	DNA分析チップ	
1	はじめに	355
2	マイクロチップ電気泳動	356
3	石英製電気泳動チップ	359
4	マイクロチップ電気泳動装置	362
5	おわりに	365
4-17	プラスチックマイクロキャピラリーチップ	
1	はじめに	367
2	マイクロキャピラリーチップに使用されるプラスチック	368
	●要求される特性 ●代表的なプラスチック	
3	プラスチックマイクロキャピラリーチップの製作方法	370
	●母型の製作 ●成形技術	
4	プラスチックマイクロキャピラリーチップの応用例	374