

磁気固定化バイオセンサーによる化学物質濃度の定量化

The Quantification of Chemical Compounds by a Magnetic Biosensor

田中孝国

TAKAKUNI TANAKA

小山工業高等専門学校物質工学科 〒323-0806 栃木県小山市大字中久喜 771

TEL: 0285-20-2804 FAX: 0285-20-2880

E-mail: tanakatakuni@oyama-ct.ac.jp

Division of Material Science and Chemical Engineering, Oyama National College of Technology, 771 Nakakuki, Oyama,
Tochigi 323-0806, Japan

キーワード: バイオセンサー, 定量化, 生物発光, 固定化

Key words: biosensor, quantification, bioluminescence, immobilized cells

(原稿受付 2008年1月9日/原稿受理 2008年8月30日)

1. 緒言

海洋性の生物発光細菌 *Vibrio fischeri* は、接触した化学物質の濃度に応じた生物発光量を迅速・定量的に示すことが知られている³⁾。この特徴を生かしたバイオセンサーとしての研究が多数行われており、様々な化学物質の濃度と発光量との相関に関する解析例が報告されている。現在、マイクロトックスやトックスレーザーなどの市販されている発光細菌を用いたバイオアッセイ法は、乾燥菌体状態の発光細菌を復水後に培養し、その培養液もしくは菌体懸濁液に化学物質を添加して発光量の変化から化学物質濃度を算出する方法^{1,4)}である。この培養液を使用する方法は、無菌スペース¹⁾もしくは測定にメーカー特有の特別な装置が必要⁴⁾であるため、高度な操作技術が要求されている。その一方で、取り扱いを簡便にする為に固定化発光細菌の研究報告例が報告されている²⁾。しかし、固定化発光細菌のバイオセンサーは発光量測定装置と一体化されていることが多いため²⁾、センサーが劣化した時やサンプル数が多い時にセンサーの迅速交換が難しく測定に時間がかかることが問題となる。

今回、これらの問題点を解決する新しいバイオセンサーを開発したので報告する。この新しいバイオセンサーは、センサーの脱着を簡便に行う方法として磁力を用いることを特徴としている。作製した磁気バイオセンサーは2種類である。まず磁性粉(四三酸化鉄)を寒天溶液に懸濁した *V. fischeri* に加えて全てを1つに固定化した1層法、磁性粉を添加した寒天の固化後に寒天により固定化した *V. fischeri* を重層した2層法である。これらの作成したバイオセンサーは、ガラス壁を隔てたフェライト磁石を用いて、脱着が簡便に出来ることを特徴としている。この新しい磁気固定化バイオセンサーの開発

法と既存の発光量測定装置を使用した化学物質の濃度と発光量の定量的な解析結果を以下に報告する。

2. 材料と方法

2.1. 発光細菌の準備

磁気固定化バイオセンサーの作製法にあたって、発光細菌 *V. fischeri* (NBRC NO. 101058) を Marine Broth (NBRC 指定培地, Difco 社製) を用いて 25°C で好気培養し、生物発光量がピーク時の菌体を集菌した (図1)。この時の菌体濃度は約 6,000 mg/L であった。この集菌した *V. fischeri* 菌体を人工海水³⁾ で洗浄して同溶液に同菌体濃度になるように再懸濁し、実験用の試験液 (以後、試験液) とし、以後の実験に用いた。洗浄及び懸濁に用いた人工海水は、市販薬品を溶解して人工的に作製した塩化物主体の水溶液である。塩化ナトリウムを主成分に、11種類の薬品によって構成されている溶液である。

2.2. 1層法バイオセンサーの作製

まず、試験液に磁性粉(四三酸化鉄, 関東化学製) を *V. fischeri* の乾燥重量と同量加え、濃縮した試験液と共に約 50°C に保った6%寒天(和光純薬工業製)溶液に懸濁させた後固化させた。固化後、直径8mmのコルクボーラーによって直径8mm、厚さ5mmのバイオセンサーを作製した。作製したバイオセンサーの最終寒天濃度は3%、細菌濃度は、約24,000 mg/Lである。細菌濃度を高くした理由は、約50°Cの寒天溶液に混ぜた時に熱によって *V. fischeri* が死滅することが考えられたこと、磁性粉及び寒天による発光量測定阻害が予想されたためである。今回作製したバイオセンサーのサイズは2.5. で述べる発光量測定装置で測定可能な最大サイズである。

2.3. 2層法バイオセンサーの作成

溶解した6%寒天溶液に磁性粉を15 g/Lの濃度になるように添加して混合後に固化させ、厚さ3 mmの第一層を作製した。次に、第1層の固化後、6%寒天溶液に懸濁させた試験液を厚さ5 mmになるように重層した。この時の最終寒天濃度及び菌体濃度は1層法の時と同じである。第2層の固化後、直径8 mmのコルクボーラーによって両方の層を打ち抜き、磁気固定化バイオセンサーを作製した。*V. fischeri*を含む第2層の厚さは比較しやすいように1層法と同じ厚さに作製した。

2.4. 化学物質濃度の発光量への影響試験

*V. fischeri*の持つバイオセンサーの特性について、試験液のみ、1層法バイオセンサー、2層法バイオセンサーの3種を用いて発光量と化学物質の濃度の相関関係について調べた。モデル化学物質として、水溶性であり濃度の調整が行いやすいトルエン類似物質 *m*-トルイル酸(以降、トルイル酸)を選んだ。試験液に最終濃度が0, 0.8, 8, 80 ppmになるように添加し、発光量との定量関係を測定した。試験液は、トルイル酸水溶液を添加・接触後、すぐに発光量の測定を行った。作製した1層法及び2層法のバイオセンサーは、トルイル酸溶液にそれぞれのバイオセンサー全体を10分間浸した後に取り出して測定用の試験管に入れて発光量を測定した。作製した2種のバイオセンサーは、トルイル酸溶液に浸して10分間までは不安定な発光量を示したため、今回は10分間接触後の発光量を測定値とした。

2.5. 発光量の測定方法

発光量の測定は、マイクロテック・ニチオンのGENE LIGHT 55を用い測定時間10秒で行った。尚、GENE LIGHT 55は、マイクロチューブやプラスチック試験管に測定対象となる溶液を入れて10秒後に化学及び生物発光の強度を測定する装置であり、発光量を測定する一般的な機器である。今回、培養液・試験液・1層法及び2層法のバイオセンサーの測定は、ディスポーザブルタイプのプラスチック試験管(長さ55 mm, 直径10 mm, 内径8 mm)にそれぞれ入れ、GENE LIGHT 55にて発光量の測定を行った。この発光量測定装置の示す発光量は相対的発光強度と示され単位は定義されていない。通常発光量は桁が大きいため、図で示される際は対数軸で

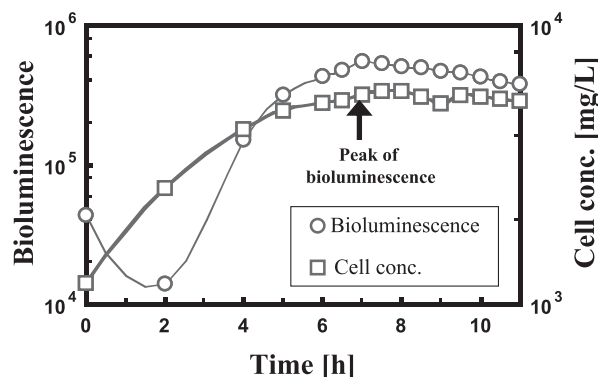


図1. *Vibrio fischeri*の示す生物発光量と細胞増殖の経時変化。

表記されている。今回の報告もそれに従って表記した。菌体濃度は、乾燥重量を測定して記録した。

3. 結果と考察

3.1. バイオセンサーの測定迅速化の評価

作製したバイオセンサーを図2-aに示した。これらのバイオセンサーは、1層法・2層法ともガラス壁を隔てたフェライト磁石の磁力に強く吸着させることができた。さらに磁石の取り外しにより、迅速に脱着が可能であった。すなわち既存のバイオセンサーの問題点である、多検体時の交換時間や、破損時の交換時間の短縮が解決

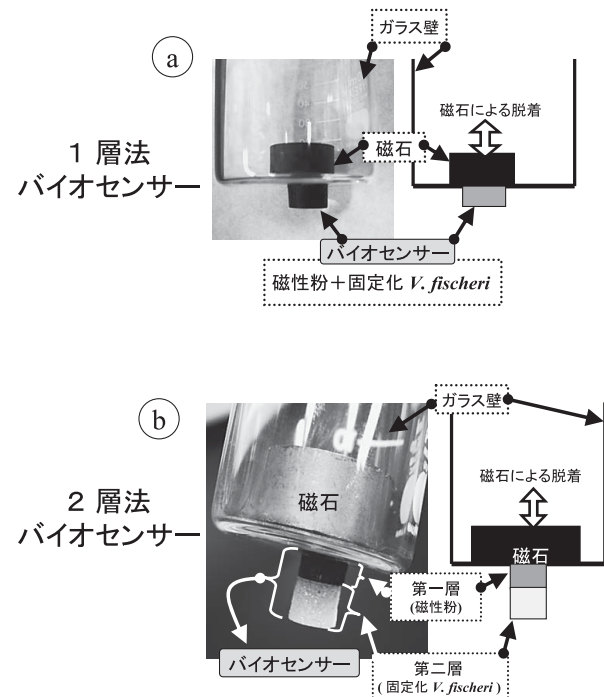


図2. 1層法 (a) 及び2層法 (b) バイオセンサー。左側：実物の写真 右側：イメージ図

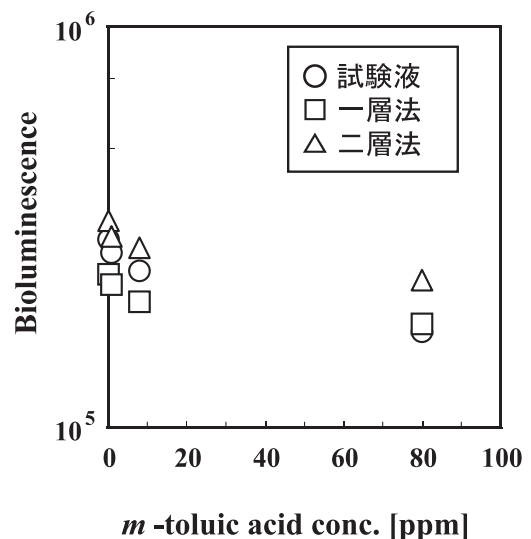


図3. トルイル酸添加時の生物発光量の変化。

表 1. トルイル酸水溶液に接触させた時の試験液・1層法・2層法バイオセンサーの発光量変化^{a)} (サンプル数 =4)

	トルイル酸濃度 [ppm]			
	0	0.8	8	80
試験液	295000 ± 20000	273000 ± 27000	246000 ± 7000	173000 ± 9000
1層法	241000 ± 276000	227000 ± 79000	206000 ± 82000	181000 ± 67000
2層法	384000 ± 52000	296000 ± 23000	266000 ± 17000	248000 ± 16000

^{a)} 表中の数値は発光量±標準偏差を示す

されたといえる。

3.2. *V. fischeri* の発光量と化学物質との関係

図3に試験液(試験液○)の発光量とトルイル酸の濃度の関係について示した。トルイル酸を試験液に接触させた場合、発光量はトルイル酸の濃度が高いほど減少を示し、定量的な式(1)が得られた。しかし、式(1)中の数値は使用時の発光細菌が示す初期発光量に強く依存する傾向が見られ一定値ではなかった。表1の発光量の標準偏差を見ると、約8 ppm以上のトルイル酸濃度は*V. fischeri*の発光量と強い相関関係($R^2=0.91$)を示すことがわかった。今後、この現象を解明するとともに、発光量によって示すことが可能なトルイル酸やその他の化学物質の濃度間隔について検討を行いたい。

$$\text{トルイル酸濃度 [ppm]} = 200 - 0.7 \times 10^{-3} \times (\text{発光量}) \quad (1)$$

3.3. 1層法バイオセンサーの発光量と化学物質との関係

1層法バイオセンサーの結果を図3に示した。バイオセンサーに接触させるトルイル酸濃度を高くすると、試験液と同様の発光量減少が見られた。1層法では以下の式(2)が得られた。表1の標準偏差がトルイル酸の各濃度で大きな値を示している理由は、*V. fischeri*を含む寒天溶液に、発光量の測定阻害を起こす磁性粉を均一に混合出来なかったことによるものだと考えられた。磁性粉にはグラム陰性細菌を強く吸着する報告例がある⁹⁾が、今回の*V. fischeri*は培養液に磁性粉を添加しても吸着現象は見られなかった(培養液に添加して確認した)。発光を阻害する理由については不明である。1層法バイオセンサーでは、相関係数 R^2 は0.77であった。

$$\text{トルイル酸濃度 [ppm]} = 300 - 1.3 \times 10^{-3} \times (\text{発光量}) \quad (2)$$

3.4. 2層法バイオセンサーの発光量と化学物質との関係

磁性粉の均一な混合が困難であったため、その問題を克服するため2層法の検討を行った(図2-b)。その結果、1層法より2層法の方の標準偏差が小さかった(表1)。2層法では、以下の(3)式が得られた。以上のことから2層法のバイオセンサーの方が、より実用向けである

ことがわかった。2層法バイオセンサーでは、相関係数 R^2 は0.83であった。

$$\text{トルイル酸濃度 [ppm]} = 150 - 0.4 \times 10^{-3} \times (\text{発光量}) \quad (3)$$

3.5. *V. fischeri* を用いたバイオセンサーの評価

発光細菌*V. fischeri*は浮遊状態(試験液)・固定化状態(1層法, 2層法)を問わず、トルイル酸濃度と発光量の間に関係があることがわかった。ただし、式(1)~(3)中の数値は常に一定の値を示すわけではなく、使用時の*V. fischeri*が示す発光量に強く依存することのみが判明している。この詳細については追加データにより解析を進めたい。以上の式(1)~(3)をまとめると、*V. fischeri*を使用したバイオセンサーは、以下のモデル式(4)を示すことが判明した。

$$\text{トルイル酸濃度} = \alpha - \beta \times 10^{-3} \times (\text{発光量}) \quad (4)$$

(α は整数, β に関しては2~0.1の数値を示す)

今後、得られた式の詳細な解析、寒天溶液へ発光細菌を均一に分散する方法(攪拌方法など)、作製したバイオセンサーの保存方法等について検討を行いたい。

本報告の一部は環境バイオテクノロジー学会2007年度大会において発表を行った。

文 献

- 1) 荒川 豊, 坂口 慶. 2006. 発光細菌を用いた有害物質のスクリーニング手法. 工業用水. 578: 15-20.
- 2) Gil, C.G., J.M. Robert, S.T. Chang, and M.B. Gu. 2000. A biosensor for the detection of gas toxicity using a recombinant bioluminescent bacterium. Biosens. Bioelectron. 15: 23-30.
- 3) Gordon, S.A.B.S., and W. Paul. 1992. *lux* genes and the applications of bacterial bioluminescence. J. Gen. Microbiol. 138: 1289-1300.
- 4) Gu, M.B., G.C. Gil, and J.H. Kim. 1999. A two-stage minireactor system for continuous toxicity monitoring. Biosens. Bioelectron. 14: 355-361.
- 5) JIS K 2510 潤滑油 - さび止め性能試験.
- 6) Sakai, Y., Y. Nitta, and F. Takahashi. 1994. A submerged filter system consisting of magnetic tubular support media covered with a biofilm fixed by magnetic force. Water Res. 28: 1175-1179.