

導電性中空糸膜を用いた感染症の遺伝子診断と
生体内の糖検出に関する研究

2003 年 3 月

五十嵐 治

目次

第1章	序論	1
第2章	病原性微生物の糖鎖結合感染とその糖検出法および遺伝子診断法	8
2.1	病原性微生物などの生体感染メカニズム	9
2.2	細胞間認識を担う糖鎖とレクチン	11
2.2.1	糖鎖の役割	11
2.2.2	レクチンの機能	13
2.2.3	細菌やウイルスの細胞表面結合	14
2.2.4	感染予防への糖鎖の役割とその可能性	15
2.3	糖鎖を解明する糖類の分析法	17
2.3.1	酵素法	17
2.3.2	クロマトグラフ法	17
2.3.3	高速液体クロマトグラフィ	21
2.4	感染予防にかかわる糖類の検出	23
2.4.1	薄層型平面電極による電気化学検出器	23
2.4.2	導電性中空糸膜電極を用いた電気化学検出器	25
2.5	導電性中空糸膜の概要	26
2.5.1	金属の被覆方法	26
2.5.2	膜構造	29
2.6	感染症の一般的な診断方法	30
2.6.1	培養法	30
2.6.2	鏡検法	32
2.6.3	抗原抗体法	34
2.6.4	遺伝子診断法	37
第3章	導電性中空糸膜を用いた「電流通電」による殺菌と遺伝子の抽出	38
3.1	細菌	39
3.1.1	細菌の構造	40
3.1.2	細菌による感染	42

3.2	導電性中空糸膜を用いた通電による殺菌	44
3.2.1	実験装置	44
3.2.2	供試細菌	46
3.2.3	実験結果	46
3.3	導電性中空糸膜を用いた通電による細胞内物質の抽出	47
3.4	遺伝子抽出	50
3.4.1	核酸	50
3.4.2	DNA の構造	50
3.4.3	RNA の構造	52
3.5	従来の核酸抽出法	53
3.5.1	化学的抽出法	53
3.5.2	磁性粒子を用いた抽出法	55
3.5.3	ポリマラーゼ連鎖反応(PCR)法	56
3.5.4	ゲル電気泳動法	57
3.6	導電性中空糸膜を用いた通電による遺伝子抽出	58
3.6.1	実験方法	58
3.6.2	実験結果	60
3.7	検討	67
3.7.1	電流通電による細菌遺伝子抽出のメカニズム	67
3.7.2	SDS による遺伝子抽出支援メカニズム	68
3.7.3	従来の化学的抽出法との比較	69
第4章	導電性中空糸膜を用いた「電界効果」による遺伝子の抽出と診断	73
4.1	遺伝子の抽出	74
4.1.1	大腸菌 O157 の遺伝子抽出	74
4.1.2	大腸菌 O157 遺伝子の濃縮	76
4.2	実験結果	77
4.2.1	電界効果を利用した単独試料からの遺伝子抽出	77
4.2.2	電界効果を利用した糞便試料からの遺伝子抽出	79
4.2.3	抽出後の遺伝子濃縮の効果	80
4.3	検討	82
4.3.1	電界効果を利用した遺伝子抽出のメカニズム	82
4.3.2	導電性中空糸膜を用いた遺伝子濃縮	83
4.3.3	従来法との比較	84
4.4	ウイルス	86
4.4.1	ウイルスの構造	86
4.4.2	ウイルスの培養と定量法	90

4.4.3	供試ウイルス	91
4.5	実験方法	93
4.5.1	電界効果を利用したウイルス遺伝子の抽出	93
4.5.2	導電性中空糸膜のウイルス濃縮効果	94
4.6	実験結果	95
4.6.1	電気的および物理的抽出法の有効性	95
4.6.2	電界強度と印加時間の最適条件	98
4.6.3	導電性中空糸膜のウイルス濃縮による遺伝子抽出	99
4.6.4	抽出後の遺伝子濃縮効果	101
4.7	検討	102
4.7.1	遺伝子の抽出に関する検討	102
4.7.2	ウイルス濃縮を含めた従来法との比較	103
第5章	導電性中空糸膜電極を用いた「電気化学」法による生体内の糖検出	105
5.1	病原性微生物の糖鎖受容	106
5.1.1	病原性微生物の生体防御	106
5.1.2	感染症に対する漢方療法	107
5.1.3	糖類の細菌阻止機能	109
5.2	糖類の電気化学検出	110
5.2.1	酸化還元による電子の授受	111
5.2.2	単糖の構造式	112
5.2.3	糖検出のメカニズム	113
5.3	糖類の検出	115
5.3.1	導電性中空糸膜を用いた糖検出電極の構造	115
5.3.2	導電性中空糸膜電極を用いたフローセルの構造	116
5.4	サイクリックボルタンメトリ	117
5.4.1	基本原理	117
5.4.2	導電性中空糸膜電極のサイクリックボルタモグラム	119
5.4.3	実験結果	120
5.4.4	検討	122
5.5	導電性中空糸膜電極の被覆金属選定	123
5.5.1	実験方法	123
5.5.2	実験結果	124
5.6	導電性中空糸膜電極長と応答特性	127
5.6.1	実験方法	127
5.6.2	実験結果	127
5.7	電気化学検出器への応用	129

5.7.1	検量線	129
5.7.2	再現性	130
5.7.3	耐久性	131
5.7.4	従来電極との比較	132
5.8	検討	133
5.8.1	サイクリックボルタモグラム	133
5.8.2	導電性中空糸膜電極の最適金属材質	134
5.8.3	導電性中空糸膜電極の基本性能	135
第6章	導電性中空糸膜電極を用いた糖類の高感度検出 および従来法との比較	136
6.1	導電性中空糸膜電極の電気化学的高感度検出	137
6.2	電気化学検出器の電極	138
6.2.1	従来電極の構造	138
6.2.2	導電性中空糸膜電極の構造	139
6.2.3	導電性中空糸膜電極の送液解析	141
6.2.4	導電性中空糸膜電極のデッドボリュームの検討	142
6.3	細孔部の残留水酸化ナトリウムの排除	143
6.3.1	内壁銅被覆電極の基本特性試験	143
6.3.2	実験結果	143
6.3.3	内壁銅被覆電極長と応答特性試験	145
6.3.4	実験結果	145
6.4	反応室の残留水酸化ナトリウムの排除	147
6.4.1	プラグ装着膜電極の基本特性試験	147
6.4.2	実験結果	148
6.5	内径縮小による残留水酸化ナトリウムの排除	149
6.5.1	内径縮小による特性試験	149
6.5.2	実験結果	150
6.6	ノイズ低減の検討	150
6.6.1	金/銅の積層電極の特性試験	150
6.6.2	実験結果	151
6.7	多成分糖の同時分析	153
6.7.1	実験方法	153
6.7.2	実験結果	154
6.8	検討	155
6.8.1	膜電極中の残留水酸化ナトリウム排除の効果	155
6.8.2	膜電極のノイズ低減効果	157

6.8.3 従来検出器の検出感度の比較	158
6.8.4 従来検出器との検出時間の比較	159
6.8.5 従来電極とのコスト比較	160
第7章 結論	161
謝辞	172
参考文献	174
研究業績	185

第1章

序 論

地球上の生物は長い進化の歴史を遺伝子情報として集積させ効率の高い有機システムとして生命を維持し、たゆまない進化を遂げてきた。人類が生命を維持するために必要な細胞は約 60 兆個、その中で体内に存在する生体組織は約 220 種類あり多くの細胞、タンパク質および糖鎖などの生体物質から構成されている^[1]。しかし時として、我々の生命が何らかの理由により脅かされ、もはや医薬などの治療では手におえない疾病に陥ることがある。そこで生体組織や臓器の蘇生が不可能となれば、それに代わる新たな臓器が必要となってくる。その選択肢のひとつが第三者による臓器の提供であり、もうひとつは人工臓器に頼ることである。このような背景から我々の生命をたえず維持して行くための生体代替のひとつとして人工膜の研究が進められてきた^{[2][3]}。

たとえば、血液の浄化系において糖尿病に由来する腎不全患者に対して行われる人工透析がある。この透析器にはポリエーテルスルフォンの多孔質中空糸膜が用いられている。また呼吸系では人口肺にポリプロピレンの多孔質中空糸膜が用いられる。しかし、この膜は気体透過性が良過ぎ血漿リーク (Serum Leakage) の問題があるため、これを補う膜としてシリコーン均質膜を併用させている。これにより人工膜は、より生体組織に近づき失われた臓器を支え生命維持の一翼を担っている^{[3][4]}。このように膜研究のアプローチは医学、薬学、生理学などの分野が取扱う細胞膜としての生体膜と化学工学、物質科学などの合成高分子膜からなる人工膜の分野から発展を遂げてきた。

その一方で、我々の日常生活において飲料水に対するより安全な水の要求が高まっている^[5]。夏の渇水期に供給される水道水は、安全性を優先するあまり次亜塩素酸ナトリウム濃度が上がり、決して味わい豊かな飲料水とはいえない。また昨今、多孔質中空糸膜と活性炭の組み合わせによって菌類や不純物などを選択分離させることでより安全性が高く、匂いの少ない飲料水を提供する簡易型浄水器が一般家庭にも普及している。しかし、一旦選択分離された膜にトラップされた菌類が生存していた場合を考えると、浄水器の使い方や構造によっては菌類などを増殖させるバイオリアクタに変貌する危険性を持っている。たとえば、昨今問題となった 24 時間風呂におけるレジ

オネラ菌の感染症は、浄化するためのフィルタが逆にその菌の温床となってしまったことで起きた被害の一例である。

一般的に膜の機能は、素材自身の持つ性質や細孔径の大きさによって選択的に分離されるが、病原性微生物などを殺菌する機能を持ち合わせていない。私は、膜の新しい機能を研究する中で、ポリエーテルスルフォンやポリプロピレンなどの多孔質中空糸膜に金属を被覆した導電性中空糸膜 (**Metal Coated Hollow Fiber Membrane ; MCH**) を開発した^{[6]~[11]}。これは、従来からの多孔質中空糸膜がイオン伝導性の域にとどまっていたものを一歩進めて金属による電子伝導性膜として機能させることで、膜としての新たな可能性を提示したものである。銀や銅などの金属物質に殺菌作用があることは古くから知られているが、飲料水などを確実に殺菌する方法としては次亜塩素酸ナトリウムなどの化学物質に頼らざるを得ない。これらのことから人体に有害な病原性微生物をより積極的に殺菌することを目的として、導電性中空糸膜に電流を通电させて効果を確認する研究を行ってきた^{[53], [56]}。

一方、病原性微生物による我々の健康への脅威は現在、大きな社会問題となっており、これらの感染により発病した患者の早期診断が望まれている。前述のレジオネラ菌や貝割れ大根に端を発した病原性大腸菌 O157 などによる感染症は、毒性が高く診断の遅れが患者を死に至らしめる危険性を持っている^{[12] [36]}。このようなことから近年、迅速かつ簡便な抗原抗体反応を用いた免疫学的手法や病原性微生物の遺伝子を直接検出する遺伝子学的手法が頻繁に用いられるようになってきた^{[13]~[16]}。そこで前述の導電性中空糸膜が病原性微生物を殺菌する際に、細胞内物質が検出されることが明らかとなり、新たな研究がはじまった。この殺菌と細胞内物質抽出に至る一連のメカニズムは、通电により細菌の細胞壁が破壊され核酸やタンパク質が漏出していると考えられている。そこで、得られた細胞内物質から DNA を取り出し PCR(**Polymerase Chain Reaction**)法にて増幅し、細菌の種類を迅速に特定診断できれば、感染症患者に対して適切な治療をすみやかに施すことができる。ここ数年、毎年のように感染者が報告されている病原性大腸菌 O157 による食中毒の事例は、産生されるベロ毒素が原因である^[36]。仮にこの遺伝子を

短時間で診断することが可能であれば、本研究の社会的貢献度は極めて高いものといえる。さらに本研究では、この導電性中空糸膜を用いた大腸菌 O157 の遺伝子抽出方法を用いて、ウイルス遺伝子の検出に応用できる可能性を示唆している。

1981 年に後天性免疫不全症候群 AIDS (Acquired Immuno Deficiency Syndrome)の報告がされて以来 20 年、その原因となるヒト免疫不全ウイルス HIV (Human Immuno Deficiency Virus)が、レトロウイルスの一種であることが解明され、HIV の研究は急速に進みつつある^{[20],[32]}。しかし、AIDS は輸血や血液製剤からの感染にとどまらず、性行為によっても二次感染を引き起こすため疾病患者が指数関数的に広がり世界的問題となっている^[32]。また現在、医療処置など含めて問題となっている B 型および C 型肝炎は、慢性肝炎をへて肝硬変や肝癌へと移行しかねない病気として恐れられている。そのため確定診断が望まれ、誤診の防止を意図として臨床的価値の高い遺伝子診断が必要とされている^{[17]-[19]}。さらに現在、アメリカで感染者が急増しているウエストナイルウイルスの出現は、かつて致死的であった細菌感染症を抗生物質の発見によって克服してきた人類に対する新たな挑戦状であるといえる。そこで導電性中空糸膜を用いて、ウイルスなどの早期遺伝子診断が可能であれば、迅速かつ画期的な診断方法となると考え評価を行った。

さらに、この金属被覆された導電性中空糸膜を用いて新たな研究も行ってきた。前述までの研究は、病原性微生物である大腸菌やウイルスによって感染した後の原因系を特定する診断である。これに対してこれらの感染症を未然に防ぐために感染前の原因系を解明することも視野に入れた。一般的に癌細胞や細菌、ウイルス、毒素などが起こす疾病は、それらの分子が持つレクチンと呼ばれるタンパク質が、ヒトの内皮細胞にある糖鎖と結合することからはじまるといわれている^{[20]-[22]}。私はここに着目し、感染時の結合をつかさどる糖鎖を解明するために、その基本となる単糖を高感度に検出することを目的に導電性中空糸膜を応用する研究を行ってきた。

生物の細胞内における代謝が無数の酸化還元を繰り返すことによって行われているように、この導電性中空糸膜もまた金属部の界面で起こる酸化還

元反応を用いて分子やイオンを検出することが可能である。しかも糖類は、その分子構造に水酸基を持っており強アルカリ条件下で直接検出することが可能である^{[23]~[25]}。さらに、導電性中空糸膜を電極として用いた場合、従来のロッド電極と比べて極めて大きな表面積を有することから電気化学検出器の糖検出感度が飛躍的に向上すると考えた。すなわち病原性微生物などが、体内細胞に結合する糖質を解明するレベルの超微量検出ができる可能性をもった膜電極として研究を行ってきた。

現在、一般的な糖の分析には、クロマトグラム法が多く用いられている。この分析は、大きく分けて液体クロマトグラフィ(LC)とガスクロマトグラフィ(GC)があり、汎用的方法としては、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)が広く採用されている。この分析法では、検出しようとする対象成分および検出感度に応じて検出器が選択される^{[23]~[26]}。本論文で取扱う導電性中空糸膜は、糖を検出する上で最も高感度検出が可能とされる電気化学検出器の分野に区分されている。

われわれの身近な分野で行われる糖の分析では「糖尿病」患者に対する血糖値がある。この場合の糖の値は、血液 1dl 中に存在する 100mg 前後の糖を分析するもので、かなり高い濃度の糖となる^{[27]~[29]}。むしろ摂取する食品に含まれる糖質を分析する分野のほうが本論文の検出領域に近いといえる。食品に含まれる糖質の検出器には、一般的に示差屈折率器が用いられ検出感度は 200pmol 前後とされるが、一旦乾燥された食品中の糖の検出では、糖成分が微量のため電気化学検出器が用いられている^{[103],[109]}。また、食品とは別に漢方薬に用いられる生薬の分野では、すべて乾燥状態のためこれらの品質管理の指標として糖が用いられ HPLC の検出器として電気化学検出器が一部に採用されている。たとえば、抗ウイルス作用やグラム陰性菌の増殖を押さえる作用のある「大黄」(Rhei rhizomd),抗 HIV ウイルス作用やインターフェロン誘起作用のある「紫根」(Lithospermi radix),鎮咳作用のある「麻黄」(Ephedrae herba)などは、含まれる糖成分が分析されている^[30]。また、この糖成分は、生体内の感染症の防御として効果を発揮している^[20]。

糖類およびその関連物質に関する分析は生化学、臨床医学、薬学、遺伝子

工学および糖鎖生物学などのさまざまな分野で研究が進められ現在に至っている。病原性微生物によって起こる疾病は、まず細菌やウイルスが宿主の組織表面に結合しなければならない。現在、大腸菌の1型線毛がレクチンとなってマンノースを含む細胞表面の糖タンパク質に、選択的に結合することが解明されている。またインフルエンザウイルスが、赤血球に特定の糖（シアル酸）を介して結合することなども明らかとなっている^{[20]~[22]}。このように細菌やウイルスの結合が感染のメカニズムにおいて重要なことから、この糖鎖と類似の構造をもつ医薬を作ればレクチンと結合して細菌やウイルスによる感染を防ぐことが可能となるため医学、薬学の分野で研究が進められている^{[21][22]}。

また、糖類のはたらきには、口腔内に取り入れた糖を分解して酸を生成し虫歯の原因となっているストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)菌への防衛機能がある。今日、虫歯抑制甘味料として脚光を浴びているキシリトール(5単糖)は、この菌に分解されない糖として食品などの分野に活用されている^[31]。このように糖類の分析は、細菌やウイルスなどによる感染を積極的に防衛する仕組みを解明する上で非常に意義深いものといえる。

近い将来、医薬品開発の分野において細菌やウイルスなどの細胞結合を阻止するような薬が、おそらく糖を利用して生まれてくるであろう。さらに、その薬は感染症や炎症となる前の予防や治療のために広く普及する時代がくると思われる^[22]。その上で本研究の導電性中空糸膜を電極として用いた高感度な電気化学検出器が将来、生体の病原性微生物に対する防衛的手段の糖鎖解明の一助となり、医学、薬学、糖鎖生物学などの研究に大きく貢献できることと確信する。また、感染症などの遺伝子診断の分野では、新しい遺伝子濃縮診断によって診断期間が短縮され、ひとつでも多くの生命が救われることを切望し、本論文の序とする。

尚、本論文は、全7章から構成されており次章以降は、次の内容が述べられている。

第2章では、病原性微生物が体内細胞の糖鎖にどのように結合するかにつ

いて述べ、その糖を検出する方法や感染症における一般的な診断方法についてまとめた。

第3章では、導電性中空糸膜を用いて「直流通電」によって殺菌された菌類と、得られた細胞内物質から遺伝子を抽出し感染症診断の可能性を模索した。

第4章では、遺伝子抽出感度を高めるために「電界効果」を利用して病原性微生物の中で迅速な診断を必要とする大腸菌 O157 を用いた遺伝子診断および肝炎ウイルスや HIV などへの遺伝子診断を目的として単純ヘルペスウイルスを用いた遺伝子抽出について述べた。

第5章では、炭水化物中の糖類を検出するためにグルコースを用いて導電性中空糸膜電極が「電気化学」的に応答する基本性能について述べた。

第6章では、糖類をより高感度に検出するための電極構造の検討を行い、7種類の混合糖を同時分析することによって具体的に現時点での糖検出の可能性について述べると共に他社との性能比較を行った。

最後の第7章では、得られた知見を整理し、それらに基づいて本研究の結論を述べた。

第2章

病原性微生物の糖鎖結合感染とその糖検出法 および遺伝子診断法

20世紀の後半, ポストゲノムの時代を背景に核酸とタンパク質が多くの遺伝子情報を担っていることからその時代の主役を演じていた. これに加えて糖鎖は構造が極端に複雑でその組み合わせも膨大なことから糖質に関する研究の関心が妨げられ科学における二級市民のように扱われてきたといえる. しかし近年, 病原性微生物が生体に感染する担い手に糖鎖が関係していることが明らかとなり本章では, その感染メカニズムと重要性について述べた. それは糖を解明することによって, 感染症を未然に防御する策を得ることにつながるからである. このことから糖質を解明する上で必要となる糖の検出方法についての概要を述べ, 導電性中空糸膜電極が, 糖を高感度に検出する可能性について触れた. また, 導電性中空糸膜は, 病原性微生物の遺伝子を直接抽出して診断することが可能なことから現状の一般的な診断方法を整理しまとめた.

2.1 病原性微生物などの生体感染メカニズム^{[20]~[22],[32],[34]}

人類は誕生以来、病気をもたらず微生物と闘い続けてきた。そしてまた 20 万年の長きに渡り寄生虫、細菌およびウイルスといったさまざまな危険物にさらされた状態で、滅亡することなく種を維持してきた。疾病が起こるには、まず、病原性のウイルス、細菌および原虫が、生体組織表面に付着してはじまるが、条件が満たされなければ生体のもつ自浄作用によって感染部から除去されてしまう。たとえば、呼吸器系に感染した微生物は、飲み込まれてしまうと胃酸によって分解されてしまうし、尿管に感染した細菌であっても尿と共に排泄されてしまうこともある。このような感染条件が整わない場合は別として、細菌は呼吸器系、消化器系、泌尿器系などの特定の組織に対してのみ選択的に結合することが一般的な事実として受けとめられている。そのひとつの例として尿管感染の原因菌である大腸菌がある。この細菌は、腎臓と膀胱を結ぶ組織に高頻度で検出されるが、呼吸器系では、ほとんど検出されない。また、これと対照的にストレプトコッカス属の細菌は、呼吸器系や皮膚にのみに生息し、尿管にはほとんど感染しない。さらにこの菌類は、まだ歯の生えてこない幼児の表皮組織では検出されず、歯が歯肉から出てくることによって高頻度に検出される。このことからストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)菌などは、口腔部の表皮組織よりも歯のほうを好むこといわれている。

これらの細菌の付着現象は、生体組織の場所によって異なるだけではなく、年齢、遺伝的背景、健康状態などによっても変わってくるといえる。また、特定動物の生体組織に付着を示す特異的な一例に淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)がある。この菌は、人間の生殖細胞と口腔の表皮細胞のみに付着し、その他の器官や他の動物細胞には付着しない。このように病原性微生物が生体に感染するためには、多くの条件が必要でこのメカニズムの一部分に糖鎖が関係していることは明らかで、今後の研究による解明が待たれている。

細菌付着による生体感染メカニズム解明の最初の手がかりは、1950年代になってからナインウエルス病院医学部のデューギッドの先導的な研究からはじめられたといわれている。デューギッドは、大腸菌(*Escherichia coli*;腸内細菌の一種でほかの組織にも生息できる)の多くの菌株や近縁の細菌が、生体組織の表面

を覆っている上皮細胞や赤血球に付着することを明らかにした。また、細菌がどのようにして細胞に結合するかを調べ、単糖のひとつであるマンノースとそれに類似した糖類のみが感染によって起こる血液凝集を阻止できることを発見した。すなわち、上皮細胞の糖鎖上に結合しやすい位置にマンノースがあれば細菌との結合が起こり感染され、逆に感染前に何らかの形でマンノースと細菌を結合させてしまえば、感染を阻止することができる可能性を意味している。このようなことから近年、病原性微生物の生体感染において糖鎖が重要な役割を持っていることが明らかになってきた。

図 2-1 は、生体の細胞表面にある糖鎖を模擬的に示したものである。細胞表面の糖鎖は、別の細胞や感染性の細菌、ウイルス、毒素、ホルモンなどの多くの分子の接着部位となっている。

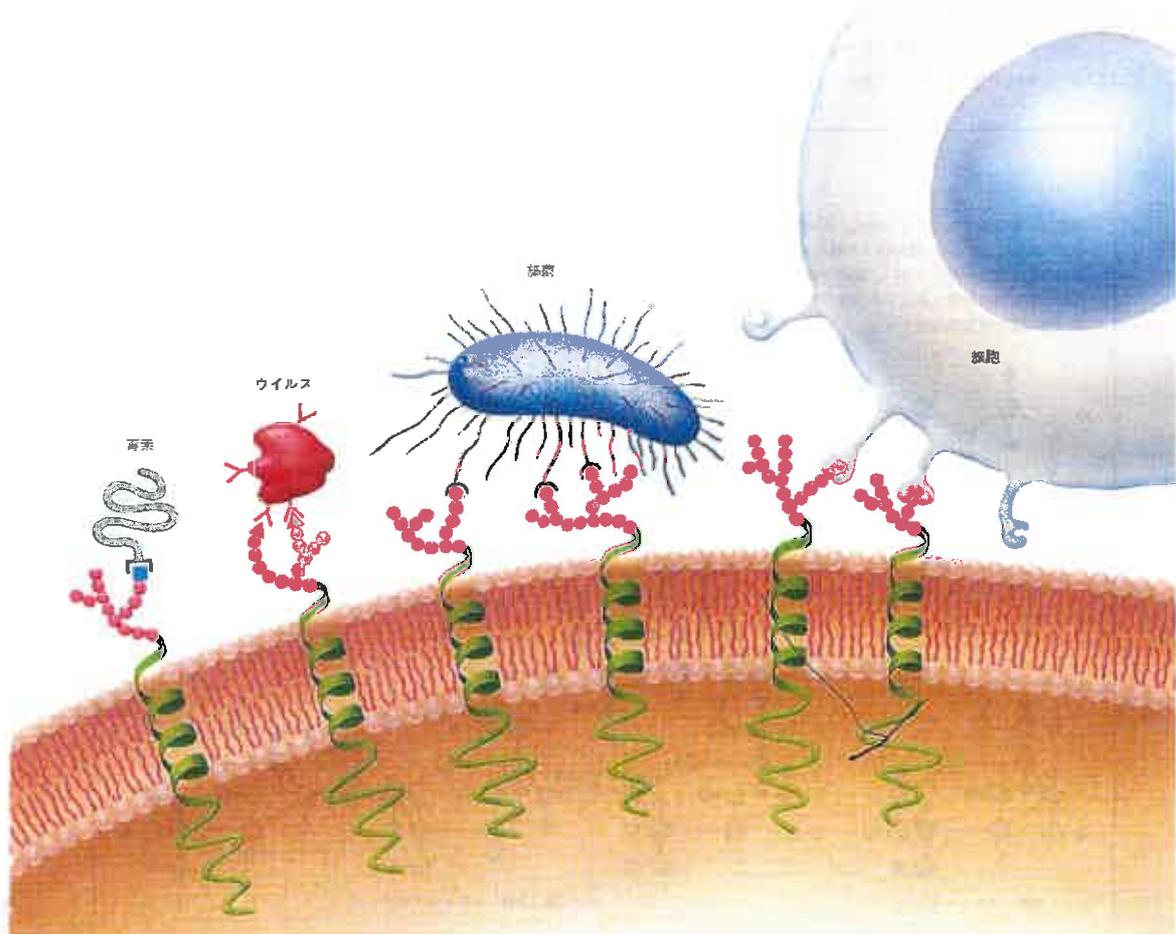


図 2-1 細胞表面の糖鎖

糖鎖の機能は 1960 年代の後半に至るまでエネルギー源(単糖やデンプンのような貯蔵分子として)であり, 構造物質(植物におけるセルロースや昆虫などの外被のキチンとして)として認識されてきた。しかし, 次に述べる 2 つの分野の研究から糖鎖の置かれた状況を一変させた。

そのひとつは, すべての細胞は糖質性の外被をまとっているという事実の認識である。この細胞外被は, 主として糖タンパク質と糖脂質という 2 種類の複合糖質からできていて, 糖タンパク質は糖がタンパク質に, 糖脂質では糖が脂質に, それぞれ結合している。ひとつの細胞の表面構造をとってみても発生, 分化, 病気などによって糖鎖は特徴的な変化を示す。とくにガン化した細胞上の糖鎖構造は, 正常細胞と比べてきわだった違いを見せている。

糖鎖に対する認識を変えたもうひとつの要因は, レクチン (Lectin) に関する研究の進歩である。レクチンは, 糖鎖分子を認識したり糖鎖と結合するタンパク質の一群をさす言葉として 1980 年 J. Goldstein らによって名づけられた。ただし, この中に抗体や糖の合成・分解に関する酵素は含まれていない。生物学者は, このころレクチンがマメ科植物の種子に含まれる血液凝集素を指すと考えていたが, その後, 細菌や動物組織や体液中にも植物レクチンとよく似た性質を示すタンパクが見出され, これらを動物レクチンと呼ばれるようになった。この動物レクチンは, 細胞の表面に存在し隣接する細胞の糖鎖と結合するのに好都合な位置で, 単糖やオリゴ糖 (単糖の短い鎖) を見分け区別する細胞認識機能をもっているといわれている。

現在, 明らかになっている糖鎖の働きには 2 つある。ひとつは糖鎖そのものが直接機能する場合で, 受容体として情報の受け取りに関与したり, タンパク質のタグ(荷札)の役を糖鎖が担ったりしている。たとえば肝臓や骨髄といった特定の場所に, そのタンパク質が間違いなく到達できるようにしていることなどである。糖鎖のもうひとつの役割は, それ自身が機能分子ではないが, それがつながったタンパク質や脂質を安定化させ, それ自身が十分機能を発揮できるように助けることである。すなわち, 糖タンパク質が血流を移動するとき, さまざまな酵素や障害と直面するが, 糖鎖がタンパク質や脂質をしっかりと守っていることを意味する。

2.2.2 レクチンの機能^{[33],[34]}

レクチンは、もともと植物の種から抽出された血球凝集素であり、現在では特定の糖鎖構造のみに結合するタンパク質であることがわかっている。また、凝集反応で簡単に判定できるため、糖鎖研究の有力な道具でありすでに多くの種類が見つかっている。逆にいうと特定の糖鎖を認識するようなレクチンを探し出すことが、単なる糖鎖の研究ではなく、実際の診断技術を確立する上で重要な鍵となっているともいえる。

細胞認識におけるレクチンと糖の相互作用について画期的な発見が NIH(国立衛生研究所)のアッシュウエル(G. Gilbert Ashwell)とアルバート・アインシュタイン医科大学のモレル(Anatol Morell)によってもたらされた。1968年、2人は血清中の糖タンパク質からシアル酸を酵素で除去した後、ウサギに注射する試みを行った。通常糖タンパク質は、動物の循環系の中で一定時間存在し続けるはずなのだが、シアル酸を除去した分子は極めて短時間のうちに消失してしまったのである。この糖タンパク質を吸収した先を調査した結果、肝臓で消滅していることがわかった。すなわち、糖タンパク質からシアル酸を取り除くことでガラクトースがむき出しになり、この糖が肝細胞のレクチンと結合していたのである。さらに2人は、このガラクトースも取り除いて同じ実験を行ったところ、糖タンパク質が血流から消失するスピードが正常に戻ることを確認した。これらの結果から、糖タンパク質の糖鎖は、血流から分解や除去すべき分子を決めて表示する機能をしているといえる。

細胞表面の糖と同様に、細胞表面のレクチンもその細胞の生理的な変化や病理的な変化に応じて変わることがいわれている。たとえばマウスとヒトのガン細胞が、正常細胞にはないレクチンを細胞表面に持っており、これがガン細胞の転移に関与しているともいわれている。また、人間の尿管に感染する大腸菌と犬に感染する大腸菌から得られた2種類の線毛レクチンに関する研究がある。いずれのレクチンもガラビオースを認識するが、一方は人間の尿管皮細胞だけに結合し、もう一方は、犬の細胞だけに結合する。これらの違いは、それぞれの細胞表面におけるガラビオースを含む糖鎖の提示のしかたが微細な点で異なっており、この糖鎖の正確な構造に関して研究が進められている。

2.2.3 細菌やウイルスの細胞表面付着^{[20],[34]}

1897年にドイツの有名な科学者フィッシャー(Emil Fischer)が「鍵と鍵穴」を唱えた。すなわち「細胞は、それぞれの表面に存在する相補的な構造を通じて相手を認識する」というものである。これは、一方の細胞に存在する構造が生物的な情報を担い、相手の細胞上の構造が、これを判読するという概念である。現在、細胞の表面付着に関する糖の役割が最もわかっているのは、宿主細胞に対する微生物と血管に対する白血球の付着である。このうち微生物の付着に関しては、ほぼ20年間にわたって詳細な解析が進められ糖を介して他の細胞を認識することがわかっている。図2-3には、尿管の組織にカン菌の一種である大腸菌が付着しているところを示す。細菌は、それぞれの組織に選択的に付着するが、こり場合、線毛(Fimbriae)と呼ぶ毛髪状の突起物が、細胞表面のある種の糖鎖に特異的に付着している。どの組織がどの細菌によって感染を受けるかは、細菌の線毛と細胞側の糖鎖との総合作用によって決まっている。

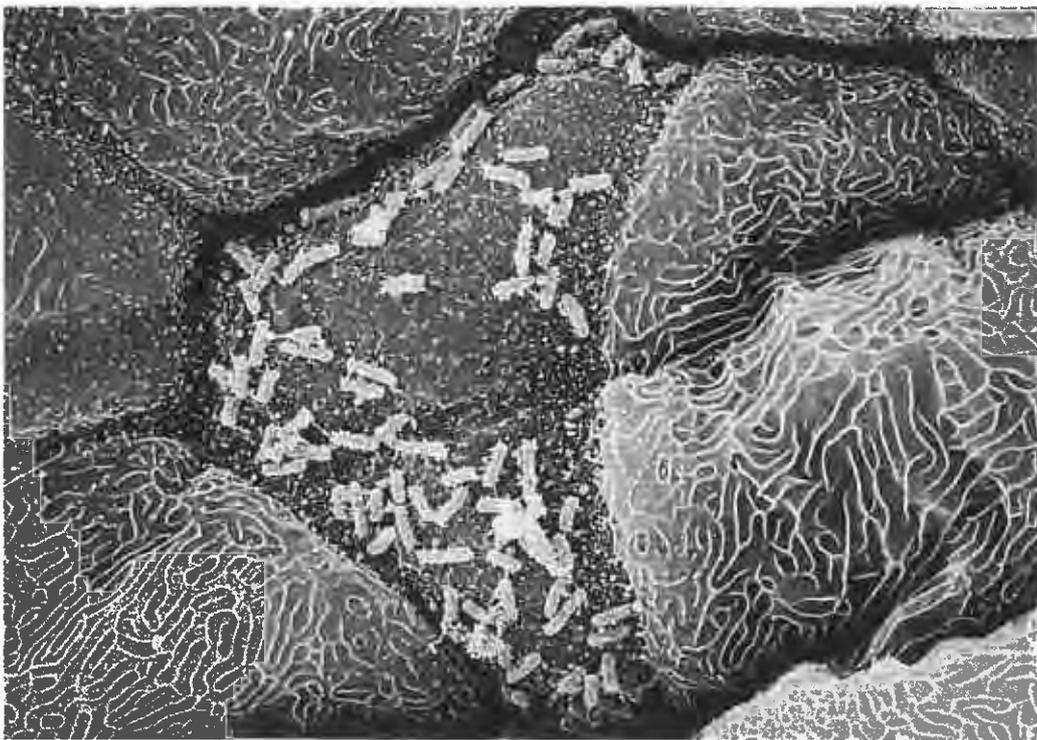


図2-3 尿管組織に糖鎖を介して付着している大腸菌

細菌の細胞付着に関係して、その性質が最もよくわかっているレクチンに、大腸菌の「1型線毛」がある。これは、通常の顕微鏡では観察できないほどの微細な毛状の付属物である。この形状は、直径5~10nm、長さ数100nmのものからそれ以上におよぶものもある。そこでこの部分をラテン語で「ふさ飾り」を意味する“Fimbriae”と呼んでいる。この線毛は、マンノースを含む細胞表面の糖タンパク質に選択的に結合することが知られている。また、大腸菌の別型の線毛である「P型線毛」は、2糖類の一種であるガラビオースを構造的に含む一般的な糖脂質と付着するといわれている。これらの細菌レクチンの特異性について研究が重ねられた結果、新たな事実がわかってきた。それは、細菌が細胞表皮の糖鎖の末端だけに付着するとは限らないことである。つまり、場合によっては、糖鎖の内部にある糖に付着できることを意味している。糖鎖は、細胞表皮からすべて露出しているとは限らない。たとえば、オリゴ糖のただ一つの糖分子だけが、細胞表皮に露出していることもある。また、免疫系のバランスを欠くことで、糖鎖の露出条件が変わり感染を引き起こしやすくなることなどの解明も進められている。

このように、細胞表面糖鎖の付着に関しては、糖鎖が存在するかどうかだけではなく、その糖鎖にうまく接近できるかどうかやその表面での糖鎖の表示の仕方にも関係しており、今後さらに解明が進むと思われる。

2.2.4 感染予防への糖鎖の役割とその可能性^{[21],[22],[34]}

ウイルスや細菌を認識する過程で、特定の糖が関与しているという発見は、ガンを含むさまざまな病気の予防や治療の面でも重要な意味を持っている。また「宿主の細胞表面の糖に対して細菌やウイルスが結合することで感染が開始される」という結論は、現在では、多くの実験的証拠によって補強されている。したがって、病原性の微生物の付着が感染の成立にとって重要なことから、医学研究者は、その予防や治療のために糖を利用することを考えている。細菌の付着を選択的に阻害する糖は、病原性細菌がそのその標的組織に到達するのをさえぎるので、いわば分子レベルの「おとり」として作用する。

1979年、細菌感染症のなかで糖鎖を用いる研究が尿管器系で積極的に開始さ

れている。たとえば、マウスの膀胱や腎臓にP型線毛を持つ大腸菌を注射し、付着を阻害する糖を加えることで効果を確かしている。また、サルを使った実験でも同様な結果が得られマンノースやガラビオースおよび糖ペプチドなどが細菌の結合を防ぐことができるとされている。実際、細菌の付着を防ぐためには、必ずしも糖を使わなくても効果を上げることができる。すなわち、細菌レクチンと宿主細胞の表面糖鎖に対して拮抗的に作用するものであれば同じような効果がある。

糖鎖の機能を利用して細菌やウイルスをブロックする原理を図2-4に示した。感染に対抗する戦略の一つは、細菌の付着を妨害することである。(a)は感染したときで、細菌上のレクチンが、感受性の宿主細胞表面の糖鎖に結合している。(b)はこの糖鎖と類似構造をもつ医薬を作れば、細菌上のレクチンと結合して細菌の付着を防止している。(c)は細菌側のレクチンと類似した分子を医薬として作れば、今度は細胞側の糖鎖の結合部を覆ってしまうので同じ効果が期待できる。

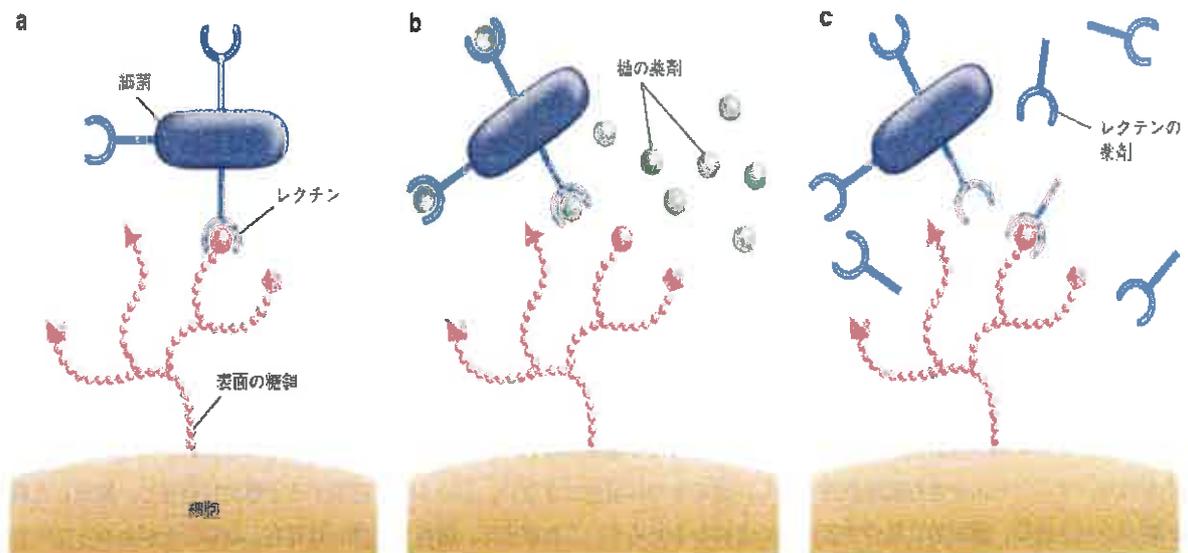


図2-4 細菌レクチンに対して分子間結合をブロックする概念図

2.3 糖鎖を解明する糖類の分析法^{[23]-[26],[34]}

DNA を語るときにアデニン(A),グアニン(G),シトシン(C),チミン(T)が欠かせないように糖鎖の場合も, その糖の区別だけは最低必要である. すなわち糖の単位は, 炭素が6個つながった単糖で, グルコース, ガラクトース, フコース, N-アセチルグルコサミン, N-アセチルガラクトサミン, マンノースと炭素が9個つながったシアル酸といった7種類の基本単糖が糖鎖の単位である. また, 糖鎖の生物学的な特異性を決定している「言語」の中でそれぞれの単糖は, 一つひとつの「文字」の役割を果たしている. しかしながら, 糖鎖の組み合わせは指数関数的に膨大かつ複雑で多様化しているために, 研究を困難なものにしている¹⁾.

生体内で極めて多様な役割を担っている糖質を解明する上で, 微量な糖を検出することは重要で, より高感度な検出器が望まれている. 一般的に, 糖類などの炭水化物の分析は, 大きく分けると酵素法とクロマトグラフ法の2つに大別される.

2.3.1 酵素法

糖鎖を分析するにあたって用いられる酵素法は, 特定の単糖類を分析する方法と大きなオリゴ糖の特定の開裂を分析する方法の2つがある. これらの方法は, 極めて高感度であるが, 塩類や金属などの化合物や他の糖類など溶液中に存在する物質に妨害を受けやすい問題がある.

免疫学的方法, 免疫沈降法および免疫蛍光法などは, 酵素的方法とはいえないが生物学的な病因論から酵素法に分類分けされている.

2.3.2 クロマトグラフ法

糖類などの炭水化物の分析は, 一般的にクロマトグラフィによる分析が広く用いられている. ロシアの植物学者ツヴェート(M.S.Tsvett)は20世紀の初頭, 有機溶媒に植物色素を炭酸カルシウム, イヌリンなど吸着性のある物質粒子を充填したガラス管(カラムと呼ぶ)に注ぐ実験を行った. また, さらに有機溶媒を流したところ, それぞれの色素は特有の色をもった帯として分離される発見をし

た。ツヴェートはギリシャ語の“Chroma;色”と“Graphos;記録する”を合成し Chromatography と命名したといわれている。このクロマトグラフ法を用いて長年にわたり糖鎖の分離に関する多くの研究がなされてきた。糖類などの炭水化物の分析は次の5つの方法がある。

(1)ペーパークロマトグラフィと薄層クロマトグラフィによる分析

ペーパークロマトグラフィは極めて安価であるが、簡単な単糖類の場合でも分離に数時間あるいは数日を要しオリゴ糖の場合は、分離できないことが多い。一方、薄層クロマトグラフィは、固定相、移動相および誘導体化などの前処理によって多数の炭水化物の分離に有効であるが、分離能の制限によって限定を受ける。

(2)ガスクロマトグラフィによる分析

単糖あるいはオリゴ糖として存在している炭水化物をガスクロマトグラフィで分析するには、誘導体化させる必要がある。トリメチルシリル化、アルキルエーテルあるいはアルキルエステルの生成など多くの誘導化法があるが、誘導化が不完全であったりすることがある。特定の糖類に対して高感度な検出ができる。

(3)超臨海流体クロマトグラフィによる分析

近年、超臨海流体クロマトグラフィによるシアル化炭水化物類の分離応用例が示されている。この方法はいくつかの利点を持つが、ガスクロのように誘導体化させる必要がある。一方、低温で分離するため、温度を上げることによる副産物の生成の可能性が減少する。

(4)液体クロマトグラフィによる分析

多数のオープンカラム液体クロマトグラフ法が用いられているが、その最も注目すべきはゲルパーミエーション法である。いくつかの糖類などの炭水化物はイオン性であり(例えばアミノ糖、ウロン酸、シアル化複合炭水化物、リン酸化炭水化物…)イオン交換によって分離でき、中性糖は、溶離液へのホウ酸塩の添加により陰イオン性炭水化物ホウ酸複合体を生成させ、イオン交換により分離ができる。この方法は、分離能と時間の点で問題があり高速液体クロマトグラフィに移行されている。

(5)電気泳動法による分析

分析レベルと同様に分取目的レベルでの炭水化物類の分離に用いられる電気泳動法もクロマトグラフ法と類似の方法と考えられる。この方法は、多くの場合、電気泳動的に分離される糖タンパク質を化学的あるいは酵素的に加水分解して得られるのが糖ペプチドである。糖ペプチドは、HPLC 法でも分離ができる。以上の内容を整理したものを表 2-1 から表 2-4 にまとめた。

表 2-1 移動相と固定相の組み合わせによる分類と名称

移動相	固定相		名称 (略称)
液体	固体	液-固クロマトグラフ ¹⁾ (LSC)	液体クロマトグラフ ⁵⁾ (LC) 液体クロマトグラフ ⁶⁾ (GC) 超臨界流体クロマト グラフ ⁷⁾ (SFC)
液体	液体	液-液クロマトグラフ ²⁾ (LLC)	
気体	固体	気-固クロマトグラフ ³⁾ (GSC)	
気体	固体	気-液クロマトグラフ ⁴⁾ (GLC)	
超臨界流体	固体		
	液体		

- (注) 1) LSC : liquid-solid chromatography
 2) LLC : liquid-liquid chromatography
 3) GSC : gas-solid chromatography
 4) GLC : gas-liquid chromatography
 5) LC : liquid chromatography
 6) GC : gas chromatography
 7) SFC : supercritical fluid chromatography

表 2-2 固定相への保持機構からの分類と名称

固体相への保持機構	固体相	名称 (略称)
吸 着	固 体	吸着クロマトグラフィー ¹⁾
イオン交換	イオン交換体	イオン交換クロマトグラフィー (IEC) ²⁾
溶 解	液 体	分配クロマトグラフィー ³⁾
孔内保持	多孔性ゲル	サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) ⁴⁾

(注) 1) adsorption chromatography

2) ion exchange chromatography

3) partition chromatography

4) size exclusion chromatography

表 2-3 分離場の形状材質による分類

分離場	名称 (略称)
・ガラス板やプラスチック板上に固体相を塗布したもの	薄層クロマトグラフィー (TLC) ¹⁾
・ろ紙	ペーパークロマトグラフィー (PC) ²⁾
・カラム (ガラス管や金属管中に固定相を保持したもの)	カラムクロマトグラフィー (CC) ³⁾

(注) 1) TLC : thin layer chromatography

2) PC : paper chromatography

3) CC : column chromatography

表 2-4 固定相と移動相の極性の大小関係による分類

極性の大きい相	極性の小さい相	名称
固定相	移動相	順相 (正相) クロマトグラフィー ¹⁾
移動相	固定相	逆相クロマトグラフィー ²⁾

(注) 1) normal phase chromatography

2) reversed phase chromatography

2.3.3 高速液体クロマトグラフィ

(1) HPLC の装置

糖類などの炭水化物の分析に一般的に多く用いられる高速液体クロマトグラフィ(HPLC)の装置の主要部を図2-6に示す。装置の全体構成は移動相の送入口、試料導入部、カラム、検出部および記録部からなっている。試料導入部から注入された試料成分はカラムで分離された後、検出部に送られ各成分量に応じた検出器の応答が電気信号に変えられ記録部に送られる。記録されたものをクロマトグラムと呼ぶ。

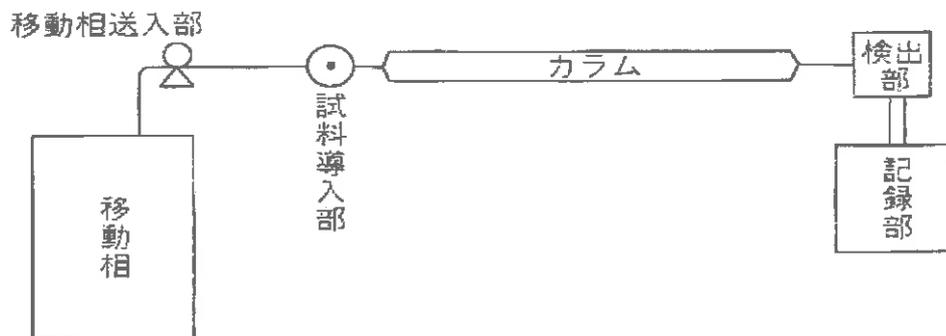


図2-6 クロマトグラフの主要構成

(2) HPLC のカラム

HPLC のカラム(Column)には固定相が詰められているが、詰める方法はクロマトグラフィの種類によって異なる。カラムにつめられる状態にしたものを充填剤と呼ぶ。HPLC 用のカラムの管材質は、ステンレス鋼管が使われ管の内径は、汎用カラムで3~12 mm、マイクロサイズでは、1 mm以下のものが使われる長さは、数cm~数10 cmである。クロマトグラムのカラムの分離を図2-7に示す。

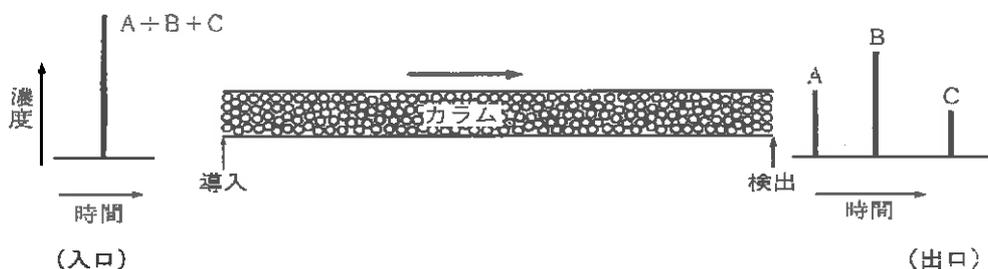


図2-7 クロマトグラムのカラム概念図

(3) HPLC の検出

表 2-5 と表 2-6 に HPLC 用および GC 用の検出器の種類と検出対象成分をまとめた。検出器には、感度や選択性は乏しいが汎用性のある検出器と特定の化合物に対して高い応答挙動を示す高感度選択的検出器がある。

最近では HPLC や GC を質量分析計(Mass Spectrometer; MS)と直結して高感度、選択的検出を行っている例もある。

表 2-5 HPLC 用検出器の種類と対象成分

種類 (略称)	対象物質
屈折率検出器 (RID) ¹⁾	汎用
紫外・可視吸収検出器 (UV-VISD) ²⁾	紫外光または可視吸収物質
蛍光検出器 (FLD) ³⁾	蛍光性物質
電気化学検出器 (ECD) ⁴⁾	電気化学的活性物質
化学発光検出器 (CLD) ⁵⁾	化学発光関連物質
光散乱検出器 (LSD) ⁶⁾	高分子量物質

表 2-6 GC 用検出器の種類と対象成分

種類 (略称)	対象物質
熱伝導度検出器 (TCD) ¹⁾	汎用
水素炎イオン化検出器 (FID) ²⁾	炭化水素ほか
電子捕獲型検出器 (ECD) ³⁾	ハロゲン化合物、多環芳香族炭化水素
熱イオン化検出器 (TID) ³⁾	含窒素、リン化合物
炎光光度検出器 (FPD) ⁵⁾	含硫黄、リン化合物
ヘリウムイオン化検出器 (HID) ⁶⁾	イオン化電圧による選択性
光イオン化検出器 (PID) ⁷⁾	イオン化電圧による選択性
伝導度検出器 (Hall D) ⁸⁾	ハロゲン化合物ほか

2.4 感染予防に係る糖類の検出^{[23]~[26]}

糖類などの炭水化物に関する分析は、生化学、臨床化学、薬学、遺伝子工学および糖鎖生物学などのさまざまな分野で研究が進められている。HPLC を用いた糖類の検出では、糖自身が強い紫外吸収や光学的に検出できる発色基を持たないことから未修飾の糖の検出は、示差屈折率検出器を用いる方法^{[100],[101]}や紫外領域に吸収をもつソルビン酸塩などを用いる間接吸光検出法^[102]が一般的となっている。しかし、これらの方法は、いずれも感度および選択性に問題があり、これらの問題を解決する手段として、糖類を誘導体化させ紫外吸光検出や蛍光検出するなどの試みがなされている^{[86],[87]}。特に蛍光検出法は、高感度で選択性も良いが誘導体化させる操作が煩雑で反応の収率の問題や試薬による汚染の問題が残されている。一方、糖類を誘導体化させずに直接検出する方法として、強アルカリ条件下で金属 (Ni, Cu, Pt, Au) 電極を用いて糖類を高感度に検出するものがある^{[81]~[85]}。これは電極が糖類の酸化反応に対して触媒的活性を示すことを利用して電気化学的に検出する方法である。

2.4.1 薄層型平面電極による電気化学検出器

一般的に、高速液体クロマトグラフィ (High-Performance Liquid Chromatography; HPLC) を用いた電気化学的測定には、薄層型の平面電極が用いられ測定する電気的性質によって3つに大別される。これはオームの法則に出てくる3つのパラメータを原理としている。第1番目は電位に関する測定で、たとえば pH メータやイオン選択電極などである。第2番目は伝導性に関する測定で、イオンの存在による抵抗値の変化を利用して溶液の導伝値の測定である。第3番目は電位を一定にしたときの電流の変化を測定するものである。通常、電気化学検出器といえは、3番目の測定を行うものを示す。基本原理は、電極表面において酸化還元反応を行わせ反応時における電流値を測定するものである。

酸化体 O_x と還元体 R_{ed} との間で可逆的な電極反応は、次のように表される。



さて、測定対象物質が HPLC に設けられたカラムによって分離されフローセル

に流入し、ある電位をもつ電極に接触して酸化還元反応が可能であれば、そこで電子の授受が生じる。この原理を図 2-8 に模式的に示す。

第1段階：測定物質が溶液から拡散によって電極表面に移動する。

第2段階：電極表面において酸化還元反応が生じる(電子の授受)。

第3段階：電極表面より反応物が再び溶液に戻っていく。

このような反応における反応量と電流値はファラデーの法則に基づくもので、次式で表される。

$$Q = n F N$$

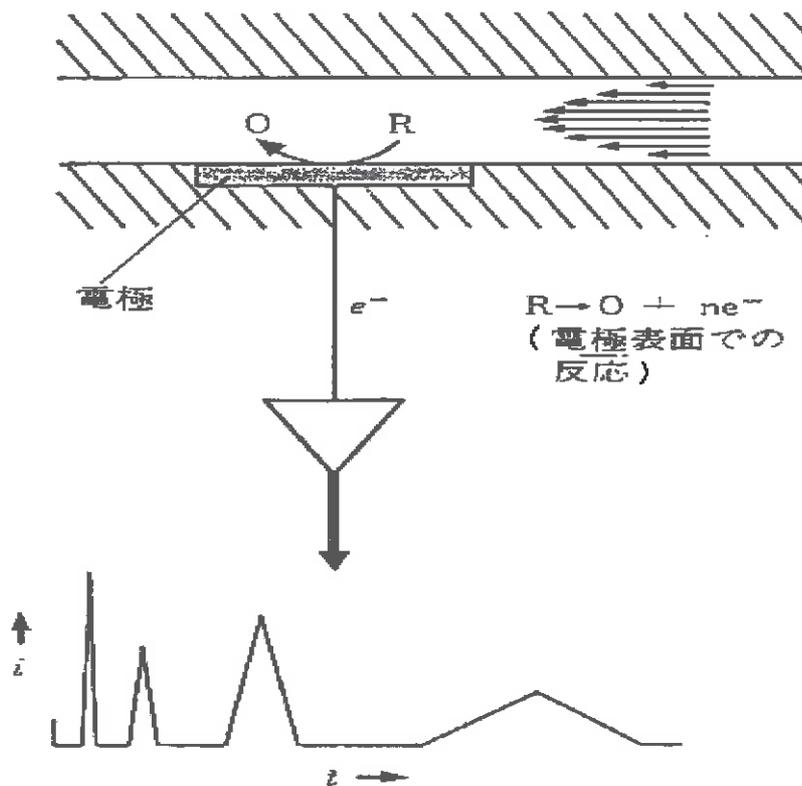


図 2-8 薄層型平面電極による反応の模式図

ここで、 Q は総電荷量、 N は反応物質のモル数、 n は電子のモル数、 F はファラデー定数である。この式を微分すると次式を得る。

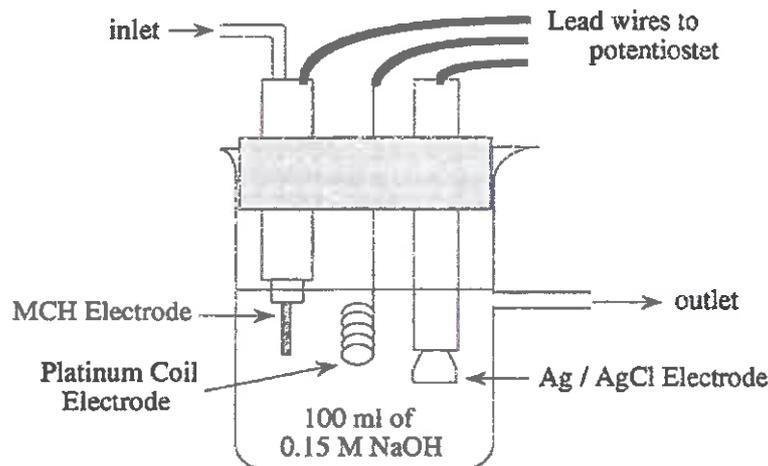
$$dQ/dt = i = nF \cdot dN/dt$$

電気化学検出器では、この i が測定される。

2.4.2 導電性中空糸膜電極を用いた電気化学検出器^{[104],[105]}

HPLC を用いた電気化学検出器の電極は、一般的に薄層型の平面電極が高感度な検出器として用いられている。しかし、この電極は目的成分がさらに低濃度となると測定精度が極端に低下するため高感度な電極が望まれていた。近年、カーボン繊維を数千本束ねて表面積を増した高感度カーボンバンドル型電極も存在しているが、炭水化物などの糖類を検出することはできない。糖を高感度に検出する方法は、第5章以降で述べるが、一般的に糖を誘導体化させる必要がある^{[86],[87]}。一方、糖類を誘導体化させずに直接検出する方法として、強アルカリ条件下で金属 (Ni,Cu,Pt,Au) 電極を用いて糖を高感度に検出するものがある^{[81]~[85]}。導電性中空糸膜電極(MCH Electrode)は、この原理に基づくもので、多孔質中空糸膜の膜表面積の広さと無電解メッキによる細孔部まで金属を被覆することができるため検出面積が極めて大きな電極として期待されている。

図 2-9 導電性中空糸膜電極を用いたフローセルの模式図



生体内の微量な糖を検出するためには1ccに含まれる糖が少なくとも数 ng 以下、すなわち数 pmol 以下の検出感度が必要とされ、現在、その感度をいかに高めるかの研究がなされており、導電性中空糸膜電極を用いた検出器もその一つである。図 2-9 に導電性中空糸膜電極を用いたフローセルの模式図を示す。

2.5 導電性中空糸膜の概要

多孔質中空糸膜は、液体や空気などの混合物質を濾過することによって、それらに含まれる目的とする物質を分離するための濾過基材である。現在、この多孔質中空糸膜は高純度水、無菌水、血液の浄化、火力・原子力発電所の復水および排水の濾過など、医療、工業分野において広く利用され、さらには一般家庭用の浄水器にも用いられている。しかし、この多孔質中空糸膜は、それ自体に殺菌能力がないため、膜内に細菌が蓄積し、それによる再汚染が懸念されるようになってきた。そこで、この膜に金属を被覆した導電性中空糸膜に電流を流すことで、膜に捕捉された細菌が殺菌されることを見出した。本研究では、それらの知見をもとに、導電性中空糸膜を全く新しい遺伝子抽出基材として利用することを試みた。

ここでは、本研究で用いた導電性中空糸膜の特徴となっている金属の被覆方法、また膜の構造、実験に際して行ったモジュール化の方法について述べる。

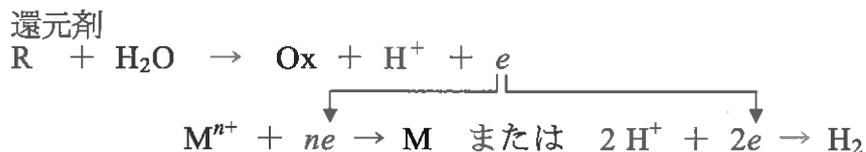
2.5.1 金属の被覆方法^{[88], [89]}

一般に金属をメッキする方法として電気メッキ、蒸着、スパッタリング、また本研究で用いている無電解メッキなどがある。それらの中でも、ポリプロピレン製の多孔質中空糸膜表面に金属を被覆する方法としては、蒸着やスパッタリングといった方法がこれまでに用いられてきた。しかし、これらの方法は、金属をポリプロピレンに付着させているだけで、金属層と多孔質中空糸膜との接着強度が低く、金属層が膜から剥離しやすいという問題があった。そこで本研究では、多孔質中空糸膜表面上に金属を被覆する方法として、これまでに Rowe^[88]が行われていなかった無電解メッキ法を採用した。

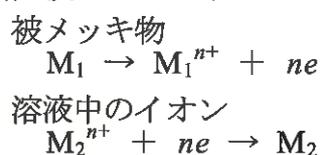
無電解メッキ法は、化学還元メッキ法と置換メッキ法に大別される。両者を簡単に説明すると、前者は、還元剤が酸化されることで放出される電子によって、溶液中の金属イオンを被メッキ物上に金属として析出させる方法である。もう一方の置換メッキ法は、被メッキ物の方が溶液中の金属よりイオン化しやすい性質をそなえていることが条件であって、その反応は溶液中に被メッキ物の金属が溶出することにより、被メッキ物上において電子の授受がなされ溶液

中の金属イオンが金属となって析出するものである。このように電気を使用しないで還元反応やイオンの置換によって金属をメッキする方法を無電解メッキ法という。両者の反応の概略を以下に示す。

(化学還元メッキ法)



(置換メッキ法)



本研究で使用した導電性中空糸膜は、導電率が高く、またほとんど腐食しない金属である金 (Au) を上述の無電解メッキ法によって被覆した。その具体的な手順を表 2-7 に示す。

まず、40%クロム酸 (CrO₃) と 40%硫酸 (H₂SO₄) の混合溶液を 60℃まで加温し、この中にポリプロピレン製の多孔質中空糸膜を 2 分間浸してエッチング処理を行った。次いで、膜を混合溶液から取り出して十分水洗した後、5%塩酸 (室温) に浸し膜に残留しているエッチング液を中和した。さらに 15%のコンデライザー SP と呼ばれる溶液 (40℃) に 3 分間浸して再度中和し、水洗した。その後、40℃に加温されたキャタリスト C と呼ばれる触媒付与剤に 3 分間浸すことで、上記のような還元反応を促進させる触媒金属パラジウムを膜に付与させた。厳密には、この操作ではパラジウムとすずの合金がコロイド状に膜表面に付与されているため、45℃の 5%塩酸に 2 分間浸すことですずを溶解し、触媒金属として良好なパラジウムのみを膜に存在させた。表中にはこの操作をアクセルと記述した。5%の塩酸から取り出した膜を水で洗い、次いで pH が 6.6~6.8 に調整されたトップケミアロイ B-1 と呼ばれる無電解ニッケル・ホウ素合金メッキ液 (60℃) に 5 分程度浸し、ニッケル・ホウ素合金を膜表面に被覆した。この操作ではメッキ液中のホウ素化合物が還元剤となり、触媒であるパラジウム表面で還元反応が生じ、これを取り巻くようにニッケル・ホウ素合金の析出が

起こる。なお、析出した合金の組成はニッケルが 99%以上、ホウ素が 1%未満であることから、以後、この操作で被覆された金属はニッケルと考える。このようにニッケルを被覆した膜は、ニッケル自体の電気抵抗が比較的高いため優れた導電性が得られなかった。そこで、さらに電気抵抗の低い金属 Au を被覆することによって導電性を向上させた。Au の被覆には OPC ムデンゴールドと呼ばれる浸漬無電解金メッキ液を 10~20%に薄め、pH を 5.5~6.2 に調整し、75~80°Cに加熱したものを用いた。この溶液にニッケルが被覆された膜を 10 分程度浸漬して Au を被覆した。先に被覆されたニッケルは Au よりイオン化傾向が高いため、Au が置換メッキによって膜表面に被覆される。

表 2-7 金属被覆の操作手順と各条件

処理	薬品	温度 (°C)	時間 (min)	pH
エッチング	40%クロム酸 (CrO ₃) と 40%硫酸 (H ₂ SO ₄) の混合溶液	60	2	---
中和 (1)	5%塩酸 (HCl)	室温	1 ^{注)}	---
中和 (2)	15%コンデライザーSP	40	3	---
触媒付与	キャタリスト C	40	3	---
アクセセル	5%塩酸	45	2	---
ニッケルメッキ (化学還元メッキ)	トップケミアロイ B	60	5	6.6~6.8
Au メッキ (置換メッキ)	10~20% OPC ムデンゴールド	75~80	10	5.5~6.2
乾燥	---	60	30~60	---

注) 残留しているエッチング液が中和するまで行い、その目安が 1 分。

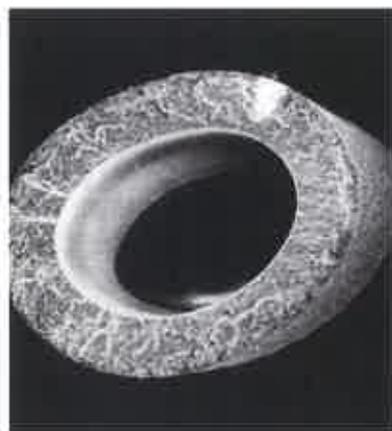
以上のような無電解メッキ法を採用することで、触媒金属のパラジウムが膜に化学的に結合し、それを取り囲むように金属が被覆されているため、これまでの蒸着やスパッタリングによるものと比べて、金属層の接着強度が大幅に向上した。さらに金属の被覆量を、エッチング液およびメッキ液の濃度と温度、処理時間などによって容易に調節でき、また被覆金属の種類も選択できること

から、導電率をも簡単に制御できる。その結果、従来のものは $100\ \Omega/\text{cm}$ 程度の比抵抗であったのに対し^{[90],[91]}、本研究で用いた導電性中空糸膜は $0.1\sim 1\ \Omega/\text{cm}$ 程度まで低下させることができ、接着強度と導電性がともに改善された。

2.5.2 膜構造^{[3],[105]}

本研究で用いた導電性中空糸膜は、前項のようにポリプロピレン製の多孔質中空糸膜表面に無電解メッキ法により金属 Au を化学的に被覆したものである。膜の電子顕微鏡写真を図 2-10 に示す。膜の形状は円筒状でポリプロピレン層と金属層（表面から数十 μm の厚さ）から成っている。ここで、図の(a)は、断面写真である。(b)は、断面部の拡大写真である。(c)は、銅被覆部の拡大写真である。(d)は、銅被覆する前のオリジナル写真である。膜厚は約 $300\ \mu\text{m}$ で、そのうち外側の $10\sim 15\%$ （数十 μm ）が金属層である。また膜の表層は、多孔質中空糸膜本来のポリプロピレン繊維に沿って金属が被覆されているため、ポリプロピレン層はもとより金属層もスポンジ状のポアが形成されている。

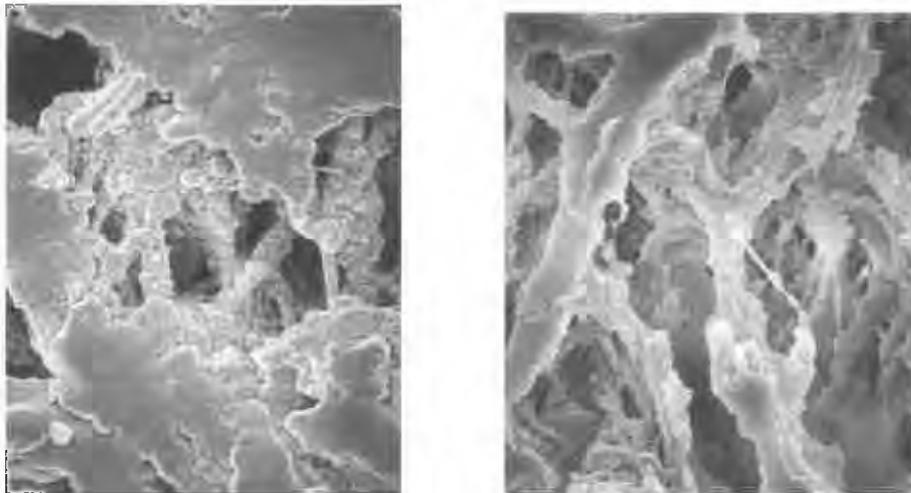
導電性中空糸膜はこのような構造から、従来の多孔質中空糸膜の特長であった広い有効膜面積 ($534\ \text{cm}^2/\text{cm}$)、微粒子に対する高い捕捉能力に加え、無電解メッキ法により金属を被覆したことからポリプロピレン層と金属層との接着強度が向上し、それに伴い高い導電性を有している。



(a) 断面写真



(b) 断面拡大写真

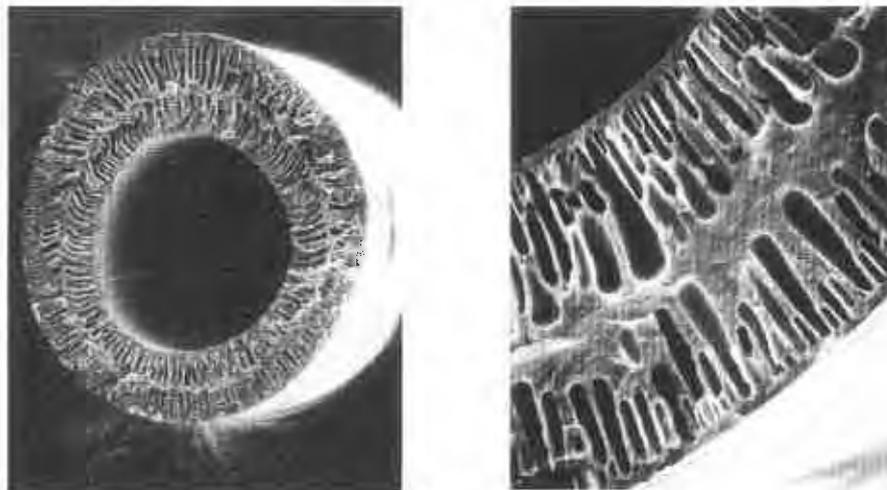


(c) メッキ部拡大写真

(d) オリジナル写真

図 2-10 導電性中空糸膜の SEM 観察写真

本論文の実験に用いた多孔質中空糸膜は、図 2-10 に示すポリプロピレン製を用いたが、この製法は、乾式法により得られたものである。多孔質中空糸膜の製法は、乾式法のほかに湿式法がありポリエーテルスルホン(PES)などの素材は、湿式法が用いられ当研究室にて試作した写真を図 2-11(a)(b)に示す。



(a) 断面写真

(b) 断面拡大写真

図 2-11 PES 製多孔質中空糸膜の観察写真

2.6 感染症の一般的な診断法^{[13],[35]}

医師により感染症と診断された場合、感染部位の特定を行った後、様々な方法によって感染症検査が行われる。まず、適切に採取した検体を肉眼および顕微鏡で観察し、確定検査を行うべきか否かを判断する。ここで得られる患者情報（症状、基礎疾患、治療歴など）は、検査を進めるうえで最も大切となる。多くの場合、確定検査が必要であり、培養法（分離培養、確認培養後の性状検査）、鏡検法（グラム染色、抗酸染色法）、免疫学的診断法（ラテックス凝集反応法、ELISA（enzyme linked immunosorbent assay；酵素結合免疫吸着測定）法、イムノクロマトグラフ法などによる抗原および抗体測定法など）、遺伝子工学的検査（PCR（polymerase chain reaction；ポリメラーゼ連鎖反応）法）などの様々な方法によって行われる。また検体の種類によっては、その特徴から特定感染症または微生物の種類の推測も可能なことがある。例えば、明らかに血性下痢便なら腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC）感染症、青緑色膿瘍物なら緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）感染症が疑われる。

ここでは、病原性細菌・ウイルスによる感染症検査の代表的なものについて概説する。

2.6.1 培養法^{[36],[37]}

病原性微生物に侵された病巣部あるいは糞便、尿、血液、髄液、喀痰などの検体、さらに食中毒などではその原因食品と思われるものから病原性微生物を分離し、同定する微生物学的検査（培養法）は古くから行われており、最も基本とされてきた。しかし、この方法は免疫学的、遺伝子工学的検査に比べて繁雑で、迅速性に劣る（少なくとも3日程度の検査期間を要す）ことから迅速な診断が要求される急性感染症には不向きな検査法といえる。

細菌およびウイルスでその手法が多少異なるため、両者を区別して以下に述べる。

(1) 細菌の場合

医師によって感染症が病原性細菌によるものと診断されたとき、まず予想される細菌のみをできる限り検体から選択的に増殖させる選択培地を用いて、

その細菌に適した環境で増菌あるいは分離培養を行う。これによって生じたコロニー（細菌群）の中から疑わしいものを掻き取って純培養する。この場合も目的に応じて、液体培地や固形培地を用いる。純培養した細菌は表 2-8 性状から同定される。

(2) ウイルスの場合

ウイルスは自己増殖する機能を有していない。そのため、生きた細胞内に寄生して、細胞の代謝酵素や材料、さらにタンパク質合成のために細胞のリボソーム（ribosome）を利用して自己成分を合成し増殖する。よって、ウイルスの増殖には生きた細胞が必要である。この生きた細胞として何を用いるかにより、ウイルス分離法は表 2-9 うに 3 つに大別される。ただし、必ずしも全ての種類のウイルスを増殖できるとは限らず、増殖効率の高い分離材料が見出されていないものも中にはあり、そのようなウイルスの培養は極めて難しい。また増殖が可能なウイルスであっても各々の分離材料が異なることから、多くの種類の分離材料を準備しなくてはならないこともこの方法の特徴である。

表 2-8 病原性細菌の性状検査

性状	検査内容
コロニーの性状	大きさ、形、色、発育条件（O ₂ 呼吸か否か）
細菌の形態	大きさ、形、配列、鞭毛や芽胞および莢膜形成の有無など
生化学性状	栄養要求性、糖、アミノ酸の分解能、酵素産生能など
毒素産生性	動物や培養細胞に対する毒性など
化学的性状	細胞壁や脂質の構成成分など
免疫学的性状	細菌の抗原性など
遺伝学的性状	CG含有量*, DNA や RNA の相同性

*C: cytosine (シトシン), G: guanine (グアニン)

なお分離されたウイルスは、感染後の培養細胞に見られる細胞変性効果（cytopathic effect: CPE）、抗血清を用いた中和試験、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察、後述の抗原および抗体測定、あるいは接種された動物の症状、病理組織学的変化などにより同定される。

表 2-9 ウイルスの分離法

分離材料	例
培養細胞	サル腎細胞によるエンテロウイルス, 単純ヘルペスウイルスの分離
発育鶏卵	8~13 日齢発育鶏卵羊膜腔でのインフルエンザウイルスの分離
感受性動物	乳のみマウス脳内接種による日本脳炎ウイルス, 狂犬病ウイルスの分離

2.6.2 鏡検法^{[37],[38]}

前述のような培養法を主体とした微生物学的検査は, 全般的に迅速性, 簡便性に問題を有しているものの, その中で鏡検法は簡単そして迅速に行えることから, 有用な感染症検査の一つとして現在でも多用されている。ただし, 鏡検法は光学顕微鏡によって行われることから, 確認できる微生物の大きさに制限があり, その中でも直径 20~300 nm であるウイルスには適用されず, それよりも大きい (0.5~1.0 μm × 1.5~2.0 μm) 細菌に対して使われる。

鏡検法の中でも特にグラム染色と抗酸性染色は, 感染検査において価値の高い鏡検法とされており, また免疫学的, 遺伝子工学的検査に比べコストが低く, 適応性が高い。

(1) グラム染色

現在, 臨床検査で使用されているグラム染色法としては, Hucker 変法, Bartholomew & Mittwer 法^{[39],[40]}がある。両者は, 色素や試薬にわずかな違いがあるだけで同様に実施される。塗抹, 乾燥, 固定した試料をクリスタル・バイオレットでまず全ての細菌を染色する。水洗後ルゴール液 (ヨウ素・ヨウ化カリウム水溶液) をかけ媒染し, さらにアルコールで脱色する。グラム陽性と呼ばれる細菌群は脱色されず, クリスタル・バイオレットの青紫に染まったままであるが, グラム陰性と呼ばれる細菌群は脱色されて無色になる。このままではグラム陰性菌を顕微鏡で観察できないため, サフラニンによって赤く呈色する。一度クリスタル・バイオレットで染まったグラム陽性菌はサフラニンを加えても色調は変わらないため青紫のままとなる。

この方法は, 検出細菌がグラム陽性か陰性であるかの判定を行い, 次に形態の特徴を観察して同定することはできるが, それ以上に緊急時の感染検査の有用性が評価されている。すなわち, グラム染色は細菌の存在を明らかに

することができる。その一方で、グラム染色性および形態特徴から菌種の推定が行われるため、形態やグラム染色性の類似した緑膿菌や腸内細菌に関しては熟練技師でも困難なことが多い。

(2) 抗酸性染色法

結核菌に代表される抗酸菌の細胞壁は脂質に富み水溶液色素に染まりにくい。一度染色されると酸、アルコールなどの脱色剤で脱色されにくいことを利用した染色法である。喀痰をスライドガラスに固定した後、石炭酸フクシンを加え加温染色する。その後、塩酸アルコールで脱色すると抗酸菌以外の細菌や上皮細胞、炎症細胞は脱色されるため、メチレンブルーを加えて青く染める。喀痰中の結核菌は赤く、その他の細胞は青く染色されることから結核菌が検出されやすくなる。

結核菌は抗酸菌の中でも抗酸性が特に強く、抗酸性染色された標本を煮沸水に浸すことで脱色されないが、非病原性抗酸菌は脱色されるため、同定がより確実に行える。しかし、この方法は抗酸菌の染色法として開発されたため、抗酸菌以外の検出は難しい。

2.6.3 抗原抗体法^{[36],[37],[41],[42],[45]}

抗原と抗体の反応は特異的であり、反応産物である抗原抗体複合物は定量的に形成される。試験管内で抗原抗体反応を行うことによって、微量の抗原の検出や抗原性による物質の同定が可能であり、また抗体の存在を定性的に知るだけでなく、血清中の特定の抗体量を、相対的に（抗体価として）また絶対的な量として測定することも可能である。現在、試験管内抗原抗体反応として、凝集反応法や標識抗体法などが用いられている。凝集反応は抗原が微粒子状であれば簡単に実施でき、肉眼で判定できるため、細菌の血清型別や血液型判定などに使われている。また抗体や抗原を標識し、その標識化合物の定量によって測定する標識抗体法は、感度と定量性に優れていることから、広く応用されている。ただし、抗体が形成されるまでに数ヶ月以上要すものもあり、そのような検査には不向きである。

(1) ラテックス凝集反応法

図2-12のようにラテックス凝集反応法は、ラテックス粒子に付与した細菌・ウイルス等の抗体を、検体中の細菌・ウイルスと反応させ、凝集塊を形成させる。目視で結果を判定できるため、特別な機器は必要ない。また、原因食品や糞便から直接検査できる場合もあるが、病原性微生物の量が多い急性期の検体を使用しないと検出は困難であり、病原性細菌の検査では、通常分離培地上に発育した疑わしいコロニーを使って行うことが多い。

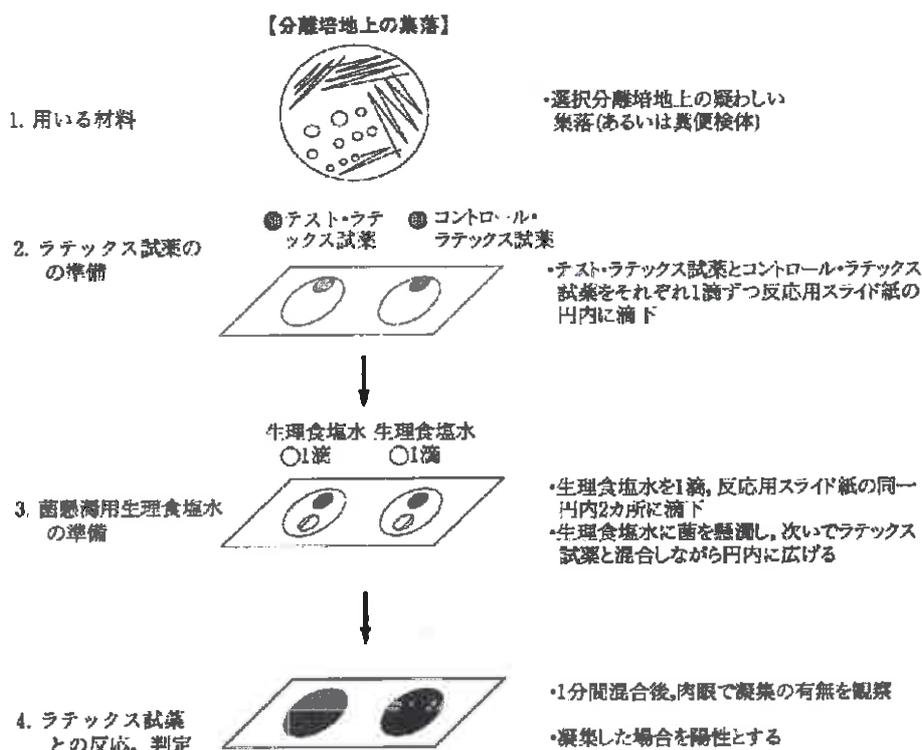


図2-12 ラテックス凝集反応法の原理

(2) ELISA 法

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay ; 酵素結合免疫吸着測定) 法は血液、糞便等の検体中に存在する病原性微生物の抗原を検出する。その原理を図2-13に示す。抗体を固相 (マイクロプレート, ガラスビーズ, 試験管) に吸着させた後、検体を加える。検体中に病原性微生物の抗原があれば、固相に吸着した抗体に捕捉される。この病原性微生物の抗原を第2の抗体 (検出

抗体)で検出する。この場合、検出抗体を酵素で標識しておくのが一般的で、検出抗体が病原性微生物の抗原と反応したかどうかを酵素反応に変換して知ることができる。また、検出抗体を未標識とし、この抗体に対する抗体(抗免疫グロブリン抗体)を標識して、反応を行わせるサンドイッチ間接法も用いられている。

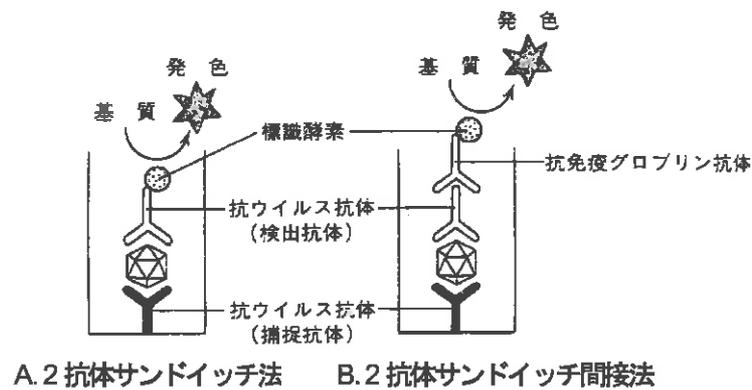


図 2-13 ELISA 法の原理

(3) イムノクロマトグラフ法

病原性微生物を抗原とする場合、この方法は原因食品や糞便から微生物を直接検出することが可能である。検体中の抗原、抗体のどちらを検出するかによって違いがあるが、両者はともに同じような原理である。図 2-14 は病原性微生物を抗原としたときのものである。濾紙でできている検体滴下部(吸収パッド)には、金などの金属コロイドやセレンなどの非金属コロイドを用いた着色粒子に抗体を結合させた標識物が乾燥付着されている。そこに検体を滴下すると、抗原は標識物(抗体)と抗原抗体複合体を形成して、毛細管現象によって濾紙上を上部に向かって拡散する。その結果、陽性判定領域(Testライン)に固定されている検出抗体と結合して発色色素により陽性のラインが出現する。コントロール領域(Cont.ライン)には抗原の有無にかかわらずラインが現れる。

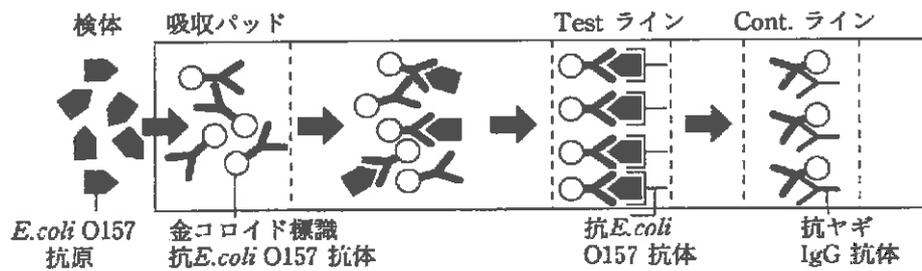


図 2-14 イムノクロマトグラフ法の原理

2.6.4 遺伝子診断法^{[46],[49]}

感染症の診断に遺伝子工学的検査（遺伝子診断法）が用いられるようになった最も大きな要因は、試験管内で遺伝子の複製・増幅が可能になったことである。その中で最も代表的なものが PCR（polymerase chain reaction；ポリメラーゼ連鎖反応）法である。

PCR 法は、検出対象である遺伝子の指定された領域を複製・増幅する技術である。試薬（酵素と遺伝子断片から構成される）と加熱冷却装置の性能や指定された遺伝子領域の配列などの条件によって異なるが、2 時間程度でおよそ 100 万から 1,000 万倍に遺伝子を増幅することができる。この手法を用いることにより、これまで検出できなかった非常に微量な細菌やウイルスを迅速に検出できるようになり、感染症の診断に役立てられるようになった。特にウイルス感染症の場合、感染後、抗体が形成されるまでに長期間要すものもあり、抗体測定法ではその間偽陰性と診断されることがあるが、PCR 法は遺伝子を直接検出するため誤診が極めて少ない。本研究でもこの PCR 法を利用して細菌、ウイルスを検出しており、原理は 3.5.3 項で詳しく述べる。

第3章

導電性中空糸膜を用いた「電流通電」による

殺菌と遺伝子の抽出

病原性微生物の中で細菌を例に取り上げ、本章では「電流通電」による殺菌と遺伝子抽出の検討を行った。また、細菌の構造および核酸についての概要と遺伝子診断に必要とされている抽出、増幅、診断方法などについて一般的な方法を解説した。実験の内容は、導電性中空糸膜を用いて、電流通電することで細菌類が殺菌されることの確認を行った。つぎにその際に得られた細胞内物質の成分を分析し遺伝子検出の可能性について見極めを行った。これらの予備実験を経て遺伝子の抽出実験を具体的に行った。その結果、300mA,5分の通電によって 10^7 個/mlの遺伝子抽出がはじめて可能であることが明らかとなった。次に、陰イオン界面活性剤を併用させ感度の向上を図った。さらに、この方法を用いて通常の糞便に存在している大腸菌の量に匹敵する条件を模擬的に再現したものおよび糞便からの直接検出を試みた結果を本章の後半で述べた。

3.1 細菌^{[37],[49]-[52]}

細菌は、自己増殖することができるもっとも小さな単細胞原核生物である。したがって、生命を維持するために必要な物質、核酸、タンパク質、脂質を持っている。生命体を構成する基本単位の細胞は、脂質二重層とタンパク質から構成される細胞膜（cell membrane）または形質膜（plasma membrane）と呼ばれる膜に囲まれている。また細胞には、核（nucleus）を持つものと持たないものがある。前者はDNAを囲う膜（核膜；nuclear membrane）が細胞の中に存在し真核細胞（eukaryotic cell）と呼ばれ、後者は原核細胞（prokaryotic cell）と呼ばれている。生物界には、このような細胞1つからなる単細胞生物と、人間のよう約60兆個もの細胞から構成されている多細胞生物が存在する。

一方、微生物（microorganism）とは、肉眼で見えず、顕微鏡下で観察可能な生物の総称である。これには原生動物（原虫）、藻類のような20~90 μmのものから、20~300 nmのウイルスに至るものまでである。微生物は最も単純な単一の細胞からなる単細胞生物と言えるが、その呼称が細胞構造に基づくものではないため、真核細胞のものもあれば、原核細胞のものもある。本論文で取り扱う細菌は、その細胞構造から分類すると原核細胞の単細胞生物で、概念図を図3-1に示す。

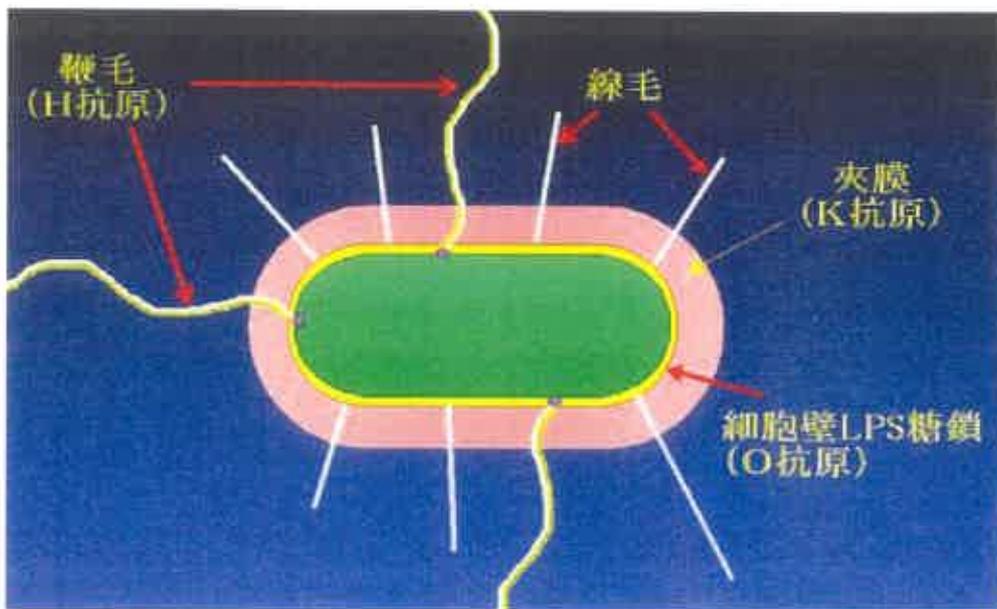
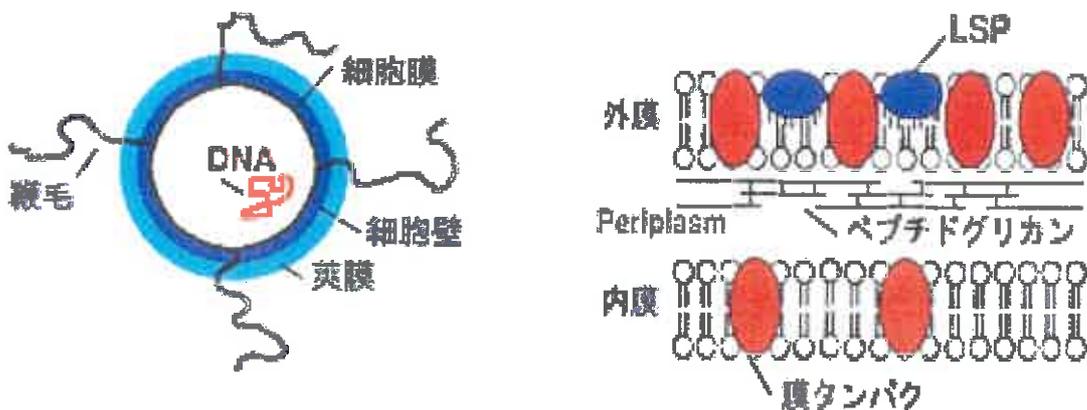


図3-1 細菌の概念図

3.1.1 細菌の構造

細菌は、大きさ約 1~10 μm で、球菌 (coccus)、桿菌 (bacillus)、らせん菌 (spirillum) の 3 つの形をとるが、基本的な構造は同じである。細菌の観察では、染色を行うのが一般的である。もっと有名なものがグラム染色で、これは細胞表面の構造の違いによって染色が行われる。グラム染色において、青紫に染まる菌をグラム陽性菌と呼び、赤紫に染まる菌をグラム陰性菌と呼ぶ。細菌の外側は 7 nm 程度の厚い細胞膜で覆われている。これは脂質二重層で、様々な分子の出入りを調節するタンパク質や酵素タンパク質で形成されている。細菌の基本構造とグラム陰性菌の基本構造を図 3-2(a)(b) にそれぞれ示す。多くの細菌は厚さ 3~25 nm のしっかりした多糖類の細胞壁 (cell wall) でさらに囲まれており、これは機械的に傷ついたり、低濃度溶液中での浸透圧による破壊を防ぐものである。細菌には、真核細胞のような膜で覆われた細胞内構造はないが、細胞膜の一部が内側に折り込まれたメソソーム (mesosome) という多層構造をつくる場合がある。メソソームは DNA の複製、その他の酵素反応の起こる部位とされている。また、細胞の詳細断面を図 3-3 に示すが、細菌の細胞質 (細胞の中身) は単なる一様な溶液ではなく、染色体 (DNA 分子) が 1 つにまとまった核様体 (nucleoid) となっている。また細胞質はいろいろな RNA や特定の化学



(a) 細菌の基本構造

(b) グラム陰性菌の基本構造

図 3-2 細菌の構造

反応を触媒する可溶性の酵素タンパク質、タンパク合成を行う何千個もの粒子リボソーム（直径 25 nm）なども含んでいる。一般の細菌は、鞭毛（flagella）を持つものが多く、それで運動する。また細菌によっては、線毛（pili）を有するものがある。線毛は 7~10nm×1~4 μm の大きさで、これはタンパク質のかたまりで、細胞膜に埋め込まれる形で固定されている。菌体に数百本生えている場合は、菌体線毛と呼ばれ、宿主細胞への付着の際にレセプター認識するために使われている。このこの細胞付着によって生体への感染が開始される。また、菌体に数本しかない場合は、性線毛と呼ばれ、性接合のときに利用され相手細胞の表面物質を認識し結合する。

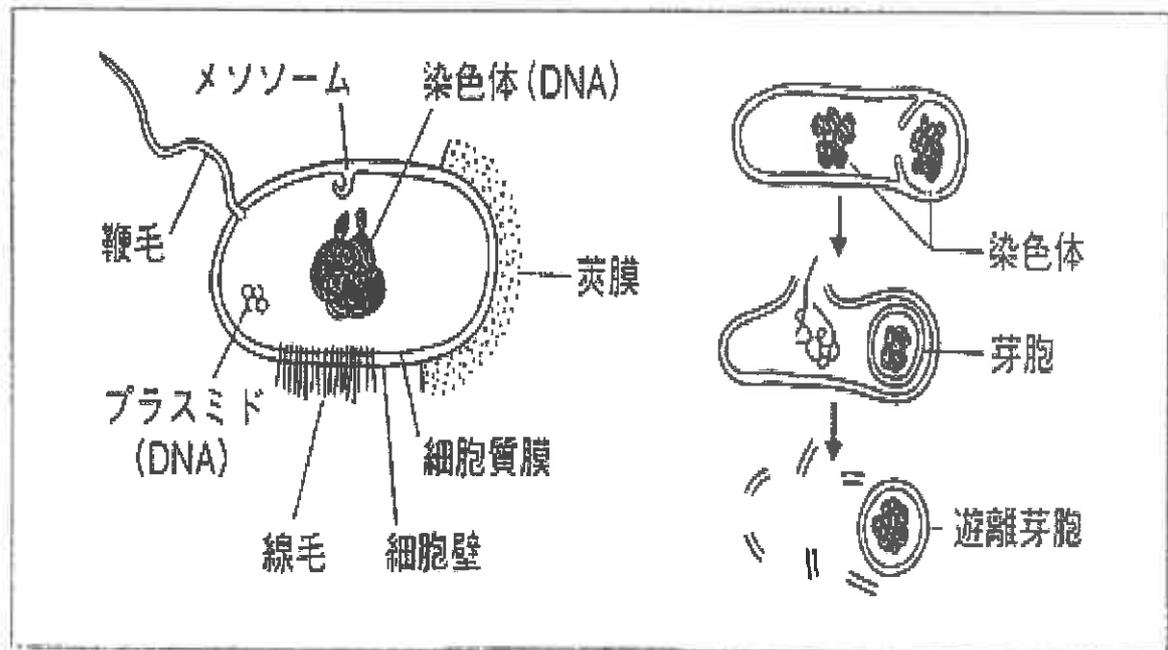


図 3-3 細菌の詳細断面図

細菌は鞭毛（flagella）を持つものが多く、10~20nm×5~15 μm ほどの大きさで、原形質から発生し、外膜を貫通し表層にでている。鞭毛は細胞の周囲に満遍なく生えているタイプのもので細胞の一部のみに存在するタイプとかあり、前者を周毛、後者を極毛と呼ぶ。

3.1.2 細菌による感染

通常の大腸菌はヒトや動物の腸管に存在し、そのほとんどは無害である。健康な人であれば糞便 1 g 中に約 $10^6 \sim 10^8$ 個含まれている。大腸菌は、大きさ $1.1 \sim 1.5 \times 2.0 \sim 6.0 \mu\text{m}$ 、重さ約 $2 \times 10^{-12} \text{g}$ のグラム陰性桿菌である。DNA は $3 \times 10^9 \text{Da}$ (約 $4 \times 10^6 \text{bp}$)、約 3,000 種のタンパク質をコードしている。1つの大腸菌に含まれる分子は、表 3-1 のようにタンパク質、核酸、多糖、脂質、その他の小分子やイオンを合わせると約 3,000~6,000 種であるとされている。

病原性大腸菌と呼称されている大腸菌は、小腸に定着できるなどの特別な病原因子産生能を有し、下痢を主症状とする腸管感染症を引き起こすものである。大腸菌 O157 を図 3-4 に示すが、病原性大腸菌の中でも腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC) に属するものであり、ペロ毒素産生性大腸菌

表 3-1 大腸菌の分子組成

成分	重量%
水	70
タンパク質	15
DNA	1
RNA	6
多糖類とその他の前駆体	3
脂質とその他の前駆体	2
その他の有機小分子	1
無機イオン	1

(Verocytotoxin-producing *E. coli*; VTEC)、あるいは志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*; STEC) と呼ばれ、VT1 (vero toxin type 1) と VT2 の 2 種類のペロ毒素を産生する^[36]。この毒素はフグ毒の 30~50 倍の毒性を示し、血便を伴う激しい下痢を引き起こし、抵抗力の低い小児や高齢者などでは溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) や脳症を合併し、最

悪の場合には死に致ることもある。さらに、緑膿菌を図 3-5 に、黄色ブドウ球菌を図 3-6 に、腸炎ビブリオを図 3-7 にそれぞれ示すが、およそ 10 万～100 万个以上の菌数を摂取しなければ発症しない。しかし、大腸菌 O15 は、わずか数百個程度の非常に少ない菌数で発症することも大きな特徴である。

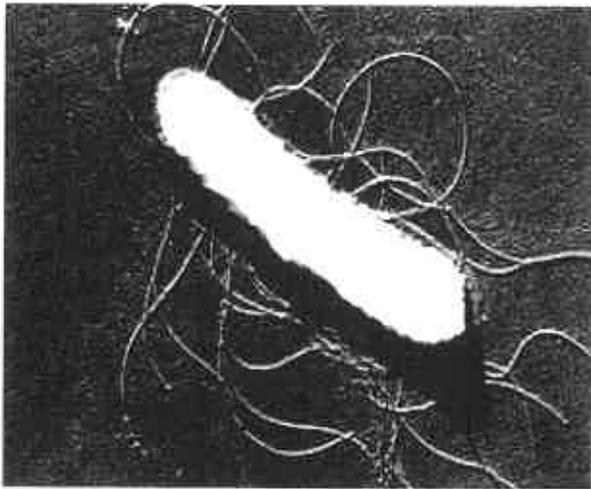


図 3-4 病原性大腸菌 O157

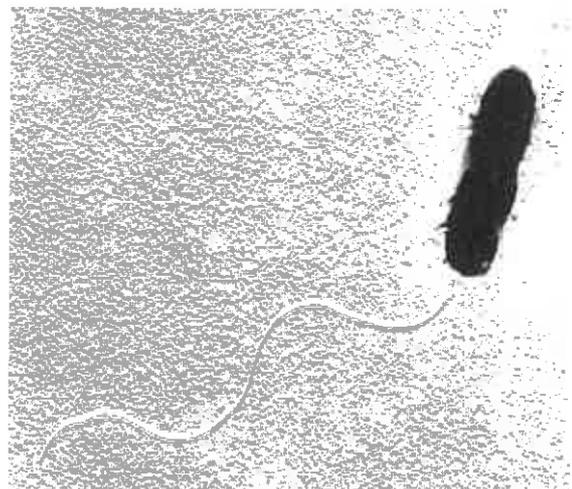


図 3-5 緑膿菌の電子顕微鏡写真

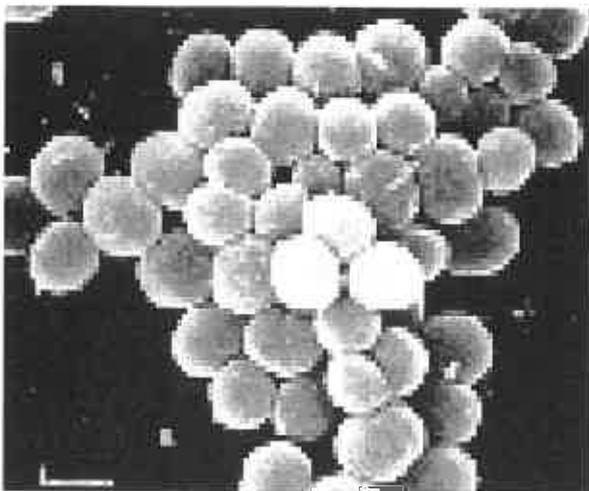


図 3-6 黄色ブドウ球菌

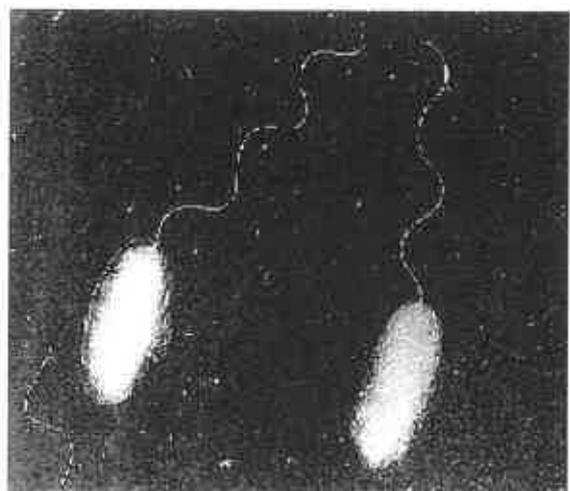


図 3-7 腸炎ビブリオ菌

3.2 導電性中空糸膜を用いた通電による殺菌 [54]-[56]

一般の家庭用浄水器は、ポリプロピレンやポリエーテルスルホン製の多孔質中空糸膜によって水中の不純物や細菌を取り除いている。しかし、それ自体に殺菌能力がないため膜内に細菌が蓄積され、それによる水の再汚染が懸念されていた。そこで膜表面に金属を被覆した導電性中空糸膜を用い、膜自体に直接通電することにより、膜内部に捕捉されている細菌を殺菌することを試みた。

3.2.1 実験装置

供試細菌懸濁液 4ml を試験に用意した。図 3-8 に示すように、シリコンチューブを介してマイクロポンプに接続し、図 3-9 に示す導電性中空糸膜モジュールを入れ、吸引（平均速度 0.3~0.5 ml/min）を開始した。開始後、試験管内の懸濁液が 1ml になった時点で吸引を停止した。この操作により懸濁液中の供試細菌が補足される。次に、膜モジュールをシリコンチューブから外し、生理食塩水 3ml の入った試験管に入れ図 3-10 に示す電流通電装置を用いて通電を行った。通電後、膜モジュールのノズルに注射器を接続し、膜に補足された供試細菌を生理食塩水 3ml 中に押し出した。その後、混釈培養法により生菌数を算出した。

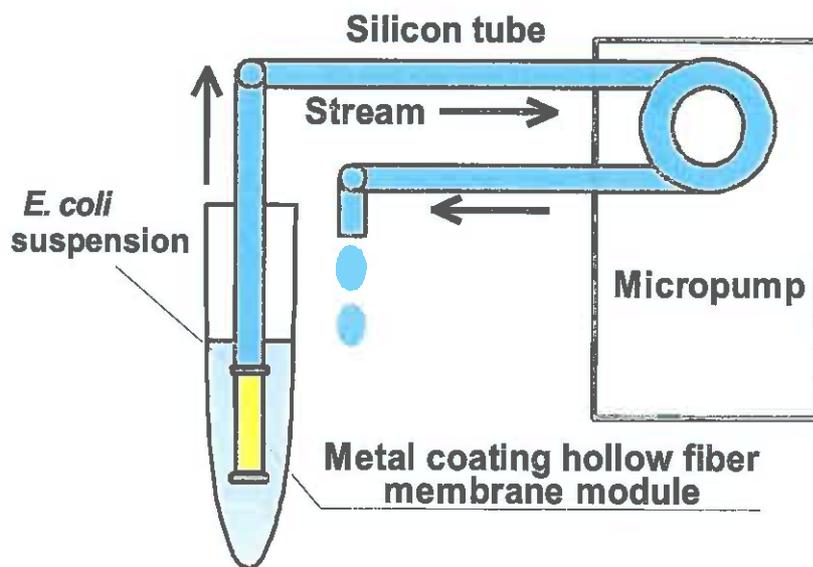


図 3-8 細菌の補足装置

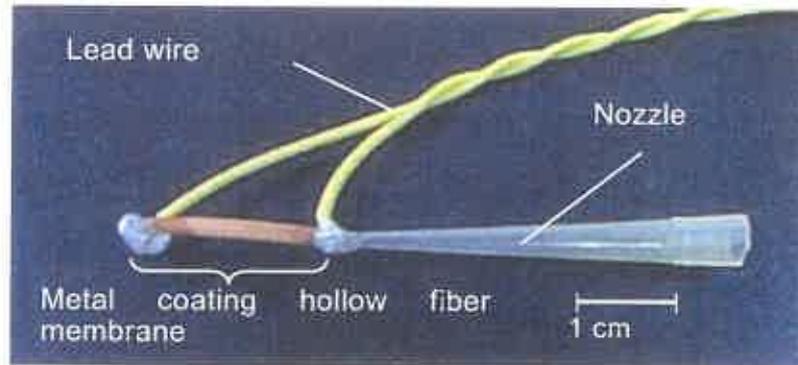


図 3-9 導電性中空糸膜モジュール写真

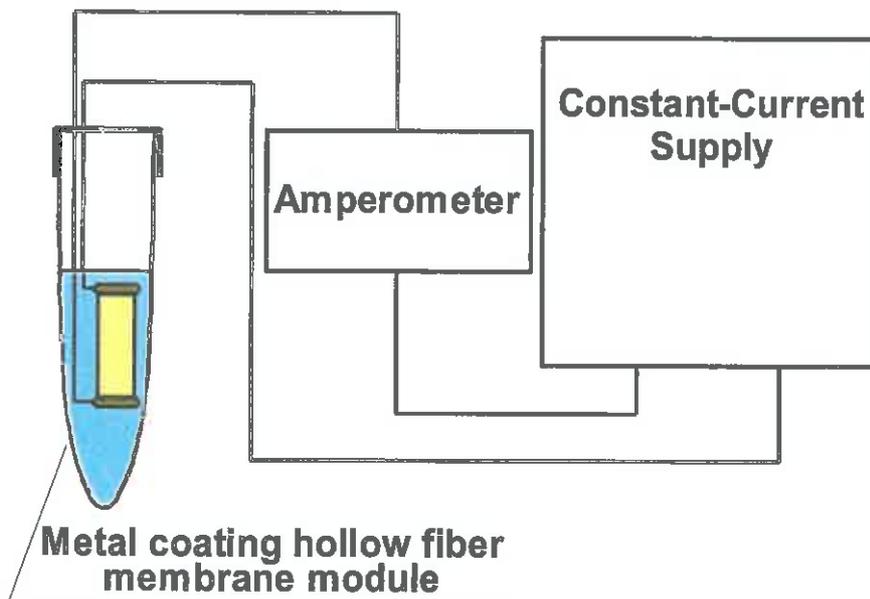


図 3-10 電流通電による殺菌装置

3.2.2 供試細菌

供試細菌は、以下のものを使用した。

- (1) 大腸菌 (*Escherichia coli* AHU 1714 株：非病原性)
- (2) 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*：耐熱性腸毒素)
- (3) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*：偏性好気性グラム陰性桿菌)
- (4) 腸炎ビブリオ菌 (*Vibrio parahaemolyticus*：耐熱性毒素)

3.2.3 実験結果

表 3-2 導電性中空糸膜の通電効果

細菌	通電電流 (mA)	通電時間 (h)	殺菌効率 (%)
大腸菌 (非病原性)	DC 100	4	100.0
"	DC 200	4	100.0
"	50 Hz AC 100	4	25.9
"	50 Hz AC 200	4	28.3
"	50 Hz PC* 100	4	81.4
"	50 Hz PC* 200	4	89.7
黄色ブドウ球菌	DC 100	2	93.1
"	50 Hz AC 100	2	0.0
"	50 Hz PC* 100	2	7.5
緑膿菌	DC 100	2	77.5
"	50 Hz AC 100	2	2.3
腸炎ビブリオ	DC 200	0.5	61.0
"	DC 200	1	98.7
"	DC 200	2	99.3
"	50 Hz AC 200	0.5	0.0
"	50 Hz AC 200	1	74.0
"	50 Hz AC 200	2	90.0

● PC : pulse current

本実験では、導電性中空糸膜を介して細菌懸濁液を吸引し、膜に細菌を人為的に捕捉させることで、細菌が蓄積された家庭用浄水器の多孔質中空糸膜を模擬した。次いでその膜に直接電流を流し、膜内の細菌を電氣的に殺菌することが試みられた。表 3-2 は、通電後、膜から回収された菌数を未通電の場合と比較して、どの程度殺菌されたのかを殺菌効率として表し、まとめたものである。この表からわかるように、導電性中空糸膜に直接電流を通電することで、大腸菌をはじめとする様々な細菌を殺菌できることが報告されている。その効果は、通電電流値が大きいほど、また時間が長いほど高い傾向を示していた。さらに、通電電流値が等しい場合も波形によって殺菌効率は異なり、直流電流が最も高く、次いで 50 Hz パルス、50 Hz 正弦波の順であることも確認されている。このように、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌は、電流値、時間、通電波形に依存することから、その機構は通電による細胞膜破壊の可能性が考えられていた。

3.3 導電性中空糸膜を用いた通電による細胞内物質の抽出^[53]

導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌は、これまでにない濾過・殺菌機能の両者を兼ね備えた全く新しいものであり、実用化に向けてさらに研究が行われた。特に実用化の際には、少ないエネルギーで効率的に殺菌することが要求されるため、殺菌機構を明確にすることは重要であり、それらの検討が行われた。3.2.3 項で述べたように、殺菌効率は電流値、時間、通電波形に依存することから、通電による細胞膜破壊の可能性が高いと考えられていた。この推測に基づくと、細菌の内容物を被っている細胞膜が電流によって破壊された場合、その内容物は細胞外に漏出することが予想され、それに関して検討が行われた。

大腸菌（非病原性）懸濁液中に導電性中空糸膜を浸し、その後、膜を介して懸濁液を吸引すると同時に、電流通電が行われた。そして、膜を介して吸引された溶液は、細胞内物質の含有量を調べるために回収された。細胞内物質として核酸とタンパク質が選択され、それらの含有量は、それぞれの特異吸収波長（260, 280 nm）で回収サンプル（1 ml）の吸光度を測定することによって定量

された。未通電のものを1としたときの各通電条件における相対値を表3-3に示す。この細胞内物質の相対漏出量と先に述べた殺菌効果を比較すると、最も殺菌効果の高かった直流、次に50 Hz パルス、50 Hz 正弦波の順に、また電流値が大きいくほど各細胞内物質の漏出量も多いことが見出された。すなわち、殺菌効果および細胞内物質の漏出量は非常に相関しており、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の機構は、通電による細胞膜破壊であるものと考えられている。

これらの結果を別の視点からとらえると、導電性中空糸膜に直流電流を通電することで細胞内物質の抽出が可能であると言える。本論文で検討している遺伝子抽出は、この3.2節で述べた電流通電による殺菌、細胞内物質の抽出に基づくものであり、それらの結果はこの研究においても非常に有用である。

表3-3 通電による細胞内物質の相対漏出量

通電電流	核酸 (260 nm)		タンパク質 (280 nm)	
	100 mA	200 mA	100 mA	200 mA
DC	12.40	16.95	10.06	14.38
50 Hz AC	2.12	3.36	1.88	2.47
50 Hz PC	5.69	7.48	5.00	6.88

上記の相対漏出量を核酸とタンパク質に分けてグラフ化したものを図3-11と図3-12にそれぞれ示す。

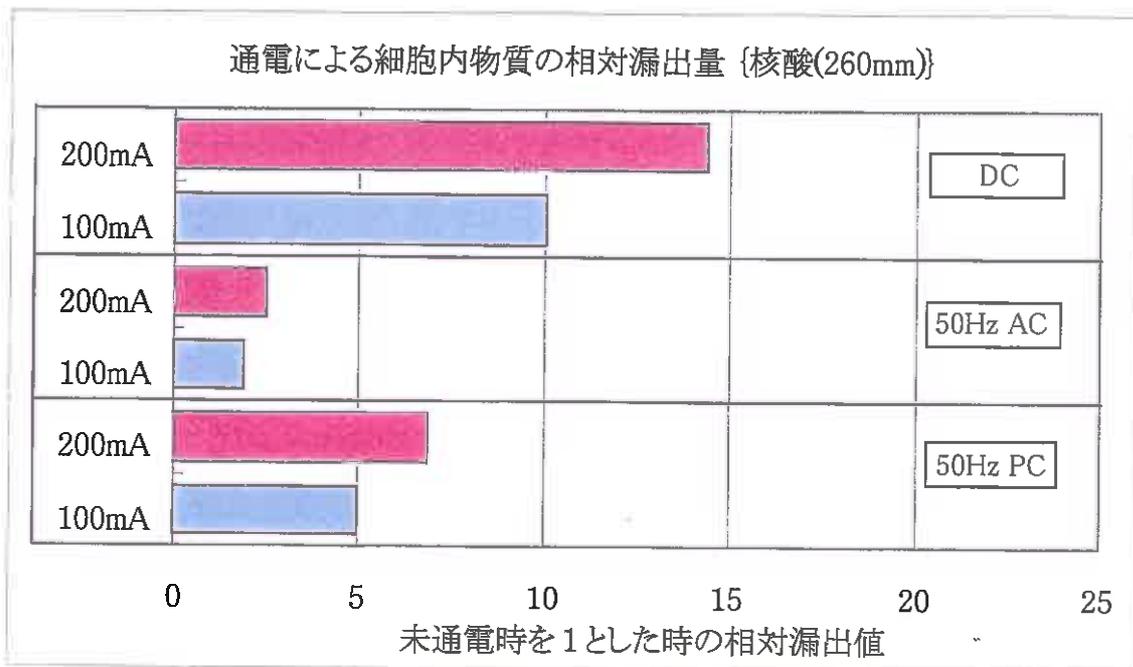


図 3-11 核酸の相対漏出量

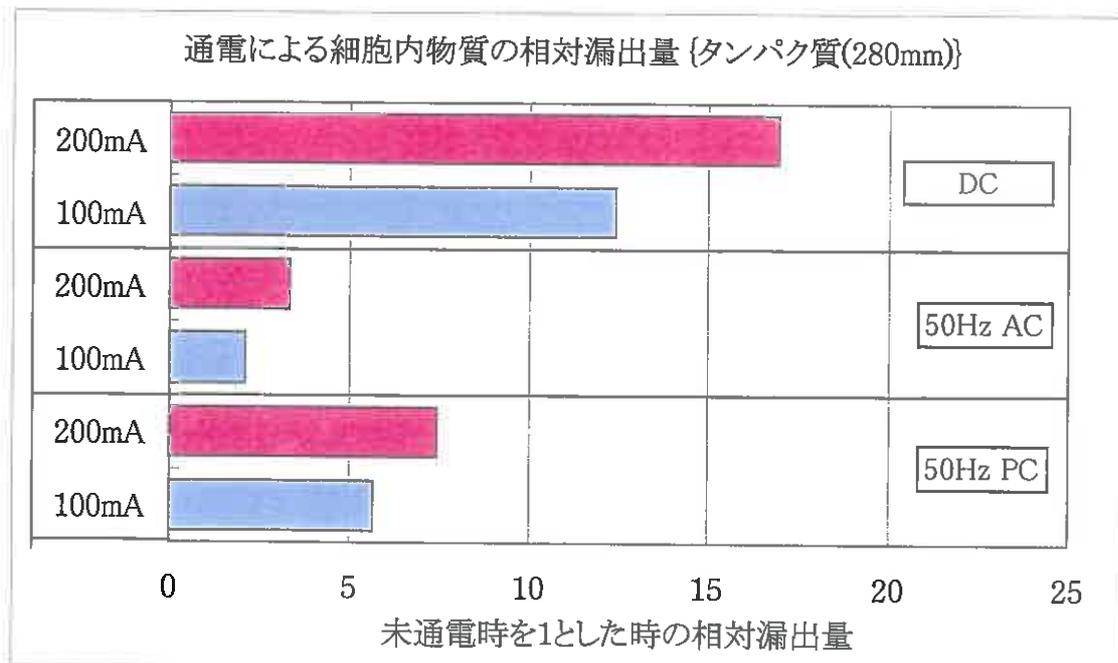


図 3-12 タンパク質の相対漏出量

3.4 遺伝子抽出

病原性微生物の感染症における遺伝子診断は、1) 検体からの遺伝子抽出、2) 遺伝子の増幅 (PCR)、3) ゲル電気泳動・染色、4) 判定といった工程で行われる。現在、その中でも特に重要、かつ必要不可欠な遺伝子抽出は繁雑であり、自動化が進んでいないことから、本論文では導電性中空糸膜を用いた全く新しい遺伝子抽出法の検討を行っている。まず微生物感染症の中でも、特に迅速な診断が求められる大腸菌 O157 による感染症の診断を目的とし、その有効性を検討した。

一般的に微生物感染症の遺伝子診断は、1) 検体からの遺伝子抽出、2) 遺伝子の増幅 (PCR)、3) ゲル電気泳動・染色、4) 判定といった工程で行われる。現在、その中でも特に重要、かつ必要不可欠な遺伝子抽出は繁雑であり、自動化が進んでいないことから、本論文では導電性中空糸膜を用いた全く新しい遺伝子抽出法の検討を行っている。まず微生物感染症の中でも、特に迅速な診断が求められる大腸菌 O157 による感染症の診断を目的とし、その有効性を検討した。

3.4.1 核酸^{[50]~[52],[57]}

生物の生命活動のほとんどはタンパク質が担っており、その正確な情報維持、生合成は核酸によって行われる。すなわち核酸とは、タンパク質のアミノ酸配列の情報を維持しているものであり、タンパク質合成の鋳型でもある。この核酸は、酸性の高分子物質であり、また生理的 pH では多価陰イオンである。核酸には、デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid : DNA) とリボ核酸 (ribonucleic acid : RNA) の 2 種類があり、それぞれは、以下に述べるような構造および機能を有している。

3.4.2 DNA の構造

DNA は、細胞や生体を形成するための情報を維持している。次の世代に、この情報は正確に複製・伝達され、種の遺伝の継続性が維持される (ウイルスは種類によって RNA の場合もある)。特にその中でも生理的機能を持つ分子 (タ

ンパク質や RNA) を合成するのに必要な情報を含んでいる部分が遺伝子 (gene) である。図 3-13 のように DNA は、アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C) と呼ばれる四種類の塩基、デオキシリボースという 5 炭糖、およびリン酸により構成されている。塩基と糖が結合したものをヌクレオシドとい

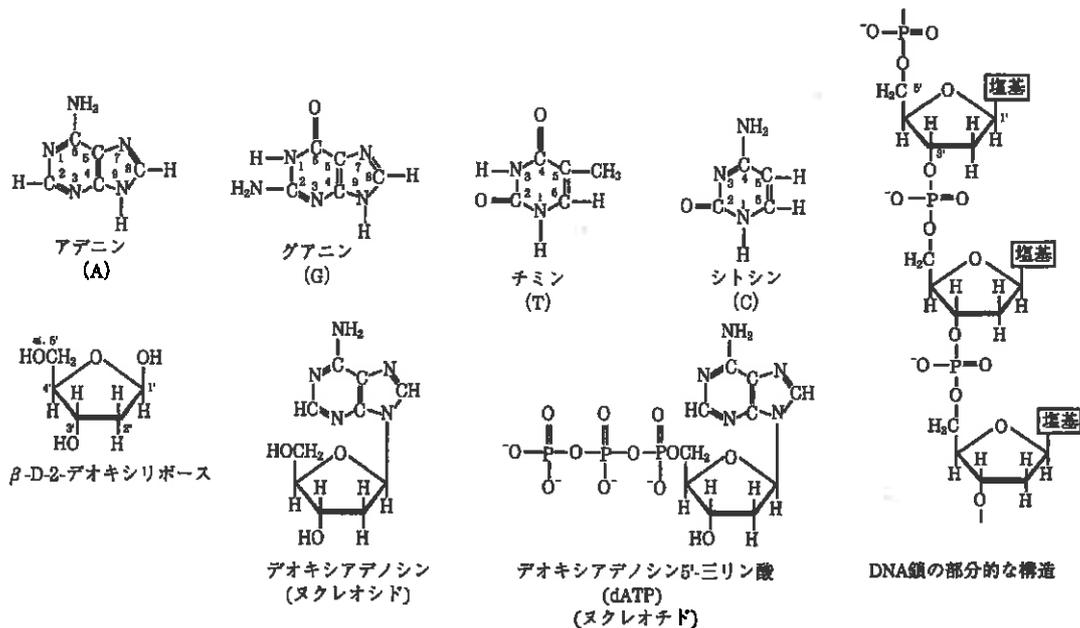


図 3-13 DNA 鎖の構成要素

い、それにリン酸が結合したものをヌクレオチドという。ヌクレオチドのリン酸と糖とが交互にリン酸ジエステル結合したポリヌクレオチドが DNA である。遺伝情報は DNA 分子の塩基の並ぶ順序、すなわち塩基配列の中にコードされている。通常 1 本の分子鎖に対して A-T, C-G という組み合わせにより対を形成し、右巻きの二重らせん構造をとる。このらせん構造は図 3-14 のように規則正しく 3.4 nm ごとに 1 巻きし、約 2 nm の直径をもつ。また隣接するヌクレオチド間の距離は 0.34 nm であり、1 巻き当たり 10 個のヌクレオチドが存在する。相補的な DNA 鎖の結合は、A-T および C-G がそれぞれ 2, 3 個の水素結合をとることによる。

遺伝情報が多ければ、それだけ情報をコードする DNA は大きくなる。一般に高等な生物ほど大きな DNA を有する。DNA の大きさは塩基対 (base pair : bp)。

あるいはダルトン (Da) で表される 本研究で使用した単純ヘルペスウイルス、大腸菌はそれぞれ約 1.7×10^5 bp, 4×10^6 bp 程度であるが、我々人間はそれらよりも遥かに大きい約 3×10^9 bp の DNA を 23 対の染色体の中に持っている^[45]

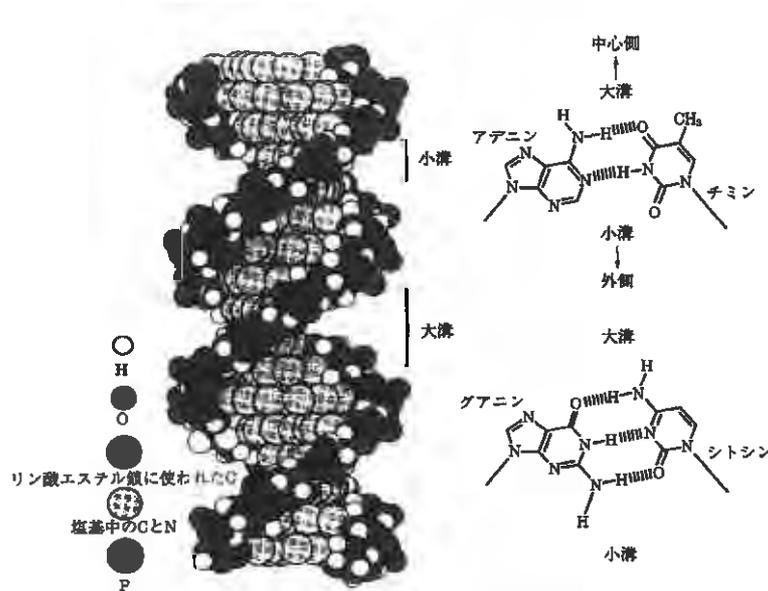


図 3-14 DNA の二重らせん構造

3.4.3 RNA の構造と機能

もう一つの核酸である RNA は、糖がデオキシリボースではなくリボース、4 種類の塩基のうちチミン (T) がウラシル (U) であること以外は DNA と同様な構造である。通常 RNA は DNA のような 2 本鎖ではなく 1 本鎖として存在する。DNA 上の遺伝情報から、生命活動の多くを担うタンパク質が正確に合成される際、RNA は伝令 RNA (messenger RNA : mRNA)、移転 RNA (transfer RNA : tRNA)、リボソーム RNA (ribosomal RNA : rRNA) という分子種として仲介する。mRNA は DNA の遺伝情報としてタンパク質のアミノ酸配列をコードしている塩基配列を運ぶ。tRNA は、mRNA にコードされた情報を読み取り、タンパク質合成において伸長中のアミノ酸の長鎖 (ポリペプチド鎖) に所定のアミノ酸を移す。rRNA はタンパク質と結合して、複雑なタンパク質合成装置であるリボソームを形成する。

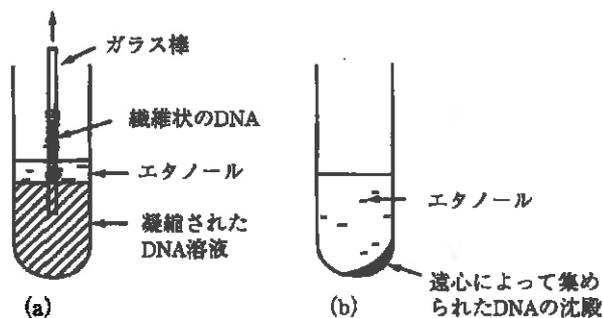
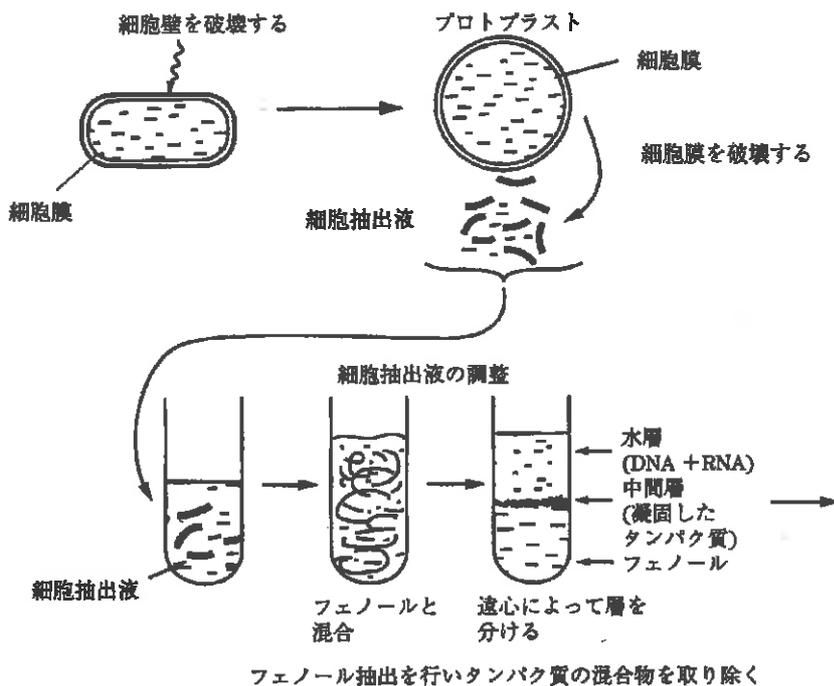
3.5 従来の核酸抽出法

遺伝子診断法は、臨床学的価値の高い診断法で今後益々利用される方法と考えられている。この遺伝子診断に欠かせないプロセスである PCR (polymerase chain reaction) 法は、酵素反応などを利用して遺伝子断片を増幅するため、反応環境に検体由来のタンパク質や脂肪等が高濃度に存在すると反応阻害を引き起こす^[47]。したがって、実際に PCR 法で遺伝子増幅を行うには、多くの場合、最初に検体からの遺伝子、すなわち核酸の抽出・精製が必要となる^{[47], [59]~[61]}。従来用いられていた手法は、以下のような化学的抽出法が主流であるが、その操作は繁雑であり、マニュアル操作が多く自動化が進んでいなかった。このようなことから最近では多くの研究が行われており、自動化されたものもある。ここでは、従来の核酸抽出法の代表的なものとして化学的抽出法、磁性粒子を用いた抽出法の原理、特徴を述べる。

3.5.1 化学的抽出法^{[47], [57], [62]}

病原性細菌やウイルスから核酸を抽出する際、最も多く用いられているのが化学的抽出法であり、一般的に図 3-15 のように実施される。まず SDS (sodium dodecyl sulfate; ドデシル硫酸ナトリウム) などの界面活性剤を添加する。界面活性剤は、脂質分子を取り除き核酸を覆っている細胞膜やウイルス被膜を破壊することで細胞やウイルス粒子を溶解する。また核酸は塩基性タンパク質と非常に強く結合しており、界面活性剤はそれらのタンパク質を変性し、核酸から切り離す活性も持っている。これによって分解されたタンパク質と核酸を分離するために、次に水飽和フェノールやクロロホルムなどの有機溶媒が使われる。核酸抽出液と等量の有機溶媒を入れ、攪拌した後に遠心分離を行うことで水溶液(上層)と有機溶媒(下層)の2層に分かれる。核酸は水溶液層に残り、変性したタンパク質は中間層あるいは下層に分離される。この水溶液層のみを回収し、2~3倍量のエタノールあるいはイソプロパノールのようなアルコールと混ぜる。核酸はこれらの有機溶媒に溶けないためゲル状の沈殿になる。これを遠心分離あるいはガラス棒で回収する。その後、乾燥させることでアルコールを除去し、適当な緩衝液に溶解する。

化学的抽出法は以上の工程にしたがって行われるが、多くの試薬、遠心分離工程が必要であり、多大な時間と労力を必要とする。また試薬には有機溶媒も使われており、その取り扱いに十分注意しなくてはならない。



エタノール沈殿によりDNAを回収する2つの方法。
 (a) 濃縮されたDNA溶液の上に100%エタノールを加える。繊維状のDNAがガラス棒を使って回収される。
 (b) DNA濃度が低い溶液に対しては、100%エタノールをDNA溶液1に対して2.5倍量加え、塩を最終濃度0.1Mになるように加えると塩析によりDNAが沈殿する。沈殿したDNAを遠心により集める。

図 3-15 核酸の化学的抽出法

3.5.2 磁性粒子を用いた抽出法^{[59], [66], [67]}

磁性粒子を用いた抽出法は、前項で述べた化学的抽出法と Boom 法^[67]を応用したものである。Boom 法は、シリカ粒子の入った高濃度の溶解液中（界面活性剤およびグアニジンイソチオシアネートなど）で細菌やウイルスの被膜を溶解すると同時に、核酸に親和性を示すシリカ粒子に核酸を濃縮し、70%エタノール等で洗浄後、低塩濃度溶液に置換することで核酸をシリカ粒子から離脱させる方法である。このように、Boom 法や化学的抽出法はともに遠心操作が必要であったり、有機溶媒を取り扱う煩わしさがあった。このような問題を解決するために考案されたのが磁性粒子による核酸抽出法である。

磁性粒子とは、化学的に安定性の高い酸化鉄（ FeO_3 ）とシリカ化合物（アモルファスシリカ、ガラス粉末、アルキルシリカ、アルミナなど）あるいはポリスチレン等の高分子ポリマーを混合して球状に成形したもので、大きさは 1~10 μm 程度のものが市販されている。酸化鉄は強磁性体であるため磁場内では磁化されて磁極に集まってくる性質があり、一方で磁場を取り去ったときの残存磁気が極めて低いため、それによって相互に凝集することがほとんどなく、振盪することで容易に再懸濁できる特徴を持つ。シリカ化合物やポリスチレンは、シリカが核酸に対する親和性を持つことを利用したり、表面に $-\text{HN}_2$ 基などの官能基やストレプトアビジンなどを付け、それらを利用して目的とする核酸を抽出する役割を持つ^[68]。処理工程としては、はじめに化学的抽出法と同じように界面活性剤で細胞やウイルス被膜を溶解する。その後、磁性粒子を入れ攪拌して核酸を捕捉させる。次に磁石によってその磁性粒子を回収し、数回洗浄を行い、適当な緩衝液に溶解する。このように、磁性粒子を用いた抽出法は、化学的抽出法のような有機溶媒の取り扱いや遠心操作が不要であることが特徴である^{[63]~[65]}。

3.5.3 PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法^{[50], [57], [69], [70]}

前節で得られた遺伝子は、PCR (polymerase chain reaction) により遺伝子の増幅を行う。PCR は新しいクローン化の手法であり、遺伝子のある部位の塩基配列が判明すれば、他のものが混入していても、ごく微量な特定の DNA 断片を直接クローニングできる。まず 2 本鎖の DNA は加熱することによって分子運動が活発になり、二重らせん構造を保持する水素結合などが切断されることを利用して、2 本鎖 DNA を 1 本鎖にする。これを変性 (denaturation) という。この熱処理によって DNA が十分に変性した後、温度を 50~60℃ に下げる。PCR 反応液中には目的とする部位の両末端に相補的な合成オリゴヌクレオチドが、変性 DNA に対して大過剰の量で加えられているため、1 本鎖の DNA は相補的な相手を見つけられず、それにかわって相補的な合成オリゴヌクレオチドが結合 (annealing) する。次に、この結合した合成オリゴヌクレオチドがプライマー (primer) となって、そこから酵素によってデオキシヌクレオシド三リン酸 (deoxynucleoside triphosphate : dNTP) が連結され、DNA 鎖の伸長・合成が行われる。ここで使用される酵素は耐熱性の DNA ポリメラーゼと呼ばれ、温泉で生息する細菌 *Thermus aquaticus* 由来の Taq ポリメラーゼが主に使われている。Taq ポリメラーゼは 72℃ になると DNA 合成を開始する。以上の変性と合成のサイクルを繰り返すことによって、目的とする部位を効率良く合成し、増幅することができる。

本研究における遺伝子抽出では抽出操作後の回収サンプル 3 ml のうち 5 μ l を、PCR 反応液 45 μ l に入れ、表 3-4 に示す条件で PCR を行った。

表 3-4 本研究の PCR 条件

条件		30 サイクル
熱変性	94℃, 1 分	
アニーリング	55℃, 1 分	
伸長 (合成)	72℃, 3 分	

3.5.4 ゲル電気泳動法^{[50], [71], [72]}

DNA や RNA をゲル電気泳動にかけると、その大きさに基づいて分離される。中性付近の pH では各ヌクレオチドのリン酸基が負の電荷を持つため、DNA や RNA 分子全体は強く負に帯電する。そのため電気泳動槽に電界を印加すると陽極の方向へ移動する。小さな DNA 分子はゲル中を大きな分子よりも速く移動するため、種々の大きさの DNA 断片をゲル電気泳動で分離することができる。ゲルによって分子のランダムな拡散が妨げられるため、種々の大きさの DNA 断片混合物を電気泳動すると、同じ大きさの断片はバンドとして他の大きさの断片と分離されていく。このバンドの幅は、電気泳動を開始するときに試料を注ぐ孔の幅と同等である。ゲル電気泳動の分解能は非常に高く、500 塩基程度までの 1 本鎖 DNA の場合には、1 塩基の差を確実に検出することが可能である。

分離された DNA バンドの検出には通常 2 つの方法が用いられる。DNA が放射性標識されていれば、オートラジオグラフィによって DNA バンドを検出することができる。この場合には、ゲルと写真フィルムを暗室で適当な時間だけ密着させて、フィルムを感光させる。フィルムを現像すれば DNA バンドの写真像を得ることができる。一方、DNA が放射性標識されていない場合には、ゲルを蛍光色素エチジウムの入った溶液で処理する。一般に色素にはエチジウム・ブロマイド (ethidium bromide : EtBr) が使用される。この色素の分子構造は平板状で、DNA の塩基対の間に入り込む。この結合によってエチジウムは DNA 内に集積し、内在性の蛍光の強度が上昇する。その結果、この色素で処理したゲルに紫外線を照射して観察すると、DNA バンドはオレンジ色のバンドとして検出される。

本研究では、DNA や RNA のゲル電気泳動で一般的に用いられる 3%アガロースゲルを使ってゲル電気泳動を行った。なお、ゲルの孔に注入した PCR 産物の量は、約 10 μ l である。その後、ゲルを 1%エチジウム・ブロマイド溶液に 15 分程度浸して遺伝子バンドを染色し、それをトランスイルミネータにより可視化して、標的遺伝子の検出状況を確認した。

3.6 導電性中空糸膜を用いた通電による遺伝子抽出

病原性微生物の感染症の一般的な遺伝子診断は、1) 検体からの遺伝子抽出、2) 遺伝子の増幅 (PCR)、3) ゲル電気泳動・染色、4) 判定といった工程で行われる。現在、その中でも特に重要、かつ必要不可欠な遺伝子抽出は繁雑であり、自動化が進んでいないことから、本論文では導電性中空糸膜を用いた全く新しい遺伝子抽出法の検討を行っている。まず微生物感染症の中でも、特に迅速な診断が求められる大腸菌 O157 による感染症の診断を目的とし、その有効性を検討した。また、供試細菌数は、培養法を用い生菌だけを計測した。単位は、1 個の集落は、1 個の生菌に由来する仮説に基づき、求めた菌数は集落形成単位 (Colony Forming Unit : CFU) で表示した。

3.6.1 実験方法

単独試料は、大腸菌 O157 懸濁液を生理食塩水で 10 倍段階希釈することにより、菌濃度 $10^8 \sim 10^5$ CFU/ml のものを 3 ml 用意した。また 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU/ml の大腸菌 O157 懸濁液 1.5 ml と、 10^{10} , 10^9 , 10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液 1.5 ml を全ての組み合わせで混合し、3 ml の混合試料を 9 種類用意した。糞便は健康な成人から採取され、1 g 当たり 10 ml の生理食塩水を添加した。このように希釈された 10%糞便溶液 0.9 ml に 10^9 , 10^8 , 10^7 CFU/ml の大腸菌 O157 懸濁液 0.1 ml を加えることで、大腸菌 O157 が 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU 含まれたものを 1 ml 準備した。その後、これに 2 ml の生理食塩水を添加し 3 ml の糞便試料を調製した。このような各々の試料から、以下に示す手順で遺伝子抽出を行った。

まず試験管に用意したサンプル 3 ml 中に、シリコンチューブを介してペリスタポンプに接続した導電性中空糸膜モジュールを浸し、0.6 ml/min の速度で試料を全て吸引することで導電性中空糸膜モジュールに菌を捕捉した。その後、図 3-18 に示すように、滅菌蒸留水 3 ml が入った試験管に膜モジュールを入れ、膜に電流を流すと同時に滅菌蒸留水を全て吸引した。この通電処理と 2 度目の吸引は、膜に捕捉された菌の細胞膜を破壊して細胞内から遺伝子を抽出し、それを試験管に回収するためである。

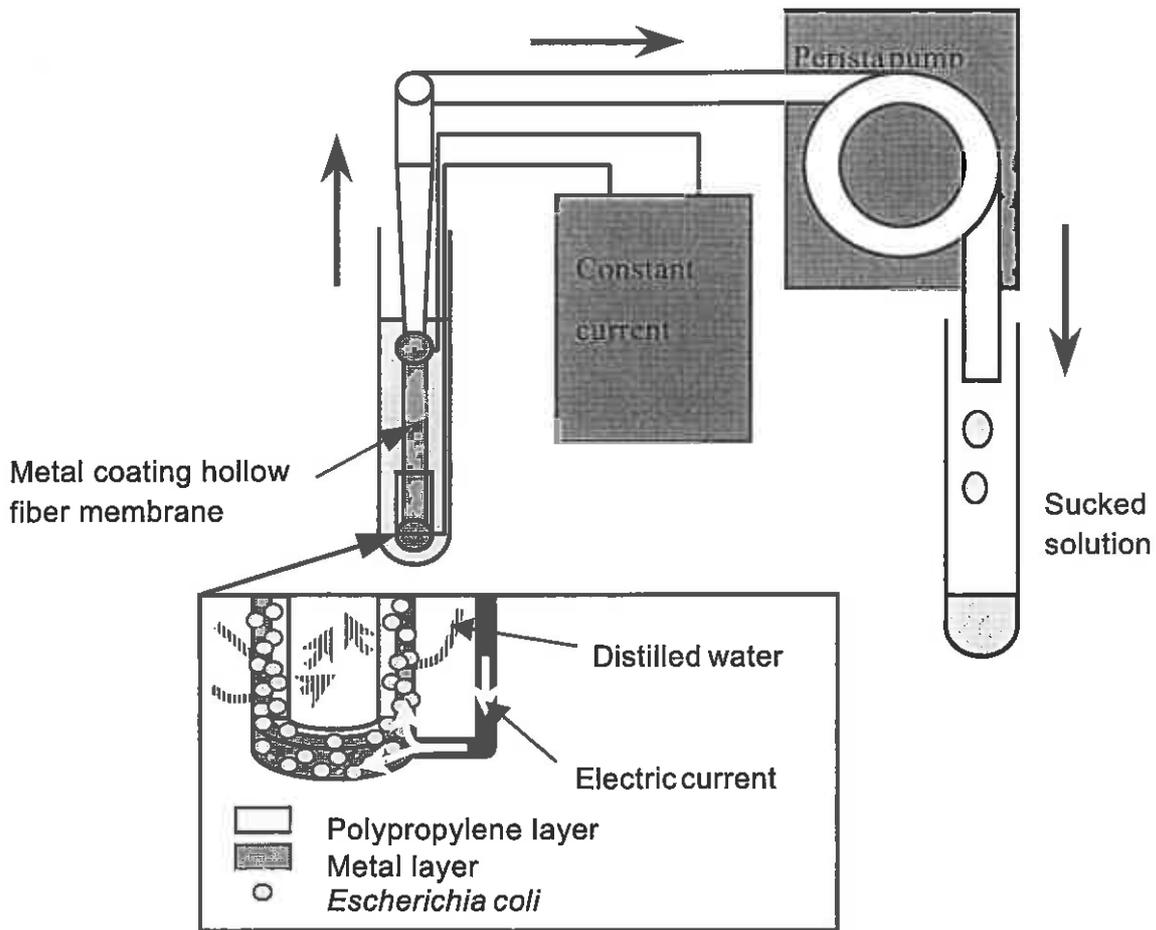


図 3-18 導電性中空糸膜の電流通電による遺伝子抽出の概略

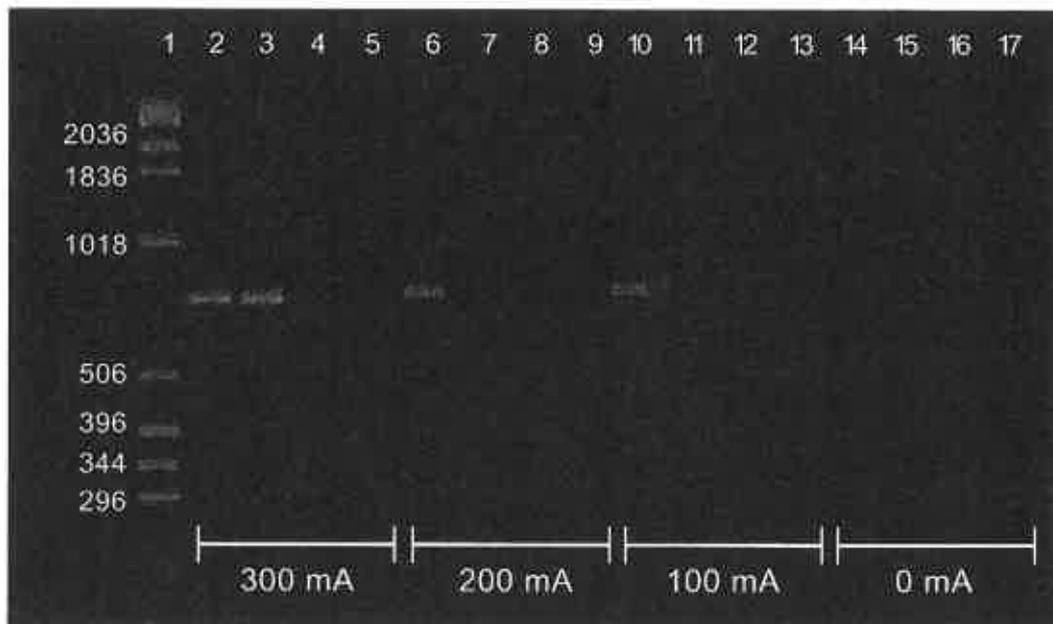
なお、3.3 節で述べたように導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の効果は、直流電流が最も高かったため、通電電流は直流とし、大きさは 100, 200, 300, 400, 500 mA のいずれかを選択した。また通電時間は、蒸留水 3 ml を全て吸引できる 5 分とした。これとは別に、遺伝子抽出における通電の効果を確認するために、通電を行わず、それ以外は同じように処理したものも用意した。

3.6.2 実験結果

導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法を遺伝子抽出に応用できるかを、大腸菌 O157 単独試料，混合試料，最後に実際の糞便試料を用いて順次検討した。得られた結果を以下に述べる。

(1) 大腸菌 O157 単独試料からの遺伝子抽出

最初に、大腸菌 O157 のみが含まれた単独試料を用いて 3.6.1 項のように遺伝子抽出操作を行い、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法を遺伝子抽出に応用できるかどうか基礎的な検討を行った。その際の通電電流は、まず従来の電流通電による殺菌法に基づいて、効果が認められた DC 100, 200 mA と、さらに効果が期待される 300 mA を選択し、通電時間を 5 分とした。それぞれの条件における遺伝子抽出結果を図 3-19 に示す。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; DC 300 mA, 6~9; DC 200 mA, 10~13; DC 100 mA, 14~17; 0 mA, 2, 6, 10 and 14; 10^8 CFU/ml, 3, 7, 11 and 15; 10^7 CFU/ml, 4, 8, 12 and 16; 10^6 CFU/ml, 5, 9, 13 and 17; 10^5 CFU/ml

図 3-19 大腸菌 O157 からの VT1 遺伝子の抽出

通電を行わずに抽出したサンプルからは、全ての菌濃度において遺伝子バンドが確認されなかった。これは、通電を行わなかった場合、膜を介して吸引された溶液中に遺伝子が含まれていないことを示している。一方、通電を行って

抽出したサンプルにおいて、506 bp から 1,018 bp 間の同じ位置に遺伝子バンドが確認された。標的とした遺伝子は、サイズが 774 bp の VT1 遺伝子断片であり、図 3-19 のように、確認できる全ての遺伝子バンドは、サイズが約 774 bp である。これより、確認された遺伝子バンドは標的とした VT1 遺伝子断片であることがわかる。ここで抽出条件について見ると、菌濃度 10^8 CFU/ml の場合、全ての電流値において遺伝子が抽出された。これに対して、菌濃度を一桁下げて 10^7 CFU/ml としたときは、100, 200 mA では確認されず、300 mA のみで確認された。さらに菌濃度を 10^6 CFU/ml に下げると、全ての電流値で確認できない結果となった。

以上の結果から、導電性中空糸膜に通電を行うことで、膜に捕捉された細菌の遺伝子を抽出できることがはじめて明らかになった。また、遺伝子の増幅で使用した PCR は、抽出された遺伝子を鋳型として新たな遺伝子を合成することから、抽出された遺伝子は比較的断裂されず、ある程度原形を保っているものと考えられる。さらに抽出感度には電流値依存性が見られ、ここでは、電流値が大きいほど、膜に捕捉された菌数が少なくても遺伝子の抽出が行えた。この知見は、従来に行われた導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の効果が電流値に依存するという結果と非常に類似しており、この全く新しい遺伝子抽出法は、導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌に基づくことは明らかである。

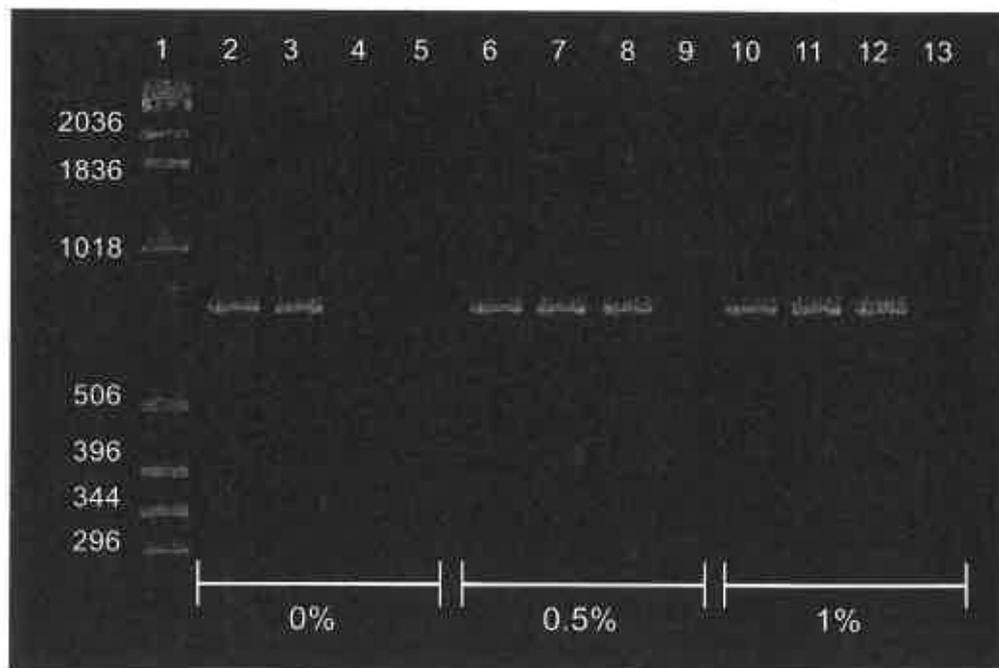
以上の結果から、通電電流値が大きいほど抽出感度が高いことから電流値を 400 mA および 500 mA に上げて同様に遺伝子抽出を試みたが、各菌濃度において遺伝子バンドは現れなかった。したがって、遺伝子を効率よく抽出できる電流値は、300 mA 近辺であることが明らかとなった。

(2) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 併用時の遺伝子抽出

細菌の細胞膜を軟化させる陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS) を大腸菌 O157 懸濁液に添加することで、遺伝子抽出の感度向上をさらに図った。まず、0.5, 1, 5, 10, 25% の濃度の SDS

溶液を用意した。次に、大腸菌 O157 懸濁液 3 ml に、任意の濃度の SDS 溶液を 1 ml 加えた。この SDS 溶液の添加後は、先と全く同様に遺伝子抽出操作を行った。ただし、通電電流値は前項の結果から 300 mA とした。

図 3-20 に示すように、SDS 溶液を添加しなかったもの (0%) と比較すると、無添加時の抽出限界は 10^7 CFU/ml であったが、SDS 濃度 0.5% および 1% の溶液を加えた場合、 10^6 CFU/ml まで向上した。SDS の濃度の効果を確認するために濃度を上げて 5% の SDS 溶液を使用すると、 10^5 CFU/ml まで抽出可能となったが、濃度を 10、25% としたときの効果は認められず、むしろ逆に抽出感度が低下した。また、さらに SDS の効果を確認するために通電を行わず、吸引のみ行ったが、未通電でも遺伝子が抽出された。最も低濃度の大腸菌 O157 懸濁液 (10^7 CFU/ml) から標的遺伝子が抽出された SDS 濃度は、1% および 5% であった。この結果から、SDS は明らかに遺伝子の抽出を促進することが示された。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; 0% SDS, 6~9; 0.5% SDS, 10~13; 1% SDS, 2, 6 and 10; 10^8 CFU/ml, 3, 7 and 11; 10^7 CFU/ml, 4, 8 and 12; 10^6 CFU/ml, 5, 9 and 13; 10^5 CFU/ml. (DC 300 mA)

図 3-20 SDS を用いたときの VT1 遺伝子の抽出 (0~1% SDS)

(3) 混合された細菌試料からの遺伝子抽出

実際の糞便 1g 中には細菌が 10^{11} 個程度と非常に多く存在することから^[73], 次いで糞便試料を模擬した混合試料からの遺伝子抽出を試み, その有効性を確かめた. ここでは, 常に糞便中に含まれている細菌として非病原性大腸菌を用いた. 通常の微生物感染症の診断では, 糞便は 10 倍に希釈されるため, 実際の細菌濃度は 10^{10} 個/ml となる. よって, 10^{10} , 10^9 , 10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液 1.5 ml と, 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU/ml

表 3-5 混合試料からの VT1 遺伝子の抽出

通電電流値 : 300 mA, SDS 濃度 : 5 %

大腸菌 O157 (CFU/ml)	非病原性大腸菌 (CFU/ml)		
	10^{10}	10^9	10^8
10^8	—*	—*	+
10^7	—*	—*	+
10^6	—*	—*	—

+ : 抽出可, — : 抽出不可

* 試料の吸引開始直後に目詰まりが発生

の大腸菌 O157 懸濁液 1.5 ml を全ての組み合わせで混合し, 3 ml の混合試料を 9 種類用意した. その後, 同じように抽出操作を行った. このときの電流値と SDS 濃度は, (1)および(2)の結果から, それぞれ 300 mA, 5%とした.

非病原性大腸菌懸濁液の菌濃度が 10^{10} , 10^9 CFU/ml の場合, 導電性中空糸膜に捕捉される菌数が多すぎるため, 吸引開始直後に目詰まりが起り, 混合試料を吸引できなくなることが多かった. すなわち, 本システムにおいて遺伝子を抽出する際に必須である通電と蒸留水の吸引まで至らないことがほとんどであった. また, 細菌の捕捉が行われたとしても, その後の蒸留水の吸引が不可能であった. そのため表 3-5 には, VT1 遺伝子が抽出されなかった “—” の記号で表記した. しかし, 10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液が混合された試料では, 目詰まりの発生がなく, 図 3-21 に示すように 10^8 または 10^7 CFU/ml



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; O157- 10^6 CFU/ml, 3; O157- 10^7 CFU/ml, 4; O157- 10^8 CFU/ml. (AHU 1714- 10^8 CFU/ml, 300 mA, 5% SDS.)

図 3-21 混合試料からの遺伝子抽出

の大腸菌 O157 懸濁液を混ぜた試料から遺伝子が抽出された。大腸菌 O157 の単独試料の結果より，抽出感度は劣るものの，混合サンプルからも標的遺伝子を抽出できた。

(4) 糞便試料からの遺伝子抽出

導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は，大腸菌 O157 の単独試料，さらに混合試料からの遺伝子抽出が可能であったことから，次に本章の最終的な目的である糞便からの遺伝子の直接抽出を行った。前述のように大腸菌 O157 が接種された糞便試料 3 ml 中に導電性中空糸膜モジュールを入れ，同様に吸引を開始した。しかし，混合試料でも見られたように，吸引直後，糞便由来細菌や固形分によって導電性中空糸膜に目詰まりが発生し，試料の吸引自体ができなくなった。その結果，VT1 遺伝子の抽出まで至らなかった。

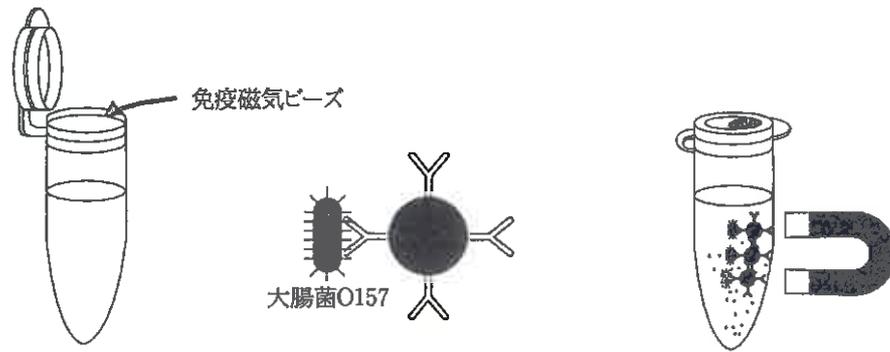


図 3-22 免疫磁気分離の原理

そこで、前処理として、糞便試料から大腸菌 O157 を特異的に分離することができる免疫磁気分離（免疫磁気ビーズ；VERITAS 社）^[42]を行った。免疫磁気分離の概略を図 3-22 に示す。

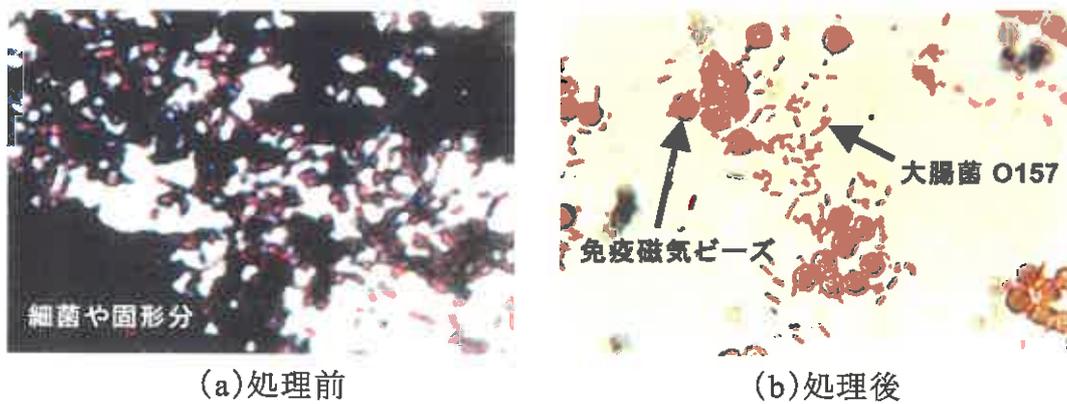
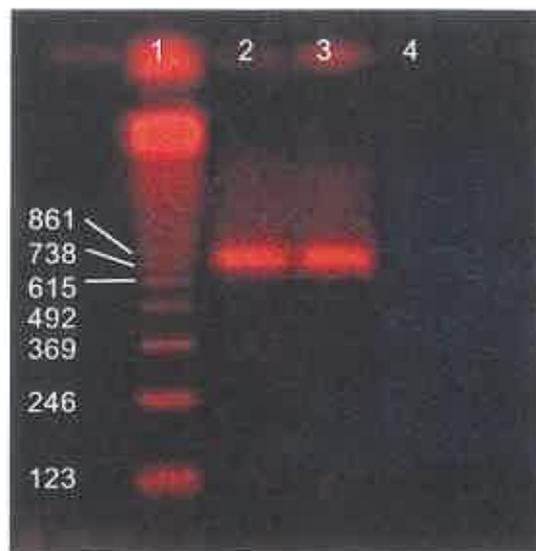


図 3-23 免疫磁気分離前後の糞便試料

免疫磁気ビーズは、大腸菌 O157 と特異的に結合する抗 O157 抗体が被覆されている金属(酸化鉄)微粒子である。まず、この免疫磁気ビーズを糞便試料に添加し、混和する。その後、抗原抗体反応により大腸菌 O157 のみが免疫磁気ビーズに捕捉される。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10⁸ CFU, 3; 10⁷ CFU, 4; 10⁶ CFU. (300 mA, 5% SDS.)

図 3-24 免疫磁気分離を利用した糞便試料からの遺伝子抽出

反応が終了した後、磁石を近づけ大腸菌 O157 と免疫磁気ビーズの複合体を集める。この状態で、糞便中の細菌や固形分などの大腸菌 O157 (免疫磁気ビーズ) 以外のものを全て取り除く。実際には、糞便試料 1 ml に対して免疫磁気ビーズを VERITAS 社の推奨する 20 μ l だけ添加し、以上の抗原抗体反応、免疫磁気ビーズの回収を、それぞれ 10 分ずつ行い、糞便試料から大腸菌 O157 のみを分離した。このように分離されたものに生理食塩水 3 ml を加え、これまでと同様に 5% SDS 溶液を 1 ml 入れ、吸引した後、再び蒸留水の吸引と同時に 300 mA 通電を行った。このような前処理を行うことで、図 3-23 のように糞便中の細菌や固形分は取り除かれ、10⁷ CFU の大腸菌 O157 が含まれていれば、図 3-24 のように糞便試料からでも標的遺伝子の抽出が可能であった。

3.7 検討

導電性中空糸膜を用いて大腸菌，黄色ブドウ球菌，緑膿菌および腸炎ビブリオ菌などの殺菌を通じて得られた細胞内物質から遺伝子を取り出されることが確認された。この遺伝子抽出法は，電流通電による殺菌からの抽出法で従来にはなかった画期的な手法といえる。本節では，この抽出法の原理等を述べ，さらに従来の化学的抽出法と対比し，導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法の有効性を明らかにする。

3.7.1 電流通電による細菌遺伝子抽出のメカニズム

導電性中空糸膜を用いた細菌の殺菌では，通電する電流値，時間および波形に相関関係を見いだした。すなわち，通電電流値が高く時間が長いほうがそれぞれの細菌に対する殺菌効果が高かった。これは，今回の供試細菌以外でも類似の結果が得られている^{[53][55][57]}。また，一番顕著な結果は通電する波形に現れた。たとえば大腸菌の場合，電流値を100 mA 共通にして直流(DC)，パルス(PC)および交流波形(AC)の3種類で比較すると殺菌効率は，それぞれ100%,81.4%および25.9%となり交流波形は効果が無く直流波形が最も効果的であった。また，殺菌に伴う細胞内物質の抽出では，殺菌のときと同じように通電する電流波形による効果の違いが得られた。また電流の大きさでは，核酸およびタンパク質共に100 mA よりも200 mA のほうが相対漏出量は多く効果が高いことが明らかとなった。このことから，この全く新しい遺伝子抽出法は，導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法と密接に関連しているといえる。

電流通電による殺菌のメカニズムは，次のように考えられている。まずポンプの吸引によって細菌が捕捉される過程で，細菌は導電性中空糸膜の金属層に接触し，細胞膜の一部に微小な物理的破壊が生じる。この局所的な細胞膜破壊を起こした部分は他の損傷のない部分よりも電気抵抗が低くなり，細菌に流れる電流はその部位に集中する。直流電流の場合には一方向に電流が流れ続けるため，また，吸引ポンプによる機械的な圧力が掛かりつづけるため細胞膜の自己修復機能^{[74], [75]}が十分に働かず，細胞膜破壊が進むとされている。そのため，細菌は形状を維持できなくなり殺菌される。

本研究によって得られた遺伝子抽出法は、以上のような殺菌メカニズムを応用することによって得られた画期的な抽出法である。すなわち、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出のメカニズムは、通電によって細菌の細胞膜破壊（殺菌）が生じ、さらに吸引圧力が加わることによって一段と細胞膜破壊が進み、その結果、細胞外に遺伝子が漏出すると考えられる。

本研究では、同じように 100, 200 mA より 300 mA の方が、より多くの細菌の細胞膜が破壊され、それに伴って遺伝子の漏出量が増加した。しかし、300 mA より大きな 400, 500 mA では、300 mA 通電時と同様の遺伝子量が含まれているにもかかわらず遺伝子バンドが確認されなかった。これは 400, 500 mA では、膜に通電した電流値が大き過ぎたために細胞膜のみならず、細胞内成分である遺伝子までもが物理的に破壊されたため PCR 増幅可能な遺伝子組成許容限界を超えたものと考えられる。

3.7.2 SDS による遺伝子抽出支援メカニズム [51], [76]~[78]

陰イオン界面活性剤である SDS 溶液を単独試料に添加し、遺伝子抽出感度の効果を確認した。その結果、添加していないものより 1/100 の菌濃度 (10^5 CFU/ml) まで検出が可能となった。これは、SDS が以下のように細菌に作用したためと推測される。

細菌の細胞膜をはじめとする生体膜は、タンパク質と脂質から成る。それらの割合は細胞によって異なり、大腸菌ではタンパク質が 75% (wt/wt)、リン脂質が 25% である^[76]。それらには、疎水性部位（非極性部位）と親水性部位（極性部位）があり、親水部位を外側に向けた二重層構造をとっている。隣接するリン脂質は、互いのリン脂質分子の炭化水素鎖が van der Waals 力によって、また膜内タンパク質とリン脂質は、膜内タンパク質の疎水部位とリン脂質の疎水部位とが互いに結合し合う疎水力（疎水効果）で強く結合されている。しかし、界面活性剤も疎水性部位と親水性部位を持つ両親媒性分子で、特に疎水性部位はリン脂質の炭化水素鎖に親和性があるため、界面活性剤が存在すると、界面活性剤分子はリン脂質二重層に入り込む。また膜内タンパク質の疎水性部位と界面活性剤分子の疎水性部位が疎水力によっても結合する。さらに SDS のよう

な陰イオン界面活性剤は、その電荷のためタンパク質内のイオン結合や水素結合を切断する働きがある^[77]。このように界面活性剤は、リン脂質二重層の中に入り込むため膜構造が維持できなくなり、リン脂質と膜内タンパク質を可溶化させる。このため、膜の透過性が増し、細胞内成分の漏出を引き起こすとされている^{[51], [78]}。このような SDS の作用に加えて、さらにポンプによる吸引圧力が細胞膜に加わり、膜破壊が一段と促進されたものと考えられる。また界面活性剤は、濃度が増すにしたがって大きく作用するため^[78]、低濃度の SDS 溶液(0.5, 1%) を加えたものより、濃度の高い 5% SDS 溶液を添加した方が、遺伝子の抽出感度が優れていた。しかし、5% SDS 溶液よりさらに効果的に作用すると考えられる 10, 25% SDS 溶液添加において、遺伝子バンドが確認されなかった。これは PCR によって遺伝子断片が増幅されなかったことを示している。PCR は、4.4.2 項で述べたように非常に少量の特定遺伝子 (DNA) 断片を化学的に合成・増幅させるものであり、反応環境下にタンパク質や脂質等が高濃度に存在すると反応阻害を引き起こすことが知られている^[47]。したがって、細胞膜に大きく作用する高濃度の SDS 溶液添加時には、遺伝子以外に多量の膜タンパク質も同時に抽出され、その混入により PCR 増幅が困難になったものと考えられる。

3.7.3 従来の化学的抽出法との比較

生物材料から遺伝子を抽出する際、現在最も多く用いられている化学的抽出法と、導電性中空糸膜による遺伝子抽出法を比較することで、本手法の有効性を明確にする。ただし、本研究で用いた免疫磁気分離は、化学的抽出法においてもよく用いられる。これは、その中で使用される試薬の効果が、糞便によって損なわれるためである。また、免疫磁気分離を利用しない場合にも、一度必ず分離培養によって糞便の中から菌を分離しなくてはならない。したがって、ここでは同じ工程である免疫磁気分離工程は比較の対象としない。

化学的抽出法の中で最も単純なインスタジーンマトリックス (BIO-RAD 社) を用いた抽出法と、導電性中空糸膜を利用した抽出法の工程および所要時間を比較した。まず、抽出工程でのインスタジーン法は、遠心による集菌から始まり、インスタジーンマトリックス添加後のインキュベーション、攪拌、さらに

2 回目のインキュベーション、攪拌、最後に遠心による遺伝子の分離というように多くの工程を必要とする。これに対して、本手法は SDS 溶液を添加して細胞膜を軟化させた後、細菌懸濁液を吸引することで導電性中空糸膜に菌を捕捉させ、その後、蒸留水を吸引すると同時に通電を行うだけで遺伝子の抽出が行われ、従来法に比べて工程の少ない抽出法である。また所要時間では、インスタジーン法は 50~60 分に対し、本手法は 10 分程度で遺伝子の抽出が可能であり、化学的抽出法に比べて約 5 分の 1 の時間で抽出が可能となる。大腸菌は、最も適した条件で約 20 分に一度細胞分裂を起こすことから^[37]、この時間短縮は、体内に入り込んだ細菌の増殖数を一桁小さくすることができ、結果として症状の悪化を防ぐことにつながる。このように、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法は簡便性・迅速性に優れた全く新しい画期的な手法であり、大腸菌 O157 をはじめとする様々な病原性細菌による感染症の早期診断に大きく寄与する。それによって、感染症を患った多くの人々の命を救うことが可能になる。さらに、従来法は夾雑物質の混入に対して細心の注意を払わなくてはならないが^{[73], [76]}、導電性中空糸膜を用いた抽出法は、膜が濾過機能を有しているため、除タンパクなどの極めて優れた特性があること、抽出工程が少ないことから従来法に比べて夾雑物質の汚染が少ないという利点がある。また、遺伝子抽出には導電性中空糸膜の他に電流源とポンプといった装置が使われているため、人手をほとんど必要としない。このことから、今後、抽出工程の自動化が期待できる。

次に、遺伝子抽出感度を比較する。感染症の診断には、実際にどの程度の感度が求められるのかを調査した。しかし、病原性細菌による感染症の進行は、患者の年齢、体調、抵抗力などの免疫状態によって大きく異なる。また、発症後の糞便中には最低 10^5 個/g 程度の菌数が含まれているとされているが^[79]、患者によってはそのときの症状と保菌数が伴わないことも多い。したがってここでは、現在、大腸菌 O157 の感染症の診断で用いられているラテックス凝集反応法やイムノクロマトグラフ法の感度を参考にして考察する。

ラテックス凝集反応法やイムノクロマトグラフ法の感度は、表 3-6 に示すように、ともに 10^5 CFU/ml 程度である^[42]。一方、電流通電による殺菌を応用した

導電性中空糸膜による遺伝子抽出とインスタジーン法は、大腸菌 O157 単独試料において各々 10^5 , 10^4 CFU/ml であった。ラテックス凝集反応法やイムノクロマトグラフ法と比較すると、単独試料の場合、インスタジーン法はもとより、本手法も実用的レベルの感度を有していることがわかる。しかし、PCR 法の一工程を担っている遺伝子抽出としてインスタジーン法と比べると、一桁ほど劣っていることがわかる。ここで、抽出された遺伝子が含まれている溶液の総量と、そのうち PCR に使用された量について考える。抽出された遺伝子は、インスタジーン法の場合、抽出剤であるインスタジーンマトリックス 200 μ l 中に存在する。一方の導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出では、3 ml の蒸留水の中にある。PCR では、このうちの 5 μ l だけを用いて遺伝子増幅が行われる。これを考慮すると、同量の遺伝子が抽出されていても、実際に PCR に使用される遺伝子量が両方で異なることがわかる。すなわち、インスタジーン法では抽出された遺伝

表 3-6 主な診断法の検出感度

診断法	感度 (CFU/ml)
・PCR 法	
インスタジーン	10^4
導電性中空糸膜	10^5
・ラテックス凝集反応法	10^5
・イムノクロマトグラフ法	10^5

子の 1/40、本手法においてはそれよりもさらに一桁以上少ない 1/600 しか PCR に使用されなかった。このため、単独試料でインスタジーン法より抽出感度が低下したのは、主に PCR に使用された遺伝子量に起因している。

他の細菌が含まれた混合試料および糞便試料からの遺伝子抽出では、単独試料の場合よりも感度低下が認められた。3 ml の混合試料は、大腸菌 O157 懸濁液 1.5 ml と非病原性大腸菌懸濁液 1.5 ml を混合して作成しているため、大腸菌 O157 懸濁液そのものを 3 ml 使用した単独試料よりも菌数が半減している。このように、対象とする大腸菌 O157 の絶対量が半分に減少しているという事実は、明らかに感度低下を引き起こす一つの原因である。その他に、次の要因が挙げ

られる。まず蒸留水を最後まで吸引することができた混合試料 (10^8 CFU/ml の非病原性大腸菌懸濁液が混合された試料) について考えると、非病原性大腸菌の濃度は常に一定であるが、大腸菌 O157 の濃度は試料によって異なる。混合した大腸菌 O157 懸濁液の濃度が 10^8 , 10^7 , 10^6 CFU/ml の場合、その占める割合はそれぞれ 1/2, 1/10, 1/100 となる。これらの割合は、導電性中空糸膜に捕捉されたときも同様であり、単独試料では大腸菌 O157 の占める有効膜面積が 100%であったものが、非病原性大腸菌が存在するため同じように減少する。したがって、全ての大腸菌 O157 が電流の作用を受けなくなり、VT1 遺伝子の抽出量の低下につながった可能性がある。

糞便に大腸菌 O157 を混ぜた糞便試料では、原理的に糞便試料から大腸菌 O157 のみを特異的に分離することができる免疫磁気分離を利用しても、 10^7 CFU/ml の濃度の試料までしか遺伝子は抽出されなかった。これは、混合試料と同じように、 10^7 CFU/ml の糞便試料 1 ml を用いて免疫磁気分離を行った後、3 ml の生理食塩水で再浮遊されたものを使用しているため、単独試料と比べて大腸菌 O157 の絶対量が 1/3 に減少したことが一つの要因である。またもう一つの要因は、免疫磁気分離工程における大腸菌 O157 の損失がある。免疫磁気分離前後の菌数を調べてみると、処理後の菌数はおよそ 1/10 に減少していた。これは、免疫磁気ビーズが大腸菌 O157 を特異的に捕捉するものではあるが、その全てを捕捉できなかったことや、大腸菌 O157 以外の細菌や固形分を取り除く際に、多少の菌数の損失などが考えられる。この他に、免疫磁気分離後の試料には、免疫磁気ビーズ (直径 2.8 μm) も含まれており、混合試料のときと同様にそれが導電性中空糸膜に捕捉され、結果的に電流の作用を受ける大腸菌 O157 の数が減ったものと推測される。

以上の検討より、導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出は、従来の化学的抽出法に比べて操作が簡単であり、さらにほとんど人手を必要としないことから自動化の可能性を有している。これは従来にはなかった画期的な抽出法である。ただし、目的以外のものが混入した場合、感度低下が認められたことから、それらの改善が今後の課題として残されている。

第4章

導電性中空糸膜を用いた「電界効果」による 遺伝子の抽出と診断

前章では、電流を導電性中空糸膜に直接通電させることでトラップしている細菌の細胞膜を破壊し、回収された細胞内物質から遺伝子を取り出す手法を用いていた。しかし、この手法は、かなり手荒な方法であるために回収された遺伝子すべてがPCRによって増幅されているとは考えにくく一部の遺伝子については、部分的な断裂が多くPCRをかけても増幅されていないことが考えられる。したがって、検出しようとする遺伝子の回収率を上げるために本章では、細胞壁の破壊を化学的な手法を用いて行った。さらに遺伝子は、中性pH溶液中で電気的に負に帯電することからこの性質を利用して導電性中空糸膜を電界効果の電極として用いる全く新たな方法で遺伝子診断の可能性を検討した。また、ウイルスに対しても同様の実験を試み実用レベルの検出感度を得ることができた。

4.1 電界効果を利用した遺伝子の抽出

本章では、遺伝子抽出の感度を上げるための検討を行った。第3章においては、導電性中空糸膜に電流通電することで大腸菌 O157 の遺伝子抽出を試みてきた。その際、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を併用させることで感度の向上を図ったが、単独試料においてのみ、現在の診断で用いられている方法と同程度の感度であった。そこで、核酸（遺伝子）のリン酸基が中性 pH の溶液中で負に帯電するという電気的性質に着目し、導電性中空糸膜を陰電極として用いることで、膜内の遺伝子を電界効果によって取り出すという全く別の角度からの利用法を考えた。また、前章で述べたように、抽出された遺伝子量に対して PCR (polymerase chain reaction) に使用される量が少ないことも感度低下の一要因であったため、抽出された遺伝子の密度を高めるための遺伝子の濃縮も試みた。以下に、それらの手順について述べる。

4.1.1 大腸菌 O157 の遺伝子抽出

まず大腸菌 O157 を導電性中空糸膜に捕捉させるため、大腸菌 O157 の入った試料 4 ml のうち 3 ml を吸引した。第3章では、試料 3 ml を残さず最後まで吸引することで細菌を捕捉していたが、この方法では吸引後、導電性中空糸膜の内部圧力が極端に陰圧となっていた。この状態で、後に続く細胞膜破壊を行った場合、その圧力によって遺伝子が導電性中空糸膜の奥（内部）に入り込み、抽出されにくくなることが考えられた。そこで試料を 1 ml 増やして 4 ml とし、そのうちの 3 ml を無理なく吸引（圧力調製）することで、最終的に膜内外の圧力差を極力抑えるようにした。吸引後、細胞溶解液（1% SDS と 10 mM NaOH の混合溶液）に 10 秒間浸し、膜に捕捉された大腸菌 O157 の細胞膜を化学的に破壊した。以後、この操作をアルカリ法^[80] という。細胞膜を溶解した後、図 4-1 に示すように、陽極領域が緩衝液（TAE buffer ; 0.48% Tris, 0.07% EDTA, 1.14% 酢酸）で満たされたセルを用いて、導電性中空糸膜が陰極になるように電界を印加し、同時に捕捉の際に膜を介して吸引された溶液 1.5 ml を膜の内側から外側に押し出すことで、負に帯電する遺伝子を電気的、物理的に抽出した。ただし電界強度は 1, 2, 4 V/cm, 印加時間は 5, 10, 15 分のいずれかを選択し

た。以上の操作によって導電性中空糸膜から抽出された遺伝子は、陰極領域と陽極領域の間に半透膜が存在するため、陰極領域のみに存在する。ここでは、遺伝子が含まれている陰極領域中の溶液約 1.5 ml のうち 5 μ l を用い、3.5.3 項で述べた PCR 条件、およびプライマーによって遺伝子を増幅した。その後、ゲル電気泳動・染色を同じように行い、遺伝子抽出の有無を視覚的に確認した。

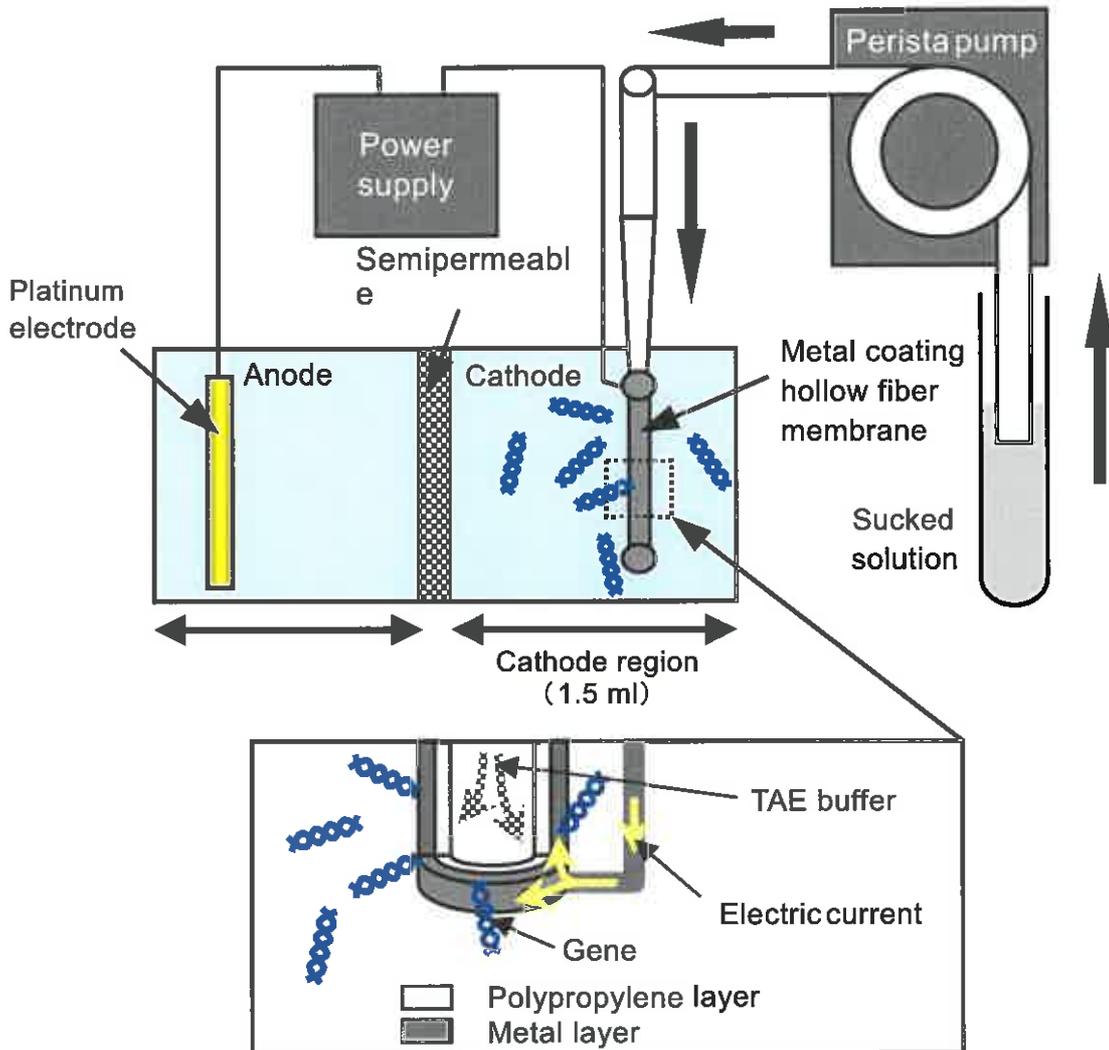


図 4-1 電界効果を利用した遺伝子抽出の概略

以上のように、導電性中空糸膜に大腸菌 O157 を捕捉した後、膜を介して吸引された溶液を逆に膜の内側から外側へ押し出し、同時に電界を印加することで遺伝子を溶液中に抽出した。

4.1.2 大腸菌 O157 遺伝子の濃縮

3.7.3 項で述べたように、PCR に使用されるサンプル量はわずか $5 \mu\text{l}$ である。すなわち、前項の操作によって遺伝子は 1.5 ml 中に抽出されるが、そのうちの 0.3% 程度 ($1/300$) しか使われないことになる。そこで、遺伝子の抽出後、新たに以下のような遺伝子濃縮操作を付加することで、感度の向上を目指した。

図 4-2 に示すように、半透膜で 3 つの領域に仕切られたセルの抽出領域（中央）において、同様に強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで遺伝子抽出を行った。ただし、中央の領域には、グリセリンが 1% 添加された電気泳動用緩衝液 (1.5 ml) を用いたため、溶液を押し出す物理的な抽出操作は行わなかった。その後、図 4-3 のように導電性中空糸膜を陰極領域に移し、これを陰極、白金線を陽極として、強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加した。この操作によって、中央の領域に存在する遺伝子は電界の影響を受け、原理的に陽極側の半透膜近傍に濃縮される。最後に、半透膜の近傍から溶液 $5 \mu\text{l}$ を採取し、これを抽出サンプルとして分析を行った。

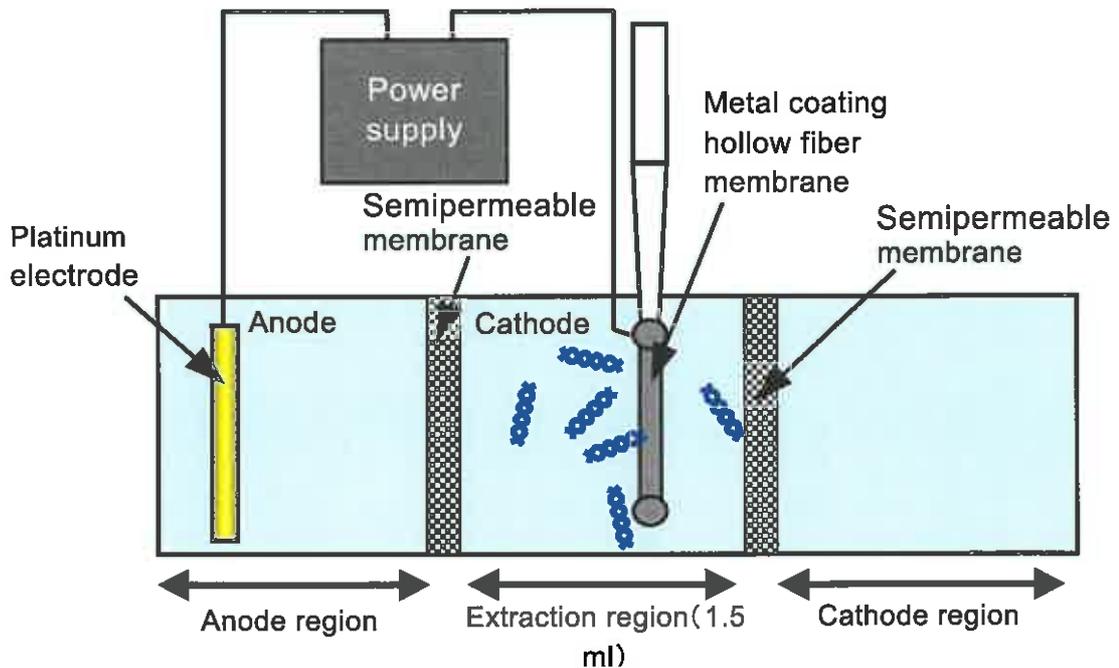


図 4-2 遺伝子抽出の概略

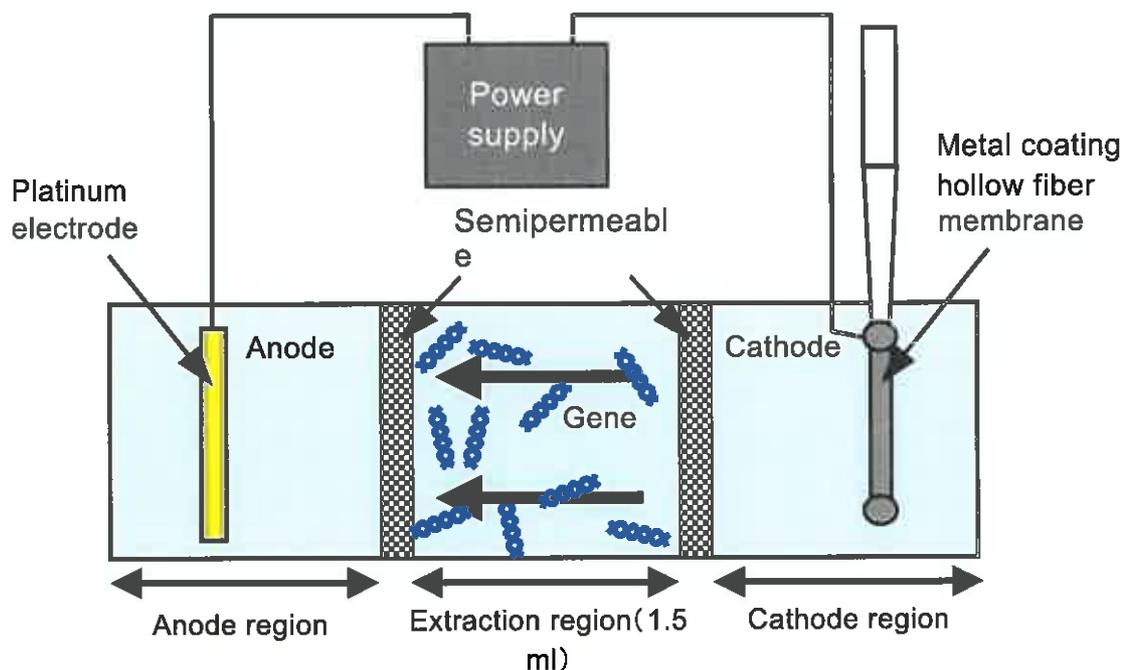


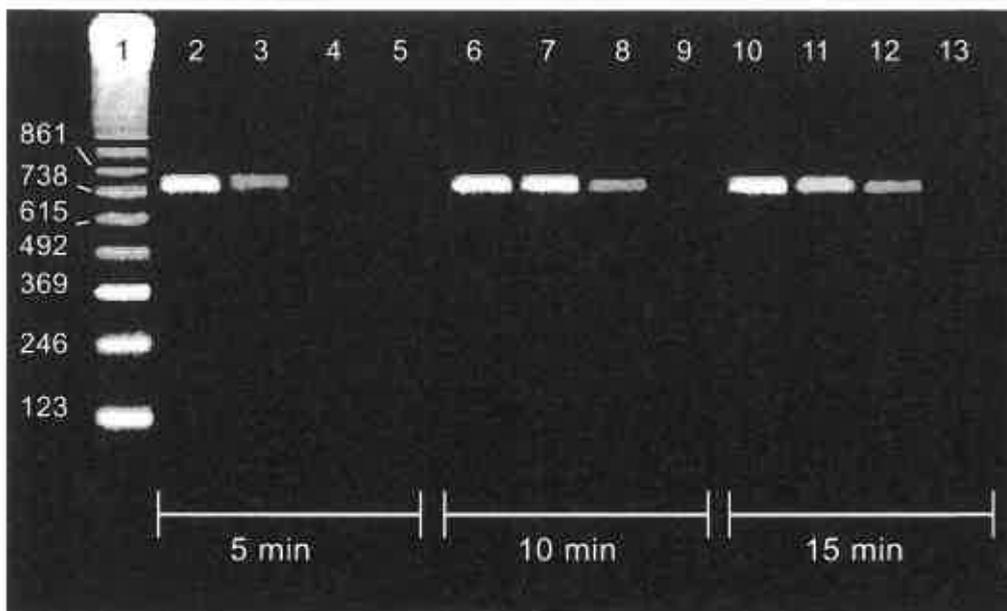
図 4-3 遺伝子濃縮の概略

4.2 実験結果

負の電荷を有する遺伝子の電氣的性質を考慮し、これまでとは全く異なった発想のもとに、導電性中空糸膜を用いた新たな遺伝子抽出の可能性を検討した。従来の導電性中空糸膜の電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出は、大腸菌 O157 単独試料において 10^5 CFU/ml, 混合試料および糞便試料では 10^7 CFU/ml の抽出感度であった。この電界効果を利用した新たな遺伝子抽出法は、これらの抽出感度よりも優れているかどうか、また抽出後の遺伝子濃縮が有効であるか否かを以下に示す。

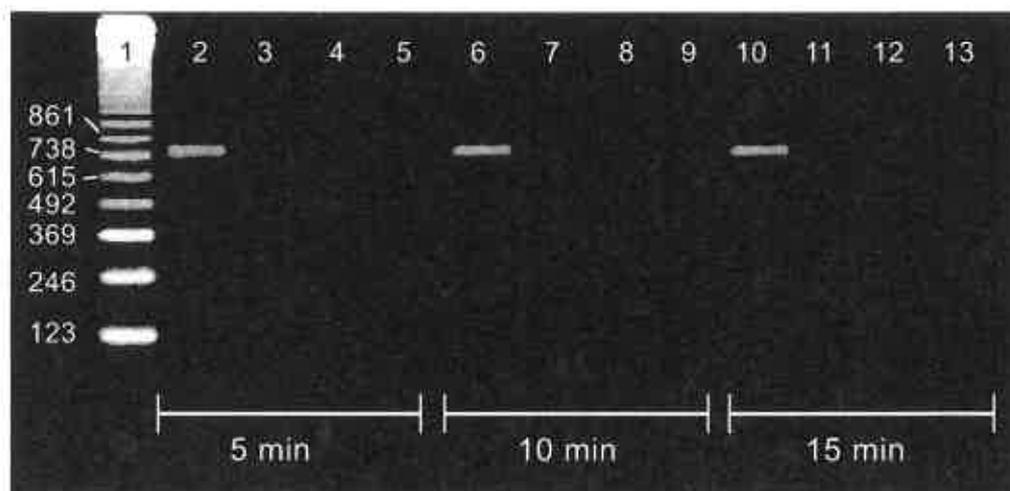
4.2.1 電界効果を利用した単独試料からの遺伝子抽出

最初に、電気泳動用の緩衝液で洗浄、希釈された単独試料を用いて 4.1.1 項のように大腸菌 O157 を捕捉し、アルカリ法によって細胞膜を溶解した後、膜を陰電極として電界を印加することで、VT1 遺伝子を導電性中空糸膜から取り出せるかどうか基礎的な検討を行った。結果を図 4-4 および図 4-5 に示す。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; 5 min, 6~9; 10 min, 10~13; 15min, 2, 6 and 10; 10^6 CFU/ml, 3, 7 and 11; 10^5 CFU/ml, 4, 8 and 12; 10^4 CFU/ml, 5, 9 and 13; 10^3 CFU/ml.

図 4-4 単独試料からの遺伝子抽出 (2 V/cm)



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2~5; 5 min, 6~9; 10 min, 10~13; 15min, 2, 6 and 10; 10^6 CFU/ml, 3, 7 and 11; 10^5 CFU/ml, 4, 8 and 12; 10^4 CFU/ml, 5, 9 and 13; 10^3 CFU/ml.

図 4-5 単独試料からの遺伝子抽出 (4 V/cm)



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10^6 CFU/ml, 3; 10^5 CFU/ml, 4; 10^4 CFU/ml, 5; 10^3 CFU/ml. (10 mim)

図 4-6 単独試料からの遺伝子抽出 (1 V/cm)

強度 2 V/cm の電界を印加した場合、図 4-4 のように印加時間 5 分で 4×10^5 , 10^6 CFU/ml の大腸菌 O157 単独試料を吸引したのから遺伝子バンドが認められた。これまでと全く同じ条件、プライマーによって VT1 遺伝子の 774 bp の部位を増幅していることから、確認された遺伝子バンドは VT1 の遺伝子断片であることがわかる。さらに印加時間を 10 分および 15 分とすると 4×10^4 CFU/ml においても遺伝子バンドが認められ、印加時間と遺伝子の抽出効率に相関性が見られた。次に図 4-5 の電界強度 4 V/cm の結果を見ると、それぞれの印加時間によって抽出感度に差はなく 4×10^6 CFU/ml の場合のみ遺伝子バンドが観察された。強度 2 V/cm の結果と比較すると抽出感度は二桁低下していた。以上の結果から、電界を印加する際の最適時間は 10 分であることが示されたものの、電界強度は明確にならなかった。そこで、印加時間を 10 分とし、強度を 2 V/cm よりも低い 1 V/cm とした。その結果、図 4-6 に示すように、 4×10^6 CFU/ml までしか確認されず、4 V/cm のときと同様に 2 V/cm の抽出感度より低かった。

遺伝子の電気的性質を考慮して、これまでとは全く異なった導電性中空糸膜の利用法を検討した結果、以下の知見が得られた。まず、化学的に細胞膜を破壊し、その後溶液を押し出すと同時に、導電性中空糸膜に電界を印加することで、膜に捕捉した大腸菌 O157 の遺伝子を物理的、そして電気的に取り出せるこ

とがはじめて示された。また、最も効率よく遺伝子が抽出される電界強度および印加時間は、それぞれ 2 V/cm, 10 分という基礎的な知見が得られた。

4.2.2 電界効果を利用した糞便試料からの遺伝子抽出

4.2.1 項で得られた基礎的な知見に基づいて、今度は大腸菌 O157 が接種された糞便試料からの遺伝子抽出を試みた。その際の抽出条件は、前項の結果を参考に電界強度を 2 V/cm, 印加時間を 10 分とした。ただし、ここでも導電性中空糸膜の目詰まりを抑制するため、あらかじめ免疫磁気分離によって一度洗浄してから遺伝子抽出操作を開始した。

糞便試料からの遺伝子抽出は、単独試料のように 4×10^4 CFU/ml までは抽出されなかったが、大腸菌 O157 の濃度が 4×10^6 CFU/ml である試料から図 4-7 のように標的遺伝子を抽出できた。このように、単独試料からの遺伝子抽出と比較すると感度低下は認められたものの、第 3 章の電流通電による殺菌を応用した抽出法と比べた場合、10 倍の感度向上が認められた。したがって、導電性中空糸膜を陰電極として利用した全く新しい遺伝子抽出法は、電流通電による殺菌法を応用した遺伝子抽出より有効な手法であり、病原性細菌による感染症の遺伝子診断に一層寄与するものと考えられる。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10^6 CFU/ml, 3; 10^5 CFU/ml, 4; 10^4 CFU/ml.

図 4-7 糞便試料からの遺伝子抽出 (2 V/cm, 10 min)

4.2.3 抽出後の遺伝子濃縮の効果

PCR に使用される遺伝子量が多いほど、最終的な PCR 産物中に含まれる複製遺伝子量が多いことは、その原理から理解できる。そこで、1.5 ml 中に抽出された遺伝子の電気的性質を利用して、新たに陽極側の半透膜近傍に濃縮することを試みた。

まず図 4-2 の遺伝子抽出領域で強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで、導電性中空糸膜から遺伝子を取り出し、その後、膜を陰極領域に移して再び強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加し、遺伝子の濃縮を行った。その結果、図 4-8 に示すように 4×10^6 CFU/ml、さらにこれまで確認されなかった 4×10^5 CFU/ml の糞便試料においても遺伝子バンドが観察された。このように、抽出後に行われた遺伝子濃縮操作によって、さらに感度は 10 倍改善され、付加されたこの操作が本抽出法において極めて有効な手段であることを見出した。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 10^6 CFU/ml, 3; 10^5 CFU/ml, 4; 10^4 CFU/ml.

図 4-8 抽出後の遺伝子の濃縮 (2 V/cm, 10 min)

4.3 検討

電界効果を利用した導電性中空糸膜による遺伝子抽出法は、これまでの電流通電による殺菌を応用した抽出法と全く原理が異なる。ここではその抽出機構を述べ、次いで従来の化学的抽出法、および電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と対比し、電界効果を利用した抽出法の有効性を明確にする。

4.3.1 電界効果を利用した遺伝子抽出法のメカニズム

電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は、導電性中空糸膜に通電を行うことで、捕捉された細菌細胞膜の局所的な破壊（殺菌）を電氣的に誘発し、さらに吸引圧力によって膜破壊が促進される。細胞膜破壊された細菌から、この吸引によって同時に遺伝子が抽出されるというメカニズムであったが、本章で述べた遺伝子抽出法は、このメカニズムとは全く異なっている。

まず導電性中空糸膜に捕捉された大腸菌 O157 は、細胞溶解液（1% SDS 溶液と 10 mM NaOH）に 10 秒間浸されることで、化学的に細胞膜が溶解される。これは、3.7.2 項で示した SDS の作用に加えて、アルカリ溶液である 10 mM NaOH によっても促進される。その後、導電性中空糸膜を陰電極として電界を印加すると、遺伝子は負に帯電しているため導電性中空糸膜から電氣的反発力によって緩衝液中に漏出される。このように、本章で述べた抽出法は、導電性中空糸膜を新たに電極として用い、さらに遺伝子の電氣的性質を利用した全く新しい抽出法である。まず抽出感度の印加時間依存性は、電界強度 2 V/cm で行われた抽出結果に反映されている。強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加したときの検出感度は 10^5 CFU/ml であったが、その 2 倍の 10 分にすると 10^4 CFU/ml まで抽出され、印加時間が長いほど抽出感度は向上する傾向にあった。電界強度 2 V/cm の場合、印加時間が 5 分というのは、結果から推察すると、遺伝子が導電性中空糸膜から抽出されるのに不十分な時間であり、膜内に残存する。それに対して印加時間を 2 倍の 10 分に延長すると、5 分では抽出されなかった膜内の遺伝子も抽出されるため、感度が向上するものと考えられる。これに基づくと、それよりも長い 15 分とした場合、さらに感度が向上すると思われたが、10 分時の結果と変わらないことから、導電性中空糸膜の中に存在するほとんどの遺伝子

は10分以内に抽出されたものと推測される。よって、導電性中空糸膜の中に遺伝子が存在する限り、遺伝子の抽出量（感度）は電界印加時間に依存する。

次に、抽出感度と電界強度に着目する。この抽出法は、導電性中空糸膜の金属層と遺伝子との間に働く静電力を利用しているため、電界強度が高いほど効率が良いものと予想し、2 V/cm を基準とし、その2倍の4 V/cm についても行った。しかし、抽出感度は4 V/cm の方が低く予想に反した結果が得られた。そこで2 V/cm の1/2の電界強度1 V/cm で遺伝子抽出を試みた。その結果、1 V/cm よりも2 V/cm の方が抽出感度は高かった。これらの結果から、遺伝子抽出量（感度）は、ある値まで電界強度に依存して上昇し、それを越えると逆に低下すると言える。

4.3.2 導電性中空糸膜を用いた遺伝子濃縮

PCR はサイクル数の増加にともなって、最初の遺伝子数の2, 4, 8倍というように 2^n 倍に遺伝子を増幅させる。この原理から、産生される最終的な遺伝子数は、PCR に用いられる初期の遺伝子数、すなわちサンプル中の遺伝子数に影響されることがわかる。前述のように、PCR に使用されるサンプル量は5 μ l と制限があることから、4.1.1項の方法によって1.5 ml の緩衝液中に抽出された遺伝子を、全てその5 μ l 中に濃縮することで、原理的に300倍の感度向上が望める。そこで4.1.2項では、抽出操作後、遺伝子を電界効果によって陽極側の半透膜近傍に極力濃縮し、そこから5 μ l を採取してPCR 増幅を行った。糞便試料を使った検討において、この濃縮操作の有無で感度に差異が生じ、濃縮を行った方が10倍の感度向上が認められ、 10^5 CFU/ml まで検出可能となった。全ての遺伝子を5 μ l 中に濃縮すると300倍の感度向上が原理的に可能であるが、ここでは10倍の向上しか確認されなかったことから、半透膜近傍の約150 ml の緩衝液中に濃縮されたものと推測される。このように、遺伝子抽出後に付加された濃縮操作は、10分程度の時間を必要とするが、その見返りとして感度は10倍ほど改善された。以上のように、遺伝子抽出後の濃縮操作は感度向上のための非常に有効な手段である。

4.3.3 従来法との比較

電界効果を利用した遺伝子抽出法は、1) 細菌の捕捉後、2) 細胞膜の溶解、3) 電界印加、4) 再度電界印加といった工程で行われる。またその所要時間は約30分である。前章で述べた細菌の捕捉、SDSの添加、通電・吸引の3工程を約10分間で行う電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と対比すると、1工程多く、また時間も20分程度長い。しかし、現在最も多用されている7工程、50～60分を要すインスタジーン法と比べると、工程および所要時間がともに優れており、迅速で画期的な抽出法と言える。

また抽出感度に着目すると、濃縮操作が含まれない場合でもインスタジーン法と同様であり、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法よりも10倍程度高い。電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は3mlの蒸留水中に遺伝子が抽出されていたが、本章の抽出法では緩衝液1.5ml中に抽出された。PCRの原理から、この溶液量の減少は感度向上の一要因であることが理解できる。それに加えて、遺伝子の抽出方向の違いも関係しているものと思われる。4.6.3項で述べたように、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法では、膜の外側（金属層）から内側（ポリプロピレン層）に向かって遺伝子を取り出すため、遺伝子は、細菌などが捕捉されたことによって小さくなったポアをいくつも通過しなければならない。これに対して、電界効果を利用した遺伝子抽出法は、膜の外側に向かって抽出されることから、小さくなったポアを数多く通過する必要がない。したがって、遺伝子は前者よりも後者の方が膜に捕捉されず、抽出されやすいものと考えられ、それが感度向上につながった可能性もある。従来の導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌に関する知見を違う角度から見ると、細菌もこれと同じような傾向を示すことがわかった。まず、以下のような殺菌効率を検討する際の細菌回収操作に着目した。電流通電による殺菌効率は、通電群と未通電群の生菌数を調べ、その後両者を比較することで検討された。そこでは、通電後、導電性中空糸膜モジュールのノズルに注射器を接続し、膜の内側から外側に向かって生理食塩水を注入することで、膜から細菌を押し出した。その後、この操作によって押し出された菌数（生菌数）が混釈培養法で測定された。以上の操作を、異なった観点から捕らえると、膜の内側か

ら外側に向かって生理食塩水を注入することで、同時に膜内の細菌が必ず押し出されることがわかる。その割合は、未通電の場合、膜に捕捉された細菌の10%程度であることが報告されている^[53]。次に、細菌懸濁液を吸引（細菌を捕捉）する際の細菌捕捉率に注目した。細菌捕捉率は、菌種を問わず100%であることが調べられている。つまり、導電性中空糸膜を介して細菌懸濁液を膜の外側から内側へ吸引したとき、膜を通過する細菌が全くいないことを示している。これらの知見を考慮すると、細菌も膜の内側よりも外側に押し出されやすい傾向が見られ、本章で述べた抽出感度も同様に遺伝子の抽出方向に影響していると考えることができる。

電界効果を利用した遺伝子抽出法は、前章の遺伝子抽出法と同様に糞便試料を使用した場合、大腸菌 O157 単独試料よりも二桁の感度低下が認められた。これは、3.7.3 項で述べたように、糞便試料の中に含まれる細菌の絶対数が単独試料と比べて 1/3 であることと、糞便試料の前処理で行われた免疫磁気分離による細菌数の損失（約 90%減）が主な原因である。しかし、濃縮処理の追加により、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法よりも時間を必要とするが、その損失を補うことができた。

以上のように、遺伝子の電氣的性質を考慮して、これまでとは全く違った発想のもとに、この新たな遺伝子抽出法の可能性が検討された。本章で得られた知見から、電界効果を利用した遺伝子抽出法は、従来の化学的抽出法に比べて迅速性、簡便性ともに優れた画期的な手法であることが示された。また前章の電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と比較した場合、工程と時間が多少多いものの、抽出感度の向上が確認された。抽出後の遺伝子濃縮も含めると100倍の感度向上が確認され、飛躍的な改善がなされた。このように、電界効果を利用した遺伝子抽出法は、大腸菌 O157 をはじめとする生命に関わる感染症を引き起こす病原性微生物に対して極めて有効であり、感染症を患った多くの人々の命を救うことに貢献できる。さらに、導電性中空糸膜の利用法が全く異なるとはいえ、遺伝子を抽出・濃縮する際に必要なセルが追加されたこと以外は、何ら装置構成に変わりがないため、将来自動化の可能性も有している。

4.4 ウイルス^[32]

19世紀末、ロシアの Ivanovsky, オランダの Beijerinck らによってタバコモザイク病の病原体が発見されたのが人類とウイルスとの出会いである。ウイルスは極めて小さな感染性因子であり生きた細胞の中でしか増殖することができず、ヒトとさまざまな係わりをもってきた。このウイルスの起源をたどると人類発祥どころか生命発祥のかなり初期から存在していたといわれている。そのひとつの根拠として、ウイルスには RNA だけを遺伝子情報として存在しているものがあるということである。現在われわれの遺伝子情報は、DNA が発信源となっているが、太古の昔 RNA がすべての遺伝をつかさどっていた時代があったといわれ、RNA ウイルスはその時代の名残りとする学説も存在している。

ウイルスは、DNA または RNA を有するものの細胞形態を持たないため、原核細胞、真核細胞のどちらにも属さない微生物である。このため、これまで述べてきた原核細胞の単細胞生物である細菌とは構造や機能等が大きく異なる。まずこの節では、それらウイルスの特徴をまとめ、そのうえで 4.5 節からウイルス遺伝子の抽出の可能性を検討していく。

4.4.1 ウイルスの構造^{[32], [37], [50], [52]}

ウイルスは微生物と呼ばれる一群の生物に属するが、これは肉眼では見えな
いか、あるいは極めて見えにくいほど小さな生物を総称する。ほかに細菌、真
菌(カビ)、原虫などがあるが、これらの観察には光学顕微鏡が用いられる。ウイ
ルスは、他の微生物とは大きく異なり、細胞壁、細胞膜、細胞質、核もしくは
核様体を持たず、大きさも 20~300 nm と著しく小さい微生物である。ウイルス
の基本構造は、遺伝物質である核酸を中心として、その周囲がカプシド (capsid)
と呼ばれるタンパク質の殻で包まれている。核酸は RNA か DNA のいずれか一
方を有し、1 本鎖あるいは 2 本鎖である。ウイルスの種類によっては、この外
側に脂質と糖タンパク質から成るエンベロープ (envelope) という被膜がある。
さらに、ある種のウイルスのエンベロープ表面には糖タンパク質の突起物であ
るスパイク (spike) が存在し、動物赤血球表面に結合する性質がある。図 4-9
にはヒトに感染性を示すいろいろなウイルスの種類と相対的大きさを示した。

また、図には同時に2つの細菌(大腸菌、クラミジア)と細菌ウイルス(バクテリオファージ), さらに植物ウイルス(タバコモザイクウイルス)も参考に示した。

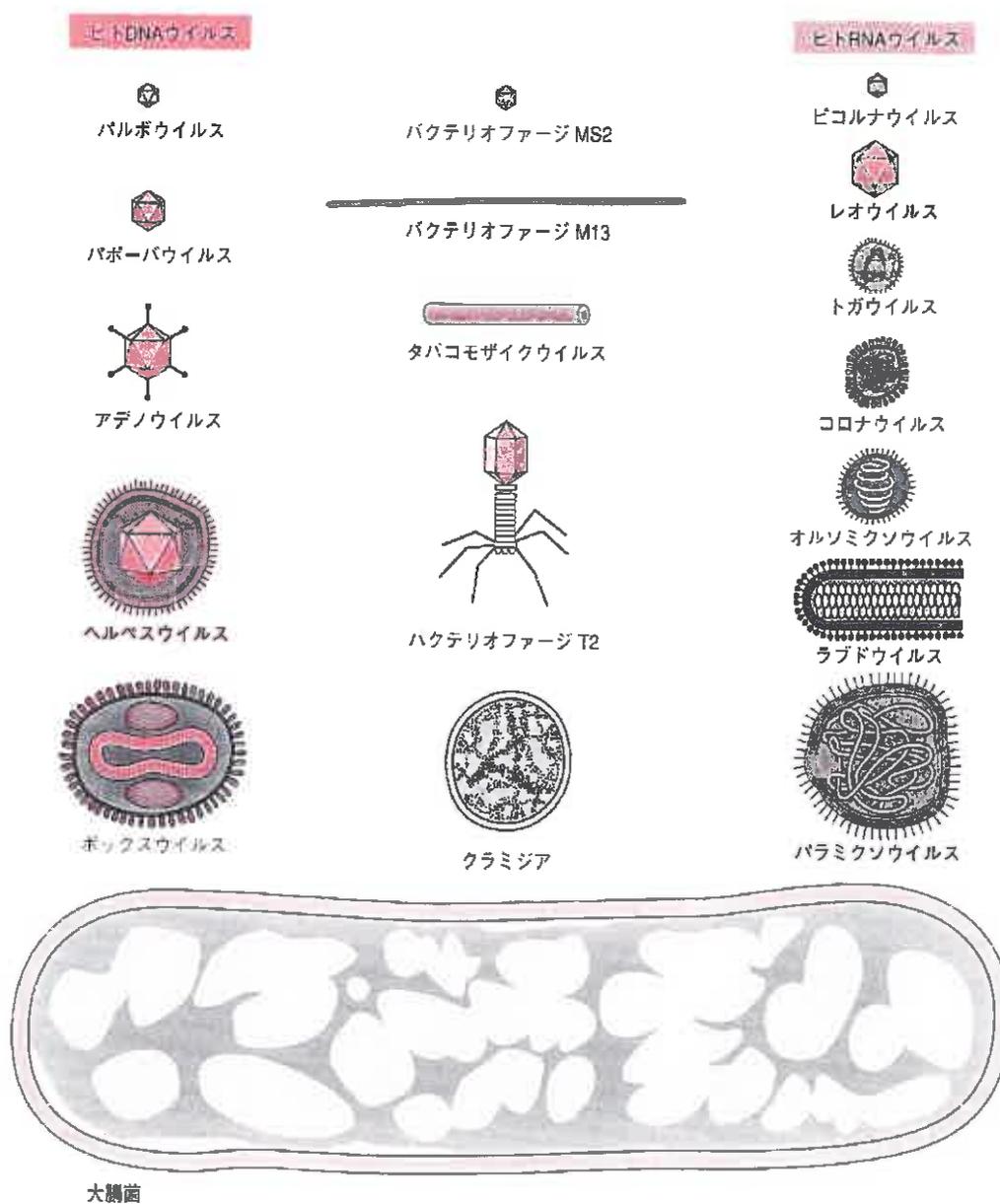


図 4-9 ウイルスの種類と相対的大きさの比較

ウイルスの基本的な構造は核酸とカプシドが組み合わされたヌクレオカプシド

(nucleocapsid) である。また、その構造からわかるように、細胞質や核を持たず、タンパク質や核酸の合成に必要な場と材料を欠いている。そのためウイルスは、人工培地上で自己増殖できないため、感受性のある細胞に感染し、細胞の代謝酵素や材料、さらにタンパク質合成のためにリボソームを利用して自己成分を合成し増殖する。

ウイルスの増殖過程は、図 4-10 に示すように 1) 吸着 (adsorption), 2) 侵入 (penetration), 3) 脱殻 (uncoating), 4) ゲノム複製 (synthesis of viral components), 5) ビリオン形成 (maturation), 6) 細胞外への放出 (release) から成る。

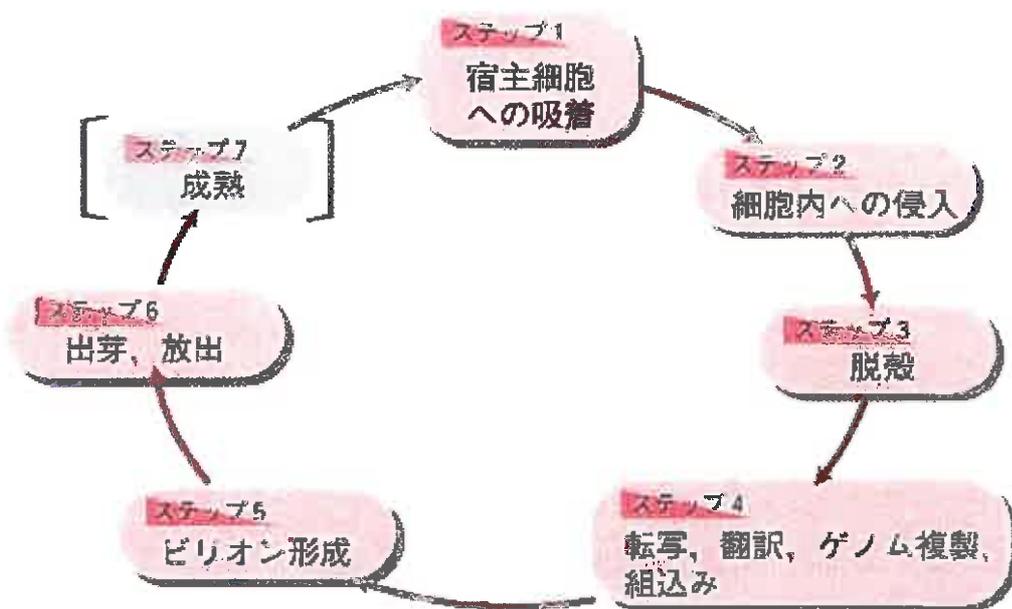


図 4-10 ウイルスの増殖過程

ウイルスのライフサイクルを図 4-11 に示す。まず、ウイルスが細胞に感染するときの第 1 段階目の吸着は、ウイルスがブラウン運動によって細胞表面に接近し衝突することから始まる。この繰り返りで、ウイルス表面のタンパク質や糖タンパク質が、レセプター (receptor) と呼ばれる細胞膜の特定部位に結合する。レセプターに結合したウイルスは、細胞の食作用によって取り込まれるか、

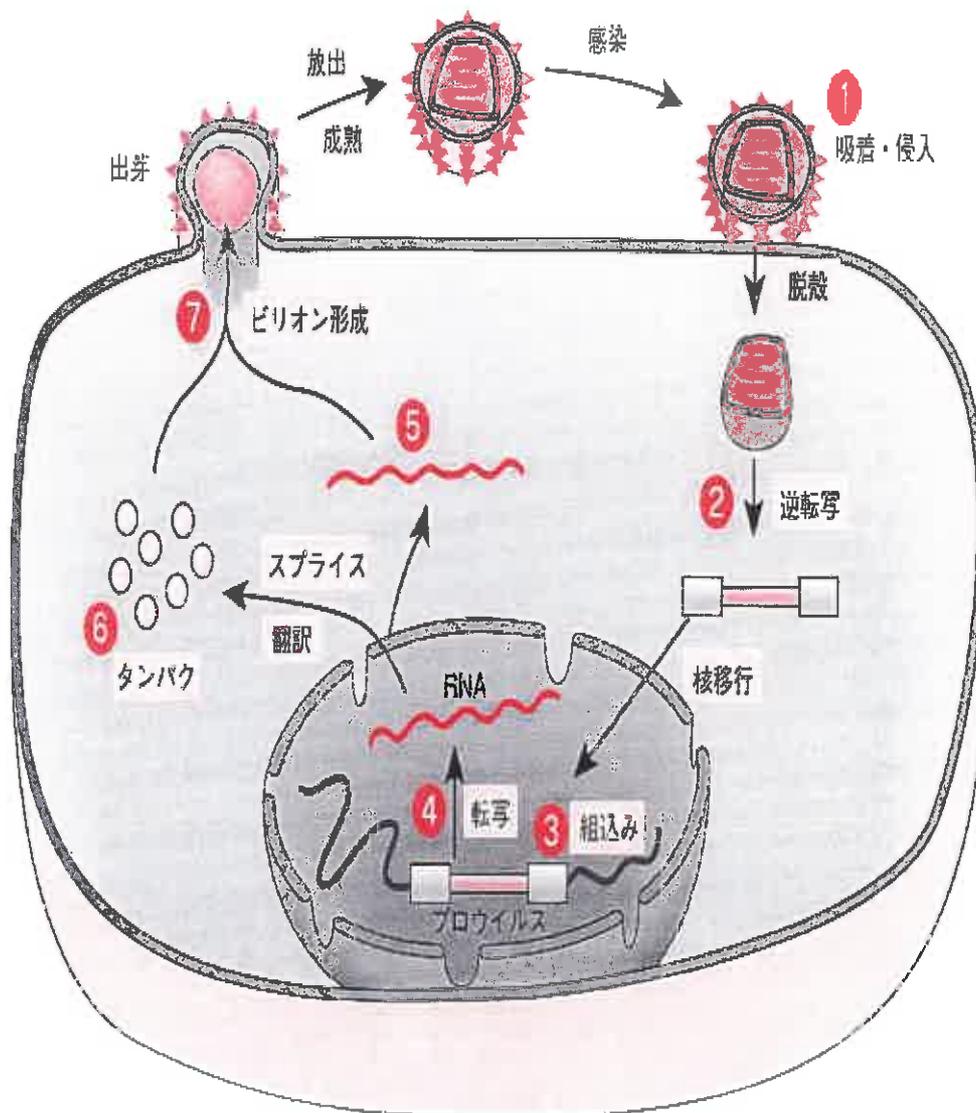


図 4-11 レトロウイルスのライフサイクル

ウイルス表面のエンベロープと細胞膜が融合し、ウイルスのヌクレオカプシドが細胞質内に侵入する。その後、ヌクレオカプシドからタンパク質が取り除かれ、裸の核酸になる(脱殻)。多くのウイルスでは、細胞のリソソーム (lysosome) と言われるタンパク質分解酵素によって起こる。脱殻したウイルス核酸の遺伝情報が mRNA に転写され、素材が合成される。DNA ウイルスの場合、DNA の一部が RNA ポリメラーゼ (細胞が持っている酵素) によって mRNA に転写さ

れ、その mRNA によってウイルス核酸の複製に必要な酵素（DNA ポリメラーゼ）が合成される。その酵素を用いて、親ウイルス DNA を鋳型として多数の子ウイルス DNA が複製される。次に子ウイルス DNA から転写された mRNA によって、ウイルスの構成タンパク質（カプシドタンパク質）が作られる。RNA ウイルスの場合、基本的に DNA ウイルスと同様であるが、親 RNA から mRNA への転写の過程がウイルスによって異なる。親ウイルス RNA が+鎖 RNA のものは、直接それが mRNA となり RNA ポリメラーゼが作られる。その RNA ポリメラーゼを用いて、まず相補的な-鎖 RNA が作られ、これを鋳型として+鎖 RNA が多数できる。また-鎖 RNA を持つウイルスは、それを鋳型として細胞の RNA ポリメラーゼによって+鎖 RNA (mRNA) が作られ、その後+鎖 RNA のものと同様な過程で-鎖 RNA が合成される。ここで生合成されたウイルス核酸とカプシドタンパク質が組み合わされウイルス粒子(ヌクレオカプシド)ができる。細胞の破壊によって、あるいはエンベロープを持つ RNA ウイルスは、ウイルスタンパク質（エンベロープタンパク質）で置き換えられた細胞膜を被って、またエンベロープを持つ DNA ウイルスの場合には、核膜を被って細胞外に遊離する。このようにウイルスが細胞内で増殖すると、多くの場合、細胞は破壊されて死滅する。これがウイルスの病原性に結びつく。1 個の細胞に 1 個のウイルスが感染して、上述の過程で増殖する時間は、ウイルスの種類と細胞の種類で異なるが、一般に 10 時間前後であり、産生される子ウイルス数は数百～数千個である。

4.4.2 ウイルスの培養と定量法^{[37], [50]}

ウイルスは、前述のように生きた細胞内に寄生して増殖する。したがってウイルスを増殖させるには、生きた細胞が必要となる。ただし、ウイルスが感染できる細胞の種類は一般的に限定されており、最も適するものを選択しなければならない。細菌だけに感染するウイルスは、バクテリオファージ (bacteriophage) と呼称される。また動物細胞、あるいは植物細胞に感染するウイルスは、それぞれ動物ウイルス (animal virus)、植物ウイルス (plant virus) と総称される。人間を含む動物に感受性を示す動物ウイルスの培養には、一般

に孵化鶏卵，培養細胞，そして動物そのものが使われる。

ウイルスの量を測定するには，物理的手法と生物学的手法がある．物理的手法は，ウイルス浮遊液に一定量のラテックス粒子を混ぜ，電子顕微鏡でウイルス数を計測する方法である．この方法は，感染性・非感染性を区別することができず，さらに簡便さに欠けるため，通常は用いられない．一方の生物学的手法にはいくつかの方法があり，ウイルスの種類によって使い分けられる．エンベロープ表面に赤血球凝集素を有するウイルスの場合には，ウイルス浮遊液を段階希釈して赤血球浮遊液と混合し，何倍希釈まで赤血球凝集を示すか調べ（赤血球凝集反応；hemagglutination test），相対的なウイルス濃度を測定する．これを赤血球凝集価（hemagglutination titer：HA titer）という．また，段階希釈したウイルス浮遊液を動物，孵化鶏卵，培養細胞に接種し，それらの50%が感染する希釈ウイルス液の倍率を調べ，それを50%感染量（50% infectious dose：ID₅₀）として表す．もう一つの方法は，プラーク検定法（plaque assay）である．これは単層培養細胞にウイルス浮遊液を接種し，寒天（agar）またはメチルセルロース（methyl cellulose）を含む培地を重層して培養する．1個のウイルスが感染した1個の細胞から，子ウイルスが放出されるが，寒天またはメチルセルロースがあるため拡散できず，隣接する細胞のみに再感染し，感染死滅した細胞集団ができる．これがプラークで，染色によって未感染細胞と区別でき，プラーク数を計測し，プラーク形成単位（plaque-forming unit：PFU）で表す．

電界効果を利用した遺伝子抽出法のウイルスに対する有効性を検討するにあたって，単純ヘルペスウイルスI型（herpes simplex virus type I：HSV）を用いた．またHSVの培養には，それに対して優れた感受性を示すVero細胞（アフリカミドリザル腎細胞由来の株化細胞）を選択した．

4.4.3 供試ウイルス^[37]

本研究では，B型肝炎ウイルスと同様なDNAウイルスとして，比較的危険性が低く，培養が容易な単純ヘルペスウイルスI型（HSV）を用いて検討を行うことにした．なお，HSV（HSV-HF RK-14）は神奈川県立衛生短期大学から分与を受けた．

図 4-12 と図 4-13 に HSV の電子顕微鏡写真を示す。HSV は、カプシド配列が正 20 面体を形成し、その中心に核酸（2 本鎖 DNA）を有する正 20 面体ヌクレオカプシド構造を成している。

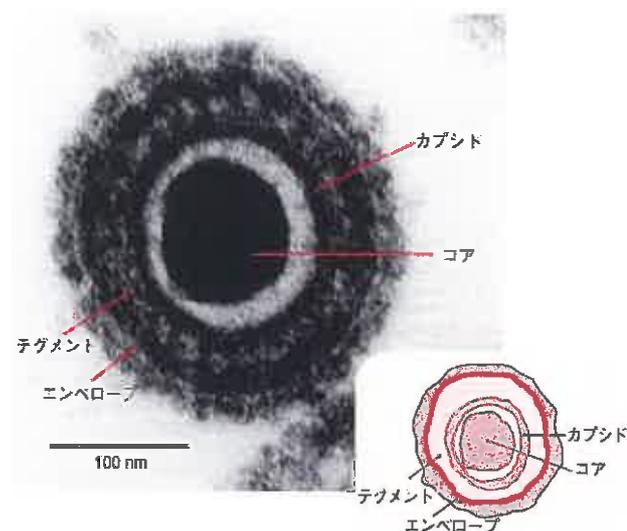
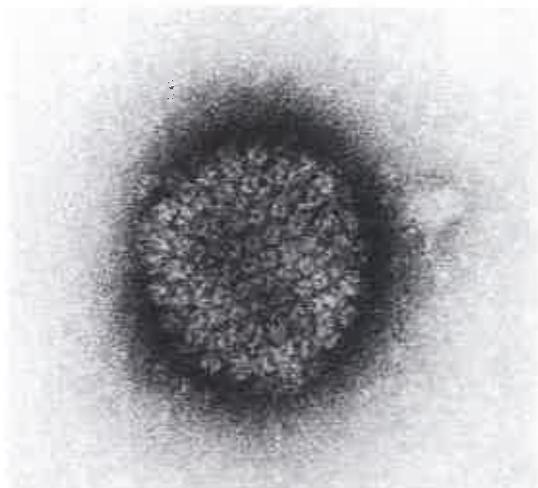


図 4-12 HSV の電子顕微鏡写真

図 4-13 HSV の断面構造

さらにその外側がエンベロープで被われている。大きさは外径 150~200 nm である。HSV がヒトに感染すると口内炎や角膜炎を引き起こし、抵抗力が低下した状態では全身性感染を起こすことがある。

HSV の培養には、先に述べた Vero-BV 細胞を用いた。まず、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) が 5% 含まれた RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) 培地 30 ml で、Vero-BV 細胞を培養瓶に単層培養した。続いてこの培養瓶に、凍結保存された HSV 浮遊液を 50 μ l 接種し、37°C に保温された CO₂ インキュベーター内で Vero 細胞に HSV を 1 時間吸着させた。その後、接種した HSV 浮遊液を取り除き、FBS が 1% 含まれた RPMI 1640 培地を 50 ml 入れ、37°C の CO₂ インキュベーター内で約 2 日間培養した。培養後、HSV の感染によって発生する細胞変性効果 (cytopathic effect : CPE) を図 4-14 のように確認した後、この培養液を遠心分離し、HSV が含まれた上澄みを回収し、HSV 浮遊液を得た。

HSV の定量は次のように行った。この際にも Vero 細胞を使い、HSV が感染することで発生する CPE を利用した定量法で測定を行った。まず HSV を含ん

だ溶液を2倍段階希釈した。次に、あらかじめ Vero 細胞が単層培養されたマイクロプレート (96 穴) に、段階希釈されたそれぞれの溶液を 50 μ l 接種し、37°C で1時間吸着させた。その後、希釈液を取り除き 1% FBS RPMI 1640 培地を 0.2 ml 入れ、CO₂ インキュベータ (37°C) 内で 48 時間培養した。培養後、CPE がどの希釈段階まで現れているのかを光学顕微鏡で観察した。本研究では、この操作を数回行い、全てにおいて CPE が現れる最終希釈段階を 100%組織培養感染価 (100% Tissue Culture Infectious Dose : TCID₁₀₀) として表した。TCID₁₀₀ は、活性を有する HSV 量が多ければ大きな値となり、逆に少ないと小さな値になる。

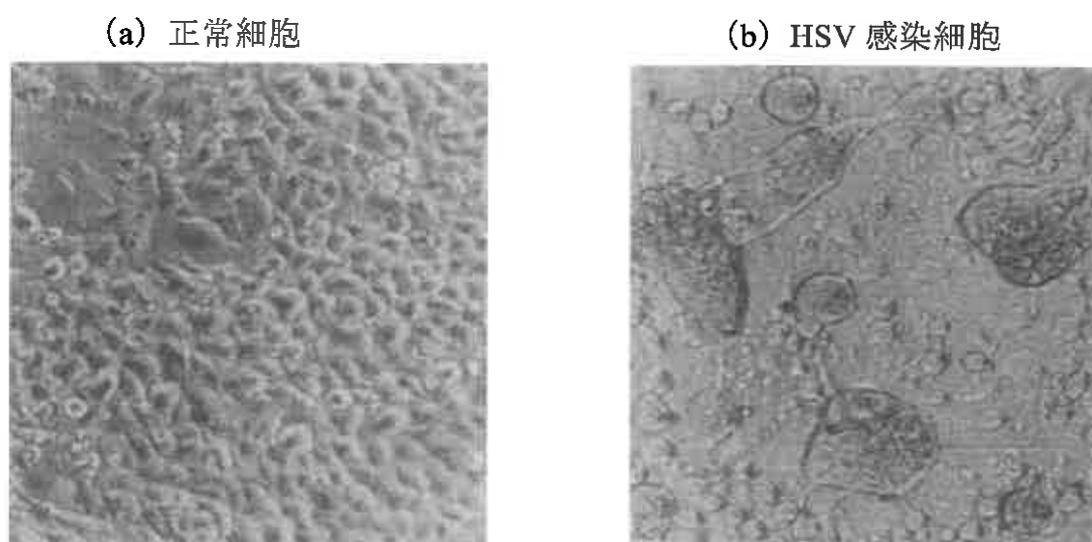


図 4-14 Vero 細胞に対する HSV の細胞変性効果 (CPE)

4.5 実験方法

4-1 節の抽出法を、HIV や肝炎ウイルスの検出に適用することを最終的な目的とし、本研究では、HSV を用いて基礎的な検討を行った。以下に、それらの方法について述べる。

4.5.1 電界効果を利用したウイルス遺伝子の抽出

大腸菌 O157 に対して有効性が示された前章の抽出法をウイルスに適用し、ウイルス遺伝子の抽出が可能かどうかを検討した。実験手順および装置は 4-1 節とほぼ同様である。まず 4.1.3 項のように培養された HSV を電気泳動用緩衝

液で適宜希釈し、HSV濃度が $5 \times 10^3 \sim 10^6$ TCID₁₀₀/mlの浮遊液を4 ml用意した。そのうちの3 mlだけ導電性中空糸膜を介してペリスタポンプで吸引（平均速度；約0.6 ml/min）し、浮遊液中のHSVを膜に捕捉（濃縮）した。続いて、その膜を、ウイルス溶解液（1% SDSと10 mM NaOHの混合溶液）に10秒間浸し、化学的にウイルス被膜（エンベロープおよびカプシド）を溶解した。その後、導電性中空糸膜をセルの抽出領域にセットして、膜が陰極になるように電界を印加し、同時にHSVを濃縮する際に膜を介して吸引した溶液を逆に押し出し、膜の中から負の電荷を持つHSV遺伝子を抽出した。ただし電界強度は2, 4 V/cm、印加時間は5, 10, 15分のいずれかを選択した。抽出後、導電性中空糸膜を陰極領域に移し、再び膜を陰極として強度2 V/cmの電界を10分間印加することで、遺伝子を濃縮した。ただし、前章では遺伝子を半透膜近傍の緩衝液に濃縮していたが、感度は10倍しか改善されなかったため、ここでは半透膜自体に遺伝子を捕捉させ（以後、遺伝子の濃縮と呼ぶ）、感度の向上を図った。その後、半透膜の一部を切り取り、それをPCR反応液の中に入れ、標的遺伝子の増幅を行った。PCR条件は3.5.3項で示したものと全く同様である。使用したプライマーは、UL41-52（5'-CG-GCCCTGCGTCTGGCGCATCTGTT-3'）とUL41-32（5'-CCTCCAGG-AGCAGCAGAAGCATAGG-3'）であり、これらによって525 bpの遺伝子断片が多量に得られた。最後に、ゲル電気泳動法によって分画し、遺伝子の抽出状況を視覚的に確認した。

4.5.2 導電性中空糸膜のウイルス濃縮効果

従来のウイルス濃度を高める操作（以後、ウイルス濃縮と呼ぶ）は、超遠心機によって数時間行われており、迅速性を欠いていた。導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は、最初にウイルスを捕捉する必要があるが、これを異なった観点から捕らえると、導電性中空糸膜にウイルスを濃縮していることになる。細菌と同じようにウイルスに対しても、浮遊液中のその全てを膜に濃縮することが可能ならば、従来法より遥かに迅速性に優れた画期的なウイルス濃縮法と言える。

そこで、図4-15に示すHSV濃縮操作前の浮遊液中のHSV含有量と、導電性

中空糸膜を介して吸引された溶液中の HSV 含有量を 4.4.3 項の方法で測定した。その後、両者の値を比較することで、導電性中空糸膜の HSV に対する濃縮効果を検討した。

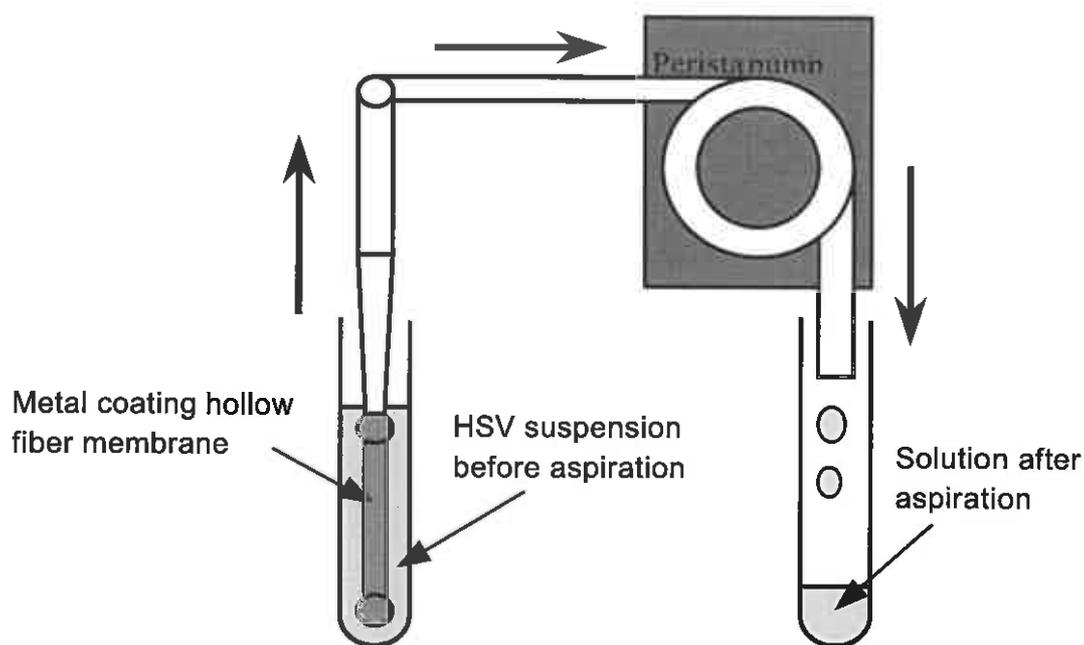


図 4-15 HSV に対する濃縮効果の確認装置

4.6 実験結果

電界効果を利用した遺伝子抽出法をウイルスに適用し、細菌と同様にその有効性が示されるかどうか、また導電性中空糸膜をウイルス濃縮基材として利用できるか否かを検討した。ウイルスを用いた検討は、前章の大腸菌 O157 の遺伝子抽出に基づくものであり、実験手順と装置は前章と全く同様である。ただしウイルスは、細菌と比べて大きさ、構造、遺伝子の長さなどが異なるため、改めて遺伝子の抽出条件を探った。

4.6.1 電気的および物理的抽出法の有効性

最初に、大腸菌 O157 のときと同様に、前章の方法によって HSV 遺伝子を導電性中空糸膜から取り出せるかどうかの基礎的な検討を行った。 5×10^4 および

10^5 TCID₁₀₀/ml の HSV 浮遊液を吸引した後、溶液 1.5 ml を押し出すと同時に、強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加した。その後、セルの陰極領域中の溶液 1.5 ml 中 5 μ l だけ PCR に用い、その中に遺伝子が含まれているかどうかを確認した。結果を図 4-17 (lane 2 および 3) に示す。この図のように、HSV 濃度が 5×10^5 TCID₁₀₀/ml である浮遊液を吸引したとき、492~615 bp の間に遺伝子バンドが認められた。本研究では、HSV 遺伝子の 525 bp の部位を PCR で増幅しているため、確認された遺伝子バンドは HSV の遺伝子断片であることがわかる。これより、大腸菌 O157 の遺伝子が抽出可能であった電界効果による遺伝子抽出法は、ウイルスに対しても適用できることをはじめて見出した。

遺伝子の抽出は、これまでと同様に、溶液を押し出す物理的手法と、電界を印加する電気的手法の両者で行われた。導電性中空糸膜に溶液を注入することで膜内の細菌が押し出されるという事実は、従来の導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌法に関する研究で確認されている。同様に、この抽出法で細菌の遺伝子を抽出する場合、電気的手法はもとより、溶液を押し出す物理的手法も、有効であるものと考えられる。一方、この抽出法はウイルス遺伝子をも

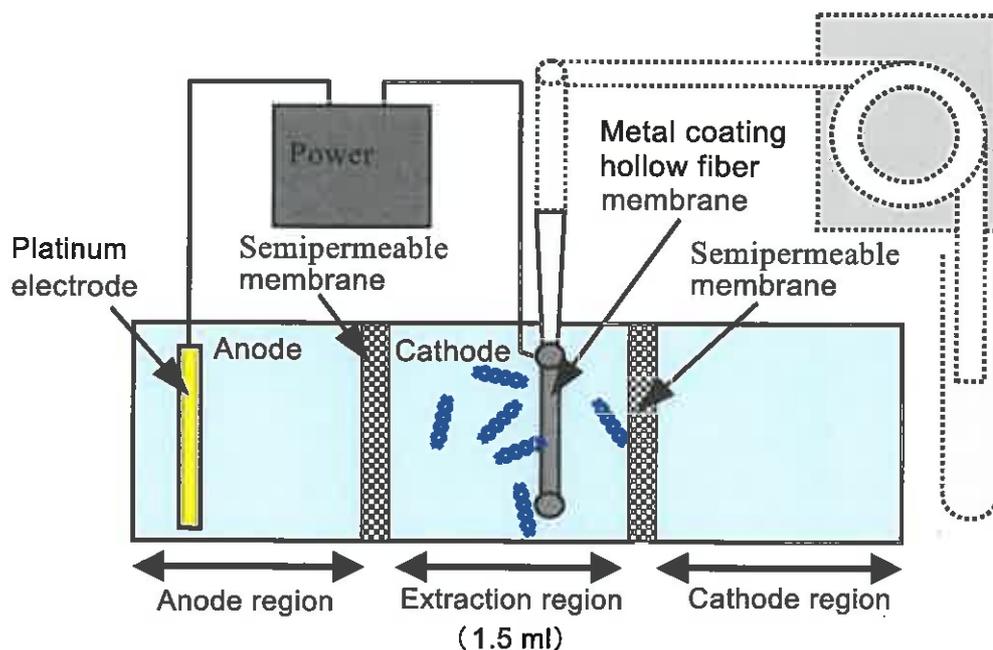
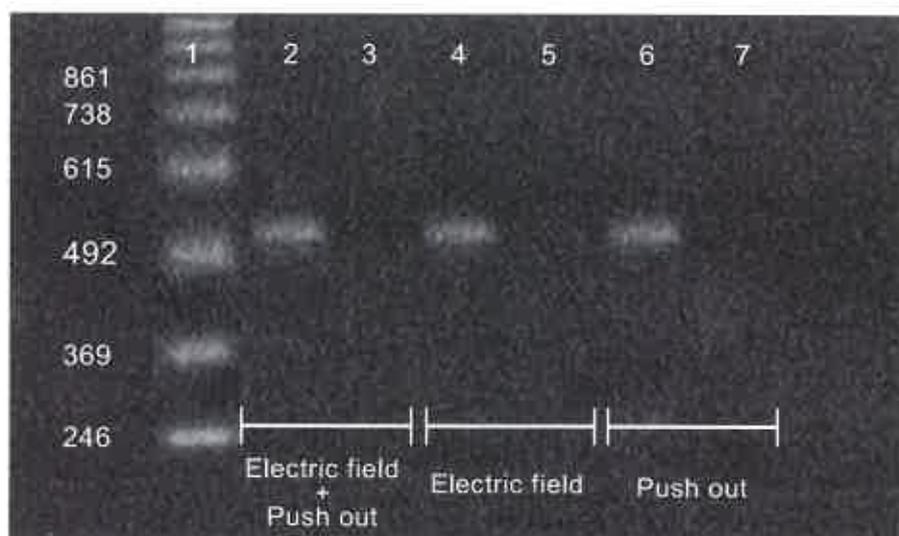


図 4-16 電氣的抽出法

抽出できることが判明したものの、ウイルスの大きさ、構造、遺伝子の長さなどが細菌と全く異なるため、物理的および電気的手法の両者の有効性を判断することは困難であった。そこで、これらを明らかにする以下の検討を行った。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2, 4, 6; 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3, 5, 7; 5×10^4 TCID₁₀₀/ml.

図 4-17 核酸の化学的抽出法

図 4-16 のように溶液の押し出しは行わず、2 V/cm の電界を 5 分間印加することによって、電気的に遺伝子を抽出した。図 4-17 の lane 4 および 5 のように、両者を利用した先の抽出法と変わらない 5×10^5 TCID₁₀₀/ml で遺伝子バンドが認められた。これより、電気的手法は、HSV 遺伝子の抽出において有効な手段であることが明確になった。

次いで、HSV の濃縮と溶解を前述のように行った後、電界を印加せずに、濃縮の際に膜を介して吸引した溶液を、セルの陰極領域に収まる量（約 1.5 ml）だけ図 4-18 に示すポンプによって押し出した。その結果が図 4-17 の lane 6 と 7 である。電気的に遺伝子を抽出したときと同じように、ウイルス濃度が 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の場合のみ、遺伝子バンドが認められた。この結果から、ポンプで溶液を押し出すことによって、導電性中空糸膜に濃縮した HSV の遺伝子が物理的に膜から抽出されることもわかった。

以上のように電気的手法あるいは物理的手法のどちらか一方で抽出した場合、ともに 5×10^5 TCID₁₀₀/ml まで抽出できたことから、それぞれ有効な抽出法であることが明らかになった。したがって、一桁以上の抽出感度の向上は認められないものの、両方を組み合わせた方が、どちらか一方で抽出するよりも有効で

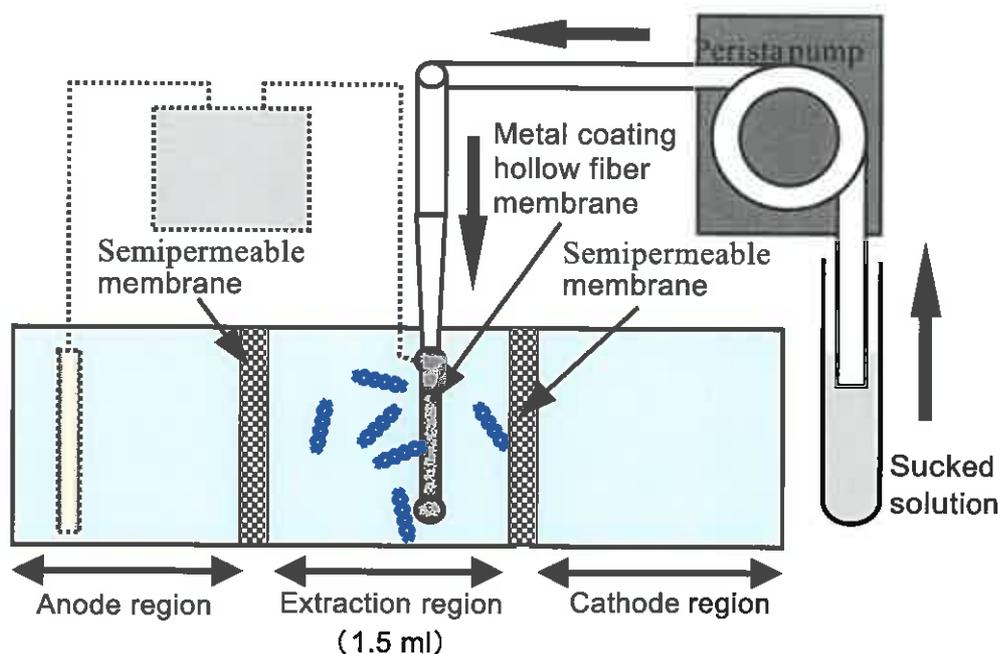


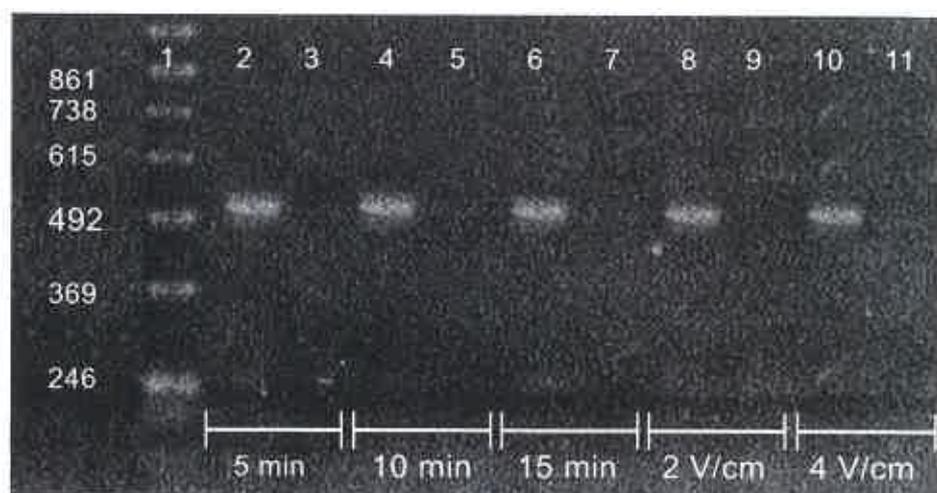
図 4-18 物理的抽出法

あると考えられ、以下の実験では、溶液を押し出すと同時に電界を印加することで遺伝子抽出を行った。

4.6.2 電界強度と印加時間の最適条件

前項の結果より、強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加することによって、 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の HSV 浮遊液を吸引した導電性中空糸膜から HSV 遺伝子が確実に抽出されることがわかった。そこで、電界強度 2 V/cm 、印加時間 5 分を基準として、遺伝子抽出の最適条件を検討した。まず、電界強度を 2 V/cm 一定とし、5 分の 2 倍あるいは 3 倍の値である 10、15 分間だけ電界を印加し、HSV 遺伝子の抽出を行った。その結果、図 4-19 の lane 2 から 7 のように、印加時間を 5、10、15 分と変化させても 5×10^5 TCID₁₀₀/ml までしか遺伝子は抽出されなかった。

次に、電界強度について検討するため、印加時間を5分間一定とし、2 V/cm またはその2倍の4 V/cmの電界を印加した。図4-19のlane 8から11のように、両者はともに 5×10^5 TCID₁₀₀/mlの場合のみ遺伝子の抽出が認められた。



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2, 4, 6, 8, 10;
 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3, 5, 7, 9, 11; 5×10^4
 TCID₁₀₀/ml, 2~7; 2 V/cm, 8~11; 5 min.

図4-19 遺伝子抽出の最適条件

以上のように電界強度2 V/cm、印加時間5分を基準とし、それよりも2倍あるいは3倍の時間、または電界強度でHSV遺伝子を抽出したが、抽出感度に顕著な差異は見られなかった。したがって、本抽出システムにおいて、最も効率良く遺伝子が抽出される電界強度および印加時間は、それぞれ2 V/cm、5分であることがわかった。

4.6.3 導電性中空糸膜のウイルス濃縮による遺伝子抽出

導電性中空糸膜のHSVに対する濃縮効果を調べるために、HSV浮遊液および膜を介して吸引された溶液中のHSV濃度を測定した。吸引前の浮遊液中のHSV濃度は、表4-1に示すように 5×10^6 TCID₁₀₀/mlであったのに対して、膜を介して吸引した後には1 TCID₁₀₀/ml未満となっていた。つまり、HSV浮遊液を導電性中空糸膜に通すことによって、浮遊液中のHSV全てが、膜の中に濃縮されることがわかった。つまり、従来法では扱う検体量が数十 μ lと非常に少ないため、血中のわずかなウイルスの検出は極めて困難であったが、導電性中空糸

膜のウイルス濃縮効果を利用することで、ウイルス密度を高め、わずかなウイルス量であっても検出可能な画期的手法であることが示された。

そこで、これまで遺伝子が抽出されなかった 5×10^4 TCID₁₀₀/ml の HSV 浮遊液を 10 倍量吸引し、膜内の HSV 量を 10 倍にすることで、 5×10^5 TCID₁₀₀/ml のときと同じように HSV 遺伝子が抽出されるかどうかを調べた。ただし、 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の HSV 浮遊液の吸引量は 1 ml、 5×10^4 TCID₁₀₀/ml の場合はその 10 倍量の 10 ml とした。また、電界強度および印加時間は前項の結果から 2 V/cm、5 分とした。これまでの浮遊液の吸引量が 3 ml であり、1 ml に減らしたことに

表 4-1 吸引前後の溶液中の HSV 濃度

ウイルス濃度 (TCID ₁₀₀ /ml)	
吸引前	5×10^6
吸引後	< 1



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2; 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3; 5×10^4 TCID₁₀₀/ml. (2 V/cm, 5min)

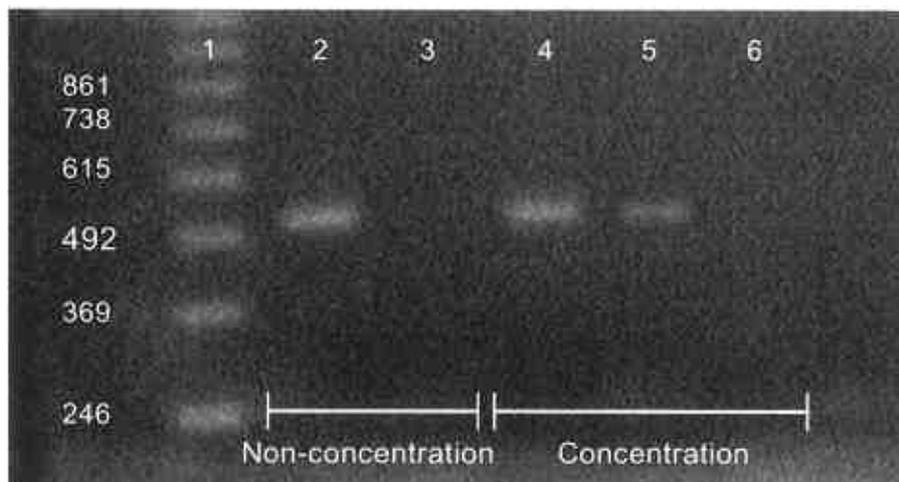
図 4-20 膜の濃縮効果を利用した遺伝子抽出

よって膜に濃縮される HSV の絶対量は 3 分の 1 に減少したものの、 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の場合、図 4-20 の lane 2 のように、HSV 遺伝子の抽出が認められた。次に、これまで抽出されなかった 5×10^4 TCID₁₀₀/ml の浮遊液を 10 ml 吸引し、HSV 遺伝子の抽出を試みた結果、図 4-20 の lane 3 のように遺伝子バンドが確認

された。これは、 5×10^5 TCID₁₀₀/ml の浮遊液を 1 ml 吸引したときと同じように、膜に 5×10^5 TCID₁₀₀ の HSV が濃縮されたことを示している。この結果から、導電性中空糸膜は、遺伝子抽出とウイルス濃縮という 2 つの機能を兼ね備えた全く新しい基材であると言える。

4.6.4 抽出後の遺伝子濃縮の効果

前項まで、抽出後、遺伝子の濃縮操作を行わず、陰極領域の溶液 1.5 ml のうち 5 μ l を PCR に使用していた。前章の大腸菌 O157 の場合、抽出の後に付加された遺伝子濃縮操作は、感度の向上をもたらした。HSV についても、その操作による遺伝子の濃縮効果を確認した。前章の結果を参考にすると、半透膜近傍の緩衝液に遺伝子を濃縮したとき、感度は 10 倍程度しか改善されなかったこと



Lanes: 1;Molecular size marker (bp), 2, 4; 5×10^5 TCID₁₀₀/ml, 3, 5; 5×10^4 TCID₁₀₀/ml, 6; 5×10^3 TCID₁₀₀/ml. (2 V/cm, 10min)

図 4-21 抽出後の HSV 遺伝子の濃縮効果

から、ここでは 4.2.1 項で述べたように、半透膜自体に遺伝子を捕捉（濃縮）させ、それをサンプルとした。

HSV の濃縮と溶解を先と同様に行った後、抽出領域に導電性中空糸膜をセットした。次に導電性中空糸膜を陰極として、強度 2 V/cm の電界を 5 分間印加し、電氣的に導電性中空糸膜から遺伝子を抽出した。ただし、抽出領域には、グリ

セリンが1%添加された電気泳動用緩衝液（1.5 ml）を用いたため、溶液を押し出す物理的な抽出操作は行わなかった。その後、導電性中空糸膜を陰極領域に移し、強度 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで、抽出領域に存在する遺伝子を陽極側の半透膜表面に濃縮した。最後に、半透膜の一部分を切り取り、それを PCR 反応液の中に入れ、標的遺伝子の増幅を行った。

その結果、図 4-21 のように 5×10^5 TCID₁₀₀/ml、さらにこれまで抽出されなかった 5×10^4 TCID₁₀₀/ml においても遺伝子バンドが認められた。このように、濃縮を行わなかったときに比べて感度は 10 倍ほど改善された。したがって、ウイルス遺伝子に対しても、抽出後の遺伝子濃縮は有効であることが明確となった。

4.7 検討

遺伝子と導電性中空糸膜の間に働く静電力を利用した抽出法は、細菌ばかりでなくウイルス遺伝子の抽出にも適用可能であることが示された。さらに、数時間の超遠心によるこれまでのウイルス濃縮を、導電性中空糸膜によって簡単かつ迅速に行えることがわかった。導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出の最大の特長は、このウイルス濃縮であり、以下にそれらについて検討する。

4.7.1 遺伝子の抽出条件に関する検討

電界効果を利用した抽出法を HSV に適用し、再度、遺伝子の抽出条件を検討した。前章の大腸菌 O157 の場合、最も感度が高かった電界強度と印加時間は、それぞれ 2 V/cm、10 分であった。一方、HSV では 2 V/cm、5 分となった。両者の抽出条件を比べると、電界強度はともに 2 V/cm であるが、印加時間は HSV の方が短い結果となった。この相違は、両者の DNA（遺伝子）のサイズに関係しているものと考えられる。3.4.2 項で述べたように、HSV および大腸菌の DNA サイズは、それぞれ 1.7×10^5 bp（約 57.8 μ m）、 4×10^6 bp（約 1.36 mm）程度であり、HSV の DNA の方が一桁以上小さいことがわかる。導電性中空糸膜は非常に小さなポアが形成されており、膜に電界が印加されたとき、DNA は、3.5.4 項で示したゲル電気泳動時のように、そのポア中を通過してこなければならない。この抽出法によって DNA が断裂せず、そのままの形で抽出された場合、サ

イズの小さい HSV の DNA の方が、そのポア内を速く移動する。したがって、HSV 遺伝子を抽出するときの方が電界印加時間は短く、また 5 分以上加えても多くの DNA は 5 分で抽出されるため感度が変わらないものと推測される。以上のことより、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は、強度 2 V/cm の電界を 5 分または 10 分間印加することで、ウイルス・細菌を問わず遺伝子の抽出が可能である。

4.7.2 ウイルス濃縮を含めた従来の化学的抽出法との比較

ウイルスは、細菌と比べて大きさ、質量が非常に小さいため、細菌のように比較的安価で入手しやすい低速遠心（数千 rpm）によって、それを濃縮することができない。したがって、一般的にウイルス濃縮は高価な超遠心（数万 rpm）によって、数時間行われる。さらに、一度に取り扱う検体の量と数にも制限がある。それに対して、導電性中空糸膜によるウイルス濃縮は、非常に短時間で効率良く行うことができる。本研究では、ウイルス浮遊液の濃縮速度を約 0.6 ml/min とし、3 ml を 5 分で吸引（ウイルス濃縮）したが、これはポンプの吸引速度に依存する。そのため、ポンプによって濃縮時間を変更することができ、さらなる時間短縮も可能である。また、4.5.2 項からわかるように、導電性中空糸膜には HSV を少なくとも 10^7 個まで濃縮できるため、ウイルス濃縮量がその値に達するまで検体の吸引が可能であり、検体量を多く扱うことができる。すなわち 4.6.3 項で示されたように、検体量を多く扱うことで、より多くのウイルスが導電性中空糸膜に濃縮され、それが検出感度の向上につながる。一度感染すると体内からの排除が困難である HIV や肝炎ウイルスによる感染症は、輸血や血液製剤の接種が主な感染様式であることから、検体をこの手法により検査することで微量のそれらの混入も見逃さずに検出できる。したがって、より安全な輸血や血液製剤の提供が可能となり、飛躍的にそれらからの感染を防止でき、世界的な流行を抑止するものと考えられる。

以上のウイルス濃縮工程を含めて従来の化学的抽出法（インスタジーン法）と比較すると、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出は、所要時間が 1/4 であり、工程も 4 つ少ない 4 工程で行われ、非常に迅速で簡便な全く新しいウイルス濃

縮・遺伝子抽出法であることがわかる。しかし、その感度は、導電性中空糸膜のウイルス濃縮を利用しない場合、4.6.4項のように 5×10^4 TCID₁₀₀/mlと、目標の抽出感度 (10^2 TCID₁₀₀/ml) より二桁ほど小さい。そこで、本章で用いた2つのプライマーによるPCR増幅の検出限界を調べたところ、 10^4 TCID₁₀₀/mlであった。つまり、HSV濃度が 10^4 TCID₁₀₀/mlより低い場合、遺伝子がたとえ抽出されていても、PCRによってHSV遺伝子を検出(増幅)することはできないということが判明した。これを考慮すると、PCR限界まで遺伝子抽出が認められており、本抽出は感度も優れていることがわかる。なお、PCRの感度は、標的遺伝子の増幅部位、長さを決めるプライマーに依存するものであり、プライマーの検討によって、さらなる感度向上が期待できる。

第5章

導電性中空糸膜電極を用いた「電気化学」法 による生体内の糖検出

病原性微生物によって感染を引き起こすには、生体細胞表皮の糖鎖が関係しているといわれている。前章までは、感染した後の診断方法についての検討であったが、本章からは、感染をつかさどる糖に着目し、導電性中空糸膜を用いてその糖を分析するための検討を行った。第3章では導電性中空糸膜に「直流通電」させることで遺伝子の抽出を行い、第4章では「電界効果」を用いて遺伝子診断の可能性を模索した。本章では導電性中空糸膜を「電気化学」的手法を用いて高速液体クロマトグラフィ(HPLC)の検出電極として生体内の糖の検出に応用することをはじめて試みた。糖は、紫外線の吸収や発色基を持たないために、高感度な検出を必要とする場合は誘導化させる必要があった。しかし、強アルカリ条件下で導電性中空糸膜を酸化還元電極として用いると糖を直接検出できる全く新しい方法を見出した。したがって、この導電性中空糸膜電極の基本性能を本章で確認し生体内の糖検出の可能性を検討した。

5.1 病原性微生物の糖鎖受容^{[20]~[22],[25],[34]}

第3章および第4章までは、病原性微生物に感染したことを想定して迅速に診断するための手段および方法について導電性中空糸膜電極を用いて検討を行ってきた。これに対して本章からは、2.1節で述べたように感染症と深い係わり合いを持っている糖鎖を解明することで、感染症を未然に防御することや治療に役立つ糖を検出することを目的として導電性中空糸膜の応用検討を行った。具体的な検出は5.4節以降に示すが、ここでは糖検出の背景や概念などについて述べる。

微生物の感染の第一段階は、その微生物が宿主の細胞表皮にある受容体に接着することである。細菌では、主として線毛を介して宿主の表皮細胞に接着することにはじまり、コロニー形成を経て毒素が放出される。この毒素もまた宿主の標的細胞に特異的に接着し感染症が開始される。昨今の研究の成果から、この接着に関与する細胞上の受容体のいくつかは糖鎖であることが明らかになってきた。細胞にはさまざまな糖鎖が存在するが、その構造は糖タンパク質、プロテオグリカンあるいは糖脂質のどれに由来するかによって異なってくる。

微生物と細胞の結合に関する研究の最終目的は、微生物感染の予防にあり、糖が部分的にその役割を担うとすれば、医薬という新たな効果が期待される。特に免疫学的において細胞表面に影響を与える糖を検出することは極めて重要なことである。

5.1.1 病原性微生物の生体防御^{[20]~[22],[34]}

細菌やウイルスなどの微生物の感染に対し、宿主は多様な生体反応により感染防御を行っている。感染症が発生するには、原因となる微生物の存在、生体の感染しやすい部位の存在、感染を発生させるに十分な微生物量、感染経路の成立など、すべての条件が満たされることが必要である。感染を防御するためには、これらの諸条件のうち少なくとも一つを満たさないようにすることである。生体内の防御機構は、白血球やマクロファージなどの食細胞あるいはナチュラルキラー(NK)細胞やナチュラルキラーT(NKT)細胞などが関与する免疫機構やこれらを調整するインターフェロンなどのサイトカインが深い関わりをも

って感染防御にあたっている。

一般的に病原性微生物などによる感染症には、化学療法剤や抗生物質があり、これらが極めて有効な働きをしている。しかしながら、宿主が免疫不全状態になった場合、しばしば日和見感染が起こってくる。このような場合には、抗生物質の効果が出にくく、また、耐性菌が出現した場合も治療に困難をきたすことが多々ある。特に毎年、院内感染による患者死亡のトラブルは、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* : MRSA)によるもので、抗生物質だけでは、ほとんど効果が少なく自己免疫能力を高めることや対処療法をし続けることでしか処置できず 100%の回復を期待することができない。

昨今、これらの免疫系の機能を高めるための「補剤」として漢方が用いられるようになってきた。漢方でいう補剤とは、「気」を補う漢方薬で、「気」とは身体のエネルギー源を意味し、生体に活力を与える作用を持っている。気力の衰え、全身倦怠感、食欲不振、体力低下、眼精疲労、風邪を引きやすいなどさまざまな「気の低下」(東洋医学では気虚という)を伴う場合、漢方薬を補剤として服用することによって、正常に復することが可能になる。また、抗生物質と漢方薬を併用させることや漢方薬単剤で細菌感染症を治療するという試みがなされている^[116]。

たとえば、MRSA 感染症患者に対して抗生物質「バンコマイシン」を当初使用したが、十分な効果が得られず便からの MRSA の排出が続いていた。このため、漢方薬「補中益気湯」を投与したところ 2 週間後に MRSA が減少し、20 週目には完全に排出されなくなった^[117]。また、補中益気湯と同じ補剤である十全大補湯を各種抗生物質投与によっても効果がなかった MRSA 感染症患者に投与し、4 ヶ月後に MRSA を陰性化させたとの報告がある^[118]。

5.1.2 感染症に対する漢方療法^[20]

古来より感染症の治療に漢方薬が用いられてきた。約 1,800 年前に張仲景が著したとされる中国の最も体系だった最古の医書「傷寒論」には、急性感染症の治療について詳しく述べられている。この漢方製剤は、すべて経験から体系

付けられたもので今日でもなお用いられている処方である。また、最近になって漢方薬の作用機構について西洋医学的な手法を用いて解明しようと試みられてきた。その結果、多くの感染症に効果のあるとされている漢方薬は、直接の抗微生物作用に加えて宿主の防御能力を活性化させることによって効果を発揮していることがわかってきた。

たとえば、インフルエンザウイルス(*Influenza virus*)については、葛根湯、麻黄湯などが用いられている。また、HSV(*Herpes simplex virus*)に対して柴朴湯、安中散、十味敗毒湯、柴胡桂枝湯および十全大補湯など27種類の漢方薬の生物活性および有効性を検討している。さらに、葛根湯などの7種類の構成生薬についても抗HSV効果を同時に評価している。その結果、*in vitro*の抗ウイルス活性実験では、いずれも効果が認められなかったとされるが、別の臨床試験では、遅延型過敏反応が増強されることで単純ヘルペスウイルスに対する防衛効果が確認されている。

漢方薬によって、生体の感染防御能力を強化させることは、感染症の予防や治療に応用することは古くて新しい方法である。抗生物質の無かった時代には、漢方薬を使っていたのであるが、抗生物質が出現するようになってからは、切れ味のよい抗生物質が主流に使用されるようになったのは当然といえる。しかし、薬剤耐性菌による問題は、西洋医学では解決されておらず漢方薬の生体防衛能力増強効果をうまく利用することにより、これらも有効に治療できるものと考えている。

漢方薬の生体防衛能力に対する影響についての研究は、わずかな感染症についてしか検討されておらず、また、使われた漢方方剤も極限られたものになっている。また、これら漢方薬を中心とする東洋医学の研究者の広がりや増加の傾向にあるもののまだまだ一部でしかない。さらには、漢方薬のどの成分がどのように効いているのかが経験則でしか解っていないことによるもどかしさもある。

近年、漢方薬の生体に対する影響効果は、糖鎖であることがわかってきた。しかし、漢方自身に含まれている糖を検出することができても体内に投与されるとその糖成分は、さらに微量なものとなるため、これ生体中の微量糖が分析

できる検出器が望まれている。通常、製剤を投与した際のドラッグデリバリーシステム(Drug delivery system : DDS)では、実際の病巣部に到達するのは、わずか0.1~1.0%といわれている。つまり、残りの99.0~99.9%は、治療に寄与しないのである。したがって、漢方方剤の生薬に含まれる糖成分が、体内でどのように影響を及ぼしているのかを解明する上で、DDS上の微量糖を検出することは、極めて重要になってくる。

5.1.3 糖類の細菌阻止機能^[34]

細菌の付着に関して、糖が選択的な妨害効果を示す例を図5-1(a),(b)に示す。この大腸菌は、P型糖脂質と結合するレクチンを持っている。この細菌を何も施さずに培養した場合、大腸菌は依然として内皮細胞に付着しているところを示すのが(a)の写真である。ところがP型糖脂質の糖成分を外したものをいっしょに入れて培養すると、これがレクチンと結合して細菌が細胞に付着するのを阻止している写真が(b)である。このように糖の活用によっては、感染症の予防や治療に効果が現れている。

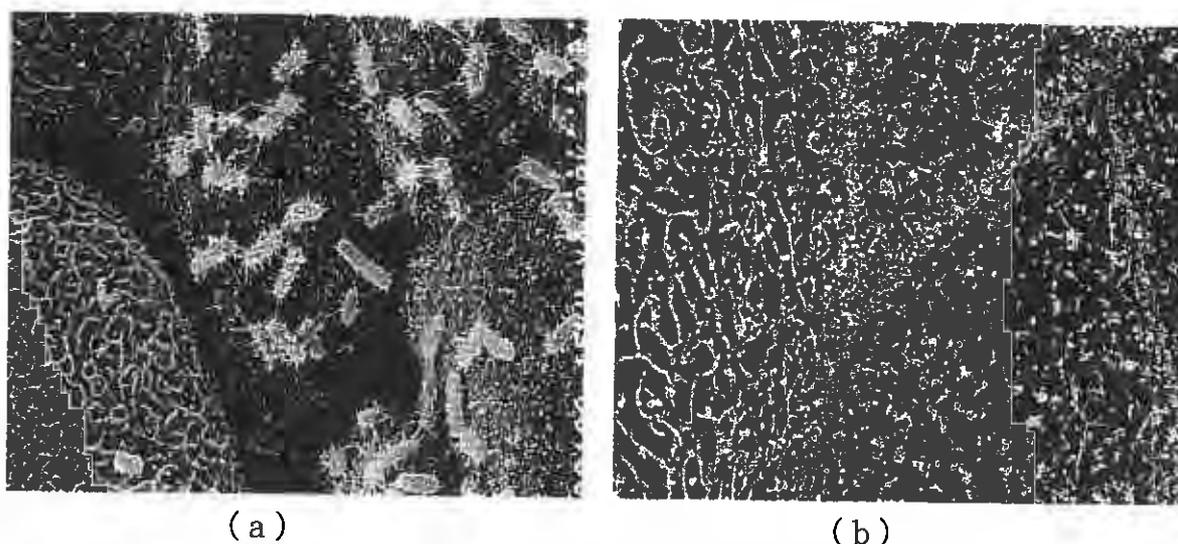


図5-1 細菌の付着を防ぐ糖鎖

5.2 糖類の電気化学検出^{[102],[103]}

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いた糖類の測定で最も高感度とされるのが、被検出物質を酸化還元反応させることで検出する電気化学検出法である。この方法は、電極を溶液に入れて電位を測定する二つの電極を用いて、2点の電位を測定しなければならない。ここで測定する電極を作用電極(Working electrode)と呼ぶが、その電極にもう一つの電極を繋いで電位差を測定する。電位差を測定するときの最も簡略なモデルを図5-2(a)に示す。この状態でセル電圧 V が起電力 E に等しくなるためには、電流 $i = 0$ の条件(平衡系)が成立する必要がある。このとき、もう一つの電極として電位が安定な電極を選んで用いるが、これはセルの電流が $i = 0$ となるため、この電極は参照電極(Reference electrode)と呼ばれる。この時、作用電極と参照電極間の正味の電流はほとんど無視できる平衡状態で電位差を測定する。この電位差は電極間の起電力(Electromotive force)に相当する。

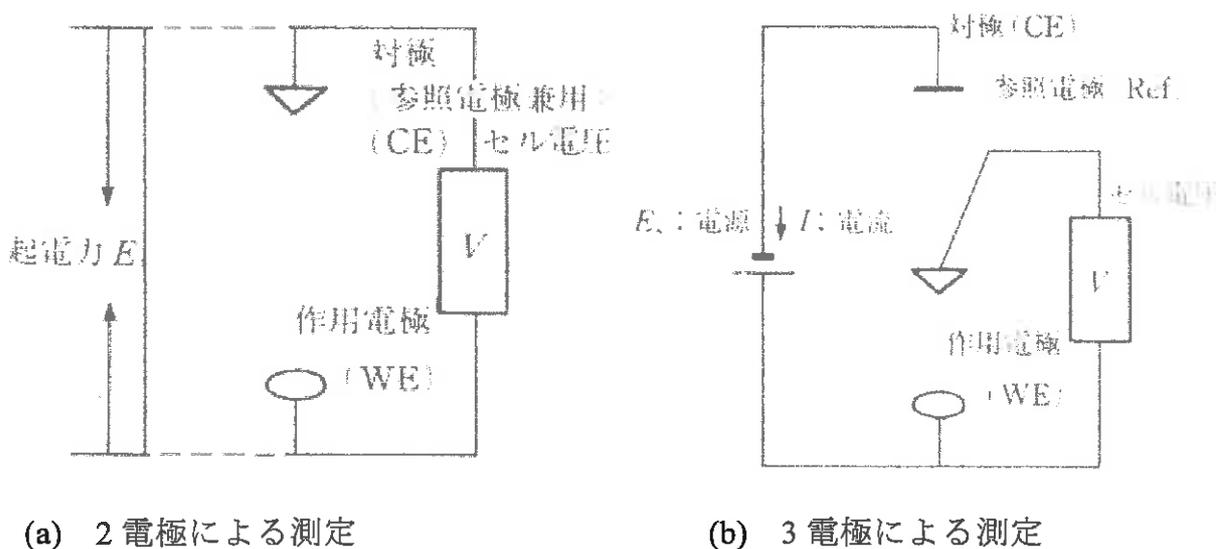


図 5-2 電気化学測定の電位測定原理図

電極間に外部から電圧を加えるような場合は、電極間すなわちセルの電位降下が生じ、参照電極電位が平衡値からずれてしまう。この誤差を避けるために電気化学測定では、三電極系の測定がよく使われている。図5-2(b)に三電極系の

模式図を示すが、セル電流は作用電極と対極の間に流れ、作用電極と参照電極の間はほとんど流れない。したがって、作用電極と参照電極間の電位差が電極反応によって流れる電流値に関係なく正確に測定できる。本実験においても設定電位を決定した後に電流を検出するが、この三電極測定法を用いている。

5.2.1 酸化還元による電子の授受^{[92],[94]}

図 5-3 に糖を検出するにあたっての電極界面の概念図を示した。電極と電解液の界面は、極めて特殊な場となっている。たとえば、正極付近の電解液なら過剰な陰イオン分布している範囲をいう。計算式は省くが、0.1Mの電解液ならば約10Åつまり1nm(10^{-9} m)になり、ざっとH₂O分子3個分の距離に相当する。この部分に電気二重層があり酸化還元反応に必要な電子の授受が起こりうる距離とされている。

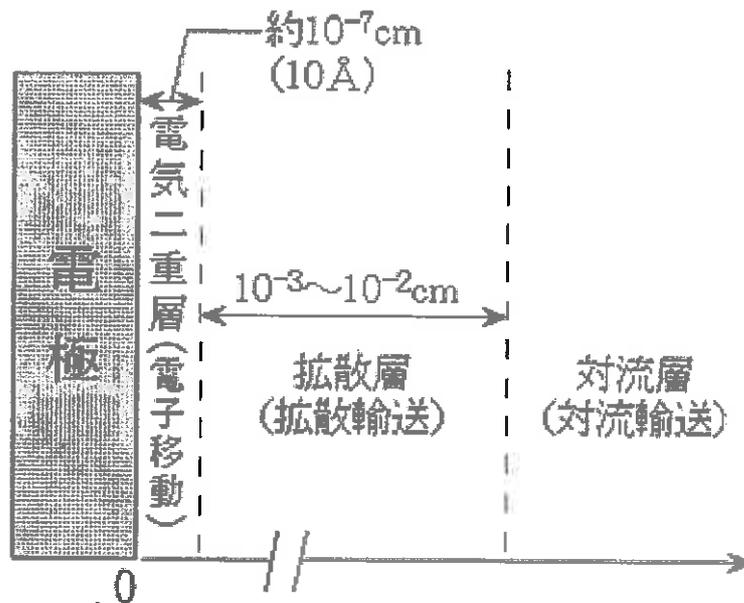


図 5-3 電極界面上の電気二重層構造

次に物質の拡散輸送の進む拡散層がある。反応が開始し、でき始めの拡散層は薄いですが、電解の進みと共に厚みを増してゆく。一方、電解液の本体(バルク)中には、温度の不均一などが原因になって大なり小なり対流が起こっている。したがって 10^{-2} cm の領域は、対流によって攪拌されているので対流層という。

5.2.2 単糖類の構造式^[113]

単糖の構造を図 5-4 に示す。図のように糖分子上の水酸基を酸化還元反応によって検出することを 5.3.3 項で述べる。

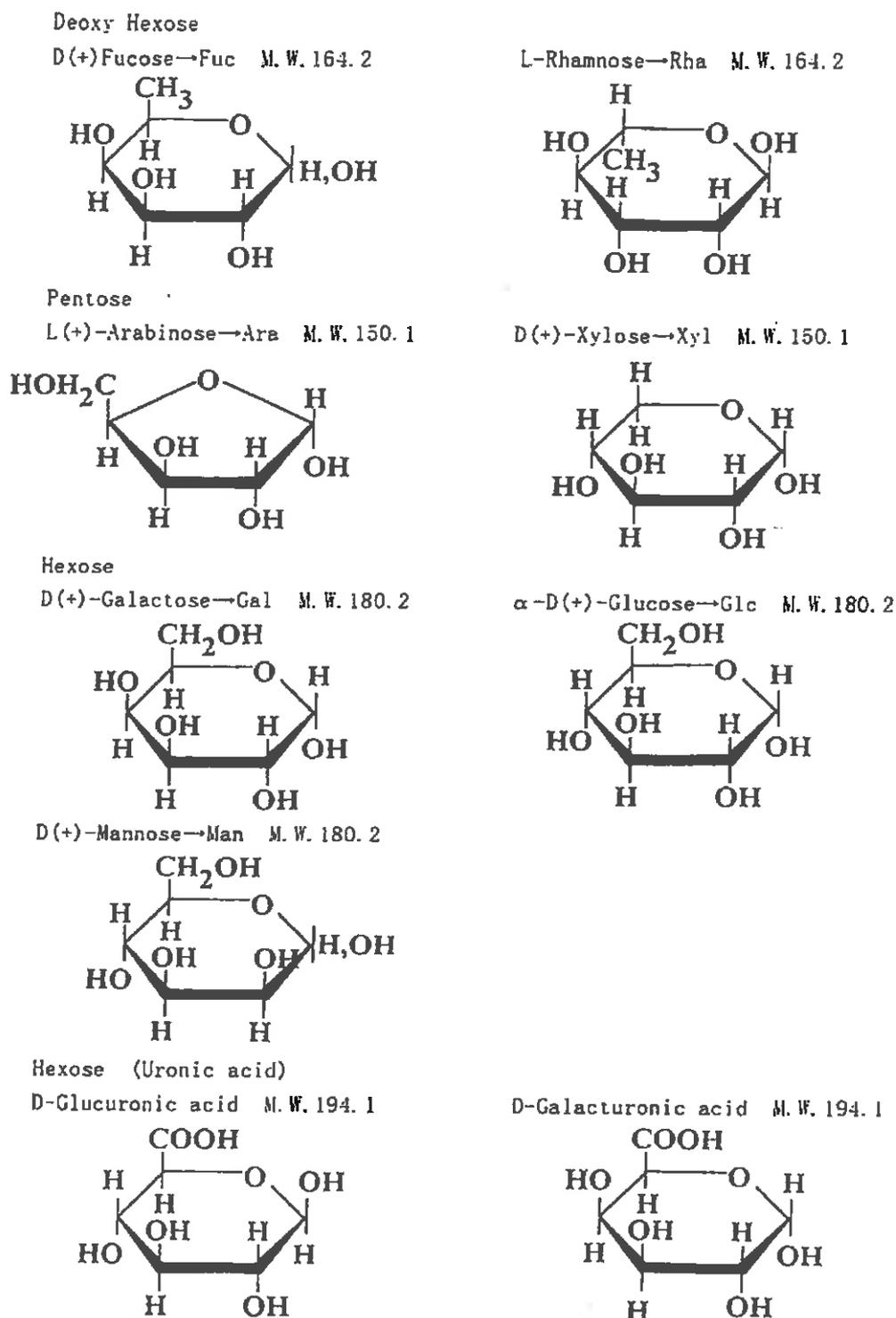


図 5-4 単糖の構造

5.2.3 糖検出のメカニズム

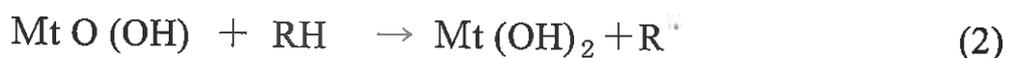
中性糖類の酸解離定数 pKa 値は, 表 5-1 に示すように 12~13 の間にあり高い pH では陰イオンの形にできることから強アルカリ条件下で検出が可能となる [99].

表 5-1 中性糖類の pKa 値

sugar	pKa
Galactose	12.39
Glucose	12.28
Xylose	12.15
Mannose	12.08
Fructose	12.03

Dissociation constants of some common carbohydrates (in water at 25°C)

金属(Mt)電極はアルカリ性溶液中で $Mt(II)(OH)_2$ となるが, 印加電圧をかけることにより酸化され三価の $Mt(III)OOH$ となる. ここで, グルコース (糖分子:RH) が移動相とともに流れてきた時, 糖の共存下で電気化学的な触媒作用が働き, 糖のヒドロキシル基の酸化と金属の酸化物の還元反応が生じることが知られている⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾. この反応は糖のラジカル形成を経由するために, 1個のヒドロキシル基が酸化される時2個の $Mt(II)(OH)_2$ を生成する2電子反応として検出される. 以上の反応式を(1)~(3)に, その概念図を図 5-5 に示す.



本実験におけるピーク電流値は、上記の一連の反応のあとで、二価の金属酸化物が活性な三価になる時の電流値を示している。これらの反応で $Mt(OH)_2$ は、糖 1 分子から 2 つ生成されることになるので、ピーク面積からクーロン量を算出する際には配慮が必要である。

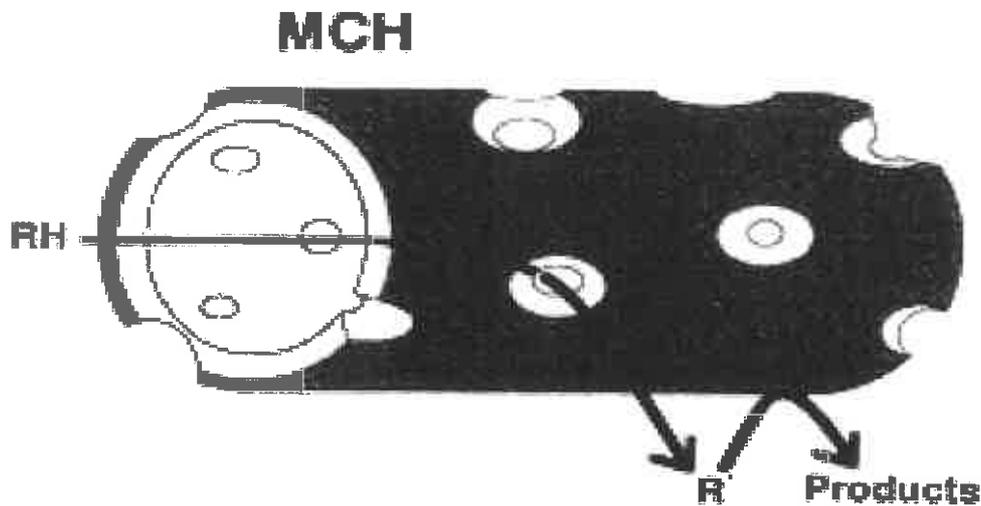


図 5-5 酸化還元反応概念図

電極上での糖の酸化メカニズムを図 5-6 に示す。グルコース 1 分子が電極上で完全に酸化されると 12 個の電子と 6 個の水酸基を消費し 6 個の蟻酸を生成することがわかる^{[111],[112]}。

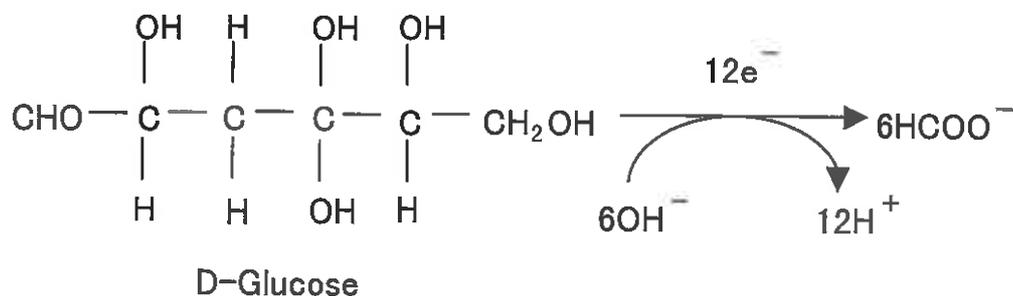


図 5-6 糖の酸化メカニズム

5.3 糖類の検出

5.3.1 導電性中空糸膜を用いた糖検出電極の構造

本研究で使用した導電性中空糸膜は、ポリプロピレン製でアクゾ社 S6/2 タイプ（外径 1.6 mm, 内径 1.0mm）を用いた。膜の形状は円筒状でポリプロピレン層と金属層（表面から数十 μm の厚さ）から成っている。実験では、この導電性中空糸膜を図 5-7 のようにモジュール化して使用した。また、その写真を図 5-8 に示す。電極に移動相を導入する際のテフロンチューブの内径は、0.5 mm とした。

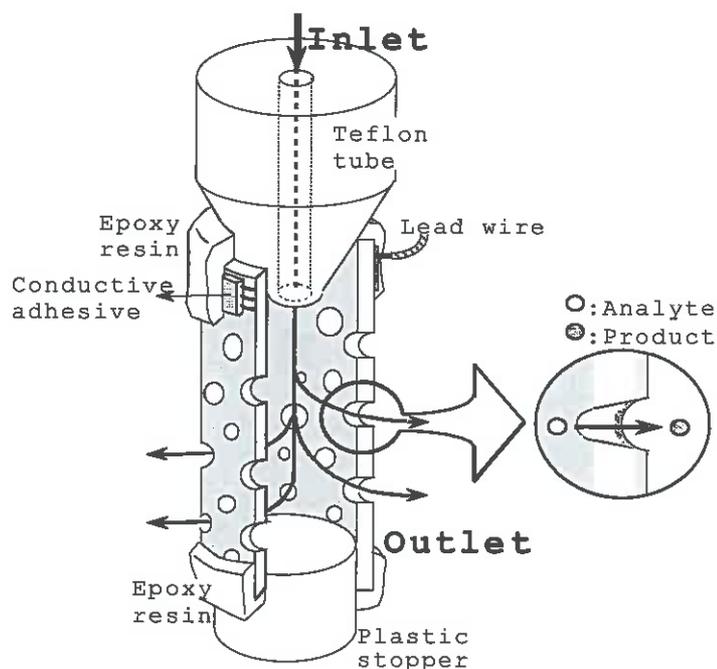


図 5-7 導電性中空糸膜電極モジュール



図 5-8 導電性中空糸膜電極モジュール写真

5.3.2 導電性中空糸膜電極を用いたフローセルの構造

5.2節に示した3電極法の原理を用いて、作用電極に導電性中空糸膜電極，参照電極に銀/塩化銀電極，対極は白金コイルを使用して糖検出のフローセルを製作した．図5-9に原理図を示し，その写真を図5-10に示す．

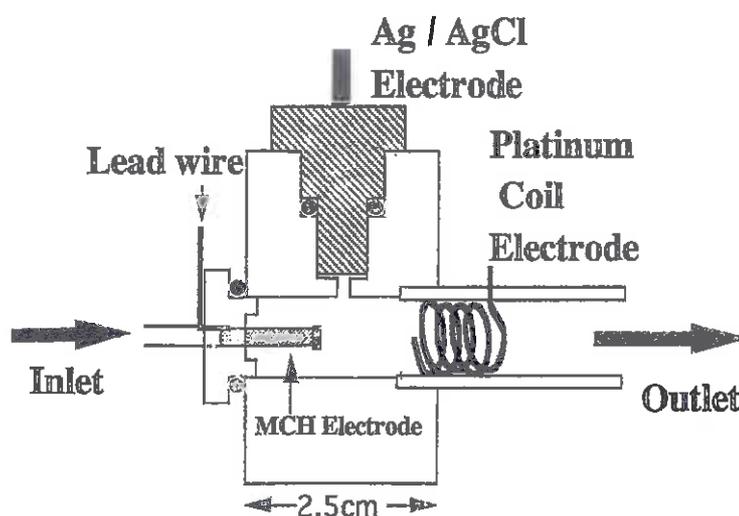


図 5-9 フローセルの原理図

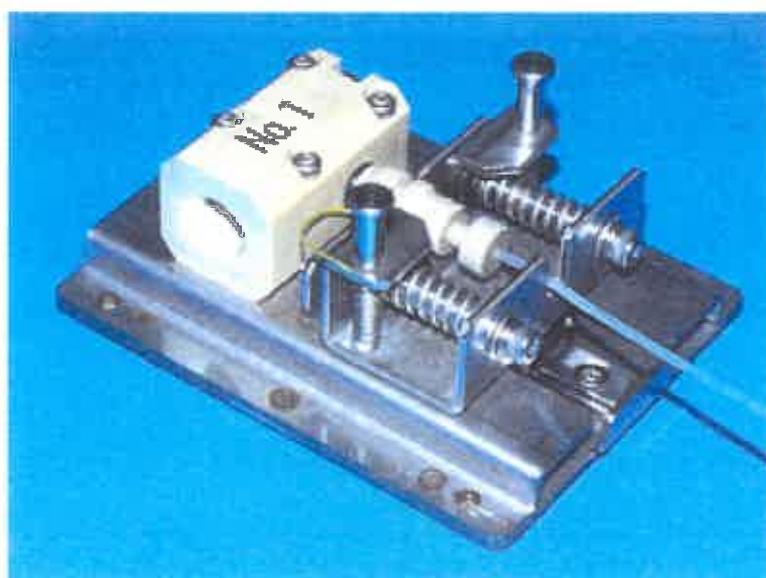


図 5-10 フローセルの外観写真

5.4 サイクリックボルタンメトリ [92]-[95], [106]-[108]

5.4.1 基本原理

電極電位をある範囲で自動的に往復させると、その範囲に電極反応の標準電位(Standard potential of an electrode reaction)をもつ酸化還元対の反応電流が測定でき多くの情報が得られる。このような測定をサイクリックボルタンメトリ(Cyclic voltammetry : CV)という(cyclic=繰り返し, volt=電位, am=電流, -metry=測定)。CV は多くの電気化学測定法の中で、電極表面あるいは電極表面近傍でどのような反応が起こっているかを最も直感的に把握できる方法の一つである。したがって CV は電気化学的に活性なレドックス化学種の電極反応の“初期診断法”として有用であり、他の電気化学的測定法と組み合わせて用いられている。ここで得られる電流-電位曲線をサイクリックボルタモグラム(Cyclic voltammogram)と呼ぶ。

図 5-11 に示す三角波の電位掃引に対して得られたサイクリックボルタモグラムを図 5-12 に示す。この図は、静止溶液中において、静止電極を用いた可逆でなおかつ単純な電極反応をさせた場合である。この電位波形は、参照電極に対して作用電極へ印加される電位を示す。初期電位 E_i (ここでは 0.3V)を通常ファ

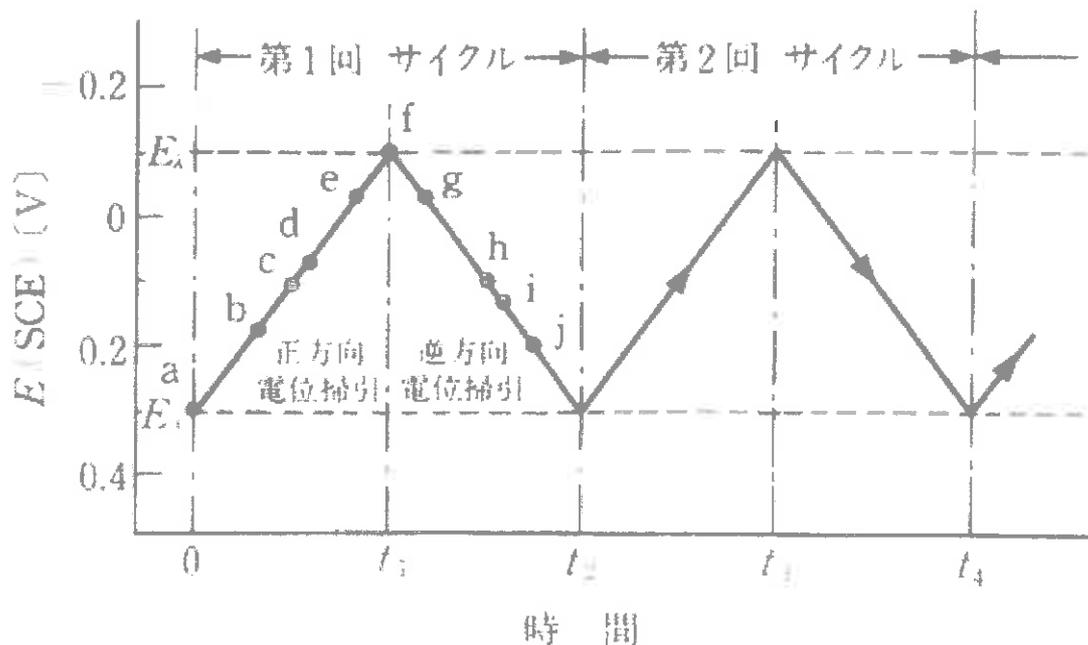


図 5-11 サイクリックボルタンメトリにおける電位掃引モード

ラダー電流が流れない電位に設定し、時間に比例した電位の掃引を行い、ある電位(反転電位 E_{λ} 、ここでは-0.1V)電位掃引方向を反転させ、順方向と同じ電位掃引速度で電位を掃引し E_i に戻る。

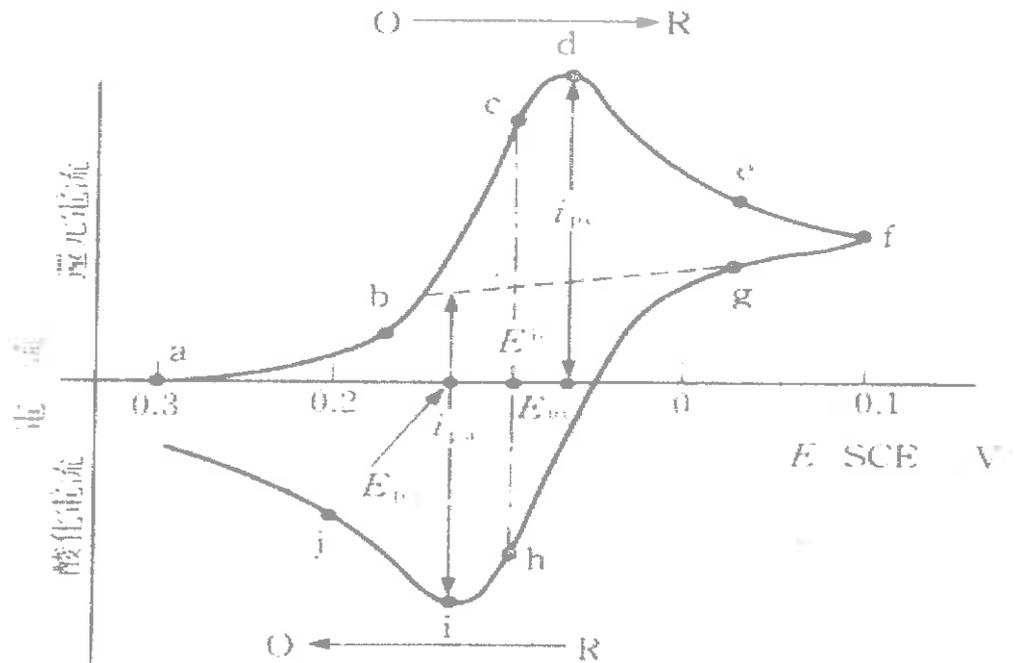


図 5-12 電位掃引モードによるサイクリックボルタモグラム

反転電位 E_{λ} の値は、調べようとする酸化還元反応が観察されるポイントを数度の掃引を繰り返して決める。得られた電流波形は、上が酸化電流で下が還元電流である。サイクリックボルタモグラム上の原理は、電極の電位を正に掃引していくとある電位から電極に電子を渡す酸化反応が始まり、酸化電流(アノード電流)が流れる。酸化反応が進むにつれて、界面の濃度は下がってくるので、電流はピークを通ったあと減り始めほぼ一定値となり、界面では酸化生成物が増えている。そのため電位を負の方向に折り返すと還元が起こり、還元電流(カソード電流)が流れる。この還元電流も酸化電流と同じようにピークを持っている。サイクリックボルタモグラムの形状は、電解反応それぞれの特性で変わってくる。特に、1分子が授受する電子の数、電極と電子をやり取りする速さ、分子の拡散しやすさなどがボルタモグラムの形に大きく影響する。

5.4.2 導電性中空糸膜電極のサイクリックボルタモグラム

サイクリックボルタモグラムの測定は、電極電位を一定速度で変化させながら電極上で起こる電気化学的な反応を電流としてとらえるもので、実験装置を図5-13に示す。試薬のグルコースは、和光純薬株式会社特級を用い、ポテンシオスタットに扶桑製 HECS 311B15-01 型、ポテンシャルスイーパーに扶桑製 HECS 321B 型、XY レコーダは理化電子製 PW-21、作用電極に導電性中空糸膜電極、参照電極に銀/塩化銀電極、対極は白金コイルを使用した。0.15Mの水酸化ナトリウム溶液を支持電解質溶液とし電位掃引幅を-0.1V~+0.8V、掃引速度を100mV/sec で計測する。電位掃引開始後、サイクリックボルタモグラムが一になるまでくりかえす。次に、グルコース濃度が1mM、2mM、3mM、4mM、5mMになるように調整して各濃度におけるサイクリックボルタモグラムを得る。本実験では、ニッケル被覆電極と銅被覆電極の導電性中空糸膜電極の評価を行った。

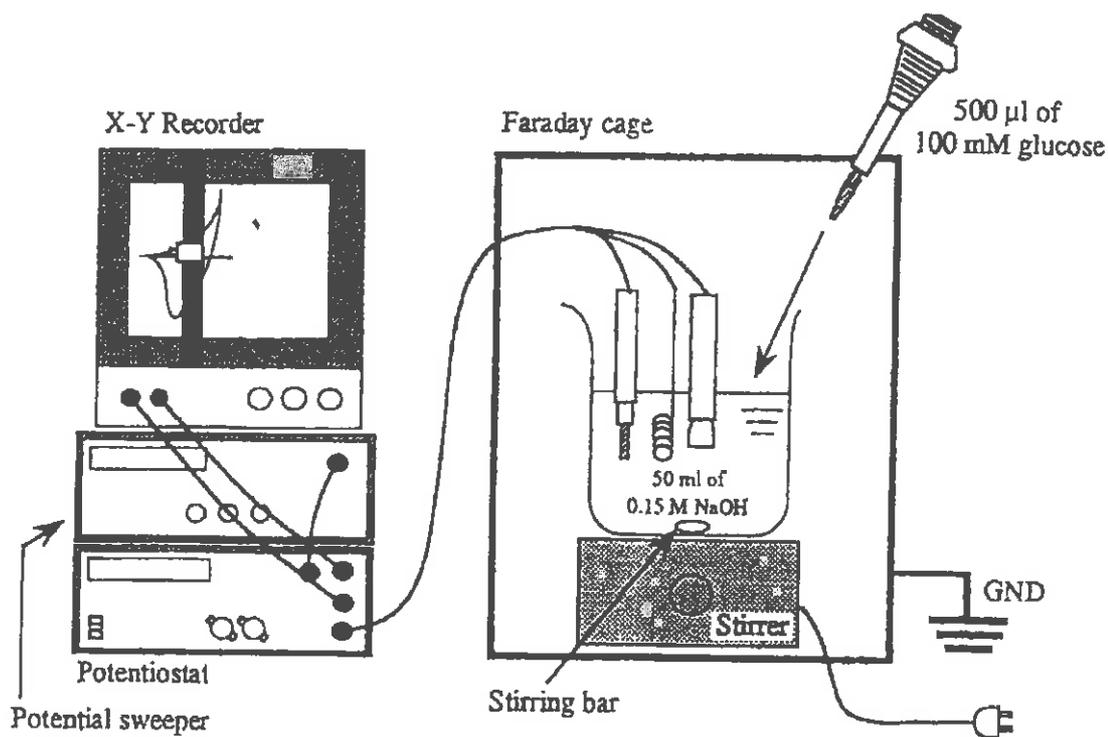
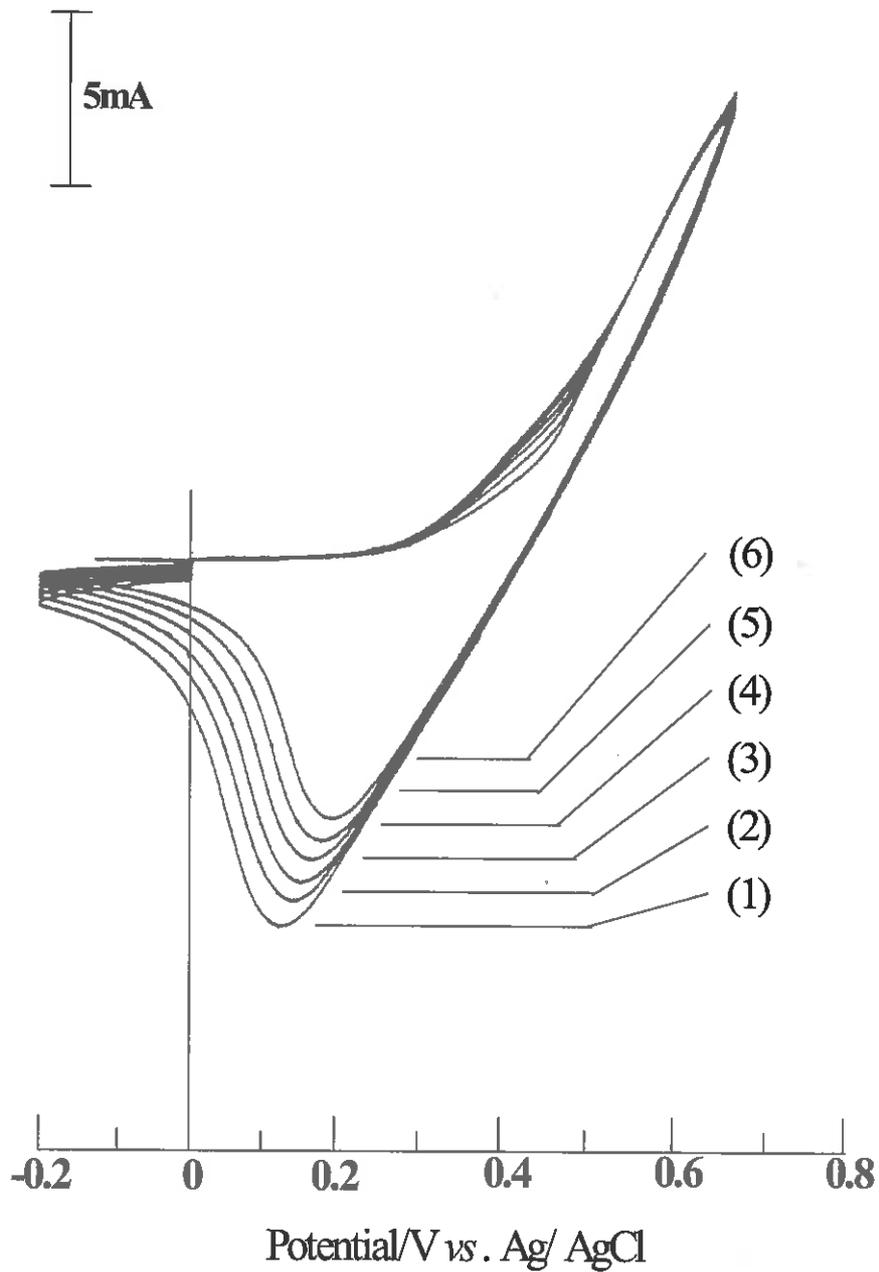


図5-13 サイクリックボルタンメトリの装置

5.4.3 実験結果

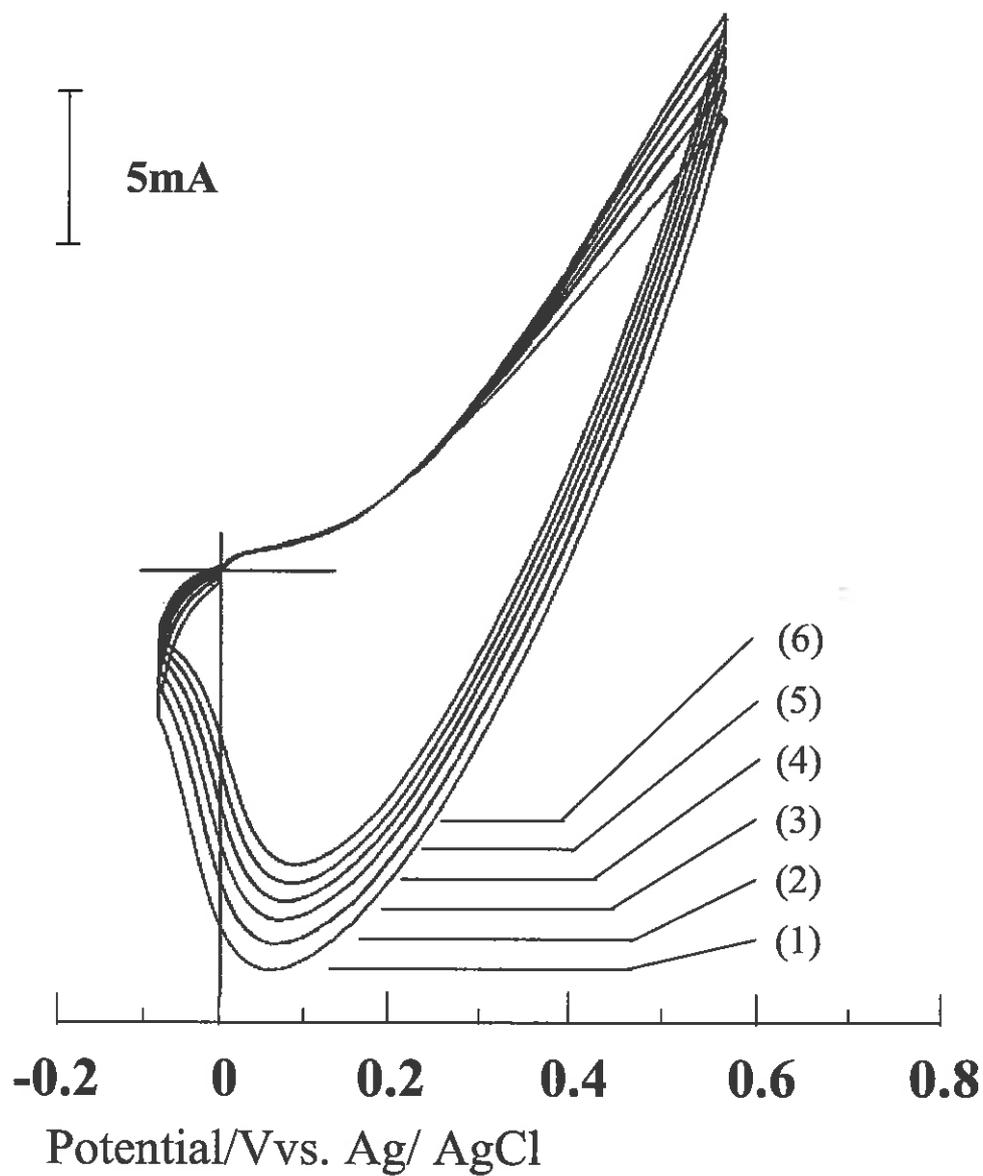
(1) Ni 被覆導電性中空糸膜電極のサイクリックボルタモグラム



Voltammetric responses of the nickel-coated hollow fiber membrane electrode at a scan of 100mV/sec in the absence (1) and presence of 1(2), 2(3), 3(4), 4(5) and 5(6)mM of glucose in 0.15M NaOH

図 5-14 ニッケル被覆導電性中空糸膜電極の CV

(2) Cu 被覆導電性中空糸膜電極のサイクリックボルタモグラム



Voltammetric responses of the copper-coated hollow fiber membrane electrode at a scan of 100mV/sec in the absence (1) and presence of 1(2), 2(3), 3(4), 4(5) and 5(6)mM of glucose in 0.15M NaOH

図 5-15 銅被覆導電性中空糸膜電極の CV

5.4.4 検討

導電性中空糸膜電極の電気化学的応答挙動を評価するために、水酸化ナトリウム 0.15M 溶液中におけるニッケルおよび銅を被覆した導電性中空糸膜電極のサイクリックボルタモグラムの図 5-14 と図 5-15 に示す。それぞれに金属の酸化還元起因する電流の変化が観測されているが、導電性中空糸膜電極は数 Ω/cm 程度の電気抵抗を持つために金属棒を電極として用いた場合に比べてブロードなピークとなった。

糖を共存させると、その濃度に依存して還元波は減少した。各ボルタモグラム上の(1)は、グルコースを共存させる前のグラフである。次に(2)はグルコース 1mM,(3)は 2mM,(4)3mM,(5)は 4mM (6)は 5mM の濃度とした時のボルタモグラムである。ニッケル電極ではアルカリ性溶液中で $\text{Ni}(\text{II})(\text{OH})_2$ を経て $\text{Ni}(\text{III})\text{OOH}$ となり、グルコース（糖分子）共存下で電気化学的な触媒作用が働き、糖のヒドロキシル基の酸化と金属の酸化物の還元反応が生じる。この反応は糖のラジカル形成を経由するために、1 個のヒドロキシル基が酸化されるとき 2 個の $\text{Ni}(\text{II})(\text{OH})_2$ を生成する 2 電子反応である。共存する糖によって $\text{Ni}(\text{III})$ が消費されるためにサイクリックボルタモグラムにおける還元波は糖の濃度に依存して減少するためサイクリックボルタモグラムの出力波形が小さくなる。

次に銅電極では、ニッケル電極と同様にアルカリ性溶液中で $\text{Cu}(\text{II})(\text{OH})_2$ を経て $\text{Cu}(\text{III})\text{OOH}$ となり、グルコース共存下で電気化学的な触媒作用が働き、糖のヒドロキシル基の酸化と金属の酸化物の還元反応が生じる。また、共存する糖によって $\text{Cu}(\text{III})$ が消費されるためにサイクリックボルタモグラムにおける還元波は糖の濃度に依存して減少するボルタモグラムとなる。

これらのことから、ニッケルおよび銅を被覆した導電性中空糸膜電極においても電気化学触媒反応によって糖が酸化されることが明確となった。なお、それぞれのサイクリックボルタモグラムの違いは、導電性中空糸膜の各種金属層が、無電解メッキ法で形成されていることに起因していると考えている。そのため、析出された金属層の厚さや密度は、一般のロッド電極表面のような結晶化層とも違っており異なっている。したがって、これらの違いがサイクリックボルタモグラムの全体形状に影響を与えていると考えている。

5.5 導電性中空糸膜電極の被覆金属選定

ニッケルおよび銅を被覆した導電性中空糸膜電極に関して、CV の測定を行
金属の酸化還元起因する電流の変化が観測された。これらの遷移金属以外の
貴金属系の金属電極においても糖類の電気化学的酸化を電流としてとらえるこ
とが知られている。そこで、ニッケルおよび銅に加えて白金と金の4種類を被
覆した導電性中空糸膜電極を用意し、HPLC 用の電気化学検出器として機能を
評価した。

5.5.1 実験方法

被覆金属材質の違いによる糖の応答挙動試験に用いた測定系を図 5-16 に示
す。

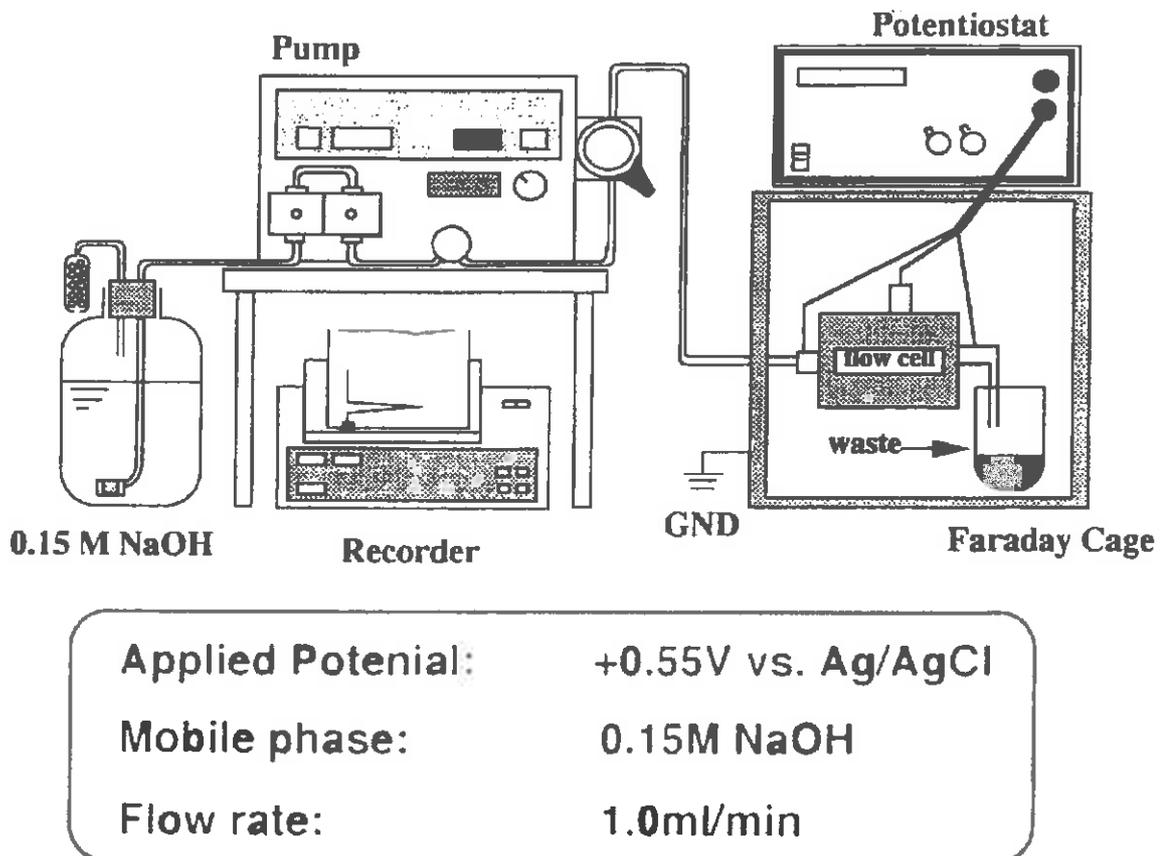


図 5-16 HPLC を用いた実験装置

ここで、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)には DIONEX 社製 AS7 陰イオン交換カラムを組み込み HPLC ポンプには日立 L-6010pump, レコーダには、日立 D-2500Chromato-Integrator, ポテンシオスタット, 作用電極に導電性中空糸膜電極, 参照電極に銀/塩化銀電極, 対極は白金コイルを使用した。各電極は、ポテンシオスタットに接続し、ポンプの流速を 1ml/min, 移動相に 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した 0.15M 水酸化ナトリウム溶液を用いた。移動相を使用している間は、空気中の二酸化炭素吸収を防ぐため、二酸化炭素吸収剤であるソーダライムを移動相溶液タンクに設置した。各被覆金属材質 (Ni, Cu, Pt, Au) の最適電極電位を決定するために、電極長さを 8 mm と一定にして、異なる濃度のグルコース (Ni ; 2 μ M, Cu ; 20 μ M, Pt ; 20 μ M, Au ; 1 mM) を電極電位を変えながら注入し、ピーク電流値, ピーク面積, 反応率, ベース電流値およびノイズを測定した。

5.5.2 実験結果

遷移金属以外の貴金属系金属電極においても糖の電気化学的酸化を電流としてとらえられることが知られている。そこで、ニッケル, 銅に加えて白金と金の4種類を被覆した導電性中空糸膜を準備し、HPLC 用電気化学検出器としての機能を評価した。導電性中空糸膜電極の各被覆金属における電極電位は、Ni ; +0.50V, Cu ; +0.60 V, Pt ; +0.50 V, Au ; +0.25 V で糖に由来するピーク電流値が極大を示し、その後減少した。しかし、ベース電流値, ノイズは、電極電位の増大に依存して上昇した。ピーク電流値が高く、かつノイズが低い電極電位がより高感度な検出には必要で、結果としてそれぞれの電極電位は、Ni ; +0.45 V, Cu ; +0.55 V, Pt ; +0.50 V, Au ; +0.20 V となった。4種類の被覆金属中、代表的な銅被覆導電性中空糸膜電極のピーク電流-設定電位特性(Hydrodynamic voltamogram)を図 5-17 に示す。グラフからもわかるように、ピーク電流値およびノイズの結果では 0.60V が最適であるが、その後の電位でノイズが急上昇していることから設定電位を 0.55V とした。また、各電極電位のグルコース検出に適した金属材質の実験結果を表 5-2 に示す。その結果の中からノイズとピーク電流の関係グラフを図 5-18 に、検出限界値の関係を図 5-19 に示した。

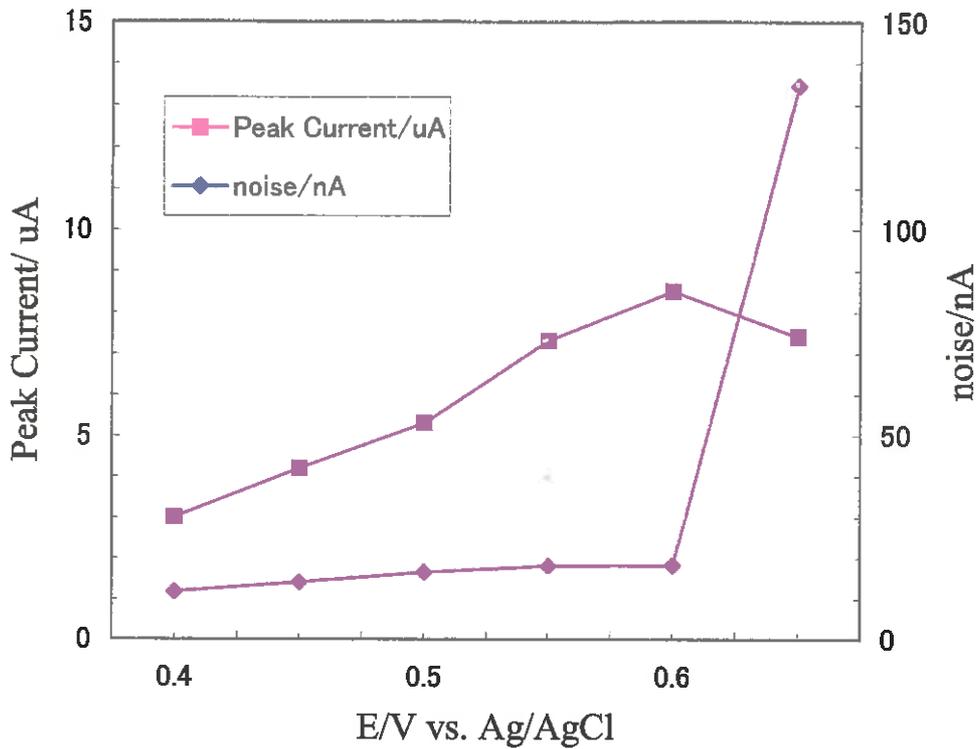


図 5-17 銅被覆導電性中空糸膜電極のピーク電流-設定電位特性

表 5-2 被覆金属材質による糖の応答特性

Electrodes	Ni	Cu	Pt	Au
Detection limit a) / pmol	9.8	2.1	3.5	19.9
Peak current/nA b)	357	281	465	27.5
Noise / nA	54	10	26	5
Applied potential / V vs. Ag/AgCl	+0.45	+0.55	+0.50	+0.20
Electrical Resistivity /Ωcm	7.63	1.67	10.60	2.35

Length of electrode:8mm.

a) Calculated as $S/N=3$. b) Obtained from 20 pmol of glucose.

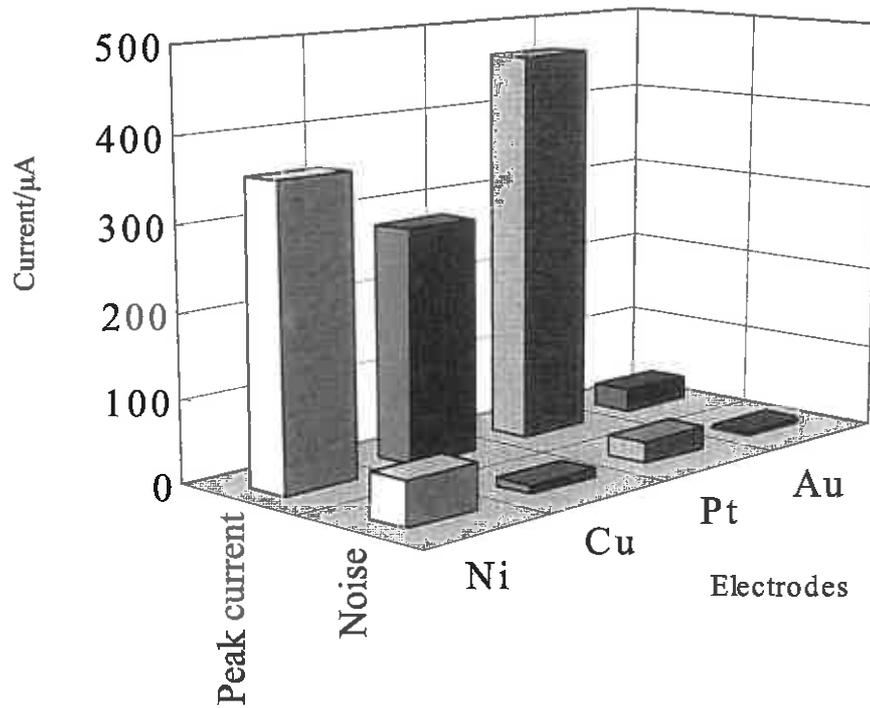


図 5-18 各電極材質による最大電流とノイズ特性

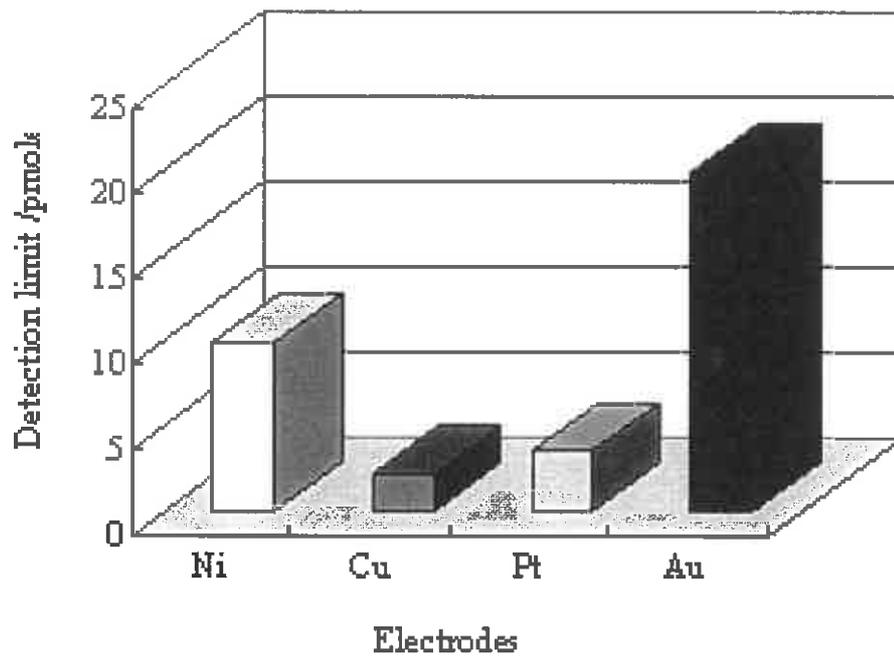


図 5-19 各電極材質による検出限界値

実験に用いた4種類の金属、ニッケル、銅、金、白金を被覆した導電性中空糸膜電極について、20pmolのグルコースを検出した際のピーク電流値、ノイズそして信号対ノイズ比(S/N)を3とした時の検出限界値である。ピーク電流値は電極材質によって異なるが、より大きな出力が得られている金属材質は①白金:465 μ A②ニッケル:357 μ A③銅:281 μ A④金:27.5 μ Aの順となった。また、低ノイズとなる場合には①金:5nA②銅:10nA③白金:27nA④ニッケル:54nAの順となった。この結果からS/N=3とした際の糖の検出限界値は、①銅:2.1pmol②白金:3.5pmol③ニッケル:9.8pmol④金:19.9pmolの順となり銅が4種類の金属中、一番検出限界値が低い値となった。この結果は、一般のロッド電極と必ずしも同様の結果ではない。多孔質中空糸膜に金属被覆した導電性中空糸膜の各種金属層は、無電解メッキによって、金属を析出させており形成された金属層の条件によって導電性中空糸膜電極のもつ特異な特性を示している。したがって、これらの違いがピーク電流値やノイズの結果に影響を与えていると考えている。本実験では銅被覆電極の検出限界が一番低く、高感度であることを明らかにした。

5.6 導電性中空糸膜電極長と応答特性

被覆する電極材質と同時に電極長さの関係を明確にするための実験を行った。

5.6.1 実験方法

本研究で、使用した導電性中空糸膜は、ポリプロピレン製でアクゾ社S6/2タイプ(外径1.8mm,内径1.2mm,膜厚0.2mm,細孔径0.2~0.6 μ m)に無電解メッキ法でニッケルを被覆した。導電性中空糸膜電極の長さを3mm, 5mm, 8mm, 11mm, 13mm, 18mmの6種類を用意した。実験装置および方法は5.5.1節と同様に行った。電極に移動相を導入するために取り付けたテフロンチューブの内径は0.5mmである。

5.6.2 実験結果

導電性中空糸膜をHPLCの電気化学検出器として使い、膜表面の金属を酸化す

るのに十分な電極電位に保った場合，注入された糖による金属の還元反応に伴った金属の再酸化を電流信号としてとらえることができる．導電性中空糸膜の被覆材質をニッケルとし，この電極長による応答挙動の結果を図5-20に示す．ピーク電流値は電極長が13mmまで増加したのち，その後減少した．実験成績における長さに依存した電流値の上昇は電極の反応面積増加によるものと考えられる．一方，導電性中空糸膜電極は，内径1.0mmの袋構造となっているために，内部に絶えず移動相として0.15Mの水酸化ナトリウム溶液が存在している．ここに糖溶液は内径0.5mmのテフロンチューブを通じて導入されるため，内部の水酸化ナトリウム溶液と混合されて外部に押し出されることになる．したがって必要以上に電極を長くすれば，希釈による糖の濃度低下が生じ，ピーク電流値の低下を引き起こす．以上のことから電極長さの増加と共にノイズも上昇することや，電極製作上の加工性も配慮すると10mm以下であることが望ましく，今後の電極長さは8mmとして検討を進めることにした．

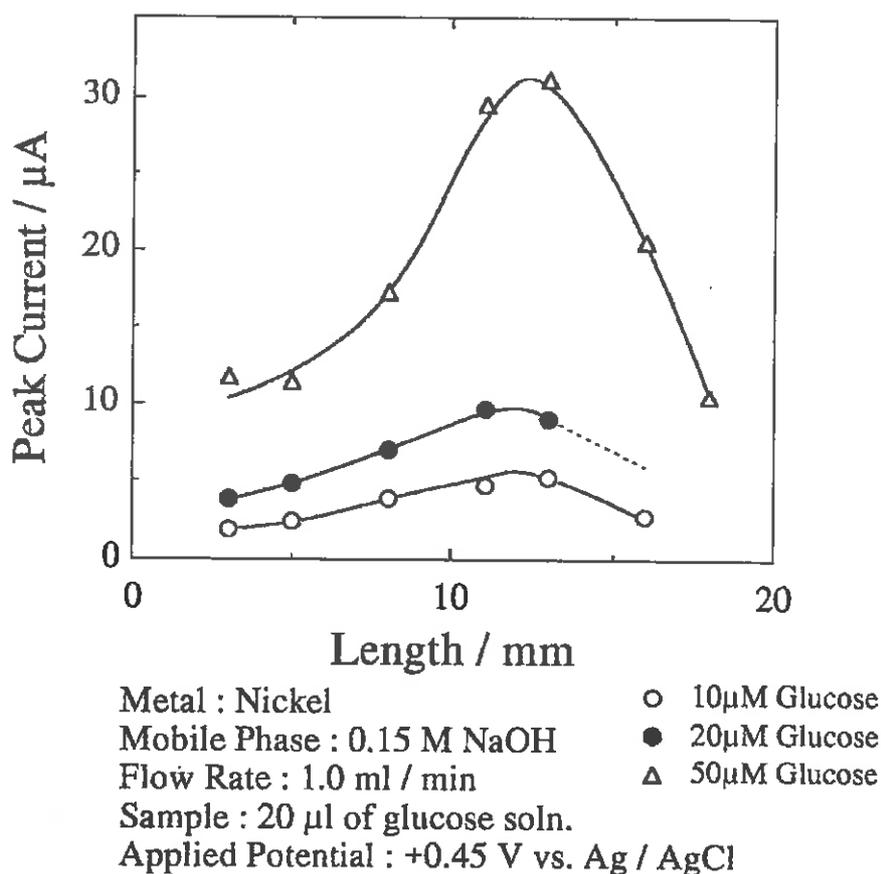


図5-20 糖濃度による導電性中空糸膜電極長とピーク電流特性

5.7 電気化学検出器への応用

5.7.1 検量線

銅被覆導電性中空糸膜電極を用いグルコース濃度を 10, 20, 50, 100, 200 μM に設定し、1 回あたりの注入量を 20 μl として検量線を得た。

グルコース濃度を変化させた際の検量線を図 5-21 に示す。銅被覆導電性中空糸膜電極で得られた電流信号は 10~200 μM の範囲でグルコースに比例して増大した。また、得られた検量線の相関係数は 0.998 であり、良い直線性を示している。

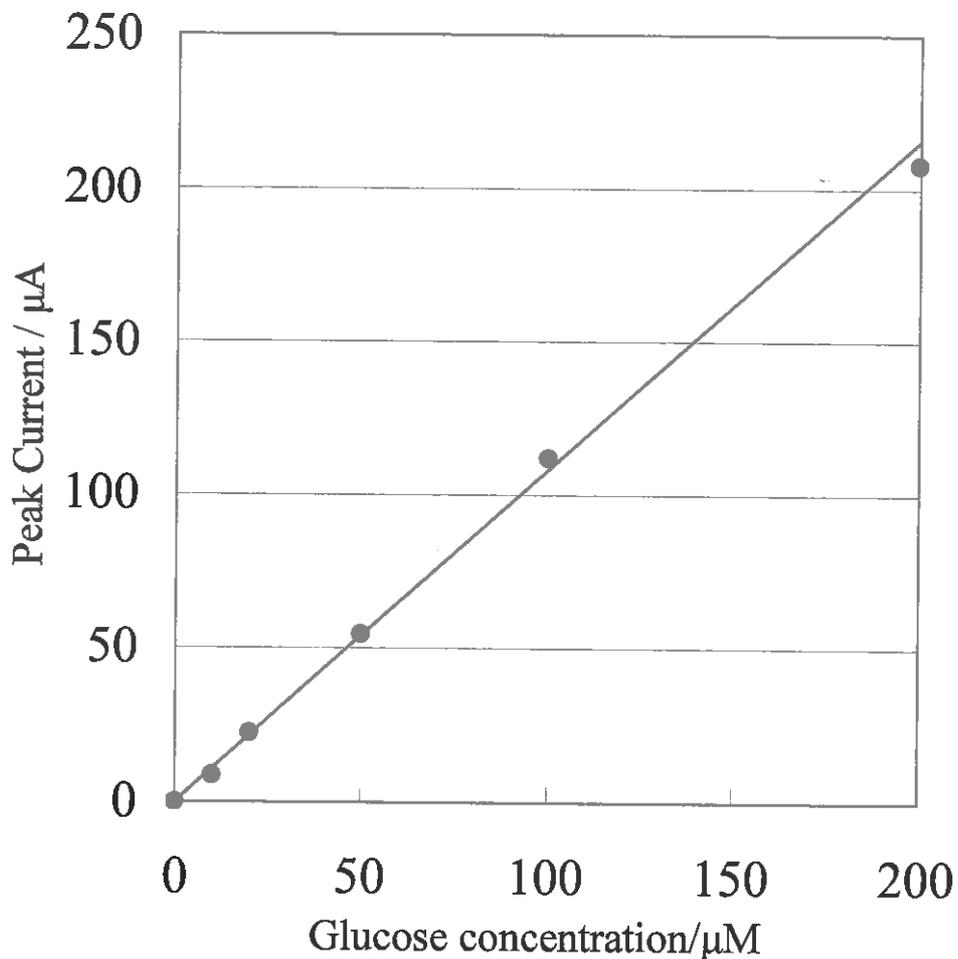


図 5-21 導電性中空糸膜電極の検量線

5.7.2 再現性

この膜電極は、深部の細孔部まで金属被覆されていることによって、高感度・高出力を可能にしているが独自の電極構造であるために基礎的性能の評価が必要である。すなわち、フロー系において繰返し注入される糖が、膜電極界面で連続的に酸化還元反応を行い、正確に電気信号として出力し続ける応答性の評価である。高濃度の糖を注入することで細孔部の目詰まりが進行し、注入圧力の上昇による膜電極の耐久性を評価する必要もある。そこで、銅被覆導電性中空糸膜電極を用いグルコース濃度を $20\ \mu\text{M}$ に設定した溶液を1回あたり $20\ \mu\text{l}$ 注入し、この測定を30回繰返し再現性の評価を行った。

グルコース濃度を $20\ \mu\text{M}$ と一定にし、 $20\ \mu\text{l}$ の注入を30回繰返した際の再現性の結果を図5-22に示す。ベース電流がやや減少する傾向になっているが、ピーク電流値は安定しており30回のグルコース注入に対する応答再現性は相対標準偏差で5.3%であり良好といえる。尚、初回の注入に対するピーク電流値の低さは、銅電極表面に形成される糖を酸化する銅酸化物が十分に形成されていなかったためと考えている。

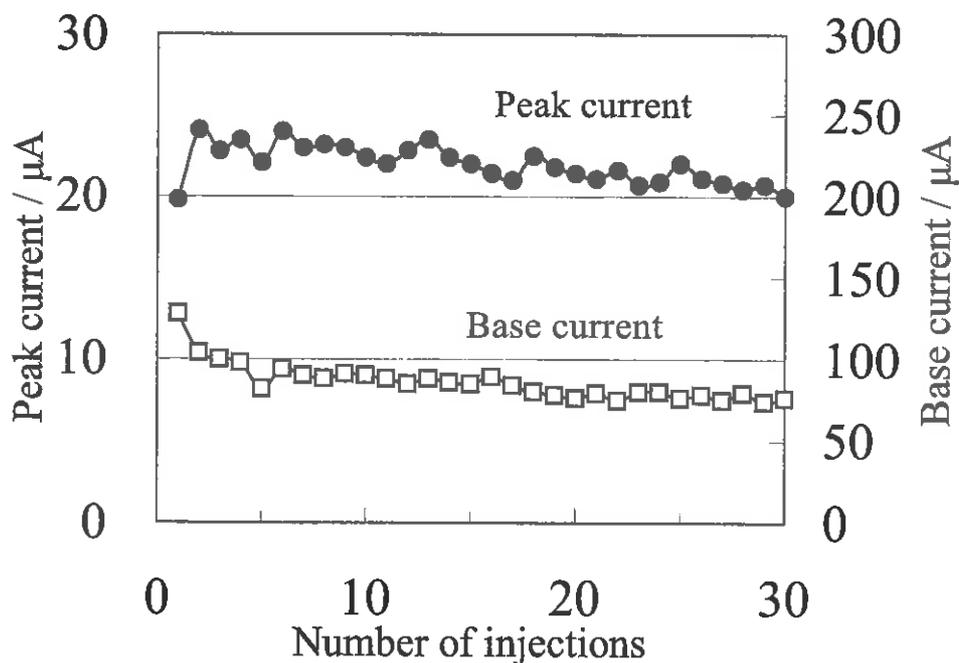


図5-22 導電性中空糸膜電極の再現性

5.7.3 耐久性

銅被覆導電性中空糸膜電極を2本用意し、グルコース濃度を再現性試験の10倍の $200\ \mu\text{M}$ に設定し、耐久性の加速試験を行った結果を図5-23に示す。1回あたりの注入量を $20\ \mu\text{l}$ とし1日に5回注入する。その日に使用した電極は、測定終了後その状態で放置し翌日、再び使用してその耐久性の評価を行った。

電極Bは、8日目で導電性中空糸膜電極にクラックが入り測定値が不確定となり翌日は測定不能となった。電極Aは10日目に入ってクラックが目立ち始めたのでここを限界として試験を中止した。この耐久性の条件および考え方については、5.8節で述べる。

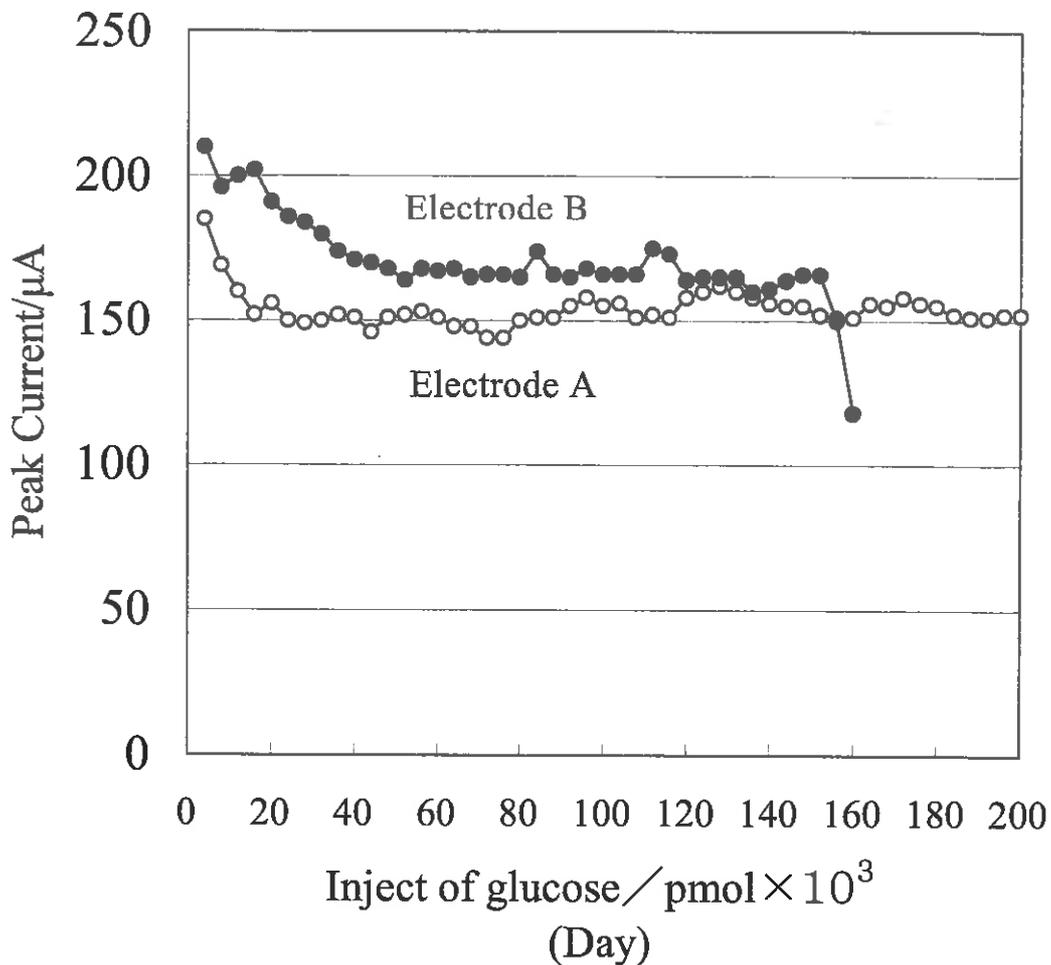


図 5-23 導電性中空糸膜電極の耐久性

5.7.4 従来電極との比較

反応金属系を統一するためニッケル被覆した導電性中空糸膜を用い、グルコース濃度を $50 \mu\text{M}$ に設定した溶液を1回あたり $20 \mu\text{l}$ 注入し、BAS (Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, USA) 社製薄相型フローセルのニッケルロッド電極との応答比較を行った。

BAS 社製のフローセルとの応答信号の比較を図 5-24 に示す。グルコース濃度を $50 \mu\text{M}$ とし $20 \mu\text{l}$ 注入した際のピーク電流値は、導電性中空糸膜電極の方が約 350 倍高くなっている。反応率では、得られた電気量からモル数を計算しグルコース 1 分子中にある水酸基は、反応に一つしか関与しないものとして計算し約 500 倍高い結果となっている。この結果から、導電性中空糸膜電極の検出表面積が市販のロッド電極に比べて極めて大きいために、高いピーク電流値を引き出すことができていることを明らかにした。

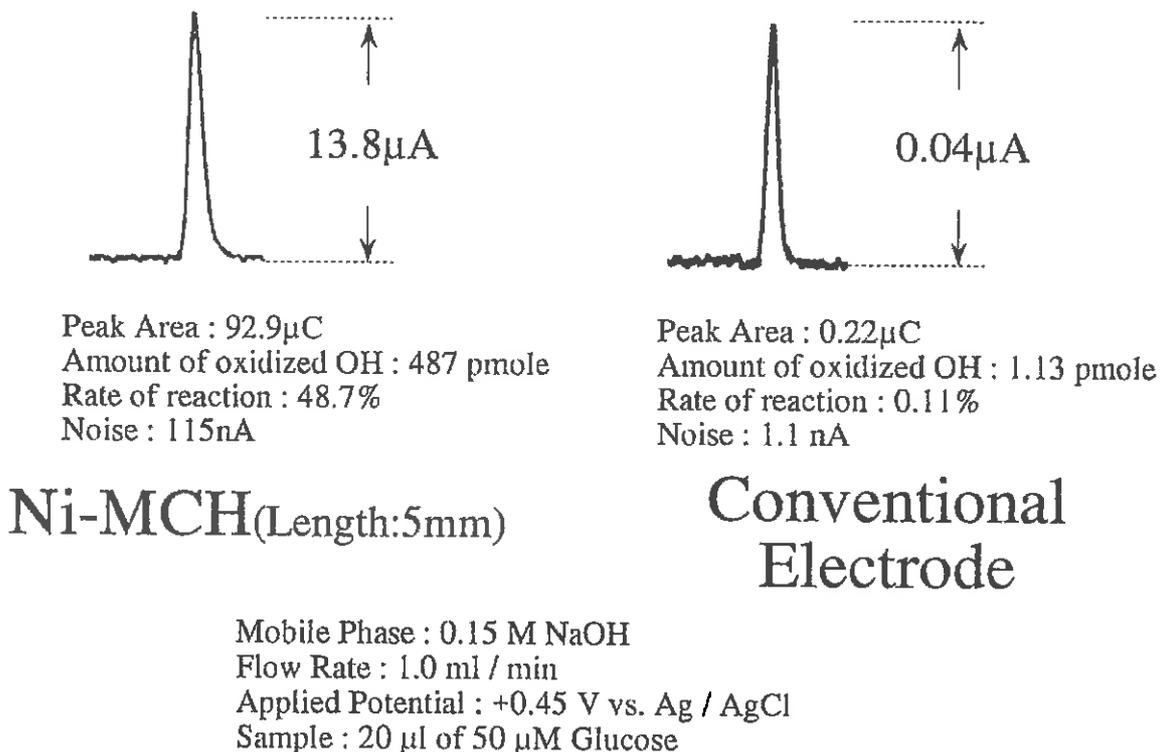


図 5-24 従来電極との比較

5.8 検討

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)における電気化学検出器の作用電極として、導電性中空糸膜を応用することを試みた。アルカリ溶液中での糖の電気化学的酸化をモデルに高感度な糖検出が可能であれば、生体内で感染を防御する糖鎖を解明する高感度な糖検出器が誕生する。多孔質中空糸膜は極めて大きな表面積を有することからその表面に金属を被覆させることで分子やイオンを検出する電極として導電性中空糸膜の可能性を検証した。分子やイオンが電極と電子のやり取りできる距離は、表面から約 10 \AA (10^{-9} m) 近辺までで、この部分で起きる糖の酸化還元反応をアルカリ条件下で検出した。

5.8.1 サイクリックボルタモグラム

作用電極の電位を時間とともに一定速度で変化させれば、そのとき得られる電流-時間曲線はそのまま電流-電位曲線に対応する。この考え方に基づいて一般的にボルタンメトリ (Voltammetry) と呼ばれる方法が用いられている。この方法は、物質によって反応する電位が異なるので電位は反応物の定性的判断に用いられ、電流は濃度に依存するのでその定量に利用することができる。すなわち、定性できる化学的ジャンルは、まず反応の起こる電位、反応の速さ、反応生成物の反応性など電極界面で起こりうる現象など最も手っ取り早い方法で把握することができるといえる。このようにボルタンメトリは、比較的簡単に物質の定性分析や定量分析を行うことができ、また電極反応の解析にも役立てることができる。

導電性中空糸膜電極は 5.4.4 で述べたように数 Ω/cm 程度の電気抵抗を持っているために電極界面での電子の授受が遅いと考えられる。したがって金属ロッド電極と比較した場合にサイクリックボルタモグラムは、濃度によって得られる酸化波のピークと還元波のピーク間の電位差に開きが生じてブロードなピークとなっている。このブロードとなるピーク波形を電子移動の化学的解析によって行おうとすると、ネルンストの式に基づく可逆・非可逆酸化還元系を論じなければならず検討をここまでとした。しかし、得られた酸化および還元波は、糖濃度に依存して変化していることから電極として十分機能しているといえる。

5.8.2 導電性中空糸膜電極の最適金属材質

アルカリ条件下でニッケル、銅、金および白金電極を用いて糖を高感度に検出電極の研究がなされている^{[81]~[85]}。また、昨今、ニッケル-チタン合金を電極として糖を高感度に検出する方法も提案されている^[96]。このような背景からニッケル-チタン合金を除く4種類の金属を多孔質中空糸膜に被覆し特性の評価を行った。

グルコースを用いた実験で一番高いピーク電流値が得られた電極材質は白金であった。また、ノイズが一番低い材質は金であった。しかし、これらの結果から得られる検出限界値での評価では、銅が一番高感度で検出限界値は2.1pmolであった。銅以外の材質ではニッケルで9.8pmol、白金で3.5pmolと一桁台のピコモル検出が可能で、金では19.9pmolであった。金は極めてノイズの低い電極であるがピーク電流値が低いために検出限界値が予想したほど下がらなかった。

一般的な電気化学検出器の検出限界値は十数ピコモルとされ、その中で金電極を用いたパルスドアンペロメトリ(PAD)法では数ピコモルとされている。金電極を用いた場合、ノイズが少なく出力不足は、増幅器を用いることによって補うことができるが、糖を酸化した後の中間体が残存物として電極に残ってしまうため洗浄工程に難を残していた。しかし、PAD法では、この問題を解決するために作用電極と参照電極(Ag/AgCl)との間の印加電圧を短時間の間に3段階に変化させ、被検出物質の測定と作用電極表面の洗浄を電気的に行うところにある。第一段階の印加電圧で糖が直接酸化され、その時のピーク電流が検出される。第二段階で電極の汚れとなる反応生成物が除去され、第三段階の負の電位で電極が洗浄される。要するに適正電位で検出した後、金電極の弱い酸化還元反応を補うために強制的に強いプラス電位とマイナス電位をかけて擬似的な酸化還元反応をさせる仕組みである。導電性中空糸膜電極は、金以外のそれぞれの金属材質において強い酸化還元反応が働くために電極を洗浄する工程が要らず、一定電位で検出が連続的に行われることから極めて優れた検出器といえる。また、表面積が大きいことを考えると電極構造の検討によっては、さらに高感度な検出器になる可能性がある。

5.8.2 導電性中空糸膜電極の基本性能

導電性中空糸膜電極の適正長さについて検討した結果、ピーク電流値が一番高く取れる電極長が13mmで、長さに依存した電流値の上昇は電極の反応面積増加によるものと考えられる。しかし、内部に絶えず移動相として0.15Mの残留水酸化ナトリウム溶液が存在しているため、必要以上に電極を長くすれば、希釈による糖の濃度低下が生じ、ピーク電流値の低下を引き起こす。また、導電性中空糸膜のメッキ工程においてピーカに入る程度に多孔質中空糸膜をフープ状に巻いて処理しているために巻き跡が残り、長くなると直線性が保てなくなる。以上のことから電極長さの増加と共にノイズも上昇することや、電極製作上の加工性も配慮すると10mm以下であることが望ましく、今後の電極長さは8mmとして検討を進めることにした。

グルコース濃度を変化させて得られた検量線から銅被覆導電性中空糸膜電極は、グルコース濃度が10~200 μ Mの範囲で直線性が得られ相関係数は0.998と精度の高い電極であることが明らかとなった。

また、5.7.2の再現性においても一回の注入量が、20 μ Mのグルコース濃度で20 μ lであるから400pmolに相当する負荷を30回、洗浄せずに繰り返し使用できる。この評価は、島津製作所の評価100pmol(10 μ M, 10 μ l)で20回(**)と比べて6倍に相当する評価をしており、実使用において全く問題のない検出器といえる。

さらに5.7.3の耐久性では、再現性試験の10倍の200 μ Mに設定して20 μ lを一日に5回注入する条件を設定したが、この電極の使用目的が数ピコモル程度の高感度領域という範囲であれば、異常に高い濃度での耐久試験となり今後は、試験条件の再検討をする必要がある。しかし、この導電性中空糸膜電極の限界を見極める意味では、意味深いものであると考えている。

従来電極との比較では、ニッケル被覆した導電性中空糸膜電極を用い、BAS社のニッケルロッド電極との比較を行った。ピーク電流値は約350倍高い結果となり、導電性中空糸膜電極の極めて大きな表面積の特徴が出た結果であるが、ノイズもあわせて検出してしまうためこれらの課題を解決することで、更なる高感度な検出器として期待される。

第6章

導電性中空糸膜を用いた糖類の高感度検出 および従来法との比較

前章では、導電性中空糸膜電極が高速液体クロマトグラフィ(HPLC)の検出電極として一番高感度に区分されている検出器と同等の検出感度であることが明らかとなった。しかし、多孔質中空糸膜の極めて大きな膜面積に被覆された金属表面積を考えると不満足な結果である。そこで感度低下を招いている要因を一つひとつ分析しその要因に対する対策を講じることによってさらに高感度となる電極構造の検討を本章で述べることにする。導電性中空糸膜電極は、極めて大きな表面積と同時にその特異な袋構造が反応室を兼ね備えているために構造が簡単で安価なフローセルの提供が可能である。しかし、この反応室に存在する残留水酸化ナトリウムが糖濃度の希釈や構造的に起こる送液上の乱流がノイズとなり感度向上を阻んでいる。本章では、それらを解決するための検討と具体的に7種類の混合糖を同時検出し、従来検出器との感度の比較もあわせて行った。また、検出時間についても現状メーカーとの比較を行い本研究の今後の可能性についても述べた。

6.1 導電性中空糸膜電極の高感度検出

糖類の多くはそれ自身強いUV吸収や蛍光を示さないため、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によって高感度検出するためには、カラムで分離する前に誘導体化させるプレカラムや分離後に誘導体化させて検出するポストカラムなどによる誘導体化反応を用いる必要がある^{[86][87]}。また、さらに高感度な分析を行う場合には、検出する糖にもよるがHPLCに換えてガスクロマトグラフィ(GC)を用いた分析を行うこともある^[109]。しかし、GCによる糖類の検出にはHPLC以上の前処理が必要で、単糖類や2糖類ではシリアル化やアセチル化、多糖類では構造解析のためにメチル化などの誘導体化が行われる^[97]。また、ガス化させるために試薬が高温にさらされるため変質しやすいことや糖検出においては、分子量が600~700以上になると検出しづらくなるなどの問題がある。したがって、幅広い測定レンジで分析可能なHPLCの分野で高感度となる検出器の研究が行われている。

一般的にHPLCの用いられる検出器の検出限界値は、最も汎用的に用いられている示差屈折率器で200pmol、蛍光検出器で10~50pmol、電気化学検出器では2~5pmolとされている^[98]。なかでも電気化学検出法は、分析時の煩雑さを回避し誘導体化させずに直接検出することが可能なため、生体系を含む高感度な検出器として用いられている。

導電性中空糸膜電極を用いた電気化学検出器の前章での検出限界値は2.4pmolで、市販の検出器と同等の性能を示すことができた。しかし、この結果、導電性中空糸膜電極が従来のロッド電極に比べて極めて大きな表面積を有しているにもかかわらず、その優位性が示されていない。そこで本章では、この導電性中空糸膜電極が、HPLCの検出限界値をGC並に引き上げるために構造的な検討を行った。

導電性中空糸膜電極の課題は、出力波形がブロードとなるため、シャープなピーク電流値が得られない。また出力波形のブロード化は、ピーク高さ h と $h/2$ の高さにおけるピーク幅(半値幅)が広がるため、リテンションタイムが近接する多成分糖を同時分析する際やオリゴ糖などの多くのピーク波形を伴う検出に適していない。すなわち、GCなどで得られるような切れ味のよいシャープな出

力波形が望まれるのである。また、この膜電極は5.7.4項の結果から、従来電極より二桁高い出力が得られながらもノイズも同時に多く検出してしまうことからこのノイズを低減させることで、より高感度な電極となると考えている。6.2節からは導電性中空糸膜をより高感度な作用電極とするための工学的検討を試みた。

6.2 電気化学検出器の電極

一般的に化学物質は、物理量に比べて複雑で計測が困難であるが、電極を用いる電気化学計測では、化学量が電位や電流などの電気信号に変換されるので、計測が容易となる。また、化学的な現象は、電子移動が伴うが、これを電気化学反応としてとらえれば平衡活量と呼ばれている反応推進力、反応速度、反応量などは、それぞれ電位、電流、電気量(電流×時間)に対応しておりいずれも電気信号として検出することができる。ここでは、電極構造の違いによる検出応答性についていくつか取り上げ、導電性中空糸膜電極の感度の検討を行う。

6.2.1 従来電極の構造

従来の薄層型平面電極の層流は図6-1に示すように、常に溶液が押し出され移動相もしくは被検出物質がすみやかに交換されながら電極表面と接し電子の授受が行われる^[92]。

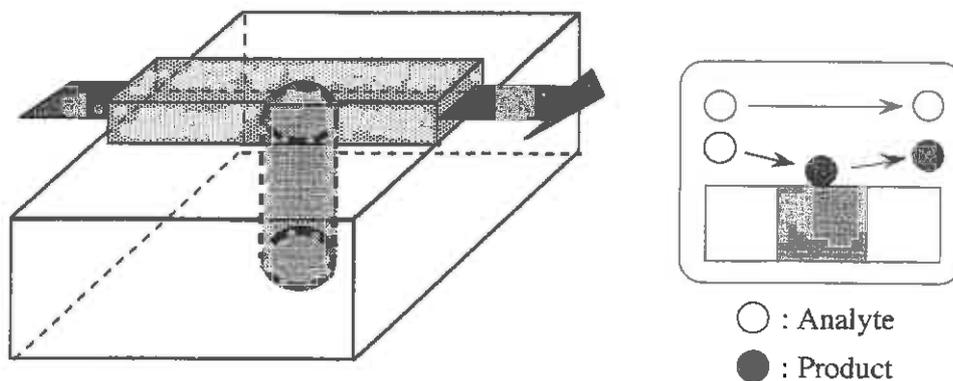


図 6-1 薄層型平面電極の構造

電極材質には、白金、ニッケル、銅、金などがある。なかでも白金は、生体中の酸化物質が異常に高まることによって細胞傷害を引き起こす成分のひとつである過酸化水素の測定に用いられている^{[22],[25]}。

また、図 6-2 には、カーボン電極の層流を示す。カーボン電極には、ガラス状カーボン(glassy carbon)、黒鉛(graphite)、カーボン繊維(carbon fiber)、炭素ナノチューブ(carbon nanotube)などの材質が用いられている。カーボン電極は、神経伝達物質であるカテコールアミンや生体中のフェノール、エノール、カテコールの酸化還元物質の測定に用いられる。代表的なカーボン繊維電極は、前述の金属ロッド電極の表面積の狭さを改善するために μm サイズのカーボンファイバを数千本束ねて電極表面積を著しく増大させ目的物質の電流交換率を上げている。しかし、カーボン系の電極は、糖類などの炭水化物の検出ができない^[23]。

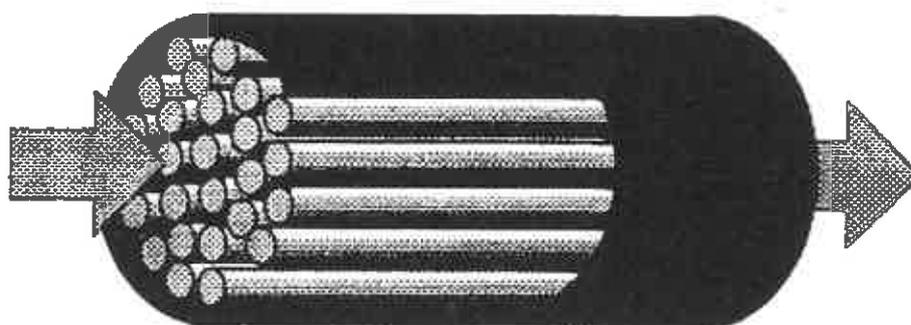


図 6-2 カーボンファイバ型電極の構造

6.2.2 導電性中空糸膜電極の構造

一方、導電性中空糸膜電極は図 6-3 に示すように、多孔質中空糸膜の膜表面積の大きさをそのまま利用して表面に金属を被覆していることから従来の金属ロッド電極よりも極めて大きな反応面積を有している。また、被覆金属材質は、無電解メッキ法で付けることのできる金属は、すべて可能なため検出しようとする目的物質にあわせて金属を選択することができる^{[6]-[11]}。さらに中空糸膜という構造をそのまま電極としているため内部が反応室として利用できることで、

電極とフローセルの機能を兼ね備えている。しかし、前章までの導電性中空糸膜電極構造では、この反応室が逆に検出感度の低下や出力波形をブロード化させ半値幅を広げる原因となっている。

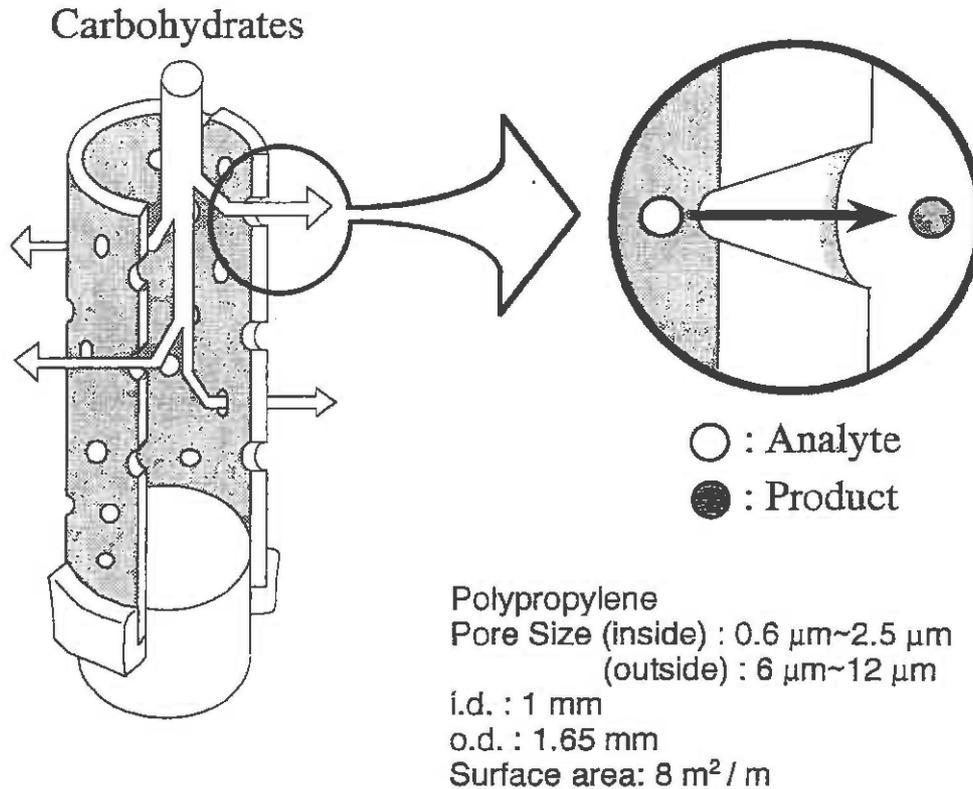


図 6-3 導電性中空糸膜電極の構造

導電性中空糸膜電極への送液は、内径 0.5mm のテフロンチューブから内径 1.0mm の膜電極に移動相および被検出物質がおくられる。そのため反応室に送液された段階で層流が急に広がるために乱流が生じてしまう。また、被検出物質が電極内で待ち受ける残留水酸化ナトリウムと混合することで見かけ上、糖濃度の低下が起こり感度の低下を招いていると考えられている。

6.2.3 導電性中空糸膜電極の送液システム

6.2.2 項の送液システムをわかりやすくするためにテフロンチューブ(PTFE tube)から導電性中空糸膜電極(MCH)の反応室に送液され細孔部を通過して反応するまでの状態を直線的にとらえた概念図を図 6-4 に示す。

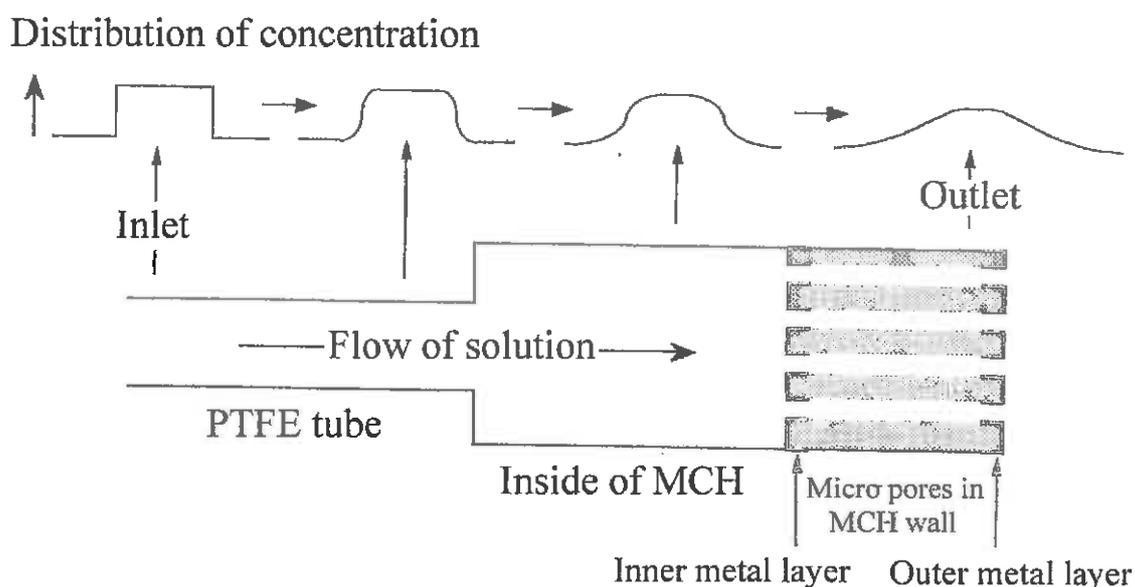


図 6-4 導電性中空糸膜電極の送液時の直線的概念図

図において試料が送液されると膜電極内の残留水酸化ナトリウムによって試料濃度分布がそれぞれ変化する。具体的には、実験に用いられる糖溶液が、テフロンチューブから膜電極に送液された段階で濃度分布は反応室に存在する残留水酸化ナトリウムによって幅広くなる。次に細孔部を通過する時点でも細孔部に存在する水酸化ナトリウムにより濃度分布はさらに幅広くなり、出力信号のピーク幅はブロードになると考えられる。このことから膜電極内の残留水酸化ナトリウム量(デッドボリューム)をいかに少なくするかが重要である。デッドボリュームの低減においては、反応室の容量だけではなく膜自身の細孔容量もあわせて検討する必要がある。

6.2.4 導電性中空糸膜電極のデッドボリュームの検討

導電性中空糸膜電極のデッドボリュームを検討するにあたって電極の概念図を図6-5に示す。膜電極長を L として実験に用いた外径1.6mm、内径1.0mmの膜電極の反応室容量は $0.5^2 \pi L = 0.25 \pi L \text{mm}^2$ となる。これに対して膜部分の容量は、膜厚を0.3mmとして $(0.8^2 - 0.5^2) \pi L = 0.39 \pi L \text{mm}^2$ となる。ここで多孔質中空糸膜の空孔率は70%で被覆した金属が占める割合は、メッキ条件によっても異なるが仮に6%とすると実質的空孔率は64%となり膜電極細孔部のデッドボリュームは $0.39 \pi L \times 0.65 = 0.25 \pi L \text{mm}^2$ となり反応室と同容積となる。

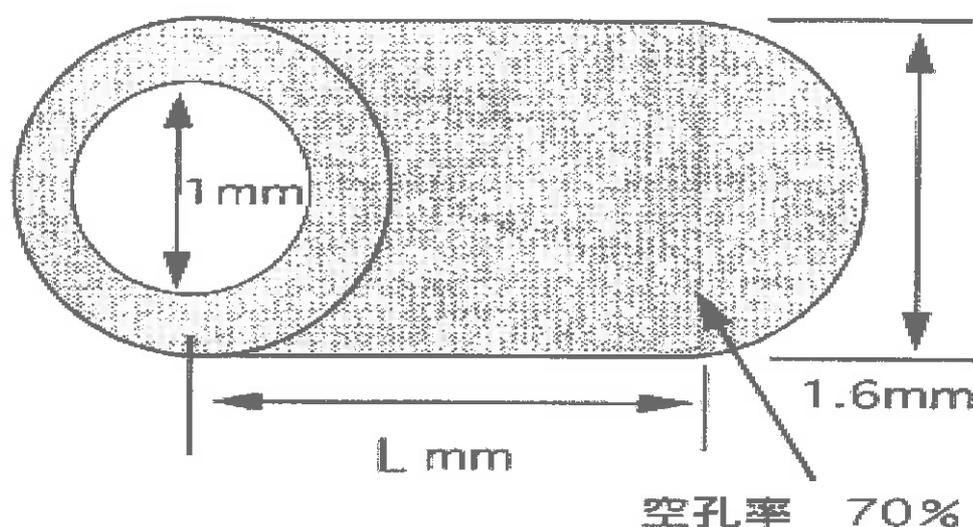


図6-5 導電性中空糸膜電極のデッドボリューム概念

したがって、従来、外壁メッキによる導電性中空糸膜電極を用いて糖の検出を行ってきたが、残留水酸化ナトリウムによる糖の希釈は、膜電極の反応室だけではなく膜素材自身の細孔部でも同様に起こっておりピーク電流波形をさらにブロード化する原因と推察される。そこで、膜自身の細孔部のデッドボリュームを回避するために、外壁メッキから内壁メッキに変え、細孔部容量で起こる残留水酸化ナトリウムの希釈の影響を排除し、細孔部を通過する直前で糖の検出を試みた。

6.3 細孔部の残留水酸化ナトリウムの排除

6.3.1 内壁銅被覆電極の基本特性試験

外壁に銅を被覆した導電性中空糸膜電極と内壁に銅を被覆した導電性中空糸膜電極を図 6-6 に示すように2種類用意し、それぞれの電極長さを7mmに統一し、5.5.1の実験方法に準じ、細孔部のデッドボリュームの影響を評価した。その際のグルコース(和光純薬株式会社特級)濃度は、 $100\mu\text{M}$ に設定し $20\mu\text{l}$ 注入した際のピーク電流値、ノイズ、検出限界値および半値幅の応答比較を行った。

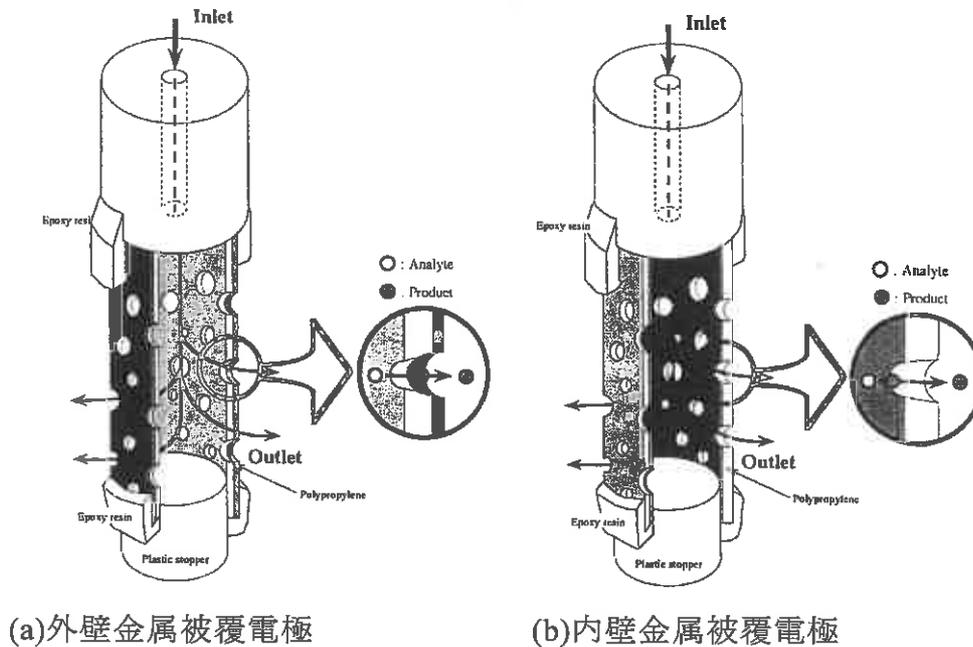


図 6-6 外壁メッキと内壁メッキの導電性中空糸膜電極

6.3.2 実験結果

外壁金属被覆と内壁金属被覆を比較した結果を表 6-1 に、また得られた出力波形を図 6-6 に示す。この結果から、ピーク電流値は、外壁銅被覆で $90.3\mu\text{A}$ に対して内壁銅被覆することによって $99.3\mu\text{A}$ となり10%向上した。また、ノイズは外壁銅被覆で 22nA に対して内壁銅被覆では 20nA で大きな改善とはならなかった。検出限界値は $S/N=3$ として、外壁銅被覆 1.7pmol に対して内壁銅被覆では 1.2pmol となり約30%下げることが可能となった。一番顕著な効果は半値幅に現れ、外壁銅被覆では 10.2sec であったのに対して内壁銅被覆では 3.6sec

となり約 1/3 に短縮された。導電性中空糸膜電極は、従来電極に比べて極めて大きな表面積を有することから大きな電流信号が得られるが、ピーク幅がブロードとなりシャープな波形が求められていた¹⁴⁾。これは、半値幅が広いと検体の多成分同時分析の場合に、分離された成分のピークが接近して重なり合い判別しにくくなるためである。しかし、今回の内壁メッキの変更によって糖類を細孔部の通過初期段階で検知することで、糖溶液濃度の低下を抑えシャープなピーク波形が得られた。

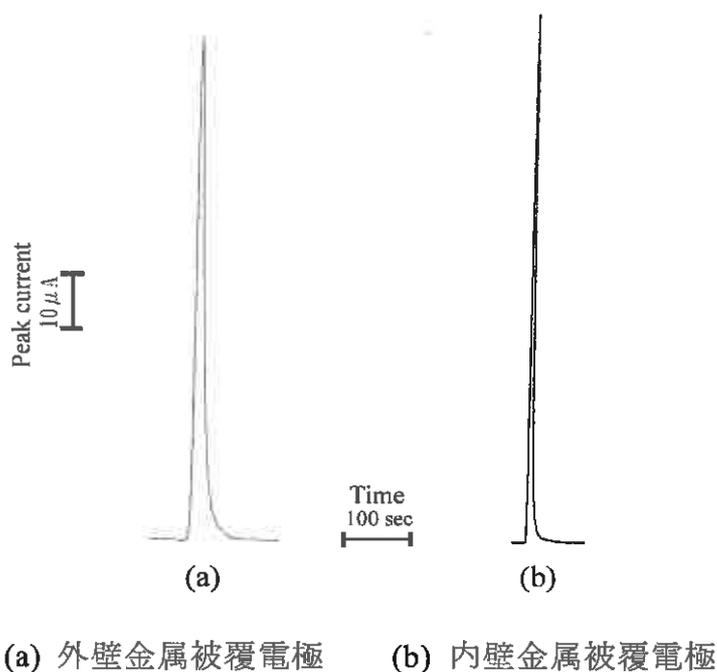


図 6-7 内・外壁導電性中空糸膜電極の出力波

表 6-1 内壁金属被覆と外壁金属被覆の特性比較

		Plated outside	Plated inside
Peak current	(μ A)	90.3	99.3
Noise	(nA)	22.0	20.0
Half-width	(sec)	10.2	3.6
Detection limit	(pmol)	1.7	1.2

6.3.3 内壁金属被覆電極長との相関関係試験

内壁金属被覆膜電極は、外壁金属被覆膜電極に比べて厳密には、金属被覆表面積が膜厚分減少しているにもかかわらず、ピーク電流値、ノイズ、検出限界値、半値幅ともに改善された。このことから 5.6 節で得られた導電性中空糸膜電極長における特性変化が細孔部のデッドボリュームの排除によってどのように変化するかを評価した。またこの膜電極長とピーク電流値、ノイズ、半値幅および検出限界値の結果から内壁金属被覆電極長の適正長さの見極めを行った。導電性中空糸膜の電極長を 1, 2, 4, 7, 10 mm と変化させグルコース濃度を $100 \mu\text{M}$ に設定し $20 \mu\text{l}$ 注入した際の応答特性の試験を行った。

6.3.4 実験結果

内壁金属被覆した導電性中空糸膜電極のピーク電流値、ノイズ、半値幅および検出限界値の電極長依存特性結果を図 6-8 に示す。ピーク電流値は電極長が 7 mm の時に最大の $99.3 \mu\text{A}$ を示し、その後減少した。これは、電極が長くなるに従って反応面積が増大し、ピーク電流値は上昇するが、同時に反応室容量も増大し残留水酸化ナトリウムによってグルコースの希釈が生じたためである。しかし、この結果を 5.6.1 で得られた外壁金属被覆した導電性中空糸膜電極との比較をすると電極長さに対するピーク電流値の変化が内壁金属被覆の方が少なくなっている。すなわち、外壁金属被覆では、電極長が増加すると反応室の残留水酸化ナトリウムと同時に細孔部にも存在する同容量の残留水酸化ナトリウムの影響を受けることになる。それに対して、内壁金属被覆では、残留水酸化ナトリウム量が半減していることからピーク電流値を得るための長さは 12mm 付近から約 1/2 の 7mm 近辺となっている。したがって、今回得られた内壁金属被覆電極長さに対するピーク電流値の変化量が外壁金属被覆電極に対して少ないことは、細孔部のデッドボリューム半減させ残留水酸化ナトリウムの影響を排除した結果であると考えられる。

次に、ノイズの電極長に対する影響では、電極長が 1~2 mm の時 9 nA で最小値を示し、その後、電極長に比例して増加する傾向を示した。検出限界値は $S/N=3$

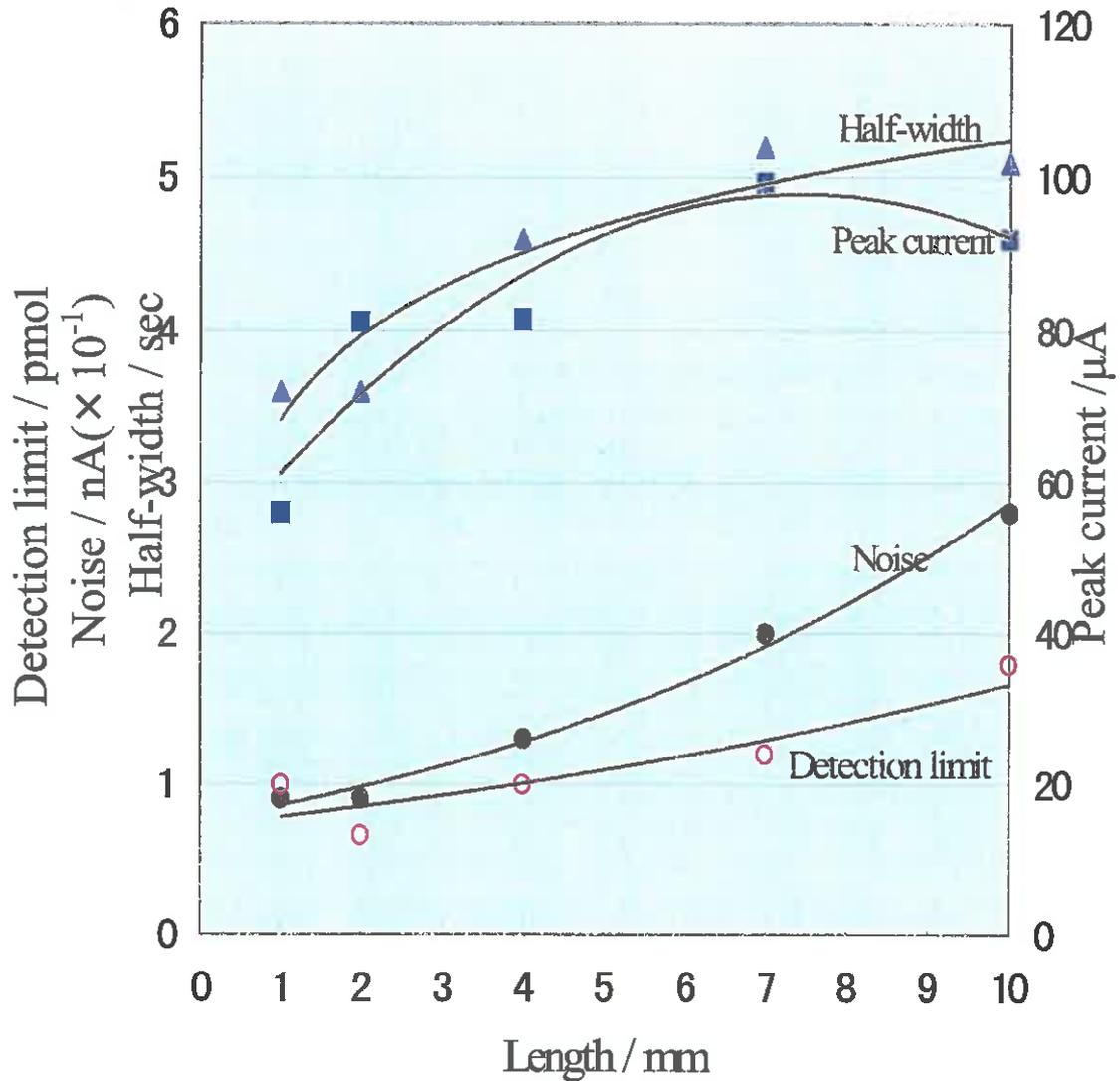


図 6-8 内壁銅被覆時の電極長と応答特性

とした時、電極長が 2 mm の時が最小で 0.66 pmol を示したが、その後、電極長の増加と共にノイズも増加し検出限界値は電極長が 10 mm で 1.8 pmol と上昇した。このことから、最適電極長は 2 mm が望ましいが、電極製作上の難易度を配慮すると 7 mm 前後の長さで検出限界値は 1.2 pmol が実能力として適正と考えられる。

6.4 反応室の残留水酸化ナトリウムの排除

導電性中空糸膜電極の反応室の残留水酸化ナトリウムを排除させるためには、多孔質中空糸膜のサイズを変更し、内径を小さくすることが望ましい。しかし、テフロンチューブに膜電極を挿入する固定構造を見直す必要があり、本節では、効果の可能性を見極めるために現状内径 1.0mm の膜電極内部にプラグを装着し、反応室を簡易的に微小化させることで効果の確認を行った。

6.4.1 プラグ装着膜電極の基本特性試験

次に、6.3.4 項で残留水酸化ナトリウムの排除は、高感度検出に至ることが示唆されていることから、反応室にけるデッドボリュームも構造的に減少させる検討を行った。膜電極内部に図 6-9 に示すプラグを取り付け反応室の容量を減少させ残留水酸化ナトリウムによる糖の希釈効果を防止し、さらなる高感度検出を試みた。検出条件を 6.3.1 節と同様に設定し、プラグを内部に装着させ電極の長さを 2, 4, 10mm に変えて得られた応答特性を図 6-10 に示す。

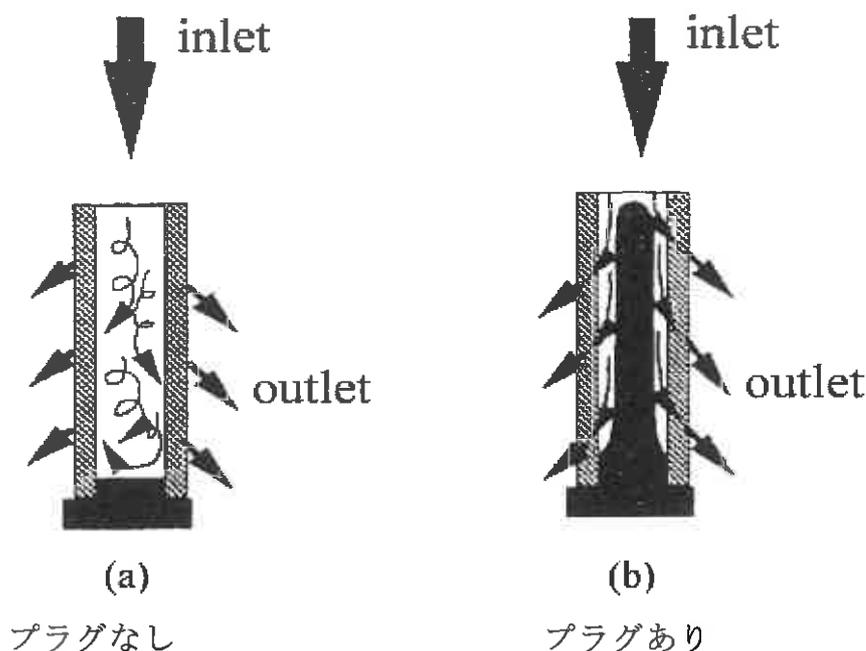


図 6-9 プラグを挿入した導電性中空糸膜電極

6.4.2 実験結果

6.3.4 項のプラグがない場合の実験結果では、電極長が7 mmでピーク電流値が最大を示しその後低下したが、プラグがある場合のピーク電流値は、飽和することなく電極長の増加に比例して上昇した。これは電極内部に設けたプラグにより反応室のデッドボリュームが微少化され、電極長さを増加しても残留水酸化ナトリウムによるグルコースの希釈効果が緩和されたためと考えられる。

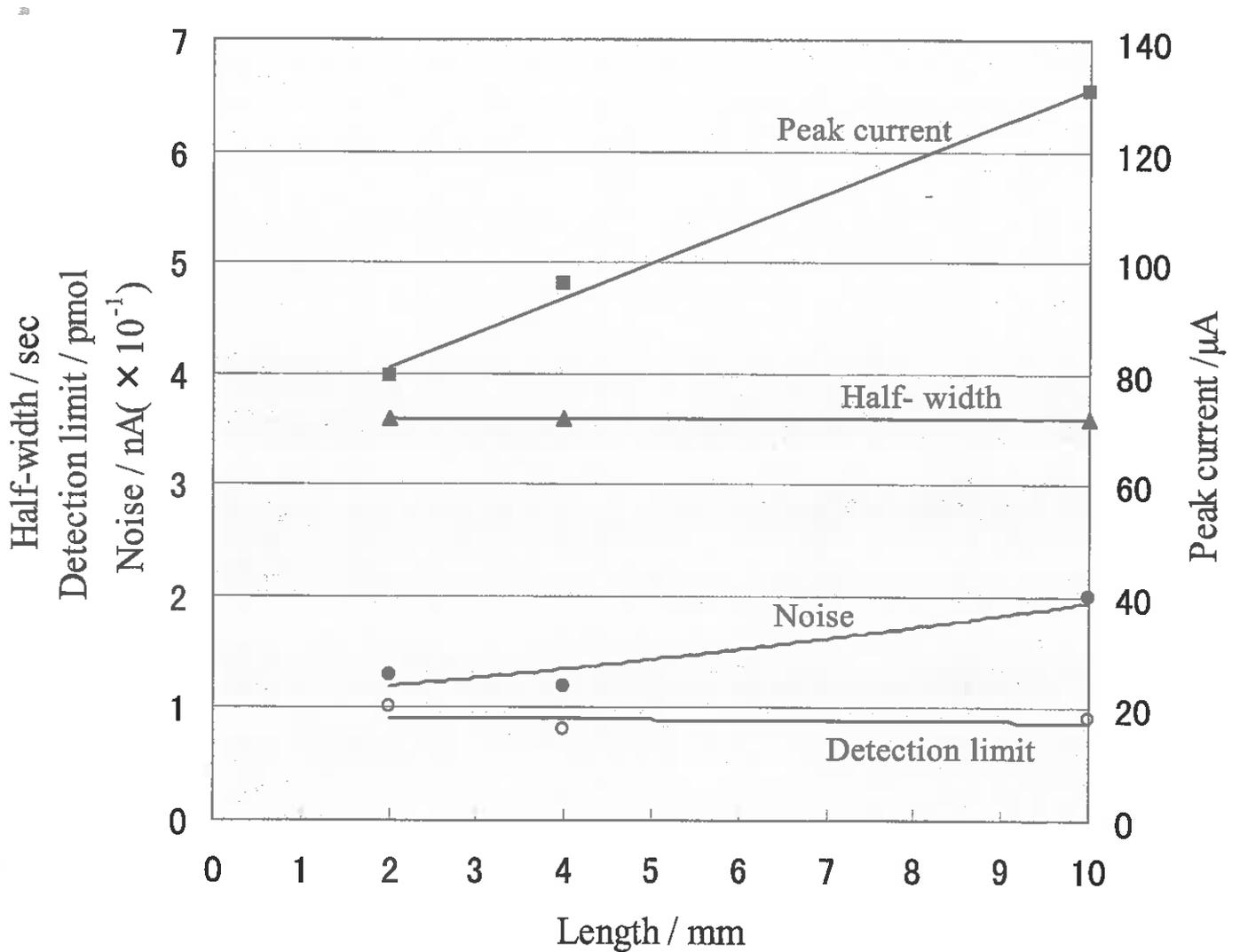


図 6-10 プラグ内臓時の電極長と応答特性

また、電極が長いほどプラグの効果が明らかであり、電極長 10mm のときに得られたピーク電流値は、プラグがない状態で $95.4 \mu\text{A}$ に対してプラグがあると $130.7 \mu\text{A}$ で 37%の改善効果が見られた。検出限界値は 1.8pmol に対して 0.9pmol と約 2 倍の感度向上となった。また、プラグの効果はピークの半値幅にもっとも顕著な効果を示している。すなわち、プラグがない場合の半値幅は、電極長が 2mm の時までは 3.6sec と同じであったが、4mm の時は 16%広がり 4.2sec となり、さらに 10mm では 33%広がって 4.8sec になっているのに対してプラグがある場合は、長さに関係なく 3.6sec 一定であった。さらに、外壁金属被覆電極時の半値幅は 6.3.2 項の結果から電極長が 7mm で 10.2sec であることから、導電性中空糸膜電極のデッドボリュウムの微少化は、半値幅の縮小により効果的に現れているといえる。これは、カラムにおいて分離された目的物質が、電極表面に到達するまでの間に受ける拡散や対流の影響を最小限にとどめていると考えられる。HPLC 用検出器ではカラムにおける分離特性を損なうことなく目的物質を検出できることは重要で、導電性中空糸膜の応用を考える際、プラグによる電極内部のデッドボリュウムの微少化が有効であることを明らかにした。さらに、この結果から内径のより小さな中空糸膜が HPLC 用電気化学検出器を構築する場合に有効であることも示唆された。

6.5 内径縮小による残留水酸化ナトリウムの排除

6.4.2 の結果から、導電性中空糸膜電極の反応室容量を微小化させることで検出感度を上げると共にシャープな出力波形が得られることが明らかとなった。そこで本節では、テフロンチューブと導電性中空糸膜との接合構造を改良し微小内径とした膜電極での効果を確認する。

6.5.1 内径縮小による特性試験

内径が 0.6 mm、電極長 7 mm の導電性中空糸膜を用い、テフロンチューブの内径 0.5 mm に近似させてデッドボリュウムの影響を同様に評価した。6.4.2 の膜電極内径 1.0mm に対するプラグの装着では、反応室を物理的に微小化させることができても被検出物質の層流に対しては、障害物となっておりその改善を試みた。

6.5.2 実験結果

ここで膜電極径の縮小化は、検出面積も縮小させてしまうことから出力となるピーク電流値が少なくなることが予想され予備実験を試みた。しかし逆に、乱流が生じないことで微量な糖検出が可能なことから、グルコース濃度を $10 \mu\text{M}$ に再設定し、 $10 \mu\text{l}$ 注入した際の結果を表 6-2 に示す。

表 6-2 内径 0.6mm の導電性中空糸膜電極特性

		Cu coated
Peak current	(μA)	10.2
Noise	(nA)	19
Detection limit	(pmol)	0.56

ピーク電流値は $10.2 \mu\text{A}$ 、ノイズは 19nA となり検出限界値 (S/N=3) は 0.56pmol となって、プラグ装着時よりも約 40%改善された。これは送液された被検出物質がテフロンチューブとほぼ同流量で膜電極に注入されるため、プラグ装着時よりもさらに拡散や対流の影響が少なくなり、検出限界値を下げたものと考えている。

6.6 ノイズ低減の検討

前節まで、感度を向上させる手段として検出するピーク電流値をいかに高く出力としてとらえるかという検討を導電性中空糸膜電極の潜在的にもつ残留水酸化ナトリウムの排除によって行ってきた。本節では、検出感度は検出信号とノイズ比によって決まるという観点からノイズの低減に着目して、検出限界値の低減の検討を行った。

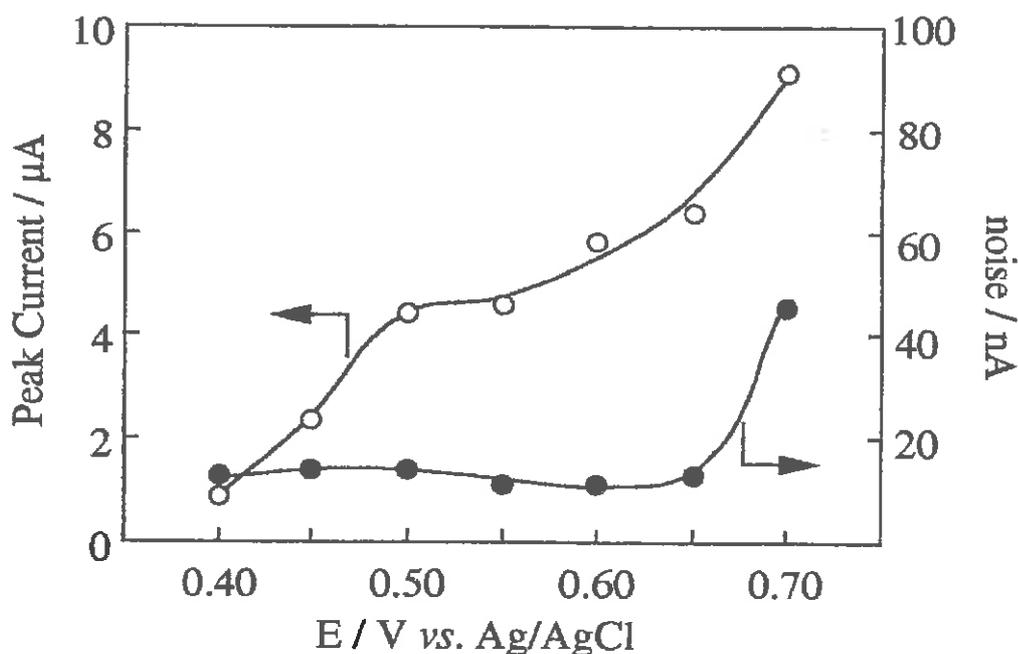
6.6.1 金/銅の積層電極による特性試験

プラグ装着や膜電極内径の縮小化は、導電性中空糸膜電極のデッドボリュー

ムを低減させピーク電流値を向上させると共に半値幅が狭くシャープな出力波形を可能にした。しかし、ノイズ低減に寄与する構造に至っていない。検出限界値を下げるためには、SN比上のノイズ低減は重要課題である。導電性中空糸膜に被覆する金属のうち金は大きな出力は期待できないが、ノイズが極めて少ない材質である¹⁴⁾。そこで酸化還元に伴う電子の授受を従来材質の銅に持たせ、ノイズの低減を目的として金を銅の下地に積層させて検討を行った。

6.6.2 実験結果

はじめに金を下地に積層させた銅被覆電極を用いて糖検出に適した電極電位を決定するための予備実験を行った。



Mobile phase : 0.15M NaOH
 Flow rate : 1ml/min
 Column : DIONEX AS7 (4mmx25cm)
 Injected Glc : 100 pmol
 Electrode : 7.28mm Cu/Au-MCH

図 6-11 Au 積層 Cu 被覆電極のピーク電流-設定電位特性
 電極長を 7 mm としグルコース濃度を $10 \mu\text{M}$ 一定にし、各電極電位において $10 \mu\text{l}$ を 3 回注入して平均値をとった。得られたピーク電流-設定電位特性

(Hydrodynamic Voltamogram) の結果を図 6-11 に示す。ピーク電流値は 0.40V から 0.50V まで上昇して一旦飽和した後 0.60V から 0.70V にかけて再び上昇した。また、ノイズは 0.40V から 0.60V まで低く安定していたが、その後急激に上昇した。このことから設定電位が 0.60V 付近が最も高感度となるが、3回測定したデータが安定しておらず結果として、ノイズが低く安定している 0.55V を設定電位とした。次に、5.5.1 節と同様にピーク電流、ノイズおよび検出限界値の測定を行った結果を表 6-3(b)に示す。また、比較データとして 6.5.2 項で得られた膜電極内径 0.6mm の銅被覆単独の導電性中空糸膜電極の結果を表 6-3(a)に併記した。

表 6-3 銅単独被覆電極と金を積層させた銅被覆電極との比較

		Cu coated (a)	Cu/Au coated (b)
Peak	(μA)	10.2	7.6
Noise	(nA)	19	6
Detection limit	(pmol)	0.56	0.24

実験結果から、ピーク電流値は $7.6 \mu\text{A}$ で銅被覆単独の電極より低い値となったが、ノイズは 19nA から 6nA となり銅単独被覆電極の $1/3$ 以下となった。また、検出限界値 ($S/N=3$) は 0.56pmol から 0.24pmol となり、感度が 2 倍に向上した。このことから、銅被覆導電性中空糸膜電極は、金を下地に積層させることで、ノイズを低く抑え高感度な電極構造となることを明らかにした。

6.7 多成分糖の同時分析

6.7.1 実験方法

6.6.4 項で高感度検出を可能にした内径 0.6 mm, 金を積層させた電極長 7 mm の銅被覆導電性中空糸膜電極を用い 5.5.1 と同様な実験方法にて多成分糖の検出を試みた. 本実験では, 7 種類の糖の混合液を作成し評価を行った. 糖サンプルには, ソルビトール(東和化成工業株式会社特級), グルコース, フルクトース, ラクトース, サッカロース, ラフィノース, マルトース(それぞれ和光純薬株式会社特級)をそれぞれ 10 μ M の濃度に設定し, 各糖とも 10 μ l 注入した.

6.7.1 実験結果

実験の結果を表 6-4 に示す. また, 得られた波形を図 6-12 に示す. 糖の検出限界値 (S/N=3) は, リテンションタイム順にソルビトールは 0.39pmol, グルコースは 0.24pmol, フルクトースは 0.39pmol, ラクトースは 0.38pmol, サッカロースは 0.58pmol, ラフィノースは 0.53pmol, マルトースは 0.82pmol であった.

表 6-5 多成分糖の同時分析

Number	Carbohydrates	Retention		Peak Current / μ A	Detection limit / pmol
		Time	/ min		
1	Sorbitol	1.82		4.6	0.39
2	Glucose	2.74		7.6	0.24
3	Fructose	2.98		4.6	0.39
4	Lactose	3.86		4.7	0.38
5	Saccharose	4.38		3.1	0.58
6	Raffinose	6.35		3.4	0.53
7	Maltose	7.77		2.2	0.82

Mobile phase : 0.15M NaOH

Flow rate : 1ml/min

Applied Potential : +0.55V vs. Ag/AgCl

Column : DIONEX CarboPac PA1(4mmx25cm)

Noise : 6nA

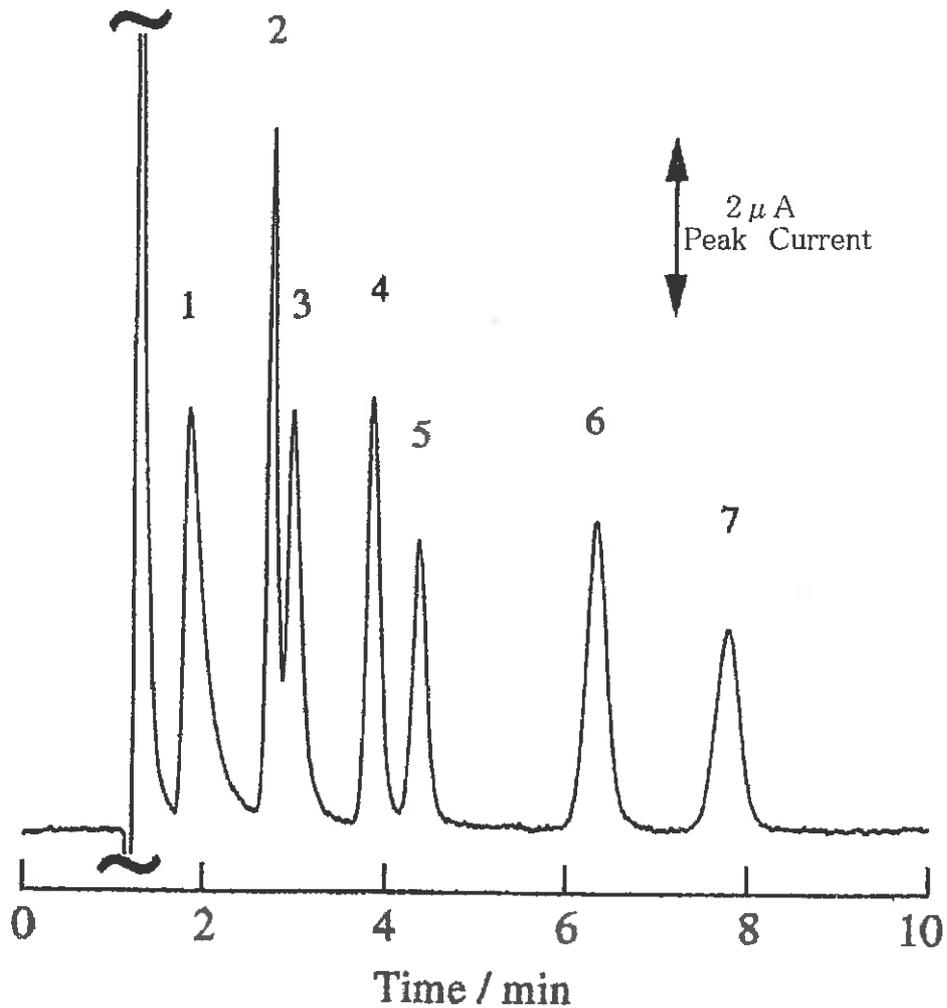


図 6-12 多成分糖の同時検出波形

7種類の糖は、すべてサブピコモルレベルで検出され、金を積層させた 0.6 mm 内径の銅被覆導電性中空糸膜電極が、それぞれの糖に対して高感度な検出が可能であることを明らかにした。実際の糖分析では、多種類の糖が存在することから混合糖の検出を試みたが、各々の糖は、そのリテンションタイムに沿って分離され検出できることを示した。

6.8 検討

導電性中空糸膜電極を HPLC における電気化学検出器の作用電極として、糖類を検出する上で最も高感度かつシャープなピーク電流値が得られる電極構造の検討を行ってきた。導電性中空糸膜電極は、独自の袋構造ゆえに電極であると同時に検体を受け入れる反応室の機能も兼ね備えている。しかしその反応室が残留水酸化ナトリウムを滞留させていることから感度の低下を招いていると考えられている。また、送液されるテフロンチューブとの内径差により反応室で乱流が生じている。本節では、残留水酸化ナトリウムを排除しシャープなピーク電流値を得る構造検討とノイズの低減による高感度検出について従来電極との比較を交えながら検討を行った。

6.8.1 導電性中空糸膜電極中の残留水酸化ナトリウム

移動相として使用する水酸化ナトリウムが導電性中空糸膜電極中に残留していると目的物質が送液された段階で見かけ上、糖濃度の低下が起こる。従来から使用されている薄層型の平面電極では、常に溶液が押し出される構造のため残留水酸化ナトリウムを配慮する必要がないが、検出表面積が少ないために高感度な検出が望めない。

導電性中空糸膜電極の残留水酸化ナトリウムを構造的に分析し、原因系を取り除く検討を行った。まず最初は膜電極の反応室に注目するが、膜自身の細孔部に着目し空孔容積を算出したところ反応室と同等の容積であることがわかった。そこで、多孔質中空糸膜の金属被覆部を外壁から内壁に変更し、細孔部を通過する初期段階で糖の検出をさせ、膜自身に存在する細孔部のデッドボリュームの排除を行った。その結果、ピーク電流値は約 10% 向上し $99.3 \mu\text{A}$ となりノイズは約 10% 低下して 20.0nA となった。これらの結果から算出された検出限界値(S/N=3)は約 30% 向上して 1.2pmol となった。一番顕著な効果は、半値幅に現れ 1/3 まで短縮され 3.6sec となった。

次に、導電性中空糸膜電極の反応室におけるデッドボリュームの検討を行った。反応室の容量を 0 にすることは送液の関係上不可能であるが、検討しなければならない構造が 2 箇所ある。まず一番目は、送液されるテフロンチューブ

の内径が 0.5mm に対してそれを受ける膜電極の内径がフローセルの構造上 1.0mm となっており、送液された段階で流路が広がり乱流が発生してしまう。この乱流は、ノイズの原因となり感度の低下を招いている。第二番目は、前述と同じ残留水酸化ナトリウムの問題である。

導電性中空糸膜電極の反応室容量を微少化させるためにプラグを装着し効果の確認を行った。その際、電極長を変化させプラグの効果の有無を評価した。実験の結果からプラグの効果は明確となった。ピーク電流値は、プラグがあることによって電極長を増加させると反応面積が増すためにピーク電流値が比例して増加した。しかし、プラグがない場合のピーク電流値は、電極長が 7mm まで増加したが、それ以上は残留水酸化ナトリウムの影響を受けて低下した。また、電極長さに対するノイズの関係では、プラグの有無にかかわらず上昇するもののプラグがある場合は、送液時の乱流が押さえられていることから明らかに低い値となっている。プラグの一番大きな効果は半値幅で、プラグがない場合は、電極長に依存してブロードなピークとなったが、プラグを装着させると電極長に全く依存せず 3.6sec と一定であった。これは、電極長を増加させても残留水酸化ナトリウムの影響を受けておらず、プラグの容積が膜電極容積に対して適正に保たれていることを示している。

また、検出限界値は電極長が 2mm の時にプラグがない状態で 0.66pmol の高感度を示しているが、この結果に対する見解は二つある。一つの考え方は 2mm という短い距離でプラグが装着されているが、組み立てられた精度が適正であったかという問題で、仮に極めて精度が高ければプラグがない場合より高感度になる可能性があるということである。もう一つの考え方は膜電極の内径が 1.0mm の場合の適正電極長は 2mm である可能性があるということである。すなわち、最適長さとなっている膜電極にプラグが装着されたため逆に乱流が生じ感度低下を招いたという見解である。どちらにしても電極長が短いことで高感度となっていることから導電性中空糸膜電極の長さを増して反応面積を上げることが高感度とならず、膜自身のもつ単位面積・単位長さによって効果的に電気信号が取り出せることが明らかとなった。

以上のように導電性中空糸膜電極のデッドボリュームを排除することによっ

て残留水酸化ナトリウムが減り高感度で半値幅の狭い電極構造が得られた。

6.8.2 導電性中空糸膜電極のノイズ対策

導電性中空糸膜電極は、極めて大きな表面積を有することから従来電極に比べ5.7.4に示すように二桁高い出力信号が得られている。しかし、ノイズも二桁に近い感度で検出してしまうため検出限界値を飛躍的に下げることが難しい。前項での検討は、残留水酸化ナトリウムを排除させることで、より高いピーク電流値とより狭い半値幅を得ようとするものであった。現出限界値を下げるためには、より高いピーク電流値を得るためのアプローチと同時に検出されるノイズいかに少なくするかである。本章での実験では、二つの項目について検討した。一つは、内外壁の検出金属間の干渉であり、もう一つは、二種類の金属をハイブリッド化させてその特徴を引き出そうとする方法である。

導電性中空糸膜電極の細孔部のデッドボリュームを排除するために外壁金属被覆から内壁金属被覆に変更したが、外壁部にわずかに形成される若干のメッキ層と干渉することでノイズが発生していることが考えられる。多孔質中空糸膜の内壁だけに無電解メッキを施すことは難しい。なぜなら外壁を全面的にマスキングさせることは不可能ではないがマスキング後にそのマスクを取り外す工程は、製造コストを極めて高いものにしてしまうことと外壁の細孔を維持した形で取り外すことは極めて難しいためである。内外金属壁が何らかの形で導通していると内壁金属部で未反応であった糖が外壁部で反応してしまいその信号が時間差となってノイズとなることが考えられる。そこで、電極を取り出す一部分だけをマスキングすることで製造コストを押さえ外壁細孔部を傷つけずに膜電極を製作し実験を行った。実験の結果、ピーク電流値は、ほとんど変化させずにノイズを1/2以下にすることに成功した。また、ノイズが低くなったことで半値幅も改善され3.0secから1.8secとなった。結果として検出限界値も1.49pmolから0.69pmolとなり約2倍の感度となった。

次に、被覆する金属材質の見直しを行った。導電性中空糸膜電極の被覆金属は、銅被覆電極で、アルカリ溶液中で電極表面に形成される酸化銅皮膜の触媒作用によって糖類の酸化反応を促進させその酸化電流を検出するものである。

導電性中空糸膜電極の被覆金属材質は 5.5.2 節の結果からニッケル、銅、白金および金の中で銅が一番検出限界値が低いことで選定を行った。4 種類の金属材質の中で金は、酸化還元反応が弱いために高い出力が得られず結果として被覆材質として選定されなかった。しかし、4 種類の材質の中でノイズが一番低いことから酸化還元上の電子の授受を銅に持たせ電気信号の伝達を金に分担させることでノイズが低く高出力な電極となると考え実験を行った。その結果、銅被覆単体の膜電極と比べるとピーク電流値は $10.2 \mu\text{A}$ から $7.6 \mu\text{A}$ に低下したがノイズは 19nA から 6nA と $1/3$ 以下と大幅に改善された。また、得られた検出限界値は 0.56pmol から 0.24pmol となり今までの最高感度を達成することが可能となった。

6.8.3 従来検出器との検出限界の比較

糖類の検出にあたっては、従来から示差屈折率器^{[100][101]}あるいは、 200nm 以下の短波長での紫外線吸収を利用した検出器^[102]が一般的に用いられている。しかし、これら検出器は、感度が低く高感度分析の用途には適さない。糖類の高感度な検出をするためのアプローチとして薬学や医学などの分野では、糖分子が数多くの水酸基を持っていることに着目し、ポストカラム反応を利用した蛍光検出器が採用されている。また、近年、糖類を電気化学的に検出する手法としてパルスアンペロメトリック検出器(PAD)が注目されている^{[113],[115]}。この手法は、金あるいは白金の電極にパルス状の電位を印加することにより電極表面の洗浄・再生を行いつつ電極反応に基づく電荷移動量を検出する方法である。また、この検出器は、他の検出器に比べて高感度に検出することが可能とされるが、電極表面に糖の酸化反応の中間体が付着しやすいために、電極に対して検出電位のほかに洗浄電位と再生電位の合計 3 種類をトリプルパルスとして短時間にかける必要があり操作が煩雑で再現性にも問題がある。

グルコースを用いた検出においてそれぞれの検出器による検出感度を表 6-5 に示し導電性中空糸膜電極の結果を追加した。この結果から、HPLC を用いた検出器としては導電性中空糸膜電極が最高感度となっている。

表 6-5 各検出器による検出限界値

導電性中空糸膜電極法	0.24 pmol
PAD(Au 電極)法	2.0 pmol
蛍光検出法	10~50 pmol
示差屈折率法	200 pmol

6.8.4 従来検出器との検出時間の比較

次に、島津製作所、横河アナリティカル・システムズ社から発行されている技術資料に基づき検出時間の比較を行った。島津製作所の検出器は薄層型平面電極(スぺーサタイプ)法で、横河アナリティカル・システムズ社(横河 AS 社)の検出器は PAD 法である。これらの比較の結果を図 6-13 に示す。

6 種類の糖に対して原理の違いが若干あるが同じ電気化学検出器として存在しているメーカーとの検出時間の比較を行った結果、パルスドアンペロメトリック(PAD)法と比べてソルビトールで 19 分が 2 分となり、グルコースで 9 分が 2.7

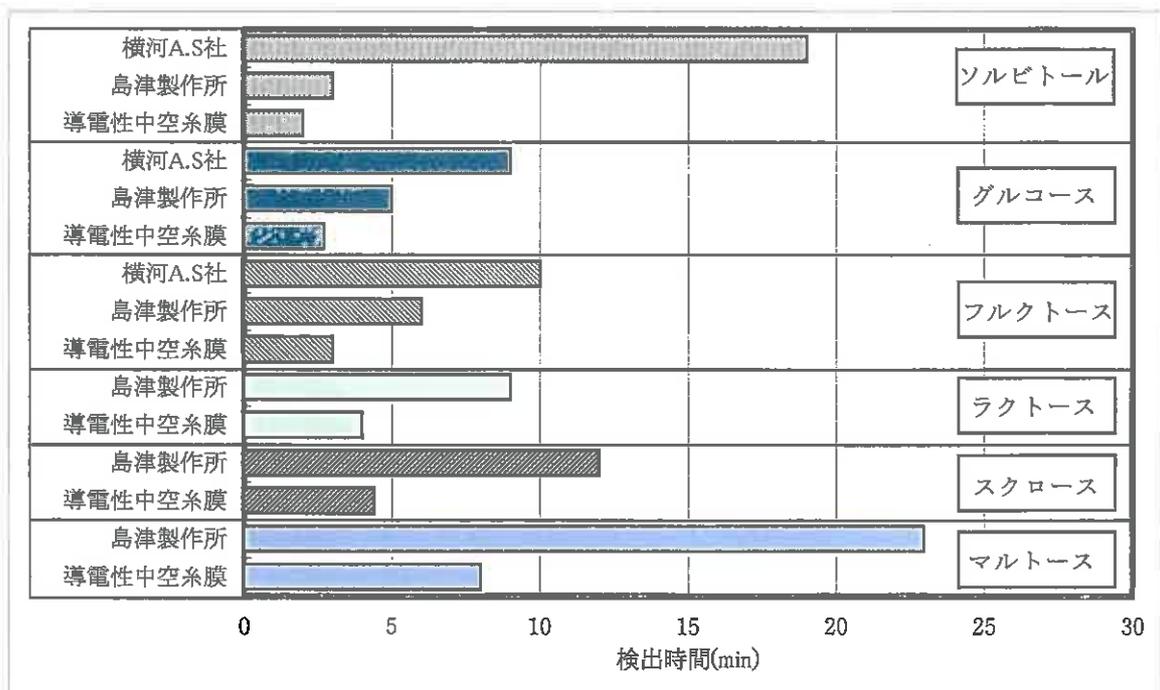


図 6-13 従来検出器の検出時間の比較

分となり、フルクトースでは10分が3分ということで大幅に検出時間を短縮することが明らかとなった。PAD法は、一度の測定に3種類の電位を印加する必要があるため検出時間が掛かることを示している。また、薄層型のスペーサ電極では、ソルビトールで3分が2分に、グルコースで5分が2.7分に、フルクトースで6分が3分に、ラクトースで4分に、スクロースで12分が4.4分に、マルトースでは23分が8分となり検出時間が大幅に短縮された。薄層型スペーサ法は、電極面積が限られているために移動相の流速を遅くしなければ高感度な検出ができないことを示している。

以上の結果から、ソルビトール、グルコース、フルクトース、ラクトース、スクロースおよびマルトースの6種類の糖に対して導電性中空糸膜電極は、検出時間が極めて短い時間で検出できることをはじめて示した。また、PADおよびスペーサタイプは、移動相の流速を下げなければ高感度が得られないのに対して、導電性中空糸膜電極法では、できる限り流速を早めることで検出時における残留水酸化ナトリウムの影響を排除することができ、極めて大きな電極面積で効率よく検出できるため、短時間で高効率に糖が検出できる原理であることを別原理での検出時間の比較を行うことではじめて明らかにした。

6.8.5 従来電極とのコスト比較

電気化学検出器の電極はロッドもしくはプレート状であるのに対して導電性中空糸膜電極は、表面のみの被覆部に金属が使用されることから必要とする金属の物理的量を単純に比較するだけで大幅なコストダウンが可能となる。具体的には、横河 A.S 社のロッド電極は Pt 製が 6.2 万円、Au 製が 5.4 万円であるのに対して本研究に用いた導電性中空糸膜電極は、電極表面部に数 $10\ \mu\text{m}$ の金属が存在しているだけでよく、製造原価および実売価格を配慮しても現状コストの 1/10 以下での提供が可能で、極めて安価な電極を提供することが実現した。

第 7 章

結 論

生体は、おびただしい種類のウイルス、細菌、カビ、原虫、寄生虫などの病原性微生物に対して防御するために、それぞれの微生物の特徴に応じて広範囲かつ多彩な免疫応答を行い、それらの排除と生体の維持につとめている。しかし、一旦、病原性微生物などによって感染を引き起こすと早急に診断をしなければ、適切な化学療法剤や抗生物質などを投与することができない。

現在、感染症の診断には、迅速かつ正確な診断方法として遺伝子診断法が多く用いられるようになってきた。この方法は、検体中の病原性微生物から直接遺伝子を抽出するため、微生物培養を必要としない。また、各々特有の遺伝子を単離、検出することによりその特定が簡便かつ迅速に行える利点がある。

遺伝子診断法には、細菌やウイルスからの遺伝子抽出が必要不可欠で、現在、化学的手法が主に用いられている。しかし、その操作は繁雑で自動化が進んでおらず、マニュアル操作に頼っており迅速な診断方法が望まれている。

近年、病原性微生物による感染に特定の糖が関与しているということが解明されてきた。この発見は、特定の部位に選択的に結合する癌を含むさまざまな病気の予防や治療の面で重要な意味を持っている。現在、細菌やウイルスが生体宿主の細胞表面にある糖に選択的に結合していることが多くの研究者の実験的証拠によって補強されている。その理由は、生体内における糖質の解明は極めて微量かつ複雑な糖鎖によるもので、生体内でのメカニズム解明が進まず、部分的な実験による実証に頼らざるを得ないためである。また、生体内の極めて微量な糖自身を検出する手法が確立されていないことも研究を阻害する要因となっている。したがって、微量な糖を高感度に検出する技術の確立は、これらの分野において極めて意義深いことである。

膜の新しい機能を研究する中で誕生したこの導電性中空糸膜は、金属を被覆させることで従来の分離膜にはない画期的な手法を取り入れ応用することが可能となった。すなわち、膜自身を導電体として直接「直流通電」させ病原性微生物を殺菌し、その遺伝子を抽出することで全く新しい診断手法を確立したことである。また、第2番目には、この導電性中空糸膜を「電界効果」を利用した電極と濃縮器に用いるという画期的な手法により、大腸菌

O157 やヘルペスウイルスの遺伝子の抽出をはじめて実用化レベルまで感度を上げたことである。さらに第3番目は、導電性中空糸膜の被覆金属材質と膜自身の極めて大きな表面積に着目し「電気化学」的手法を用いてアルカリ溶液中で分子やイオンを検出する酸化還元電極として全く新たな応用分野を構築したことである。この研究によって高速液体クロマトグラフィの検出器の感度が上がり微量な生体内の糖まで分析可能となれば、感染症に関する糖鎖解明の研究をさらに掘り下げていくことに極めて有効な手段となる。

これらの研究に用いられた電子工学的手法は、現代社会が求める医学、薬学、臨床医学および糖鎖生物学などのさまざまな分野において、領域を越えた新たな学術ジャンルを形成するもので、21世紀における全く新しい工学分野を構築する研究といえる。

このような背景から、本章では、得られた結果を総括し、本研究の結論とする。

第3章 “導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌と遺伝子の抽出”に関して

- 1) 導電性中空糸膜を用いた細菌の殺菌では、通電する電流値、時間および波形に相関関係を見いだした。一番顕著な結果は通電する波形に現れた。たとえば大腸菌の場合、電流値を100 mA 共通にして直流(DC)、パルス(PC)および交流波形(AC)の3種類で比較すると殺菌効率は、それぞれ100%,81.4%および25.9%となり交流波形は効果が無く直流波形が最も効果的であった。
- 2) 殺菌に伴う細胞内物質の抽出では、殺菌のときと同じように通電する電流波形による効果の違いが得られた。また電流の大きさでは、核酸およびタンパク質共に100 mA よりも200 mA のほうが相対漏出量は多く効果が高いことが明らかとなった。
- 3) 大腸菌 O157 の単独試料を用いた検討で、導電性中空糸膜に電流を

流すことで、膜に捕捉された細菌から遺伝子が抽出されることをはじめて見出した。

- 4) 遺伝子の抽出感度は、従来の導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌と同様に、電流値依存性が確認され、DC 100, 200, 300 mA の中で 300 mA 通電時が最も優れた感度 (10^7 CFU/ml) を示した。しかし、400, 500 mA の通電では、遺伝子の収量がほとんど変わらず、特定電流値を越える通電は遺伝子を断裂する可能性があると考えられる。
- 5) 大腸菌 O157 懸濁液の吸引前に、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を添加したところ大幅に感度が向上した。これは、SDS の持つ細菌細胞膜の軟化作用を利用したもので、その濃度の増加に伴なって抽出感度が改善された。最も抽出感度の改善が認められた SDS 濃度は 5%で、300 mA 通電では 10^5 CFU/ml まで抽出が可能となった。またそれ以上の濃度では、PCR の阻害を引き起こし逆効果であった。
- 6) 実際の糞便には 1g 中に細菌が 10^{11} 個程度と多くの細菌が含まれているため、大腸菌 O157 の他に別の細菌が混入している混合試料からの遺伝子抽出を試みた。大腸菌 O157 単独試料と比べて抽出感度は 2 桁ほど低下したものの、 10^7 CFU/ml まで検出可能であった。
- 7) 大腸菌 O157 が接種された糞便試料を用いて同様に遺伝子抽出操作を行った。固形物や挟雑物質を前処理として排除するため、免疫磁気分離工程を付加した。その結果、混合試料と同様に大腸菌 O157 の濃度が 10^7 CFU/ml 以上の試料から遺伝子の抽出が認められた。
- 8) 従来の化学的抽出法と比較すると、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法は、抽出工程数およびその所要時間がともに少なく、簡便性と迅速性に優れた手法であることが判明した。また、電源とポンプと

いった単純な装置のため自動化の可能性を有した全く新しい抽出であることが示された。一方、その抽出感度は、混合試料や糞便試料において従来の診断法より2桁程度劣っており課題が残った。

第4章 “導電性中空糸膜を用いた電界効果による遺伝子の抽出と診断” に関して

- 9) 導電性中空糸膜を用いた電流通電による遺伝子抽出では、感度を向上させることに限界があったため、遺伝子のもつ負の電荷に着目し、膜を電界効果の電極として、これまでとは異なった観点から検討した。その結果、大腸菌 O157 単独試料を用いた場合、電流通電による遺伝子抽出より10倍高い感度 (10^4 個/ml) が得られた。
- 10) 電界効果を利用した遺伝子抽出の感度は、導電性中空糸膜に印加する電界強度と印加時間に依存し、それぞれ 2 V/cm, 10 分が最適条件であることがはじめて明らかとなった。
- 11) 糞便試料を用いた場合、大腸菌 O157 単独試料と比べると感度低下が認められたものの、電流通電による遺伝子抽出より10倍感度が向上した。
- 12) さらに PCR の原理を考慮して、糞便から遺伝子を抽出した後、新たに遺伝子濃縮操作を付加し、従来の診断法と等しい 10^5 個/ml まで抽出できることを新たに見出した。この遺伝子濃縮操作は、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出において極めて有効な手段であると考えられる。
- 13) 電流通電による遺伝子抽出法と対比すると、1工程多く、また時間も20分程度長いですが、抽出感度は100倍に改善された。また、電流通電による遺伝子抽出法よりも工程や時間では多少劣るが、従来の化学的抽出法と比較した場合には、工程数が少なく、その所要時間も約半分で済

むことが示された。このことから、電界効果を利用した遺伝子抽出は膜の利用法が全く異なるものの、セルが追加された以外は装置構成には変わりがなく、自動化の可能性を十分有している。

- 14) 大腸菌 O157 に対して有効性が示された電界効果を用いた遺伝子抽出法を、単純ヘルペスウイルス (HSV) に適用した結果、同様にウイルスに対しても有効な方法であることがはじめて確認された。
- 15) HSV の遺伝子抽出において、その条件を改めて検討したところ、HSV の遺伝子を抽出する電界印加時間は、大腸菌 O157 よりも短かく 5 分であることが明らかとなった。
- 16) 導電性中空糸膜を濃縮にも用いることで HSV に対して 100% の捕捉能力を有していることがはじめて明らかとなった。また、この手法は、遺伝子抽出とウイルス濃縮の両者の機能を兼ね備えた全く新しい遺伝子抽出法であることを示した。
- 17) 従来のウイルス濃縮は、超遠心機によって数時間実施されており、このウイルス濃縮工程を含めると、導電性中空糸膜による遺伝子抽出は、従来の化学的抽出法よりも所要時間が約 1/4 に短縮され、しかも 4 工程省略できることが判明した。したがって、病原性ウイルスによる感染症の診断に対して画期的な抽出法であることが示された。
- 18) 抽出感度は、PCR の検出限界である 10^4 TCID₁₀₀/ml をさらにすすめ 10^3 TCID₁₀₀/ml となり、本手法はウイルス遺伝子の抽出感度において優れていることを示すことができた。

第5章 “導電性中空糸膜を用いた電気化学法による糖類の検出” に関して

- 19) 導電性中空糸膜を高速液体クロマトグラフィの検出電極として用い、ニッケルおよび銅被覆電極の酸化還元起因する電流変化のサイクリックボルタモグラムを得た。それぞれの金属とも数 Ω/cm 程度の抵抗値を持つためにブロードなピークとなったが、グルコース濃度に依存して酸化波および還元波が変化していることで糖の検出に導電性中空糸膜が応用できることをはじめて実証した。

- 20) 銅を用いてこの反応を説明すると、アルカリ溶液中で銅は Cu(II)(OH)_2 を経て Cu(III)OOH となり、グルコース共存下で電気化学的な触媒作用が働き、糖のヒドロキシル基の酸化と銅の酸化物の還元反応が生じる。また、共存する糖によって Cu(III) が消費されるためにサイクリックボルタモグラムにおける還元波は糖の濃度に依存して減少する結果が得られる。したがって、ニッケルおよび銅を被覆した導電性中空糸膜電極は、電気化学触媒反応によって糖が酸化されることがはじめて明らかとなった。

- 21) 導電性中空糸膜電極の被覆金属材質の選定では、銅が最も検出感度かよく 2.1pmol であった。また、電極長は、ピーク電流値、ノイズおよび電極の製造技術を配慮して 8mm が最適であることが示された。

- 22) 21)の条件で検量線を得るための実験を行った結果、グルコース濃度 $10\sim 200\ \mu\text{M}$ の範囲で直線性が得られ相関係数は 0.998 となり導電性中空糸膜電極が極めて良好な直線性を示すことが明らかとなった。

- 23) グルコース濃度を $20\ \mu\text{M}$ と一定にし、 $20\ \mu\text{l}$ の注入を30回繰返した際の再現性では、ベース電流がやや減少する傾向にあるが、ピーク電流値は安定しており30回のグルコース注入に対する応答再現性は相対標

準偏差で5.3%であり良好な結果が得られた。

- 24) 耐久性では、再現性試験の10倍濃度の $200\mu\text{M}$ に設定して $20\mu\text{l}$ を一日に5回注入する条件を設定したが、この電極の使用目的が数ピコモル程度の高感度領域という範囲であれば、一度の注入量が 2000pmol で異常に高い濃度での耐久性試験となり8日目でクラックが入ってしまうことはやむを得ない結果と考えている。しかし、この導電性中空糸膜電極の目詰まりなどを含む構造的限界を見極める意味では、興味深い結果であると考えている。
- 25) 従来電極の比較では、ニッケル被覆した導電性中空糸膜電極を用い、BAS社のニッケルロッド電極との比較を行ったが、ピーク電流値は約350倍高く膜電極の表面積の大きさが高出力となっていることをはじめに明らかにした。しかし、ノイズもあわせて検出してしまうためこれらの課題を解決することで、さらに高感度な検出器となると考えられる。

第6章 “導電性中空糸膜を用いた糖類の高感度検出” に関して

- 26) 導電性中空糸膜電極の感度低下を招いている残留水酸化ナトリウムを検討した結果、膜自身の空孔部が反応室とほぼ同容積とわかりこの部分の残留水酸化ナトリウムを排除するために金属被覆部を外壁から内壁へ変更し評価した結果検出限界値は 1.7pmol から 1.2pmol となり約30%感度が向上した。
- 27) 内壁銅被覆への変更効果は、ピーク電流波形の半値幅に現れ外壁金属被覆時の半値幅が 10.2sec であったものが内壁銅被覆にすることで 3.6sec となり約 $1/3$ に短縮され膜自身の空孔部にある残留水酸化ナトリウムを排除した結果を示すことができた。
- 28) 内壁銅被覆によって電極長の関係を再度確認した結果、外壁金属被

覆時の最大ピーク電流値の電極長さが13mmであるのに対して内壁金属被覆では7mmの長さとなり反応室と同容積の膜自身の空孔部が排除されたことでピーク電流の電極長に対する応答性が改善されたことを示した。

- 29) 次に反応室内の残留水酸化ナトリウムをプラグの装着で改善する構造検討を行った結果、電極長に依存したピーク電流値の飽和は起こらず反応面積に比例したピーク電流値が得られた。すなわち、この結果は、反応室の残留水酸化ナトリウムを排除できたことを示している。
- 30) 反応室を微小化するために従来1.0mm内径の導電性中空糸膜電極をテフロンチューブの内径0.5mmに近接させ内径0.6mmの銅被覆導電性中空糸膜電極に変更し評価を行った結果、検出限界値は0.56pmolとなり一桁検出感度を上げることが可能となった。
- 31) 検出感度を上げるためには、ピーク電流値を向上させることと同時にノイズを低減することも重要である。そこでノイズが一番低い金属被覆材質である金を下地に積層させ酸化還元力の強い銅を表面に被覆することで機能分離させたハイブリッド電極を製作して検出限界値の評価を行った結果、検出限界値はさらに低下して0.24pmolとなり電気化学検出器の分野では、最高感度の電極であることを明らかにした。
- 32) この電極を用い具体的な糖の同時検出を行った。その結果、リテンションタイム順にソルビトールは0.39pmol, グルコースは0.24pmol, フルクトースは0.39pmol, ラクトースは0.38pmol, サッカロースは0.58pmol, ラフィノースは0.53pmol, マルトースは0.82pmolで7種類の糖すべてにおいてサブピコモルの感度をはじめて示すことができた。
- 33) 6種類の糖に対して原理の違いが若干あるが同じ電気化学検出器と

- して存在しているメーカーとの検出時間の比較を行った結果、パルスドアンペロメトリック(PAD)法と比べてソルビトールで 19 分が 2 分となり、グルコースで 9 分が 2.7 分となり、フルクトースでは 10 分が 3 分ということで大幅に検出時間を短縮することが明らかとなった。PAD 法は、一度の測定に 3 種類の電位を印加する必要があるため検出時間が掛かることを示している。
- 34) また、薄層型のスぺーサ電極では、ソルビトールで 3 分が 2 分に、グルコースで 5 分が 2.7 分に、フルクトースで 6 分が 3 分に、ラクトースで 4 分に、スクロースで 12 分が 4.4 分に、マルトースでは 23 分が 8 分となり検出時間が大幅に短縮された。薄層型スぺーサ法は、電極面積が限られているために移動相の流速を遅くしなければ高感度な検出ができないことを示している。
- 35) 導電性中空糸膜電極を用いた電気化学検出器が短時間に検出できる理由は、流速を早めることによって残留水酸化ナトリウムの影響を排除でき、極めて大きな電極面積で効率よく検出できるため、短時間で高効率に糖を検出できることをはじめて明らかにした。
- 36) 製造上における電極コストの比較では、電気化学検出器の電極はロッドもしくはプレート状であるのに対して導電性中空糸膜電極は、電極表面部に数 $10\ \mu\text{m}$ の金属が存在しているだけでよく必要とする金属の物理的量を単純に比較するだけで大幅なコストダウンが可能となり、低コストな電極を提供できることを示した。
- 37) 現状の糖検出感度では、アガリクスと共に抗癌成分として注目される漢方生薬の乾燥きのこ中のマンニトール残存量分析、虫歯抑制甘味料として脚光を浴びているキシリトールの血清、唾液中の残存量として検出される微量糖(2~3pmol)の分析および微量検体から多成分検出をするために分注希

積された低濃度検体の糖分析には、極めて威力を発揮する検出器感度を達成している。

以上が得られた結論で、最後に導電性中空糸膜の今後の課題を述べる。遺伝子の抽出法においては、細菌やウイルス遺伝子を簡単かつ迅速に抽出できることが示されたものの、臨床検査への適用を考えた場合、満足する抽出感度ではない。本手法の感度が最低1桁、さらに2桁改善されれば感染症の遺伝子診断にさらに大きく寄与すると考えられる。また供試細菌、ウイルスはともに1種類しか用いていない。抽出機構を考慮するとそれらの性質や構造によって、感度に大きな差は生じないものと考えられるが、導電性中空糸膜のポアサイズは0.1 μm であり、B型肝炎ウイルス（大きさ42 nm）のようにそれよりも小さな病原性微生物を対象とする場合、濃縮効率の低下、それによる感度低下が予想される。したがって、遺伝子抽出に使われる導電性中空糸膜のポアサイズの検討も求められる。また、実際の血液などの臨床材料からのウイルス遺伝子の抽出が挙げられる。前述のようにPCRは、検体由来のタンパク質や脂質等が抽出サンプルに含まれていると、それらが阻害物質となって遺伝子増幅が行われぬ。ウイルス感染症の診断は、血液を臨床材料とすることがほとんどであり、実際の血液を用いてその有効性を検討する必要がある。

生体内の糖の検出においては、遺伝子の検出感度と同じようにもう1桁から2桁、すなわち 10^{-15} のフェムトモル(fmol)の検出が可能となると生体内の糖鎖分析が飛躍的に向上すると考えられる。感染症を含む多くの治療に用いられ数千年の実証的見地から実績のある漢方方剤に用いられる生薬の医学的効果の解明などは、ドラッグデリバリシステム上の検出分析を無くして不可能である。これらの解明には、単糖だけではなく多糖類の検出を視野に入れ今後検討する必要がある。また、糖類を分離する上でさらに高精度な分離カラムも含めた検討が望まれる。

これらを克服することによって、病原性微生物による感染症の迅速な遺伝子診断が行われ、さらに、それらを未然に防ぐ糖鎖の解明に大きく寄与する検出器が近い将来誕生することを確信している。

謝 辞

本研究は、10年間に渡って北海道工業大学 工学部 応用電子工学科と共に研究を行ってきた「導電性中空糸膜の応用研究」を中心に継続的に行われた研究の成果をまとめたものである。本研究の分野は工学，微生物学および分析化学の分野と非常に幅広く，学術的に大変難しい研究であるにもかかわらず，10年間にわたって研究ならびにご指導して頂いた有澤準二教授に感謝申し上げます。原著論文ならびに本論文の作成にあたっては研究者としての課題の取り組み方や論文作成に関わる細部に至るまで懇切丁寧にご指導して頂きあらためて心から感謝申し上げます。

本学 応用電子工学専攻主任の今井和明教授には，お忙しい中，本論文をまとめるに際してご査読頂いたことに深く感謝申し上げます。また，三澤顕次教授には，電気学会への原著論文投稿時にご指導頂き，また，本論文作成時にも，ご査読頂いたことに感謝申し上げます。さらに，木村主幸教授には，微生物に関する知識および取り扱いなどを具体的にご指導して頂き，また，本論文のご査読に際し専門的な見地から多岐にわたってご指導頂いたことに感謝申し上げます。加えて，本論文の作成にあたり一番具体的な形でアドバイスを頂いたのが，菅原俊継講師で研究期間がオーバーラップしていたこともあり，共通した内容に対して共に検討して頂いたことに感謝申し上げます。

導電性中空糸膜を10年間にわたって研究していく中で糖の分析に関して幅広くご指導を頂いた北見工業大学の井上貞信教授，星座教授に感謝申し上げます。特に宇都正幸助教授には分析化学の分野での知識と理化学分野での

見識のとらえ方などについてご指導して頂き深く感謝申し上げます。

さらに、糖鎖を研究するにあたって当時、北里大学東洋医学研究所の所長で現在、同大学大学院感染制御学府の山田陽城教授および清原寛章助教授には、漢方処方後に生薬のドラッグデリバリーシステム上の糖などを高感度検出する研究に関してご助言を頂き感謝申し上げます。また、糖を検出する上で高速液体クロマトグラフィに関してご指導を頂いた東京理科大学薬学部の中村洋教授に感謝申し上げます。

本研究にあたって、企業人としての立場で、研究を行いながら商品化を前提とした開発はどうあるべきかを常日頃考えてきた。また、研究を行いながらその専門分野を極めていく方向と商品化を進めて販売していく方向とは、時として相反するもので、葛藤する日々もあった。しかし、今では共に必要な2つの方向を見極めながら、社会に貢献できるすばらしい技術を世に贈る人生を全うしたいと考えている。このように多くのことを学ぶ機会を提供して頂いた北海道工業大学 柴田拓二学長にあらためて心から感謝申し上げます。

本研究を通じていろいろな形でアドバイスならびにご支援頂いた関係各位の方々、また北海道工業大学の学部生、大学院生ならびに諸先生に心から感謝申し上げます。また、本論文作成上で影ながらご支援を頂きお導きいただいた同大学学長補佐の丸山晃市教授に感謝申し上げます。

最後に、本研究ならびに本論文作成にあたり並々ならぬご指導とご鞭撻を賜った株式会社ニックス 青木伸一取締役社長に深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] 日本生物物理学会編：“生体膜生命の基本形を形づくるもの” 吉岡書店 (1996)
- [2] 筏 義人：“人工臓器物語-コンタクトレンズから人工心臓まで-” 裳華房(2002)
- [3] 仲川 勤 編著：“分離機能膜の開発と応用” (2001)
- [4] 透析療法合同専門委員：“血液浄化療法ハンドブック第2版” 共同医書出版社 (1998)
- [5] 虫明功臣, 石崎勝義, 吉野文雄, 山口高志：水環境の保全と再生, 山海堂 (1990)
- [6] 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦, 今村敏英, 門谷完一：“中空糸膜モジュールおよびその製造方法”, 特願平 3-149349, (1991-05)
- [7] 五十嵐治, 佐野正勝, 勝浦信夫, 中山敦：“中空糸膜モジュール”, 特願平 3-221280, (1991-08)
- [8] 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦, 今村敏英, 門谷完一：“金属層を有する樹脂膜およびその製造方法”, 特願平 4-75773 (1992-02)
- [9] M.Sano, N.Katsuura, O.Igarashi, A.Nakayama, T.Imamura, K.Kadotani,: “ RESIN MEMBRANE HAVING METALLIC LAYER AND METHOD OF PRODUCING THE SAME “ ,US Patent 07/842,705 (1992-02), 3216904.(1996-04)
- [10] M.Sano, N.Katsuura, O.Igarashi, A.Nakayama, T.Imamura, K.Kadotani,: “ Resin membrane having metallic layer and method of producing the same “ ,UK Patent 9204371.0 (1992-02), 2254340 (1995-08)
- [11] O.Igarashi, M.Sano, N.Katsuura, A.Nakayama, M.Matsubara, M.Uto, “HOLLOW FIBER ELECTRODE AND ELECTROCHEMICAL DETECTOR” US Patent

- 08/172,326 (1993-12)
- [12] 栗岡隆顕：“腸管出血性大腸菌 O157 および Vero 毒素の ELISA 検出キット（オーソ社 *E. coli* O157 およびオーソ VT1/VT2）に対する臨床的評価”，臨床と微生物，24，pp. 123-130 (1997)
- [13] 山中喜代治：“迅速診断をどのように活用するか”，臨床と微生物，27-suppl.，pp. 589-592，近代出版 (2000)
- [14] 玉造滋，白鳥康史，加藤直也：“Single-tube, single enzyme RT-PCR 法による IFN 治療患者の HCV-RNA モニタリング”，肝胆膵，30，pp. 921-925 (1995)
- [15] 藤野達也，八橋弘，浜田るみこ：“アンプルコア HCV による HCV-RNA 測定の臨床的意義”，医学と薬学，35，pp. 223-228 (1996)
- [16] 青木正和，片山透，山岸文雄：“PCR 法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット（アンプルコアマイコバクテリウム）による臨床検体からの抗酸菌迅速検出”，結核，69，pp. 7-19 (1994)
- [17] 北村聖：“HIV 関連検査の進歩”，日本 ME 学会雑誌，12-10，pp. 11-16 (1998)
- [18] 飯野四郎：C 型肝炎最前線，日本医事新報社 (2000)
- [19] 山田雅哉，井上和明，与芝真：“C 型肝炎の診断プロトコル”，Medical Technology，28，pp. 6-18 (2000)
- [20] 今西二郎 編：“感染症の宿主防御機構-理論と実際-”，医薬ジャーナル社(2002)
- [21] 池北雅彦，入村達郎，辻 勉，堀戸重臣，吉野輝雄：“糖鎖学概論”，丸善株式会社(1997)
- [22] 信沢孝一 編：“複合糖質-細胞認識から病変まで-” 共立出版株式会社(1992)
- [23] 南原利夫，池川信夫：“最新 高速液体クロマトグラフィー”，理論社(1988)

- [24] 中川照眞, 牧野圭祐: “ライフサイエンスのための高速液体クロマトグラフィー-基礎と実験-” 廣川書店(1988)
- [25] 牧野圭祐 監訳: “生体高分子の高速液体クロマトグラフィー-タンパク質, 核酸, 多糖類の HPLC-”, 廣川書店(1992)
- [26] 奥田忠雄, 川嶋拓治, 保母敏行, 本水昌二: “基礎教育分析化学” 株式会社東京教学社(2000)
- [27] 会田 薫, 小林哲郎: “糖尿病の診断と分類”, 臨床医, vol.28, pp1939-1943(2002)
- [28] 須田俊宏 編著: “糖尿病診断の実際”, 永井書店(2000)
- [29] 岩本安彦 編著: “糖尿病合併症-どう対処するか-” 中外医学社(1998)
- [30] 佐藤泰昌, 三嶋廣繁, 玉舎輝彦: “漢方薬の感染症治療への有用性に関する基礎的・臨床的検討”, 岐阜大医紀 48,87^96,(2000)
- [31] K.Ohsawa, Y.Yoshimura, S.Watanabe, H.Tanaka, A.Yokota, K.Tamura, K.Imaeda,; “Determination of Xylitol in Human Serum and Saliva by Ion Chromatography with Pulsed Amperometric Detection”, *Anal. Sci.*, **10**, 165 (1986)
- [32] 山本直樹 編: “ウイルスを知る”, 羊土社 (2002)
- [33] 大沢利昭, 小浪亜紀子 邦訳: “レクチン” 学会出版センター(1992)
- [34] Nathan Sharon and Halina Lis: “Carbohydrates in Cell Recognition”, *SCIENTIFIC AMERICAN January* (1993)
- [35] 平潟洋一: “感染症診断の進め方”, 臨床検査, 42, pp. 1213-1227 (1998)
- [36] 内村眞佐子: “便からのペロ毒素の検出法”, 検査と技術, 28-3, pp. 231-236, 医学書院 (2000)
- [37] 東匡伸, 小熊恵二編: シンプル微生物学, 南江堂 (1992)

- [38] 小松方, 相原雅典: “グラム染色”, 臨床と微生物, 27-suppl., pp. 752-758, 近代出版 (2000)
- [39] 小栗豊子: “感染症の迅速検査としての塗抹検査—グラム染色—”, 臨床微生物検査ハンドブック, pp. 8-12, 三輪書店 (1996)
- [40] Kruczak Filipov P and Shively RG: “Gram stain procedure.”, Clinical Microbiology Procedures Hndbook, 1, American Society for Microbiology (1992)
- [41] 山下順香, 柴田弘俊, 出口松夫: “HIV-1, 2 抗体測定法”, 検査と技術, 27-13, pp. 1481-1487, 医学書院 (1999)
- [42] 高井信子: “腸管出血性大腸菌 O157”, 臨床と微生物, 27-suppl., pp. 612-620, 近代出版 (2000)
- [43] 柏木征三郎, 林純, 青山巖: “イムノクロマトグラフィー法を利用した血中抗 HIV-1/2 抗体検出用キット「ダイナスクリーン・HIV-1/2」の基礎的, 臨床的検討”, 新薬と臨床, 48, pp. 111-118 (1999)
- [44] 竹田多恵, 山形匡子: “イムノクロマトグラフィー市販キットを用いた *Escherichia coli* O157 患者の迅速診断”, 感染症学雑誌, 72, pp. 834-839 (1998)
- [45] 栗岡隆顕: “腸管出血性大腸菌 O157 および Vero 毒素の ELISA 検出キット (オーソ社 *E. coli* O157 およびオーソ VT1/VT2) に対する臨床的評価”, 臨床と微生物, 24, pp. 123-130 (1997)
- [46] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N: “Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia”, Science, 230, pp. 1350-1354 (1985)
- [47] 広瀬徹: “ウイルス量をどう測るか—RT-PCR 法とその応用—”, 日本 ME 学会雑誌, 12-10, pp. 17-26 (1998)
- [48] David HP, Thomas FS, Fred CT and Thomas JW eds.: “In vitro nucleic acid

- amplification techniques”, *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications.*, pp. 51-87, American Society for Microbiology (1993)
- [49] 三浦俊昭, 玉造滋: “DNA 診断”, *検査と技術*, 27-12, pp. 1425-1432, 医学書院 (1999)
- [50] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell 著, 野田春彦, 丸山工作, 石川統, 須藤和夫, 山本啓一, 丸山敬, 三井恵津子訳: *分子細胞生物学 (上)*, 東京化学同人 (1997)
- [51] 山科郁男監修, 川寄敏祐編集: *レーニンジャーの新生化学 (上)*, 廣川書店 (1998)
- [52] Donald Voet, Judith G. Voet 著, 田宮信雄, 村松正実, 八木達彦, 吉田浩訳: *ヴォート生化学 (下)*, 東京化学同人 (1996)
- [53] 葛西扶美夫: “導電性多孔質中空糸膜を用いた電気殺菌と遺伝子抽出に関する研究”, 北海道工業大学大学院博士論文 (1998)
- [54] L. Concha, K. Kimura, J. Arisawa, K. Misawa and O. Igarashi: “Electrical sterilization on *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* using metal coating hollow fiber membrane”, Technical report of IEICE, MBE97-111, pp. 1-7 (1997)
- [55] 菅原俊継: “導電性膜を用いた薬剤耐性日和見感染菌に対する電気殺菌の効果に関する研究”, 北海道工業大学大学院修士論文 (1998)
- [56] 葛西扶美夫, 岸田英樹, 木村主幸, 三澤頭次, 五十嵐治, 有澤準二: “導電性中空糸膜を用いた水の電気殺菌”, *医用電子と生体工学*, 36-1, pp. 15-21 (1998)
- [57] 半田宏: *わかりやすい遺伝子工学*, 照晃堂 (1997)
- [58] 西庄勇: “遺伝子の診断と治療”, *日本 ME 学会雑誌*, 12-2, pp. 3-14 (1998)
- [59] 小幡公道: “磁性粒子を用いた核酸自動抽出装置”, *日本 ME 学会雑誌*, 12-2, pp. 15-24 (1998)

- [60] Ausubel FM, Brent R, Kingston RF, Moore RR, Seidman JG, Smith JA, Struhl K :
Current Protocols in Molecular Biology , Green Publishing Associates and
Wiley-Interscience (1987)
- [61] Berger SL, Kimmel AR : “Guide to molecular cloning techniques”, Methods Enzymol,
152, pp. 215-304 (1987)
- [62] 日本生物工学会編 : 生物学実験書, 培風館 (1995)
- [63] Hornes E, Korsnes L : “Magnetic DNA hybridization properties of oligonucleotide
probes attached to superparamagnetic beads and their use in the isolation of
poly(A)mRNA from eukaryotic cells” 。 Genet. Anal. Tech. Appl., 7, pp. 145-150
(1990)
- [64] Hawkins TL, O’Conner-Morin T, Roy A, Santillan C : DNA purification and isolation
using a solid-phase, Nucleic Acids Res, 22, pp. 4543-4544 (1994)
- [65] Jakoben KS, Breivold E, Hornes E : Purification of mRNA directly from crude plant in
15 minutes using oligo dT microspheres, Nucleic Acids Res, 18, p. 3669 (1990)
- [66] Miyachi H, Matsukawa A, Ohshima T, Fusegawa H, Hiroshi T, Impraim C, Ando Y :
“Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction
and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of Hepatitis C Virus
using the Internal Control” , Clin. Chem. Lab. Med., 36 (1998)
- [67] Boom WR, Sol CJA, van der Noordaa J : “Rapid and simple method for purification of
nucleic acids”, Journal of Clinical Microbiology, 28, pp. 495-503 (1990)
- [68] Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical Handbook, Second Edition,
Dinal A. S. Oslo (1995)
- [69] 磯野一宏 : “Thermal Cycler” 。 日本 ME 学会雑誌, 12-2, pp. 38-43 (1998)
- [70] Kawasaki ES, Wang AM : Detection of gene expression, Erlich HA ed., PCR

- Technology, Principles and Applications for DNA amplification, Stockton Press, pp. 89-97 (1989)
- [71] 宮西節子：“遺伝子検査に用いられる主な電気泳動”，検査と技術，27-13，pp. 1519-1523，医学書院（1999）
- [72] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T : Molecular Cloning, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- [73] 日本生物工学会編：生物工学実験書，培風館（1995）
- [74] U. Zimmermann & P. Scheurich：“High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields”，*Planta*, 151, pp. 26-32 (1981)
- [75] U. Zimmermann, P. Scheurich, G. Pilwat & R. Benz : Cells with manipulated functions –New perspectives for cell biology, medicine, and technology–, *Angew. Int. Ed. Engl.*, 20, pp. 325-344 (1981)
- [76] Donald Voet, Judith G. Voet 著，田宮信雄，村松正実，八木達彦，吉田浩訳：ヴォート生化学（上），東京化学同人（1996）
- [77] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell 著，野田春彦，丸山工作，石川統，須藤和夫，山本啓一，丸山敬，三井恵津子訳：分子細胞生物学（下），東京化学同人（1997）
- [78] 森崎久雄，服部黎子：界面と微生物，pp. 46-48，学会出版センター（1988）
- [79] Hidetoshi Okamoto, Emiko Takano, Tatsuhiko Sugao, Kazuo Kage, Eiichi Okamoto, Naoyuki Nishimura and Kunihiko Ueda：“Direct amplification of Escherichia coli O157 vero toxin genes from human faeces by the polymerase chain reaction”，*Ann. Clin. Biochem.*, 36, pp. 642-648 (1999)
- [80] Benjamin Lewin 著，菊池韶彦ほか訳：遺伝子，東京化学同人（1996）

- [81] D. C. Johnson, W. R. LaCourse: "Liquid Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection at Gold and Platinum Electrodes", *Anal. Chem.*, **62**, 589A-597A (1990)
- [82] I. G. Casella, T. R. I. Cataldi, A. M. Salvi, E. Desimoni: "Electrocatalytic Oxidation and Liquid Chromatographic Detection of Aliphatic Alcohols at a Nickel-Based Glassy Carbon Modified Electrode", *Anal. Chem.*, **65**, 3143-3150 (1993)
- [83] M. B. Jensen, D. C. Johnson: "Fast Wave Forms for Pulsed Electrochemical Detection of Glucose by Incorporation of Reductive Desorption of Oxidation Products", *Anal. Chem.*, **69**, 1776-1781 (1997)
- [84] P. Singhal, K. T. Kawagoe, C. N. Christian, W. G. Kuhr: "Sinusoidal Voltammetry for the Analysis of Carbohydrates at Copper Electrodes", *Anal. Chem.*, **69**, 1662-1668 (1997)
- [85] Z. L. Chen, D. B. J. Hibbert: "Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes", *J. Chromatogr. A*, **766**, 27-33 (1997)
- [86] A. Klockow, R. Amado, H. M. Widmer, A. Paulus: "Separation of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid-labelled neutral and sialylated N-linked complex oligosaccharides by capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, **716**, 241-257 (1995)
- [87] N. Kiba, K. Saegusa, M. Furusawa: "Post-column enzyme reactors for chemiluminometric detection of glucose, 1,5-anhydroglucitol and 3-hydroxybutyrate in an anion-exchange chromatographic system", *J. Chromatogr. B*, **689**, 393-398 (1997)
- [88] 神戸徳蔵, 伊勢秀夫共著: 無電解メッキ・電鍍 - 金属メッキ技術 (5) -, pp. 1-6, 慎書店 (1976)
- [89] 逢坂哲彌, 後藤文男: "無電解めっきの基礎と応用", 表面, 23-3, pp. 138-148 (1985)
- [90] C. Guizard, F. Legault, N. Idrissi, A. Larbot, L. Cot, C. Gavach: "Electronically

- conductive mineral membranes designed for Electro-Ultrafiltration”. *J.Mem. Sci.*, 41, pp.127-142 (1986)
- [91] Ih-Houng Loh, Richard A.Moody : “Electrically conductive membranes – Synthesis and application –”, *J.Mem.Sci.*, 50, pp.31-49 (1990)
- [92] 渡辺 正, 中村誠一郎 : “電子移動の化学”, 朝倉書店(2000)
- [93] 松田好晴, 岩倉千秋: “電気化学概論”, 丸善株式会社(2000)
- [94] 木村 優: “酸化還元反応とは何か”, 共同出版株式会社(1999)
- [95] 逢坂哲爾, 小川 昇, 大坂武男: “電気化学法”, 講談社サイエンティフィク(2001)
- [96] 金 継業, 三輪智夫: “ニッケル-チタン合金電極の電気化学的挙動と糖類の電気化学検出への応用”, *BUNSEKI KAGAKU* Vol.47,No.10,pp665-672(1998)
- [97] 日本分析化学会ガスクロマトグラフィー研究懇談会編: “キャピラリーガスクロマトグラフィー”, 朝倉書店(1997)
- [98] 上田輝久: “糖類用の電気化学検出器”, 公開特許広報 5-149918(1993)
- [99] H.McGraw: “From Lange’s Handbook of Chemistry,13th”, McGraw-Hill,New York(1985)
- [100] A. E. Bruno, B. Krattiger, F. Mayster, H. M. Widmer: “On-Column Laser-Based Refractive Index Detector for Capillary Electrophoresis”, *Anal. Chem.*, 63, 2689-2697 (1991)
- [101] B. Krattiger, G. J. M. Bruin, A. E. Bruno: “Hologram-Based Refractive Index Detector for Capillary Electrophoresis: Separation of metal Ions”, *Anal. Chem.*, 66, 1-8 (1994)
- [102] A. Klockow, A. Paulus, V. Figueiredo, R. Amado, H. M. Widmer: “Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance

- liquid chromatography” , *J. Chromatogr. A*, **680**, 187-200 (1994)
- [103] 杉本敏明：“HPLC 法による食品中の糖質分析の実際”，‘97Shodx LC セミナー講演要旨集, pp. 15-25, (1997)
- [104] M.Uto, K.Kodama, K.Ishimori, Y.Kudou, S.Hoshi and M.Matsubara：“Nicel-Coated Hollow-Fiber Electrode for the Electrochemical Detection for Carbohydrates”, *Anal.Sci.*, vol.10, pp.835-837, (1994)
- [105] 五十嵐治, 宇都正幸, 井上忠信, 星 座, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二：“導電性中空糸膜電極の電気化学的応答特性と糖類の電気化学検出への応用”，膜学会論文誌, 第 27 卷 3 号, pp. 145-150, (2002)
- [106] 中村俊夫, 西川裕志：“親水性高分子膜を反応場とする生体機能物質の非水系ボルタンメトリー”， *BUNSEKI KAGAKU*, Vol.46, pp.45-49, (1997)
- [107] D.K.Gosser：“Cyclic Volammety; Simulation and Analysis of Reaction Mechanism”, VCH, Inc., New Yoke, (1993)
- [108] M.V.Pishko, A.C.Michael and A.Heller：“Amperometric Glucose Microelectrodes Prepared through Immobilization of Glucose Oxidase in Redox Hydrogels”, *Anal.Chem.*, **63**, pp.2268-2272, (1991)
- [109] 常定健, 竹原淳彦, 光石一太, 井原俊英：“熱分解ガスクロマトグラフィー/質量分析法によるオリゴ糖及び糖アルコールの分析”， *BUNSEKI KAGAKU* Vol.49, pp. 437-442, (2000)
- [110] M.Masuda, M.Handa and K.Sugara：“HPLC detection of inositol in multivitamin preparation containing large amounts of sugars”， *BUNSEKI KAGAKU*, Vol.44, pp.271-275, (1995)
- [111] 四方田千佳子, 田頭洋子, 岡田敏史, 林 譲, 松田りえ子：“示差屈折検出器を用いた HPLC の分析糖度”， *Chromatography*, Vol. 18, pp266-267, (1997)

- [112] K Kano, M. Torimura, Y. Esaka, M. Goto, T. Ueda: "Electrocatalytic oxidation of carbohydrates at copper(II)-modified electrodes and its application to follow-through detection", *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 372, 137-143(1994)
- [113] 後藤正志,田中一哉,江坂幸宏,宇野文二:“銅電極を用いる電気化学検出キャピラリー電気泳動による糖類及びその関連物質の迅速高感度分析法の開発”, *BUNSEK KAGAKU* Vol.46,pp95-100,(1977)
- [114] N. Watanabe, M. Inoue: "Amperometric Detection of Reducing Carbohydrates in Liquid Chromatography", *Anal. Chem*, 55, 1016-1019(1983)
- [115] Y. C. Lee: “高性能アニオンクロマトグラフィーとパルスドアンペロメトリー検出器を組み合わせた糖質の高感度分析”, *化学と工業*,第 43 巻,pp99-103, (1990)
- [116] 佐藤泰昌,三嶋廣繁,玉舎輝彦:“漢方薬の感染症治療への有用性に関する基礎的・臨床的検討” *岐阜大医紀* 48 : 87~96(2000)
- [117] 東祐一郎:“補中益気湯が奏効した MRSA 感染症の一例” *漢方診断* 16,PP11~13(1997)
- [118] 中村信之,沼野藤江,齋田啓子:“MRSA 感染に対する補剤の効果についての検討” *Progress in Medicine* 19, 992-995(1999)

研究業績目録

1. 原著論文	9
2. 国際会議論文	7
3. 工業所有権(JP・US・UK)	25
4. 研究会報告	12
5. 口頭発表	38

1. 原著論文 (Original Paper)

- 1.1 五十嵐治, 宇都正幸, 井上忠信, 星 座, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二: “導電性中空糸膜電極の電気化学的応答特性と糖類の電気化学検出への応用”, 膜学会論文誌, 第 27 巻 3 号, pp.145-150 (2002-05)
- 1.2 五十嵐治, 宇都正幸, 井上忠信, 星 座, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二: “導電性中空糸膜電極を用いた糖センサへの応用”, 電気学会論文誌,
(印刷中)
- 1.3 五十嵐治, 宇都正幸, 井上忠信, 星 座, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二: “導電性中空糸膜電極を用いた電気化学検出法による糖検出感度の検討”, 分析化学会論文誌,
(投稿中)
- 1.4 Osamu Igarashi, Toshitsugu Sugawara, Kazuyuki Kimura, Kenji Misawa, and Junji Arisawa: “Extraction of *E. coli* O-157 gene from feces samples using metal-coated hollow fiber membrane (MCH)”, , Journal of Membrane Science
- 1.5 五十嵐治, 宇都正幸, 井上忠信, 星 座, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二: “導電性中空糸膜電極による糖検出感度の検討と糖類およびその関連物質の電気化学検出への応用”, 膜学会論文誌, (投稿中)
- 1.6 葛西扶美夫, 岸田英樹, 木村主幸, 三澤顕次, 五十嵐治, 有澤準二: “導電性中空糸膜を用いた電気殺菌”, 日本ME学会論文誌 “医用電子と生体工学”, Vol.36, No.1, pp. 15-21 (1998 年)
- 1.7 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 五十嵐治, 有澤準二: “導電性中空糸膜を用いた大腸菌 O157 の遺伝子抽出”, 医用電子と生体工学 (日本 ME 学会論文誌), 38 巻 4 号, pp. 291-297 (2000 年)
- 1.8 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜による大腸菌 O157 からのベロ毒素遺伝子の抽出”, 膜学会論文誌, 第 26 巻 1 号, pp.46-51 (2001 年)
- 1.9 菅原俊継, 船木貞幸, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜による実糞便試料からの大腸菌 O157 の遺伝子抽出”, 電気学会論文誌, 121 巻 10 号, pp.552-558 (2001-01)

2. 国際会議論文 (Proceedings)

- 2.1 O.Igarasi and S.Nitta: "EMC by using resin material having metallic layers"
Proceedings of the 1994 International Symposium on Electromagnetic Compatibility
(EMC'94,Sendai,Japan),17P6PS04,pp.792 (1994)
- 2.2 T.Sugawara, K.Kimura, K.Misawa , J.Arisawa and O.Igarasi: "Electro-
bactericidal effect of the metal coating flat sheet membrane on *Pseudomonas
aeruginosa* " Proceedings of the fifth international conference on inorganic
membranes, pp.242-245, (1998-06)(Nagoya)
- 2.3 T.Sugawara, K.Kimura, K.Misawa , J.Arisawa and O.Igarasi: "Study on electro-
bactericidal effect of the metal coating flat sheet membrane for *Pseudomonas
aeruginosa*", Proceedings of the 20th annual international conference of the IEEE
engineering in medicine and biology society, -II- pp.1068-1071(1998-10)(Hong
Kong)
- 2.4 T.Sugawara, , K.Kimura, K.Misawa , J.Arisawa and O.Igarasi: "*Pseudomonas
aeruginosa* sterilized electrically by the metal coating flat sheet membrane",
Proceedings of the 1999 international congress on membranes and membrane
Processes, pp.129-130(1999-06)(Canada-Tronto)
- 2.5 K.Kimura, T.Sugawara, K.Misawa , J.Arisawa and O.Igarasi: "Gene collection
Escherichia coli O-157 by the metal coating hollow fiber membrane", Proceedings
of the 1999 international congress on membranes and membrane Processes,
pp.127-128(1999-06)(Canada-Tronto)
- 2.6 T.Sugawara M.Ebikawa K.Kimura K.Misawa J.Arisawa and O.Igarasi: "Study on the
simple and rapid gene isolation system using the metal coating hollow fiber
membrane" Proceedings of the 2002 international congress on membranes and
membrane Processes, (2002-06)(France) (in press)
- 2.7 K.Kimura, T.Sugawara, K.Misawa , J.Arisawa and O.Igarasi: "Utilization of a newly
established gene isolation technique with metal coting hollow fiber membrane for
viral gene collection", Proceedings of the 2002 international congress on
membranes and membrane Processes, (2002-06)(France) (in press)

3. 工業所有権 (JP. US. UK. Patents)

- 3.1 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦, 今村敏英, 門谷完一: “中空糸膜モジュールおよびその製造方法”, 特願平 3-149349, (1991-05)
- 3.2 五十嵐治, 佐野正勝, 勝浦信夫, 中山敦: “中空糸膜モジュール”, 特願平 3-221280, (1991-08)
- 3.3 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦, 今村敏英, 門谷完一: “金属層を有する樹脂膜およびその製造方法”, 特願平 4-75773 (1992-02)
- 3.4 M.Sano, N.Katsuura, O.Igarashi, A.Nakayama, T.Imamura, K.Kadotani: “ RESIN MEMBRANE HAVING METALLIC LAYER AND METHOD OF PRODUCING THE SAME “ ,US Patent 07/842,705 (1992-02), 3216904.(1996-04)
- 3.5 M.Sano, N.Katsuura, O.Igarashi, A.Nakayama, T.Imamura, K.Kadotani: “ Resin membrane having metallic layer and method of producing the same “ ,UK Patent 9204371.0 (1992-02), 2254340 (1995-08)
- 3.6 五十嵐治, 佐野正勝, 勝浦信夫, 中山敦: “多孔質膜およびその製造方法”, 特願平 4-170191, (1992-06)
- 3.7 五十嵐治, 佐野正勝, 勝浦信夫, 中山敦, 松原睦哉, 宇都正幸: “中空糸電極及びそれを用いた電気化学検出器”, 特願平 4-245486 (1992-08), 特許 2935775 (1999-06)
- 3.8 有澤準二, 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “除菌装置”, 特願平 4-269586 (1992-09)
- 3.9 勝浦信夫, 佐野正勝, 五十嵐治, 中山敦光澤舜明, 安岡高志: “電解質成分の除去装置” 特願平 4-355486 (1992-12)
- 3.10 勝浦信夫, 佐野正勝, 五十嵐治, 中山敦: “膜部材及びその製造方法” 特願平 4-357993 (1992)
- 3.11 O.Igarashi, M.Sano, N.Katsuura, A.Nakayama, M.Matsubara, M.Uto, “HOLLOW FIBER ELECTRODE AND ELECTROCHEMICAL DETECTOR ” US Patent 08/172,326 (1993-12)
- 3.12 有澤準二, 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “除菌方法、たんぱく質または、ホルモン類の回収方法及びこれらの装置”, 特願平 6-87520 (1994-04)

- 3.13 勝浦信夫, 佐野正勝, 五十嵐治, 中山敦, 光澤舜明, 安岡高志: “金属イオン除去装置および金属イオン除去方法”, 特願平 6-112289 (1994-04)
- 3.14 五十嵐治, 佐野正勝, 勝浦信夫, 中山敦, 松原睦哉, 宇都正幸: “中空糸電極及びそれを用いた電気化学検出器”, 特願平 6-230511 (1994-04), 特許 2925948 (1999-05)
- 3.15 勝浦信夫, 佐野正勝, 五十嵐治, 中山敦, 光澤舜明, 安岡高志: “金属イオン除去装置および金属イオン除去方法”, 特願平 7-101079 (1995-04)
- 3.16 有澤準二, 木村主幸, 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “核酸回収方法および核酸回収装置” 特願平 7-233121 (1995-09), 特許 3154294 (2001-02)
- 3.17 五十嵐治, 佐野正勝, 勝浦信夫, 中山敦: “膜部材およびその製造方法” 特願平 7-289164 (1995-10)
- 3.18 有澤準二, 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “空気の清浄化方法、空気の清浄化装置およびこれを備えた空調装置” 特願平 7-339252 (1995-12)
- 3.19 J.Arisawa, K.Kimura, M.Sano, N.Katsuura, O.Igarashi, A.Nakayama, “METHOD FOR RECOVERING NUCLEIC ACID AND DEVICE FOR THE SAME PURPOSE” US Patent 08/580,966 (1995-12), 5891694(1999-04)
- 3.20 有澤準二, 木村主幸, 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “微生物を殺菌するシステム及び遺伝子回収システム” 特願平 9-258816 (1997-09)
- 3.21 J.Arisawa, K.Kimura, M.Sano, N.Katsuura, O.Igarashi, A.Nakayama: “STERILIZING SYSTEM , AND SYSTEM FOR RECOVERING GENES ” US Patent 09/159,773(1997-09)
- 3.22 J.Arisawa, K.Kimura, M.Sano, N.Katsuura, O.Igarashi, A.Nakayama : “Sterilizing system and system for recovering genes” UK Patent 9820822.6 (1997-09)
- 3.23 有澤準二, 木村主幸, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “ウイルスの不活化方法及び回収方法、並びにこれらの装置” 特願平 10-375061 (1998-12)
- 3.24 有澤準二, 木村主幸, 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “ウイルス遺伝子の抽出方法及び抽出装置” 特願 2001-63834 (2001-03)
- 3.25 有澤準二, 木村主幸, 佐野正勝, 勝浦信夫, 五十嵐治, 中山敦: “ウイルス遺伝子の抽出及び抽出装置” 日本語で出願: PCT/JP01/02118, US and UK Patent PEND.(2001-03)

4. 研究会報告

- 4.1 葛西扶美夫, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性中空糸膜による細胞内物質の回収に関する検討, 信学技報, MBE96-87, pp.43-49 (1996-11)
- 4.2 酒井正勝, 菅原俊継, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 空気中の黄色ブドウ球菌に対する導電性膜の殺菌効果, 信学技報, MBE97-94, pp.7-12 (1997-11)
- 4.3 葛西扶美夫, 岸田英樹, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性中空糸膜による電気殺菌の殺菌機序に関する検討, 信学技報, MBE97-95, pp.13-18 (1997-11)
- 4.4 コンチャ・ルイス, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜による腸炎ビブリオとコレラ菌に対する電気殺菌, 信学技報, MBE97-111, pp.1-7 (1997-12)
- 4.5 菅原俊継, 酒井正勝, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 薬剤耐性菌に対する導電性膜の通電殺菌効果, 信学技報, MBE97-112, pp.9-14 (1997-12)
- 4.6 岸田英樹, 葛西扶美夫, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜による遺伝子回収の可能性とその評価, 信学技報, MBE97-113, pp.15-20 (1997-12)
- 4.7 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性膜を用いた微生物制御法の可能性, 信学技報, MBE98-101, pp.17-22(1998-12)
- 4.8 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性膜を用いた電気殺菌機構の検討, 信学技報, MBE99-33, pp.71-76(1999-06)
- 4.9 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いたウイルス制御に関する基礎的検討”, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE99-105, pp. 17-22 (1999)
- 4.10 菅原俊継, 海老川慎, 木村浩一, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いた電気泳動法によるウイルス遺伝子の抽出”, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE2000-76, pp. 67-72 (2000年)
- 4.11 安田真之助, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性フィルタに捕捉された細菌に対する電流刺激の影響”, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE2000-77, pp. 73-78 (2000年)
- 4.12 海老川慎, 菅原俊継, 木村浩一, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性中空糸膜によるウイルス遺伝子の検出感度の検討, 電子情報通信学会技術研究報告, MBE2001-116, pp. 99-104 (2001)

5. 口頭発表

- 5.1 菅原俊継, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜による黄色ブドウ球菌の通電殺菌効果, 日本ME学会雑誌, Vol.35 Suppl, p.536 (1997-04)
- 5.2 岸田英樹, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 細胞内成分漏出モデルによる導電性中空糸膜の通電殺菌機序に関する検討, 日本ME学会雑誌, Vol.35 Suppl, p.537 (1997-04)
- 5.3 酒井正勝, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜の通電殺菌機序に関する検討-電界の影響-, 日本ME学会雑誌, Vol.35 Suppl, p.538 (1997-04)
- 5.4 葛西扶美夫, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 被覆金属の違いによる導電性中空糸膜の殺菌効果, 日本ME学会雑誌, Vol.35 Suppl, p.539 (1997-04)
- 5.5 コンチャルイス, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 高浸透圧溶液中の細菌に対する導電性中空糸膜の殺菌効果, 日本ME学会雑誌, Vol.35 Suppl, p.540 (1997-04)
- 5.6 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性膜を用いた通電殺菌システムの基礎的検討, 日本ME学会雑誌, Vol.36 Suppl, p.708 (1998-05)
- 5.7 佐々木裕樹, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性膜を用いた遺伝子の検出感度に関する検討, 日本ME学会雑誌, Vol.37 Suppl, p.178 (1999-04)
- 5.8 菅原俊継, 佐々木裕樹, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性膜を用いた微生物制御に関する基礎的検討, 日本ME学会雑誌, Vol.37 Suppl, p.179 (1999-04)
- 5.9 酒井正勝, 有澤準二, 木村主幸, 三澤顕次, 五十嵐治: 空気中での導電性中空糸膜の通電殺菌効果, 平成8年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 289, No. 276 (1996-10)
- 5.10 コンチャ・ルイス, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜による腸炎ビブリオの殺菌効果, 平成8年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 290, No. 277 (1996-10)
- 5.11 菅原俊継, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜による黄色ブドウ球菌の通電殺菌, 平成8年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 291, No. 278 (1996-10)
- 5.12 葛西扶美夫, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜を用いた殺菌効果に関する検討, 平成8年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 292, No. 279 (1996-10)
- 5.13 岸田英樹, 有澤準二, 木村主幸, 三澤顕次, 五十嵐治: 細胞内成分に及ぼす影響から見た導電性中空糸膜の通電殺菌機序に関する検討, 平成8年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 293, No. 280 (1996-10)
- 5.14 五十嵐治, 勝浦信夫, 佐野正勝, 中村洋: 金属被覆中空糸膜電極による糖の高出力検出について, 第118回液体クロマトグラフィー研究懇談会, p 11-16 (1997)

- 5.15 菅原俊継, 酒井正勝, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性膜による通電殺菌の基礎的検討, 第36回日本ME学会北海道支部大会, No. 10 p20 (1997-10)
- 5.16 酒井正勝, 菅原俊継, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性膜を用いた空気中の微生物殺菌に関する基礎的検討, 第36回日本ME学会北海道支部大会, No. 11, p. 20 (1997-10)
- 5.2 コンチャ・ルイス, 葛西扶美夫, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜によるエルトル稲葉型コレラ菌の通電殺菌効果, 第36回日本ME学会北海道支部大会, No. 12, p. 20 (1997-10)
- 5.3 五十嵐治, 勝浦信夫, 武居育子, 佐野正勝, 中村洋: “導電性中空糸膜電極による糖の高感度検出” 第2回LCテクノプラザ講演要旨集, C03, p. 25-26, (1997-01)
- 5.19 岸田英樹, 葛西扶美夫, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜を応用した微生物からの遺伝子回収の可能性, 第36回日本ME学会北海道支部大会, No. 13, p. 21 (1997-10)
- 5.20 菅原俊継, 酒井正勝, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性膜による緑膿菌の通電殺菌, 平成9年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 258, No. 224 (1997-10)
- 5.21 酒井正勝, 菅原俊継, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性膜の空気中での通電殺菌効果, 平成9年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 259, No. 225 (1997-10)
- 5.22 コンチャ・ルイス, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜のエルトルコレラ稲葉株に対する通電殺菌特性, 平成9年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 260, No. 226 (1997-10)
- 5.23 岸田英樹, 葛西扶美夫, 木村主幸, 有澤準二, 三澤顕次, 五十嵐治: 導電性中空糸膜を用いた微生物からの遺伝子回収の可能性, 平成9年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 261, No. 227 (1997-10)
- 5.24 菅原俊継, 佐々木裕樹, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性平膜を用いた空気中に浮遊する黄色ブドウ球菌の電気殺菌, 平成10年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 328, No. 296 (1998-10)
- 5.25 佐々木裕樹, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: 導電性中空糸膜を用いた大腸菌からの遺伝子回収, 平成10年度電気関係学会北海道支部連合大会講演論文集, p. 329, No. 297 (1998-10)
- 5.26 菅原俊継, 佐々木裕樹, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性膜を用いた微生物制御に関する基礎的検討”, 医用電子と生体工学, 37-Suppl., p. 179 (1999)
- 5.27 佐々木裕樹, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いた遺伝子の検出感度に関する検討”, 医用電子と生体工学, 37-Suppl., p. 178 (1999)
- 5.28 菅原俊継, 佐々木裕樹, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “ウイルスに対する導電性中空糸膜の通電効果”, 第38回日本エム・イー学会北海道支部大会, p. 17

(1999)

- 5.29 佐々木裕樹, 菅原俊継, 船木貞幸, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いた微生物からの遺伝子回収に関する基礎的検討”, 第 38 回日本エム・イー学会北海道支部大会, p. 16 (1999)
- 5.30 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜による単純ヘルペスウイルスの不活化”, 平成 11 年度電気関係学会北海道支部連合大会, p. 449 (1999)
- 5.31 菅原俊継, 安田真之助, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いた電気殺菌法のウイルスへの応用”, 医用電子と生体工学, 38-Suppl., p. 361 (2000)
- 5.32 安田真之助, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性フィルタを用いた緑膿菌に対する通電殺菌”, 医用電子と生体工学, 38-Suppl., p. 360 (2000)
- 5.33 船木貞幸, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いた O-157 を含む糞便試料からのペロ毒素遺伝子の回収”, 医用電子と生体工学, 38-Suppl., p. 362 (2000)
- 5.34 菅原俊継, 海老川慎, 木村浩一, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “電気泳動法を利用した導電性中空糸膜のウイルス遺伝子抽出”, 第 39 回日本エム・イー学会北海道支部大会, p. 16 (2000)
- 5.35 船木貞幸, 菅原俊継, 木村浩一, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いた大腸菌 O157 からのペロ毒素遺伝子抽出法に関する検討”, 第 39 回日本エム・イー学会北海道支部大会, p. 16 (2000)
- 4.36 安田真之助, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性フィルタを用いての通電殺菌機構の検討”, 第 39 回日本エム・イー学会北海道支部大会, p. 16 (2000)
- 5.37 海老川慎, 菅原俊継, 木村浩一, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “導電性中空糸膜を用いたウイルス遺伝子の抽出に関する基礎的検討”, 平成 12 年度電気関係学会北海道支部連合大会, p. 336 (2000 年)
- 5.38 海老川慎, 菅原俊継, 木村浩一, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治: “電界効果を用いた導電性中空糸膜によるウイルス遺伝子の抽出”, 第40回日本ME学会大会, Japan Soc. ME & BE, pp279, 39巻 特別号(2001-05)