

4.2, バイオセンサ

センサは
物理と電気を結びつけ、
バイオセンサは
生体と電気を結びつける。

バイオセンサとは

生体が持っている高度な機能を実現するためのセンサ。

バイオセンサと言っても、生体物質をデバイスとして利用するセンサ(Biomaterial Sensor)、生体をまねた人工物を利用するセンサ(Biomimetic Sensor)、データの処理方法において生体をまねるセンサ(Biomimetic Data Processing)など様々。

さらに、バイオセンサとは言えないかもしれないが、微細加工技術を利用して生化学的分析系を1チップ上において実現する、微小総合化学分析システム(μ TAS)も開発が進んでいる。

バイオセンサの分類

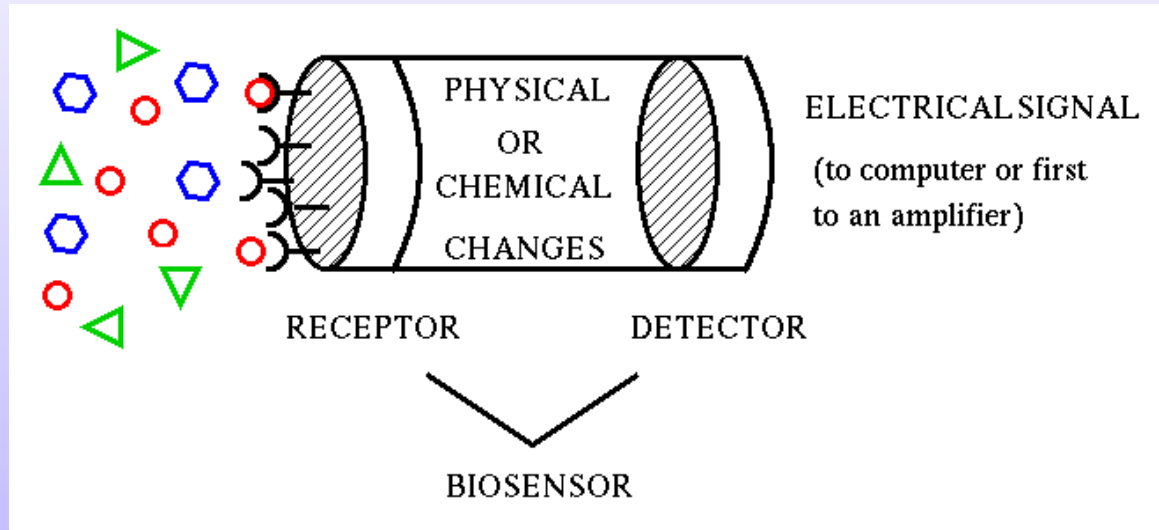
a. バイオマテリアルセンサ

生体物質をセンサの検出部(受容体)として利用する。
受容体の特異性、高感度が特徴。
受容体の選択、信号の変換方式が研究上のポイント。

b. バイオミメティックセンサ

人工的な素材で生体機能をまねする。
信号の入力方法、処理方法が従来のセンサと異なる
ところが特徴。
入力(物質)の選択性、信号処理の方法が研究上の
ポイント。

バイオマテリアルセンサ



基本構造

受容体(信号(物質)の受容、変換)

酵素固定相(酵素の固定)

選択透過膜(生成されるイオン、酸化物などを選択)

トランスデューサ(電気への変換)

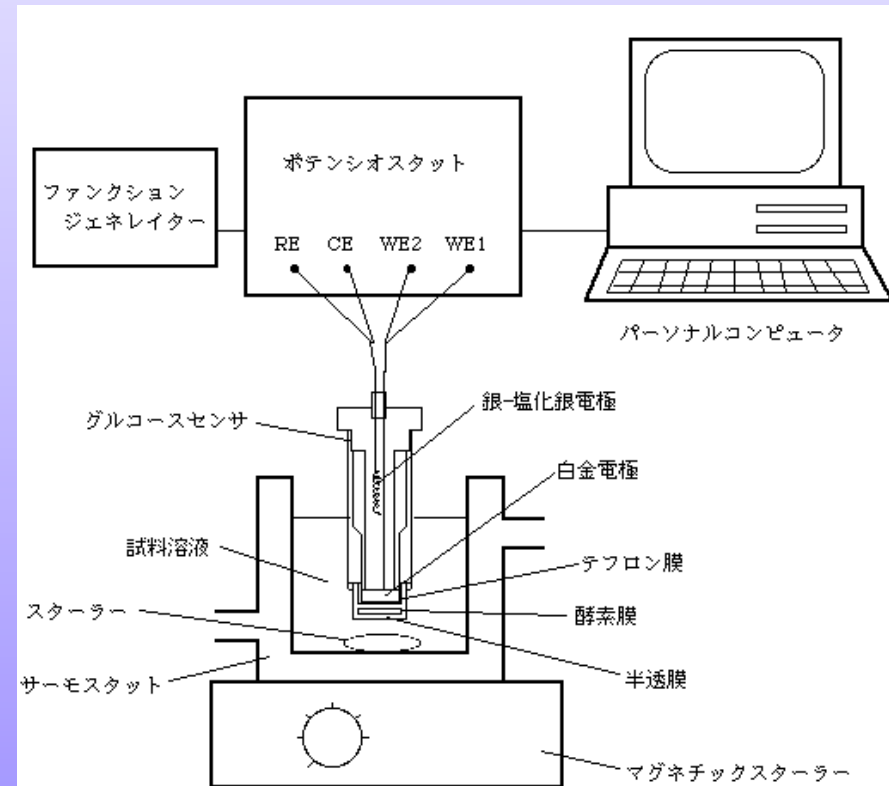
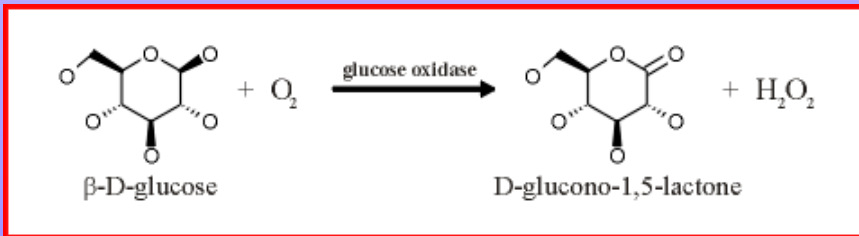
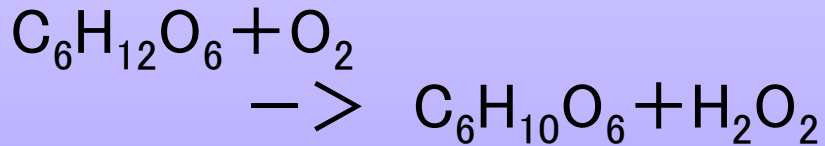
から構成される。

バイオマテリアルセンサの種類

センサー	受容体	トランスデューサ	検出対象
酵素センサ	酵素(GOD...)	酸素電極	グルコース、 尿素
(酵素反応 産物)	GOD,Urease...	過酸化水素電極	グルコース、 尿素、コレステロール
	lipase?	pH電極	中性脂質
	AA.oxygenase	炭酸ガス電極	アミノ酸
	Urease	アンモニア電極	尿素、クレアチン
	Urease	FET/pH	尿素
免疫センサ	抗体(IgG)	抗原抗体反応 SPR	抗原一般
	(IgG)	蛍光異方性	抗原一般
	(IgG)	FET	抗原一般
微生物センサ	微生物	酸素電極	資化糖
	(微生物の 活動産物)	水素電極	BOD
		炭酸ガス電極	グルタミン
酵素サーミスタ	酵素	サーミスタ	ATPなど

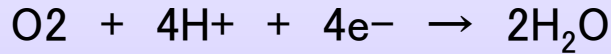
酵素電極

グルコースセンサ
 グルコースオキシダーゼ: グルコースと酸素からグルコノラクトンと過酸化水素を生成。

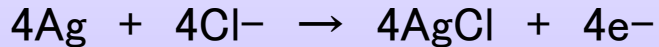


酸素電極の原理

酸素電極の電極部に飽和KCl溶液を満たし、陰極(白金)と陽極(銀)の間に電圧を印加すると、陰極からの電子により溶液中の酸素が還元され、水が発生する。



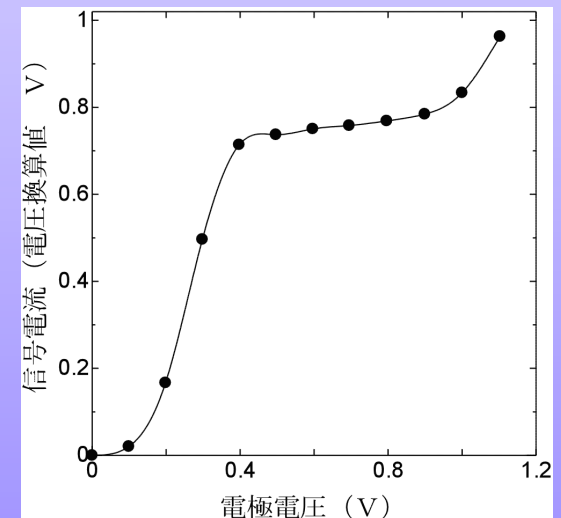
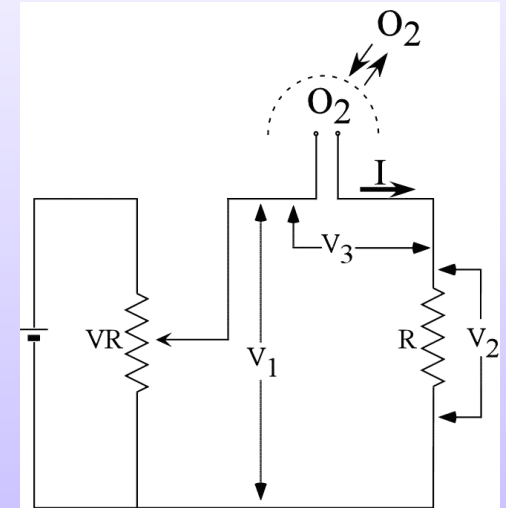
陽極では銀が酸化され、電子を電極に与える。



発生した電子の量は溶液中の酸素濃度に比例するので、電流変化を測定することにより酸素濃度を知ることができる。

実際には右の回路の抵抗Rを用いて酸素電極に流れる電流を電圧に変換する。可変抵抗VRによって電圧V1を回路にかける。このV1から、抵抗Rの電圧降下V2を差し引いたV3が酸素電極にかかる電極電圧となる。酸素電極の信号電流は、電極電圧によっても変化するが右下図のように、0.4 Vから0.8 V付近の電極電圧では比較的变化が小さいので、V3を0.6 V付近に設定する。酸素濃度はV2を測定することによってられる。

他の物質の妨害を防ぐため、テフロン製の酸素透過膜で表面を覆い、内部の溶液中で測定する。

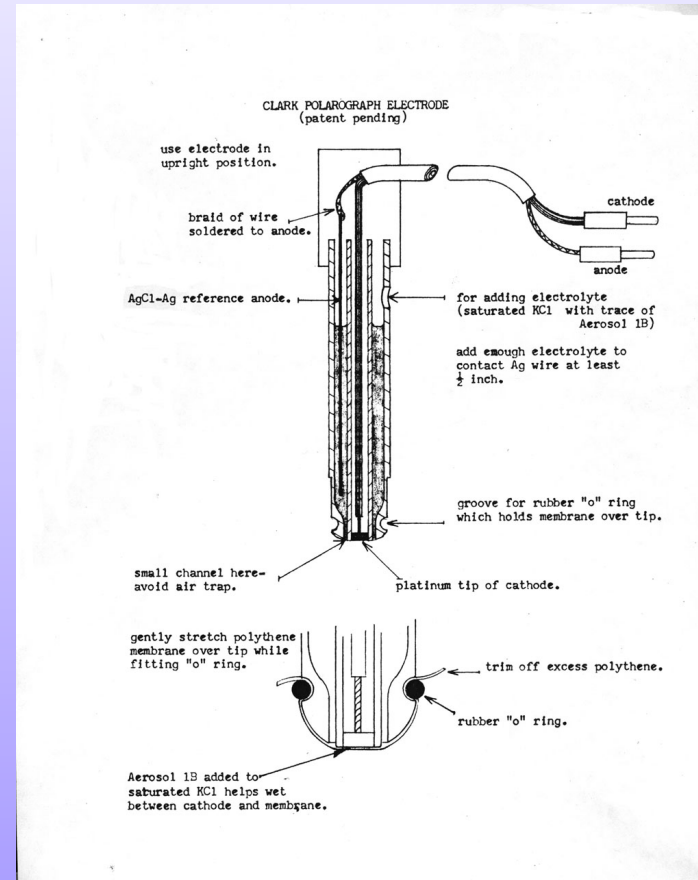
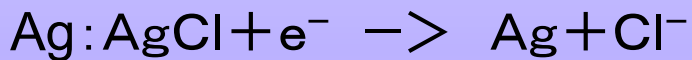


過酸化水素電極

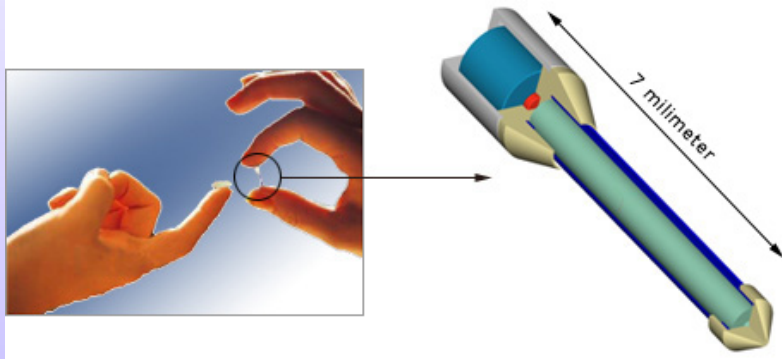
酢酸セルロース膜 (or PTF) / Ptアノード
/ Ag(or Pb)カソード

白金酸素電極 (アンペロメトリック)

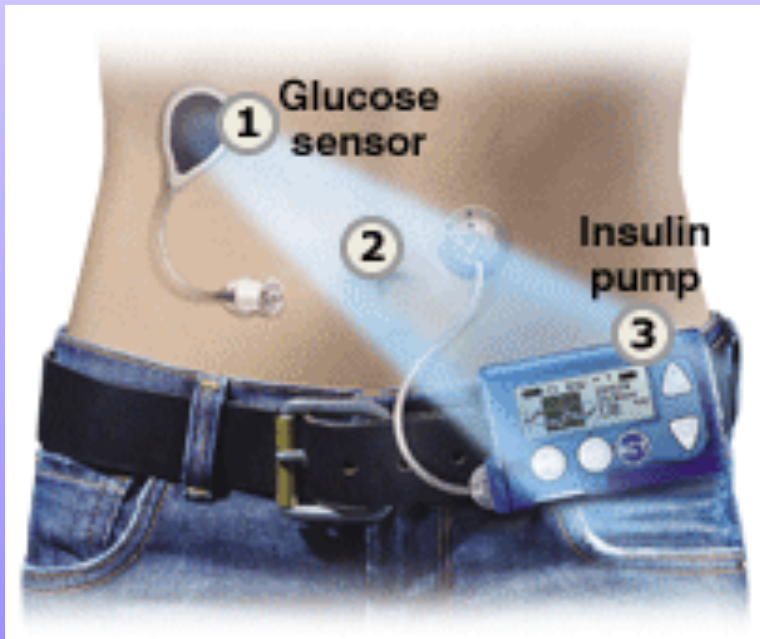
白金 / 銀電極



グルコースセンサ



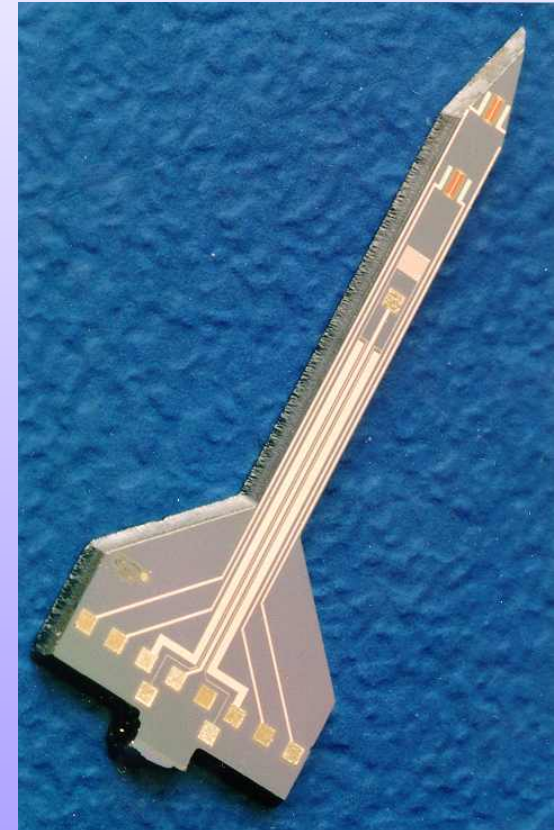
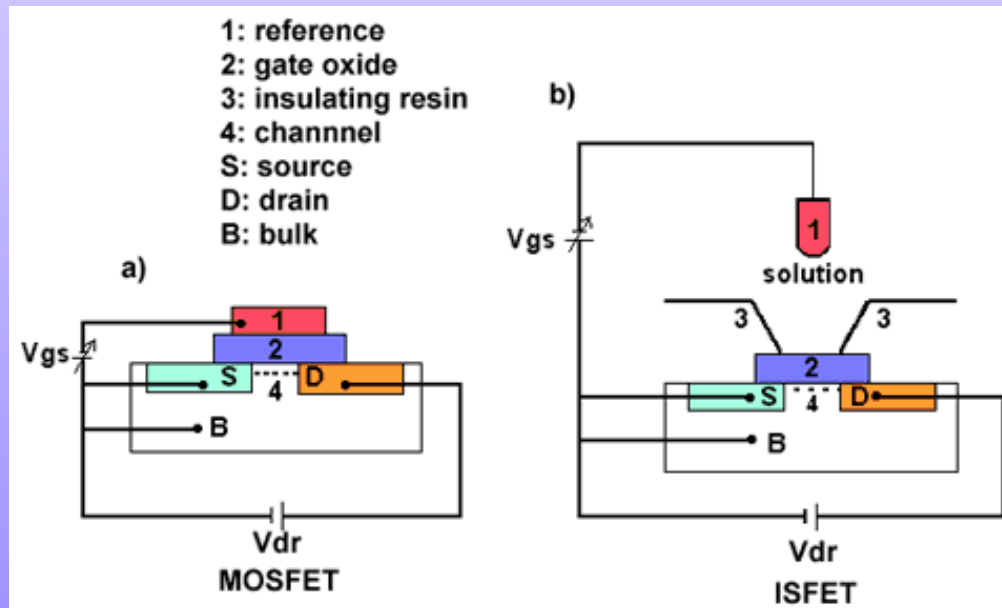
血中の糖濃度をコントロールするため、マイクロマシン技術で作成した微小なグルコースセンサを体内に埋め込み、きめ細かにインシュリンを注入する。



ISFET

ISFETはMOSFETのゲート表面上をイオン透過膜で覆ったFETで、膜を透過してきたイオンが吸着することによって発生する表面電位を検出する。

イオン透過膜の種類を変えることで特定のイオンだけの吸着量を測り、そこから溶液中のイオン濃度を測定することができる。例えば、ガラスの薄膜は水素イオンを透過するので、pHセンサとすることができる。



SPRセンサ

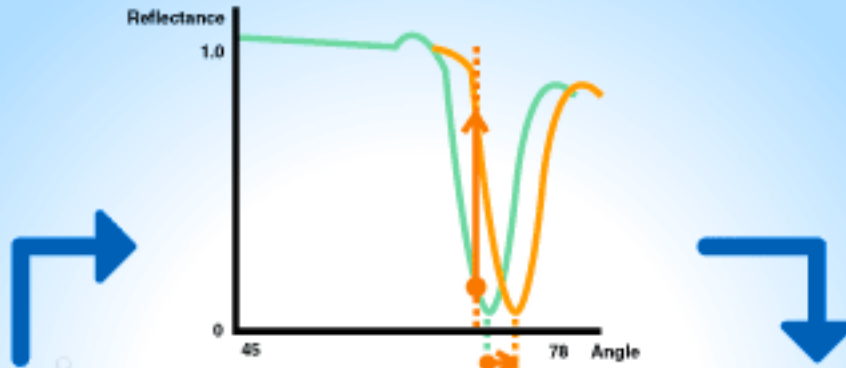
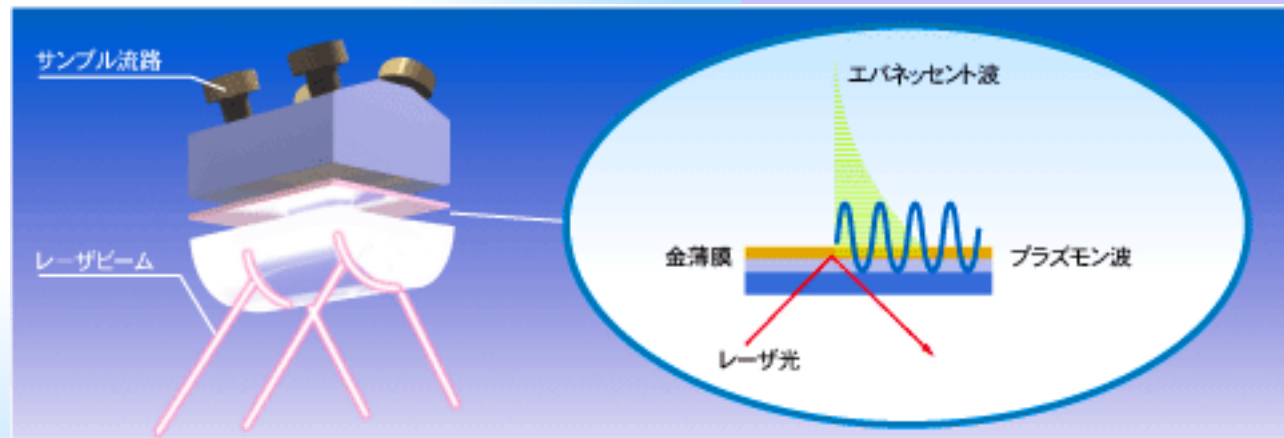
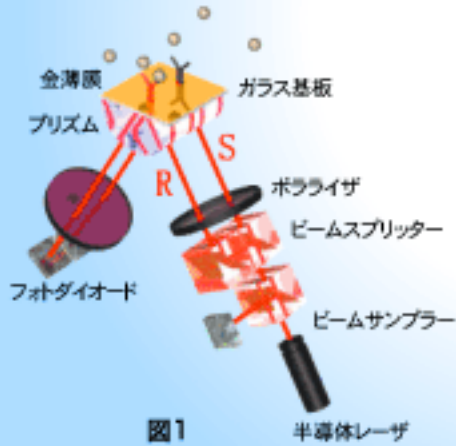
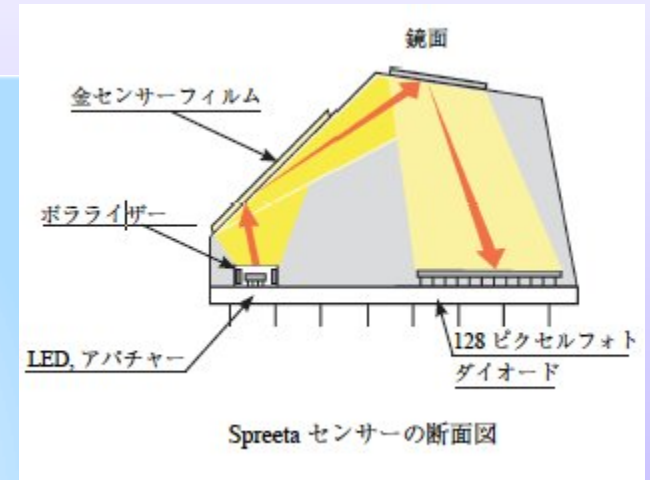
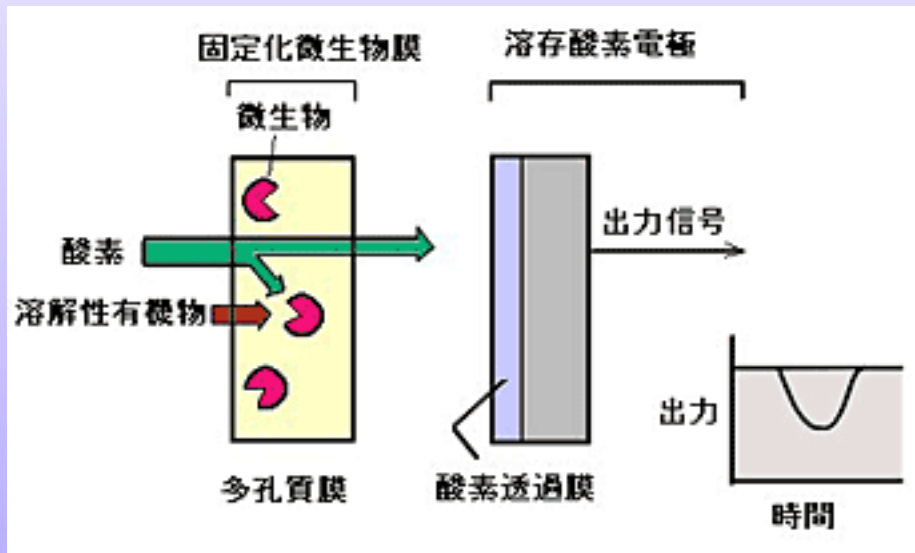


図2



微生物センサ

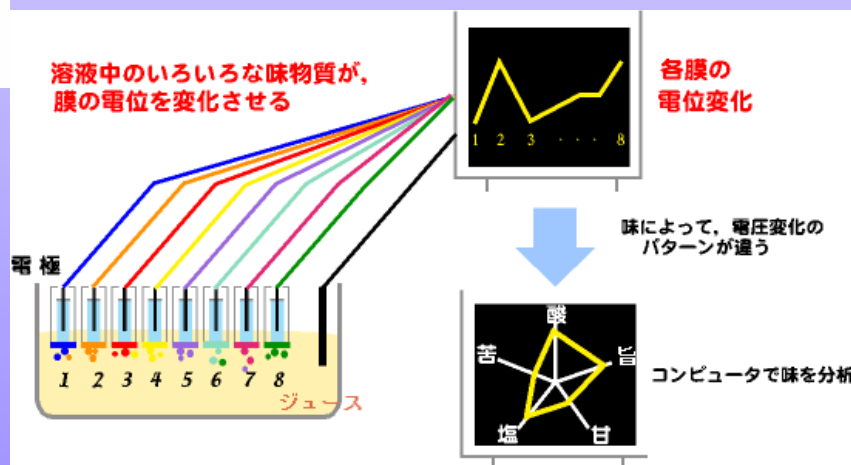
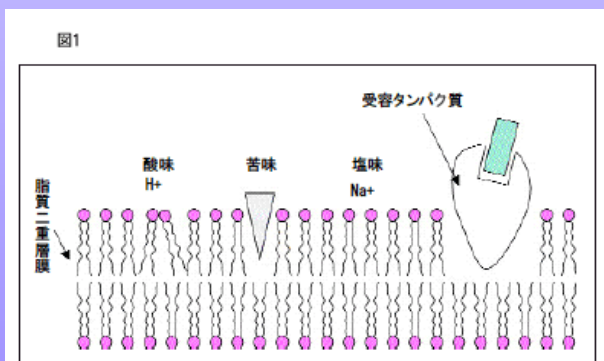
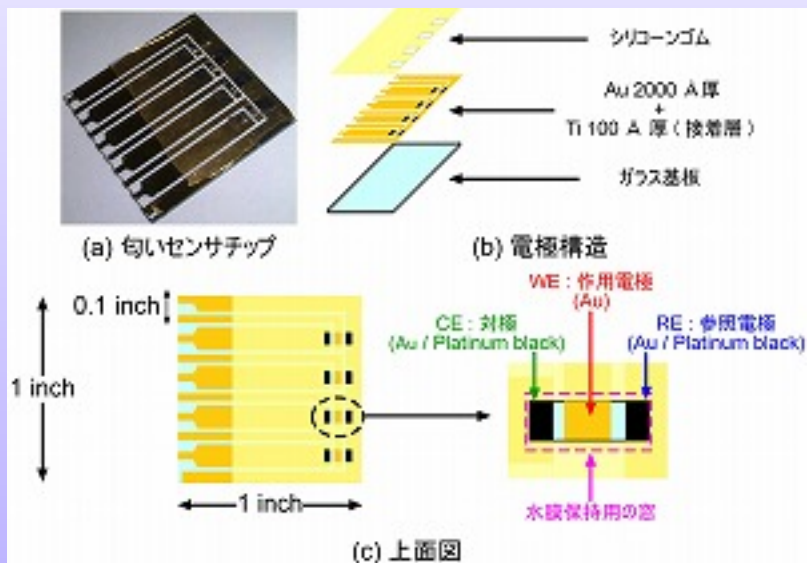


酵素センサの酵素の代わりに菌体をポリマーなどに固定して、その産物を検出することで測定する。BODの他、測定に用いられる。

トランスデューサ部では、酸素量を酸素電極で測定する。

脂質膜センサ

脂質二重膜は高い絶縁性を持っているが、その伝導度は膜にとけ込む物質によって変化する。この変化は膜の種類、とけ込む物質の種類で異なるため、複数種類の膜で伝導度を測定することで、混合溶液中の物質濃度を知ることができる。これは味センサとして利用できる。



マイクロカロリメトリー

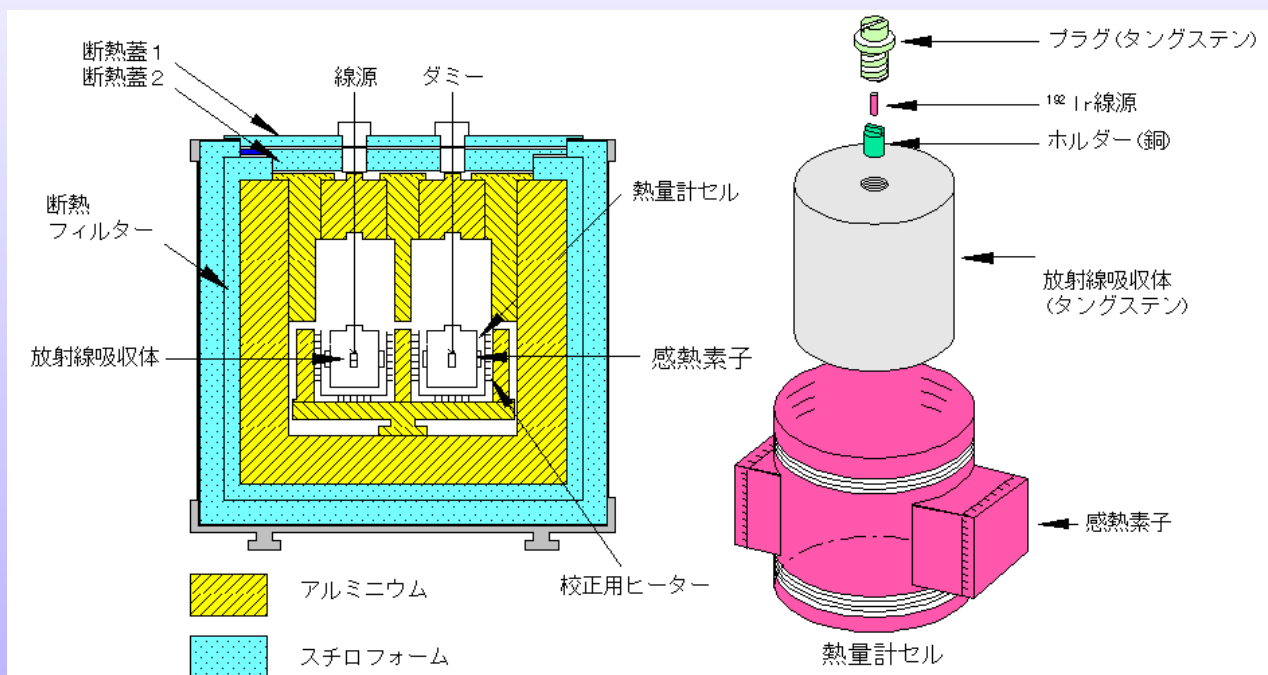


図1 双子熱伝導型マイクロカロリメーターの主要部の構造と検出部まわりの状況

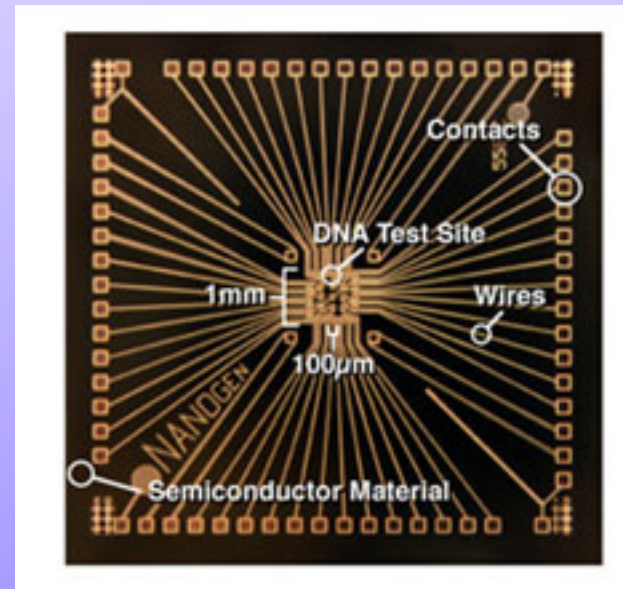
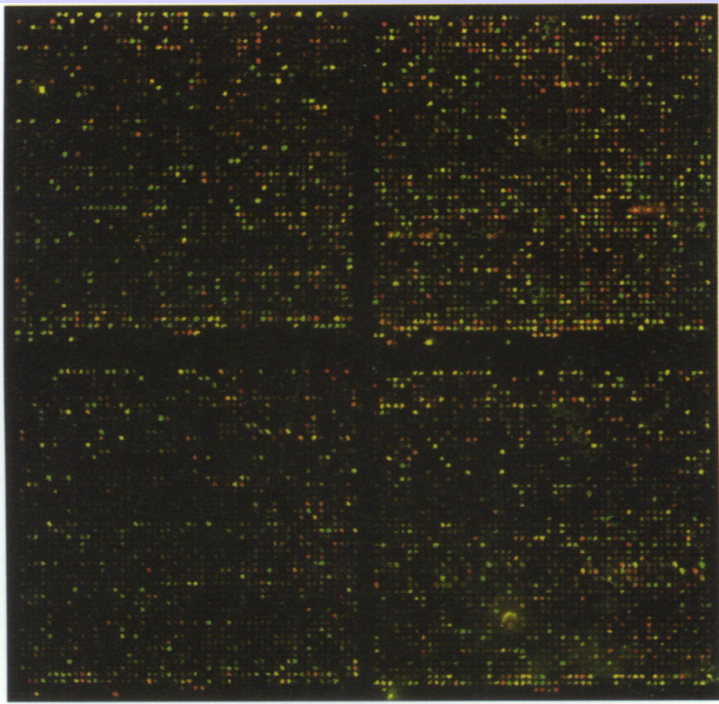
[出典]源河 次雄: Radioisotopes, vol. 45, p. 64(1996)

化学反応はほとんどの場合発熱または吸熱反応である。そこで精密なカロリメータを用いて酵素反応を検出することで、特異的な反応測定ができる。実際にはトランスデューサとしてサーミスタを利用して発熱量測定を行う。

DNAチップ

DNAの対合をプローブDNAが発する蛍光で検出する。

対合したDNAのうち、結合の弱い物を電氣的に排除し、特異性を高める。



免疫センサ

ヒトの免疫系では、抗体(Antibody)と呼ばれるタンパク質が、高い特異性で病原体を認識して結合することで、その後の免疫反応を引き起こす。この抗体の機能をセンサとして利用するのが免疫センサである。

抗体を使った免疫測定は、一般的な診断技術として確立している。(免疫沈降、酵素免疫測定、蛍光免疫測定、ラジオ免疫測定)しかし、病原体試料と抗体溶液の溶液プロセスが基本なので、連続モニタや試料の微量化、測定の集積化による多チャンネル測定が困難。このような点を克服するため、免疫センサが研究されている。現在までに様々な免疫センサが作られているが、吸着による大きなバックグラウンドのため実用化はまだ難しい。

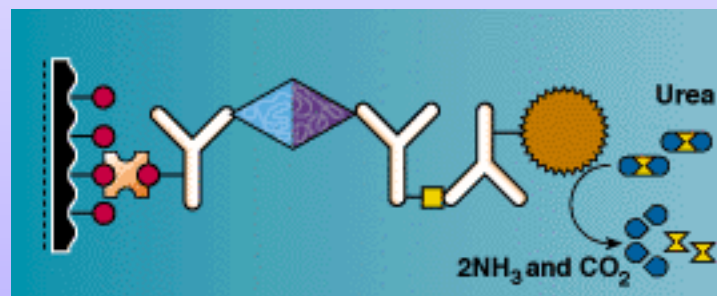
高感度免疫測定

LASER Nephelometry

抗原抗体反応に基づく凝集物の生成を光り散乱を用いて測定する方法。レーザー光を利用した、レーザーネフェロメトリーが実用的に用いられている。これはレーザー光の散乱を光路と直交する方向から測定するものである。

EIA(エンザイムイムノアッセイ、酵素免疫測定法)

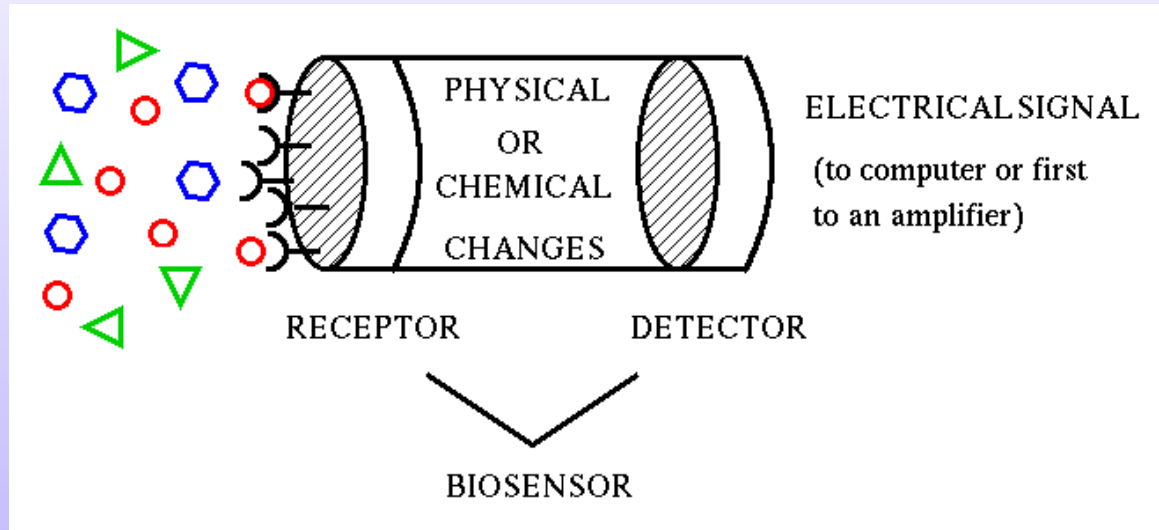
抗体に酵素を結合し、抗原抗体反応で固定された抗体の量を酵素量を持ちいて測定する方法。酵素に発色性の化学物質を生成させることで高感度測定が可能。



以上の測定はいずれも溶液中でのバルク測定であり、化学的な操作が不可欠となる。このため装置全体が複雑となり、連続測定や体内留置測定は不可能である。このような点を解決するためには単一デバイスとして形成されたセンサが必要になる。

一方で、免疫反応は酵素反応とは異なり化学的生成物がないため、電気化学反応のような増幅可能な高感度検出法が使えない。このため、トランスデューサには様々な工夫がなされている。しかし、高感度検出方を用いても、表面への非特異吸着があるためBGノイズが大きく、多成分系での検出は困難な場合が多い。

バイオマテリアルセンサ



基本構造

受容体(信号(物質)の受容、変換)

酵素固定相(酵素の固定)

選択透過膜(生成されるイオン、酸化物などを選択)

トランスデューサ(電気への変換)

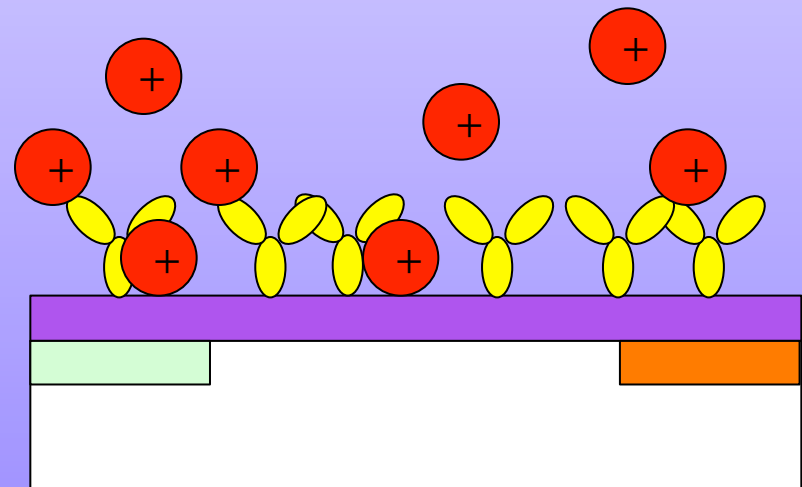
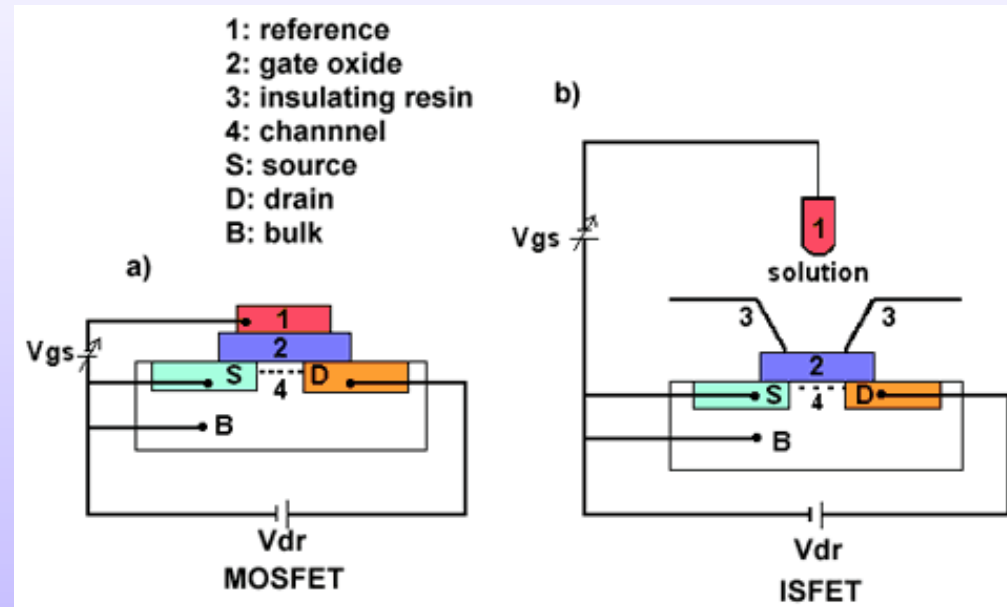
から構成される。抗体を受容体とするバイオセンサを免疫センサと呼ぶ。

ISFETイムノセンサ

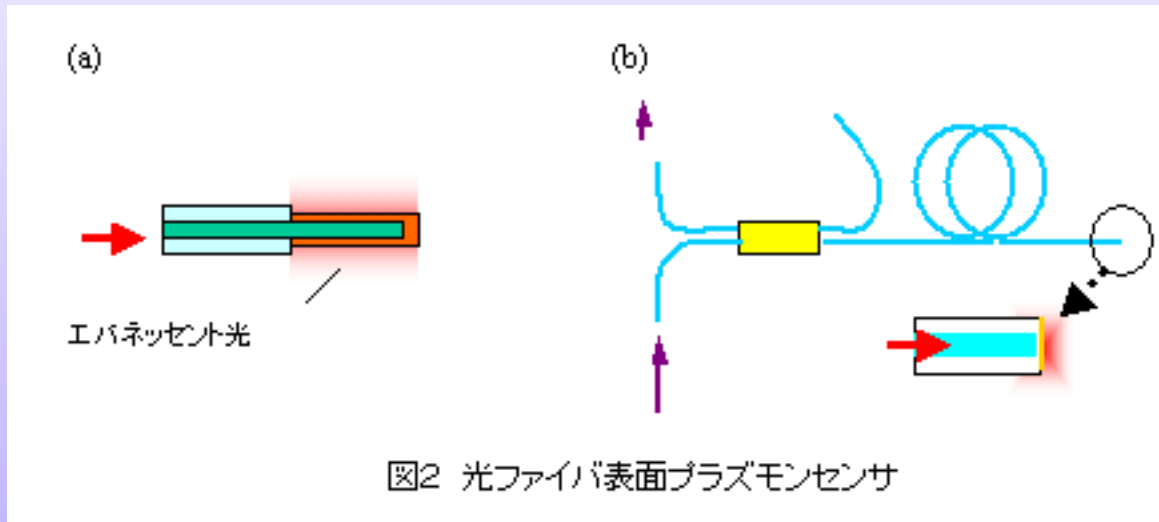
ISFETの利点

- 1, 応答が早い。
- 2, 選択膜で種類を変えられる。
- 3, 集積化可能。

一方で、FETは表面電位を測定するため、基本的に化学増幅が困難である。このため電氣的な増幅が不可欠となるが、物理吸着の影響を受けやすく、多成分試料の分析には困難がある。



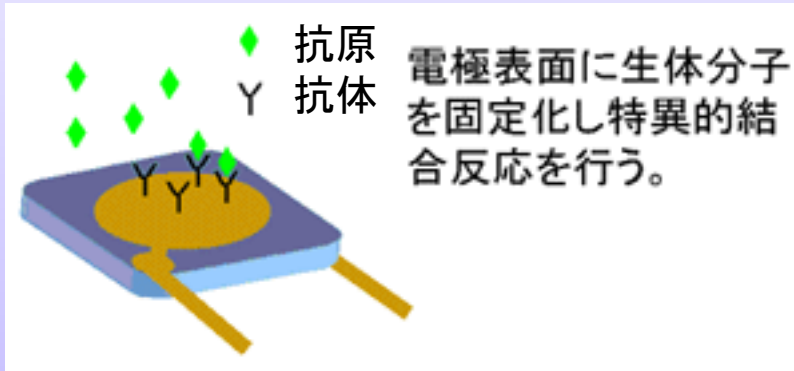
光ファイバ イムノセンサ



抗原を蛍光ラベルするか、抗体を蛍光ラベルして結合してくる抗原の量を蛍光強度変化として検出する。基本的には蛍光イムノアッセイと同じ原理を用いているが、抗体を固定化する事で測定系を単一素子化している。

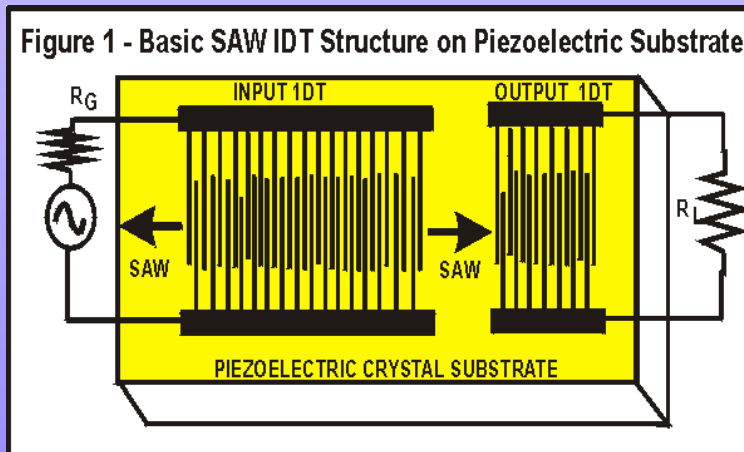
マイクロQCMセンサ

圧電振動子の表面に抗体などの生体物質を固定し、特異的な結合にともなう質量変化を検出するマイクロQCM (Quartz Crystal Microbalance)。



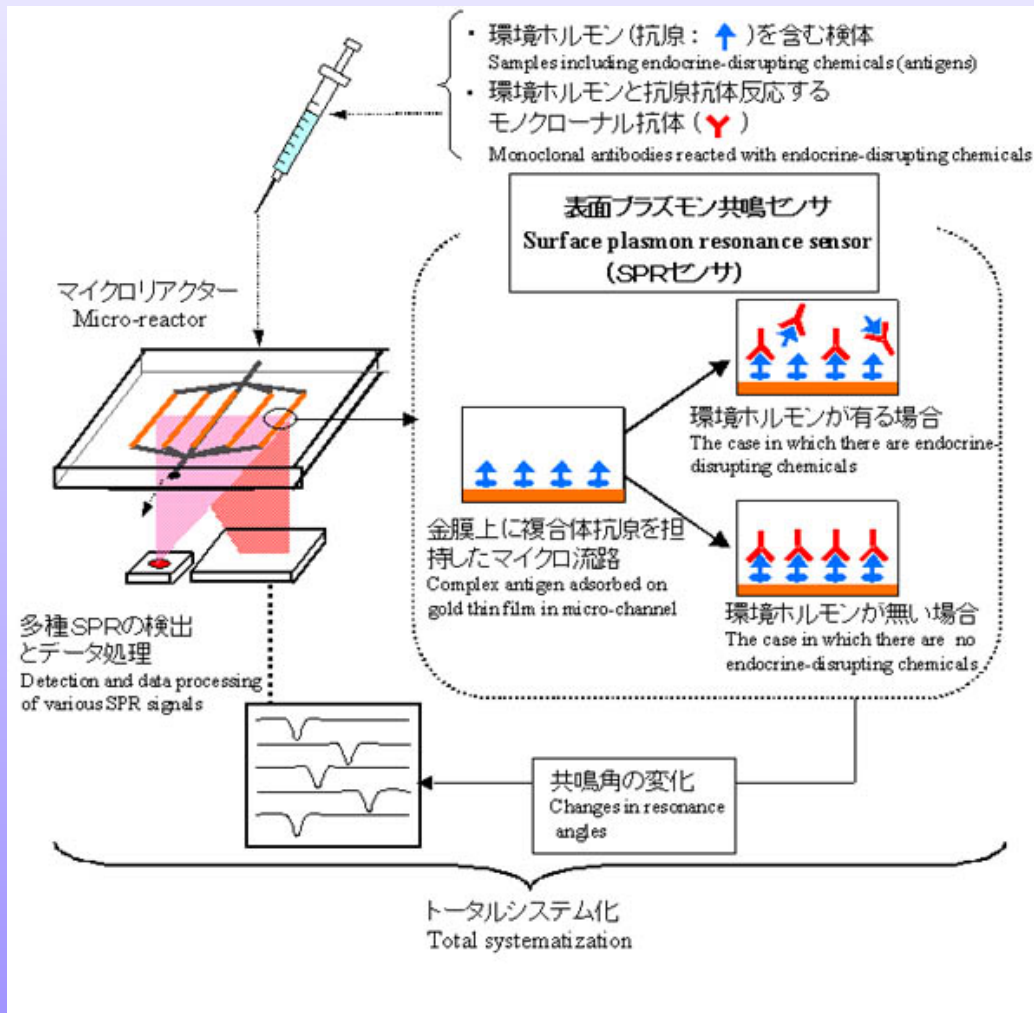
QCMは圧電素子で、板の質量と固さで決まる固有振動が電圧振動と共鳴する。質量変化があると周波数変化として検出することができる。

類似したセンサとして、SAWセンサがある。これは、圧電素子によって発生した表面音響波 (SAW) の伝達関数の変化から、表面への物資結合を検出するものである。匂いセンサなどに利用される。



表面音響波の波数は質量に依存し、途中経路に質量変化があると伝達関数の周波数分散が変化する。

その他の光免疫センサ



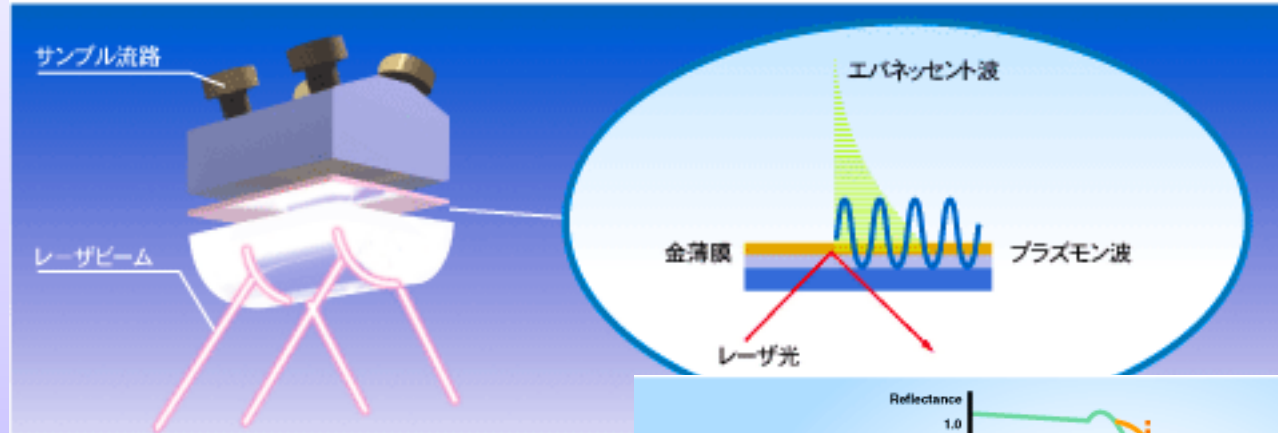
拮抗法による抗原の検出。試料中に抗原が多く存在すると、固定化抗原に結合する抗体量が少なくなるので、SPRセンサによって抗原量の違いを検出することができる。微小流路中で測定する事で短時間、微量試料での測定が可能になる。

SPRセンサ

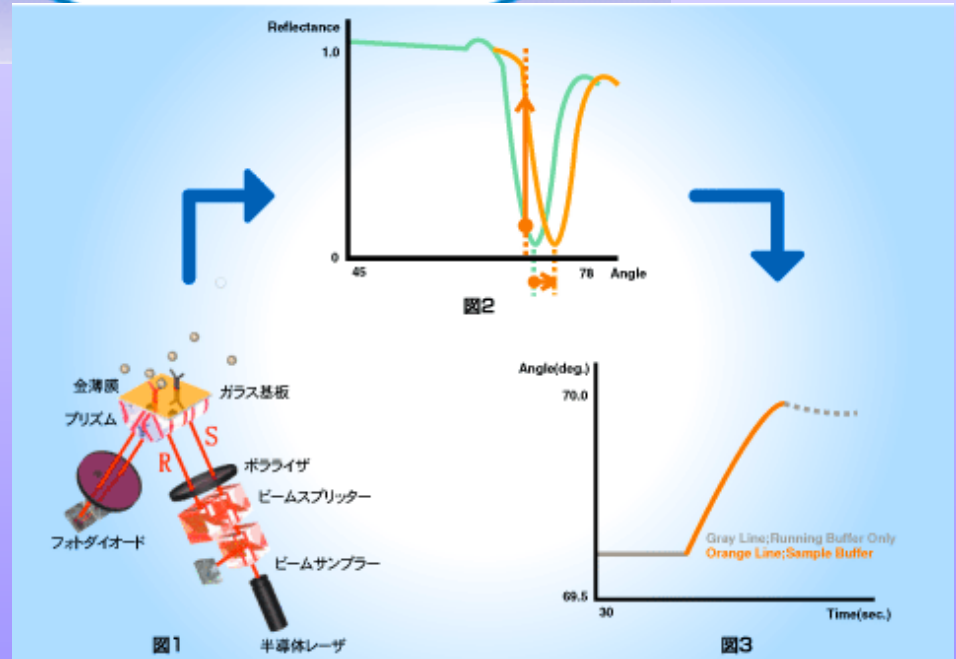
SPRは表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance) の略で、金属と誘電体の境界において、特定周波数 (波長、波数) の電子密度波が励起される現象である。

SPRは極めて狭い周波数範囲で起きるため、周波数の僅かな変化も敏感に検知できる。
この現象を利用して、金属表面の誘電率変化を測定するのがSPRセンサである。

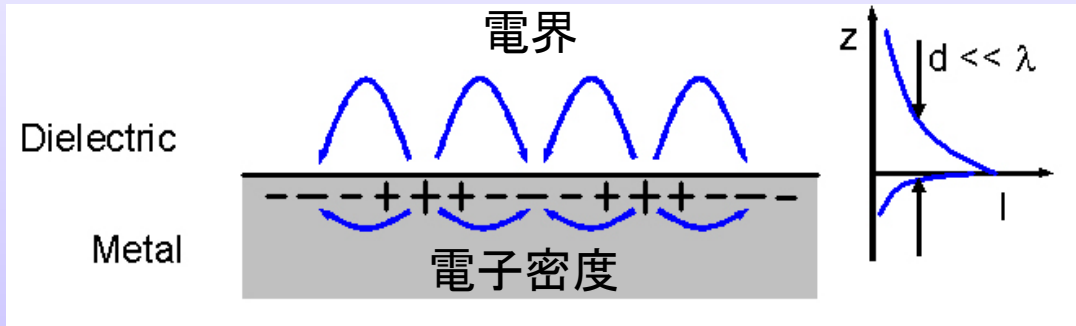
SPR装置



金の薄膜の裏からプリズムを通してレーザービームを入射すると、共鳴周波数でプラズモン波が立ち、表面側の溶液にエバネッセント波が侵入する。タンパク質などが吸着すると表面の誘電率が変わるので、共鳴周波数もシフトする。このシフトを反射角の変化として検出する。



SPRの原理



$$K(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2 \mu_1 \mu_2}{\epsilon_1 \mu_1 + \epsilon_2 \mu_2}}$$

K: wave number,
 ω : angular frequency
c : light velocity,
 ϵ : electric permittivity,
 μ : magnetic permittivity
(1: glass block, 2: metal film)

金属と誘電体の境界では、誘電体中に電界の波が発生すると、電界の連続性により金属中にも電界が発生し、それに誘導されて電子密度の波ができる。

誘電体中の電界はマクスウェルの法則に従って波数が決まる。一方、進行する電子密度波は損失項によって位相の遅れが生じ、複素誘電率によって波数が決まる。

誘電体と金属中の波の波数が一致したとき、2つの波が境界面に存在できる。この時の周波数が共鳴周波数である。

波数の一致

進行する平面波、

$$E = E_0 \exp j(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})$$

の波数ベクトル \mathbf{k} は座標軸の方向成分に分解できる。波数の絶対値 k と x 成分 k_x の関係は、波数の方向ベクトルと x 軸がなす角を θ とすると、

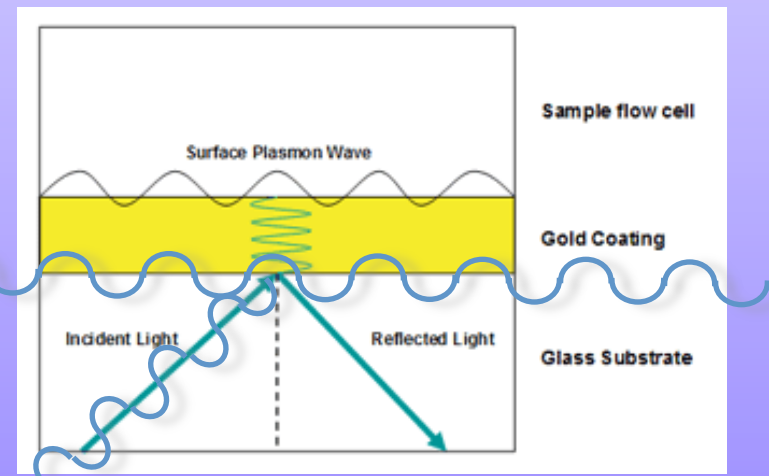
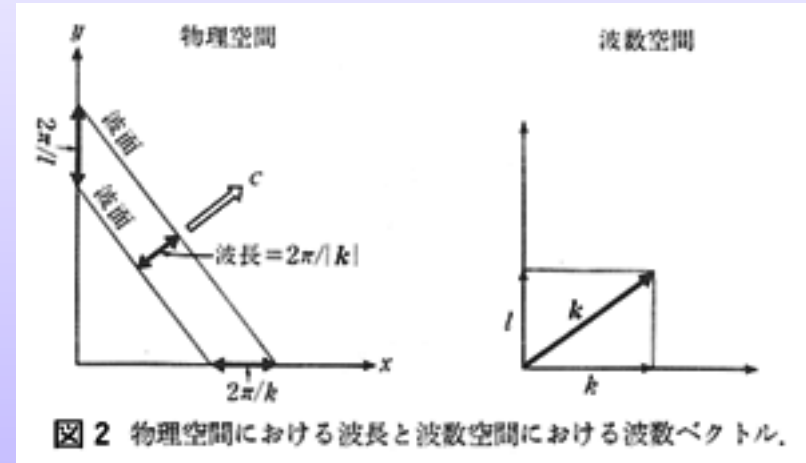
$$k_x = k \cos(\theta)$$

で与えられる。波数は波長 λ の逆数であることから、 x 軸方向の波長 λ_x は

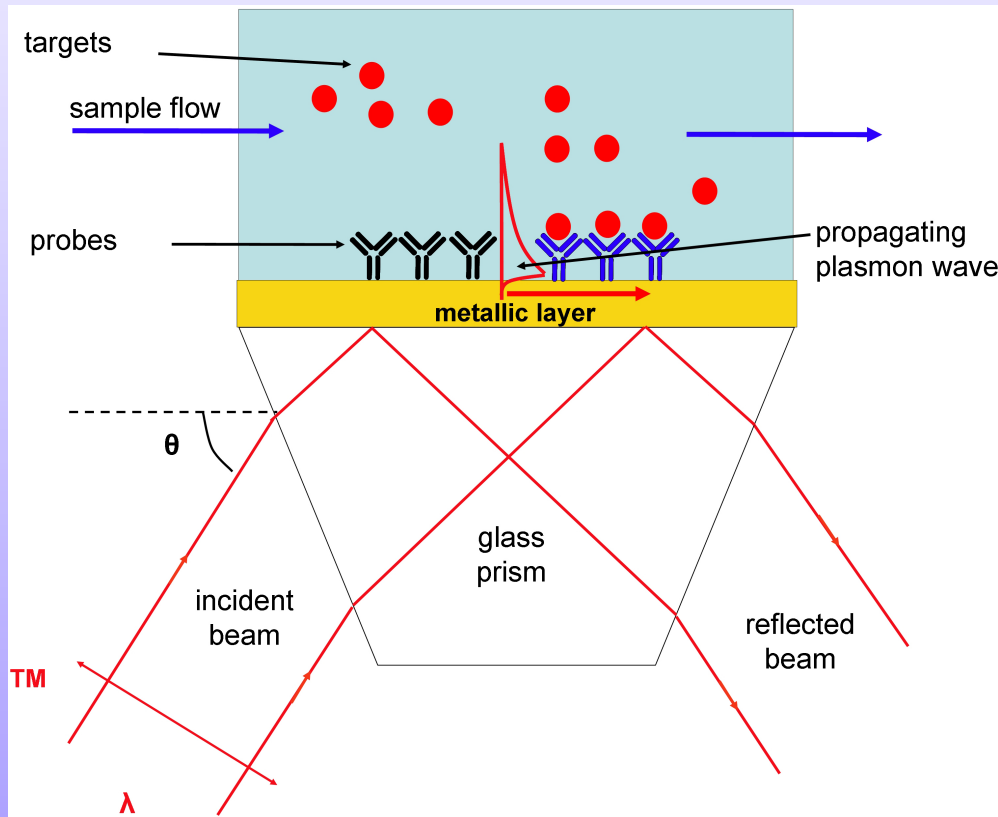
$$\lambda_x = \lambda / \cos(\theta)$$

で、角度によって波長が変わることが分かる。

SPR周波数より少し高い周波数の光が入射した場合、入射角を調整することで共振条件を満たすことができる。界面に沿った波数が共振に一致したとき、プラズモンが光エネルギーを金薄膜の表面に伝達し、エバネッセント波を励起する。



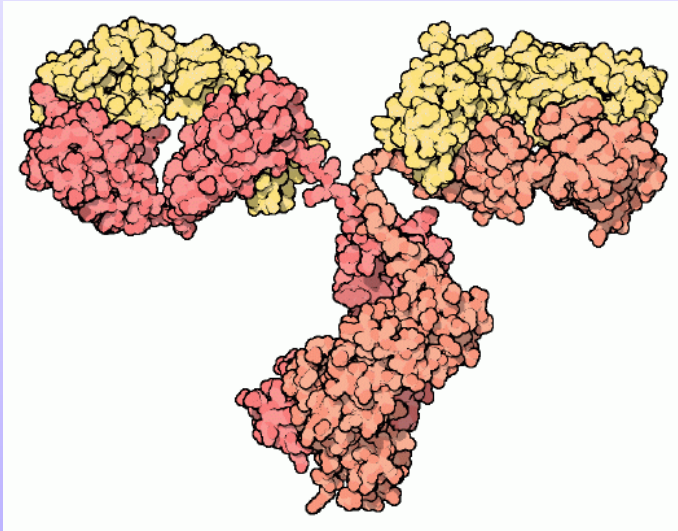
SPR免疫センサ



抗体による、抗原に対する特異的結合を、結合抗原量の変化としてSPRで検出することで、免疫センサを作ることができる。

精製した試料に対しては非常に高い感度を持っている。非特異吸着を表面修飾で抑えると、標的の検出が可能。

蛍光異方性測定免疫センサ

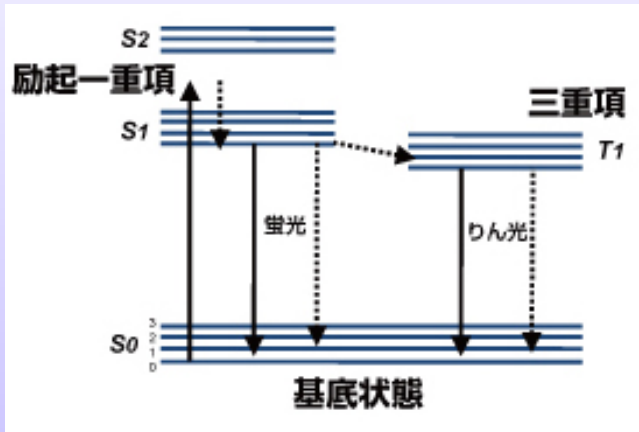


1分子の運動を直接測定し、その変化から抗原の結合を検出すれば、表面への吸着など関係なく免疫反応を測定する事ができる。

では、どうしたら分子の運動を測定する事ができるのだろうか？

蛍光

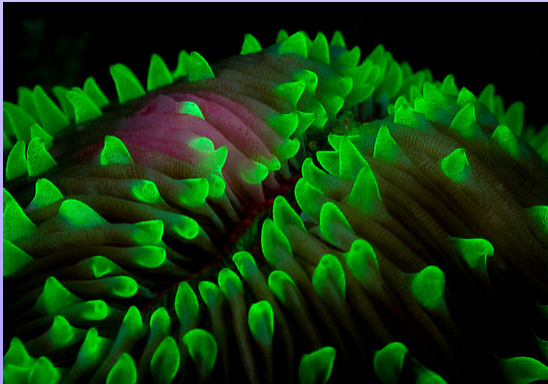
蛍光



電子は光エネルギーを吸収して基底状態から励起状態に上がり、光を放出してもとの状態に戻る。この時発生する光を蛍光や燐光と呼ぶ。

HOMO軌道内の電子のスピンの $1/2$ と $-1/2$ で全スピン 0 の状態から、 0 の状態のLUMOへの遷移を一重項遷移と呼ぶ。一重項遷移はスピン状態が変わらないので速く(数ns)で起きる。これによる速い発光が蛍光である。

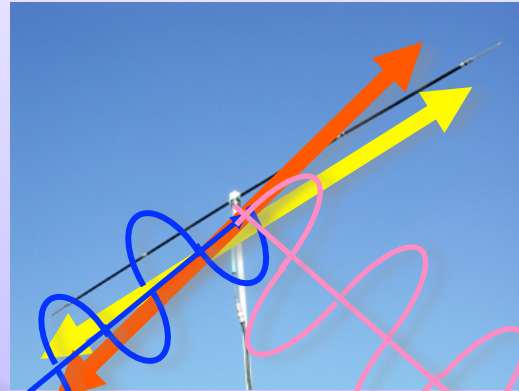
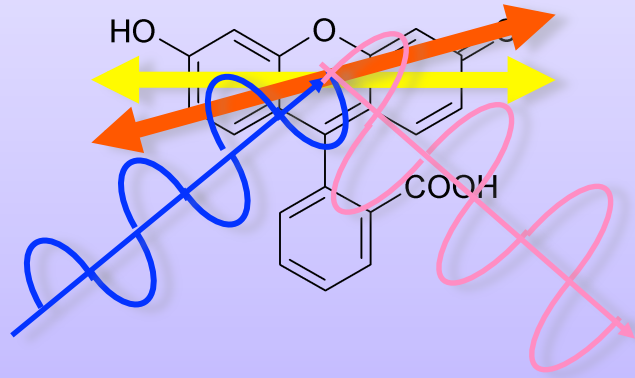
LUMO軌道内の電子のスピンの $1/2$ と $1/2$ で全スピン 1 の状態を三重項と呼ぶ。励起された電子が一重項からより安定な三重項に落ちると、その後スピンを交換しなければ一重項のHOMOには戻れない。このため、遷移確率が低く、発光までの時間が長くなったのが燐光である。



サンゴの蛍光

光のアンテナ

励起モーメント 発光モーメント

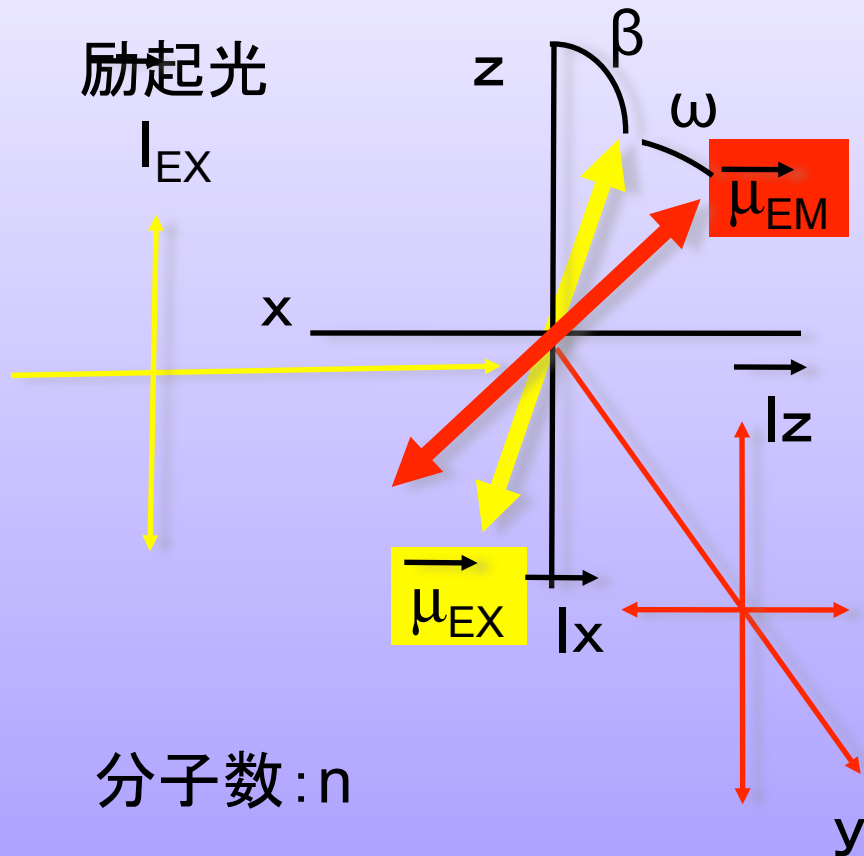


蛍光分子

アンテナ

電磁波の振動方向が分子の励起モーメントと同じ向きだと励起されやすく、同じ方向に振動する電磁波を放出する。

1 蛍光分子の励起と発光

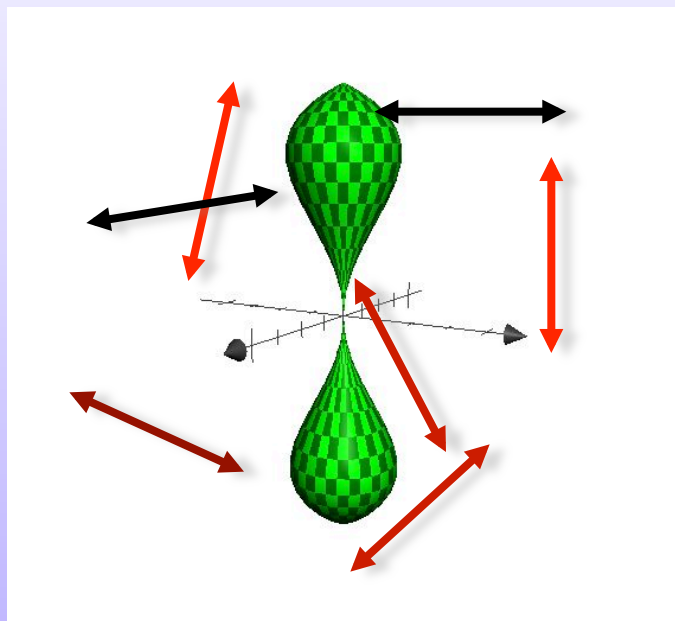


励起確率: p_E

$$p_E = (\mu_{EX} \cdot E_{EX})^2 = I_{EX} \cos^2 \omega$$

励起分子からの蛍光発光は、発光モーメント μ_{EM} の方向によって、 I_z 成分と I_x 成分の両方向振動成分を持つ。観測される蛍光は色々な方向を向いた分子集団からの発光の積分となる。

蛍光分子集団の励起と発光



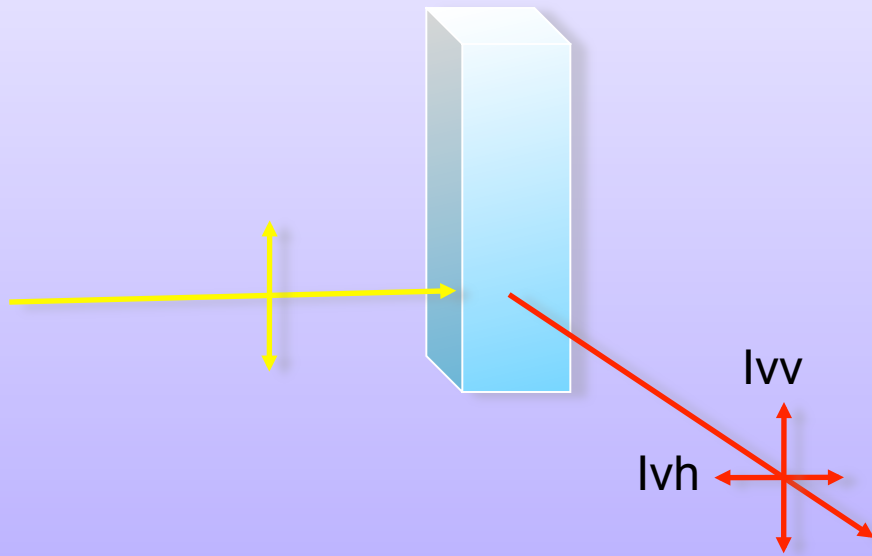
励起光の振動ベクトルをz軸とした時の極からの天頂角を β ,励起光入射軸からの周角を ϕ とする。励起はエネルギー密度に比例するので、電界強度の2乗に比例する。また、 β 方向を向いた励起分子数はその立体角 $2\pi \sin(\beta)$ 倍になる。よって励起分子の分布関数 $\rho_E(\beta)$ は角度の関数となる。

$$\begin{aligned}\rho_E(\beta) &= n \cos^2 \phi \cdot 2\pi \sin \beta \\ &= 2n\pi \cos^2 \phi \sin \beta\end{aligned}$$

簡単のため分子の励起モーメント μ_A と発光モーメント μ_E が等しいとすると、発光する分子集団も同じ分布を持つ。

励起分布： $\rho_E(\beta)$
分子数： n

蛍光異方性測定



$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2I_{vh}}$$

励起された分子の異方性（振動方向が一方向にそろっている程度）は、分子が励起されてから蛍光を放出するまでの回転運動によって緩和され、異方性 r は小さくなる。

この緩和時間から回転運動の速さが推定できる。

1分子の蛍光異方性

天頂角 β の発光ベクトルを持つ1分子からの蛍光は、強度を与える定数 k 、円周角 ϕ として、垂直成分 I_{vv} と水平成分 I_{vh} がそれぞれ

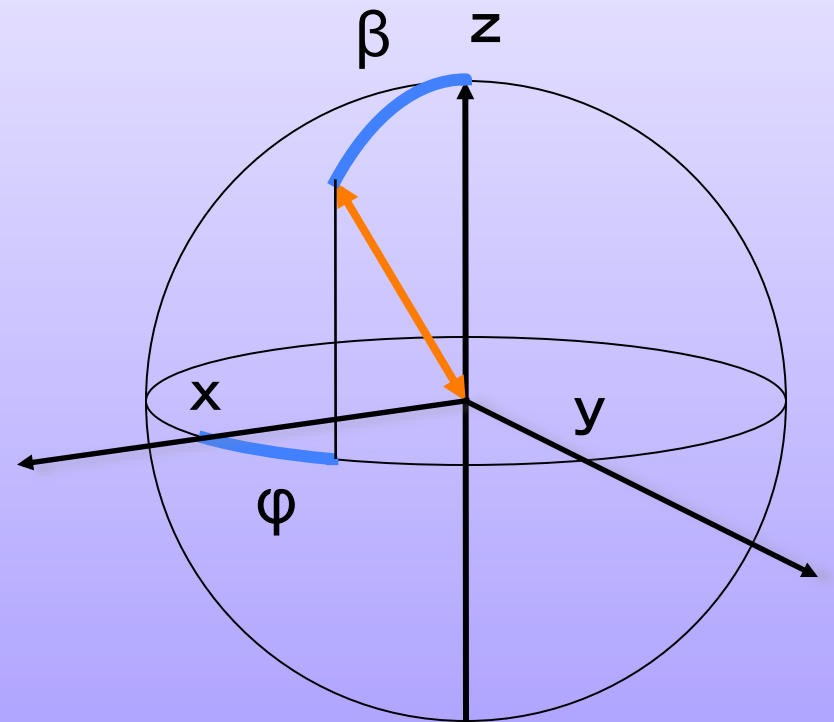
$$I_{vv} = k \cos^2 \beta$$

$$I_{vh} = k \sin^2 \beta \cos^2 \phi$$

となる。 $\cos^2 \phi$ を一周積分すると1/2。各成分を異方性の定義式に代入して、

$$r = \frac{k(\cos^2 \beta - 1/2 \sin^2 \beta)}{k(\cos^2 \beta + \sin^2 \beta)} = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2}$$

を得る。



蛍光分子の方向分布

全積分が1となるように規格化した励起分布 $\rho(\beta)$

$$\rho(\beta) = 3\cos^2\phi\sin\beta$$

をもつ分子集団からの蛍光発光の異方性 r は、

$$\begin{aligned} r &= \int \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \rho_E(\beta) d\beta \\ &= \int \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} 3\cos^2\phi\sin\beta d\beta \end{aligned}$$

で求められ、積分値は0.4になる。(励起と発光にずれがない時の異方性値。)

分子構造や運動による励起モーメントと発光モーメントのなす角が ω の場合には球面三角法の計算により

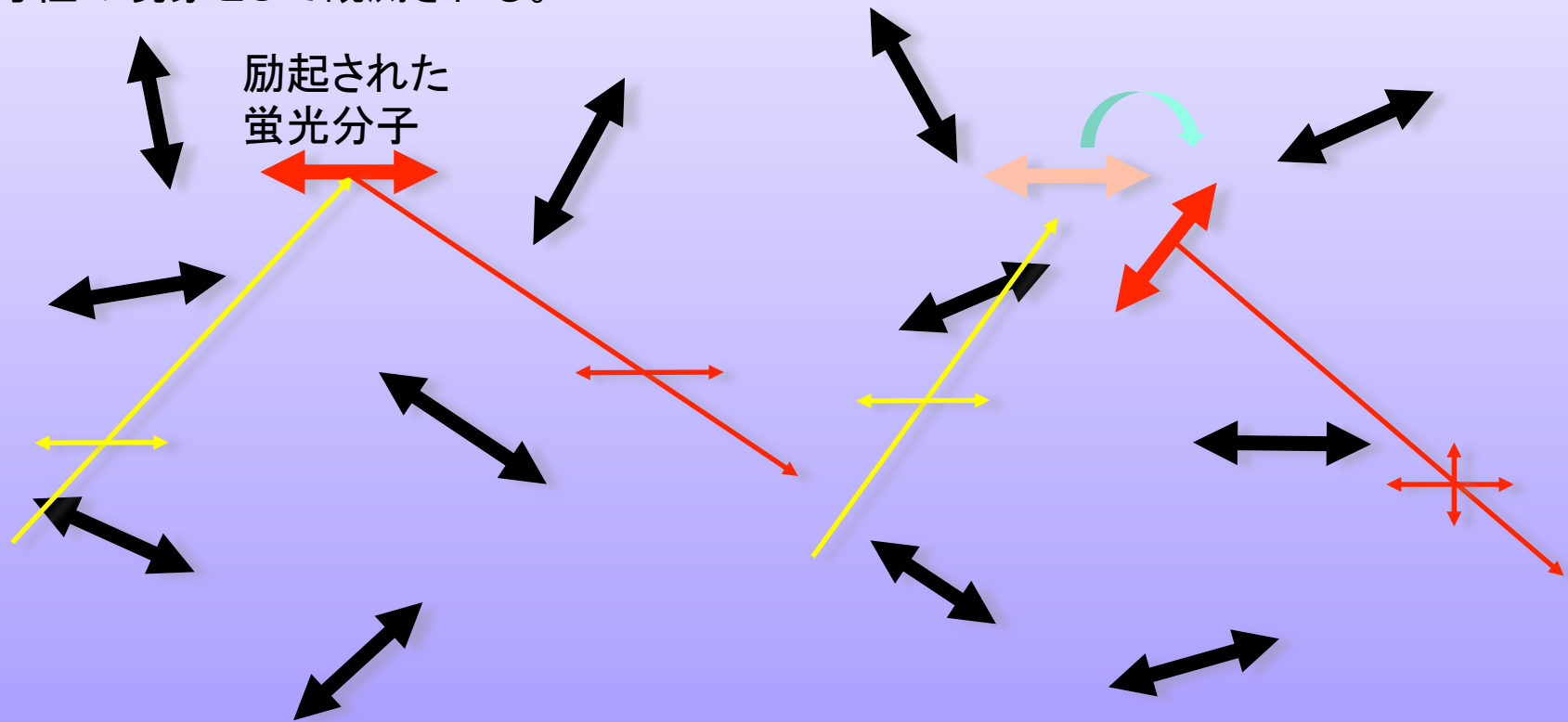
$$r = 0.4 \left(\frac{3\cos^2\omega - 1}{2} \right)$$

となる。

この値は励起モーメントと発光モーメントのずれが大きくなるほど小さくなり、0.4から-0.2の間の値をとる。

励起分布方向の緩和

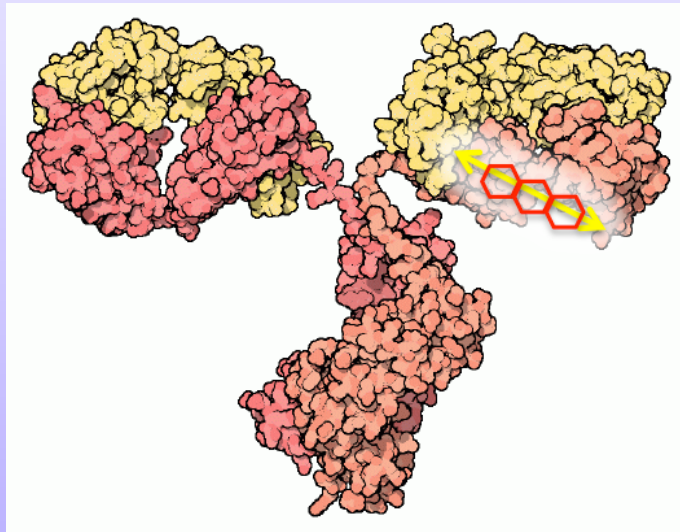
熱振動によって励起と発光のモーメントがずれる場合も異方性は減少する。分子集団の異方性は分子振動の速さによって緩和され、その様子が蛍光異方性の現象として観測される。



運動が遅いと励起と発光の振動方向が同じ。

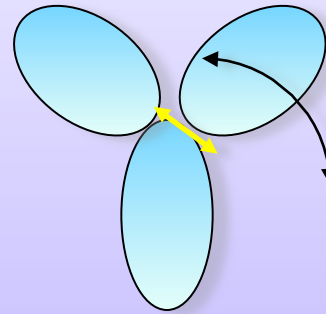
運動が速いと発光までに振動方向がずれる。

抗体タンパク



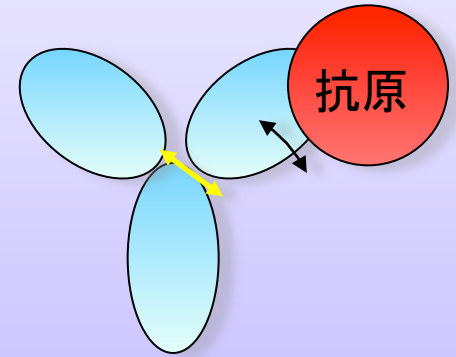
IgG分子(抗体)の模式図。
様々な病原体を認識して結合する。
抗体に蛍光分子をラベルすることで、
運動速度を測定する。

30 ns程度



何も結合していない抗体、
速度が速く、 r
が小さい

100 ns以上

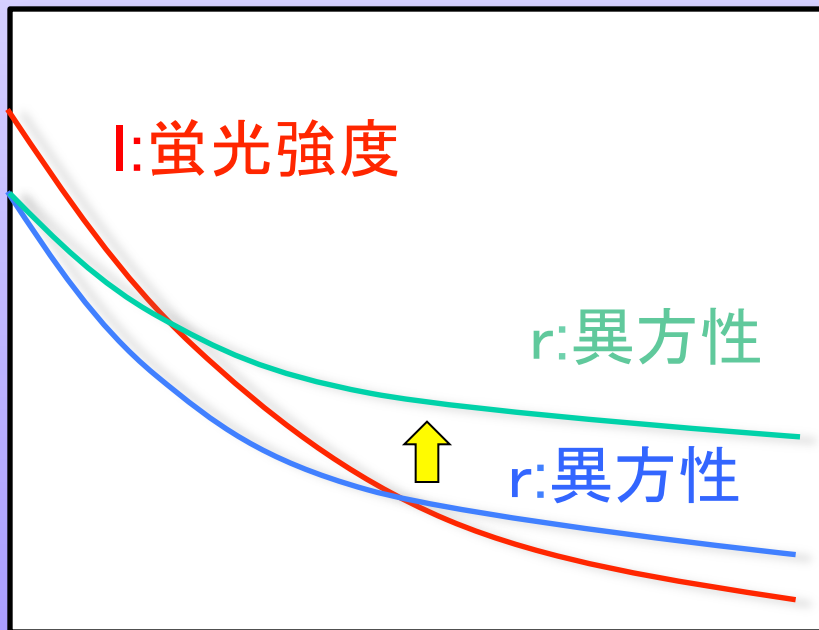


抗原が結合
速度が下がり、 r が大きい

単独では激しく振動するので異方性 r が小さいが、病原体(抗原)が結合すると、振動が減り、 r が大きくなる。

連続光励起

異方性の時間的緩和は、インパルス状の励起光に対して起きる現象と考えられる。連続光で励起した場合、蛍光強度と異方性の積が積分された値が観測される。

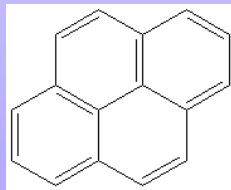


蛍光強度が一瞬で0になれば、観測される異方性の値は、最大値になる。逆に蛍光強度が減少しなければ異方性はもっとも低い値に近くなる。

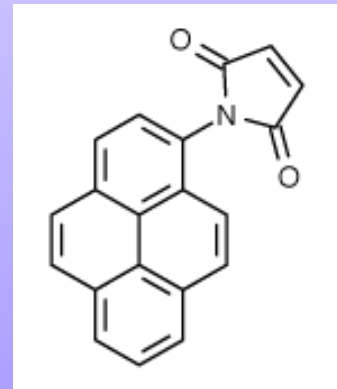
異方性の緩和速度の変化に対してもっとも敏感に測定するためには、異方性の緩和時間と蛍光の寿命が近い方が良い。

単独の蛍光分子の回転の特性時間は1ns程度、タンパク分子の分子振動の特性時間は10ns以上になる。一般の蛍光色素の蛍光寿命は通常4ns程度なので、巨大分子の観測にはふさわしくない。

Pyrene分子は蛍光分子としては異例に長い30-100nsの寿命を持つ。抗体分子をPyreneでラベルすることで回転緩和の変化を測定することができる。

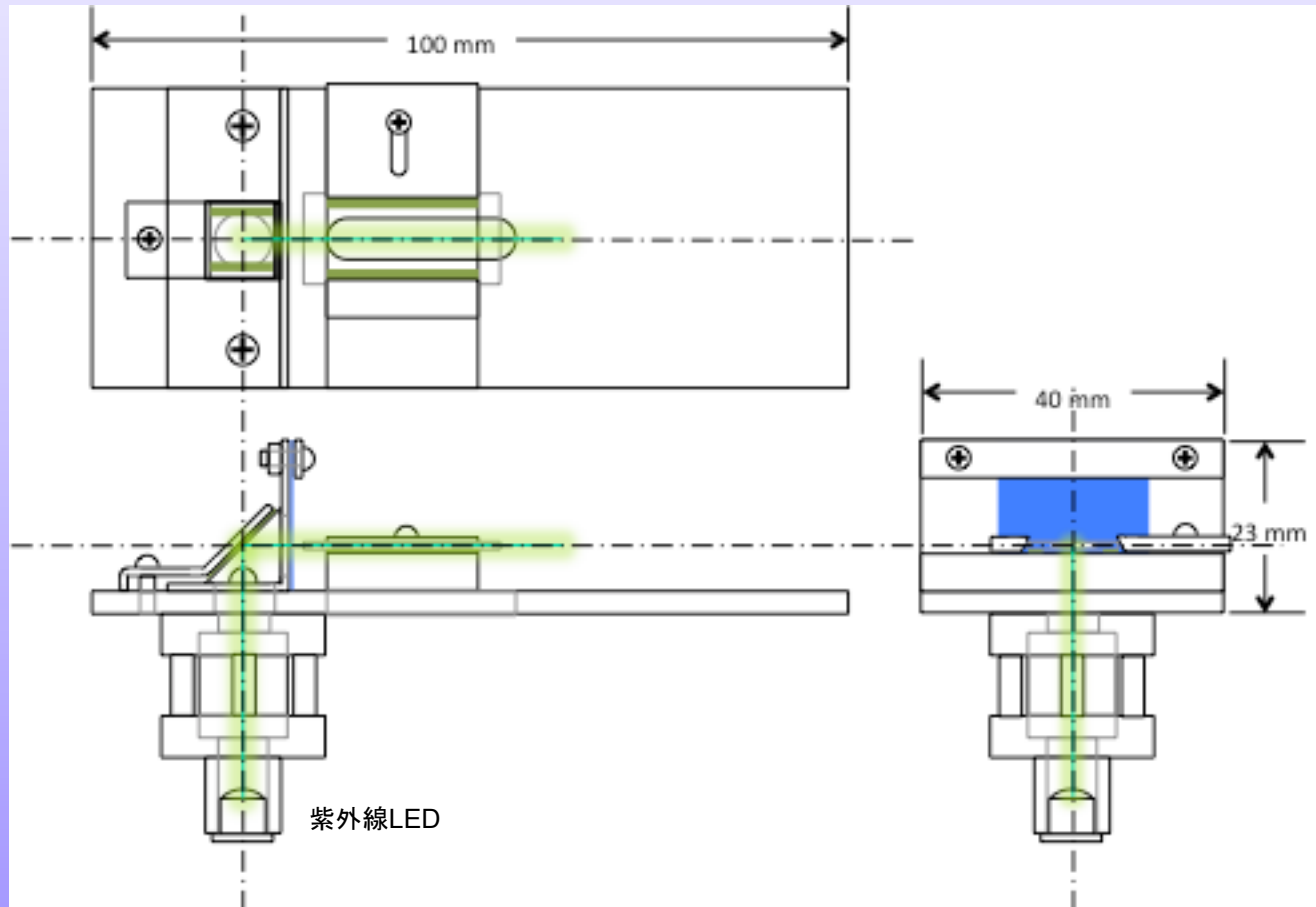


Pyrene

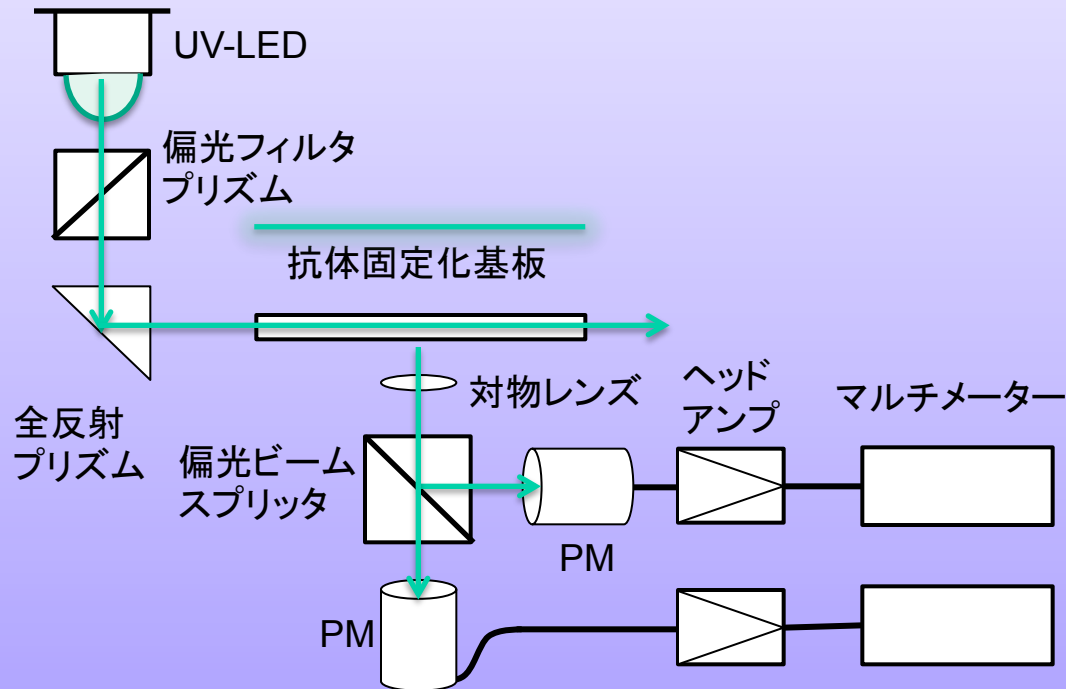


Pyrene Maleimide

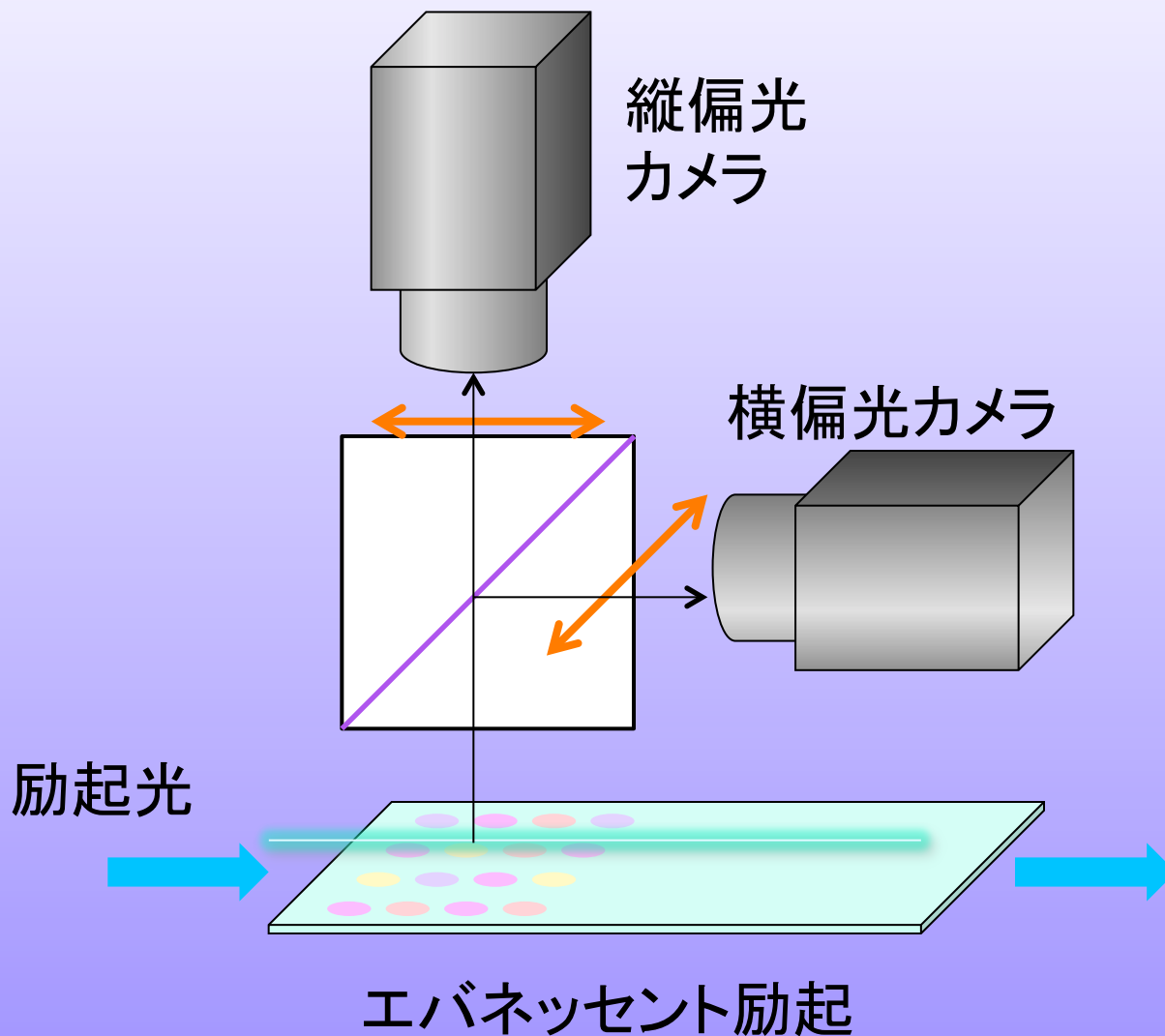
エバネッセント励起ステージ



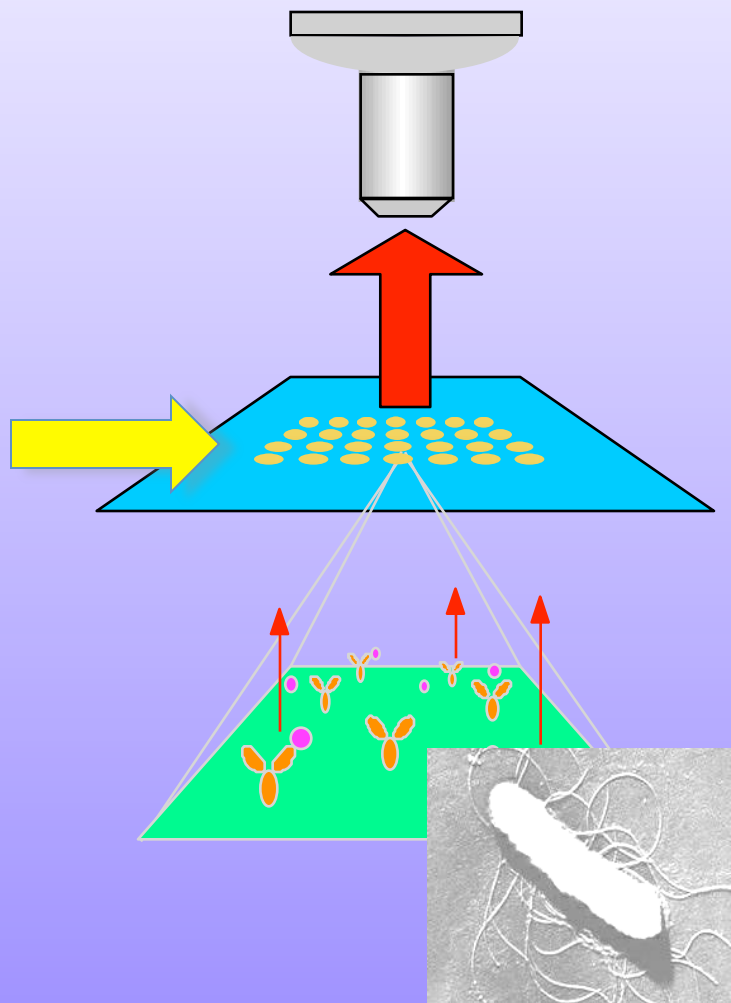
蛍光異方性の測定光学系



マルチチャンネル免疫センサ



蛍光異方性光免疫センサ



様々な病原体に結合する抗体をガラス基板上のスポットに固定。抗体一分子の運動を蛍光の偏光性で測定することで、各スポットに病原体が結合したかどうかを知ることができる。

このセンサなら、血液一滴でどんな病気も診断できる？

レポート問題

- 免疫センサのような特異的結合を検知するセンサで、非特異吸着の影響を抑えるためにはどのような工夫が考えられるだろうか。