

ヒスタミンセンサの試作

小久保弘樹*¹ 盛田耕作*²

Fabrication of a Histamine Sensor

Hiroki KOKUBO and Kosaku MORITA

Technical Consulting Division, AITEC*¹
Research and Development Division, AITEC*²

新規アミン脱水素酵素 (*Alcaligenes xylosoxidans* 由来) を用いてヒスタミンセンサを試作した。メディアータにはフェロセンを用い、酵素はグルタルアルデヒドとの架橋反応により作用極上に固定した。センサの応答は基質濃度 2 mM 以上のところで飽和傾向を示し、また、弱アルカリ性の試料で応答が大きく、中性から弱酸性になるにつれて応答が低下していくことがわかった。電極活物質の中では、尿酸による測定誤差の拡大が顕著に見られたが、センサ基板上に電極活物質を検出する電極を設けることにより、電極活物質による測定誤差を除去できることがわかった。

1. はじめに

ヒスタミンは毛細血管拡張、平滑筋収縮、胃酸分泌等の多くの薬理作用を持つ生理活性アミンである。生体内では肥満細胞に高濃度に存在し、免疫システムと密接な関係を持っている。近年問題になっている花粉症や気管支喘息、食物アレルギー等の即時型アレルギーは、この肥満細胞がアレルギー (アレルギー原因物質) と結合することによりヒスタミン等を放出するために発症する免疫疾患である¹⁾。従って、種々のアレルギー候補と血液を混ぜて、そのヒスタミン濃度を簡易に測定できれば、アレルギーの特定を容易に行うことができる。アレルギー検査の一般的な方法として、スクラッチテストやラスト法 (Radio-Allergo Sorbent Test: 放射性アレルギー吸着法) があるが、ヒスタミンセンサがこの検査に応用できる可能性も十分あると思われる。

ヒスタミンは、アミノ酸の一種であるヒスチジンが *Proteus morganii* 等の細菌が持つ酵素により脱炭酸されても生じる。サバやマグロ等は遊離ヒスチジン含有量が多く、細菌の働きによりヒスタミンが高濃度に蓄積されていることもあるため、その魚肉の摂取により吐き気や頭痛、じん麻疹等を発症することがある (アレルギー様食中毒)。腐敗の様相を呈する前に魚肉中にヒスタミン

が蓄積されていることがあり²⁾、魚介類の変質を視覚や嗅覚で捉えにくいと、アレルギー様食中毒発生の報告は後を絶たない^{3)~6)}。これを予防する確実な方法はヒスタミン濃度のモニタリングであり、その簡易測定技術を確立することが食品管理の分野で待ち望まれている。

そこで、本研究では新規酵素を用いたヒスタミンセンサを試作し、その特性評価を行った。電極活物質がしばしばセンサ応答に影響を及ぼすことから、その影響を除去する方法についても検討した。本報ではこれらについて報告する。

2. 実験方法

2.1 センサの作製

本研究で試作したヒスタミンセンサはメディアータ型酵素センサである。用いた酵素は *Alcaligenes xylosoxidans* 由来の新規アミン脱水素酵素 (以下 HmDH) であり、愛知県食品工業技術センターから精製液の状態で譲り受けた。30℃、pH: 8 の条件で、酵素活性を測定したところ、約 10U/mg であった。

センサの基板には、アルミナ粉をプレス成形後、焼結したものを用いた。焼結時に白金ペーストにより電極を形成させ、作用極、対極とした。参照極は銀/塩化銀線

*1 技術支援部機械電子室 *2 基盤技術部

を用い、エポキシ樹脂で基板に取り付けた。HmDH の作用極上への固定は、HmDH (0.3U相当量) と牛血清アルブミン (和光純薬: 和光一級、以下 BSA) の混合液を電極上に滴下した後、グルタルアルデヒド (和光純薬: 生化学用 70wt%、以下 GA) を加えて架橋反応させることにより行った。HmDH、BSA、GA はリン酸緩衝液 (リン酸水素二ナトリウムとリン酸二水素カリウムにより調整。いずれも和光純薬: 和光特級、以下 P B) により pH を 8 に調整し、メディエータには、酵素固定化の際の架橋反応に対して化学的に安定なフェロセン (関東化学) を用いた。調整した試薬の組成を表 1 に、作製手順を図

表 1 試薬組成

試薬	組成
溶液 A	飽和フェロセンエタノール溶液 (20)
溶液 B	100 μ l 酵素精製液 (P B : 2 mM、p H : 8)
溶液 C	2 wt % B S A (P B : 2 mM、p H : 8)
溶液 D	2 wt % G A (P B : 2 mM、p H : 8)
溶液 E	溶液 B (全部) + 溶液 C (15 μ l)

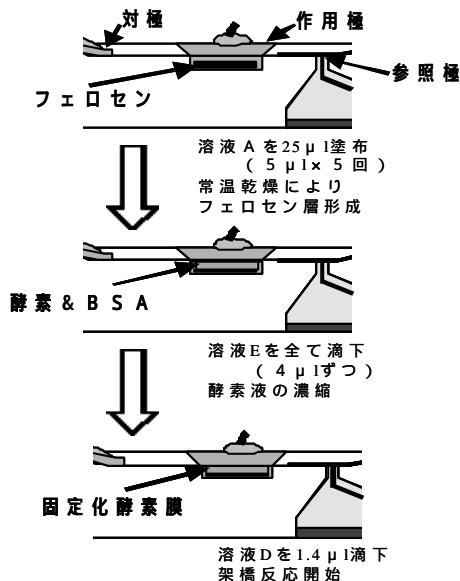


図 1 センサの作製手順 (断面図)

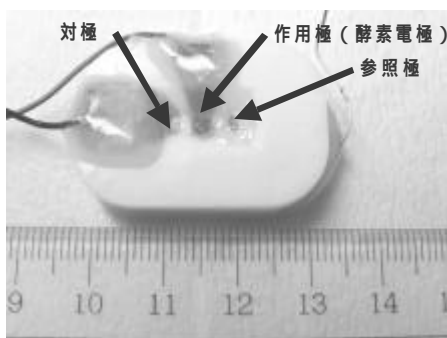


写真 1 ヒスタミンセンサ

1 に示す。写真 1 が完成したヒスタミンセンサであり、その電気化学反応の概要は図 2 のとおりである。

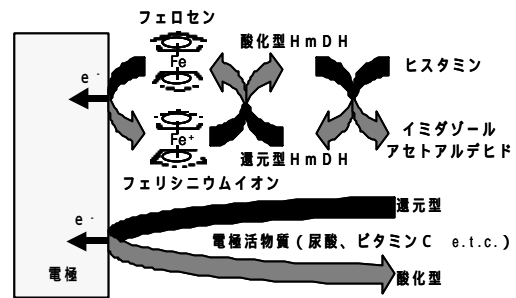


図 2 センサの電気化学反応

2.2 評価方法

測定では、0.1M の P B にヒスタミン (和光純薬: 和光特級) やビタミン C (和光純薬: 和光特級) 尿酸 (和光純薬: 和光特級) を所定の量溶かしたものを試料溶液として用いた。センサの特性評価では、この試料溶液を基板凹部に滴下した後の応答電流を測定しており、一測定当たりの試料溶液の使用量は約 200 μ l であった。測定は、センサを大気雰囲気中に設置し、35 に保った状態で行った。

電流応答の測定は、10pA 程度までの検出感度を有し、同時に 2 つの作用極を測定できるポテンショスタットを作製して行った。作用極電位を参照極 (飽和銀 / 塩化銀電極) に対して +0.2 V に設定し、ほぼ定常状態と見なせる試料滴下 500 秒後の電流値を測定した。

3 . 実験結果及び考察

今回試作したヒスタミンセンサの繰り返し応答特性を図 3 に示す。各測定間にスポイトで軽くセンサを水洗いしただけであるが、再現性は良好であった。

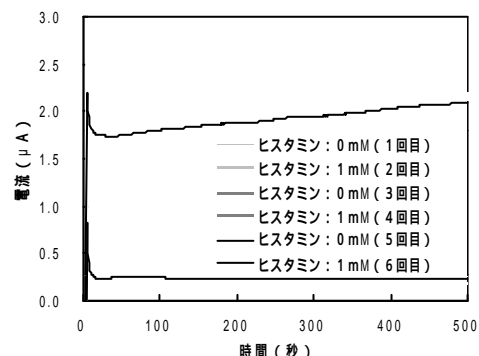


図 3 センサの繰り返し応答特性

ヒスタミン濃度依存性の測定では (図 4)、ヒスタミン濃度 0.1mM の時の電流値 (約 0.4 μ A) がヒスタミン濃度 0 mM の時の暗電流値 (0.1 ~ 0.2 μ A) の倍以上となっており、0.1mM は十分検出できる濃度であること

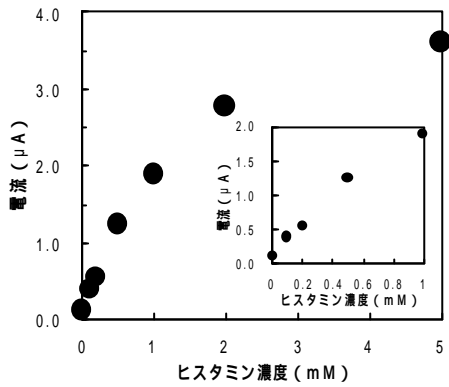


図4 センサのヒスタミン濃度依存性

がわかった。一方、高濃度側では2 mM 前後から飽和傾向が見られるようになるが、実際の生体試料の測定においては前処理段階で容易に希釈できることから、高濃度側での飽和特性が問題になることは少ないものと思われる。アレルギー様食中毒について述べれば、この食中毒が発症する魚肉中のヒスタミン濃度の目安として100mg/100g という数字が挙げられることが多く、また、米国食品医薬局 (Food and Drug Administration : FDA) では、20mg/100g 以上を腐敗した状態、50mg/100g 以上の場合には健康上有害であるとしている⁷⁾。簡易にできる食品成分試験法の前処理として、魚肉10gに塩酸を加えて50mlとしたものを試料溶液とするものがあるが⁸⁾、この方法で前述の数値をモル濃度に換算すれば、それぞれ1.8mM、0.36mM、0.9mM となり、本センサで測定可能な範囲にあることがわかる。

ヒスタミンセンサの pH 依存性では、弱アルカリ性の感度に比べて、弱酸性の感度が低下することがわかった (図 5)。しかし、実際の生体試料の測定では、多くの場合前処理段階で pH 調整が可能であり、測定の障害になることは少ないものと思われる。たとえ、pH 調整が困難な場合でも、著者らの提案した pH センサ⁹⁾で測定結果を補正することも可能である。

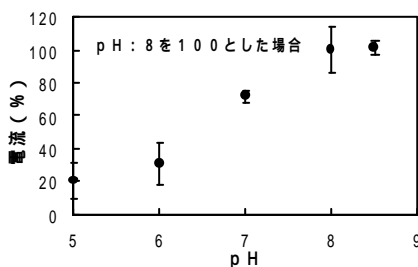


図5 センサの pH 依存性

ヒスタミン濃度 0mM 時と 1mM 時のセンサの応答電流の差を求め、その経時変化を調べた (図 6)。センサは約 4 日の冷蔵庫に保管し、測定する時のみ、冷蔵庫から取り出して実験を行った。図 6 からわかるように、

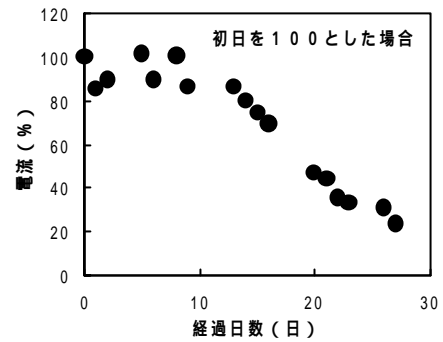


図6 センサの経時変化

測定開始から 2 週間程度はほぼ一定の応答を示したが、その後徐々に低下し、4 週間後には初期の 20% 程度の応答しか示さなくなった。この劣化は、HmDH の劣化やフェロセンがフェリシニウムイオンの形で試料溶液中に溶出したために、作用極近傍での電気化学反応の律速段階がヒスタミンの拡散過程から他の過程に変化したためであると思われる。改善法として、フェロセンや HmDH の固定量を増やし、ヒスタミンの拡散過程を律速段階とする期間を長くすることが考えられる。

代表的な電極活物質であるビタミン C と尿酸を用い、これらに対するセンサの応答電流を測定した (図 7)。

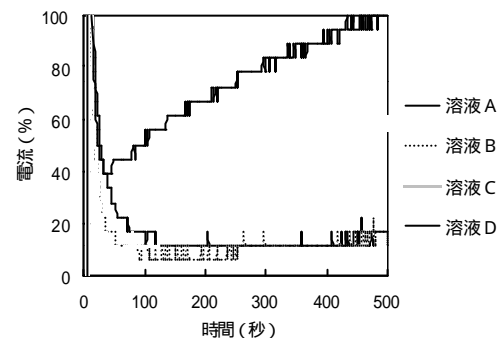


図7 センサの電極活物質に対する応答

溶液 A: ヒスタミン: 0mM, 尿酸: 0mM: ビタミン C : 0mM
 溶液 B: ヒスタミン: 0mM, 尿酸: 0mM: ビタミン C : 0.5mM
 溶液 C: ヒスタミン: 0mM, 尿酸: 0.5mM: ビタミン C : 0mM
 溶液 D: ヒスタミン: 1mM, 尿酸: 0mM: ビタミン C : 0mM

なお、本測定における電極活物質の濃度 0.5mM は、人の血中濃度を参考として、若干大きめに設定した値である。この測定に使用したセンサは他のセンサと異なり、試料滴下 500 秒後でも定常状態に到らなかったが、電極活物質の影響を調べるうえでは問題ないものと思われる。本実験からセンサはビタミン C の影響をほとんど受けないが、尿酸による電流値の増加は少なくないことがわかった。そこで、尿酸の影響を補正するために、白金ペーストによる作用極を二つ形成し、一つを酵素電極、他の一つを尿酸濃度検出用の参照電極とするセンサを製作し

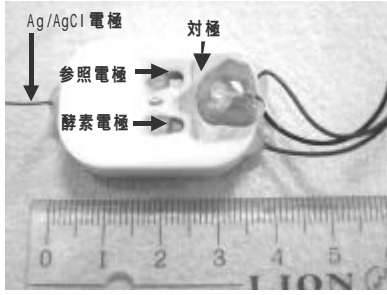


写真 2 改良ヒスタミンセンサ

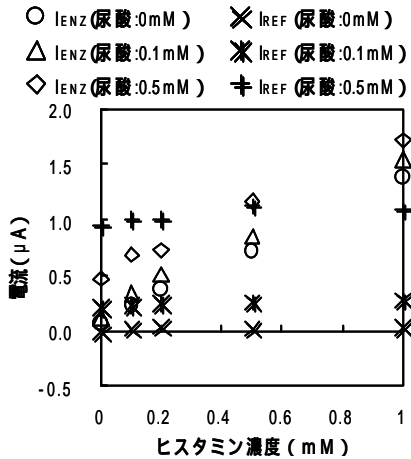


図 8 改良センサの応答特性

た(写真 2)。その応答特性を図 8 に示す。なお、図中の I_{ENZ} 及び I_{REF} は、それぞれ酵素電極、参照電極における電流値である。この図から、酵素電極の電流値はヒスタミン濃度の上昇にともない直線的に増加するとともに、試料溶液中の尿酸濃度に応じて電流値が全体的にかさ上げされること、また、参照電極の電流値はヒスタミン濃度の影響はほとんどなく、尿酸濃度に応じて上昇することがわかる。ヒスタミンによる酵素電極の電流分 I_{HIS} が、 I_{ENZ} と I_{REF} の簡単な一次式で推定できると仮定して、その係数をヒスタミン濃度 0 mM 時の I_{ENZ} と I_{REF} の測定値から最小自乗法で求めた結果、次式を得た。

$$I_{HIS} = I_{ENZ} - 0.43 \times I_{REF} \quad (1)$$

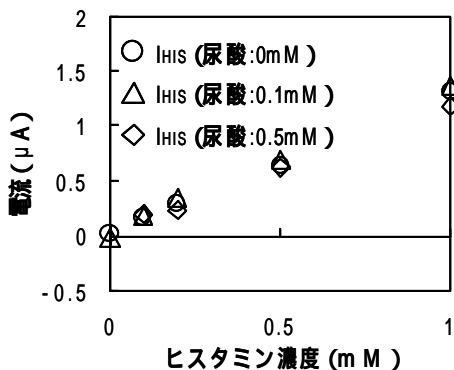


図 9 センサの応答特性の補正

(1)式により図 8 の酵素電極電流を補正したのが図 9 であり、尿酸濃度の影響はほとんど除去できることがわかった。実際にシステム化する場合には、マイコンに簡単な校正ルーチンを組み込むだけで実現可能である。尿酸、ビタミン C 以外の電極活物質については測定していないが、生体中での濃度が低いことから測定に大きな誤差を与える可能性は低いものと思われる。

4. ま と め

本研究では新規アミン脱水素酵素を用いたヒスタミンセンサを試作し、その特性評価を行った。個々のセンサは良好に動作し、また、電極活物質の影響も容易に除去できることはわかったが、図 3 と図 7 で応答波形の違いが見られるように、センサ間での特性のばらつきが生じた。これは、白金ペーストを筆で塗っているために電極の出来映えに差が生じることや、GA 等の試薬が極微量あるために使用量のばらつきが生じ、固定化酵素膜の架橋度に差が生じていることなどが原因と思われる。今後は、作製法を改良するとともに、簡単な校正ルーチンでセンサ間の特性のばらつきを補正する方法について検討していく予定である。

現在は、市販試薬を調整した試料を用いて実験しているが、実際の生体試料では蛋白質の吸着等によるセンサ特性の変化が問題化する可能性がある。また、今回使用した酵素はヒスタミン以外のアミンに対しても若干の触媒活性を示しており、このことが実際の測定に与える影響についても検討する必要がある。今後は魚介類を使用した実験も行い、これらのことについても研究していく予定である。

文 献

- 1) 例えば、B. Alberts et al. : Molecular Biology of the Cell , 1016(1989) , Garland Publishing, Inc .
- 2) 例えば、総合食品安全事典編集委員会編 : 総合食品安全事典 , 427(1994) , 産業調査会 .
- 3) 木村正人 : 食衛誌 , 37 , J233(1995) .
- 4) 高橋富世 : 食衛誌 , 39 , J203(1998) .
- 5) 道本真理子 : 食衛誌 , 40 , J386(1999) .
- 6) 小林弘志 : 食衛誌 , 41 , J187(2000) .
- 7) FDA : CPG7108 , 24 .
- 8) 日本薬学会編 : 衛生試験法・注解 , 173(2000) , 金原出版 .
- 9) 小久保弘樹、盛田耕作 : 愛知県工業技術センター報告 , 37 , 8(2001) .