

## 電気化学的測定法による糖化アルブミンのセンシング†

菅原一晴\*, 門屋利彦\*\*

## 1 はじめに

糖尿病などで高血糖状態が続くとグルコースなどの還元糖とタンパク質やペプチドとが非酵素的に反応してアマドリ転移生成物となり、さらに酸化、脱水、縮合反応によって多様な構造の終末糖化産物 (Advanced glycation end-products: AGEs) が生成される<sup>1)</sup>。この AGEs は肝臓や腎臓の血管内皮細胞、平滑筋細胞などに蓄積し、腎障害、動脈硬化症、心筋梗塞のような糖尿病性合併症の進展要因となることが知られている<sup>2)</sup>。それゆえ、アマドリ転移生成物をモニタリングし、それらの血中レベルをコントロールすることができれば、糖尿病合併症の発症の低減が可能となる。糖尿病の指標となるこれらの物質として 1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (1,5-AG) や糖化ヘモグロビン A1c (HbA1c)、糖化アルブミン (GA) などがある<sup>3)</sup>。1,5-AG は、数日から数週間の血糖値の平均とすることができ、その値は慢性腎不全などの疾病により低下する。HbA1c は糖尿病の診断マーカーとして一般的に使われており、過去 2-3 か月間の平均血糖値を反映していると考えられている。一方、GA は 2~4 週間の平均血糖値のマーカーとなり、HbA1c と比較して短期間で血糖値の状態のモニタリングに適している。このような背景からのいくつかの GA スクリーニング法が開発されてきた。例えば、GA と 3-アクリルアミドフェニルボロン酸との相互作用に基づいたキャピラリー電気泳動法が提案されている<sup>4)</sup>。また、プロテアーゼとフルクトサミンオキシダーゼとを用いて GA がグルコノラクトンとアミノ酸に分解される際にルミノールを共存させた発光検出が行われた<sup>5)</sup>。Ki らは、ヒト血清アルブミンのグルコースレベルと糖化比をイムノクロマトグラフィーによって検出するセンサを考案した<sup>6)</sup>。それに対して、電気化学的手法に基づいた GA の検出方法も報告されており、高感度で費用対効果が高く、簡易迅速型のセンサの構築が期待できる。本論文では、①ビオチン化 GA 認識アプタマー/ストレプトアビジン-固定化電極、②スクリーン印刷カーボン電極上にグラフェンを固定化し GA 認識 ss-DNA をその表面に修飾したセンサ、③酵素反応によるε-フルクトシルリジン(ε-FK)生成に基づいたセンシングシステムに関する研究について概説する。

## 2 ビオチン化 GA 認識アプタマー/ストレプトアビジン-固定化電極を用いた GA 検出

Bunyarathaphan らはタンパク質分解ステップや熱イ

ンキュベーションを必要としない GA 測定用の電気化学的アプタセンサを提案した<sup>7)</sup>。研究のねらいは、ポイントオブケア検査 (POCT) デバイスとして高い再現性をもち、安価で、取り扱いが簡単な使い捨てマイクロチップを作製することであった。そのデバイスはストレプトアビジン-ビオチン相互作用を介し GA および HSA に対して特異的なアプタマーをそれぞれ固定したスクリーン印刷カーボン電極 (SPCE) である。GA と HSA とのアプタマーへの結合を評価するために酸化還元メディエーターである  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  の存在下で、各アプタマー修飾電極を用いてターゲットタンパク質の結合をボルタメトリー的手法により測定した。GA または HSA を添加した場合、アプタマー-ターゲットタンパク質複合体の形成により、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  の電極への電子伝達が抑制され電流値が減少するため各タンパク質の検出が可能となった。GA 電気化学的アプタセンサは、6 オーダーの広い線形測定範囲 ( $1.0 \times 10^{-2} - 1.6 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ ) を備えており、検出限界は GA で 3 ng/mL、HSA で 0.2  $\mu\text{g/mL}$  であった。アプタセンサの再現性は、25  $\mu\text{g/mL}$  GA と 32  $\mu\text{g/mL}$  HAS のアッセイで見積もられた。相対標準偏差 ( $n=3$ ) はそれぞれ 6.5 % と 8.6 % であった。センサの安定性については約 1 か月間保管した後のアプタセンサを使用して 25  $\mu\text{g/mL}$  GA と 32  $\mu\text{g/mL}$  HSA を検出した場合、初期応答の 87 % および 83 % となった。グルコース、グリシン、葉酸、アンピシリン共存下での測定への影響を評価した結果、GA に対して高い選択性を示した。電気化学的センサを血漿サンプル中の GA の測定に適用したところ、糖尿病患者と非糖尿病患者の GA の濃度において統計的に有意な差が観察された。糖尿病血漿中の GA 濃度は、非糖尿病血漿中の GA 濃度よりも高く、糖尿病血漿と非糖尿病血漿でそれぞれ 5 - 32 および 1 - 2 mg/mL あった。さらに、これらの GA 濃度の傾向は、HbA1c テストを使用して得られた傾向と一致した。従って、開発されたシステムは GA 値測定に関する POCT の一つとなる。

## 3 GA センシングのための GA 結合アプタマー/グラフェン-固定化電極のデザイン

GA を高感度、効果的、迅速に検出するために、グラフェン (GO) ベースの電気化学的アプタセンサをデザインした<sup>8)</sup>。その手法は、最初にカルボキシ基を有した GO を SPCE に固定化した。次に、GO に 5'-アミノ基を導入した DNA アプタマーを凝集反応によりアミド

† 原稿受理 令和 4 年 2 月 28 日 Received February 28, 2022

\* 教職センター (Teaching Profession Center)

\*\* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

結合を介して修飾した使い捨てのセンサを作製した。電気化学的アプタセンサの特性は、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ を使用しサイクリックボルタメトリーとインピーダンス測定によって確認された。未修飾 SPCE と GO-SPCE とのサイクリックボルタモグラムの比較すると GO-SPCE において酸化還元応答は大幅に増加した。これは電極の活性面積が増加し電荷移動速度が改善されたことに起因している。アプタマーを修飾すると、その電極応答は SPCE 表面状態変化とアプタマーの負に帯電したリン酸基のため $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ の電流値が減少した。GA の結合によるアプタマーコンフォメーションの変化はさらなる電流値の減少をもたらすため GA が検出できた。測定では、インピーダンス $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3-}$ の電荷移動抵抗( $R_{ct}$ )の変化から電極の特性が特長づけられた。未修飾 SPCE のナイキストプロットは高周波数領域と低周波数領域の半円と線形で構成された。電子移動速度は GO-SPCE で増幅され  $R_{ct}$  値が減少した。一方、アプタマー/GO-SPCE, GA/アプタマー/GO-SPCE の順に抵抗値は増大していった。GA の検量線は  $1 - 10,000 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $R^2=0.9899$ ) で検出限界  $0.31 \mu\text{g}/\text{mL}$  となり、糖尿病の診断法として十分であった。また、ビリルビン ( $0.05 \text{ mg}/\text{mL}$ ) と、アンピシリン ( $5 \text{ mg}/\text{mL}$ ) および葉酸 ( $160 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を共存させた際にも電流値への影響はほとんど認められなかった。再現性については、 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  GA ( $n=20$ ) の測定によって得られた相対標準偏差 2.1% であった。本センサを 15 日間、 $4^\circ\text{C}$  で保存したところ、 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$  GA の電流値は作製日の応答 92% となった。ヒト血清に GA を添加し 1000 倍に希釈して測定したところ 50 および  $240 \mu\text{g}/\text{mL}$  での回収率は 98.7% と 92.2% であり RSD 値は 2.1% と 2.6% になった。電気化学的手法によって測定された GA 値は、市販の ELISA キットを使用して得られた値と一致しており、開発された電気化学的センサは十分な性能を示した。

#### 4 酵素反応に基づいた糖化アルブミンの電気化学的システムの開発

酵素反応を利用した電気化学的システムは GA をセンシングするための手法の一つとして有用であると考えられる。ここでは GA を検出するためにフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOx) に基づいた POCT に向けた電気化学酵素センサの開発について述べる<sup>9)</sup>。FAOx そして電子メディエーターには塩化ヘキサアンミンルテニウム (III) 錯体を使用しスクリーン印刷カーボン電極 (SPCE) で測定を行うものである。その原理はプロテアーゼによる消化によって  $\epsilon$ -FK が生成し、続いて FAOx によって酸化され、その際に Ru 錯体が還元される。還元された Ru 錯体は、酵素と電子メディエーターが電極に吸着することによりクロノアンペロメトリーによって測定された。本測定システムでは、プロテアーゼ分解によるサンプル調製後約 1 分以内に、少量のサンプル量 ( $1.3 \mu\text{L}$ ) で GA を測定することができた。血中 GA 値の正常範囲は 11~16% であり 24% 以上で糖尿病の可能性

が大となる。プロテアーゼ消化された GA サンプルから計算された  $\epsilon$ -FK は、15% および 30% GA でそれぞれ 29 および  $81 \mu\text{M}$  であり明確に区別できる結果が得られた。測定システムは  $37^\circ\text{C}$  で三ヶ月間、GA センサとして安定に機能した。上記の結果は、開発されたセンサが POCT として有効であることを示しており、臨床分野へ応用できる。

#### 5 まとめ

SPCE をベースとした電気化学的センシングシステムは、迅速かつ高感度で、使い捨てのツールとして GA を検出することが可能である。また、上述の手法は糖尿病の診断に必要とされる GA の濃度範囲をカバーする手法となっており SPCE の有用性が明らかである。今後、既存の測定システムに匹敵する有力な POCT システムとして臨床現場への導入が期待される。

#### 参考文献

- 1) Q. Song et al., Novel advances in inhibiting advanced glycation end-product formation using natural compounds, *Biomed. Pharmacother.*, **140**, 111750 (2021), doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111750.
- 2) Maxime Fournet et al., Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and aging, *Aging Dis.*, **9**, 880-900 (2018).
- 3) H. Choi et al., Electrochemical Immunoassay For Determination of Glycated Albumin using Nanozymes, **10**, 9513 (2020), doi: 10.1038/s41598-020-66446-3.
- 4) G. Murtaza et al., Determination of glycated albumin in serum and saliva by capillary electrophoresis utilizing affinity of 3-acrylamido phenylboronic acid selected by virtual screening and molecular docking, *J. Chromatogra. A*, **1636**, 461793 (2021), doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461793.
- 5) Y. Inoue et al., Sensitive Detection of Glycated Albumin in Human Serum Albumin Using Electrochemiluminescence, *Anal. Chem.*, **89**, 5909-5915 (2017).
- 6) H. Ki et al., Simultaneous Detection of Serum Glucose and Glycated Albumin on a Paper-Based Sensor for Acute Hyperglycemia and Diabetes Mellitus, *Anal. Chem.*, **92**, 11530-11534 (2020).
- 7) S. Bunyarataphan et al., Glycated Albumin Measurement Using an Electrochemical Aptasensor for Screening and Monitoring of Diabetes Mellitus, *Electroanalysis*, **31**, 2254-2261 (2019).
- 8) N.N.S. Aye et al., A Simple Graphene Functionalized Electrochemical Aptasensor for the Sensitive and Selective Detection of Glycated Albumin, *Appl. Sci.* **11**, 10315 (2021), doi.org/10.3390/app112110315.
- 9) M. Hatada et al., Development of a screen-printed carbon electrode based disposable enzyme sensor strip for the measurement of glycated albumin, *Biosens. Bioelectron.*, **88**, 167-173 (2017).