

新しい皮膚成分の分析手法としてのコレステロールセンサの開発

大阪府立大学 先端科学イノベーションセンター

椎木 弘

Control of the skin cholesterol level plays an important role for preventing the life-style related diseases and goes a long way in skin health. However, the conventional method is troublesome due to its sensitivity and the necessity of using the enzyme reaction through many procedures. Therefore, we focus on the simple electrochemical measurement of cholesterol using the molecularly imprinted self-assembled monolayer (SAM). A detection of the electroinactive cholesterol has been achieved by electrochemical method with a potassium ferrocyanide as a redox marker. The change of the oxidation peak current (I) has shown a linear relationship with the concentration of cholesterol. The change of I related to the cavity concentration for the mass-transport of redox marker on the molecularly imprinted SAM. When the cholesterol-sensitive SAM recognizes cholesterol, the I decreases due to the rejection of diffusion of the marker to the gold electrode surface. On contrary, when the SAM extracts cholesterol, the marker diffuses to the electrode surface, and the I increases. The sensing properties of molecularly imprinted SAM, such as sensitivity, selectivity, and reproducibility, have been examined and it has been applied for simple and speedy electrochemical sensor development.

1. 緒言

コレステロールは皮膚の保湿、老化防止に関する重要な成分として、また、細胞膜や細胞内の物質の移動を防ぐ生体膜を構成する成分としても知られており、さらに胆汁酸、各種ホルモンの原料になるなど様々な役割を担っているなど、身体を維持していくために不可欠な化合物であるが、過剰摂取は動脈硬化や狭心症の危険因子である高脂血症の発症に深く関わると言われている¹⁻⁴⁾。食文化の相違から、高コレステロール血症を含む高脂血症は欧米人に多く見られ、東洋人、とりわけ日本人には軽視されがちであったが、その人口は日本国内においても年々増大し、平成2年には700万人であった患者は平成12年では2000万人を超えるまでに増大している。さらに、他の生活習慣病や疾患・疾病などの合併症のリスクから計測による管理の必要性が増しており、コレステロール濃度の適正レベルの維持はゆとりある日常生活を送るための必要条件となっている。したがって、簡易なコレステロール計測法および機器の開発は、医療従事者だけでなく、家庭での健康の自己管理を望む多くの人々に切望されている。しかしながら、医療機関で行われる計測の全てが酵素法によるもので、採血(侵襲)を伴うため自宅での簡単な検査は困難である。

近年、米国FDAは皮膚コレステロールが体内コレス

テロール全体の約11%を占めていることを報告し、加国International Medical Innovations社と米国クリーブランドクリニックの研究グループはコレステロール検査法*Cholesterol I, 2, 3™*を開発した⁵⁾。この方法は検査パッドを手のひらに貼り付け、酵素反応による色の変化で皮膚のコレステロール量を判断できるというもので非侵襲的な検査が可能である。しかしながら、低感度なために定量的な計測は困難で、一般母集団を対象としたCADのリスクを判定するスクリーニングテストとしては不適合であるとされており、標準的な血液検査に取って代わる検査法ではない。実際に皮膚と血中のコレステロールに相関が在るか否かという問題はいくつかの報告⁵⁻⁷⁾に結論を委ねるが、コレステロールを非侵襲的に計測するひとつの新しい試みとして、また、皮膚の健康状態を客観的に調べる一つの指標として、分子鑄型^{8, 9)}を刷り込んだ自己集合単分子膜を利用した測定法の開発を行い、皮膚コレステロールの定量を行った。

2. 実験

2.1 電極の作製と測定

作用極(センサ部)に金電極(直径1mm)、対極に白金線および参照極としてAg/AgCl[基準参照極Ag/AgClの標準水素電極(SHE)との電位差は25℃で+0.199V]を使用した。以下、全ての電気化学計測により得られた値はAg/AgClに対するもので、その表記はvs. Ag/AgClとする。金電極の表面を研磨および超音波洗浄した後、0.1M硫酸水溶液中で-0.2~+1.5V(vs. Ag/AgCl)、掃引速度100mV/sで電位サイクルして洗浄した。この電極を20mMコレステロールと100μMステアリルメルカプタ

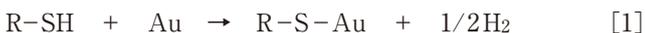


Development of novel analytical method for skin cholesterol

Hiroshi Shiigi

Frontier Science Innovation Center,
Osaka Prefecture University

ンを含む修飾エタノール溶液 50mL に 30min 浸けて金電極上に自己集合単分子膜 (self-assembled monolayer 以下 SAM と略) を形成した。SAM 電極をエタノール中に浸し 3 時間攪拌することで、鑄型分子であるコレステロールを洗い流して分子鑄型電極とした。SAM はチオール分子の -SH 部位が金に吸着することを利用したもので、下式 [1] のような反応により形成されることが知られている¹⁰⁾。



アルキルチオールを用いた場合、金電極上に吸着した隣り合うチオール分子のアルキル基がファンデルワールス力によって引き合うことで高密度にパッキングされる¹¹⁻¹³⁾。本研究ではチオール分子として長鎖アルキル基を有するステアリルメルカプタン (C₁₈H₃₇SH) を使用し、コレステロールとの混合溶液に金電極を浸漬することで、金電極上に SAM を形成した。エタノール中で SAM 修飾電極を洗浄すると、コレステロールだけが洗い流され、コレステロール分子の鑄型を有する SAM 膜が形成される。これを分子鑄型電極としてコレステロールの計測を行った。コレステロールは非常に高い酸化電位を持つため、その電気化学検出は広い電位窓を有するダイヤモンド電極を用いるなどの必要がある¹⁴⁾。したがって、通常の電気化学系では電気化学的に不活性な物質として取り扱われている。そこで、本法では酸化還元活性化学種 ([Fe(CN)₆]⁴⁻) をマーカーとして使い、コレステロールの認識に伴う酸化電流の変化を読み取ることで間接的にコレステロールの定量を行った¹⁵⁾。分子鑄型によるコレステロールの認識は以下により説明できる (図 1)。SAM 上に構築された分子鑄型が空の場合 (a)、マーカーは金電極表面に拡散し、酸化電流を生じる。一方、

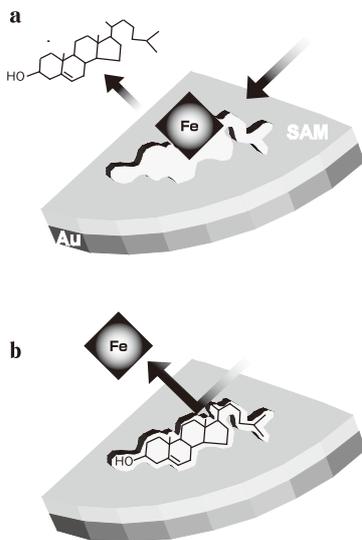


図 1 分子鑄型 SAM 電極のコレステロール認識機構の概念図、吐き出し (a) と取り込み (b)。

分子鑄型がコレステロールを認識するとマーカーは電極表面に接近することができないため (b)、その濃度に依存して酸化電流は減少する。

分子鑄型電極によるコレステロールの計測 (マーカーの酸化電流測定) は、5mM K₄Fe(CN)₆ を含む 50mM 過塩素酸カリウム電解液中、サイクリックボルタンメトリー (CV) により行った。このとき、修飾電極からコレステロールを溶出させることで増加した酸化電流値を *I*₀、鑄型電極がコレステロールを取り込んだ後の電流値を *I*_r と表すと、コレステロール認識による酸化電流変化は *I*₀ - *I*_r から求めることが可能で、これを Δ*I* と定義する。

2.2 血中コレステロールの定量

血中の総コレステロール値は総合病院の臨床検査部により、採血と測定を行った後に得られた。採血は食後 2~3 時間 (15 時~15 時半) に行った。4 人の被験者に対しては、informed consent 後にすべての実験を行った。

2.3 皮膚コレステロールの抽出

皮膚コレステロールの計測を行うために、プラスチックカップ (内径 25mm、容量 8mL) にエタノールを 1.0mL 入れ、せっけんで手洗して 30 分後、手のひらにカップを接触 (60s) させコレステロールを抽出した。食後 2~3 時間に行った採血の一時間後 (16~16 時半) に、皮膚コレステロールの抽出操作を行った。

2.4 従来法による皮膚コレステロールの定量

酵素法では総コレステロール測定キット (コレステロール E-テストワコー, 和光純薬工業) を使用した。反応溶液に抽出液 20μL を加えて攪拌し、37°C で 5 分間静置した後に 600nm の吸光度を測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量には LC-10A システム (島津製作所) または 1100 Series (Agilent 社) を使用した。カラムには Luna 5u C18 (Phenomenex 社, 150 mm × 4.6 mm) を使い、カラム温度、流速、検出波長はそれぞれ 40°C、1.2mL/min、212nm で行った。また、溶離液としてアセトニトリル/2-プロパノールの混合溶液 (1:1) を使用した。

3. 結果

3.1 電気化学応答

電気化学的に洗浄した後、裸の金電極では典型的なマーカーの CV 曲線が得られた (図 2a)。しかし、SAM 電極では酸化還元電流はほとんど見られない (b)。これは、電気化学的に不活性なステアリルメルカプタンとコレステロールにより、電極上に絶縁膜が形成されたため、電極表面

にマーカが接近できなくなったものと考えられる。分子鑄型電極ではマーカの酸化還元電流が曲線 a より小さい値であるが再び現れた (c)。これは SAM 中のコレステロール分子が溶出した際、マーカの拡散が可能な分子の形の孔 (分子鑄型) が形成されたことを意味する。分子鑄型電極における酸化還元電流はコレステロール溶液に浸漬した後に再び減少した (d)。このとき、酸化電流は浸漬時間に依存して減少したが、約 30s 以上では変化は見られず、ほぼ一定になった。分子鑄型法は酵素反応とは異なり、分子鑄型を構成するステアリルメルカプタンが目的分子 (コレステロール) と特異的に反応する部位を持たないが、両分子に大きな疎水基が存在する。このため、溶液中のコレステロール分子は疎水-疎水相互作用により電極近傍に濃

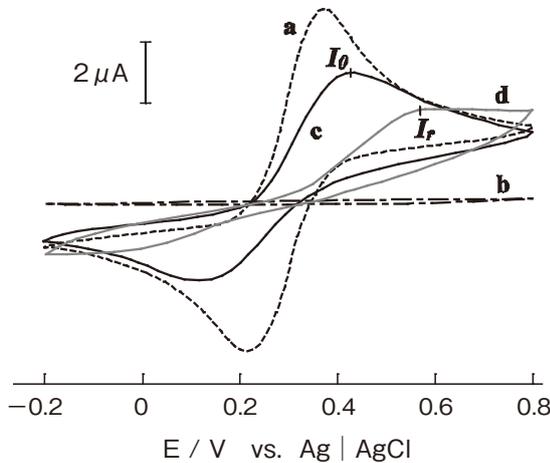


図2 サイクリックボルタンモグラム, 裸の金 (a), SAM 修飾電極 (b), 分子鑄型 SAM 電極 (c) と 3mM コレステロール溶液に浸漬後 (d). 5mM $K_4Fe(CN)_6$ を酸化還元マーカ, 50mM $KClO_4$ をバックグラウンド電解質として含む溶液中. I_0 : マーカの酸化電流値, I_r : コレステロールを認識した後の酸化電流値. 電流応答 (ΔI) は次式により算出される. $\Delta I = I_0 - I_r$. (Shiigi et al.)

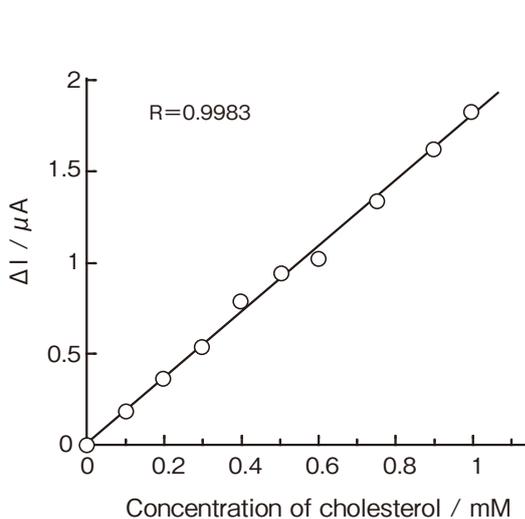


図3 ΔI のコレステロール濃度依存性. (Shiigi et al.)

縮され、分子鑄型に取り込まれると考えられる。このようなコレステロールの認識過程が 30s で達成されるものと推測される。つまり、分子鑄型のコレステロールへの応答時間として取り扱うことが出来る。以下、コレステロール溶液への電極の浸漬時間を 30s とした。鑄型電極のコレステロールの認識に伴う ΔI と濃度との関係を図 3 に示す。0 ~ 1.0mM の濃度領域において直線的な変化が観察された (相関係数 0.9983)。1.0mM 以上では ΔI はなだらかに増加し、約 3mM で飽和に達した。標準的な酵素法による測定の場合、求められた 600nm の吸光度をコレステロールの濃度に対してプロットすると (図 4)、2.0 ~ 10mM (70 ~ 400 mg dL⁻¹ に相当し、酵素法の実用測定領域) での相関係数は 0.9995 (inset) であるが、1.0mM 以下では 0.8980 にまで低下する。したがって、1.0mM 以下の低濃度領域 (0.1 ~ 1.0mM) での定量は分子鑄型法 (精度 5% 以内、感度 1.67 $\mu A/mM$) が適すると考えられる。

3.2 分子鑄型の選択性

皮膚に存在する物質のほか、コレステロールと類似した構造を有する化合物について測定を行った。各物質の分子体積、相対感度 (コレステロール (ΔI) を 1 とした時の相対値) を表 1 に示した。ステロイド骨格を持ち、コレステロールと似た構造を持つ胆汁酸では、分子体積の最も小さいデヒドロコール酸の相対感度は 0.52、最も大きなタウロコール酸においては 0.24 となり、分子体積の増加に伴って相対感度は減少した。デヒドロコール酸、デオキシコール酸、コール酸は、コレステロールよりも小さい分子であるが、カルボニル基 (親水基) を持つため疎水雰囲気の鑄型に取り込まれにくいものと考えられる。しかしながら、これらの胆汁酸は 0.52 ~ 0.24 とコレステロールの認識に

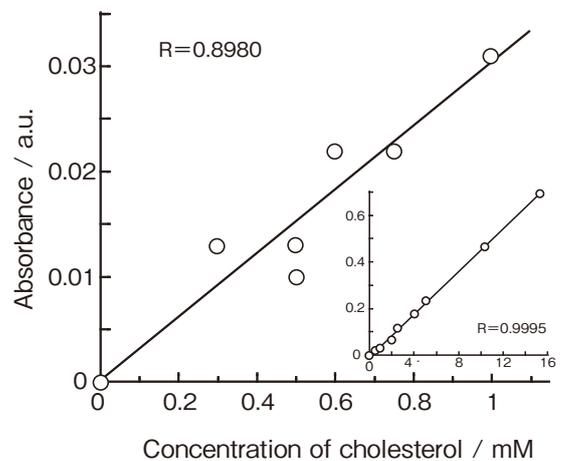


図4 酵素反応溶液の 600nm での吸収ピーク強度のコレステロール濃度依存性. 挿入図は 16mM までの広い範囲での濃度依存性. (Shiigi et al.)

において無視できない相対感度を示す。また、コレステロールエステルでは体積の最も小さなコレステロールアセテートで0.49、最も大ききリノール酸コレステロールにおいては0.37となり、分子体積が増加するにつれて相対感度に減少が見られた。エステル型は胆汁酸と比べ、疎水性の強い化合物であるが、3位の置換基(R-)の存在により分子体積がコレステロール(HO-)より大きくなり、鑄型に取り込まれにくいものと考えられる。このような選択特性の相違から、分子鑄型がコレステロールとのわずかな構造の違い(R=CH₃OCO-, C₇H₁₅OCO-, C₁₇H₃₁OCO-)を認識していることが示唆された。また、コレステロールは光や熱によって酸化されるため、皮膚コレステロールは酸化コレステロールとして存在する場合がある。それらに対する相対感度はケトコレステロールで0.97、コレステロールエポキシドで0.88であり、コレステロールと同程度の選択特性を示した。一方、コレステロールの前駆体、皮膚に多く存在する物質として知られるスクワレン¹⁶⁾はステロイド骨格の環が開いた構造をしており、疎水性が強くコレステロールと類似しているが相対感度は0.39と比較的小さい。皮膚に広く分布しているトリオレインやオレイン酸などの脂肪酸については0.20以下の低い値を示した。

3.3 皮膚コレステロールの測定

皮膚からのコレステロール抽出液を用いて、酵素法、HPLC法と分子鑄型法のそれぞれの方法によりコレステロールの定量を行った。抽出液中のコレステロール濃度は抽出時間に依存したが60s以上では変化が見られないことから、抽出時間は60sとした。酵素法およびHPLC法では抽出液そのままでは吸光計の感度が得られないため、加熱・減圧により5倍に濃縮した。それぞれの方法から得られた値は等しいものとなった。以上のことから、分子鑄型法は酵素法やHPLC法と比較して同等の認識能を持つだけでなく、5倍以上の感度を有するため、皮膚コレステロールの計測に適していることがわかった。また、コレステロールの非侵襲計測の観点から、血中の総コレステロール値と分子鑄型法により得られた皮膚コレステロールの値を比較した。4人の被験者はいずれも20代男性(22~29歳)で、血中総コレステロール濃度が最も高い被験者(220mg/dL)では皮膚コレステロールは0.37mM、血中濃度が低い人(159mg/dL)では0.17mMとなり、血中総コレステロールと皮膚コレステロールの間に相関が見られた(相関係数0.9886)。同一抽出液を加熱・減圧により5倍に濃縮した後、酵素法およびHPLC法により計測した結果と良く一致した。

Table 1 Selectivity of molecularly imprinted SAM electrode.

Substance ^a	Molecular volume ^b / Å ³	Selectivity ^c
cholesterol	292.2	1.00
bile acid		
cholate	286.5	0.44
dehydrocholate	276.2	0.52
deoxycholate	279.6	0.50
taurocholate	345.0	0.24
cholesterol ester		
cholesterol acetate	318.5	0.49
cholesterol n-caprylate	390.9	0.45
cholesterol linoleate	504.7	0.37
cholesterol oxide		
7-keto cholesterol	295.9	0.97
cholesterol 5 α , 6 α -epoxide	298.5	0.88
hydrophobe		
squalene	310.8	0.39
anthracene	119.4	0.32
triolein	614.9	0.19
oleic acid	203.0	0.14
toluene	65.9	0.08
L-phenylalanine	105.0	0.03

^aThe concentration of respective ethanolic solutions were 0.5mM. ^bThe molecular volume was evaluated with Fujitsu WinMOPAC software (ver. 2.0) using the PM3 approximation, along with FREE WHEEL ver. 0.57T (BUTCH SOFTWARE). ^cRelative selectivity was derived from dividing respective DI and DI for cholesterol.

エタノールで抽出した後に、同一箇所から再び抽出した場合、4時間の間隔を保つことで皮膚コレステロール値に回復が見られた。室内外における大気環境の変化が皮膚に与える影響を考えると、コレステロールは少なくとも4時間で分泌され、保湿の役割を果たすと考えられる。さらに、抽出操作における溶媒の与える影響としてメタノール、ヘキサン、プロパノール、アセトニトリルなどを用いて実験を行った。各条件はエタノールの場合と同じで、溶媒の化学的性質、皮膚に与える影響を調べた。アセトニトリル、ヘキサンでは、コレステロールの抽出量に関して増加の傾向にあったが、いわゆる手荒れが認められ、2～3日間元に戻ることは無かった。メタノール、プロパノールの場合、手荒れは見られなかったが、コレステロール抽出量は減少した。

4. 考 察

実際の計測を考えると、総コレステロールの正常値に個人差はあるが通常130～230 mg/dLと言われており、3.4～5.9mMに相当する。皮膚に存在するコレステロールは0.37～0.65mMであり、従来法による定量は抽出液の濃縮工程を要したが、我々が開発した分子鑄型法では1.0mM以下の濃度領域においても十分な感度(1.67 μ A/mM)が得られ、皮膚コレステロールの定量が可能になった。さらに、血中濃度との良好な相関が得られたことから、総コレステロール値の測定の可能性も示唆された。しかしながら、妨害が予測される角層、皮脂、表皮、真皮などに存在する種々の物質に対しては、十分な選択性が得られたものと、今後、抽出法や前処理などによる解決法が必要な物質が存在した。例えば胆汁酸は、分子鑄型法を選択特性に大きな影響を与える値を示したが、生体中では腸で再吸収されて肝臓に戻るといった閉鎖的な循環を行っており、その低い血中濃度(1～8 μ M)のために皮膚での存在は計測に関してほとんど影響しない濃度であることが予測される。また、スクワレンや脂肪酸などの疎水性が強い物質の、同じく疎水性の強い分子鑄型膜への非特異吸着が、コレステロール計測に与える影響はほとんど見られなかった。エステル型では、分子鑄型がコレステロールとのわずかな構造の違いを認識していることが示唆されたが、選択特性に与える影響は大きく、今後の検討課題である。

5. 総 括

本研究により開発した分子鑄型によるコレステロール計測法は従来の酵素法よりも工程が少なく、取り扱いが容易であることに加え、低濃度領域(<1.0mM)の測定が可

能であることから、皮膚コレステロールの測定に適していることがわかった。しかしながら、皮膚に存在する汚れや皮脂などさまざまな妨害物質の存在のため、更なるセンシング特性の向上や皮膚からの抽出法の最適化の必要がある。実際には個人差や生活習慣だけでなく、抽出法により大きく左右されるため、本方法を多くの被験者に対して実施し、臨床データを取得することが必要である。

(参考文献)

- 1) 山中 學, 村地 孝, 林 康之, 臨床検査MOOK, No.4, 血清脂質, 金原出版, 1 (1980).
- 2) 岡 芳知, 倉林正彦, 福内靖男, 山田信博, *Molecular Medicine*, **38**, 92, 生活習慣病 分子メカニズムと治療, 中山書店 (2002).
- 3) P. M. Ridker, J. Genest, P. Libby, *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, 6th ed., W. B. Saunders, 1010 Philadelphia (2001).
- 4) H. Bouissou, J. De Graeve, C. Legendre, M. L. Solera, E. Wulfert, J. C. Thiers, *Biomed Pharmacother*, **36**, 159 (1982).
- 5) R. Zawdiwski, D. L. Sprecher, M. J. Eveleigh, P. Orsewood, C. Carte, M. Patterson, *Clin. Chem.*, **7**, 1302 (2001).
- 6) J. Mancini, S. Chan, J. Frohlich, L. Kuramoto, M. Schulzer, D. Abbott, *Am. J. Cardiol.*, **89**, 1313 (2002).
- 7) L. Edouard, F. Doucet, J. C. Buxtorf, J. L. Beaumont, *Clin. Physiol. Biochem.*, **3**, 323 (1985).
- 8) H. Shiigi, K. Okamura, D. Kijima, A. Hironaka, B. Deore, U. Sree, T. Nagaoka, *Electrochemical and Solid-State Letters*, **6**, H1 (2003).
- 9) H. Okuno, T. Kitano, H. Yakabe, B. Deore, H. Shiigi, T. Nagaoka, *Anal. Chem.*, **74**, 4184 (2002).
- 10) 桑畑 進, *Electrochemistry*, **67**, 90(1999).
- 11) P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Yu.-T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7152 (1991).
- 12) M. C. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3559 (1987).
- 13) 原 正彦, *表面科学*, **21**, 724 (2000).
- 14) A. Kotani, F. Kusu, *Arch. Dermatol. Res.*, **294**, 172 (2002).
- 15) S. A. Piletsky, E. V. Piletskaya, T. A. Sergeyeva, T. L. Panasyuk, A. V. El' skaya, *Sensors and Actuators B*, **60**, 216 (1999).
- 16) 見城 勝, 大倉さゆり, 任田美穂, 金子智佳子, 太田尚子, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **34**, 365 (2000).