

多チャンネルフロースルー型バイオセンサー  
—多成分バイオセンシングの実用化—

陳力騏・松本清

九州大学農学部食糧化学工学科：〒812福岡市東区箱崎6-10-1

---

**Multi-channel Flow-through Biosensor:  
A practical approach to multi-component biosensing**

**Richie L. C. Chen and Kiyoshi Matsumoto**

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture  
Kyushu University 46-09, Hakozaki, Higashi-ku  
Fukuoka 812, Japan

Several types of multi-channel flow-through biosensing system were introduced. Synchronized multiple-injection systems are based on simultaneous injections of a sample solution into separated carrier streams of independent channels for various analytical purposes, and the FIA signals can be detected simultaneously with a multi-channel detector (section 2.1) or sequentially by the aid of an asymmetric merging point set in front of a flow-through detector (section 2.2). Sequential multiple-injection techniques make use of a multi-port flow-line switching valve with one inlet port (connected to the injector) and several outlet ports (connected to the channels), the instrumental requirements are substantially reduced by this configuration (section 2.3). Also mentioned is a manifold capable of sensing two components in sequence in the continuous sampling mode which was designed to accelerate the sampling rate. A recently developed CFA (continuous flow analysis) based multi-channel system is another practical approach involving no complicate instrumentation. Its practical use in routine analysis was demonstrated (section 3).

---

## 1. はじめに

酵素を用いる分析法は確立されつつあるが、それをより経済的に実行するため、固定化酵素を利用したバイオセンサー技術に期待が寄せられている<sup>1,2)</sup>。フロースルー型バイオセンサー(Flow-through Biosensor)は、典型的な酵素電極としてのバッチ式バイオセンサーよりも反応条件をより再現性よく制御できるので実用面に優れている<sup>3)</sup>。このフロースルー型バイオセンサーをフローインジェクション分析(FIA)システムの検出系に利用すると、センサーのパフォーマンスをさらに高めることが期待できる<sup>4,5)</sup>と同時に、種々の分野への応用が可能である。

ほとんどの生命現象は多数の化学物質が関わる総合的な生理応答に基づくものであることから、生命科学、医学あるいは食品科学における化学分析は、多数の生理活性物質を同時に取り扱えるクロマトグラフィーなどの技術に依存している。しかしながら、ほとんどのFIA法は特殊な場合を除いて分離過程を含まないため、単一成分の分析に限られている。それ故に、多成分FIAバイオセンシングシステムの開発は、生体試料及び食品分野においてFIAの研究成果を実用化する積極的な手段になる<sup>6-8)</sup>。

異なった酵素電極などのバッチ式センサーを同一流路に設置するシステムは、構成が単純で有効な方法であるが、試料ゾーンの分散を抑えるためにセンサーの微小化が要求される。特殊な反応系の利用や試料ゾーンの分割、合流の制御などを基本にしたアプローチは、学術的に興味深いのが、反応の速度論や試料ゾーンの分散を正確に把握する技術が要求されるので、実用性が問われている。一方、それぞれ独立したFIAシステムをコンパクトに結合したシステムはより実用性に富むと思われる。これを実現する多チャンネルFIA法として、一連の連動したインジェクターの使用による同時注入システム<sup>9)</sup>及び多流路スイッチングバルブの導入による逐次注入システム<sup>10)</sup>がある。

本稿では、最近の応用例を紹介すると共に、最近当研究室で開発したCFA(Continuous Flow Analysis)に基づく多チャンネル自動分析システム<sup>11)</sup>も合わせて記述する。

## 2. 多チャンネルFIA法

## 2.1 多検出器／同時注入システム

多成分分析用FIA法の中でも、多チャンネル検出器を装備した同時注入システムは最も迅速である。図1はその典型的なマニホールドの一例である<sup>12)</sup>。

このシステムは、チャンネルA（グルコース分析用）、チャンネルB（尿酸分析用）及びチャンネルC（コレステロール分析用）の3チャンネルを持ち、それぞれ独立したキャリア、インジェクター、固定化酵素リアクター及び電気化学

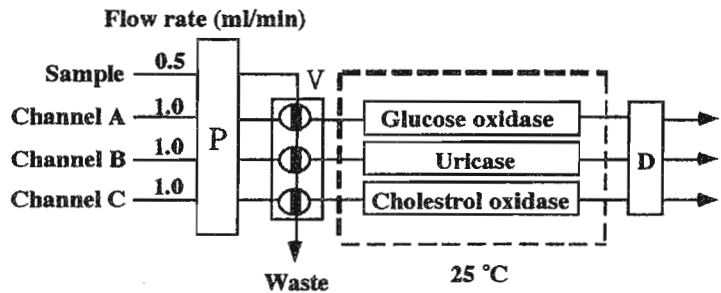


Fig. 1. Three channel FIA system for simultaneous determination of glucose (Channel A), urate (Channel B) and cholesterol (Channel C). Carrier solutions for channel A and B: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5); C: 0.1M phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.75% (v/v) Triton X-100. P: four channel pump; V: 16-way switching valve with three sample loops; D: multichannel detecting system with three independent poly(1,2-diaminobenzene)-coated platinum electrodes (0.6 V vs. Ag/AgCl). Revised from Yao et al. (1994).

学検出器を備えている。血清に共存するアスコルビン酸や尿酸が過酸化水素の電気化学的測定に影響を与えるので、Sassoら<sup>13)</sup>により開発された1,2-ジアミノベンゼンの電解重合反応による電極修飾法を利用し、作用電極の表面に薄膜を形成することにより妨害物質由来の信号を除去している。

同時測定は、サンプル溶液を共通な流路により一度に各チャンネルのサンプルループに充填した後、同時にキャリアに注入することにより行われている。この連動したインジェクション操作の方策として、Slanninaら<sup>14)</sup>によるオリジナルな提案は、一連の気圧作動インジェクションバルブをコンピューターとインターフェースする方式により動作をシンクロナイズしたものがある。一方、Matsumotoら<sup>15)</sup>は、16方バルブ(16-way switching valve)の使用により手動でも同様な効果を得ることを報告している。マニホールドをよりコンパクトにするには、多チャンネルフローセル<sup>9)</sup>の使用が効果的である。同時注入FIAシステムは、各チャンネルそれぞれが独立した酵素反応系でセンサー応答を得ることに基づいたものであり、チャンネルそれぞれに適した反応条件下でデータを得ることができるので、応用範囲が広いという特長を持つ。

分析速度が厳しく要求されていない場合、装置面のコスト軽減には、以下の節で紹介するアプローチが有効となる。

## 2.2 単一検出器／同時注入システム

類似した酵素反応を利用した場合、検出器の上流に遅延コイルと合流点の導入により単一検出器でも多チャンネルのシグナルを逐次的に記録することができる。図2は、それを代表したマニホールドの一例である<sup>16)</sup>。チロシン測定用のチャンネルAでは、サンプル中のチロシンがTyrosinase-

リアクターの作用により酸化され、その際にキャリア中の溶存酸素が消費される。リシン測定用のチャンネルBでは、

Lysine oxidaseが固定化され、その作用により、サンプル中のリシンが酸化されると同時に過酸化水素が産生される。異なったタイプの反応であるが、両者とも、酸素の消費により反応の進み具合を定量できるので、検出器に

は酸素電極が用いられている。遅延コイルの導入により生まれたシグナルの時間的ずれを基本にしたピークの分離であるため、遅延コイルの長さやキャリアの流速を検討する必要がある。図3は、チャンネルA(Tyrosine)の流速を1.3ml/minに固定したままで、チャンネルB(Lysine)の流速を変えながら得られたそれぞれの応答である。

酸素電極の応答が遅いので、二成分の分析に限られていることになる。応答の速い検出器の使用により三成分の定量が可能である<sup>17)</sup>が、酸素電極は妨害が少ない特徴があると同時に、広範な酵素反応を試薬なしで直接モニターできるので応用面に優れている。

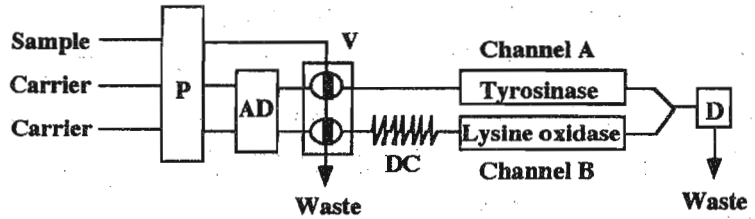


Fig. 2. Two channel FIA system for quasi-simultaneous determination of L-tyrosine (Channel A) and L-lysine (Channel B). Carrier : 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); P : pump; AD : air damper; V : 16-way switching valve with two sample loops; DC : delay coil (80 cm x 0.5 mm i.d.); D : detector (oxygen electrode). Revised from Matsumoto et al. (1994).

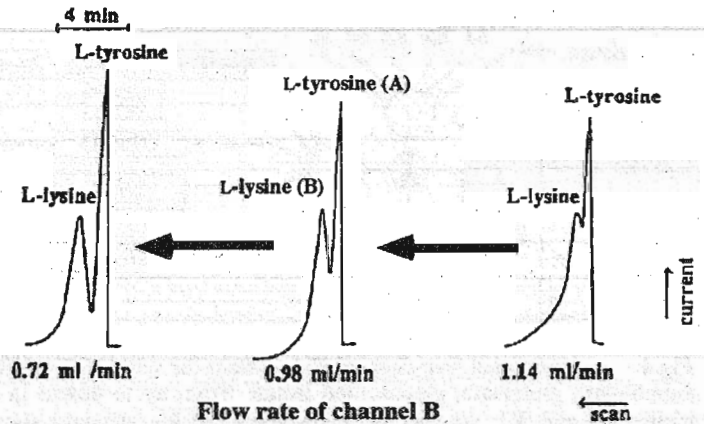


Fig. 3. Effect of flow rate of channel B (Fig. 2) on response curves. The flow rate of channel A was fixed at 1.3 ml / min. L-tyrosine concentration: 0.4 mM; L-lysine concentration: 0.4mM.<sup>16)</sup>

### 2.3 逐次注入システム

逐次注入システムは分析速度の点では同時注入システムほど速くはないが、各チャンネルのコストを減らすことには効果的であるのでより長時間の分析に適する手段となる。図4に示した逐次注入システムは、動物細胞の培養過程における培養液中の重要な化学物質を自動的にオンラインでモニターすることを可能にしたものである<sup>18)</sup>。成分ごとの測定はそれぞれ多流路スイッチングバルブにより選択された一時的に独立したチャンネルで行い、検出はluminolの化学発光反応を利用し、過酸化水素の産生をモニターする共通のセンサーにより行う。各チャンネルは、共通のキャリアー、インジェクター及び発光検出器を使用することができ、部品などのハード面の要求やキャリアー溶液の使用量などのランニングコストを減らし得るのが特長である。オンライン化したサンプルの前処理と酵素反応の詳細は、文献を参照して戴くこととし、ここでは触れない。

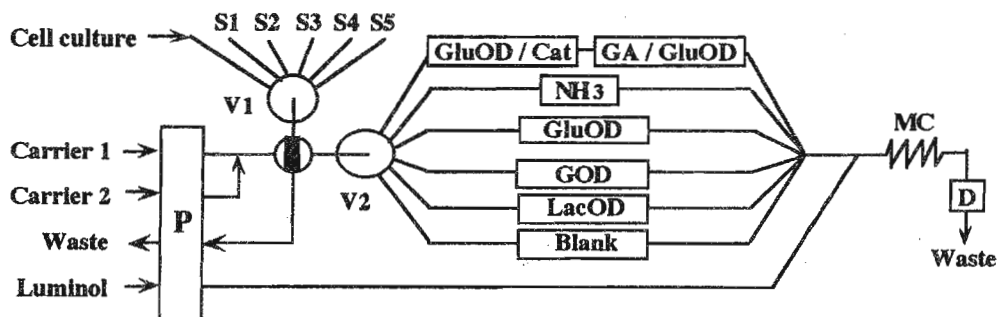


Fig.4. Automated five-channel FIA system for sequential on-line determination of glutamine, ammonium, glutamate, glucose and lactate (from up to down) in a cell cultivation process. P: pump; V1 and V2: six-way selection valve; S1-S5: standard solutions for calibration; GluOD: glutamate oxidase; Cat: catalase; GA: glutaminase; NH<sub>3</sub>: for the determination of ammonium; GOD: glucose oxidase; LacOD: lactate oxidase; Blank: for the detection of blank signal; MC: mixing coil; D: chemiluminometric flow-through cell. Carrier 1 and 2 are different pH buffers which are aspirated into the main stream of the system in different flow rates to achieve a final pH suitable for the enzyme reaction. Revised from Spohn (1995) for simplification.

長時間のプロセス分析には、センサーの校正、サンプリング、測定及び誤動作の検出などの操作をコンピューターにより自動化することが望まれる。最近、コンピューターとインターフェースしたFIA用部品の動作を制御するC言語関数を数多く提供したFIACCO (Flow Injection Analysis Control and Configuration)というソフトウェアパッケージが、Eberhartら (Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, P.O. Box 1913, D-52428 Jülich, Germany)により開発され、それを使って構築した自動化多チャンネル逐次注入システムがSpohnらにより報告された<sup>10)</sup>。開発済みの関数を使えばプログラミングの苦勞が軽減されるであろう。

プロセス分析には、F I Aを基本にした迅速な方法（P F I A法）が魅力的であるが<sup>19)</sup>、商品化された装置が少ないなどの理由で、研究室以外の実応用が<sup>20)</sup>少ない。筆者ら<sup>21)</sup>は、わずかに商品化されたグルコース分析用P F I Aシステム(FGA-1, TOA)及びL C用多流路バルブを共にコンピューターとインターフェースすることにより、手軽な三チャンネルP F I Aシステムを構築した。多チャンネル化することは、P F I Aシステムをさらに実用化する有効的なアプローチと思われる。

逐次注入システムと他のほとんどの同時注入システムは、酵素リアクターをフロースルー型検出器に前置するリアクター型フロースルー型バイオセンサー(Reactor-type flow-through biosensor)によるものであり、そのメリットは酵素リアクターを変えるだけで分析対象物質を変えられるというハード的柔軟性である。しかしながら、逐次注入システムの操作に必要なとされる流路の切り替えは、流れに急激な流速の変化をもたらし、リアクター更には測定の実現性に影響を与えることがしばしばである。そこで、チャンネルの切り替えをした直後に測定をせず、リアクターが安定するまで暫くキャリアーを流し続けることは、再現性を向上させるポイントである。そのため、一般の多流路バルブにより構築された逐次注入システムの分析スピードは限られたものとなる。

多方バルブの使用は、マニホールドの設計に豊かなバリエーションをもたらし<sup>22)</sup>、連続サンプリング法と類似したマニホールドの使用が可能である。Matsumotoら<sup>23)</sup>は、16方バルブの使用によりメインシグナルとブランクシグナルを単一検出器で逐次測定できるシステムを提案した。連続サンプリング法と同様に、サンプリング間隔が二倍向上したので、ブランクカラムの位置に別の固定化酵素リアクターを装着することにより、ブランクシグナルのないサンプルには、より迅速な二成分逐次測定システムになるとと思われる。

### 3. 多チャンネルC F A法

C F A法による多成分測定はあまり報告されていないが、以下で紹介する多チャンネルC F A法は、多成分測定を可能にすると同時に、流路の切り替えによる逐次注入システムでは匹敵しにくい再現性を得ることができる。図5はその典型的フローシステムである。このフローシステムは、二つの多流路バルブ(サンプル、ブランク、標準液の導入制御用V 1及びチャンネル切り替え用V 2)、一台のペリスターポンプ及び検出システムにより構成された簡単なも

のである。分散をできるだけ抑えるために、その多流路バルブは、Dead volume の小さい HPLC 用 Column switching valve<sup>24)</sup>を採用している。流路の切り替えは、バルブ V 1 と V 2 専用のコントローラーにより自動的に制御されているが、そのタイミングとシーケンスの詳細は文献を参照されたい<sup>11,25)</sup>。

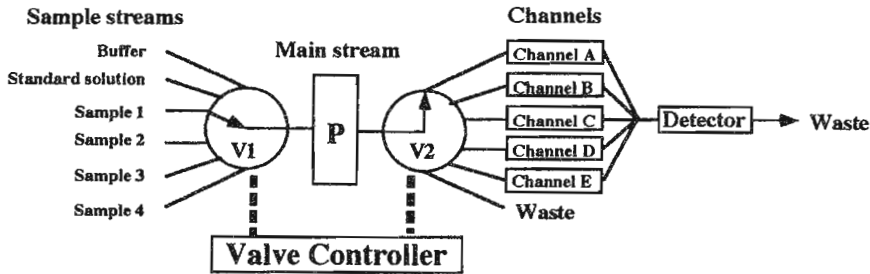


Fig. 5. Automated multi-channel CFA system. V1, V2: six-way selection valve; P: peristaltic pump. In the figure, sample 1 is aspirated into channel A.

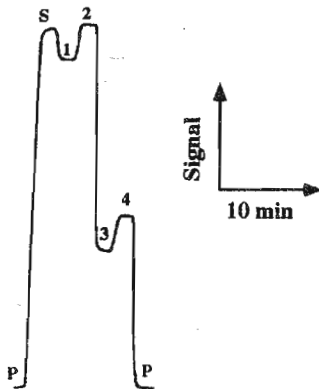


Fig. 6. Typical response pattern of automated multichannel CFA system. A standard solution (S) and sample solutions (1, 2, 3 and 4) were sequentially aspirated into a channel. "P" represents the phosphate buffer, which was used to obtain the baseline and then to purge the channel.

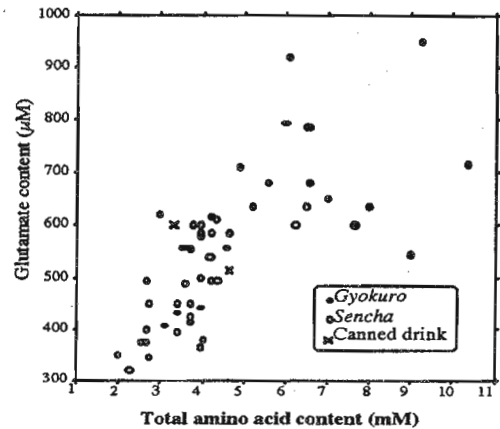


Fig. 7. Scattergram of the glutamate contents versus the total amino acid contents of the various tea samples.<sup>26)</sup>

インジェクション操作のない CFA を基本にした方法であるので、FIA 法とは異なったプラトー値を持った Flat-topped Signal が得られる (図 6)。定常状態を示すプラトー値を測定することにより、2.3 節で述べた流路の切り替えによる一過性のリアクターの不安定現象を解消し、より優れた再現性が得られる<sup>11)</sup>。更に、試料の分散による誤差を問題にする必要がなく、チャンネル間のシグナルの差引を正確に行うことができるので、酵素リレー反応<sup>11)</sup>及びブランクシグナル<sup>25)</sup>のシグナル差引による算出と除去を簡単に行うことができる。

これに基づいて開発されたアミノ酸自動分析システム<sup>25)</sup>は、お茶の総アミノ酸含量とグルタミン酸含量を前処理なしで測定でき、お茶の品質評価に有用で

ある。図7は、このシステムを用い、異なったブランドのお茶に対する分析結果を示している<sup>26)</sup>。図に示したように、多成分分析はお茶の品質評価、種類判別ないしグルタミン酸の人為的添加<sup>27)</sup>の検出に役に立つと思われる。このフローシステムは、多数試料における多成分分析を信頼性よく自動的に行えるので、ルーチン用の多成分分析手法として推奨されるものである。

#### 4. おわりに

バイオセンサーと同様に、F I A法の実用性と信頼性が問われる中で、学术界よりも実際の使用者に認められる方向への研究の進展もぜひ必要である。バイオセンシングをF I Aモードで実行するアプローチは、バイオセンサーのみでなくF I Aの実用化にも大きく貢献してきたが、多成分分析用F I A式バイオセンサーへの足踏みは、ともすればアカデミックになりがちで実用的研究に乏しい。多チャンネルF I A法は数少ない実用本位の技術であり、研究用の分析手段に限らず、ルーチン用の分析法への移行も期待するところである<sup>28)</sup>。

#### 参考文献

- 1) Scouten WH, Luong JHT & Brown RS (1995), *Trend Biotech.*, **13**: 178.
- 2) Schwedt G & Stein K (1994), *Z. Lebensm. Unter. Forsch.*, **199**: 171.
- 3) Varcarcel M & Luque de Castro MD (1994), "Flow-Through (Bio)Chemical Sensors", Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- 4) 八尾俊男 (1985), *J. Flow Injection Anal.*, **2**: 115.
- 5) Hansen EH (1994), *Talanta*, **41**: 939.
- 6) Varcarcel M & Luque de Castro MD (1984), *Analyst*, **109**: 413.
- 7) 小熊幸一 & 黒田六郎 (1985), *J. Flow Injection Anal.*, **2**: 98.
- 8) 松本清 (1991), *食品工業*, **8.30.**: 43.
- 9) Matsumoto K, Kamikado H, Matsubara H & Osajima Y (1988), *Anal. Chem.*, **60**: 147.
- 10) Spohn U, van der Pol J, Eberhardt R, Joksich B & Wandrey Ch (1994), *Anal. Chim. Acta*, **292**: 281.
- 11) Chen RLC & Matsumoto K (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 813.
- 12) Yao T, Satomura M & Nakahara T (1994), *Anal. Chim. Acta*, **296**: 271.
- 13) Sasso SV, Pierce RJ, Walla R & Yacynych AM (1990), *Anal. Chem.*, **62**: 1111.



- 14) Slanina J, Bakker F, Bruyn-Hes A & Mols JJ (1980), *Anal. Chim. Acta*, **113**: 331.
- 15) Matsumoto K, Matsubara H, Hamada M, Ukeda H & Osajima Y (1990), *J. Biotech.*, **14**: 115.
- 16) Matsumoto K, Gao L-Y & Osajima Y (1994), *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **38**: 207.
- 17) Morishita F, Nishikawa Y & Kojima T (1986), *Anal. Sci.*, **2**: 411.
- 18) Spohn U, Preuschoff F, Blankenstein G, Janasek D, Kula MR & Hacker A (1995) *Anal. Chim. Acta*, **303**: 109.
- 19) Beebe KR, Blaser WW, Bredeweg RA, Chauvel JP, Harner RS, LaPack M, Leugers A, Martin DP, Wright LG & Yalvac ED (1993), *Anal. Chem.*, **65**: 199R.
- 20) Blaser WW, Bredeweg RA, Harner RS, LaPack MA, Leugers A, Martin DP, Pell RJ, Workman JJ & Wright LG (1995), *Anal. Chem.*, **67**: 47R.
- 21) Chen RLC & Matsumoto K (1995), *Anal. Chim. Acta*, **308**: 145.
- 22) 久保田和雄 & 黒石忠文 (1989), *J. Flow Injection Anal.*, **6**: 5.
- 23) Matsumoto K, Sakoda K & Osajima Y (1992), *Anal. Chim. Acta*, **261**: 155.
- 24) Dorsey JG, Cooper WT, Wheeler JF, Barth HG & Foley JP (1994), *Anal. Chem.*, **66**: 500R.
- 25) Lee M-H, Chen RLC & Matsumoto K (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press.
- 26) Lee M-H, Chen RLC & Matsumoto K (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, in press.
- 27) 堀江秀樹 (1995), *農業及び園芸*, **70**: 67.
- 28) Selected topics in "*Bioinstrumentation: Research, Developments and Applications*", Wise DL (ed.), Butterworth, Stoneham, MA, USA (1990).