

フローインジェクションバイオセンサシステム

酵素などの生体機能性物質が FIA にどのように利用され、どのようなことができるのかを例をあげて解説する。

八尾 俊男

大阪府立大学大学院工学研究科： 599-8531 堺市学園町 1-1

1. はじめに

フローインジェクション分析 (FIA) 法は簡易迅速、高精度のオンライン分析法として発展してきたが、用いる反応の多くは化学反応に基づいている。しかし、複雑な組成からなる試料、特に生体試料 (血液、尿、細胞、組織など) を取り扱う場合には、より高度に選択的 (理想的には特異的) な反応が望まれる。このように定量技術としての FIA に、生体機能性物質による分子認識に基づいたセンシング機能を付与したものが、フローインジェクションバイオセンサシステムである。生体機能性物質には酵素、抗体、結合タンパク質、ホルモンレセプター等の他に、微生物、オルガネラ、動植物組織も含まれるが、FIA に汎用される反応としては、酵素反応と抗原抗体反応 (免疫反応) がある。特に、酵素は数多くのもが市販されており、多種多様な反応特異性と基質特異性を有しているため、特異的な FIA システムを設計するのに便利である。さらに、酵素や抗体を電極や不溶性担体に固定化して水に不溶性にすることで、再使用ができるので、いわゆる“固定化酵素”や“固定化抗体”が実用上用いられている。

ここでは、生体機能性物質、主として固定化酵素を利用した分子認識 FIA を解説すると共に、このような FIA をさらに高機能化、多機能化、高感度化するためのアプローチを例をあげて紹介する事にする。

2. 酵素の固定化

酵素は高分子量の糖タンパク質で、その一部に活性中心構造を有する。酵素の固定化法には大別すると化学的方法と生物化学的方法、及び物理的方法がある (図 1)。化学的方法には共有結合法と架橋法とがあり、酵素分子に化学結合を導入して酵素を不溶化する方法である。この場合、化学結合を導入するので酵素の比活性は減少するが、酵素分子は多点結合されるので、いわゆる“堅い”構造となり、安定性や耐熱性が増す場合が多く、FIA にとって有効な固定化法といえる。生物化学的方法では抗原抗体複合体形成反応 (結合定数: $5 \times 10^4 - 1 \times 10^{12} \text{ l mol}^{-1}$) やビオチン-アビジン結合 (結合定数: $1 \times 10^{15} \text{ l mol}^{-1}$) など、非共有結合であるが生物親和結合によって酵素を強固に固定化できる。この場合、pH を 2 以下にすると、これらの複合体は解離するので、酵素の活性が劣化した場合に、固定化酵素を再生できる利点がある。一方、物理的方法には吸着法と包括法とがあり、酵素分子に結合が導入されていないので、固定化前後での酵素の性質にはほとんど変化が見られない。しかし、FIA で用いるためには、脱着や格子からの脱離を伴う場合が多く、安定性に問題がある。

固定化酵素を FIA に利用する場合、センサ型とリアクター型のものがある。前者の場合には固定化酵素は膜状に、後者の場合には粒状の不溶性担体に固定化するのが一般的である。いずれにしても、必要な機械的強度を持ち、長期間安定なものとなるべく簡単に、しかも安価に得られることが望ましい。さらに、FIA 計測用の酵素センサと酵素リアクターには速い物質拡散速度と反応速度が必要とされるので、一般に化学的方法による固定化法が最も有効である。

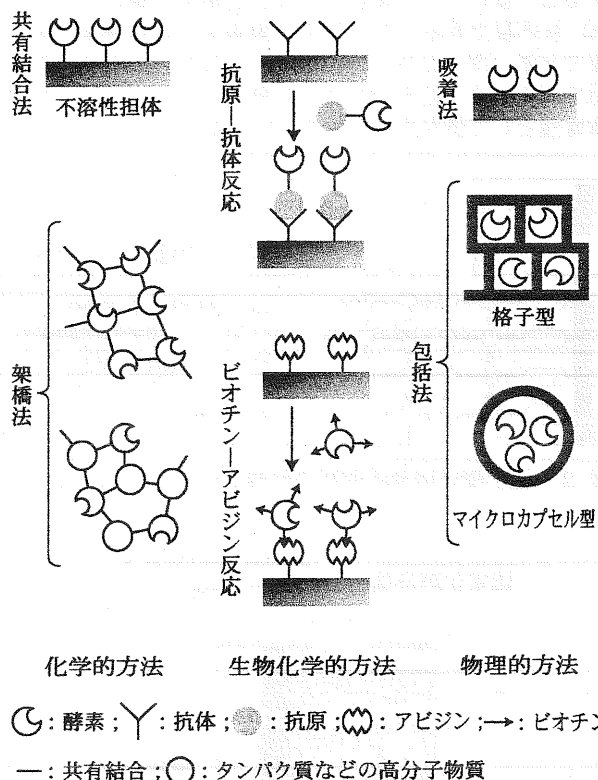
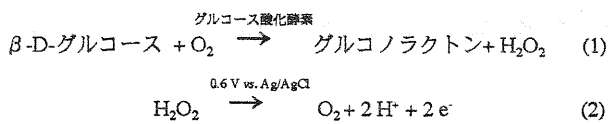


図 1. 酵素の一般的な固定化方法

3. 酵素電極を用いる FIA

3.1 FIA 酵素センサの最適設計

通常の酵素電極は過酸化水素電極や酸素電極の先端部に酵素固定化膜を装着したもので、バッチ方式で測定されている。基質溶液を加えてから、一定の電気信号が得られるまでの時間を応答時間という。例えば、過酸化水素電極にグルコース酸化酵素固定化膜を装着した電極では、次の酵素反応と電極反応によりグルコースに応答するが、応答時



間は酵素膜内部への物質拡散速度に支配され、応答電流値は酵素膜の酵素活性に支配される結果、定常状態応答が得られる。

一方、酵素電極を FIA に用いる場合には、同じ酵素活性を有する電極でも、応答時間の長い電極では遅い物質拡散速度（酵素膜内部及び外部方向への拡散）により、低感度でテーリングを伴うシグナルになる。しかし、迅速な応答を与える酵素電極では、高感度でテーリングのない鋭い FIA シグナルが得られる。このように FIA 用の酵素電極の酵素膜には、基質に対する高い親和性（基質はほとんど水溶性）と薄い膜厚にもかかわらず高い酵素比活性を有することが望まれる。

そこで、FIA 用酵素電極として著者が以前に提案した化学修飾膜電極 [1,2] の作製方法を図 2 に示す。白金電極を 1N 硫酸中で電解酸化して酸化被膜を形成させ、シリル化剤でアミノシリル化した後、酵素とウシ血清アルブミン（あるいはゼラチン）の架橋被膜をグルタルアルデヒドで形成すると、膜の一部が電極に結合した酵素の薄膜（0.1 - 2 μm）を作製できる。この場合、酵素分子は高密度に多分子層で分散、固定化されているので、比活性が高く、センサ感度が高いうえ応答時間は 10 秒以下であり、FIA 用の酵素電極として優れた特性を持っている。

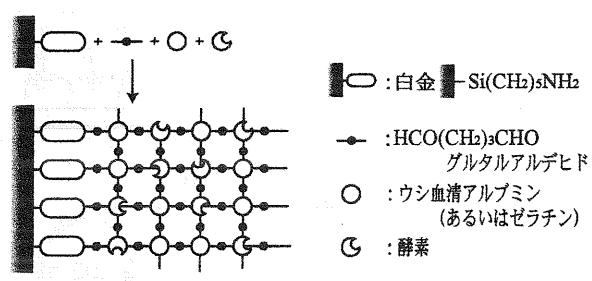


図 2. 化学修飾酵素膜電極の作製方法

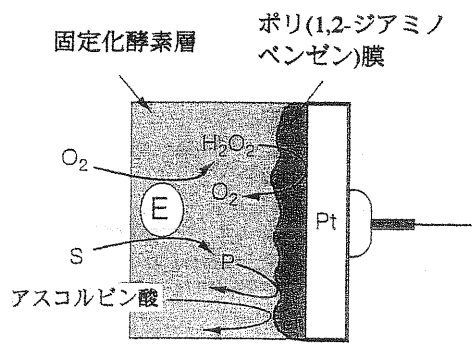


図 3. 固定化酵素膜と分子ふるいポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜をハイブリッド化した酵素電極の膜断面
E: 酵素; S: 基質; P: 生成物; Pt: 白金ディスク

しかし、式 (1) と (2) の反応に基づいたグルコース電極では、 H_2O_2 の検出電圧として 0.5 - 0.7 V vs. Ag/AgCl を必要とするので、試料中に共存するアスコルビン酸、システイン、尿酸などの被酸化性物質による妨害がある。そこで、1,2-ジアミノベンゼンをモノマーとして、白金電極で

電解酸化して得られたポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜上に、上述の酵素-アルブミン（あるいはゼラチン）架橋被膜を形成させた。この電極では、グルコースに対する感度は過酸化水素に対する感度と同様 40 - 50% に減少したが、アスコルビン酸などの被酸化性物質に対する応答は無視できる程度にまで減少した。図 3 にこの電解重合膜をハイブリッド化した酵素被膜の予想される断面を示す。中性での電解酸化によって得られたポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜は非導電性の薄膜（約 10 nm）として白金電極表面に形成される。酵素膜層での反応で生成した過酸化水素はポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜を透過できるが、より分子量の大きなアスコルビン酸などの被酸化性有機化学物質は分子ふるい機能によってこの膜に排除される。また、酵素膜は電解重合膜に化学的に結合しているので密着性も良い。この電解重合膜と酵素膜とをハイブリッド化した酵素電極は、迅速で、高選択的、高感度な FIA 応答を与えたので、単流路 FIA を用いて種々の単一成分の特異的な計測法に利用できる。

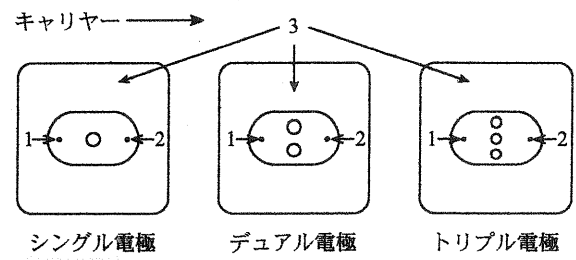


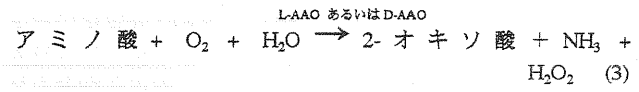
図 4. FIA 用酵素電極の種類
(1): キャリヤー入口; (2): キャリヤー出口; (3): スペース (厚さ 0.1 mm)

3・2 酵素電極の形状

酵素電極は特定成分だけを認識して検出できるので、図 4 に示した複数個の酵素センシング部を並べたフロー電極により、注入した試料ゾーン中の 2 成分あるいは 3 成分を同時に、それぞれを選択的に検出できる。この場合、流れ方向に対して直列配置よりも図に示した並列配置をとり、各センシング部を 1 mm 程度離して配置することで、各センシング部の交差反応性を無視できる。そこで、デュアルあるいはトリプル酵素電極を用いた FIA 計測について、次の例を紹介する。

(A) デュアル酵素電極による D,L-アミノ酸の光学分割検出 [3]

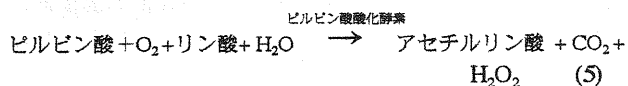
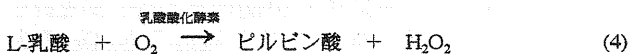
D,L-アミノ酸の光学分割は一般的に光学活性固定相を用いた HPLC で行われているが、酵素分子の活性部位は特定のアミノ酸構造を有しているため、不斉場となる場合がある。このような立体特異性を有した酵素の例として、L-アミノ酸酸化酵素(L-AAO)と D-アミノ酸酸化酵素(D-AAO)があり、それぞれ L-アミノ酸と D-アミノ酸を認識すると共に、次の反応を触媒する。



そこで、L-AAO と D-AAO を 3・1 に示した固定化法により、デュアル電極のそれぞれのセンシング部に酵素/電解重合薄膜を形成させた。各センシング部は L-アミノ酸と D-アミノ酸に特異的に応答し、試料ゾーン中の L,D-アミノ酸を光学分離して同時検出できる。

(B) トリプル酵素電極によるグルコース、L-乳酸、ピルビン酸の同時検出

グルコースは脳や筋肉中で、種々の解糖系により嫌気的条件下ではL-乳酸を、好気的条件下ではピルビン酸に代謝される。そのため、これら3成分を同時計測することは生理学的に意味がある。著者らはトリプル電極の各センシング部にグルコース酸化酵素、乳酸酸化酵素、ピルビン酸酸化酵素から成る架橋被膜を形成させ、式(1)と式(4)、式(5)の酵素反応により、3成分を同時計測できるトリプル酵素電極を作製した。これをラット脳細胞外液中のこれら3成分を同時検出できる *in vivo* 計測に利用した。



これらのことが可能なのは、各センシング部が独立してセンサとして機能し、相互干渉なしに単一のサンプルゾーン中の各成分を特異的に検出できることが前提となるので酵素分子の分子認識レセプターとしての優れた特質を示している。

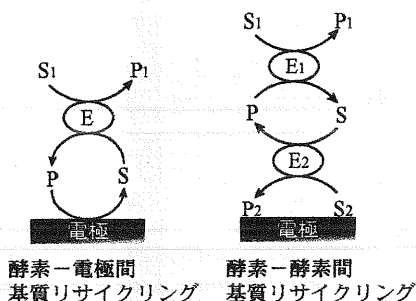


図 5. 酵素電極の増幅反応モデル
E₁, E₂, E₃: 酵素; S: 基質; P: 生成物; S₁, S₂: 反応基質; P₁, P₂: S₁, S₂ からの生成物。

3・3 増幅型酵素電極

酵素の重要な特質には既に述べた基質特異性の他に生触媒としての機能がある。この二つの機能をうまく利用し、基質リサイクリング反応に基づいて基質を高感度に計測する方法がある。基質リサイクリングには一般に二通りの方法がある(図5)。一つは酵素-電極間リサイクリングに基づく方法で、基質 S は酵素 E の基質となり生成物 P を生成し、P は電極で酸化(あるいは還元)され S を再生する。ここで、S₁ が過剰にあり、P→S の電気化学反応が可逆であれば、このリサイクリング反応は効率的に起こり、基質 S に対して増幅されたシグナルが得られる。もう一方の方法は、基質 S と生成物 P が共役する二つの複合酵素反応系で、S₁ と S₂ が過剰にあれば、基質 S は両酵素間でシャトルされ、多量の生成物 P₁ (あるいは P₂) を生成するので、このどちらかを電極で検出することで、基質 S に対して増幅されたシグナルが得られる。

(A) 酵素-電極間基質リサイクリング

このタイプの例として、神経伝達物質ドーパミンの高感度センサがある(図6)。グラッシーカーボン電極にグルコース脱水素酵素(GDH)を膜状に固定化し、フローセルに装着する。ドーパミンは 0.5 V でキノン体に酸化され、生成したキノン体は GDH の基質となりドーパミンを再生す

る。グルコースがキャリアー溶液中に過剰にあれば、このリサイクリング反応は効率的に起こり、10⁻⁸ - 10⁻⁷ M のドーパミンを検出できる。

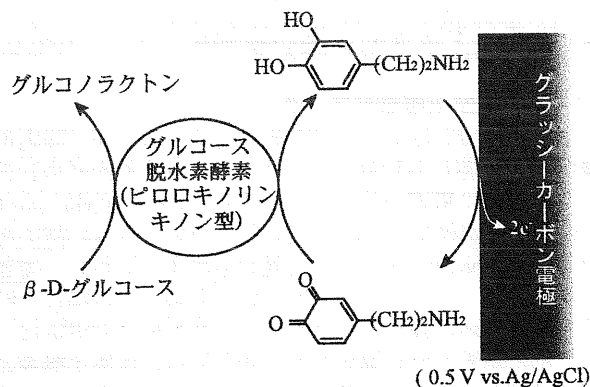


図 6. ドーパミンに対する高感度センサーの反応モデル

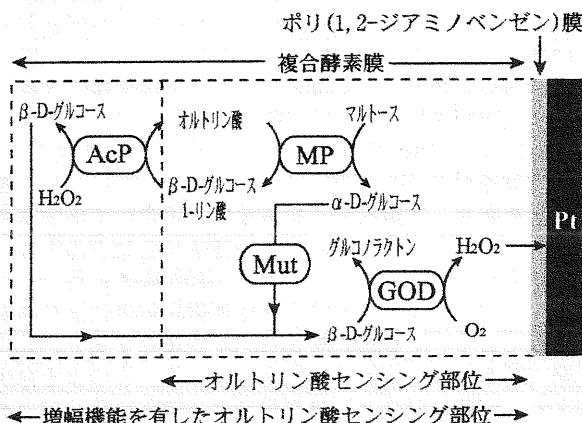


図 7. 2つのセンシング部位を持ったデュアル酵素電極のオルトリン酸に対する応答原理

AcP: 酸性ホスファターゼ; MP: マルトースホスホリラーゼ; Mut: ムタロターゼ; GOD: グルコース酸化酵素

(B) 酵素-酵素間基質リサイクリング

このタイプの例として、オルトリン酸の高感度計測 [4] について述べる。3・2 で述べたデュアル電極の一方の白金ディスク部にマルトースホスホリラーゼ(MP)とムタロターゼ、グルコース酸化酵素を同時固定化した化学修飾酵素膜電極を作製する(図7)。この酵素膜では、キャリアー溶液中にマルトースが過剰にあれば、3つの連続する酵素反応により、オルトリン酸は最終的に H₂O₂ に変換されるので、これを検出することでオルトリン酸を計測できる。さらに、もう一方の白金ディスク部に上記の3酵素系に酸性ホスファターゼ(AcP)を更に加えて同様に固定化酵素膜を作製すると、AcP と MP 間でオルトリン酸はリサイクリングされ、多量の α-及び β-D-グルコースを生成すると共に、連続的な酵素反応により多量の H₂O₂ を生成するので、オルトリン酸に対して 20 数倍増幅されたシグナルが得られる。非増幅のセンシング部は 5×10⁻⁶ - 2×10⁻³ M のオルトリン酸に、増幅センシング部は 2×10⁻⁷ - 5×10⁻⁵ M のオルトリン酸濃度に対して直線的に応答した。結果として、注入されたオルトリン酸試料溶液に対して2つの FIA シグナルが得られ、両ピーク電流から 2×10⁻⁷ - 2×10⁻³ M の広

い濃度範囲にわたってオルトリン酸を計測できる。

以上のように、基質リサイクリングは酵素の触媒機能を有効に利用したもので、高感度計測を目指した種々のアプローチがなされている。

4. 酵素リアクターを用いる FIA

4・1 固定化酵素リアクター

酵素の固定化法については既に2でふれたが、固定化酵素を FIA で用いるにはガラスキャピラリーやナイロンチューブの内壁に酵素を固定化したもの (open tubular reactor) と粒状の不溶性担体に固定化したものをカラムに詰め込んだもの (packed bed reactor) がよく用いられる。しかし、後者の方がリアクターとしてより高活性である。この場合、酵素は不溶性担体の表面官能基を介して共有結合で固定化される。特に基質の分子量が大きい場合には、担体と酵素との間に適当な分子鎖長を持ったスペーサー分子を入れ、酵素分子の動きに自由度を持たせる工夫も必要になる。

固定化用担体として、表面積が大きく、孔直径、孔体積、粒径が揃った孔直径が 50 nm 前後のアミノプロピル化多孔性ガラスビーズ(CPG)が多用され、グルタルアルデヒドを橋かけ剤とした反応により酵素が固定化されている (図 8 A)。この場合、酵素分子の殆どは CPG の表面積の大部分を占める孔内部表面に平面的に固定化されていると考えられる。しかし、孔内部を酵素反応キャビティーと考えると、孔内部空間を酵素固定化場とし、ビオチン-アビジン生物親和結合を利用して酵素分子を多重層に固定化する方法を提案した。図 8 B に示したように、CPG-NH₂ にグルタルアルデヒドを橋かけ分子としてビオチン標識酵素 E₁ (E₁-b) を固定化し、次いでアビジン分子を生物親和結合により結合し、さらにビオチン標識酵素 E₂ (E₂-b) を結合すると、孔内部空間で酵素分子が直鎖状に固定化される。このような反応により、同種の酵素及び異種酵素の連続固定化リアクターと基質リサイクリングに基づいた増幅型酵素リアクターの最適設計法を提案した。詳しくは著者らの論文 [5,6] を参照されたい。

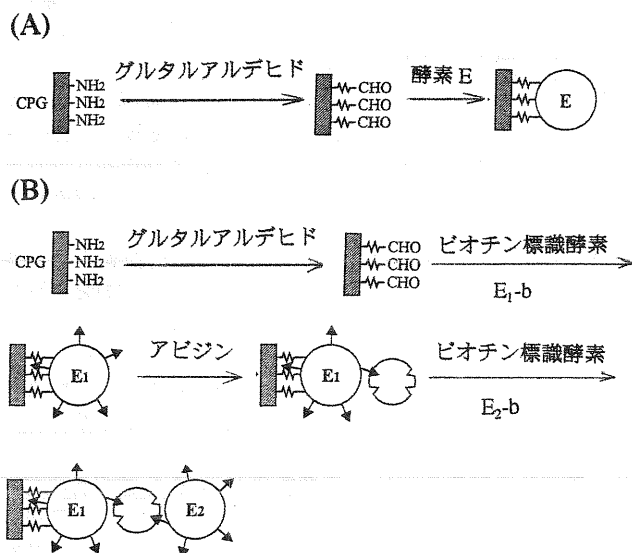


図 8. 多孔性ガラスビーズ (CPG) への酵素の固定化法
A: グルタルアルデヒドを橋架け剤とする酵素の固定化法;
B: ビオチン-アビジン反応による酵素の多重層固定化法。

4・2 FIA システムの基本構成

酵素電極の酵素固定化膜 (レセプター部位) と電極 (トランスデューサー部位) とを切り離し、前者に酵素リアクターを、後者にフロー電極を用いたものと考えられる。但し、検出器には電気化学検出法 (電流測定、電位測定、導電率測定など) のみならず光学的検出法 (紫外-可視、発光、蛍光など) や熱計測、さらに HPLC で用いられている検出器のほとんどが利用できるため、汎用性が高い。また、酵素リアクター内での物質変換を定量的に行わせることも容易である。

酵素リアクターには、ほとんどの場合、主反応として酸化酵素 (oxidases) や脱水素酵素 (dehydrogenases) が用いられ、それぞれ基質濃度に対応した量の H₂O₂ や NADH を生成する。従って、これらを検出することで特定の基質を定量できる。ここでは、アンペロメトリー検出器を用いたこれらの選択的な検出法について述べる。

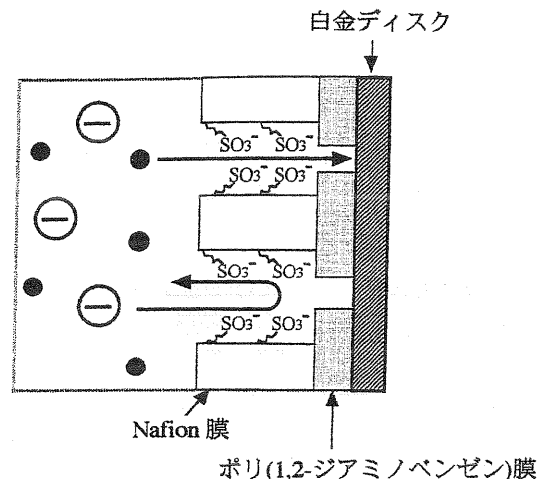
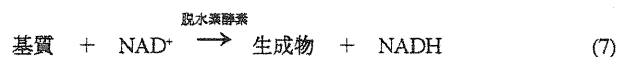
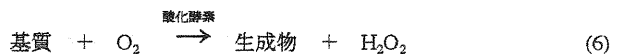
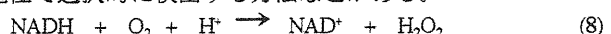


図 9. H₂O₂ に選択的に応答する Nafion 膜/電解重合膜ハイブリッド化白金電極

H₂O₂ の検出には白金電極が用いられるが、アスコルビン酸などの被酸化性物質により妨害を受け、H₂O₂ に対して選択性に乏しいことを 3・1 で述べた。そこで、アニオン電荷とテフロン類似構造を持った Nafion ポリマーを白金電極にスピコーティングすると、アスコルビン酸に対する電流は H₂O₂ の約 5% に減少した。また、ポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜修飾電極では約 2% にまで減少した。さらに、図 9 に示した、Nafion 膜と電解重合膜とをハイブリッド化した電極では、0.3% 以下にまで減少し、選択的な H₂O₂ 電極として機能した [9]。

一方、NADH の直接検出は検出加電圧が高い (0.8 V vs. Ag/AgCl) ので、さらに選択性に乏しい。そこで、メディエーターとしてメルドラブールを吸着させたグラブアイト電極や導電性 Os ポリマーを修飾した電極により、それぞれ 0 V, +0.4 V vs. Ag/AgCl で検出する方法がある。一方、ジアホラーゼや NADH 酸化酵素により、式(8)のように、NADH の物質情報量を H₂O₂ の情報に変換し、上記の H₂O₂ 電極で選択的に検出する方法などがある。



酸化酵素や脱水素酵素はそれぞれ 300 種程度知られており、市販されている酵素も多い。そこで、これらの酵素を固定化したリアクターと上記の選択的な H_2O_2 電極や NADH 電極とを組み合わせることで、多種多様な FIA システムを構築できる。

4・3 2成分同時定量システム

酵素リアクターは特定の基質に対して分子認識機能と反応触媒機能を有しているため、単一成分の FIA 計測に利用できるのはもちろんのこと、2成分以上の多成分計測にも応用できる。しかし、複数の酵素リアクターと複数の検出器とを組み合わせる方法では、FIA システムが複雑になる欠点がある。そこで、FIA 流路の多様性を利用して、1つの検出器だけで2成分を同時定量できる FIA システムの設計法について例を挙げて述べる。

(A) 試料ゾーン分割再合流流路

図 10 に示した FIA 流路により、注入された試料ゾーンを2つのサブゾーンに分割し、特定の基質に対して特異的に働く酵素リアクターで分子認識と物質変換を行い、さらに遅延コイルを導入して、1つの検出器で2つの特異的な FIA シグナルを得る方法である。

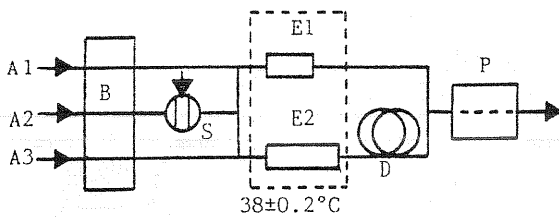
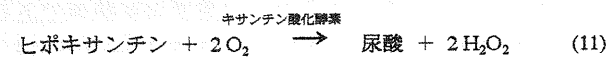
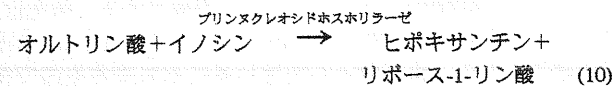


図 10. 亜硫酸とオルトリン酸に対する同時定量 FIA システム (試料ゾーン分割再合流流路)

A_1, A_3 : キャリヤー溶液; A_2 : 水; B: ポンプ; S: インジェクター; D: 遅延コイル; E_1 : 亜硫酸酸化酵素固定化リアクター; E_2 : ヌクレオシドホスホリラーゼ/キサンチン酸化酵素同時固定化リアクター; P: ポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜修飾白金電極。

ここでは、ワイン中の亜硫酸とオルトリン酸を同時定量する方法を紹介する[8]。図 10 のリアクター E_1 は亜硫酸酸化酵素固定化リアクターで式(9)の反応を触媒して H_2O_2 を



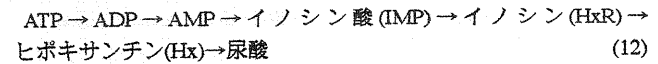
生成する。一方、リアクター E_2 はヌクレオシドホスホリラーゼとキサンチン酸化酵素を同時に固定化したリアクターで、キャリヤー溶液に過剰のイノシンが共存すると、式(10)と(11)の連続的な酵素反応によりオルトリン酸から H_2O_2 を生成する。両酵素リアクターはそれぞれ亜硫酸とオルトリン酸に特異的に作用するので、遅延コイル D を図に示した位置に入れ、 H_2O_2 電極を検出器に用いることで、2つの分離した FIA シグナルが得られる。第1ピークは亜硫酸に、第2ピークはオルトリン酸に対応するので、2成分を選択的にほぼ同時定量できる。このような簡単な FIA シ

ステムが、2成分あるいは3成分の特異的な同時定量分析に利用されている。

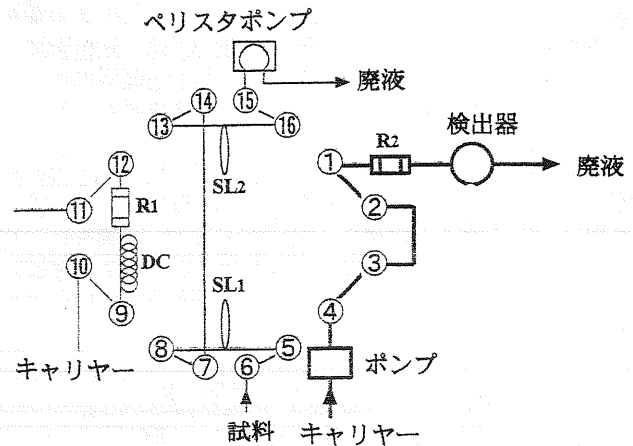
(B) 16方切り替えバルブを用いた流路

ここでは、16方切り替えバルブを用いた2成分同時定量 FIA を魚肉の鮮度測定 [9] に応用した例について述べる。

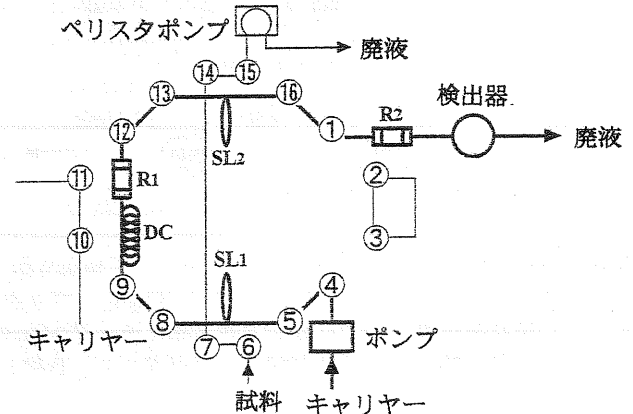
魚の死と同時に、魚肉中のアデノシン-5'-三リン酸(ATP)は次の代謝経路に従って分解する。



ここで、ATP から IMP までの分解速度は非常に早く、ATP と ADP と AMP は死後 24 時間以内に消失する。そこで、魚の鮮度を示す指標として、 $K_1(\%) = ([HxR] + [Hx]) \times 100 / ([IMP] + [HxR] + [Hx])$ と $K_2(\%) = [Hx] \times 100 / [HxR] + [Hx]$ が提案されている。著者らは銅を用いて鮮度(死後の経過時間)と鮮度指数 K_1, K_2 との相関を調べた。



(A) 試料吸引モード



(B) FIA モード

図 11. 16 方切り替えバルブで構成された魚肉の鮮度測定のための FIA 流路

R_1, R_2 : 酵素リアクター; DC: 遅延コイル; SL_1, SL_2 : サンプルループ (約 $60 \mu l$); 検出器: ポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜修飾白金電極。

16 方切り替えバルブで構成された FIA 流路を図 11 に示す。測定系には2つの固定化酵素リアクター(R_1, R_2)と H_2O_2 電極が含まれる。試料吸引モードでは、試料溶液がサン

ループ SL₁ と SL₂ に満たされると共に、キャリア溶液（リン酸緩衝液）は④→③→②→①の順に検出器に流れ、一定のベース電流が得られる。続いて FIA モードに自動的に切り替わり、キャリア溶液は④→⑤→⑧→⑨→⑫→⑬→⑯→①の順に流れ、SL₁ と SL₂ の試料溶液が流路内に注入される。遅延コイル DC を入れることで、時間差により SL₁ と SL₂ に対応する 2 つのピークシグナルが得られる。

鮮度指数 K₁ の測定には、R₁ リアクターに 5'-ヌクレオチダーゼ固定化リアクターを、R₂ リアクターにヌクレオシドホスホリラーゼ(NP) / キサンチン酸化酵素(XO)同時固定化リアクターを用いた (図 12)。SL₁ と SL₂ 中の HxR と Hx は、R₂ リアクターで最終的に H₂O₂ に変換されるため、ピーク 1 とピーク 2 が得られる。一方、IMP は R₂ リアクターで全く認識されないため、SL₂ に対応するピーク 2 だけが得られる。リアクターは 100% の効率で基質を変換できるので、ピークの高さに加成性が成り立ち、ピーク 1 は HxR と Hx の総濃度に比例し、ピーク 2 は IMP と HxR と Hx の総濃度に比例する。従って、 $K_1(\%) = (i_1/i_2) \times (s_2/s_1) \times 100$ となる。ここで i_1/i_2 はピーク 2 に対するピーク 1 の電流比であり、 s_2/s_1 は標準 Hx のピーク 1 に対するピーク 2 の電極での感度比を示す。つまり、鮮度指数 K₁ は、試料溶液に対して得られたピーク 1 とピーク 2 に対する相対的な大きさの比と検出感度の比とから求められ、検量線を必要とせず、また試料量にも依存しない。

同様に鮮度指数 K₂ の測定には、R₁ リアクターに NP 固定化リアクターを、R₂ リアクターに XO 固定化リアクターを用い、K₁ の場合と同様に、ピーク 1 は Hx の濃度に、ピーク 2 は HxR と Hx の総濃度に比例するので、それぞれのピークの相対的な大きさの比から鮮度指数 K₂ を決定できる。

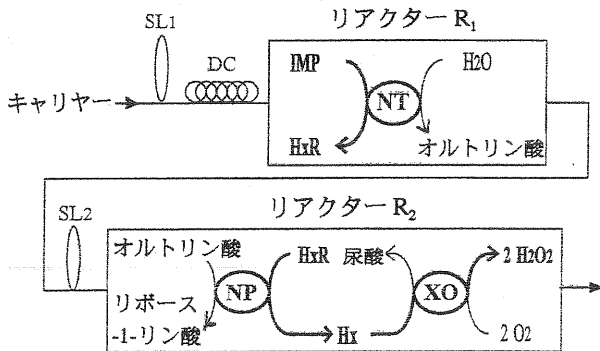


図 12. 鮮度指数 K₁ 測定のためのフローラインと酵素反応。リアクター R₁: 5'-ヌクレオチダーゼ(NT)固定化リアクター; リアクター R₂: ニクレオシドホスホリラーゼ(NP)/キサンチン酸化酵素(XO)同時固定化リアクター; IMP: イノシン酸; HxR: イノシン; Hx: ヒポキサンチン。

そこで、鯛の魚肉の小片(0.2 - 0.4 g)に少量のリン酸緩衝液を加え、ホモジナイザーで均一にし、遠心分離して濾過した溶液を K₁, K₂ の鮮度センサシステムに注入した。鯛の死後 4℃ で保存した時間と鮮度指数 K₁ と K₂ 及び Hx, HxR, IMP の濃度との関係を図 13 に示す。150 時間経過後に、魚肉のうまみ成分である IMP は減少すると共に、HxR が増加して、さらに遅れて Hx が増加し、分解が式(12)に従って進むことが伺える。鮮度指数 K₂ は鮮度との間に明確な相関が得られなかったが、鮮度指数 K₁ は保存時間 0 から 380 時間まで良好な相関があり、鮮度の優れた指標となること

が分かった。このように、鮮度という“あいまいさ”を FIA で数値化して測定することも可能になった。

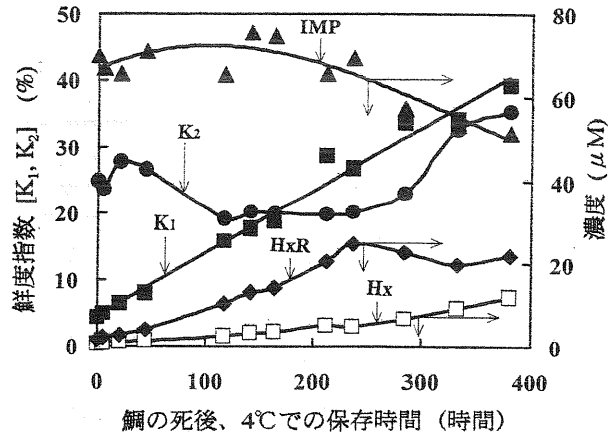


図 13. 鮮度指数(K₁, K₂)と鯛の鮮度(4℃での保存時間)との関係及びヒポキサンチン(Hx)、イノシン(HxR)とイノシン酸(IMP)濃度の時間経過

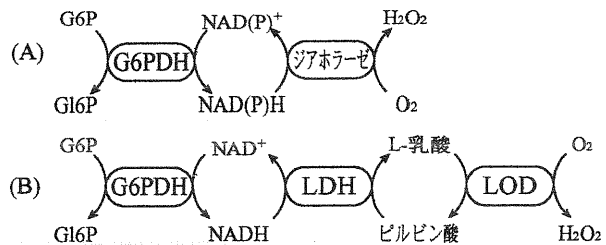


図 14. NAD⁺/NADH 系及び NADP⁺/NADPH 系補酵素の増幅反応モデル。

G6PDH: グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (酵母起源と LM 起源のもの); LDH: 乳酸脱水素酵素; LOD: 乳酸酸化酵素; G6P: グルコース-6-リン酸; G6P: グルコノラクトン-6-リン酸。

4・4 増幅型酵素リアクター

3・3 の増幅型酵素電極のところでも触れたように、基質と生成物が共役する 2 つの複合酵素反応系をリアクターに設計することで、特定の基質をオンラインで増幅できることから、いろいろな高感度検出器と組み合わせることによって、さらに高感度な FIA システムに発展できる。例えば、このような増幅機能を持った FIA システムを、HPLC の高感度ポストカラム検出器として用いることもできるので多様性に富む。ここでは、生理学的に重要な補酵素である NAD⁺ /NADH 系と NADP⁺ /NADPH 系のそれぞれを増幅できる酵素リアクターについて述べる。

図 14 にこれら補酵素に対する増幅反応モデルを示す。グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)とジアホラーゼを同時固定化したリアクターでは (図 14A) [10]、反応基質としてグルコース-6-リン酸と溶解酸素がキャリアー中にあると、補酵素は両酵素間でシャトルされ多量の H₂O₂ を生成する。ここで、G6PDH として酵母起源のものを用いると NADP⁺/NADPH 系に特異的に応答し、増幅率は 0.3 ml min⁻¹ のキャリアー流速で約 600 倍であった。一方、*Leuconostoc mesenteroides* (LM) 起源の G6PDH を用いた場合には、NAD⁺/NADH 系と NADP⁺/NADPH 系の両方に応答

し、それぞれ増幅率は 60 倍と 380 倍であった。さらに、G6PDH (LM 起源のもの) と乳酸脱水素酵素(LDH)と乳酸酸化酵素(LOD)を同時固定化したリアクター(Fig. 14B) [11] では、NAD⁺/NADH 系に特異的に応答し、キャリアー溶液中に過剰のグルコース-6-リン酸とピルビン酸があれば、補酵素 NAD⁺/NADH は G6PDH と LDH 間でリサイクリングされ、多量の L-乳酸を生成し、さらに LOD により多量の H₂O₂ に変換される。この場合、増幅率は約 500 倍であった。このように増幅反応設計された酵素リアクターを使い分けることによって、fmol オーダーの NAD⁺/NADH 系と NADP⁺/NADPH 系の補酵素を特異的に、あるいはその両者をオンライン増幅して検出することができる。

このような酵素-酵素間基質リサイクリングに基づいて反応設計された増幅型酵素リアクターは、フローインジェクションバイオセンサシステムを高感度化するためのオンライン増幅素子として有効であり、いろいろな応用が期待されている。

5. その他の応用

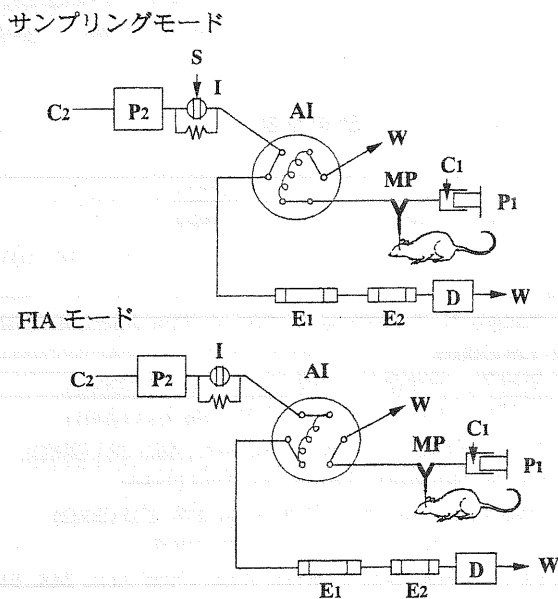


図 15. ラット脳細胞外 L-グルタミン酸の *in vivo* FIA. P₁: シリンジポンプ; P₂: μ l ポンプ; MP: マイクロ透析プローブ; AI: 6 方オートインジェクター (2.5 μ l サンプルループ); I: インジェクター (2.5 μ l サンプルループ); D: ポリ(1,2-ジアミノベンゼン)膜修飾白金電極; E₁: サッカロピ脱水素酵素固定化リアクター; E₂: L-グルタミン酸酸化酵素/グルタミン酸脱水素酵素同時固定化リアクター; C₁: リンゲル液; C₂: キャリヤー溶液 (0.5 mM NADH, 5 mM L-リシン, 147 mM NaCl を含む 0.1 M, pH 6.7, リン酸アンモニウム緩衝液); S: 1 μ M L-グルタミン酸標準溶液。

5.1 脳化学を解明するための *in vivo* FIA

人間を含めて生物は脳で情報の集約化が行われており、それは細胞間シナプスを介した神経伝達物質による情報伝達に基づいている。さらにその過程が学習、記憶、老化などに関わると共に、精神遅滞やアルツハイマー病に関係しているとも言われている。神経伝達物質には種々のものが知られているが、L-グルタミン酸は脳内での興奮性の神経

伝達物質として注目されている。そこで、脳細胞外での L-グルタミン酸をリアルタイムに *in vivo* 計測できる分析技術を開発することは、神経系のメカニズムを明らかにし、新薬開発や治療にも役立つと考えられる。

著者らは脳細胞外 L-グルタミン酸をオンラインで *in vivo* 計測するために、直径 0.22 mm のマイクロ透析プローブをラット脳細胞外の所定の箇所により手術により固定し、オンライン透析された灌流液を一定時間間隔で FIA 流路に注入するフローインジェクションバイオセンサ *in vivo* システムを開発した[12,13]。

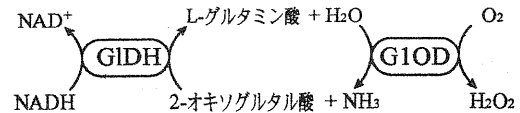
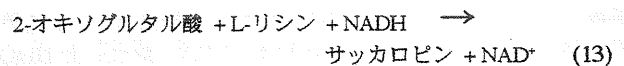


図 16. L-グルタミン酸の増幅反応モデル。

GIOD: グルタミン酸酸化酵素; GIDH: グルタミン酸脱水素酵素。

測定システムの概略を図 15 に示す。リンゲル液 C₁ を 2 μ l/分の流速でマイクロ透析プローブ MP に流し、透析液を 6 方自動スイッチングバルブのサンプルループ (2.5 μ l) に 3 分間溜めた後、30 秒間 FIA 流路に切り替え、透析液を注入する。この操作が自動的に繰り返される。注入された透析液中の L-グルタミン酸は、下流の酵素リアクター/H₂O₂ 電極システムにより特異的に検出され、脳細胞外 L-グルタミン酸がモニターされる。しかし、L-グルタミン酸の脳細胞外での濃度は数 μ M 以下であり、さらに透析プローブの透析率が 10% 以下であるので、検出系には 10⁻⁷ - 10⁻⁸ M 濃度レベルの感度が必要になる。そこで、4.4 で述べた基質リサイクリングに基づいた L-グルタミン酸の増幅型酵素リアクターを分子認識・増幅素子リアクターとして用いた (図 15, E₂)。その増幅反応モデルを図 16 に示すが、キャリアー溶液中に NADH と O₂ が過剰にあれば、L-グルタミン酸はリサイクリングされ多量の H₂O₂ を生成する。検出器には分子ふるい機能を持った選択的な H₂O₂ 電極を用いた。しかし、増幅反応モデルからも明らかなように、2-オキソグルタル酸も増幅され妨害となる。そこで、増幅素子リアクターの上流にサッカロピ脱水素酵素固定化リアクター (図 15, E₁) を入れ、キャリアー中にさらに L-リシンを加え、式 (13) の酵素反応により 2-オキソグルタル



酸を分解除去した。増幅素子リアクターの L-グルタミン酸に対する増幅率は約 60 であり、検出下限は 5 \times 10⁻⁷ M であった。また、この方法で KCl 刺激により脳細胞から L-グルタミン酸が放出される過程を *in vivo* モニターした。

ここで提案した *in vivo* FIA システムは、自動分析技術としての FIA 法を脳化学を解明するための技術として利用したもので、脳だけでなく皮下、血管、臓器、末梢神経などの *in vivo* 計測に発展できる技術であり、今後の応用が期待できる。

5.2 フローインジェクション酵素免疫測定

酵素免疫測定法(ELISA)にフローインジェクション分析技術を導入したフローインジェクション酵素免疫測定法は、

迅速で、高精度で、自動化が容易である等の利点がある。低分子量有機化学物質の特異的計測には酵素分子をレセプターとして用いることができるが、タンパク質に対しては別の特異的なレセプター分子が必要になる。ここでは、ヒトの免疫グロブリン G (HIgG) の計測を考えてみる。

HIgG のレセプター分子として HIgG の抗体 (抗 HIgG) とプロテイン A がある。HIgG は抗 HIgG の 2 つの Fab 部位に結合し、安定な抗原-抗体複合体を形成する。一方、プロテイン A は HIgG の Fab 部位に結合せず、Fc 部位に選択的に結合して安定な複合体を形成する。

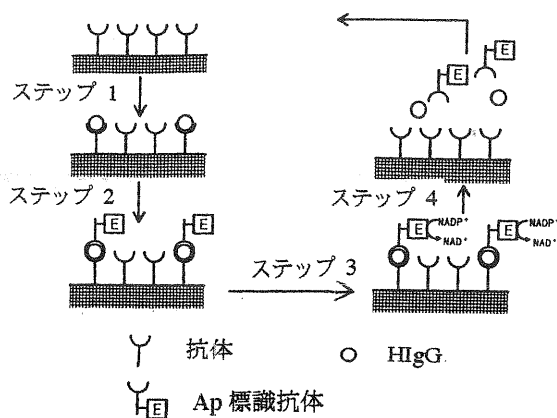


図 17. 二段階増幅に基づいたフローインジェクション酵素免疫測定法の原理。

ステップ 1: 抗体の注入; ステップ 2: AP 標識抗体の結合; ステップ 3: NAD⁺の注入; ステップ 4: 複合体の解離 (抗体結合カラムの再生)。

そこで、抗 HIgG リアクターとプロテイン A リアクターのそれぞれを、HIgG に対するレセプター分子リアクターとし、さらにアルカリ性ホスファターゼ (AP) 標識抗 HIgG や AP 標識プロテイン A とのサンドイッチ結合反応を用いて、HIgG に対する高感度 FIA を開発することを目的として行った。しかし、測定操作に数ステップが含まれているので、日立 K-1000 の 16 方バルブを用いて流路を設計し、全ステップが半自動的にこなせるようにした (詳しくは論文[14]を参照)。図 17 に各ステップの概略と測定原理を示す。

つまり、HIgG 量に比例して結合した AP 標識抗体や AP 標識プロテイン A に NAD⁺を作用させ、標識 AP による酵素反応によって NAD⁺を生成させる。つまり、結合した HIgG 分子から多量の NAD⁺分子を生成させることになる (第 1 段階の増幅)。さらに、生成した NAD⁺を増幅して検出するため、NAD⁺の増幅型リアクターとして 4・4 の図 14B に示した G6PDH/LDH/LOD 同時固定化リアクターを下流に配置して、NAD⁺を基質リサイクリング反応により多量の過酸化水素に変換し (第 2 段階の増幅)、過酸化水素電極で電気化学的に検出する FIA 法を開発した。ここで提案した方法では、微量の HIgG の物質情報を 2 段階で増幅して最終的に多量の過酸化水素の物質情報に変換できるので、fmol から pmol 濃度レベルの HIgG を定量できた。

ここで提案した方法は、酵素免疫測定各操作を 16 方バルブを備えたフローインジェクション流路に組み入れることで、半自動的にこなせることと、1 試料あたり 8 - 9 分で分析が完了すると共に、繰り返し測定が可能である特

徴を有する。また、酵素標識した抗体やプロテイン A を用いた特異的な複合体形成反応を利用して酵素増幅し、さらに基質リサイクリング機能を有した酵素リアクターを検出系に用いて増幅したことから、従来の方法と比べて高感度であった。この方法は高感度なフローインジェクション酵素免疫測定法の新たなアプローチとして、他の酵素免疫測定システムにも利用できると考えている。

6. おわりに

以上、簡易迅速な高精度のオンライン分析法として発展してきた FIA 法に、より高次の選択性、特異性を付与したフローインジェクションバイオセンサシステムは、FIA 流路の多様性と生体機能性分子によるピンポイント分子認識を兼ね備えた方法として、近年、バイオ計測のみならず環境計測などへの応用も目覚ましい。ここでは、このような計測システムを、方法論を中心に解説し、いくつかの応用例を紹介したが、全てを網羅することが出来ない程多様である。そこで、紙面の都合上、著者らの研究を中心に解説することにした。本稿では、“何を分析できる”のではなく、“どのような方法で何ができる”のかを中心にしたが、ある特定の物質の分析法を開発する際に、読者に何か参考になれば幸いである。

参考文献

- [1] T. Yao, *Anal. Chim. Acta*, **148**, 27 (1983).
- [2] T. Yao, *Anal. Chim. Acta*, **153**, 175 (1983).
- [3] T. Yao, K. Takashima, Y. Nanjyo, *Anal. Sci.*, **18**, 1039 (2002).
- [4] Y. Nanjyo, K. Takashima, T. Yao, *J. Flow Injection Anal.*, **19**, 129 (2002).
- [5] 八尾俊男、南條陽子、分析化学、**50**, 603 (2001).
- [6] 八尾俊男、南條陽子、分析化学、**50**, 613 (2001).
- [7] T. Yao, K. Kotegawa, *Anal. Chim. Acta*, **462**, 283 (2002).
- [8] T. Yao, M. Satomura, *Talanta*, **41**, 2113 (1994).
- [9] Y. Nanjyo, T. Yao, *Anal. Chim. Acta*, **470**, 175 (2002).
- [10] T. Yao, H. Ogawa, *Talanta*, **42**, 1297 (1995).
- [11] T. Yao, N. Kobayashi, T. Wasa, *Anal. Chim. Acta*, **248**, 345 (1991).
- [12] T. Yao, Y. Nanjyo, H. Nishino, *Anal. Sci.*, **17**, 703 (2001).
- [13] T. Yao, Y. Nanjyo, T. Tanaka, H. Nishino, *Electroanalysis*, **13**, 1361 (2001).
- [14] 八尾俊男、小川泰州、*J. Flow Injection Anal.*, **17**, 51 (2000).

(Received March 1, 2003)

