

## 化学発光検出フロースルーセンサー

木羽 信敏

山梨大学大学院 医学工学総合研究部 物質・生命工学専攻  
〒400-8511 山梨県甲府市武田 4-3-11



## Chemiluminometric Flow-through Sensors

Nobutoshi Kiba

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Takeda 4-3-11, Kofu 400-8511, Japan

This paper reviews the state-of-art and trends of flow-through sensors based on the integration of detection and reaction (and/or separation) in a flow cell which can be connected to a chemiluminescence detector for direct determination of one or more analyte(s) in liquid samples.

**Keywords** chemiluminescence, chemical and biochemical sensors, FIA

### 1. 緒言

化学発光(CL)は酸化還元反応により生じた活性種が発光を伴って基底状態へと失活する現象で、試料と化学発光試薬が接触・混合するだけで強いCLが観察される。光源を必要とせず、光電子増倍管などの光検出器のみで高感度検出が可能であり、装置の小型化が容易である。CL反応は一般に高速であり、活性種はすばやく失活するので、CLの再現性の良い測定には連続流れ法との組み合わせが不可欠である。さらに、CLを効率よく捕捉するため、CL反応場と検出器とをなるべく近づける工夫がなされてきた。近年、さらなる高感度化、省資源化、小型化、システムのシンプル化を追求して、フローセル内に固体試薬、イオン交換樹脂、固定化酵素または固定化抗原(抗体)を充填して、反応・分離・CL反応を集積化したフロースルーセンサーの開発が多く報告されている。

本稿は、化学センサーに関する前回の石井ら[1]による総説「フローインジェクション/化学発光計測法に基づく化学センサー」に続くもので、各種固相反応を組み込んだ特徴的な化学発光検出フロースルーセンサーについて、最近の成果を中心に紹介する。CL法の分析化学や臨床分野への応用に関しては総説[2-5]を参考にされたい。

### 2. 化学センサー

分離と検出を集積化した高感度で高選択性のセンサーが開

発された[6-10]。フローセル内に吸着剤を充填し、分析成分を固相抽出して他成分(妨害成分)と分離濃縮し、次に、CL試薬溶液を送液して分析成分のみに基づくCLを測定する方法である。

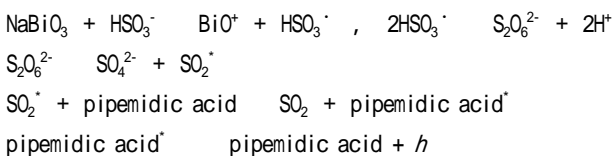
Linら[6]は、はじめて、分子インプリントポリマーを用いた、1,10-フェナントロリンを鑄型分子として、4-ビニルピリジン-Cu(II)-1,10-フェナントロリン錯体を含むスチレン/ジビニルベンゼン共重合体(粒子径100~300 $\mu$ m)を合成した。フローセル(内径500 $\mu$ m,長さ1.5cmのガラス管)に充填し、過酸化水素水溶液をキャリア溶液として10分間流してポリマー中の1,10-フェナントロリン(phen)を分解した後、試料溶液(50 $\mu$ L)を注入した。試料中のphenは選択的にポリマー中のサイトに吸着され、過酸化水素から生成したスーパーオキシドラジカルアニオンとの反応で生成した励起状態の3,3'-ジホルミル-2,2'-ジピリジルの失活に伴う極大波長約450nmのCLを生ずる。発光反応によりphenは分解してサイトから脱離するので、ポリマーは繰り返し使用できた。構造が類似している2,9-ジメチルphen, 2-クロロphen, 1,7-フェナントロリンは妨害しなかった。検出限界は試料量50 $\mu$ Lで $4 \times 10^{-9}$ Mであった。Luら[7]は、選択性が高く高感度なエピネフリンセンサーを製作した。エピネフリンを鑄型分子とし、メタクリル酸とジメタクリル酸エチレングリコールからポリマー(粒子径100~200 $\mu$ m)を合成した。フローセル(内径4mm,長さ5cmのガラス管)に充填し、試料溶液( $5.0 \times 10^{-9}$ ~ $1.0 \times 10^{-7}$ M)を流速1.5mL/minで10分間流し、エピネフリンをポリマーに選択的に濃縮し、水で洗浄後、バルブを切り替え、発光試薬溶液( $1 \times 10^{-3}$ Mルミノール,  $4 \times 10^{-6}$ Mフェリス

アン化カリウム) 600 μL を注入し, CL を測定した。その後, 水を送液してポリマーを洗浄して再生し, 次の分析を行った。分析速度は 3.5/h であった。CL は, エピネフリンと溶存酸素との反応で生成したスーパーオキシドラジカルアニオンとルミノールとの反応に基づく。

Zhang らは, 尿中の気管支拡張剤の選択的定量用に, クレンプテロールインプリントポリマー[8] やサルブタモールインプリントポリマー[9] を用いる高感度センサーを開発した。

Morais ら[10] は, マルチシリンジ FIA システムに組み込んだ分離と検出を集積化したセンサーを作製し, 水中のオルトリン酸塩の定量に応用した。試料(1.8mL) 中のオルトリン酸塩(5~50 μg P/L) をバナジン酸/モリブデン酸混合溶液でヘテロポリ酸とした後, フローセル(120 μL) 中に充填したビニルピロリドン/ビニルベンゼン共重合体(粒子径 30 μm) で吸着分離した。発光試薬溶液(5x10<sup>-3</sup>M ルミノール) に切り替え, ルミノール CL を検出した。測定後, 80%メタノールに切り替えて, ヘテロポリ酸を樹脂から除去し, 次の分析を行った。分析速度は 11/h であった。500 倍(Si/P) のシリカは妨害しなかった。

反応と検出を集積化した高感度センサーが報告されている。活性化した二酸化硫黄 SO<sub>2</sub><sup>•</sup> を利用する CL 反応系が検討され, SO<sub>2</sub><sup>•</sup> の生成に固体のビスマス酸, 二酸化鉛または二酸化マンガンが用いられた。抗菌剤ピペミド酸の定量に, 亜硫酸とビスマス酸との反応が用いられた。Li ら[11] は, スポンジゴム(2x2x2mm) に粉末状のビスマス酸ナトリウム(粒子径 40~60 μm) を付着させ, フローセル(内径 5.5mm, 長さ 7cm のガラス管) に充填した。キャリアー溶液(0.1M 硫酸) に 1x10<sup>-3</sup>M 亜硫酸(110 μL) を注入し, 下流で試料溶液と合流させ, フローセルへと導いた。下式のように, まず, 亜硫酸とビスマス酸ナトリウムとが反応して SO<sub>2</sub><sup>•</sup> が生成する。次いで, SO<sub>2</sub><sup>•</sup> によりピペミド酸が励起され, 失活する際, ピペミド酸の蛍光極大波長 430nm と同じ極大波長を有する CL を発する。亜硫酸とビスマス酸塩との反応では微弱な CL が観察されるが, ピペミド酸とビスマス酸塩との反応では CL は観察されなかった。L-アスコルビン酸とヨウ化物イオンは, ビスマス酸と優先的に酸化還元反応を起こすため, 負の妨害を与えた。濃度範囲 0.1~10 μg/mL のピペミド酸を 60/h の分析速度で定量可能であった。ビスマス酸ナトリウムのキャリアー溶液への溶解と反応による消耗のため, センサーの寿命は 50h であった。



ビスマス酸ナトリウムにかえて二酸化鉛を用いるオフロキサシンセンサーが作製され, 製薬分析に応用された[12]。鎮痛剤アナルギンの溶解試験のために, 選択性の高いアナルギンセンサーが開発された[13]。二酸化マンガンを付着させたスポンジゴムをフローセル(内径 5.5mm, 長さ 7cm のガラス管) に充填し

た。キャリアー溶液(水)に 120/h の速度で試料溶液(120 μL) を注入し, ローダミン B(RhB) を含む 1x10<sup>-3</sup>M 硫酸溶液と合流させ, フローセルに導く。アナルギンが加水分解して, 分子中のスルホ基が亜硫酸イオンとして脱離し, 二酸化マンガンによって酸化され, SO<sub>2</sub><sup>•</sup> が生成する。これから RhB へエネルギーが移動し RhB は励起され, 極大波長 430nm の CL が生ずる。センサーは, 濃度範囲 4x10<sup>-5</sup>~1x10<sup>-3</sup>M のアナルギンの 400 回の定量に使用できた。

Kawatani ら[14] は一流路系で使用できる高感度なメラトニンセンサーを作製した。モリブデン酸塩イオン(MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) を吸着させた強塩基性陰イオン交換樹脂(IRA-958, -45) をガラス管(内径 5mm, 長さ 3.5cm) に充填しフローセルとした。キャリアー溶液は pH 調整していない過酸化水素水溶液で, 試料溶液(100 μL) は 70 °C に加熱したミキシングコイルを経てフローセルへ導いた。CL は, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> の存在下で過酸化水素の不均化反応で生成した一重項酸素とメラトニンとの反応に基づく。このセンサーは, 分析速度 30/h で濃度範囲 1x10<sup>-7</sup>~1x10<sup>-3</sup>M のメラトニンの定量に用いることができ, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> は一重項酸素生成反応の触媒として作用するので, 樹脂は繰り返し使用できた。

多用されているルミノール CL 反応は塩基性溶液中で進行し, 活性化した 3-アミノフタル酸に基づく CL の極大波長は, pH10.5 で 425nm である。Lin ら[15] は陽イオン交換樹脂(Dowex-50W) に吸着させたコバルト(II) - エタノールアミン錯体触媒が過酸化水素と反応してスーパーオキシドラジカルアニオンを生成し, pH5.8 でルミノール CL 反応が進行することを見出した。この反応を利用した一流路系で使用できる過酸化水素センサーを作製した[15,16]。キャリアー溶液には pH 調整をしていない 1x10<sup>-3</sup>M ルミノール水溶液を用いた。センサーは, 内径 5mm, 長さ 3cm のガラス管に錯体を吸着させた樹脂を充填し, 光電子増倍管の前面に設置して作製した。濃度範囲 2x10<sup>-7</sup>~2x10<sup>-5</sup>M の過酸化水素(注入量 90 μL) を 60/h の分析速度で定量できた。この錯体を吸着させた樹脂は安定で, センサーは 1000 回以上の分析に使用できた。本センサーシステムは雨水中の過酸化水素の定量と, 固定化グルコースオキシダーゼカラムリアクターを組み込み, ジュースやヒト尿中のグルコースの定量に応用された。

塩基性で炭酸塩イオンが存在する条件下で, 過酸化水素は過ヨウ素酸と反応し, 炭酸塩イオンから生じた三重項状態の二酸化炭素二量体の二酸化炭素への分解反応に基づく 440nm 付近に極大をもつ CL を発する[17-19]。この CL 現象を利用して, 水をキャリアー溶液とする一流路系で使用できる過酸化水素センサーが開発され, 雨水の分析に用いられた[18]。過ヨウ素酸と水酸化カリウム/炭酸カリウムを別々に吸着させた強塩基性陰イオン交換樹脂(Amberlite IRA-458) をフローセル(内径 5mm, 長さ 3cm のガラス管) に充填した。分析速度 100/h で, 2x10<sup>-7</sup>~1x10<sup>-4</sup>M の濃度範囲の過酸化水素(注入量 100 μL) を定量できた。樹脂は 1x10<sup>-5</sup>M 過酸化水素(注入量 100 μL) の 222 回の測定に用いることができた。

固体表面で CL が増感されることを利用した亜硝酸センサーが

開発された[19]。試料溶液と酸性過酸化水素溶液とを混合し、試料中の亜硝酸をオンラインでパーオキシ亜硝酸(ONOOH)に変換し、0.4M 炭酸ナトリウム溶液(150  $\mu$ L)を注入して、炭酸塩イオンと反応させた。炭酸ラジカルの分解に基づく強い416~460nmのバンドを持つCLがフローセル(内径3mm,長さ3cmのガラス管)に詰めた綿(0.03g)の表面で発生する。水道水および井戸水中の $2 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-9}$ Mの濃度範囲の亜硝酸を定量できた。

塩基性溶液中で固体過酸化バリウム表面にスーパーオキシドラジカルアニオンが生成する現象を利用したルミノール等の検出法が開発された[20,21]。キャピラリー電気泳動の分離流路終端(内径75  $\mu$ m)に過酸化バリウム(粒子径5  $\mu$ m以下)を長さ0.3cm充填し、アセトニトリルを含むホウ酸塩緩衝液(pH8.3)を用い、ルミノール、ルシゲニン、4-アミノエチルイソルミノールを分離検出した。検出下限はそれぞれ、 $1 \times 10^{-9}$ M、 $5 \times 10^{-9}$ M、 $7 \times 10^{-9}$ Mであった。

陽イオン交換樹脂に固定化したトリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)錯体を充填したフローセルでの電気化学発光(electrochemiluminescence)による実用的なシュウ酸、エタノール、亜硫酸センサー[22]が開発された。ルミノール/過ヨウ素酸または過マンガン酸塩を吸着させた陰イオン交換樹脂を用いる抗結核剤イソニアシド[23]、アドレナリン[24]、イソプレナリン[24]、アスコルビン酸[25]用のセンサーが作製された。

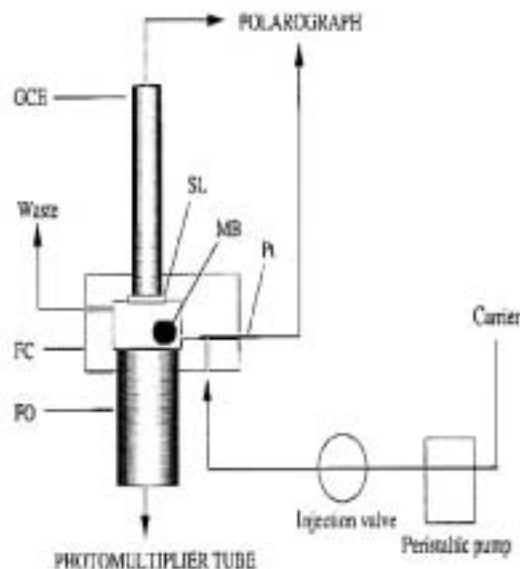
ルミノールCL反応の触媒であるヘモグロビン[26]、過シュウ酸エステルCL反応の増感剤である3-アミノフロオランテン[27,28]、亜硫酸CL反応の増感剤であるローダミン6G[29]の固定化が検討され、過酸化水素[26-28]およびアナルギン[29]用センサーが開発された。

## 2. 酵素センサー

酵素センサーは、酵素の分子認識能と酸化還元触媒能を同時に利用するものであり、CL反応は塩基性でのルミノールCLが用いられている。固定化酵素反応系は担体に膜を用いる表面固定化系と多孔性粒子を用いる細孔内固定化系に分類される。連続流れ系では、多孔性微粒子をカラム内に詰めた充填層型固定化酵素反応管が固定化酵素膜より安定性、反応効率の点で有利であるが、CLセンサーでは、再現性の良い反応管の調製に熟練を要することと反応管内でのCLの散乱等の問題がある。

酸化酵素固定化膜と光ファイバーを組み合わせた電気CL法が検討され、グルコース[30,33]、乳酸[30,33]、コリン[31,33]、コレステロール[32,33]用のセンサーが報告された(Fig.1)。Marquetteら[33]は、50  $\mu$ mルミノールを含む0.1Mバロピツル酸塩緩衝液(30mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH8.5またはpH9)をキャリアー溶液とする一流路系で、上部にグラシーカーボン電極(GCE)(直径3mm)、下部に光ファイバー(シングルモード、コア直径5mm, クラッド直径7mm)を接続したフローセル(容量250  $\mu$ L, スターラーバー(2x7mm))を作製した。酸化酵素固定化ポリアミド膜

またはコラーゲン膜(直径7mm)をGCEに貼り付け、+425mV(対Pt電極)を印加した。CLはGCEで酸化されたルミノールと基質との酵素反応で生成した過酸化水素との反応による。グルコースセンサーと乳酸センサーでは、それぞれグルコースオキシダーゼ(EC 1.1.3.4)および乳酸オキシダーゼ(EC 1.13.12.4)を用い、いずれも $1 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-9}$ Mの濃度範囲(注入量10  $\mu$ L)の定量が可能であった。グルコースセンサーおよび乳酸センサーでは、流速が高いとGCEでのルミノールの酸化効率と酵素膜での反応効率が低下するので、分析速度は5/hであった。これは、グルコースオキシダーゼおよび乳酸オキシダーゼの至適pHが酸性側なのでルミノールCLに適した塩基性条件では酵素反応の反応効率が悪いためである。緩衝液にはKClとMgCl<sub>2</sub>を電導性を確保する目的で加えた。コレステロールセンサーとコリンセンサーでは、塩基性側に至適pHをもつコレステロールオキシダーゼ(EC 1.1.3.6)およびコリンオキシダーゼ(EC 1.1.3.17)を使用したので、分析速度はそれぞれ10/hおよび20/hであった。



**Fig.1 Electrochemiluminescent FIA measurement set-up.** GCE, glassy carbon electrode; SL, sensing layer; Pt, platinum pseudo-reference electrode; FC, flow cell; FO, liquid core fiber-optic; MB, magnetic bar. [33]

ペルオキシダーゼ(EC 1.11.1.7)の固定化が検討され、過酸化水素センサーが開発された。ペルオキシダーゼはルミノールCL反応を触媒するが、微生物(*Arthromyces ramosus*)由来が、西洋ワサビ(horseradish)由来より、発光強度で100倍、最大反応速度V<sub>max</sub>で500倍高く、安定性に優れている[34]ので、酵素センサーでは多用されている。固定化用担体にはナイロン膜[35,36]、シリカゲル(ゾル-ゲル法)[37]、ポリビニルアルコールビーズ[38,39]、フーズドシリカキャピラリー[40]が検討された。

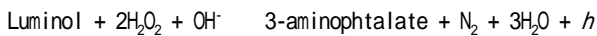
ヒスタミンセンサーが開発され、魚肉の分析に用いられた[41]。ペルオキシダーゼと新規なヒスタミンオキシダーゼ(EC

1.4.3.-)とを同時固定化したポリビニルアルコール (PVA) ビーズ(粒子径約 60 μm)をテフロン管(内径 1.0mm, 外径 1.5mm, 長さ 40cm)に充填し, 渦巻状にして, 光電子増倍管の前面に貼り付けた。500 μM ルミノールを含む緩衝液 (pH10) をキャリアー溶液とする一流路系で, 濃度範囲  $1 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-9} \text{M}$  のヒスタミンが分析速度 30/h で定量できた。センサーは三日間 (450 回注入) 使用でき, 固定化酵素は 4 で 30 日間安定であった。

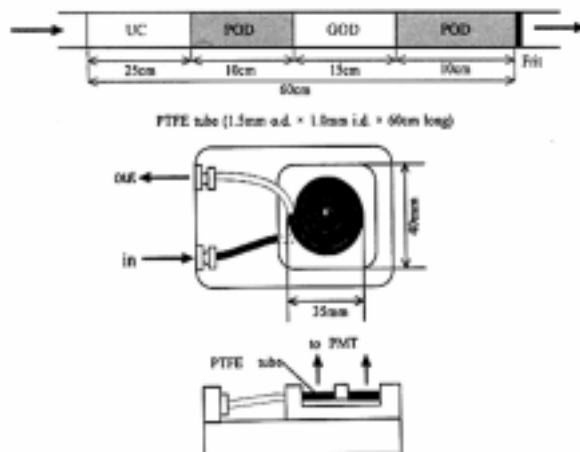
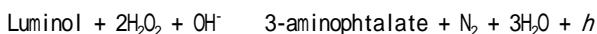
ルミノール CL 反応がすばやく起こり, 急速に消光することを利用して, 生体試料中の尿酸, アスコルビン酸等の還元性物質の妨害を受け難い, 選択的な L-グルタミン酸センサー[42]および L-グルタミン酸と L-リシンの同時計測用センサー[43]が開発された。L-グルタミン酸センサー[42]では, テフロン管(内径 1.0mm, 長さ 60cm)に PVA ビーズを担体とした固定化ウリカーゼ(EC 1.7.3.3)(UC), 固定化ペルオキシダーゼ(POD), 固定化グルタミン酸オキシダーゼ(EC 1.4.3.11)(GOD), 固定化ペルオキシダーゼを充填し, 渦巻状にして, フローセルとした(Fig.2 参照)。100 μM ルミノール溶液(pH9.0)をキャリアー溶液とする一流路系に試料溶液 10 μL を注入した。フローセル内の UC で試料中の尿酸の酸化反応が下式の様に進行し, 試料中の尿酸は分解し, 生成した過酸化水素は共存するアスコルビン酸等の還元性物質を酸化分解する。



未反応の過酸化水素は下流の POD でルミノールと CL 反応して分解する(第一ピーク)。



次いで, GOD で L-グルタミン酸が反応し, 生成した過酸化水素を下流の POD で CL 検出する(第二ピーク)。



**Fig.2 Schematic representation of the flow-through chemiluminescence sensor.** PTFE tube was packed with immobilized enzyme beads and coiled spirally and set in front of a photomultiplier tube (PMT). UC, immobilized urecase; POD, immobilized peroxidase; GOD, immobilized glutamate oxidase. [42].



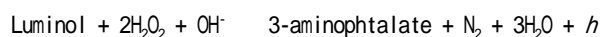
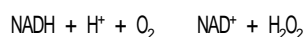
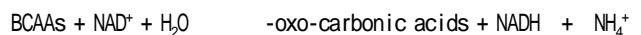
**Fig.3 Flow-injection responses for four injections of the the serum sample.** Each second peak is L-glutamate. Serum was diluted with 0.05M carbonate buffer (pH9.0) and filtered through an ultrafiltration membrane. The filtrate (10 μL) was injected into the system. [42]

$2 \times 10^{-9} \text{M} \sim 5 \times 10^{-6} \text{M}$  の濃度範囲の L-グルタミン酸を, 分析速度 30/h で定量できた。血清の分析に応用し, 392 μM 尿酸, 440 μM アスコルビン酸の存在は分析値(141 μM)に影響を与えなかった。

(Fig.3参照)固定化酵素は2000回の分析に使用できた。また, ペルオキシダーゼ, コリンオキシダーゼ, アセチルコリンエステラーゼ(EC 3.1.1.7)を用いるコリンとアセチルコリンの同時計測用センサーが開発され, ウサギ脳の分析に応用された[44]。

これらのセンサーでは, 上流の固定化酸化酵素層で生成した過酸化水素をその直下の固定化ペルオキシダーゼでのルミノール CL 反応で完全に分解できないと, 下流のペルオキシダーゼでも検出され, 「化学混線」(chemical cross talk)が起こるので, 注意が必要である。

脱水素酵素基質のルミノール CL 検出が検討さ, L-分岐鎖アミノ酸(ロイシン, バリン, イソロイシン)(BCAAs)センサーが開発された[45]。L-ロイシンデヒドロゲナーゼ(EC 1.4.1.9), NADH オキシダーゼ(EC 未定), ペルオキシダーゼを PVA ビーズに同時固定化し, テフロン管(内径 1mm, 長さ 20cm)に充填し, 渦巻状にして, フローセルとした。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド( $\text{NAD}^+$ )溶液をキャリアー溶液とし, 試料溶液 20 μL を注入し, ルミノール溶液 (pH10.5) と合流させ, フローセルへ導いた。フローセル内で下式の酵素反応と CL 反応が進行する。



このセンサーは,  $3 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-6} \text{M}$  の濃度範囲の BCAAs を, 分析速度 25/h で定量でき, 血清の分析に 1000 回使用できた。

脱水素酵素基質の二成分同時計測が検討され, 糖尿病のマーカである D-グルコースと 3-ヒドロキシ酪酸(ケトン体)の同時計測用センサーが開発された[46]。テフロン管(内径 1mm, 長さ 30 cm)に 3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.30),

NADH オキシダーゼおよびペルオキシダーゼの3種類の酵素を同時固定化したPVA ビーズ(長さ5cm), 酵素を固定化してないPVA ビーズ(20cm), グルコースデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.47), NADH オキシダーゼおよびペルオキシダーゼの3種類の酵素を同時固定化したPVA ビーズ(5cm)を充填した。得られたレスポンスの第一ピークは3-ヒドロキシ酪酸, 第二ピークはD-グルコースに基づく。それぞれ $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-9} \text{M}$  および  $1 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-9} \text{M}$  の濃度範囲で, 分析速度30/hで定量できた。固定化酵素活性の半減期は約20日であった。

コリンオキシダーゼとペルオキシダーゼ同時固定化膜を用いたコリンセンサー[47,48], ウリカーゼとペルオキシダーゼ同時固定化ビーズ充填反応管を用いた尿酸センサー[49]が報告されている。

#### 4. イムノセンサー

イムノセンサーとは, フローインジェクション酵素免疫測定法(FIIA)において, 分離(免疫反応)と検出(CL測定)をフローセル内に集積化したものである。新規免疫測定法の確立は抗原に対してより高い特異性と親和性をもつ抗体を得ることにかかっているが, イムノセンサーの開発では, 抗体の非特異的吸着が少な担体の選択と繰り返し利用できる安定な固定化抗原または抗体の調製がポイントである。

Marquetteらは各種2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)センサーを開発した[50,51]。2,4-Dを固定化したグラシーカーボン電極とルミノールをラベル化した抗2,4-D抗体とを用いる直接競合法による電気CLセンサーは, 0.2~200 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲の2,4-Dの50回の測定に使用できた。抗2,4-D抗体と二次抗体(ペルオキシダーゼをラベル化した抗イムノグロブリン抗体)とを用いる間接競合法では, 定量範囲は0.2 $\mu\text{g/L}$ ~200mg/Lに広がった。いずれも, 1回の測定に50分かかった[50]。非特異的吸着が少ないポリエーテルスルホン樹脂膜を固定化用担体として用いる場合, 分析速度3/hで $\mu\text{g/L}$ ~160mg/Lの濃度範囲の2,4-Dの定量が30回可能であった[51]。

Botchkarevaら[52]は, 間接競合法によるDDTセンサーに適した担体と再生試薬を検討した。担体として, 二次抗体(ペルオキシダーゼをラベル化した抗イムノグロブリン抗体)の非特異的吸着が少なく, 光散乱が少ないナイロン膜が, 再生試薬としてグリシン/塩酸緩衝液(pH1.9)が優れていた。5~100nMの濃度範囲のDDTを, 1.5/hの分析速度で, 40回定量できた。

下痢性貝毒であるオカダ酸を迅速に定量できる直接競合法によるセンサーが開発された[53]。オカダ酸を固定化したポリエーテルスルホン酸膜(直径11mm)を貼り付けたフローセル(250 $\mu\text{L}$ )に抗オカダ酸モノクロナール抗体と試料溶液の混合液(200 $\mu\text{L}$ )を導き, 送液をとめて5分間反応させ, 洗浄後, CL試薬(ルミノール,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *p*-ヨードフェノール, pH8.5)(40 $\mu\text{L}$ )を注入し, CLを測定した。再生試薬(グリシン緩衝液, pH2.0)をセルに導

き抗原を再生し, 次の分析を行った。1サイクルの所要時間は20分で, 市販キットの1/4であった。34サイクルの使用が可能で, 分析精度は, 400ng/mLのオカダ酸を含む貝肉試料溶液の分析値の変動係数は12%( $n=34$ )で, 従来法(14~44%)より優れていた。

FIIAでは, 免疫反応, 洗浄, CL反応, 再生, 洗浄の各段階で液性の異なる溶液を使用するため, シーケンシャルインジェクション分析(SIA)法による完全自動化が検討された。Drevenyら[54]は, 直接競合法によるトリヨードチロニン(T3)センサーを作製した。抗T3抗体を固定化したポリメタクリル酸ビーズを充填したフローセル(内径1.4mm, 外径1.5mm, 長さ2mmのポリエチレンチューブ)とアクリジニウムエステルをラベル化したT3を用いた。1~5ng/Lの濃度範囲のT3を分析速度8.5/hで, 300回分析でき, 検出下限は0.4ng/mLであった。

Imatoらは, 抗体を固定化した磁性ビーズをフローセル内に磁石で捕捉する方法を用い, SIA法により自動化したピテロジェニンセンサー[55]と直鎖アルキルベンゼンスルホン酸センサー[56]を作製した。抗ピテロジェニン(Vg)モノクロナール抗体(一次抗体)を固定化した磁性ビーズ(粒子径100 $\mu\text{m}$ )懸濁液(250 $\mu\text{g/mL}$ )をフローセル(0.5 $\times$ 2 $\times$ 25 $\text{mm}^3$ )に導き, セルの下部に設置した磁石でビーズ(37.5 $\mu\text{g}$ )を固定化した。試料溶液をセル内に導き, 送液を止め, Vgと一次抗体との免疫反応を進め(20分間), 次いで, ペルオキシダーゼでラベル化した抗Vg抗体(二次抗体)を導き, 固定化されているVgと反応させた(20分間)。CL試薬(ルミノール,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , *p*-ヨードフェノール)を導き, CLをセルの上部に設置した光電子増倍管で測定した。濃度範囲2~100ng/LのVgの定量ができ, 検出下限は2ng/Lであった[55]。

Yakovlevaら[57]はシリコンマイクロチップを用いるアトラジン(AZ)センサーを作製した。試料溶液とペルオキシダーゼをラベル化したAZと抗AZイムノグロブリンGとを試験管中で30分間競合反応させた後, その10 $\mu\text{L}$ をFIAシステムに注入した。フローセルのチャンネル(幅2.5 $\mu\text{m}$ , 深さ235 $\mu\text{m}$ )の壁に固定化したプロテインGでイムノ生成物のみを吸着分離した後, CL試薬溶液を導き, CL検出した。再生にはグリシン緩衝液(pH2.2)を用いた。分析速度6/hで, 14ng/L~1 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲のAZを, 相対標準偏差15%で定量できた。センサーは260日間使用可能であった。

#### 文献

- [1] M.Ishii, M.Yamada: *J.Flow Injection Anal.*, **11**, 154(1994).
- [2] M.Kurihara, T.Hasebe, T.Kawashima: *Bunseki Kagaku*, **51**, 205(2002).
- [3] P.Fletcher, K.N.Andrew, A.C.Calokerinos, S.Forbes, P.J.Worsfold: *Luminescence*, **16**, 1(2001).
- [4] J.Lin, H.Ju: *Biosens.Bioelectron.*, **20**, 1461(2005).
- [5] L.J.Kricka: *Anal.Chim.Acta*, **500**, 279(2003).
- [6] J.-M.Lin, M.Yamada: *Analyst*, **126**, 810(2001).

- [7] J.Du, L.Shen, J.Lu: *Anal.Chim.Acta*, **489**, 183(2003).
- [8] H.Zhou, Z.Zhang, D.He, Y.Hu, Y.Huang, D.Chen: *Anal.Chim.Acta*, **523**, 237(2004).
- [9] H.Zhou, Z.Zhang, D.He, Y.Hu, Y.Xiong: *Sens.Actuat.B*, **107**, 798(2005).
- [10] I.P.A.Morais, M.Miro, M.Manera, J.M.Estela, V.Cerda, M.R.S.Souto, A.O.S.S.Rangel: *Anal.Chim.Acta*, **506**, 17(2004).
- [11] B.Li, Z.Zhang, L.Zhao, C.Xu: *Anal.Chim.Acta*, **459**, 19 (2002).
- [12] B.Li, Z.Zhang, L.Zhao, C.Xu: *Talanta*, **57**, 765(2002).
- [13] L.Zhao, B.Li, Z.Zhang, J.-M.Lin: *Sens.Actuat.B*, **97**, 266 (2004).
- [14] T.Kawatani, J.-M.Lin, M.Yamada: *Analyst*, **125**, 2057(2000).
- [15] J.-M.Lin, X.Shan, S.Hanaoka, M.Yamada: *Anal.Chem.*, **73**, 5043(2001).
- [16] S.Hanaoka, J.-M.Lin, M.Yamada: *Anal.Chim.Acta*, **426**, 57(2001).
- [17] J.-M.Lin, M.Yamada: *Anal.Chem.*, **71**, 1760(1999).
- [18] J.-M.Lin, K.Sato, M.Yamada: *Microchem.J.*, **69**, 73(2001).
- [19] C.Lu, J.-M.Lin, C.W.Huie, M.Yamada: *Anal.Chim.Acta*, **510**, 29(2004).
- [20] H.Goto, J.-M.Lin, M.Yamada: *Bunseki Kagaku*, **47**, 417 (1998).
- [21] J.-M.Lin, H.Goto, M.Yamada: *J.Chromatogr.A*, **844**, 341(1999).
- [22] J.-M.Lin, F.Qu, M.Yamada: *Anal.Bioanal.Chem.*, **374**, 1159(2002).
- [23] S.Zhang, H.Li: *Anal.Chim.Acta*, **444**, 287(2001).
- [24] G.-J.Zhou, G.-F.Zhang, H.-Y.Chen: *Anal.Chim.Acta*, **463**, 257(2002).
- [25] Y.Huang, Z.Zhang: *Anal.Lett.*, **36**, 2783(2003).
- [26] B.Li, Z.Zhang, L.Zhao: *Anal.Chim.Acta*, **445**, 161(2001).
- [27] E.Ponten, M.Stigbrand, K.Irgum: *Anal.Chem.*, **67**, 4302 (1995).
- [28] E.Ponten, C.Viklund, K.Irgum, S.T.Bogen, A.N.Lindgern: *Anal.Chem.*, **68**, 4389(1996).
- [29] Y.-M.Huang, C.Zhang, X.-R.Zhang, Z.-J.Zhang: *Fresenius J.Anal.Chem.*, **365**, 381(1999).
- [30] C.A.Marquette, L.J.Blum: *Anal.Chim.Acta*, **381**, 1(1999).
- [31] V.C.Tsafack, C.A.Marquette, B.Leca, L.J.Blum: *Analyst*, **125**, 151(2000). C.A.
- [32] C.A.Marquette, S.Ravaud, L.J.Blum: *Anal.Lett.*, **33**, 1779(2000).
- [33] C.A.Marquette, B.D.Leca, L.J.Blum: *Luminescence*, **16**, 159(2001).
- [34] K.Akimoto, Y.Shinmen, M.Sumida, S.Asami, T.Amachi, H.Yoshizumi, Y.Saeki, S.Shimizu, H.Yamada: *Anal.Biocem.*, **189**, 182(1990).
- [35] U.Spohn, F.Preuschoff, G.Blankenstein, D.Janasek, M.R.Kula, A.Hacker: *Anal.Chim.Acta*, **303**, 109(1995).
- [36] D.Janasek, U.Spohn: *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 123 (1999).
- [37] B.Li, Z.Zhang, Y.Jin: *Sens.Actuat.B*, **72**, 115(2001).
- [38] N.Kiba, A.Itagaki, S.Fukumura, K.Saegusa, M.Furusawa: *Anal.Chim.Acta*, **354**, 205(1997).
- [39] T.Kato, K.Abe, K.Nakamura, M.Tachibana, H.Koizumi, K.Tani, N.Kiba: *Bunseki Kagaku*, **52**, 741(2003).
- [40] N.Kiba, T.Tokizawa, S.Kato, M.Tachibana, K.Tani, H.Koizumi, M.Edo, E.Yonezawa: *Anal.Sci.*, **19**, 823(2003).
- [41] Y.Sekiguchi, A.Nishikawa, H.Makita, A.Yamamura, K.Matsumoto, N.Kiba: *Anal.Sci.*, **17**, 1161(2001).
- [42] N.Kiba, S.Ito, M.Tachibana, K.Tani, H.Koizumi: *Anal.Sci.*, **17**, 929(2001).
- [43] N.Kiba, T.Miwa, M.Tachibana, K.Tani, H.Koizumi: *Anal.Chem.*, **74**, 1269(2002).
- [44] N.Kiba, S.Ito, M.Tachibana, K.Tani, H.Koizumi: *Anal.Sci.*, **19**, 1647(2003).
- [45] N.Kiba, M.Tachibana, K.Tani, T.Miwa: *Anal.Chim.Acta*, **375**, 65(1998).
- [46] N.Kiba, Y.Inoue, M.Tachibana, K.Tani, H.Koizumi: *Anal.Sci.*, **19**, 1203(2003).
- [47] H.Lapp, U.Spohn, D.Janasek: *Anal.Lett.*, **29**, 1(1996).
- [48] V.C.Tsafack, C.A.Marquette, F.Pizzolato, L.J.Blum: *Biosens.Bioelectron.*, **15**, 125(2000).
- [49] N.Kiba, K.Suzuki, T.Miwa, M.Tachibana, H.Koizumi, K.Tani: *Anal.Sci.*, **16**, 1203(2000).
- [50] C.A.Marquette, L.J.Blum: *Sens.Actuat.B*, **51**, 100(1998).
- [51] C.A.Marquette, L.J.Blum: *Talanta*, **51**, 395(2000).
- [52] A.E.Botchkareva, F.Fini, S.Eremin, J.V.Mereader, A.Montoya, S.Giritti: *Anal.Chim.Acta*, **453**, 43(2002).
- [53] C.A.Marquette, P.R.Coulet, L.J.Blum: *Anal.Chim.Acta*, **398**, 173(1999).
- [54] D.Dreveny, C.Klammer, J.Michalowsky, G.Gubitz: *Anal.Chim.Acta*, **398**, 183(1999).
- [55] N.Soh, H.Nishiyama, Y.Asano, T.Imato, T.Masadome, Y.Kurokawa: *Talanta*, **64**, 1160(2004).
- [56] R.Zhang, K.Hirakawa, D.Seto, N.Soh, K.Nakano, T.Masadome, K.Nagata, K.Sakamoto, T.Imato: *Talanta*, **68**, 231(2005).
- [57] J.Yakovleva, R.Davidsson, M.Bengtsson, T.Laurell, J.Emneus: *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 21(2003).

(Received May 10, 2006)