オプティカル化学センサ

相澤 益 男*

1. はじめに

化学センサ (Chemical Sensor) には非常に高度な選択性が要求される。測定対象を識別する分子認識材料が化学センサ構築に必須となるが、多くの分子認識材料には分子情報を直接センサ出力としての電気情報に変換するような機能を備えていない。したがって、分子認識材料の選択性発現をなんとかして効率よい信号変換に結び付ける必要がある。これまで化学センサの研究開発の歴史を彩る多様な設計が分子認識の信号を中心として行われてきた⁽¹⁾⁻⁽⁵⁾。

しかしこれらの展開の中では、光を利用した化学センサすなわち“オプティカル化学センサ”は多少特異な存在であった。オプティカル化学センサは非常に幅広い原理を基盤としているにもかかわらず、その研究開発はむしろ個々特殊なケースを対象として行われてきた。最近このような認識のもとに、オプティカル化学センサをもっと一般化しようとする動きが活発化しているときでもある⁽⁶⁾⁻⁽¹⁰⁾。こうした状況を踏まえて、オプティカル化学センサの研究開発の現況および将来展望を述べることにしたい。

2. オプティカル化学センサの原理と基本構成

化学センサは化学物質を測定対象とするので、測定対象を選択的に認識する機能部位をもっとも基本的な構成要素とする。この機能部位で行われる測定対象の認識を信号変換する部位が、化学センサのもう一つの重要構成要素である。信号変換部位で、光学的情報への変換が行われる化学センサがオ

プティカル化学センサと呼ばれる。

オプティカル化学センサの測定対象は、気体成分および溶液成分である。測定対象が気体成分であれ、液体成分であれ、要は複数成分の共存系から特定成分を選択的に検知することが必要とされる。この選択性発現には、それぞれの特定成分に選択的親和性を示す分子認識材料が活用される。分子認識材料で測定対象が認識され、その変化が光学的变化を誘導するメカニズムがオプティカル化学センサの特徴である。光学的变化としては屈折率、反射率、吸収、蛍光、発光、偏光、あるいはサーフェスプラズモンなどの変化を利用するセンサが多い。

これらの光学的变化が高感度、高精度に検知されるように、オプティカル化学センサはデザインされる。光ファイバおよび光ガイドを利用し、これらに分子認識部位を装着したオプティカル化学センサが一般的である(図1)。発光検出方式では入射ビームを必要としないが、その他の検出方式では入射ビームと発光ビームの光路内蔵した構造となる。

3. オプティカルイオンセンサ

(1) 原理

オプティカルイオンセンサは pH センサを中心に研究開発が進められてきた。オプティカル pH センサ(pH オプトード)は、pH 感応部の色素が測定液中のプロトンと可逆的に反応して光学的变化を伴うことを利用している。もっとも広く用いられている色素は、弱酸性の色素であり、プロトン解離型とプロトン会合型が、測定 pH 範囲で吸収または、蛍光を著しく変化することがポイントである。

* 東京工業大学生命理工学部長・教授(〒226 横浜市緑区長津田町4259)

Optical Chemical Sensors; Masuo Aizawa (Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama)

Keywords: optical ion sensor, optical pH sensor, optical biosensor, optical enzyme sensor, optical immunosensor, electrochemical luminescence

1995年8月15日受理

図1 種々のオプティカル化学センサ.

HA^a は色素の酸型であり、 A^{a-1} は塩基型である。

色素の解離度は pH に依存して変化するが、酸型と塩基型の濃度定数 K_c が低濃度領域では成立する。

$$K_c = [\text{C}_A - \text{C}_{\text{H}^+}] / \text{C}_{\text{HA}}$$

解離定数 K_a とそれぞれの活量係数 γ とは次のような関係式が得られる。

$$K_a = K_c [\gamma_A - \gamma_{\text{H}^+}] / \gamma_{\text{HA}}$$

これらの活量係数はイオン強度に著しく影響を受ける。

便宜的にはプロトン以外のイオン濃度を導入した混合解離定数 K_{ac} が用いられる。

$$K_{ac} = a_{\text{H}^+} \cdot \text{C}_A / \text{C}_{\text{HA}}$$

ただし、イオン強度と温度が一定条件下で成立する。

酸型および塩基型の吸収または、蛍光強度が顕著に違う色素を光ファイバの先端に固定し、オプティカル pH センサを構成できる。このようなオプティカル pH センサの pH 応答を測定すると、一般的に K_{ac} を中心としてシグモイド形の検量線が得られる。しかも、ダイナミックレンジは K_{ac} 中心とした $\pm \text{pH } 1$ 程度であることが多い。

(2) 吸収測定方式オプティカル pH センサ

吸収測定方式のオプティカル pH センサでは、色素層の吸収を散乱または反射法によって測定する。

Peterson らは、ポリアクリルアミドマイクロスフィアにフェノールレッドを共有結合し、光ファイバの先端に装着して、オプティカル pH センサを構成した⁽¹¹⁾。pH 感応部位には、1 μm 径のポリスチレンマイクロスフィアを混合し、光散乱を増強している。

フェノールレッドは、塩基型が 588 nm に吸収ピークをもっているため、この波長における吸収変化を測定する。しか

し、この測定を定量的に行うためには、pH などの測定環境の変化によって変動しない安定なコントロールが必要である。

Peterson らは 650 nm 以上の赤色光をコントロールに使えることを見出し、種々のバックグラウンドを補正するシステムを構成した。

Bacci らは、イオン交換樹脂 Amberlite XAD-2 ビーズにフェノールレッドを吸着固定し、反射のスペクトルを溶媒中のスペクトルと比較し、オプティカル pH センサ構築の基本的条件を導出している⁽¹²⁾。

(3) 蛍光方式オプティカル pH センサ

蛍光変化を利用するオプティカル pH センサでは、酸型と塩基型を有する弱電解質の蛍光色素が使われる。酸型と塩基型の解離状態が pH に依存して変化するのを、これを利用して pH の測定を行える。 β -メチルウンベルフェロンは古くから知られている蛍光色素であるが⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾、オプティカル pH センサに適用された。Saari らはフルロレセインアミンをガラスあるいはセルロースに共有結合し、オプティカル pH センサを構成した⁽¹⁵⁾。この pH センサでは、pH が增大すると、酸型の固定化色素が塩基型に変わるので、蛍光強度が増大する。これらのオプティカル pH センサは、固定一波長における蛍光強度の増減を測定する方式である。

もっとも汎用されている蛍光色素は 1-ヒドロキシビレン-3, 6, 8-トリスルホン酸 (HPTS) である。セルロースに固定化された HPTS の塩基型は 530 nm で励起され、420 nm の蛍光を発する。pH の増加とともにこの蛍光は増大する。一方、HPTS の酸型は 410 nm に励起スペクトルのピークを持っている⁽¹⁶⁾。励起スペクトルの 428 nm に酸・塩基型の等発光点があるので、この波長で励起したときの発光をコントロールとして使用する。したがって、この方式は、二波長で励起し、二波長における蛍光強度を測定する。

HPTS は蛍光量子効率が高く、可視部領域の励起および発光であり、二波長励起できるなどの利点を有し、オプティカル pH センサに適用している⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾。またスルホン酸基をもっているため、化学修飾や静電結合によって固体担体に固定化しやすい。ただし、HPTS の蛍光はイオン強度の影響にきわめて鋭敏である。また、酸素による消光効果も生じる。Stern-Volmer 式での消光係数は、 10^{-6} Pa^{-1} である。イオン強度の影響および酸素による消光は、HPTS を固体担体に固定化することによって、克服できることが明らかとなった。

色素の安定性を克服するため、Walt らは pH を連続的に測定するための色素放出型の pH センサを考案している⁽¹⁹⁾。HPTS をエチレン/酢酸ビニルポリマー中に担持し、測定液中に徐放するように工夫されている。405 nm と 450 nm に二波長励起方式で、515 nm の蛍光強度比を測定する。3 ヶ月 (約 7.8 Ms) の連続測定が可能であると報告されている。

以上のオプティカル pH センサは、pH 感応性蛍光色素を

固体マトリックスに固定化してつくられているが、これらの色素の安定性が大きな問題である。筆者らは pH 感応性高分子薄膜をそのまま光学 pH センサとして利用することを提案している⁽²⁰⁾。一例はポリアニリン薄膜である。光ファイバや光ガイドの表面にポリアニリン薄膜を容易に形成できるので、任意の固体表面全体を pH 感応面とすることが可能である。ポリアニリンは、pH に依存して可視部吸収および蛍光特性が変化する。これを利用して、可視部吸収または蛍光測定による光学 pH センサが構成される。この例ではプラスチック光ファイバの先端にポリアニリン薄膜が形成されている。ガラス電極とほぼ同じ応答速度で pH 変化に追従している。高分子薄膜を用いれば、pH 感応面が広い 2 次元 pH センシングが可能となり、新しい応用面が開かれるものと期待される。

pCO₂ センサは pH センサを基盤として構成される。pH センサの表面を CO₂ 透過性膜で被覆し、HCO₃⁻ 溶液を充填するのが一般的な構造である。

(4) 金属イオンセンサ

金属イオン検知用の光学イオンセンサは、非蛍光性物質が金属イオンとコンプレックスを形成し、蛍光を発生する系を利用して構成される。例えば、固定化モリン(3, 5, 7, 2', 4'-ペンタヒドロキシフラボン)による Al³⁺ および Be²⁺ 光学イオンセンサの報告がある⁽²¹⁾。

クラウンエーテルその他のイオノフォアに色素を導入した報告が目される⁽²²⁾⁽²³⁾。

Narayanaswamy らは、(5-(4'-ニトロフェニルアゾ)-2-ヒドロキシ-1, 3-キシリル-18-クラウン-5)をスチレン-ジビニルベンゼン共重合体に固定化し、光学カルシウムイオンセンサを構成した。このセンサの至適 pH 領域は 7~9 であり、(5~50) × 10⁻³ mol/m³ のカルシウムを検出できるという。

鈴木らは、非環状イオノフォア A2318 を用いたカルシウムイオンセンサおよびマグネシウムイオンセンサを報告した⁽²⁴⁾。至適 pH 領域は 6.8~7.5 であり、430 nm の蛍光強度を測定する。Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, NH₄⁺, Ba²⁺ などの妨害を受けないが、Ca²⁺ と Mg²⁺ は同程度の応答を示す。また、錯形成が膜表面で不可逆的に起こるので、センサを再使用するためには、pH 3 の塩酸溶液で洗浄する必要があるという。その他いろいろな試みがあり、金属イオンの光学イオンセンサが研究開発されているが、選択性が十分でないなど種々の課題があり、これらの課題克服に期待が寄せられている。

(5) ディスポーザブルセンサ

連続測定とともにスポット測定の重要性が増大している。スポット測定ではディスポーザブルセンサが簡便であり、その有用性が再認識されている。このようなニーズに対応し

て、光学イオンセンサについてもディスポーザブル方式のセンサが開発されるようになった。

医療計測用であるが、pH, pO₂, pCO₂, pCa²⁺ の 4 項目を同時測定できるディスポーザブルセンサが市販されるようになった。

4. 光学バイオセンサ

(1) 光学酵素センサ

バイオセンサは分子認識機能が優れた生体物質を利用して構成される。生体物質の種類によって、酵素センサ、微生物センサ、免疫センサなどに分類される。これらのバイオセンサの中で、光学情報に信号変換する方式のものが光学バイオセンサである。

光学酵素センサには、蛍光または吸収変化を利用する方式と発光を利用する方式とがある。第 1 の方式では、酵素反応を蛍光変化または吸収変化に導く、繰り返し使用を可能とする系は極めて少ない。既に述べた光学 pH センサあるいは光学 pO₂ などを基盤とし、酵素層を形成することによって、繰り返し使用可能な光学酵素センサをつくることができる。第 2 の方式では、ルシフェラーゼなどの化学発光が利用される。

もっとも単純な構造の光学酵素センサは、光学 pH センサの pH 感応層の上に酵素層を形成したものである。アセチルコリンエステラーゼはアセチルコリンを加水分解して、酢酸とコリンを生成するので、pH の変動を伴う。そこでアセチルコリン測定用の光学酵素センサは、光学 pH センサにアセチルコリンエステラーゼを組合せてつくることができる。pH 変化を伴う酵素系を利用する光学酵素センサには同様な原理が適用される。ただしこの種の光学酵素センサでは、測定溶液の緩衝作用を常に考慮しなければならない。酵素反応によって生じた pH 変化が緩衝作用のためセンサ出力とならないからである。

ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素は、それぞれルシフェリン、ルミノールなどの化学発光を触媒する。筆者はこれらの酵素を高分子膜に固定化した発光膜を合成し、光学酵素センサに適用した。例えば、ルミノールの濃度が一定の条件下では、過酸化水素濃度に依存して定量的にホトンが発生する。したがって、発光量から過酸化水素を計測することができる。

このような原理により、2 種類の光学酵素センサがつくられた。第 1 は発光膜を光ファイバの先端に装着した光学酵素センサであり⁽²⁵⁾、第 2 は発光膜をホトダイオードの受光面に装着した光学酵素センサである⁽²⁶⁾。これらのセンサでは、ルミノールが消費されるが、きわめて高感度に過酸化水素の測定を行うことができる。これらの過酸化水素センサは、グルコースなど種々の物質を測

定する基盤センサとして利用される。

ホタルルシフェラーゼはルシフェリンと ATP の発光反応を触媒する。最近では遺伝子組換えによってホタルルシフェラーゼをつくることができるようになったので、ルシフェラーゼの応用展開が活発化している。ルシフェラーゼによって ATP 測定用のオプティカル酵素センサをつくることができる。

バクテリアルシフェラーゼはホタルルシフェラーゼとは違った発光反応を触媒する。遺伝子組換え体で大腸菌で発現し、発光バクテリアをつくることができるが、発光バクテリア内では FMNH₂ が再生され、発光量からアルデヒドなどを測定できる。このような発光バクテリアを利用したオプティカルバイオセンサによって、種々の測定が可能となる。

(2) オプティカルバイオアフィニティセンサ

抗体、結合タンパク質、レセプタ、あるいは DNA 鎖などはそれぞれ対応する分子に対して非常に強い親和性を示し、安定な複合体を形成する。このようなバイオアフィニティを利用したセンサを総称してバイオアフィニティセンサという。免疫センサはその代表的な例である⁽²⁷⁾。このバイオアフィニティセンサには複合体の解離・結合状態を標識剤を用いずに信号変換する方式と、標識剤を用いる方式がある。

(i) 非標識バイオアフィニティセンサ

非標識方式のオプティカルバイオアフィニティセンサには次のような原理が提案されている。

第1は、抗体分子内にある蛍光性アミノ酸残基の消光現象を利用したオプティカル免疫センサである。抗体固有の蛍光は抗原との複合体形成によって消光する。この消光を利用して、非標識方式のオプティカル免疫センサを構成できる。しかし消光の程度は小さいのでこれを増強するためのエネルギー移動系の構築が種々試みられている。

第2は、固体表面に抗体あるいは抗原を固定化しておき、この固体表面の光学的特性を直接測定するオプティカル免疫センサである。抗原抗体複合体の生成によってこれら光学的特性が著しく変動することが望まれる。表面増強ラマンスペクトル(SERS)、表面プラズモン(SPR)、表面における屈折率、偏光などの光学的変化が検討され、この種のオプティカル免疫センサの研究開発が進められている。SPR 方式のバイオアフィニティセンサが実用段階に達した。

表面プラズモン方式の免疫センサは、抗体固体化界面の非特異的吸着を制御することができたため実用段階に達した。表面に銀または金などの薄膜を形成したガラス界面にレーザー光照射すると、プラズモンが発生する。このプラズモンの発生は界面状態を鋭敏に反映する。そこで SPR 発生時の界面に抗体を固定化し、この抗体層に測定対象の抗原が特異吸着によって複合体を形成すれば、SPR 発生特性が変化する⁽²⁸⁾。市販された測定装置では、免疫センサ部に測定液がフロー方式で達するものであり、抗原抗体複合体の形成を連続測定で

きる。これまで連続免疫測定は困難とされてきたため、SPR 方式の免疫センサの実現は大きなインパクトを与えた。

非標識方式のオプティカル免疫センサは測定システムがもっとも簡便であり、標識の必要がないので測定プロセスも単純である。そのため非標識方式のオプティカル免疫センサの研究開発の進展に多大の期待が寄せられるところである。しかし、一般的には非標識方式では超高感度を達成することが難しい。これらの問題点を克服するために新たな視点に立った研究開発が進んでいる。

(ii) 標識バイオアフィニティセンサ

標識方式のオプティカルバイオアフィニティセンサには種々の標識剤が提案されているが、蛍光分子および酵素がその代表例である。

Schultz らは、結合タンパク質プロテイン A のバイオアフィニティと蛍光標識を利用したバイオアフィニティセンサを提案した。光ファイバの先端に小さなキャビティを装着した構造を基本とし、このキャビティの内壁にはプロテイン A が固定化されている。キャビティ内部では蛍光標識(FITC)したポリサッカライドが固定化プロテイン A と複合体を形成している。複合体形成時の標識剤は光ファイバからのビームで励起されないようにキャビティは設計されている。キャビティ内部には試料液中のグルコースが拡散できる構造となっているので、標識糖とグルコースが固定化プロテイン A と競争反応を行って複合体を形成する。したがってキャビティ内部に遊離した標識糖からグルコース濃度を推定できることになる。この原理に基づいて血中グルコース(血糖)測定用のセンサがつくられた。

抗体を利用した標識方式のオプティカルバイオアフィニティセンサ(免疫センサ)には次のような例が知られている(図2)。

第1は発光反応を触媒する酵素を標識剤としたオプティカル免疫センサである。光ファイバの先端に抗原または抗原アナログが固定され、酵素標識抗体との複合体が形成される。標識酵素はペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼなどであ

図2 オプティカル免疫センサ。

る。測定液に接触すると、測定対象の抗原と固定化抗原(または抗原アナログ)との競争反応によって、光ファイバ先端の複合体が一部解離し、溶液中に抗原/抗体複合体を形成する。光ファイバ先端部を洗浄後、標識酵素による発光量を測定する。酵素に代わり、ヘミンもルミノールの発光反応を触媒することが示されている。 β_2 ミクログロブリン、インシュリンなどのオプティカル免疫センサが報告された⁽²⁷⁾。

第2は電気化学ルミネッセンスを利用したオプティカル免疫センサである。センサの基本構造は、光ファイバの先端を透明電極とした光ファイバ電極である。この透明電極の電位は外部電源によって制御可能であり、電極表面で発生したルミネッセンスは光ファイバを介してホトンカウンタで計数される。筆者らは、ピレンやルミノールなどで標識した抗原(または抗体)は電気化学ルミネッセンスを発生するが、抗原/抗体複合体を形成すると電気化学ルミネッセンスを示さなくなってしまうことを見いだした。この現象を利用してホモジニアス免疫測定法が確立された。とくにルミノールについて過酸化水素共存下で電気化学ルミネッセンスを行うときわめて高感度な免疫測定を行えることが示された⁽²⁹⁾。

免疫グロブリン(IgG)を測定するオプティカル免疫センサは次のように使われる。標識抗原はあらかじめ調製される。共有結合によってルミノールをIgGに結合し、所定の結合比の複合体を分離精製する。測定にあたっては、所定量のルミノール標識抗IgG抗体をIgG含有測定液に添加する。所定時間抗原抗体反応を行った後、オプティカル免疫センサによって電気化学ルミネッセンスを測定する。

以上の方法では、抗原抗体反応後、複合体(B)と遊離抗原(F)(または抗体)を分離する必要がない。すなわちB/F分離を必要としないホモジニアス免疫測定である。ホモジニアス測定は一段階測定であり、測定プロセスが簡便であるが、超高感度を達成することが難しいとされてきた。しかし、電気化学ルミネッセンスを利用したホモジニアス免疫測定では $10^{-7} \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ のIgGが測定可能であることが示された。

第3はエバネッシェント波を利用したオプティカル免疫センサである。光ファイバのコアを露出した部分に抗体を固定化した構造が基本となっている。光ファイバの一端からは標識蛍光分子を励起するビームが入射され、他端で受光される。抗原含有の測定液に、蛍光標識抗原を添加すると、両抗原はコア表面の抗体と抗原/抗体複合体を形成する。コア表面近傍の標識蛍光分子だけがエバネッシェント波で励起され、蛍光を発生する。この方式もB/F分離を必要としないホモ

ジニアス免疫測定である。

文 献

- (1) 清山哲郎, 鈴木周一, 塩川二郎, 笛木和雄編: 化学センサー, 講談社サイエンティフィク, (1982).
- (2) T. Seiyama, ed.: *Chemical Sensor Technology I, II*, Kodansha (I; 1988) (II; 1989).
- (3) N. Yamazoe, ed.: *Chemical Sensor Technology III*, Kodansha, (1991).
- (4) S. Yamauchi, ed.: *Chemical Sensor Technology IV*, Kodansha, (1992).
- (5) M. Aizawa, ed.: *Chemical Sensor Technology V*, Kodansha, (1994).
- (6) W. R. Seitz: *Anal. Chem.*, **56**(1984), 16A.
- (7) T. Hirschfeld, T. Deaton, F. Milanovich and S. Klainer: *Optical Engineering*, **22**(1983), 527.
- (8) O. S. Wolfbeis: *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors Vol. 2*, CRC Press, Boca Raton, (1991).
- (9) M. Arnold: *Anal. Chem.*, **64**(1992), 1015A.
- (10) M. J. P. Leiner and P. Hartmann: *Sensors Actuators B*, **11**(1993), 281.
- (11) J. I. Peterson, S. R. Goldstein, R. V. Fitzferald and D. K. Buckhold: *Anal. Chem.*, **53**(1980), 864.
- (12) M. Bacci, F. Baldini and A. M. Scheggi: *Anal. Chim. Acta*, **207**(1988), 343.
- (13) C. Bulow and W. Dieck: *Z. Anal. Chem.*, **75**(1982), 81.
- (14) R. R. Chen: *Anal. Lett.*, **1**(1968), 423.
- (15) L. A. Saari and W. R. Seitz: *Anal. Chem.*, **54**(1982), 821.
- (16) O. S. Wolfbeis, E. Furlinger, H. Kroneis and H. Marsoner: *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **314**(1983), 119.
- (17) Z. Zhujun and W. R. Seitz: *Anal. Chim. Acta*, **160**(1984), 47.
- (18) O. S. Wolfbeis and H. Offenbacher: *Sensors Actuators*, **9**(1986), 85.
- (19) S. Luo and D. R. Watt: *Anal. Chem.*, **61**(1989), 174.
- (20) H. Shinohara, S. Nishiguchi, K. Yabuuchi, Y. Ikariyama and M. Aizawa: *Proc. 3rd Internatl. Meeting Chem. Sensors*, (1990), 326.
- (21) L. A. Saari and W. R. Seitz: *Anal. Chem.*, **54**(1982), 821.
- (22) J. F. Alder, D. C. Ashworth, R. Narayanaswamy, R. E. Moss and I. O. Sutherland: *Analyst*, **112**(1987), 1191.
- (23) D. C. Ashworth, H. P. Huang and R. Narayanaswamy: *Anal. Chim. Acta*, **213**(1988), 251.
- (24) K. Suzuki, K. Tohda, Y. Tanda, H. Ohzonra, S. Nishihama, H. Inoue and T. Shirai: *Anal. Chem.*, **61**(1989), 382.
- (25) Y. Ikariyama, M. Aizawa and S. Suzuki: *J. Solid-Phase Biochem.*, **5**(1980), 223.
- (26) M. Aizawa, Y. Ikariyama and H. Kunoh: *Anal. Lett.*, **17**(1984), 555.
- (27) S. Logas and B. Johnsson: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1990), 1526.
- (28) M. Aizawa: *Adv. Clin. Chem.*, **31**(1994), 247.
- (29) M. Tanaka, S. Kamiya, A. Shibue and M. Aizawa: *Sensor Actuators B* **13-14**(1993), 184.