極微弱化学発光からみた薬剤の安定性 (第1報¹⁾) 光電子計数法
による極微弱化学発光測定装置の試作水野光司, 熊木健治, 畑 俊一, 西井易穂, 富岡穂一
中外製薬株式会社総合研究所²⁾Estimation of Drug Stability Based on Extra-Weak Chemiluminescence. I.¹⁾
Construction of Apparatus for Measuring of Extra-Weak
Chemiluminescence Using Photo-Electron
Counting MethodKOJI MIZUNO, KENJI KUMAKI, SHUN-ICHI HATA, YASUHO NISHII, and SUICHI TOMIOKA
Research Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.²⁾

(Received October 4, 1977)

A new apparatus to measure the extra-weak chemiluminescence based on single photo-electron counting method was constructed and some working conditions for this apparatus were examined experimentally.

The upper limit of the intensity of input light for quantitative determination in this apparatus is about 10^{-12} W and the lower one is about 6×10^{-16} W. Luminol was determined by the use of the apparatus in 0.1 pg order of the magnitude by its oxidative reaction system. Small quantities of ATP (10^{-13} mol) and NADH (10^{-13} mol) were also determined in the firefly and bacterial luciferase system, respectively.

Keywords—extra-weak chemiluminescence; photo-electron counting method; luminol; luciferase; ATP; NADH; linolic acid

近年, 種々の化学反応系³⁾ や酵素反応系⁴⁾ において, 反応に伴う極微弱な発光の存在が知られてきた。このような発光現象は, それらの系内に存在する活性分子種のエネルギー状態の遷移に基づくものであるから, その発光現象を定量的に捉えることができれば, その反応系に関する種々の情報を得ることが可能になるものと思われる。著者らは多くの有機化合物の自動酸化反応がフリーラジカル種の関与する反応と考えられること,⁵⁾ また化学発光をはじめ多くの発光を伴う反応にはフリーラジカル種が寄与している事実^{3,4)} に着目して不安定な薬物の分解に際してこれまで観察することのできなかつたような極微弱な発光が存在するのではないかと考えた。

例えば, 40°, 5分というような極めて短時間の温和な加速条件においても不安定な薬物は, 濃度変化としては観測され得ないような初期の分解反応を起こしているはずであり, この分解反応にフリーラジカル種が関与していれば, それらの再結合などによる極微弱化学発光を生じ, これを測定することによって短時間に薬剤の安定性の測定が行なえるのではないかと試みである。

著者らは先の予備的検討において, グリシン, リノール酸あるいはシュウ酸と酸化剤との共存下に生ずる極微弱化学発光を観察した。^{3d)} 一方, このような極微弱化学発光の研究の発展性は, 現在のところ常に検出測定器の性能に依存していることは明かであり, 高性能の極微弱光測定装置の開発が待たれる。

1) 日本薬学会第92年会, 大阪, 1972年4月および第95年会, 西宮, 1975年4月, で発表。

2) Location: Takada, Toshima-ku, Tokyo.

3) a) R.F. Vassilév, A.A. Vichutinskii, *Nature*, **194**, 1276 (1962); b) J. Stauff, H. Schmidkunz, G. Hartmann, *ibid.*, **198**, 281 (1963); c) A.A. Gurwitsch, V.F. Eremeyev, Yu. A. Karabchievsky, *ibid.*, **206**, 20 (1965); d) K. Mizuno, S. Hata, S. Tomioka, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 2588 (1970).

4) E.K. Hodgson, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 702 (1976); B.L. Strehler, *Method of Biochemical Analysis*, **16**, 99 (1968).

5) E.H. White, D.F. Rosewell, *Accounts Chem. Res.*, **3**, 54 (1970).

今回、著者らは極微弱化学発光の定量的な測定を目的とした高性能の装置を開発するため、光電子計数法を基に極微弱化学発光測定装置を試作するとともに、いわゆる化学発光系ならびに生物発光系を用いてそれらの微量成分領域における極微弱発光の定量的測定を行ない合せて油脂の自動酸化分解のモデル系としてリノール酸水溶液からの発光の検出を試みた。

実験の部

試料 ルミノール、ヘミンおよびバクテリアルシフェラーゼは Sigma 製、ホタルルシフェラーゼは Boehringer Mannheim 製、FMN は Calbiochem 製、リノール酸ナトリウム、NADH、ATP およびドデシルアルデヒドは東京化成工業製、過酸化水素は三菱ガス化学製をいずれもそのまま用いた。その他の試薬はいずれも試薬特級品を用いた。

極微弱化学発光測定装置 光電子計数方式を用いて試作した装置の全体のブロック図を Fig. 1 に示す。光電子増倍管 (E) は、ヘッドオン型の浜松テレビ製 HTV-R374 を用いた。測定に際しては直流安定化電源 (L)、Pacific Photometric Instrument 製の Negative High Voltage Power Supply Model 204、により -1300V を光電子増倍管に供給し、温度制御回路 (K) で制御された液体窒素 (H) の蒸発ガスにより光電面付近を -20° に冷却させ暗電流を減少させた。Table I. また冷却によって光電子増倍管の窓に霜がつくのを防ぐために、光電子増倍管のハウジング (F) 内をシリカゲルで乾燥させると共にハウジングの外側窓 (D) の側部にヒータ ($25\ \Omega$) を巻き温度制御回路 (J) より直流 $0.6\ \text{A}$ を流し約 5° に加熱した。なおヒータは石膏で埋めてヒータからの光放出を完全に防いだ。パルス増幅器 (M) は、NEC 製 $\mu\text{PC} 53\text{-A}$ 演算用 IC を用いて自作した。Gain は約 $30\ \text{dB}$ 、周波数帯域は約 $3\ \text{MHz}$ である。パルスカウンター (N) は松下電器製 VP-439 A を使用した。恒温槽 (B) は種々検討の結果、恒温炉方式のものをセルホルダーの形に作成して用いた。発光測定用セル (A) は石英製の円筒型 ($20\ \text{mm}\phi$) のものを用い、セルの底面より放出される光を測定するようにした。装置を取めた暗箱は暗室内におき、暗室の隣に準備室を設けて試料調製を行なった。準備室には試料の蛍光あるいはリン光の発生を避けるため、照明用として $5\ \text{Watt}$ の赤色ランプを用い、さらにアルミハクでおおって光量を減少させた。

実験方法 1. ルミノールの測定——ルミノールならびにヘミン溶液はいずれも $0.0125\ \text{M}$ 硼砂-カ性ソーダ緩衝液 (pH 10.5) に溶解して調製し、過酸化水素は2回蒸留水に希釈して用いた。ルミノール溶液 $0.5\ \text{ml}$ とヘミン溶液 ($0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) $0.1\ \text{ml}$ を混合したのち、過酸化水素水溶液 (0.3%) $0.01\ \text{ml}$ を加え発光強度を計測した。

2. ATP の測定——ホタルルシフェラーゼ $10\ \text{mg}$ を $0.01\ \text{M}$ MgSO_4 を含有する $0.01\ \text{M}$ リン酸緩衝液 (pH 7.3) $300\ \text{ml}$ に溶解し室温にて 30 分以上放置したのちこの $2.9\ \text{ml}$ を採り ATP 水溶液 $0.1\ \text{ml}$ を加えて測定した。

3. NADH の測定——バクテリアルシフェラーゼ $10\ \text{mg}$ を $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝液 (pH 7.0) $300\ \text{ml}$ に溶解しその $2.7\ \text{ml}$ を採り $10^{-4}\ \text{M}$ FMN 水溶液 $0.1\ \text{ml}$ 、 $2 \times 10^{-4}\ \text{M}$ ドデシルアルデヒド水溶液 $0.1\ \text{ml}$ ならびに NADH 水溶液 $0.1\ \text{ml}$ を順次加えて発光強度を測定した。

4. リノール酸の測定——リノール酸ナトリウムを $1/15\ \text{M}$ リン酸緩衝液 (pH 7.1) $30\ \text{ml}$ に溶解し発光強度を測定した。

Fig. 1. Diagram of Apparatus for Measurement of Extra-Weak Chemiluminescence

A; quartz cell, B; cell holder, C; shutter, D; quartz window, E; photomultiplier, F; housing for photomultiplier, G; pre-amplifier, H; liquid nitrogen, I, J, K; thermo-regulating circuit, L; negative high voltage source, M; pulse amplifier and discriminator, N; pulse counter, O; digital printer, P; D-A converter, and Q; pen recorder.

TABLE I. Effect of Photocathode Temperature on the Photomultiplier Dark Current

Photocathode temperature	Dark current (counts/10 sec) Av. $\pm$ S.D.
20°	4133 ± 488
-20°	253 ± 39

結 果

最適動作条件の検討

Fig. 2 は使用した光電子増倍管 HTV R-374 の微分波高分布曲線である。測定には東芝製 200 チャンネル波高分析器を用い、この波高チャンネル間の補正は、Philips 製 PM 5770 パルス発生器と日立製 V-1011 シンクロスコープを用いておこなった。なお本測定の場合に限り、パルス増幅器は用いず、プリアンプからの出力を直接波高分析器に入力させた。Fig. 2 において光電子パルスがある特別な波高値で極大を示す傾向は認められない。したがって信号：雑音比 (S/N) を最大にするような特定の波高域はなく、低波高のパルスまで計数することにより最も S/N 比を大きくできると考えられた。

検出感度

以上のように動作条件を定めた装置に実際に微弱光を入射させて S/N 比の入射光強度に対する依存性を求めた。試験用の光源には表示用の発光ダイオード（ピーク波長 6328 Å）を用いた。計数時間は 1 秒間としパルスカウンターの計数値を 100 回読み、その平均値および分散により S/N 比を求め、入射光強度は波長 6328 Å、光電面の量子効率 5% として計算した。結果を Fig. 3 に示す。ここで $S/N=1$ に外挿すると光電子パルス数約 15 cps を得る。この場合 S/N の実測は各入射光強度に対して計 100 秒間の計数時間であり、分散が大きいため S/N 比も低くなっているが、計数時間を 10 秒間にとれば、最小検出可能光電子数は $1/\sqrt{10}$ 倍すなわち 5 cps 程度の値となる。これを入射光電力に換算すると約 3×10^{-17} Watt になるが実際には光電子増倍管のハウジング窓の反射や弁別レベル以下の光電子パルスの数え落としなどのため見かけ上の量子効率はさらに低くなる。例えばこれを 1% とすると最小検出可能入射光電力は 6×10^{-16} Watt となる。

暗電流に対する恒温槽温度の影響

計数時間を 1 秒間にとって測定したときの暗電流パルス数の分布を Fig. 4 に示す。次にシャッターを閉じた状態で恒温槽温度を 20, 40 ならびに 60° と変化させたときの暗電流の様子を観察した。Table II にみられるように恒温槽温度の上昇とともに暗電流は増大する結果が得られた。恒温槽と光電子増倍管ハウジングとは直接接触させていないにもかかわらずこのような現象がおきたのは輻射により熱が伝わったためで、光電面の冷却温度をコントロールするサーミスタの設置位置を設計上光電面よりわずかに光電子増倍管のソケット方向にずら

Fig. 2. Differential Pulse Height Distribution of Photomultiplier Tube, HTV R-374, Supplied -1300 V., Cooling at -20°

●, dark pulse, ○, dark and signal pulse.

Fig. 3. Experimental Result of Signal-to-Noise Ratio as the Function of Optical Input Power (HTV R-374, Supplied -1300 V., Cooling at -20°, 6328 Å, Band Width; 3 MHz)

TABLE II. Effect of Cell Holder Temperature on the Photomultiplier Dark Current

Cell holder temperature	Dark current (counts/10 sec) Av. $\pm$ S.D.
20°	260 $\pm$ 43
40°	346 $\pm$ 40
60°	523 $\pm$ 48

トしてあるので外部からの背景光についてはほとんど問題はなかった。光電子増倍管の光シャッターを開き恒温槽温度を上昇させると光シャッターを閉じた場合に比べてさらにカウント数は大きく上昇したが、これは主として光シャッターの自動開閉用の配線が暗箱内に露出していたためで、市販のアルミニウム箱で露出部を覆うことによってほぼ完全に防ぐことができた。なお暗箱の内面は黒色に塗り、箱の接続部およびネジ穴部などはすべて黒色パテで埋めて外部からの光の入射を完全に遮断し恒温槽部と光電子増倍管のハウジング部はしきり板によって光の通過を遮断した。これらの措置によって光シャッター開閉による背景光のカウント数の差をほぼなくすることができた。

各発光反応の測定

1. **ルミノール** ルミノールはアルカリ性水溶液中でヘミンと過酸化水素の添加により発光し、発光強度は反応開始後 1—2 秒で極大に達し以後時間とともに急速に減衰した (Fig. 5)。反応開始後 1 分間の計数値をルミノール濃度に対してプロットしたものが Fig. 6 で発光強度とルミノール濃度との間には極めてよい直線関係が認められた。

2. **ATP** ホタルルシフェラーゼは緩衝液に溶解することにより発光が認められた。この発光は溶解後時間とともに減衰し 30 分以降はほぼ一定の発光強度になったのでこれをブランクカウントとし、その後 ATP を加えて発光測定をおこなった。ATP 添加後 10 秒間のカウント数からブランクカウント数を差し引いて ATP の濃度に対してプロットすると、Fig. 7 に示したように両者の間にはよい直線性が認められた。

Fig. 4. Distribution of Pulse Number of Dark Current in Photomultiplier, HTV R-374, Supplied -1300 V., Cooling at -20°

average dark count $\pm$ standard deviation; 32.7 ± 16.7 .

Fig. 5. Typical Chemiluminescence of Luminal Aqueous Solution (10^{-9} g/ml), pH 10.5, at 25°

Fig. 6. Correlation between Luminol Concentration and Chemiluminescence Intensity

Fig. 7. Correlation between ATP Concentration and Chemiluminescence Intensity in Firefly Luciferase System

Fig. 8. Correlation between NADH Concentration and Chemiluminescence Intensity in Bacterial Luciferase System

Fig. 9. Extra-Weak Chemiluminescence from 0.02 M Sodium Linolate Aqueous Solution, pH 7.1, at 40°

Fig. 10. Correlation between Concentration and Luminescence Intensity of Linolate Solution at 40°

Fig. 11. Temperature Dependence of Luminescence Intensity of 0.02 M Linolate Solution, pH 7.1

3. **NADH** バクテリアルシフェラーゼは溶解後、FMN およびドデシルアルデヒドの添加によりわずかに発光が認められたが、この発光も経時的に減衰し 1 時間以上放置することによりほぼ発光強度が一定となった。したがってこれをブランクカウントとし、その後に NADH を加えて発光を測定した。NADH 添加後 10 秒間のカウント数からブランクカウント数を差し引いて NADH の濃度に対してプロットしたのが Fig. 8 であり、両者の間には良い直線関係が得られた。

4. **リノール酸** 0.02M リノール酸溶液の 40° における発光の経時変化を Fig. 9 に示す。リノール酸は長時間にわたりほぼ一定の発光強度を示した。また発光強度とリノール酸濃度との間にもよい直線関係が認められた (Fig. 10)。次に試料を、20, 30, 40, 50, ならびに 60° の各温度に設定したときの発光強度を、それぞれ測定した結果を Fig. 11 に示した。発光強度の対数と絶対温度の逆数との間には直線関係が認められた。

考 察

紫外から近赤外にわたる微弱光の検出には現在のところ光電子増倍管がもっとも卓越している。したがって極微弱光の測定に際して光電子増倍管の選択は最も重要な問題であり、その使用に際しては観測する光の強度に対する動作特性の質的な変化を把握しておくことが不可欠である。これによって精度および安定性にすぐれた測定系を得ることができるものと考えられる。

次に極微弱光を測定する際、重大な障害となるのが雑音である。これには背景光による光電子パルスや負荷抵抗での熱雑音などもあるが最大の問題は光電子増倍管自体の暗電流すなわち入射光が存在しない場合においても観察される出力電流である。これは光電子増倍管を用いたすべての測定において直線性、安定性、測定精度および感度を決定する重要な因子となる。特にトリアルカリ光電陰極を有し受光面の比較的広い HTV R-374 は常温における暗電流が大きい。暗電流が生ずる原因には種々の因子が考えられるが支配的な要因は光電陰極面からの熱電子放出であり光電面の温度に依存している。したがって本装置では液体窒素の蒸発ガスにより -20° に冷却した。温度依存性は光電面材料により一様ではないが今回用いたトリアルカリ系では室温に比べて約 1/16 に暗電流を低下させることができた。温度を低下させても暗電流は残存するが、その一部は光電子増倍管のソケット部での漏洩電流や宇宙線などによるチェレンコフ効果などがその原因として考えられる。

ルミノールはアルカリ性水溶液中で過酸化水素と鉄触媒により発光する。⁵⁾ ルミノールの発光を測定する際、ヘミンと過酸化水素との反応によりルミノールの不在下において発光が認められ微量のルミノールの発光を測定する場合に大きな障害となった。これはヘミンの触媒作用によって過酸化水素が分解する際に生ずる活性酸素に由来する発光と考えられ過酸化水素およびヘミンの濃度、試薬や水の純度ならびに器具のよごれ具合によってカウント数が大きく変動した。種々予備検討の結果、試薬は最純品を用い、器具はアルカリ性洗浄剤にて十分に洗浄し、ヘミンおよび過酸化水素の濃度ならびに添加容量を前述の条件に設定することによりブランクのカウント数を最も低下させまたそのばらつきも減少させることができた。

Fig. 2 に示されているように発光測定によるルミノールの定量的な検出限界は 10^{-1} pg オーダーであった。 10^{-1} pg のルミノールは発光の量子収率を 1% とするとトータルで 8×10^6 個の光量子を放出する計算となる。

本装置の測定限界が 6×10^{-16} Watt であることを考えるとさらに数オーダー下のレベルのルミノール濃度が測定されるはずであるがこの場合測定限界は装置の性能よりもブランクの発光量により制約されるものと考えられる。今回得られたルミノールの定量限界は従来の発光測定による感度領域⁶⁾ をはるかに下まわるものであり今後種々の分野への応用が期待される。

ATP はホタルルシフェラーゼ系を用いて 0.1 pmol オーダー、またバクテリアルシフェラーゼ系により NADH が pmol オーダーで定量的に測定された。今回使用したホタルルシフェラーゼ系は市販のホタル発光器からの抽出物をそのまま用いており、そのため ATP を添加していない系においてもかなり強い発光が認められた。これはいわゆるブランク値として定量限界を制限する結果をもたらしており、さらに低濃度の ATP を測定するためにはルシフェラーゼの精製が必要と考えられる。

ルミノール (425 nm⁵⁾), ホタルルシフェラーゼ系 (562 nm⁷⁾) およびバクテリアルシフェラーゼ系 (492 nm⁷⁾)

6) 武者宗一郎, 伊蔵三夫, 日本化学雑誌, 77, 114 (1956).

7) R.K. Stevens, J.A. Hodgeson, *Anal. Chem.*, 45, 433 A (1973).

のように試料の発光波長があらかじめ判明している場合にはその波長に最大感度を有する光電子増倍管が選択できる。すなわち 400—500 nm の波長の光を測定する場合、光電子増倍管はバイアルカリ光電面を有するものの方が、量子効率もよく、暗電流も少ないため冷却せずに使用できることからはるかに有効であろう。本報では著者らの目的とする薬物の分解に伴う発光を測定するために、多種類の薬物試料を対照とするわけでその測定波長域も可及的に広くとっておく必要があるため、トリアルカリ光電面を有する HTV R—374 を用いたものである。

リノール酸は空气中で非常に酸化されやすい物質である。油脂類のいわゆる自動酸化は広く研究されており、次式のラジカル連鎖反応機構が知られている。⁸⁾

また生成した過酸化物 ROOH は金属触媒の存在下で $RO^{\cdot}$ 、 $OH^{\cdot}$ および $RO_2^{\cdot}$ などのフリーラジカルに分解されるといわれている。⁸⁾

本実験結果から明らかなようにこのようなラジカル連鎖反応は極微弱化学発光を伴いその発光強度は基質の濃度に依存している。

また、Fig. 11 においてみられたように各温度におけるリノール酸の発光強度の対数と絶対温度の逆数との間の直線関係の存在は、発光強度が反応速度に対応していることを示しているものと考えられる。

このようなラジカル連鎖反応機構は一般の有機化合物の自動分解反応においても何らかの形で関与しているものと考えられる。したがって種々の薬物においてもその自動分解に伴って発光の存在することが当然予想され、その発光を定量的に測定することにより薬剤の安定性を評価することができるようになるものと考えられる。

謝辞 本研究に際し、種々御指導、御助言を賜った東北大学電子通信研究所 稲場文男教授に深謝致します。

8) N. Uri, "Autoxidation and Antioxidants," Vol. 1, ed. by W.O. Lundberg, Interscience Publishers, New York, 1961, p. 55.