

生物発光, 化学発光を用いたバイオ計測技術に関する調査研究

丹羽 一樹*

(平成18年12月18日受理)

A survey on bio-measurement technology using bioluminescence and chemiluminescence

Kazuki NIWA

1. 緒言

病気や健康の指標になる生体関連物質（内分泌物質、抗体、ウイルス、DNAなど）の計測や環境汚染物質（農薬、重金属、ダイオキシン、内分泌攪乱物質など）の計測は我々の生活を安全・安心なものとするために欠く事のできない先端科学技術産業となっている。測定すべき物質の種類は膨大であり、測定できる物質も研究の進展に伴い現在でも増加している。また検出感度が向上し、より微量な物質を分析できるようになった。そしてHTP（High-Throughput, 高速多検体処理）、あるいはPOCT（Point-of-Care Testing, 作業現場で瞬時に分析する技術）などの簡易迅速計測が開発された。その結果、一方では分析が自動化され大規模化し、また一方では簡易分析キットの普及により誰もが手軽に分析をできるようになってきた。さらに計測を前提とした法律（環境、衛生関連の法規制など）が制定されるなど、市場規模は拡大しており今後の需要増加が見込まれている。

微量物質の簡易迅速分析技術の原理としては、微弱な光を検出する技術がコアとなっているものが数多く見られる。即ち、化学発光・生物発光・蛍光のような光を発する現象を用いることで、微量な測定対象物の量を光量に変換し、それを測定する。実際に、光検出デバイスを搭載した多くの分析機器が作られている。

しかしながら現在市販されている分析機器での直接の測定値はRLU (relative light unit) という物理的には意味の無い単位でしか表示されない。更に装置ごとの互換性がない。また検出器に温度依存性などの不安定性要因があることも知られている。現状ではこれらの問題を回避するために標準物質を用いて検量線を作成することが多

い。また定量性を必要としない白黒判定的な方法が使われることも多い。

一方で、発光量を物理的に意味のある量として測定すること（絶対光量測定）は煩雑な校正作業を伴うものの、決して不可能なことではない。筆者らはこれまで、ホテルの生物発光反応の量子収率を測定することを目的とし、絶対発光量測定を行ってきた。その中で発光量を物理的に意味のある量、すなわち光子（フォトン）の個数を測定する装置を開発してきた。これを通して発光量測定における不確かさ要因を明らかにしつつある。現在はSIトレーサブルな測定技術の確立をめざしている。

本稿では発光・蛍光のような微弱光の測定に関して、その応用技術の現状やその市場規模を概観し、計測標準整備の技術的問題点や可能性、および必要性について調査を行った。本報告では調査結果をもとに、「発光量測定の標準化」による「技術信頼性の向上」を通して「発光応用技術産業」の進展を推進することの意義をまとめた。

2. 現状と課題

2.1 発光量測定を原理としたバイオ計測

発光反応は化学分析において非常に有効なツールである。その理由は反応の特異性にある。必要な物質がそろったときにだけ発光するため、バックグラウンドが低く検出感度が高い測定が実現できる。「原理的には発光反応に必要な因子は全て分析の対象になりうる」と言われており、このことは発光反応を応用するときの基本と言える。発光反応に必要な因子のうちの1つが、他の因子よりも十分に少ない場合、発光量はその少ない因子の量に比例する。そのため分析の対象物質を発光反応に必要な因子に変換することができれば、物質量を発光量として測定できる。

現在もっとも重要な応用例は臨床検査である。健康や

* セルエンジニアリング研究部門
(計測標準研究部門 有機分析科兼務)

病気の指標となる生体物質の分析は医療診断の根幹となっている。臨床検査試薬の市場規模は年間3200億円であり、検査装置については400億円とされている¹⁾。

臨床検査項目をその分析原理で分類したのが図1である²⁾。全項目数の半分以上が、蛍光・発光を最終シグナルとして検出する方法である。発光反応の検出感度の良さを活用し、微量な対象物質をイムノアッセイ（抗原抗体反応を用いた特異的検出方法）で測定するときに用いられることが多い（表1）。

環境計測分野での応用も広がっている。環境省によると環境ビジネスの市場規模は年間数十兆円で現在も成長を続けている。このうち測定・分析関連の市場は約3000億円であるが³⁾、その中で発光測定技術は簡易迅速法としての活用が期待されている。例えば発光量測定によるバイオアッセイ法をダイオキシン類の簡易迅速測定法とすべく、関係法令を整備している（表2）。その背景として、従来の高分解能GC/MSによる測定が高価で時間がかかる（1検体あたり10~20日、10~20万円）ために、廃棄物処理業者の負担が大きく、測定義務（年1回以上測定）が十分に果たされていないという事実がある。そこで簡易迅速法を導入することで事業者の負担を軽減し、きめの細かい汚染モニタリングを目指している。測定方法については現在、JIS規格制定のための作業が行われている。

また、発光細菌を土壌汚染計測に応用する技術が実用化されつつある。土壌中の汚染物質によって発光細菌がダメージを受け、それにより減少する発光量をモニタリングするというものである。天然の細菌を用いるため環境にやさしく、汚染物質の種類によらず汚染を検出でき、汚染除去工事現場での簡易迅速分

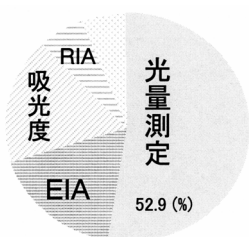
析が可能であるなどのメリットがある。土壌汚染浄化に関わる計測・分析市場は530億円であり、今後の市場開拓が見込まれている⁴⁾。

食品工場やレストランなどでの衛生管理ではATP法として発光測定が既に活用されている。これはホテルの生物発光反応がアデノシン三リン酸（ATP）を必須因子としていることを応用している。ATPは食品産業で問題となる細菌類を含め全ての生物の細胞内エネルギー源であるため、製品や厨房での細菌や清浄度検査に用いられている。ATP法は簡易迅速法としての位置付け（食品衛生検査指針）であり、確定診断としての従来法（寒天培養法など）を補完するものとして、年間約15億円の市場規模を有している。同法は、化粧品や医薬品など、細菌汚染が問題となりうる製品の無菌試験にも活用されている。本法に関しては業界団体と専門家が主体となって「ATP・迅速検査研究会」を組織し、公定法化を目指して活動している⁵⁾。

その他にも研究開発段階ではあるが、一塩基置換(SNPS、罹患率や薬効の個人差の指標になる遺伝子レベルでの個人差)を簡便に検査するパイロシークエンス法にもホテル生物発光反応が応用されている⁶⁾。

以上のように化学発光・生物発光は微量物質の簡易迅速測定・分析に広く応用されており、その市場規模も大きく、今後の成長が見込まれている。

更に海外ではわが国以上に、簡易迅速法による計測技術に注目が集まっている。欧米では“due diligence（適正な配慮、評価）”と言う考え方が浸透していて、特に企業買収や訴訟問題対策として「安全性に対してできる限りの努力はしていた」ことを示さなくてはならないという社会背景がある。そのため、簡易迅速法によるきめの細



「先端バイオ技術を利用した医用分析機器実用化の課題と将来展望に関する調査報告書（平成16年3月(社)日本機械工業連合会、(社)日本分析機器工業会）」より

光量測定	52.9 (%)
化学発光免疫測定法	38.4
電気化学発光免疫測定法	9.6
蛍光免疫測定法	4.7
生物発光免疫測定法	0.2
光量 or 吸光度測定 (酵素免疫測定法)	15.8
吸光度測定	17.9
ラテックス免疫測定法	10.2
免疫比濁測定法	4.8
粒子凝集法	2.9
ラジオイムノアッセイ法	6.2
その他	7.3
(フリーラジカル免疫測定法、IM/クロマトグラフィ、HPLC法、DNA検査など)	

図1 臨床検査における測定方法の内訳。半数以上が発光・蛍光などの光を測定している。

表1 発光法による臨床検査項目の代表例。生体内の微量物質の検査が多く含まれている。

甲状腺関連	遊離トリヨードサイロニン(FT3)，遊離サイロキシシン(FT4)，トリヨードサイロニン(T3)，総サイロキシシン(T4)，サイログロブリン(Tg)，サイロキシシン結合グロブリン(TBG)，抗サイログロブリン抗体(Tg-Ab)，甲状腺刺激ホルモン(TSH)，抗甲状腺ペルオキシターゼ抗体(TPO-Ab)
副腎 / 下垂体関連	副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)，コルチゾール，成長ホルモン(GH)
心臓(循環器)疾患関連	総ホモシステイン
腫瘍マーカー	α フェトプロテイン(AFP)，癌胎児性(CEA)，CA19-9，CA125，CA15-3，シフラ，PIVKA-II
骨疾患関連	前立腺酸性フォスファターゼ(PAP)，前立腺特異抗原(PSA)， γ -セミノプロテイン(γ -Sm)
糖尿病関連	インスリン(IRI)，C-ペプチド(CPR)，サイトカイン，可溶性IL-2レセプター(sIL-2R)，インターロイキン-6(IL-6)
アレルギー関連	非特異的IgE，特異的IgE，好酸球塩基性蛋白(ECP)
血中薬物	テオフィリン(気管支拡張剤)
その他	フェノバルビタール(抗てんかん剤)，バンコマイシン，ペプシノゲンI，ペプシノゲンII，フェリチン，ヘリコバクターピロリ抗体

表2 環境省より告示されたダイオキシン類のバイオアッセイ法。簡易法として、発光を最終シグナルとするこれらバイオアッセイ法が示されている。

告示法名称	バイオアッセイの種類	前処理方法	測定に用いる細胞あるいは抗体
第1の1	レポータージーンアッセイ	硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラム	マウス由来組換え細胞(H1L6、1c2)
第1の2	レポータージーンアッセイ	硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラム	ヒト由来組換え細胞(101L)
第1の3	レポータージーンアッセイ	多層カラム	マウス由来組換え細胞(HeB5)
第1の4	イムノアッセイ	多層シリカゲルカラム及びカーボンカラム	抗ダイオキシン類モノクローナル抗体(5-F酵素抗体免疫法)

かいスクリーニングを企業が自主的に導入し始めている。また発展途上国では経済的事情から簡易迅速法が目目されている。

2.2 発光量測定機器の現状

現在、市場が拡大傾向にある簡易迅速分析であるが、化学発光・生物発光を応用した技術の場合、そのコアと言えるのが発光量を検出する装置(ルミノメーター)である。簡易迅速分析の利点は多検体自動処理なので、ルミノメーターは自動分析装置の中に組み込まれていることもある。

発光量測定で使われるルミノメーターの大部分が検出デバイスとして光電子増倍管(PMT)を使用している。PMTは日本の浜松ホトニクス社が世界シェアの60%を占めており、わが国が世界をリードしている分野である。現在のところ、発光量の絶対値(エネルギー量Wあるいは光子数)を測定するためのルミノメーターはほとんど存在しない。通常はPMTから出力される電気シグナルが測定値として表示され、RLU(relative light unit)が単位として用いられる。化学発光、生物発光に関する学術論文においても、一般にRLUで標記されている。

PMTの測定モードに“フォトンカウントモード”というものがあるが、必ずしも光子数を計測しているわけ

はない。光子が検出面に衝突したとき、光電効果によって生じるパルス電流をカウントしているためにこう呼ばれている。しかし、光電効果の効率が求められていないため、受容した光子数がそのままパルス電流の数とはならない。

絶対光量の測定が困難な理由は主に二つある。

一つめは波長依存性の問題である。PMTの感度には製品ごとに波長依存性があり、光子の波長、すなわちエネルギーごとに検出面(光電面)で光電効果が起こる効率が異なる。

この問題は発光測定結果の比較を行うときに重要な問題を引き起こす。例えば図2に異なるスペクトルの発光反応溶液の発光量を複数の装置で測定した場合の実験例を示す。二つの発光液の発光量がある装置では同等であるという結果が出ても、別の装置では3倍の発光量の差があるという結果が出ている。

このように、検出デバイスの波長感度依存性の問題は、実験結果の解釈に重大なミスリーディングを起こす可能性がある。波長感度依存性はPMT以外の検出器(CCD、フォトダイオード等)にも存在する。

以上は検出デバイスの問題であるが、もう1つ大きな問題がある。溶液からの集光効率の問題である。簡易迅速分析において測定するのは溶液からの発光であるが、

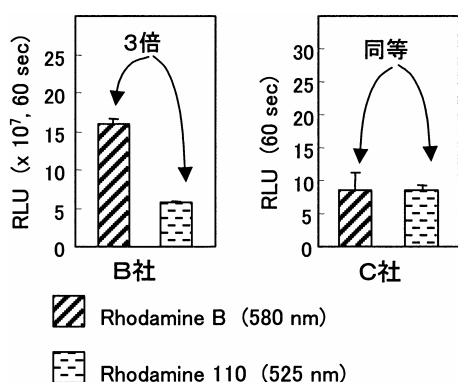


図2 発光色の異なる化学発光溶液の測定例. 過シュウ酸エステル化学発光系の発光色は加えた蛍光色素（ここではRhodamine）によって決まる. 発光色の異なる二つの反応液の発光強度を異なる二つのルミノメーターで同時に測定した. 反応液の組成, 条件は全く同じである. 装置によって相対感度が異なることがわかる.

溶液からの光は溶液表面や容器の器壁を通過するときに反射, 吸収, 屈折し, 検出器に到達するまでに乱反射, 迷光が起こる. そのため集光効率（発光が検出器に到達する効率）を決定することは難しい.

また, 発光溶液は測定用セルに入っているが, ディスパーザブルなプラスチック製品の場合製品が均質ではなく, これが再現性低下の要因となっている. CVで最大5%程度のバラツキのある製品がある. 更に容器の型番, 材質が変わると測定値は数倍の変化を示す.

集光効率の決定が難しいということは, 安定な光源を標準として校正することができないということでもある. 容器の中の液体全体が光る状態を, 電球やLEDのような個体の光源で実現することは不可能だからである.

「電源を入れてから30分後から測定が可能」という使用上の注意がよく見られるが, これは装置の安定性の問題を示唆している. 具体的には主に検出器あるいは光源ランプなどのデバイスが温度依存性を示すためである. PMTは真空管であるが, 一つひとつ手作りされており, 同じ型番であっても製品間の感度差が20%にも及ぶ. 更に真空度の低下による感度の変化という問題も指摘されている.

以上まとめると, 簡易迅速分析を支える発光測定装置は相対値測定しかできず, その結果装置ごとの互換性がなく, 安定性に対する信頼も決して高くないのが現状と言える. 技術的煩雑さからか, 集光効率を決定している測定装置は市販されていない.

このような現状にもかかわらず, 化学発光反応の感度の良さ, 特異性の高さ, 操作の簡便さから産業応用は進んでいる. しかしながら発光測定の信頼に関する問題を

回避するために, 計測のたびに検量線を作成しなくてはならない.

しかし検量線を作成するための標準物質が準備できない場合もある. 活性酸素と病気の間には有為な相関があることが数多く報告されているにも関わらず臨床検査に応用されていないのは, 活性酸素種の定量分析技術が確立していないためである. 現状では, リファレンスとして健常者の検体を同時に測定する必要がある. 絶対光量をルミノメーターで測定できれば, 活性酸素量によって化学発光する試薬の臨床検査応用が加速するものと考えられており, そのような測定装置・方法の開発, 整備が望まれている.

発光測定に関しては多くの問題は残されているが, それらの解決は不可能なことではない. 集光効率を決定して発光量の絶対値を測定することは可能である. 更にSIトレーサブルな計測を行うことも可能である. 絶対値測定技術の開発と, その普及のための標準開発は, 発光測定技術の信頼性向上, ひいては簡易迅速測定技術全体の信頼性向上に繋がると考えられる.

具体的には, 分析試薬としての化学・生物発光物質の特性や, 発光計測機器の性能を公正に評価できる. また, 機器や試薬などの性能や品質を管理しやすくなる. 更に, 化学・生物発光を基礎研究の段階から絶対値で評価できるようになる, などの効果が期待できる.

更に蛍光物質は励起光を照射したときに光を放出する物質で, これも分析マーカーとして多用される. 蛍光物質の定量的計測には, 基礎として発光量の測定が必要であり, 更に励起光の照射効率も定量的に計測しなくてはならない. そのため発光計測の標準開発は蛍光物質の物性評価にもつながる.

2.3 関連する先行技術

発光量測定に関するデータの互換性や, 再現性の確保に対するユーザーの要請は年々高まっている. 既に英国のLUX biotechnology社は封入型液体シンチレーターを測定装置の日差変動校正用に販売している. この製品は発光量の絶対値がNPLにトレーサブルな全光束 (lm, ルーメン) で保証されており, 信頼性の確保に重要な役割を担っている. しかしながらこの製品で保証されているのは光源としての発光量である. 集光効率は測定装置に依存するので, 測定装置全体の絶対感度を校正することはできない.

Berthold Detection Systems社はLEDを用いた安定光源を販売しているが, 絶対値は不明である. 同社製品間の互換性確保のために用いるのが目的なので, 絶対値を計

測する必要はなく，また発光量の絶対値を知りたいユーザーは多くないというのがその理由である。

しかしながら絶対値が明示されていないために汎用性には限界がある。何らかの形でSI単位系すなわち国家標準にトレーサブルな計測標準の整備は，相対測定においても信頼性の向上，汎用性などの観点で有用であると考えられる。

わが国では光の測定に関して，JCSS校正および依頼試験制度による校正が産業技術研究所計量標準総合センター（NMIJ）で行われている。このうち，発光量測定に関連するものとしては分光応答度校正サービスがある。これはNMIJの光放射標準研究室により供給されている絶対分光応答度標準（極低温放射計と複数のレーザーによって得られる）によってフォトダイオードの絶対感度を波長ごとに値付けするサービスである。絶対感度を校正したフォトダイオードを利用することで，国家標準にトレーサブルな発光測定装置を構築できる。

しかしながら，検出帯域の違いがある。発光量測定で検出する光量は 10^{-10} から 10^{-15} Wである。これに対し，分光応答度の校正に用いる光源は 10^{-5} から 10^{-8} W程度である。SIトレーサブルな発光測定技術を開発するためには検出器の直線性を確かめつつ，絶対分光応答度標準から正確に感度の値付けをする必要がある。これは同時に，微弱な光測定という新しい標準の開発に繋がるものであると言える。

全ての発光波長に関してSIトレーサブルな絶対感度校正をできるようにになれば，蛍光光度計など，他の多くの計測機器の校正をSIトレーサブルにすることができる。

2.4 国際動向

2006年の1月に“Biophotonic Tools for Cell and Tissue Diagnostics”と題して，また9月に“Imaging as Biomarker: Standards for Change Measurements in Therapy”と題してU.S. Measurement Systemのワークショップが開催された。バイオ分野における光計測，イメージングの標準化に向けた米国の動きと言える。例えばPETのようなバイオイメージングなどは既に医療応用が進んでいる。ところが，診断に用いる際に定量性や基準がないことが問題となっている。生体からの微弱な光シグナル測定を標準化するニーズ，動きがあるということを示している。

またCCQM，BAWGにおいて蛍光測定の技術的不確かさに関するパイロットスタディーの提案がドイツ及び英国の計量研究所から出されたという経緯がある。このときは標準物質供給というCCQMの範疇に合う形でELISA法による定量分析に関するパイロットスタディーが行わ

れることとなったため，蛍光測定の技術的不確かさに対応するためのものではなくなった。発光の正確な測定は蛍光測定の基礎と言える。蛍光測定も含めて，発光測定の不確かさは既に広く認識されていると言える。

以上のように，国際的にも発光測定の信頼性向上に資する標準整備の要請は高まっていると言える。

3. 発光測定の標準整備

3.1 発光測定における標準化の概念

発光測定の信頼性向上のためにどのような標準化ができるのだろうか。現状では，以下の3つの問題がある。

- ・相対値測定しかできない。
- ・繰り返し性を保証するための校正ツールが普及していない。
- ・再現性・互換性（装置間，試薬間）が保証されていない。

これらの問題を解決するためには，測定装置を何らかの標準で校正できるようにすればよい。そのためには次の3つを整備する必要がある（図3）。

①校正用標準

まず，検出器の精度を校正するためのデバイスが有効である。すなわち，発光量（あるいはその変動）が明確な光源（LEDや封入型液体シンチレーターなど）を用いて検出器を校正することで日差変動などに対する精度が保証できる。実際にいくつかの海外メーカーはこのような安定光源を販売している。しかしながら安定光源の精度を検証する必要がある，そのための安定な検出器も必要となる。

英国のLUX社は絶対光度（全光束）が国家標準にトレーサブルな封入型液体シンチレーターを販売している。この例からもわかるように，相対感度を測定する装置の

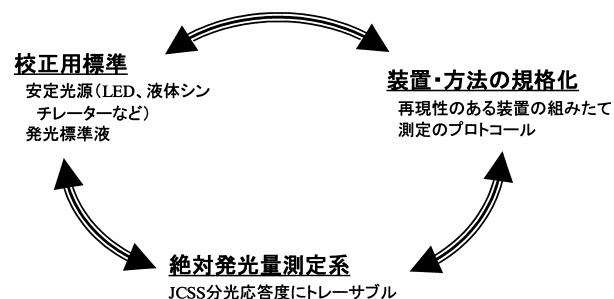


図3 発光測定標準化の概念。校正用標準（光源と発光溶液）が必要であるが，これらを国家標準トレーサブルにするための測定系，更には測定装置・方法の規格化も必要である。これらの3つは相互に連携しながら整備されなくてはならない。

ためであっても、その校正は絶対発光量で評価することが有効であると言える。

以上のように安定光源があれば検出デバイスの日差変動の校正ができる。しかし集光効率まで含めた校正を行わなくては、装置全体の精度は保証できない。特に発光反応は溶液中で起こるため、全ての反応容器に対応できる液体の発光標準が望ましい。

そこで安定光源の他に、絶対発光量が明らかな発光標準溶液の開発が必要である。これを用いることで反応容器を含めた装置全体の検出感度（集光効率を含む）を校正できる。絶対発光量の値付けは、SIにトレーサブルであることが理想的である。

②絶対発光量測定系

標準発光溶液の普及には発光量の絶対値測定が大前提となる。その操作の煩雑さのためかあまり多くの報告例はないが、不可能ではない。具体的な方法は後述する。

絶対発光量測定装置はJCSS校正サービスを利用することで国家標準にトレーサブルになる。

絶対発光量測定装置の精確さを向上し、発光反応溶液の再現性を確保することで、信頼性の高い標準の開発が可能になると考えられる。測定装置の詳細については次の節で概説する。

③装置・方法の規格化

最後に、発光測定装置と測定方法の規格化が必要となる。共通の測定方法により同じ測定結果が表示されるように測定装置の規格を決める。これにより装置、試薬、作業間の再現性が確保できる。

国際的に受け入れられ易い規格にするためには、測定結果がSIトレーサブルな物理量で表示されることが望ましい。具体的には、フォトン数での表示が理想である。熱量単位（W, Jなど）の場合フォトンの波長によってエネルギー量が異なるため、発光反応を量論的に取り扱うには向いていない。

装置の繰り返し性は安定光源を用いて校正する。ただしこれだけでは検出デバイスの繰り返し性しか保証できない。測定用のセルの型やロットが変わると集光効率が変わり、装置全体としての感度も変わってしまう。そこで装置の検出器以外の部分を校正するために発光標準溶液を用いる。以上の操作により、発光測定の信頼性は各段に向上する。

3.2 発光量絶対測定装置

前節で述べた標準化の取り組みにおいて重要となるのが絶対発光量測定である。

発光量絶対測定は1960年代から1980年代初頭にかけて

盛んに行われた⁷⁾。目的は生物発光、化学発光の発光量子収率を測定するためである。しかし当時の測定法は非常に煩雑であり、再現実験による検証はあまり行われていない。現在では当時の測定結果が2次標準のように扱われており（例えばルミノール反応の量子収率1.2%）、他の発光反応の量子収率測定時にレファレンスとして使用されている⁸⁾。しかしながらスペクトルの同時測定が行われていないために、波長の異なる発光系を直接比較することはできないので、発光スペクトルと検出器波長感度特性による補正が必要になる。

筆者らは、ホテルの生物発光量子収率を測定する目的でスペクトルを同時に測定できる装置を使用している⁹⁾。また、校正方法についても再検討を行い、より精確かつ簡便な方法を検討した¹⁰⁾。

まず、検出器絶対感度の校正方法であるが、過去の文献の方法は標準ランプ（全積分光量または放射波長分布が既知）とサーモパイル（光を熱に変換してその熱を測定するため広い波長範囲で使用できる）を用いるものであった。初めに標準ランプによってサーモパイルの絶対感度校正を行う。次にこれをワーキングスタンダードとして、単色光（白色光源からプリズム分光器などを用いて取り出す）でPMTの絶対波長感度を決定する。光源の強度はNDフィルターを用いて調整する。

筆者らが使用している装置（図4）は、検出器にCCDを使用している。またスペクトルを同時に測定するために回折光子を用いた分光器を使用した。分光器を通過した発光は波長で分離され、CCD面に結像する。絶対感度はパワーメーター（フォトダイオード）を使って校正を行った。光源としてはレーザーを用いた。レーザーは4種類を用いたが単波長なのでその間の絶対感度は白色光源を利用してつないだ。

フォトダイオードの絶対感度をJCSS校正サービスによってNMIJの絶対分光応答度標準（極低温放射計と複数の

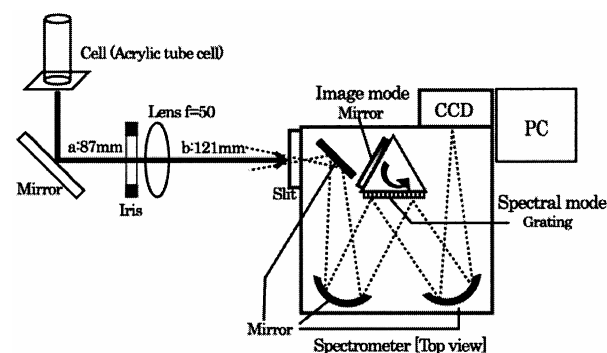


図4 絶対発光量測定装置の概略。

レーザーを用いて得られる) から移すことで国家標準にトレーサブルな検出装置になる。

溶液発光の集光効率の求め方であるが, 過去の文献では球状の容器を用いて点光源近似を行っているものが多い。しかし完全に閉じた球ではないため, 点光源近似の信頼性, 不確かさを見積もる事は難しい。

我々は, 集光効率を厳密に計算できる参照用プレートセルを作成した(図5)。セルは, 2枚の薄い平行ガラス平板の間の厚み0.5 mmの隙間に発光溶液を挟むような形状になっている。その片面には直径4.5 mmの円形の窓を開けた黒色板をおき, 体積 $(4.5/2)^2\pi \times 0.5 = 8.0 \mu\text{l}$ の溶液からの発光を観測できるようにしておく。屈折のために, 溶液内の $\text{NA}_i = \sin \theta_i$ に対応する立体角内の発光が, 外部の $\text{NA} = \sin \theta$ の光学系で集光される。ただし, $\sin \theta_i = \sin \theta / n_i$ である。このため, 集光効率は $\eta_{\text{cell}} = [1 - (1 - (\text{NA}/n_i)^2)^{1/2}] / 2$ となる。発光強度がほとんど変化しない発光溶液(東洋ビーネット社, ピッカジーン™)を用いて, 参照用プレートセルと実際に測定に用いるセルとの集光効率の比を求めることで, あらゆる種類の測定セルの集光効率を決定できる。

また, ホタルの発光反応の量子収率を測定した結果, 測定値のバラツキはCV3%程度であった。ピペッティング操作などのハンドリングエラーを含めてのバラツキであり, この結果は再現性の高い発光標準溶液開発の可能性を示していると言える。今後は量子収率に影響を与える因子を調べることで, 精度(再現性, 繰り返し性)の高い標準を開発できると考えられる。

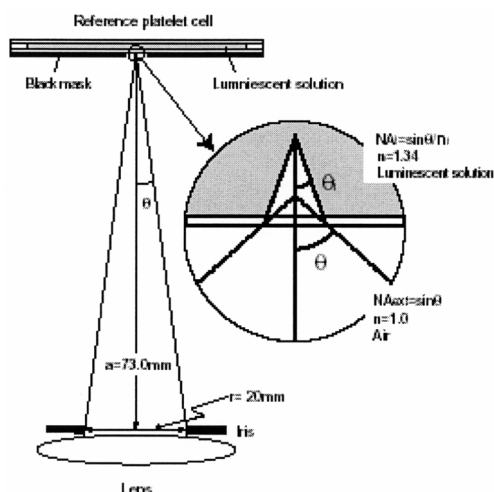


図5 集光効率校正用参照セル。集光の幾何学的因子 η_{cell} を計算することができる。

4. 今後の展望

発光測定における標準開発の方向性を明らかにすることができた。今後は標準開発を通して発光測定の信頼性を向上させ, 簡易迅速分析技術の信頼性の向上, ひいては分析産業の振興につなげていけたらと考えている。

また, 標準化の取り組みは生産者やユーザーからの意見が重要になるため, 産官学が協力することが望ましい。これまでに浜松ホトニクス株式会社, 日本電子株式会社, 日立化成工業株式会社, 東京大学, 長崎大学, 昭和大学などと協力して「発光蛍光測定標準化検討会」を開催し, ニーズや技術開発要素などについて検討を行っており, 発光量測定をコアにした産業の国際競争力強化を目指している。

産官学の協力体制のもと, 発光測定の標準化を推進していきたい。

参考文献

- 1) 富士経済: 2005臨床検査 (2005)
- 2) 社団法人日本機会工業連合会, 社団法人日本分析機器工業会: 先端バイオ技術を利用した医用分析機器実用化の課題と将来展望に関する調査報告書 (2004) 47-58.
- 3) 環境省: わが国の環境ビジネスの市場規模及び雇用規模の現状と将来予測についての推計について (2003).
- 4) 富士経済: 2004 土壌浄化修復・サービス市場の現状分析と将来展望 (2004年).
- 5) 月刊HACCP編集, 伊藤武, ATPふき取り検査研究会 監: ATPふき取り検査 (2002)年.
- 6) L. Bonetta: G genome sequencing in the fast lane, Nature Methods 3 (2006) 141-147.
- 7) D.J. O'Kane et al.: Purification of Bacterial Luciferase by HPLC, Meth. Enzymol. 305 (2000) 89-98.
- 8) D.J. O'Kane et al.: Absolute Calibration of Luminometers with Low-Level Light Standard, Meth. Enzymol. 305 (2000) 89-98.
- 9) Y. Ando et al.: Bioluminescence quantum-yield measurements with modern semiconductor photodetectors, Recent Progress of Bio/Chemiluminescence and its Applications to Photosynthesis (Research Signpost, Kerala, India, 2005) 79-100.
- 10) 秋山英文, 他: 溶液発光の定量測定—ホタルの発光量子収率—, 分光研究, 54巻5号 (2005) 309-310.