

ポータブル蛍光光度計FC-1

「もっと気軽に蛍光測定」を目指して

熊谷 直也, 加藤 祐史

1 はじめに

近年、屋外や実験室以外の場所で実施できる分析装置の需要が高まっている。従来、実験室で行うような分析をその場で実施できれば、現場で採取した新鮮な試料を計測できるため、試料の搬送時に生じる可能性のあるコンタミネーションの影響無く測定を行うことができる。また、すぐに測定を実施できることから結果を迅速に取得できる。このようなその場分析を実現するには、容易に持ち運ぶことのできるポータブルな分析装置を開発することが求められる。分析装置をダウンサイズ化するために、様々な工夫がなされ¹⁾、特に最近では、ものづくり技術の発展により装置自体のダウンサイズ化は可能になってきている。その一方で、測定感度の観点からすると、小型装置はまだ大型装置に十分に匹敵しているとはいえない。例えば、吸光光度計は、測定原理がシンプルでダウンサイズ化は容易であるものの、MEMS グレーティング²⁾などを機器に搭載すると、波長分解能が低下し正確な測定が難しくなる。現在、現場で小型装置により測定されている目的物質の多くは、定性および半定量分析により計測されているものが多く、高感度が必要な測定対象の計測は、小型装置の検出感度不足により計測できない可能性がある。このように、装置のダウンサイズ化と高感度化の両立は課題として残されてきた。

光学的検出法の中でも、蛍光法は、吸光度と比較して 10^3 倍程度感度が高いことが知られており³⁾、より低濃度の測定対象物質（生体試料中バイオマーカーなど）を計測するために適した検出法である。しかし、蛍光検出装置は、数多くの光学・電子部品から構成されており、大型かつ高価で、実験室の卓上など設置して使用することが一般的である。より手軽に、どこにでも持ち運べ、好きなタイミングで測りたい物質を高感度かつ容易に測る、そのような「都合の良い」蛍光光度計があれば、感度の問題でこれまでその場計測することが難しかった測定対象物質が計測できるようになり、オンサイト分析に新たな活路を見いだせるはずである。

筆者ら東海光学株は、メガネレンズの製造販売や、光学薄膜加工および光学薄膜製品の製造販売を本業として

おり、光学フィルターの設計・製造も行っている。本稿では、光学薄膜製品開発技術を活用し、持ち運んで手軽に蛍光測定できる「ポータブル蛍光光度計 FC-1」を開発したので、これを紹介する⁴⁾。また、本装置のアプリケーションとして、C 反応性タンパク（CRP）およびグルコースの定量への応用について述べる。

2 ポータブル蛍光光度計 FC-1

2-1 装置の特徴

弊社で販売しているポータブル蛍光光度計 FC-1（図 1 a）は、サイズが 130 mm×140 mm×62 mm、質量は

(a)



(b)

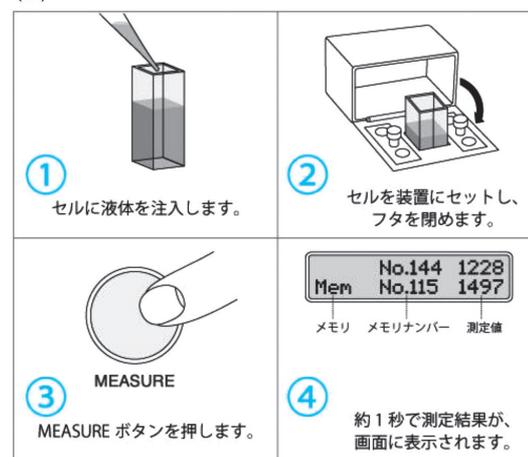


図 1 ポータブル蛍光光度計 FC-1

(a) 外観写真, (b) 操作方法.

600 g であり、バッテリー駆動（単三乾電池 2 本）であるため、屋外などに容易に持ち運んで測定できる。測定には、市販されているプラスチック製キュベットなど、標準的な角型キュベット（12.5 mm 角、光路長 1 cm）を使用可能である。測定は、1) キュベット内に試料を入れる、2) キュベットを装置にセットして蓋を閉める、3) MEASURE ボタンを押す、という操作で簡単に取り扱うことができ（図 1 b）、ボタンを押してから約 1 秒で測定結果（メモリナンバーや測定値）が表示される。簡便かつ迅速な測定が可能であるため、多量のサンプルの測定にも対応できる。また、装置に約 1000 測定分のデータを保存可能である。

FC-1 の装置構成は、蛍光測定の原理そのものを簡易に実現できる極めてシンプルなものとなっており、励起光源と光検出器はキュベットに対して垂直に配置されている。測定対象の蛍光物質を含む試料溶液を入れたキュベットをセットして MEASURE ボタンを押すと、LED 光源から励起光がキュベット内の溶液に照射され、蛍光が生じる。この光を、蛍光フィルターを介して受光素子で検出することで、受光素子方向に散乱・反射した励起光をカットし、蛍光の光のみが検出される。蛍光フィルターは交換可能であり、測定対象物質の特性に合わせて蛍光光度計をカスタマイズできる。蛍光フィルターブロックを保有していれば、ユーザーの手でブロックの交換により蛍光波長を変更できるため、装置を弊社に送ることなく、用途に合わせて手軽にその場で検出波長を変えることができる。

2.2 性能

蛍光物質であるレゾルフィンモデルとして、FC-1 の分析性能（検出感度、再現性など）を評価した。レゾルフィンを検出するにあたり、レゾルフィンの光学特性に適した LED 光源および光学フィルターを装置に搭載した。0.14 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH

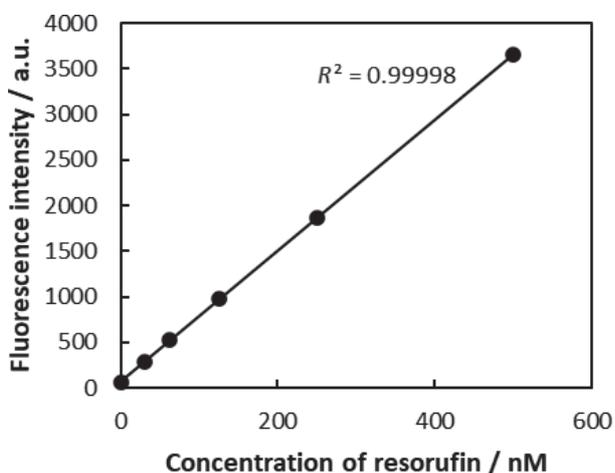


図 2 レゾルフィンの検量線

8.0) を用いて調製した種々の濃度のレゾルフィン溶液を、ディスポーザブルキュベットに入れて蛍光を測定した。得られた蛍光強度をレゾルフィン濃度 (0~500 nM) に対してプロットして作成した検量線は、 $R^2=0.99998$ の良好な直線性を示した（図 2）。また、ブランクの標準偏差を用いて算出した検出限界 (3σ) および標準偏差 ($n=4$) は、242 pM および 2.1 % 以下と見積もられた。卓上型マイクロプレートリーダーを用いてレゾルフィンの蛍光を測定した既報⁵⁾の結果と比較して、開発したポータブル蛍光光度計 FC-1 は、約 250 倍も検出感度が高いことが明らかになった。この結果から、FC-1 が、簡素化された装置構成で、持ち運べるサイズでありながら、pM オーダーでレゾルフィンを検出できる高い感度を有していることを明らかにした。

3 分析応用例

3.1 CRP の測定

CRP は、ヒト血中に含まれる炎症マーカーであり、体内で炎症が起きたり組織細胞に障害が起こると濃度が増加することが知られている。CRP は一般的に抗原抗体反応を利用したイムノアッセイによって定量される。本測定では、ポータブル蛍光光度計を利用して CRP を定量する手段として、抗体固定化媒体としてジャングルジウム構造体（図 3 a）を利用した簡易 ELISA 法を開発した⁴⁾。図 3 b に示す原理で、濃度の異なる CRP 溶液を測定し、検量線を作成した（図 3 c）。溶液中の CRP 濃度の増加に伴って蛍光強度は増大し、検量線は $R^2=0.997$ の良好な直線性を示した。ブランク値を用いて算出した検出限界 (3σ) および RSD ($n=3$) は、50 pg mL^{-1} および 8.5~17.3 % と見積もられた。ヒト血清中に含まれる CRP の基準値は $1.0 \times 10^4 \text{ ng/mL}$ であり⁶⁾⁷⁾、本装置を用いる ELISA は、炎症の度合いを客観的に評価するために利用できると考えられる。また、標準的な検査法である、マイクロプレートとマイクロプレートリーダーを使用して CRP の測定を行ったところ、検出限界 (3σ) および RSD ($n=3$) は 71 pg mL^{-1} および 0.8~10.1 % であった。これらの結果から、本装置を使用する ELISA 法により、CRP を従来の検査法と同等の性能で測定できることを示している。また、ヒト血清中に含まれる CRP を定量したところ、定量値は $10.2 \pm 2.4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ と見積もられた。この定量値は、マイクロプレートリーダーを用いて測定した値とよく一致した ($10.7 \pm 1.4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)。本検討から、本法が実試料に応用できることがわかった。抗体固定化媒体であるジャングルジウム構造体に固定する捕捉抗体の種類を変えることにより、バイオマーカーだけでなく、農作物に残留する農薬や、食品に含まれるアレルゲン物質など、様々なタンパク質の定量に利用することが可能である。

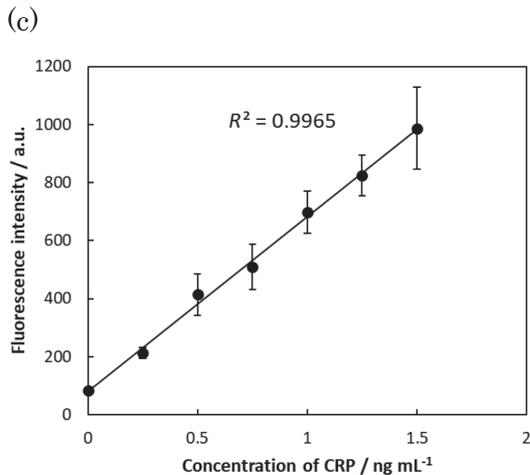
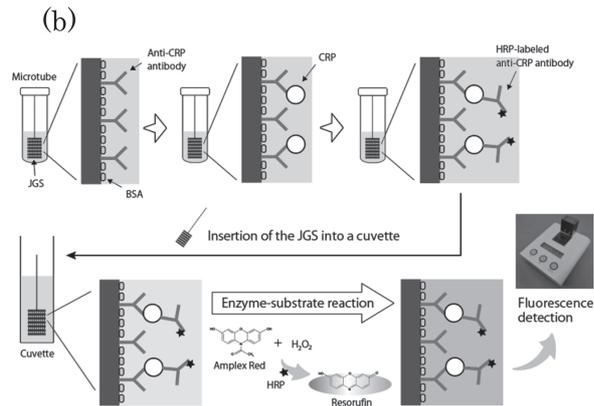
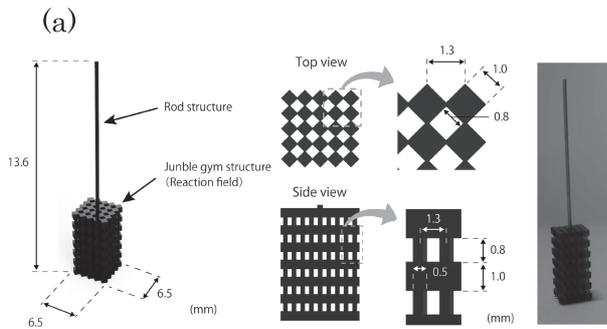


図3 CRPの測定

(a) ジャン글ジム構造体のデザイン。(b) FC-1を使用するELISAの原理。(c) CRPの検量線。

3.2 グルコースの測定

ポータブル蛍光光度計 FC-1 を用いる酵素アッセイにより、グルコースの測定を行った。キュベット内に、グルコースオキシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼおよび Amplex Red (基質) を含む溶液にグルコース溶液を入れると、酵素反応によりレゾルフィンが生じる。この蛍光強度を、FC-1 を使用して測定した。種々の濃度のグルコース溶液を測定し、得られた結果から検量線を作成したところ、検量線は $R^2=0.998$ の良好な直線性

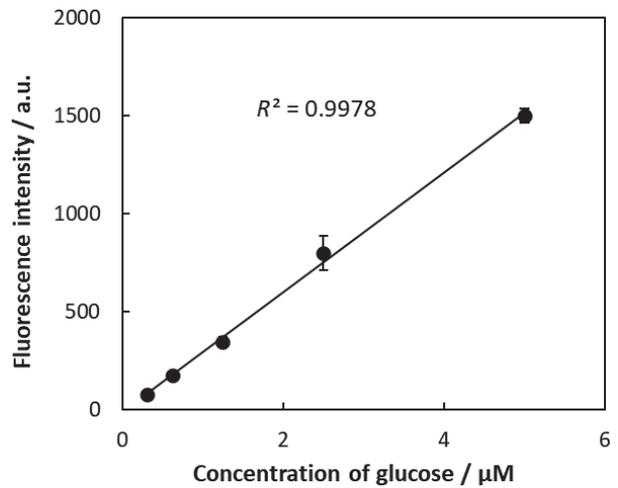


図4 グルコースの検量線

を示した (図4)。血清および2種類の清涼飲料水に含まれるグルコースを測定したところ、定量値はそれぞれ 1.7 ± 0.5 mM, 15.6 ± 2.2 mM, および 38.9 ± 3.1 mM と見積もられた。この測定では、キュベットを反応容器としても活用することで、シンプルな操作手順でグルコースを定量することを可能にしている。また、添加する酵素を変えることにより、グルコース以外にも、コレステロール、尿酸、乳酸、トリグリセリドなど、様々な物質の測定に応用できる。

4 おわりに

本稿では、弊社で開発したポータブル蛍光光度計 FC-1 について紹介した。FC-1 は、「屋外や実験室以外の場所で測定したいが、装置が大きくて移動ができない」、「長時間連続測定したいが、高価な装置を占有してしまう」など、従来の蛍光光度計の課題を克服すべく、ニーズに応じて開発した蛍光光度計である。小型、軽量、バッテリー駆動であり、いつでもどこでも簡便に高感度な蛍光測定が可能である。屋外での計測はもちろんのこと、複数のフィルターブロックを用意すれば実験室での日常的な実験にも活用できるため、様々な用途に対応可能である。

本装置は、環境計測、医療検査、食品分析、農薬検出など、非常に多くのアプリケーションに活用できるため、「都合の良い」蛍光光度計として、多くの皆様にご活用いただければ幸いである。さらに、装置構成が単純であり、初心者が蛍光光度計の装置構成を理解するのに適していると考えられるため、学生実験などの教育現場にもお役立ていただきたい。

文献

- 1) J. Yang, K. Wang, H. Xu, W. Yan, Q. Jin, D. Cui : *Talanta*, **202**, 96 (2019).
- 2) M. Tormen, R. Lockhart, P. Niedermann, T. Overstolz,

A. Hoogerwerf, J.-M. Mayor, J. Pierer, C. Bosshard, R. Ischer, G. Voirin, R. P. Stanley : Proc. of International Conference on Space Optics-ICSO 2008, 1056607 (2008), (Toulouse, France).

- 3) 堀込 純：“分光蛍光光度計の原理と応用”，分析の原理 43 電磁波(光) ⑥, JAIMA Season 2018 New Year, 2018 年 1 月 30 日公開.
- 4) 熊谷直也, 森岡和大, 中村好花, 千明大悟, 北谷菜津美, 加藤祐史, 東海林敦：分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **70**, 721 (2021).
- 5) K. Morioka, H. Sato, M. Kuboyama, A. Yanagida, A. Shoj : *Talanta*, **224**, 151725 (2021).
- 6) D. C. McMillan, K. Canna, C. S. McArdle : *EJS*, **90**, 215 (2003).
- 7) Y.-J. Lin, Z.-M. Li, Y. Xia, J.-J. Huang, H.-Q. Huang, Z.-J. Xia, T.-U. Lin, S. Li, X.-Y. Cai, Z.-J. Wu-Xiao, W.-Q. Jiang : *PLOS One*, **8**, e64158 (2013).



熊谷直也 (Naoya KUMAGAI)
東海光学株式会社開発本部 (〒444-2192 愛知県岡崎市恵田町下田 5-26). 《現在の研究テーマ》光学技術を応用した製品開発. とくに小型の蛍光光度計. 《趣味》ランニング.
E-mail : n-kumagai@tokaiopt.co.jp



加藤祐史 (Yuji KATO)
東海光学株式会社開発本部 (〒444-2192 愛知県岡崎市恵田町下田 5-26). 《現在の研究テーマ》光学技術を応用した製品開発. 《趣味》バレーボール.
E-mail : y-kato@tokaiopt.co.jp

会社ホームページ URL :

<https://www.tokaiopt.co.jp/>

関連製品ページ URL :

https://www.tokaioptical.com/products/optical_technology/fc-1/

原 稿 募 集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象：以下のような分析機器, 分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術, 2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術, 3) 分析機器および分析手法の応用例, 4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説, 5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項, 6) その他, 分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情

報など

新規性：本記事の内容に関しては, 新規性は一切問いません. 新規の装置や技術である必要はなく, 既存の装置や技術に関わるもので構いません. また, 社会的要求が高いテーマや関連技術については, データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません.

お問い合わせ先：

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]