

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18750067
 研究課題名(和文) 接触反応／微小場反応システムを利用するヒト代謝物質のオンサイトアナライザーの開発
 研究課題名(英文) Development of on-site analyzer for human metabolites using catalysis/micro-flow analysis system
 研究代表者
 手嶋 紀雄 (TESHIMA NORIO)
 愛知工業大学・工学部・准教授
 研究者番号：30292501

研究成果の概要：ヒト代謝物質の濃度は、健康状態を反映して増減する。従ってこれら物質の精確な計測技術の確立は、迅速簡便な健康診断や病態診断に役立つ。本研究では、呼気から排出される揮発性有機化合物、尿中の微量金属をターゲットにした分析法の確立を目指した。その結果、呼気中ホルムアルデヒドの計測技術を確立し、また、尿分析への適用には至らなかったが、糖尿病に効果があるといわれる環境水中のバナジウムの計測技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,200,000	0	2,200,000
2007 年度	700,000	0	700,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	240,000	3,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：化学センサー、バナジウム、呼気分析、呼気ホルムアルデヒド、糖尿病、流れ分析

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は生活習慣病の一つで、その患者数は、発症予備軍を併せると全国で 1,500 万人を超えていると言われている。厚生労働省は現在「21 世紀における国民健康づくり運動(健康日本 21)」を推進し、国民の生活習慣病の予防に取り組んでいる。

痛みを伴わない呼気分析は、非侵襲分析法として近年脚光を浴びている。糖尿病患者の呼気には、健常人に比べて高いアセトンガスが含まれている。これは、エネルギー源としての糖をうまく利用することができないため、代替りのエネルギー源として脂肪酸を代

謝して、その代謝産物であるアセトンが血中を通り、肺胞から呼気として排出されるからである。呼気アセトン分析は、これまで多くの報告例があるが、呼気ホルムアルデヒド(呼気 HCHO)に着目した研究は極めて少ない。また、患者のベッドサイドでリアルタイムに呼気 HCHO を計測する技術(オンサイト分析)は確立されていない。

一方、バナジウムは、糖尿病と深い関わりがある。1985 年 Heyliger らは、糖尿病ラットにバナジウムを投与したところ、高血糖値が正常化することから、バナジウム自体がインスリン様作用を有することを発見した

(Science, 227, 1474 (1985))。この発見以来、ヒトへの臨床実験も行われており、バナジウムにインスリンの作用を促進する働きがあることも見出されている (J. Clin. Endocrinol. Metab., 86, 1410 (2001))。しかし、その作用機作は不明な点が多い。また、ヒトの全血および血清中のバナジウム濃度は、多くの場合 0.1 mg/L 以下であり、極めて微量であるため、高感度な分析法が求められる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト代謝物質のうち、糖尿病に深く関わる呼吸アセトン、また癌のバイオマーカーとして期待される呼吸 HCHO、さらには、バナジウムに注目して、これらのオンサイトアナライザーを開発することを目的とした。すなわち、

(1)非侵襲呼吸アセトン・HCHO 分析法の確立

(2)サブ ppb レベルのバナジウム定量法の確立

を目指した。本報告書では、(1)のうち、呼吸 HCHO 分析法、並びに(2)の成果について詳述する。

3. 研究の方法

(1) 呼吸 HCHO : 呼吸 HCHO は、酢酸アンモニウム存在下でジメドン (5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione) と反応し、蛍光誘導体を生成する。生成した蛍光誘導体は、励起波長を 395 nm に、蛍光波長を 463 nm に持つため、この蛍光誘導体の蛍光強度を測定することで、HCHO を定量することができる。

分析システムとして、フローインジェクション分析 (FIA) を採用した。FIA とは、内径 1 mm 以下の細管 (テフロンチューブ) 内に溶液を一定流量で送液し、サンプルをその流れに注入して化学反応を流れの中で行わせ、下流に設置したフローセル付きの検出器でピークを得る方法で、化学分析の迅速化・自動化を達成する技術である。

本 FIA システムは二流路とし、キャリアー溶液として水、試薬溶液として酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.0) に溶かしたジメドンを送液した。サンプルガスの捕集には、拡散スクラバーを用いた。この拡散スクラバーは、通常のテフロンチューブにガス透過性をもつ多孔質テフロンチューブを通した二重管構造を有する。多孔質テフロンチューブ内に水を充填し、2 つのチューブの間にサンプルガスを流すことで、多孔質テフロンチューブの外壁を透過したサンプルガスを水に吸収させることができる。本研究では、採取した呼吸をこの拡散スクラバーに導入し、呼吸 HCHO を水に捕集濃縮し、この吸収液を FIA

システムに導入し、呼吸 HCHO を定量した。
(2) 環境水バナジウム : 本研究の測定における指示反応はバナジウムを触媒とした *p* アニシジンの酸化反応である。臭素酸カリウムによる *p* アニシジンの酸化反応で生ずる色素は 510 nm に極大吸収を有する。しかし、この酸化反応は非常に遅い。ここに触媒として微量のバナジウムが存在することで反応が促進され、バナジウムの分析が可能となる。ここで酸化剤として働くバナジウム(V)は還元され、バナジウム(IV)となるが、臭素酸カリウムの存在により酸化再生され、再び酸化剤として色素生成反応に関与する。このようにバナジウムは触媒サイクルをして *p* アニシジンを酸化するので非常に高感度に分析できる。

また、接触反応においてある種の配位子を添加することにより、金属イオンの触媒能を高める場合がある。このようなものを活性化剤という。この反応においては、バナジウムに対してタイロンが活性化剤として作用する。

分析システムには、本研究で新しく提案したストップト・イン・ループフロー分析 (Stopped-in-loop flow analysis, SILFA) 法を用いた。SILFA について概説する。FIA 法では先に述べたように、キャリアー溶液と試薬溶液を一定流速で流し、キャリアー溶液にサンプル溶液を注入して、サンプル濃度に比例した FIA ピークを得る。バッチマニユアル分析法に比べれば試薬量は大幅に削減できるが、試薬溶液を常に流し続けることになる。従って、特に反応時間が長い反応系を扱う場合は、試薬の消費量が反応時間に比例して増大してしまう。そこで、反応溶液をループ内に隔離することにより、流れが止まった状態で反応を促進させ、この間、ポンプを止めて試薬を流さない新しい流れ分析技術を考案した。SILFA の概念図を図 1 に示す。測定の直前にポンプを再作動し、ベースラインを形成させた上で、その流れに反応溶液を注入して測定するので、最小限の試薬で高感度分析を行うことができる。

Stopped-in-Loop Flow Analysis, SILFA の概念図

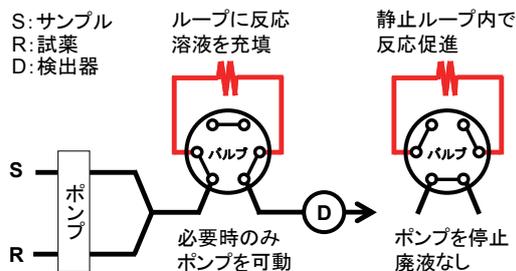


図 1 SILFA の概念図

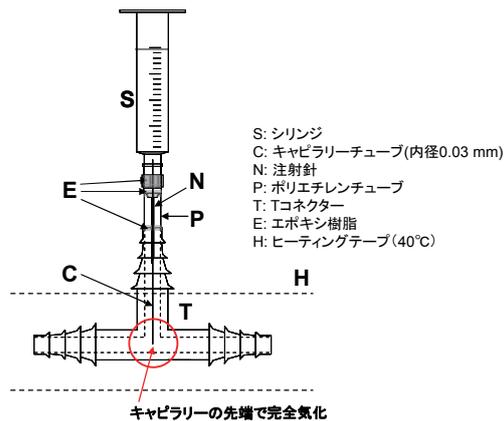


図2 重力滴下-蒸発法による標準ガス発生

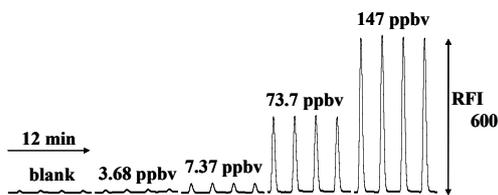


図3 ホルムアルデヒドの FIA ピーク

4. 研究成果

(1) 呼気 HCHO: ガス分析システムの校正には、一般にガスシリンダーから供給される標準ガスが用いられる。しかし、ガスシリンダーは高価であり、長期間保存すると濃度が変動するなどの問題を抱える。そこで本研究では、簡易な装置で標準ガスを発生させるために、全く新しい手法を取り入れた。すなわち、HCHO 標準溶液をキャピラリー管から重力を利用して極低速度で滴下し、キャピラリー管の先端で完全気化させることにより、HCHO 標準ガスを発生させた。この方法を「重力滴下-蒸発法」と命名している(図2)。この方法で発生した標準ガス濃度は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-HPLC 法によって検定され、精確さが保証された。

重力滴下-蒸発法による HCHO 標準ガスは、拡散スクラバーに導入されて HCHO 水溶液となり、オンライン接続された FIA 蛍光分析システムにより検出された。これにより、HCHO 3.68~147 ppbv の濃度範囲で良好な検量線を得た(図3)。呼気 HCHO 分析を行う際は、標準ガス発生部を取り外し、代わりに呼気を直接導入した。その結果、4名のボランティアから 5.8~11.8 ppbv の HCHO を検出した。また、喫煙習慣のある1人のボランティアでは、喫煙前の約 1.5 倍の濃度の HCHO が約 25 分間にわたり検出され、その後、喫煙前の濃度に近い値まで減少した。

本成果において特筆すべき点として、重力滴下-蒸発法を用いれば、取り扱いの煩雑なガスシリンダーを用いることがなく、HCHO のみならず他の標準ガス発生にも適用可能であることが挙げられる。医療現場で本格的に呼気分析が行われるには、分析システム全体の更なるダウンサイジングが求められるが、校正を簡易に行うことができる本手法は、ポイント・オブ・ケア検査にとって有効な技術になると考えられる。

本論文は、新しい標準ガス発生法を提案し、呼気 HCHO の ppbv レベルの確度の高い動態モニタリングを実現したことから、臨床化学における新しい有用な分析法の提案として社会的意義も高い研究である。

(2) 環境水バナジウム: バナジウムを高感度に検出するために、反応時間、温度、各種試薬濃度などの実験諸条件を検討し、図4に示す SILFA システムの最適条件を得た。最適条件下で得たシグナルを図5に示す。本システムでは第一ループ L₁、第二ループ L₂のそれぞれからピークが得られる。図5に示す(a)、(a')は L₁、L₂から得られたブランクのピークであり、(b)、(b')は L₁、L₂から得られた 1 µg L⁻¹ のバナジウムのピークである。これらのシグナルから以下の検量線を得た。

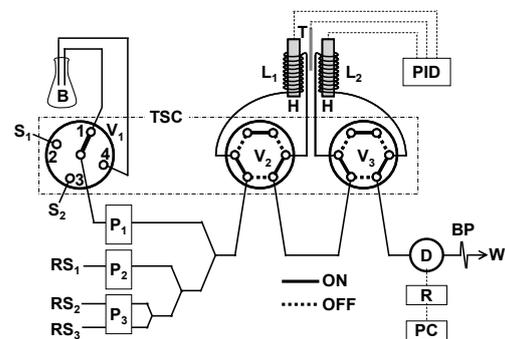


図4 バナジウムの SILFA システム. B, 10 mM HNO₃; S₁ と S₂, 標準/サンプル; RS₁, 80 mM *p*-ansidine と 1 M acetate buffer (pH 3.3)の混合溶液; RS₂, 50 mM KBrO₃; RS₃, 0.15 M Tiron; V₁, 4-ポートセレクションバルブ; V₂ と V₃, 六方インジェクションバルブ; P₁, P₂, P₃, ダブルプランジャーポンプ (P₁, 0.90 mL min⁻¹; P₂, 0.15 mL min⁻¹; P₃, 0.20 mL min⁻¹); H, ヒーター; T, 熱電対; PID, PID (proportional-integral-derivative) 制御装置 (105°C); L₁, 第一ループ (100 µL); L₂, 第二ループ (100 µL); D, 吸光光度検出器 (510 nm); R, 記録計; PC, パソコン; BP, 背圧コイル (0.25 mm i.d., 45 cm long).

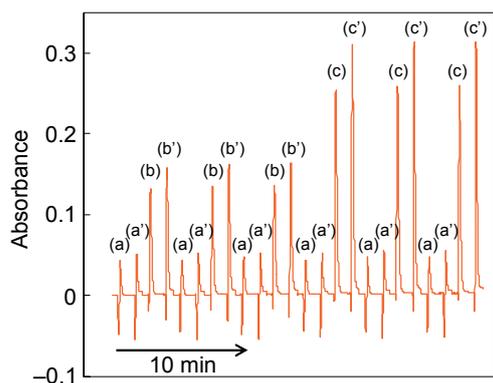


図5 第一ループ L_1 ((a), (b), (c))と第二ループ L_2 ((a'), (b'), (c'))から得られるバナジウムのSILFAシグナル. バナジウム濃度 ($\mu\text{g L}^{-1}$): (a)と(a'), 0; (b)と(b'), 1.0; (c)と(c'), 2.0.

第一ループ: $y = 0.104x - 0.00504$

第二ループ: $y = 0.128x - 0.00678$

ここで y はブランクを差し引いたネットの吸光度であり, x は $\mu\text{g L}^{-1}$ で表すバナジウムの濃度である。いずれも相関係数 (r^2) 0.993 であり直線性は良好であった。第一ループの傾きが若干低いのは, 図4のシステム図からもわかるように L_1 が L_2 より検出器から離れているため, 反応生成物がより拡散するためである。しかし, ブランク値の 3σ から算出した検出限界は L_1 で 38 ppt, L_2 で 37 ppt であり, 感度に遜色はない。 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ での5回繰り返し測定における相対標準偏差はそれぞれ 0.81%, 1.1% であり, L_1 , L_2 を使用することで, 370秒間で2個の未知サンプルの分析値を得ることができる。すなわち, 試料処理能力は1時間当たり約20サンプルである。

共存物質の影響を調べた。 $1 \mu\text{g L}^{-1}$ のバナジウムに鉄(III)や銅(II)などのイオンを添加し, $\pm 5\%$ 以内を許容として共存物質の影響を検討した。検討したイオンの中で鉄(III)が最も大きな干渉を示した。鉄(III)も本反応において触媒として作用する可能性がある。しかし, 本法による $1 \mu\text{g L}^{-1}$ のバナジウム(V)の定量に対し $50 \mu\text{g L}^{-1}$ の鉄(III)の共存が許容された。井戸水中に $40\sim 80 \mu\text{g L}^{-1}$ の鉄が存在することが報告されているので, 鉄濃度が比較的高い天然水への応用は困難かも知れない。しかし, 本法はバナジウム豊富な水分析には十分適用可能である。

そこで, 本システムを用いて4種類の市販ミネラルウォーター中のバナジウムを測定した。その結果, 表示値及びICP-MSによる測定結果と良い一致を示した。本実験により,

本法の有用性が実証された。

本研究では, バナジウムの接触分析法を用いたSIDLFA法を開発した。実験操作は完全に自動化されており, 本SIDLFA法は, 従来のFIA法と比べ, 試薬消費量も削減できる。本SIDLFA法は, 今後, 様々な化学分析法の自動化, 試薬削減化に有効であると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

- ① N. Teshima, M. Kuno, M. Ueda, H. Ueda, S. Ohno, T. Sakai: Automated stopped-in-dual-loop flow analysis system for catalytic determination of vanadium in drinking water, *Talanta*, accepted. Doi: 10.1016/j.talanta.2009.04.018. 査読有
- ② T. Sakai, N. Teshima: Advancement of Flow-Based Analysis with Alternative Chemical Reactions and New Devices for Environmental and Biological Samples, *Anal. Sci.*, 24, 855-864 (2008). 査読有
- ③ 上田 実, 手嶋紀雄, 酒井忠雄: 重力滴下-蒸発法によるホルムアルデヒド標準ガス発生法の開発と呼気ホルムアルデヒド分析への応用, *分析化学*, 57, 605-611 (2008). 査読有
- ④ 手嶋紀雄, 信田拓哉, 酒井忠雄: 反応速度差を用いるアスコルビン酸とグルタチオンのフローインジェクション吸光光度同時定量, *分析化学*, 57, 327-333 (2008). 査読有
- ⑤ K. Watla-iad, T. Sakai, N. Teshima, S. Katoh, K. Grudpan: Successive determination of urinary protein and glucose using spectrophotometric sequential injection method, *Anal. Chim. Acta*, 604, 139-146 (2007). 査読有
- ⑥ 福井啓典, 大野慎介, 樋口慶郎, 手嶋紀雄, 酒井忠雄: オンラインガス拡散/イオン交換濃縮法を用いる海水中微量アンモニウムイオンのフローインジェクション吸光光度定量, *分析化学*, 56, 757-763 (2007). 査読有
- ⑦ N. Teshima, T. Hino, T. Sakai: An Alternative Interface for Flow Injection-Capillary Electrophoresis System with Electrokinetic Injection, *Anal. Sci.*, 23, 751-753 (2007). 査読有
- ⑧ N. Teshima, S. Ohno, T. Sakai: Stopped-in-loop flow analysis of trace vanadium in water, *Anal. Sci.*, 23, 1-2

- (2007).査読有
- ⑨ 手嶋紀雄, 山本真吾, Qinghe Zhang, 山田善市, 酒井忠雄: アナターゼ型酸化チタンの光触媒反応によるクリスタルバイオレットの脱色機構及び分解生成物の解析, 分析化学, 56, 99-106 (2007).査読有
- ⑩ 手嶋紀雄, 酒井忠雄: 反応速度を用いる分析法, ぶんせき, 2006, 215-220.査読有
- ⑪ T. Sakai, S. Fujimoto, K. Higuchi, N. Teshima: On-Line Preconcentration and Determination of Phenols at Sub-ppb Levels Using Three Switching Valves, American Laboratory News, 38(15), August 2006 issue, pp. 40-41 (2006).査読有
- ⑫ N. Teshima, S. Gotoh, K. Ida, T. Sakai: One-shot flow injection spectrophotometric simultaneous determination of copper, iron and zinc in patients' sera with newly developed multi-compartment flow cell, Anal. Chim. Acta, 557, 387-392 (2006).査読有
- ⑬ S. Ohno, N. Teshima, T. Sakai, K. Grudpan, M. Polasek: Sequential injection lab-on-valve simultaneous spectrophotometric determination of trace amounts of copper and iron, Talanta, 68, 527-534 (2006).査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 久野真紗美, 上田 実, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 「ストップト・イン・ループフロー分析法による金属イオンの接触分析における加温効果」, 第 39 回中部化学連合学協会支部連合秋季大会 (2008.11).
- ② N. Teshima, M. Ueda, T. Sakai, 「Standard gas generator based on gravitational dispensing- vaporization for breath formaldehyde analysis system」, The 15th International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2008) & The 25th Anniversary Meeting of Japanese Association for Flow Injection Analysis (Nagoya, 2008.9).
- ③ 手嶋紀雄, 上田 実, 飯田憲治, 久木田 惇, 酒井忠雄, 「サリチルアルデヒド吸光度法による呼気アセトン分析」, 日本分析化学会第 57 年会 (福岡大学, 2008.9).
- ④ N. Teshima, M. Kuno, M. Ueda, T. Sakai, 「Stopped-in-Dual-Loop Flow Analysis of Trace Vanadium in Drinking Water」, Tokyo Conference 2008, Asia Young Analytical Chemist Session 2008 (Chiba, 2008.9).
- ⑤ 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 「流れ分析技術の臨床化学への応用」, 第 69 回分析化学討論

会 (名古屋国際会議場, 2008.5).

- ⑥ 上田 実, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 「呼気ホルムアルデヒドの自動分析」, 第 69 回分析化学討論会 (名古屋国際会議場, 2008.5).
- ⑦ 久野真紗美, 上田 実, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 「タッチパネル可変式自動フローインジェクション装置の開発」, 第 69 回分析化学討論会 (名古屋国際会議場, 2008.5).
- ⑧ 久野真紗美, 上田実, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 「新規ストップトフロー法によるバナジウムの自動分析」, 日本分析化学会第 56 年会 (徳島大学, 2007.9).
- ⑨ 上田実, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 「微量ガスホルムアルデヒド分析のための自動システムの開発」, 日本分析化学会第 56 年会 (徳島大学, 2007.9).
- ⑩ N. Teshima, M. Kuno, M. Ueda, S. Ohno, T. Sakai, 「Automated stopped-in-loop flow analysis for trace metal ion determination using catalytic reaction」, The 15th International Conference on Flow Injection Analysis (Berlin, Germany, 2007.9)

[図書] (計 1 件)

- ① 北森武彦 編: 新しい地平をひらく分析手法の最前線, 酒井忠雄, 手嶋紀雄 分担執筆: 24 章 固相抽出を利用する水試料中のフェノールの高感度吸光度法, 化学同人 (2009), pp.181-188.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: フローインジェクション分析装置用加熱装置

発明者: 手嶋紀雄, 村瀬武生

権利者: 同上

種類: 実用新案

番号: 実案 2008-007722

取得年月日: 2008 年 11 月 4 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

手嶋 紀雄 (TESHIMA NORIO)

愛知工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 302925

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書