

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：35309

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15072

研究課題名（和文）有機リン中毒解毒剤PAMを用いた新しい検査反応の発見および様々な用途開発

研究課題名（英文）Discovery of a New Test Reaction Using an Organophosphate Poisoning Antidote PAM, and Development of Various Applications

研究代表者

永瀬 澄香（Nagase, Sumika）

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：00189127

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究では有機リン中毒解毒剤であるプラリドキシムヨウ化メチル（PAM）を用いて新しいPAMでんぷん反応を確立させた。PAMの新しい自己血糖測定器（SMBG）の血糖値に及ぼす影響要因を明らかにした。新PAMでんぷん反応を用いた酵素アミラーゼ検出反応、グルコース検出反応へ応用など新たな活用法として教育教材開発を実施した。食品に含まれるでんぷんを簡便に定性反応で検出できる新PAMでんぷん反応の用途開発を行った。さらに糖質制限食、有酸素運動による臨床検査値の測定を健常者に行い、糖尿病における運動や食事療法の有用性を検討した。これらの研究成果は国内学会や国際学会において発表し、医学雑誌に論文投稿した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究では糖質制限食における連続血糖測定（FGM）では食事による血糖上昇の緩和効果、有酸素運動における臨床検査値の変動要因を検討し、糖尿病における食事療法、運動療法の重要性、健康増進の啓発活動に役立つ成果が得られた。さらに、新しく開発したPAMでんぷん反応は、でんぷん糖検出反応、酵素アミラーゼ反応等の教材開発に役立ち、食品、紙類等のでんぷん検出にも利用可能であった。従来のヨウ素でんぷん反応に比較して、無色で環境にも優しく、利便性が高いと考える。今回、新PAMでんぷん反応のさまざまな用途開発を見出すことができ、教育教材開発、食品中でんぷん検出応用など今後社会的普及の可能性が期待できるであろう。

研究成果の概要（英文）：I established a new test reaction of pralidoxime methiodide (PAM), an antidote for organophosphate poisoning, with starch. I identified the factors causing PAM to affect blood glucose levels, as measured by using new self-monitoring blood glucose meters. I also pursued the development of educational materials as applications of the new PAM-starch reaction, such as an amylase enzyme detection reaction and glucose detection reaction. I developed applications of the new PAM-starch reaction, which allows for the easy detection of starch contained in food by using a qualitative reaction. Moreover, laboratory tests following the implementation of a carbohydrate-restricted diet or aerobic exercise were performed in healthy subjects to examine the benefits of exercise and diet therapy in diabetes mellitus. These results have been presented at domestic and international conferences and published in medical journals.

研究分野：臨床化学検査学

キーワード：新PAMでんぷん反応 有機リン中毒解毒剤PAM 血糖測定への影響 臨床検査値影響要因 アミラーゼ酵素実験 教材開発

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤 PAM(プラリドキシムヨウ化メチル)は、農薬や猛毒サリンの有機リン中毒に使用される解毒剤の一つとして知られている。薬剤が臨床検査値に影響を与える要因について、私の研究の中で解毒剤 PAM に含まれるヨードイオンが血糖測定電極法に影響を及ぼす要因であることを明らかにした。

その過程で PAM を用いる新しいでんぷん反応を初めて発見した。研究では新しい SMBG による血糖測定電極法における薬剤 PAM の影響を検討し、分析上の注意点を明確にする。世界に普及しているでんぷん反応は、毒物であるヨウ素を使用するヨウ素ヨウ化カリウムを試薬とするヨウ素でんぷん反応が一般的に用いられる。研究において従来法に比較して新しい PAM でんぷん反応の新たな活用法を検討する。新 PAM でんぷん反応原理を用いて測定法を確立させ、さらに PAM でんぷん反応の多様性と利便性を追求し、教育教材、食品でんぷん検出反応、生化学実習酵素実験など、さまざまな用途開発を検討し社会貢献することをめざす。

2. 研究の目的

(1) 薬剤の血糖測定影響要因の検討

簡易血糖測定器が普及し、糖尿病患者さんが自宅でインスリン療法を行う指標として自己血糖測定器 (SMBG) を使用するようになった。新機種①: Free Style リブレ (Abbott 社) と SMBG②: グルテストミント (三和化学) および従来法の SMBG③: グルテストエブリ (GOD 酸素電極法) の計 3 機種を用いて、有機リン中毒解毒剤である PAM の血糖測定 (酵素電極法) への影響を検討する。2 つの新機種 SMBG を用いて解毒剤 PAM とビタミン療法で使用するアスコルビン酸 (ビタミン C) の薬剤について、血糖値に及ぼす影響を明らかにする。さらに SMBG 器の保存温度による血糖値に及ぼす影響を検討する。

(2) 食事や有酸素運動における連続血糖測定 CGM の変動要因の検討

糖尿病患者に対する食事や有酸素運動等は血糖コントロールや心疾患のリスクファクターを改善させる効果があると言われている。現在までに連続血糖測定器 (CGM)、臨床検査値および有酸素運動前後での超音波検査を総合的に検討している報告はほとんど見られない。連続血糖測定機能を持つ Free Style リブレを用いて血糖検査の意義を見出すとともに、糖質制限食、食事摂取の仕方や有酸素運動が血糖値をはじめとする臨床検査値に及ぼす影響について明らかにし、頸部超音波検査を含めて様々な検討を実施する。食事の影響では時にきのこ食の血糖抑制効果に着目し、アミラーゼ酵素の関与を新 PAM でんぷん反応で検討する。

(3) 新 PAM でんぷん反応の教材開発

研究では、PAM を用いた新しいでんぷん反応の活用法を検討し、教材開発を目指すことを目的に様々な検討を行う。溶液中のでんぷん検出は、従来法のヨウ素ヨウ化カリウム試薬では褐色調が濃く、試薬取り扱いが難しいとされている。有機リン中毒解毒剤である PAM は治療薬として人に投与されている薬剤であり、試薬として安全に利用可能である。PAM に含まれるヨードイオンを化学反応でトリヨードイオンに変換させ、鮮明で簡単に発色させる比色測定条件を設定を検討する。この新しい PAM でんぷん反応を活用して、溶液の比色分析、呈色溶液の色調変化による定性反応条件を検討し、教育に役立つように安心安全な化学実験のための教材開発が可能であると考えられる。

(4) 新 PAM でんぷん反応を利用した用途開発

さらに、溶液中のでんぷん検出検査および食品中や生活品のでんぷん検出を定性反応で簡単に調べる方法を確立させる。PAM でんぷん反応試薬の定性分析のための基礎的条件設定を検討する。各でんぷん粉 (9 種類) を用い、新 PAM でんぷん反応によるでんぷん検出法を検討する。また、実験では、食品中 (各でんぷん粉、サツマイモ、バナナ、うるち米、もち米等) および紙類のでんぷん検出について、PAM でんぷん反応の定性反応による色調変化を比較検討し簡単にできるでんぷん検出実験を確立する。

3. 研究の方法

(1) 薬剤の血糖測定影響要因の検討

本研究では薬剤の血糖測定影響要因を検討する。新しい 2 つの自己血糖測定 (SMBG) 器 Free Style リブレとグルテストミント (GDH: グルコースデヒドロゲナーゼ法) について、血糖測定に及ぼす薬剤 (PAM、アスコルビン酸) の影響および温度変化による血糖測定への影響を検討した。薬剤 PAM の検討は、7 系列の濃度別 PAM 液 (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800ug/mL) を用いて、従来法 (GOD: グルコースオキシダーゼ法) と比較した。アスコルビン酸の検討では、低濃度 (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5mg/dL) と高濃度 (0, 5, 10, 15, 20mg/dL) のアスコルビン酸添加試料を準備した。添加方法は基礎検討では全血: グルコース溶液が 9:1 になるように添加し、PAM、アスコルビン

酸の影響では全血：グルコース溶液：各添加溶液が 8：1：1 の割合に添加し、新しい 2 機種
の SMBG①②を用いて血糖値の変動を測定した (n=10)。

新しい 2 種類の SMBG 器の保存温度による温度変化の影響については、本体リーダーと試薬セン
サー両方を高温 (37℃)、低温 (15℃) に保管した場合、室温 (25℃) と比較して血糖値の変動を調べ
た。測定には、ベース検体にそれぞれ低濃度 (50 mg/dL)、中濃度 (100 mg/dL) および高濃度
(200 mg/dL) の 3 種類のグルコース溶液を添加した検体を用いて血糖値への影響を検討した。

(2) 食事や有酸素運動における連続血糖測定 CGM の変動要因の検討

近年、新しく販売された Free Style リブレは、持続血糖測定 (Flash Glucose Monitoring:FGM)
として、糖尿病患者が 2 週間連続血糖測定 (間質液) することが可能である。今回、糖質制限食
事コントロールを行い、被検者は、普通食 (約 1900kcal) と糖質制限食 (約 1500kcal) をそれぞ
れ 3 日間同じ食事を摂取し、Free Style リブレを用いて連続血糖測定 (CGM) を行った。2 日目
に採血し、臨床検査値 (9 項目：インスリン、血糖、アルカリホスファターゼ、アルブミン、ア
ミラーゼ、乳酸、総ケトン体、アセト酢酸、オステオカルシン) を測定した。食事の影響におけ
る血糖値日内変動および臨床検査値への影響を比較検討した。さらに、舞茸による血糖上昇抑制
効果について、朝食に舞茸 80g を摂取した場合と舞茸非接種の場合での血糖値の変動を比較検
討した。きのこ食の血糖抑制効果について、連続血糖測定 (CGM) による CGM Viewer のデータ分析
を行った。また、エアロバイクを用いて有酸素運動における CGM 血糖変動および頸部超音波検査
による経静脈流速の比較を検討した。

(3) 新 PAM でんぷん反応の教材開発

①試薬条件の基礎検討：PAM 溶液 (400、800、1600 μ g/mL)、 H_2O_2 液、バレイショデンプン液 (10
段階；0.01~0.1%) の濃度別希釈系列を作成し、PAM でんぷん反応が起こる試薬条件を検討し
た。

②新しい糖検査反応の試み：1)PAM でんぷん反応によるでんぷん検出、吸光度測定、2)ジアスタ
ーゼ酵素作用によるでんぷん加水分解反応の検討、3)GOD・POD (グルコース・ペルオキシダーゼ)
反応によるブドウ糖検出反応の検討を実施した。1)2)3)の条件設定を検討することにより、PAM
試薬を用いて糖検査反応を活用した簡単な化学実験の方法を確立させる。

③生化学アミラーゼ実験への応用：さらに、生化学実習に応用するため、唾液中のアミラーゼ酵
素の測定法を改良させた。従来法のような素でんぷん反応の代りに新しい PAM でんぷん反応を用
いることにより、短時間でより鮮明に発色できるようでんぷん溶液定性反応の条件設定を検討
した。一般に広く実施されているヨウ素でんぷん反応によるアミラーゼ酵素実験に変わって、新
PAM でんぷん反応が生化学実験に活用できる測定法を検討した。

(4) 新 PAM デンプン反応を利用した用途開発

PAM でんぷん反応の比色測定の条件設定を検討した。さらに、溶液中のでんぷん検出検査およ
び食品中や生活用品のでんぷん検出を簡単に調べることができる定性反応を確立させるために、
さまざまな検討を試みた。

新 PAM でんぷん反応試薬の基礎的条件設定を検討した。各でんぷん粉 (9 種類) を使い、新 PAM
でんぷん反応の比色法の比較を行った。また、実験では、食品中 (各でんぷん粉、サツマイモ、
バナナ、うるち米、もち米等) および各紙類のでんぷん検出について、PAM でんぷん反応の定性
反応を従来法と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 薬剤 (PAM) の SMBG 血糖値測定への影響要因の検討

薬剤 PAM は分子構造体に含まれるヨードイオンが遊離し、SMBG 電極法に正誤差として影響す
ると考えられる。従来法の③グルテストエブリ (GOD 法) は、新機種の①②2SMBG (GDH 法) に比
較すると PAM 濃度に比例して血糖値の有意な上昇が見られた ($p<0.01$)。

高濃度の PAM 添加では新しい SMBG の両機種①②とも不安定となり、PAM 濃度が 1000 (μ g/mL) より
大きくなるとエラーが表示され測定不能となった。SMBG 血糖測定電極法における PAM の影響
が明らかとなった。薬剤アスコルビン酸の影響において、グルテストミントでは低濃度アスコル
ビン酸 3mg/dL 以上で増加傾向を示した。両機種 (①Free Style リブレ、②グルテストミント)
ともにアスコルビン酸高濃度 5mg/dL 以上で血糖値の有意な増加が認められた ($p<0.01$)。高濃度
アスコルビン酸では、Free Style リブレのほうがグルテストミントに比べて血糖値上昇幅が大き
く変動係数 (CV) が高くなった。SMBG 器の温度変化による血糖値への影響は、グルテストミ
ントで変化が見られ、保存温度が低くなるに従って各濃度添加検体で有意な上昇を認めた ($n=10$ 、
 $p<0.01$)。

新しい機種 Free Style リブレは、連続血糖測定器として血糖およびインスリン投与量のコント
ロールに優れており、今後糖尿病患者の自己血糖測定器として普及すると思われる。

さまざまな SMBG の中で、治療の目的、生活習慣病改善においてどの機器を使用するかを選択し、
機種の特徴をよく理解し、薬剤の影響や季節、管理温度など影響要因を把握したうえで、正しい
血糖測定を行うことが重要である。

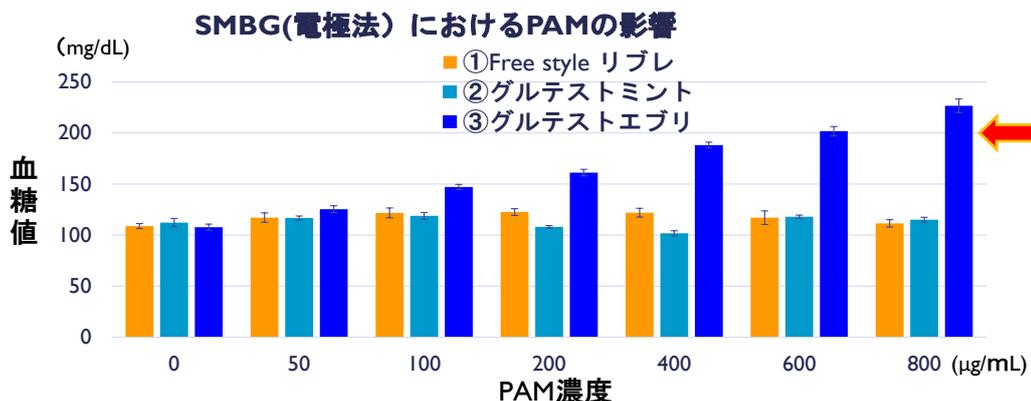


図1 SMBG（電極法）における薬剤PAMの影響

(2) 食事や有酸素運動における連続血糖測定CGMの変動要因の検討

糖質制限食による血糖および臨床検査値の変動を検討した結果、カロリーをコントロールし、普通食に比較して糖質制限をコントロールすることによって血糖の上昇が抑えられると考える。また、食事内容、野菜や主食（糖質：ご飯）の摂取する順番を考慮することによって、血糖値上昇を緩和できることがCGM Viewerのデータ分析から明らかとなった。さらに、きのこ類の中でも特に舞茸摂取時の一日のCGMによる血糖値の平均値変化について検討した結果、コントロールに比較して舞茸接種では血糖上昇が抑えられた（図2）。新PAMでんぷん反応で舞茸の酵素ジアスターゼ阻害効果を検討した結果、舞茸の血糖上昇抑制効果の1つの要因として、舞茸によるアミラーゼ消化酵素の阻害が考えられ、糖の吸収を抑える要因となることが示唆された。有酸素運動前後の食後60分値、食後90分値における血糖の平均値を比較する。臨床検査値9項目について比較検討を行った。インスリン：コントロール時のインスリンの減少率が35.8%であるのに対し、運動負荷では63.6%となった。血糖値：血糖値の減少率は、有酸素運動を行わないコントロールでは21%、運動負荷を行うと24.6%であった。総ケトン体、アセト酢酸、乳酸は運動後上昇が認められた。CGM Viewerで血糖の変動を解析した結果、コントロールに比較して有酸素運動により血糖値ピーク時までの血糖上昇率は抑えられていた（図3-1、3-2）。頸部超音波検査による流速の変化では、運動負荷前：食後60分に比べ運動負荷後：食後90分の平均流速でわずかに上昇傾向があったが、有意な差は認められなかった。

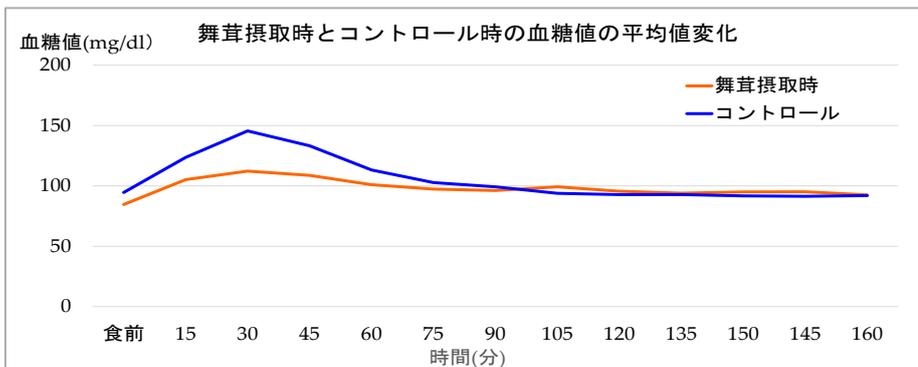


図2 舞茸摂取時と非摂取時の血糖値の変化

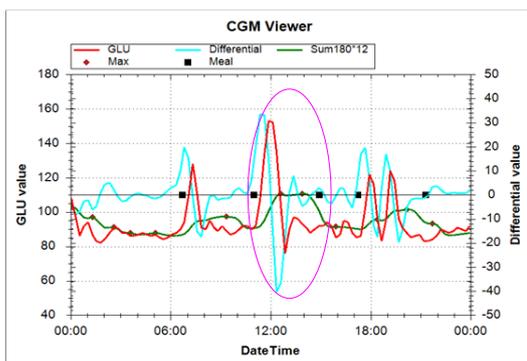


図3-1 運動負荷の血糖値と3時間積分値

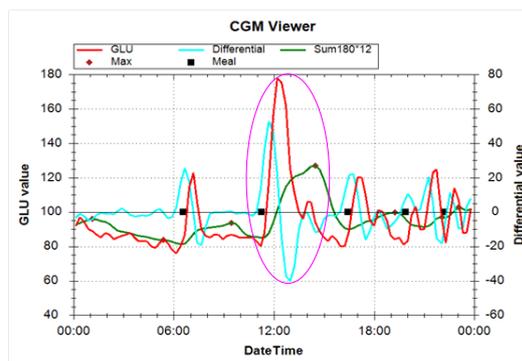


図3-2 コントロールの血糖値と3時間積分値

(3) 新 PAM でんぷん反応の教材開発

PAM 試薬条件も段階的に濃度を変えて条件設定するために比色分析の基礎的検討を行い、溶液中のでんぷん検出を 600nm で比色定量分析できるように操作法を確立することができた。PAM 反応試薬とでんぷん濃度を変えて反応条件設定を検討した結果、PAM 濃度に比例して、青色に発色し PAM 反応後の吸光度の上昇を比色測定することが可能となった。従来のでんぷん試薬はヨウ素の褐色が濃く、半定量分析には適していない。一方 PAM 反応試薬は無色であり、簡単いでんぷん反応が起こり、鮮明な青色を比色測定できることが分かった。この反応は比色測定が可能であり、同時再現性も良好な結果が得られた。でんぷん・糖検出実験では、でんぷん溶液に PAM 試薬を添加し青色に発色させた後、アミラーゼ酵素で加水分解しグルコースに変換させると反応液の青色は消失し無色となる。その後グルコース酵素試薬 (GOD・POD 呈色液) を添加してグルコースを鮮やかな赤色に変化させることができた。中高生が簡単に楽しくできる理科実験として、新 PAM でんぷん反応を利用して、溶液中のでんぷん検出反応、アミラーゼ酵素による加水分解反応、糖検出反応の一連の操作方法を視覚的に色の発色変化で理解しやすいように色調変化の定性実験方法を考案することができた。

(4) 新 PAM でんぷん反応を利用した用途開発

各でんぷん液を用いて、吸光度変化や最大吸収極大の変化を比較検討した結果、でんぷんの種類によって発色の色、最大吸収波長の変化の違い (570nm から 630nm) が認められた。定性反応は定量分析と異なり PAM 試薬の条件を変えないとうまく発色できない。定性反応の条件設定を検討した結果、試薬として使用する適切な PAM 濃度は 16,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。9 種類のでんぷん粉、果物、穀類および紙類のでんぷん検出反応の定性反応条件を検討した結果、新 PAM でんぷん反応で鮮明に青紫色の変化を観察することが可能となった。米類ではアミロースから成るうるち米は青紫色、アミロペクチンを多く含むもち米は赤紫色に呈色した。従来法と比較しても新 PAM 反応の方が色鮮やかに呈色することを確認した。紙類 (コピー用紙、ろ紙、新聞紙等) では従来法よりも新 PAM でんぷん反応では陰性の判定が容易であった。紙類に含まれるでんぷん検出について、従来のような素でんぷん試薬に比較して、試薬は安全でほぼ無色であり、鮮明に発色し簡便に操作を行うことが可能となった。果物中でんぷんを含むものは発色する。バナナは完熟度が増すに従ってブドウ糖に変換されるため、でんぷん反応の青紫色が薄くなっていた。

新 PAM でんぷん反応の測定法の条件設定を確立させ、さまざまな定量法や定性反応に応用できることが判明した。本研究の検討により、食品中のでんぷんの有無について、新 PAM でんぷん反応を用い、簡単に発色でき感度よく検出可能であることがわかった。食品中や紙類などのでんぷん検出反応に幅広く役立つものと思われる。さらに、でんぷんを含有するかまぼこなどの加工食品のでんぷん検出にも活用でき、食品の検閲検査に利用できる可能性が示唆された。

PAM でんぷん反応試薬 (PAM+ H_2O_2 液) は、従来のヨウ素ヨウ化カリウムでんぷん反応試薬と異なり、無色透明で環境にも優しく安全な試薬である。この試薬の反応原理を用いて、新しい PAM でんぷん反応の用途開発を確立することができた。この反応は他のでんぷんや糖検出実験等にも応用できると考えられ、今後、新 PAM でんぷん反応の新たな可能性と社会的意義、検査への普及が望まれるであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 永瀬澄香、片岡浩巳	4. 巻 46
2. 論文標題 血糖測定におけるSMBG器の有用性と問題点に関する検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kawasaki Igakkai Shi Liberal Arts & Sciences	6. 最初と最後の頁 51-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永瀬澄香、片岡浩巳	4. 巻 Vol.67 別冊
2. 論文標題 連続血糖測定（FGM）における影響要因の検討－糖質制限コントロールの有用性－	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 p198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永瀬澄香、片岡浩巳	4. 巻 Vol.67 別冊
2. 論文標題 新しい自己血糖測定器（SMBG）における薬剤影響要因の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 p199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永瀬澄香、片岡浩巳
2. 発表標題 Discovery of the new starch reaction and determination of the effect of pralidoxime on blood glucose measurement
3. 学会等名 2020AACC ANNUAL SCIENTIFIC MEETING（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永瀬澄香
2. 発表標題 有機リン中毒解毒剤 (PAM)を用いた新しい糖検査反応の開発
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永瀬澄香、片岡浩巳
2. 発表標題 連続血糖測定 (FGM)における影響要因の検討－糖質制限コントロールの有用性－
3. 学会等名 第66回 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永瀬澄香、片岡浩巳
2. 発表標題 新しい自己血糖測定器 (SMBG)における薬剤影響要因の検討
3. 学会等名 第66回 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永瀬澄香、上杉里枝、脇本敏裕、片岡浩巳
2. 発表標題 Free Style Libreを用いた連続血糖測定 (CGM)における検査値変動要因の解析
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新田 菜々子、尾崎 未羽、諏訪 なずな、石村 亜美、的野 咲美、山下 歌奈、永瀬澄香
2. 発表標題 新しいIPAMデンブun反応を利用した用途開発
3. 学会等名 第15回日本臨床検査学教育学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------