

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19550083  
 研究課題名（和文） シリンジを反応、濃縮、検出場とする生体関連物質の簡易セミマイクロ定量法の開発  
 研究課題名（英文） Development of simple and semi-micro scale determination methods using a syringe as reaction, concentration and detection field  
 研究代表者  
 鈴木 保任 (SUZUKI YASUTADA)  
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
 研究者番号：20262644

## 研究成果の概要：

広く溶液の採取に用いられているシリンジを、反応、検出あるいは濃縮の場として利用する簡易な分析法を目的とした。シリンジ内で分析に必要なほとんどの操作を行うことで、省力化と省試薬化が可能であった。シリンジに取り付けられる吸光度検出器を開発し、性能を評価するとともに、河川水中の微量鉄の定量に応用した。また、市販の試薬キットを利用した、ヒト免疫グロブリン G の定量法を検討し、市販装置と性能を比較し良好な結果を得た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

## 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：分析科学・簡易分析法・環境分析・生体関連物質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、疾病やストレスなどの指標として、生体内の微量物質の分析に対する関心が高まっている。このような微量物質を測定するには、血液、尿、唾液などを採取して分析することが一般的であるが、いずれも大量に採取することは困難であることから、必要とする試料量の少ない分析法の開発が望まれている。

またこれらの物質の濃度変化は、一定期間、ある程度の頻度で繰り返し測定して観測する必要がある。そのため前処理を含めた分析操作の簡易化及び迅速化や、試薬、試料量の低減が広く試みられている。例えば、フローインジェクション分析法 (FIA) は、試薬溶液を

ポンプにより細管に連続的に流し、この中に試料を注入して細管内で混合、反応、検出までを行う方法であり、従来のバッチ法と比較して大幅な省力化と迅速化が可能であるので、非常に多くの研究がなされている。しかし、試薬溶液を常時流し続けるために間欠的な定量には向いていないという問題がある。一方、コンピュータ制御の高度化に伴って、シリンジポンプや流路を切り替えるためのマルチポジションバルブを高精度に制御できるようになったことから、試薬溶液を連続的に流すのではなく、試料と同一の細管に逐次導入するシーケンシャルインジェクション分析法 (SIA) の研究が盛んに行われるようになってき

た。流路、流れの方向を柔軟に変更できるため、同一のシステムを様々な用途にそのまま利用できることや、精密なシリンジポンプを利用することから、1 mL以下の試薬使用量で定量可能という長所も併せ持っている。さらには、シリコン基板上に微小な流路を刻み、その上で試料の前処理や検出までを行う微小化学分析システム ( $\mu$ TAS) の発展も著しい。これらの方法は試料、試薬ともにごくわずかで済み、分析時間も非常に短くなるが、いずれも現時点では装置の価格が高く、例えば環境試料や臨床診断等のスクリーニングのような簡易な目的には、必ずしも普及が進んでいるとはいえない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、通常は一定量の溶液採取を目的として用いるシリンジを、反応、検出さらには濃縮の場として利用する簡易分析装置の開発を検討する。通常のバッチ法では、一定量を採取した試薬あるいは試料溶液を、別の反応用容器に移しながら逐次添加していき、調製の終わった溶液を分析装置あるいはさらに別の試料容器に移動して分析することになる。一方、本装置ではシリンジに採取した溶液を別の容器に移すことなく、次々に採取し、その中で混合及び反応を行う。また、検出についてもシリンジに吸光度検出器、あるいは電極を直接取り付けすることで、そのまま測定までを行えるようにする。さらには、シリンジの Needle 内に充填剤を詰め、ここで目的物質の抽出・濃縮を行う MEPS (Microextraction in Packed Syringe) 法、Needle 内壁を吸着剤でコーティングして同様な目的に使用する SPDE 法 (Solid Phase Dynamic Extraction) で用いられる Needle と組み合わせてオンライン濃縮することも検討する。なお、当初は本法のキャリーオーバー (試料、試薬が残存することにより次の測定に影響すること) や、繰り返し精度など基本性能を検討するため、シリンジの操作は手動で行う。この結果を受けて、シリンジ及び溶液選択を自動化できるようにし、最終的には検出部分と併せて各溶液の採取量や順序をコンピュータにより制御できるようにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 吸光度検出器の開発

構造が簡便で精度も安定している吸光度検出器の開発を行った。既開発の小型比色計を改造し、光源の LED 及び光検出器のフォトダイオード (PD) に光ファイバーを取り付け、シリンジと結合できるようにした。

### (2) 色素を用いる評価と攪拌装置の開発

色素メチルオレンジを用いて検量線を作成し、測定精度を検討した。続いて、色素溶液を段

階的に採取し、水で希釈して吸光度を測定し、混合方法について検討した。

### (3) 1,10-フェナントロリンを用いる鉄の定量による性能評価

すでに比色分析法として確立している鉄と 1,10-フェナントロリンの反応を利用し、試作した装置及び本法の性能を評価した。この実験においても、混合方法について検討した。

### (4) 1,10-フェナントロリン/チオシアン酸を比色試薬に、活性炭カラムを濃縮に用いる鉄の定量による性能評価

鉄の定量において実用的な感度を得るために、比色試薬にチオシアン酸ナトリウムを加え、シリンジ内で生成した錯体を含む溶液を活性炭カラムに通過し、錯体のみを捕集した。続いて、このカラムを、検出器を取り付けた別のシリンジにつなぎ、少量のアセトンを通じて錯体を溶離して濃縮・測定する方法を検討した。

### (5) 市販の測定キットを用いる生体関連物質の測定

一般にマイクロプレートを利用して測定される生体関連物質の定量を本法により行い、マイクロプレートリーダーの結果と比較した。測定対象として、ポリスチレンビーズ凝集法による測定キットが市販されているヒト免疫グロブリン (IgG) を選択した。

## 4. 研究成果

### (1) 吸光度検出器の開発

試作した検出器の外観を図 1 に、ブロック図を図 2 に示す。



図 1 吸光度検出器の外観

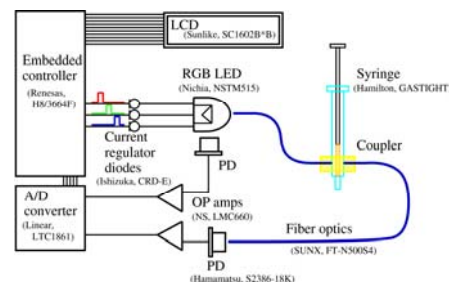


図 2 吸光度検出器のブロック図

写真に示すように、検出器は手の平に乗るほどの大きさであり、3色 (赤 630 nm, 緑 530

nm, 青 470 nm) の三波長における吸光度を測定できる。また、ACアダプタの他に 9 V 積層乾電池 1 個で駆動できるので、屋外での測定も可能である。透過光強度を測定する PD に加え、LED 直近に PD を設置し、光源光強度の変動を補正するようにした。

### (2) メチルオレンジ溶液の検量線と混合法の検討

種々の濃度 (0~90 μM) のメチルオレンジ溶液を調製し、250 μL シリンジで 100 μL 吸い上げて 470 nm における吸光度を測定し、検量線を作成した。得られた式は  $Abs_{470} = 3.47 C_{MO}$ 、相関係数は 0.999 となった。ここで、 $Abs_{470}$  は 470 nm における吸光度、 $C_{MO}$  はメチルオレンジの濃度 (μM) を表す。直線性は良好であり、測定誤差も最大で 8% と、少量の試料量及び簡便な装置ながら良好な結果が得られた。続いて、メチルオレンジ溶液と水を順次吸い上げてシリンジ内で混合して同様に測定したところ、均一な混合状態を得ることができず、検量線を作成できなかった。混合促進のため、携帯電話などに用いられている振動モーターをシリンジに当てて混合してみたが、均一な溶液を得るのに 30 分以上を要した。そこで、シリンジ先端に PTFE の細管 (内径 0.5 mm、全長 50 cm、体積 100 μL) を取り付け、プランジャーの上下動によってこの細管内も利用して混合するようにしたところ、4 回程度の往復で一定の吸光度が得られるようになった。

### (3) 鉄の検量線作成

1,10-フェナントロリンを比色試薬として用い、0~10 mg/L の範囲で鉄の検量線を作成した。操作を図 3 に示す。

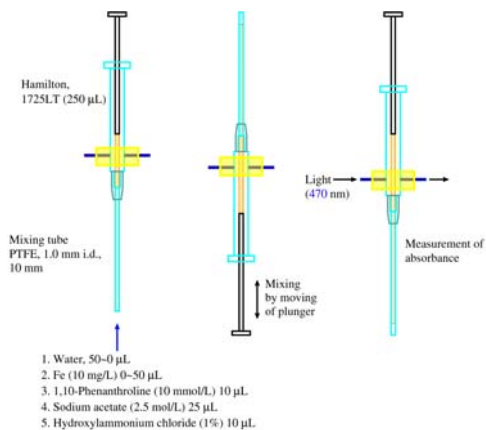


図 3 鉄の定量操作

メチルオレンジの定量の場合と同様の細管を用いて混合を行った場合、得られた検量線の式は  $Abs_{470} = 0.015 C_{Fe} - 0.001$  となり、相関係数は 0.991 であった。ここで  $C_{Fe}$  は鉄の濃度 (mg/L) である。pH の調整に使用した酢酸ナトリウム溶液 (2.5 M) の粘性が非常に高いため、メチルオレンジの測定の場合とは異なり、良好な検量線を得ることができな

かった。また、測定精度も最大 20% と悪化した。より容易に拡散できるように、細管を内径 1 mm、全長 10 mm、体積 90 L に変更したところ、図 4 に示すようにプランジャーを 4 回程度往復させるだけで混合が完了し、得られた検量線の式も  $Abs_{470} = 0.012 C_{Fe} - 0.001$  となり、相関係数は 0.999 と良好な直線性を有していた。これを図 5 に示す。

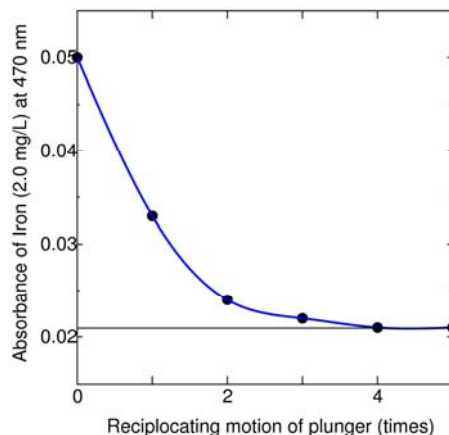


図 4 鉄 2 mg/L 溶液の発色操作時におけるプランジャー往復運動と吸光度変化の関係

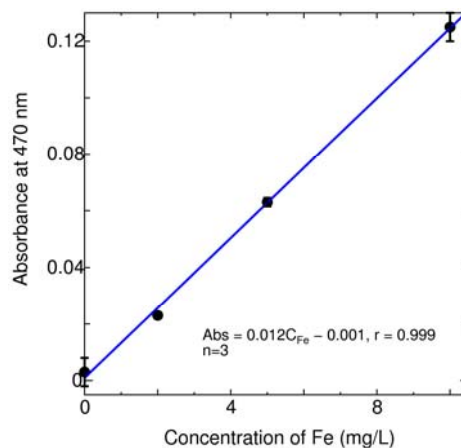


図 5 1,10-フェナントロリンを比色試薬として用いる鉄の検量線 (濃縮操作なし)

### (4) 活性炭による濃縮操作を併用する鉄の高感度定量

(3) により、鉄の定量が可能であることがわかったが、天然水などの実際試料中の鉄を定量するには、大幅に感度が不足していた。そこで、比色試薬に 1,10-フェナントロリンに加えてチオシアン酸イオンを用いるとともに、生成した錯体を一旦活性炭カラムに捕集し、それを少量のアセトンによって溶離することで濃縮する方法を検討した。操作を図 6 に示す。試料調製には、今までよりも大容量な 2.5 mL シリンジを用いた。この場合、プランジャーを上下動させる必要はなく、単に数回シリンジを反転動させるだけで溶液の混合は完了した。錯体を捕集したカラムを測定用シリンジ (250 μL) に付けかえて、80 μL

のアセトンで溶離しそのまま吸光度を測定した。

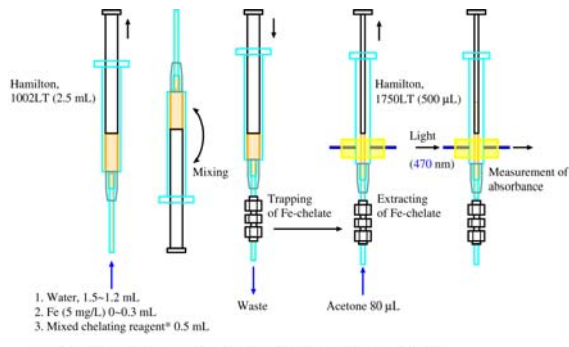


図 6 活性炭カラムを用いる鉄の定量操作

得られた検量線の式は、相関係数は 0.995 となり、直線性は若干悪化したものの濃縮操作を用いない方法に比べて 1 桁以上の高感度化を達成できた。7 回のブランクの測定値の標準偏差の 3 倍から求めた検出限界は 30  $\mu\text{g/L}$  であった。検量線を図 7 に示す。

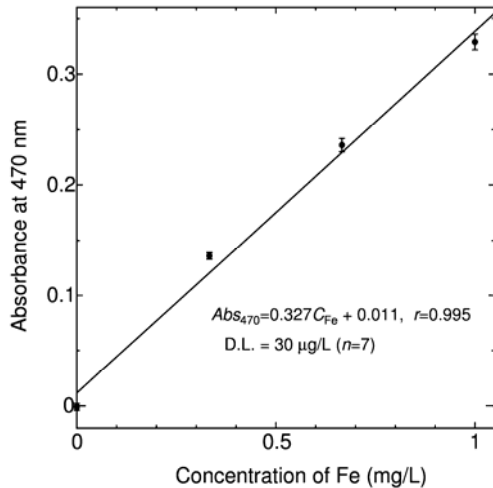


図 7 活性炭カラム濃縮・定量法による鉄の検量線

実用的な感度を得ることができたため、実際試料として河川水試料中の鉄の定量を試みた。黒鉛炉原子吸光法 (GFAAS) による測定も行い、定量値を比較した。結果を表 1 に示す。

表 1 活性炭カラム濃縮・定量法による河川水試料中の鉄の定量結果 ( $\mu\text{g/L}$ )

試料採取日	本法, $n=6$	GFAAS, $n=3$
2008/ 9/22	40 $\pm$ 4	40 $\pm$ 2
2008/10/17	42 $\pm$ 2	47 $\pm$ 3

このように、測定精度 10%以内、比較法との誤差も概ね 10%以内と、簡便な操作、装置でありながら高感度かつ高精度な鉄の定量を行うことができた。

### (5) 市販測定キットを用いるヒト免疫グロブリン G 定量への応用

Pierce 製ヒト IgG(H+L) 測定キットを用いた。本キットの通常操作は、IgG 抗体を固定したポリスチレンビーズ 10  $\mu\text{L}$  に IgG を含む標準溶液あるいは試料 10  $\mu\text{L}$  を添加して 5 分間振とうし、反応させた後、緩衝溶液 50  $\mu\text{L}$  を添加して 5 分間振とうして反応を停止する。IgG の量が多くなるにつれ、抗体修飾ビーズが凝集して光の散乱が小さくなるので、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定して検量線を作成した。本法では、マイクロプレート上で同様な操作を行った後、シリンジに吸い上げて吸光度を測定した。吸光度検出器の LED は 400 nm の紫色単色 LED に変更した。本法及びマイクロプレートリーダーで得られた検量線を、それぞれ図 7 及び 8 に示す。

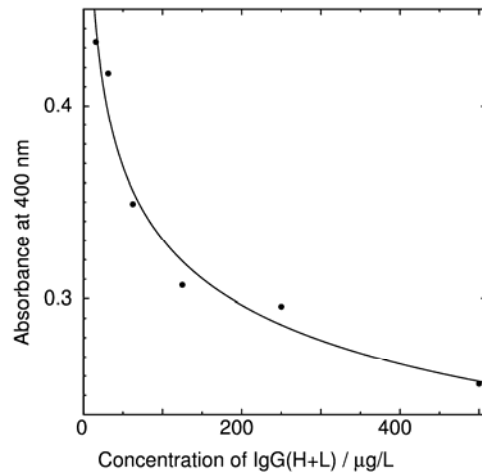


図 7 本法によるヒト IgG の検量線

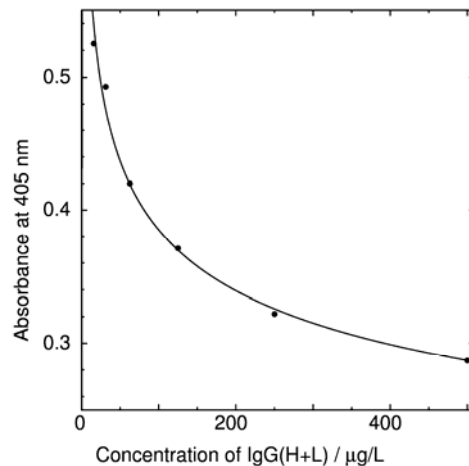


図 8 マイクロプレートリーダーによるヒト IgG の検量線

このように、マイクロプレートリーダーとほぼ同様な検量線を得ることができた。低濃度域において、若干吸光度が低く出るものの、この濃度範囲ではほぼ同等の感度が得られた。

## (6) 結言

以上のように非常に簡便な装置でありながら、通常の分析法と比較して 1/10 から 1/100 の試薬スケールで容易に測定できる分析法を開発することができた。精度については、スケールを低減したにも関わらず、さほど悪化せず実用的な範囲内であった。

本課題では装置の構造が単純であることから吸光光度法を選択したが、さらに感度を向上する必要がある。濃縮法を組み合わせるのは一つの方法であるが、本質的に高感度な検出法を用いる方が操作も容易になる。計画していたものの、実施できなかった電気化学検出法は試料量が少なくても高い感度を得られるので、引き続き開発及び検討を続けて行きたい。別の研究課題では、蛍光光度検出により、同様にシリンジを用いてセレンの高感度定量に成功している。これらの検出器を用いて、環境試料中の重金属元素の現場定量への応用や生理活性物質や疾病マーカー物質など種々の生体関連物質の定量に展開を図る予定である。

また、シリンジポンプを用いて操作の自動化を予定していたが、試薬溶液の交換が困難であること、混合にプランジャーの往復運動が必要であることから、実現できなかった。これに変わり、従来のフローインジェクション分析法 (FIA) で用いられるような合流路を用いる混合法を検討している。FIA では連続的な試薬の流れとなるが、流路にバルブを設け、これを逐次切り換えることで SIA のように間欠的な運転ができるようにする。現在はシリンジ、バルブとも手動であるが、鉄の濃縮定量用の流路を試作し、感度が若干劣るものの高精度な定量ができることを確認した。感度の向上を図るとともに、シリンジとバルブをそれぞれソレノイドポンプとソレノイドバルブに変更することで、操作の自動化を進めている。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

### (1) 鈴木保任、佐伯康介、川久保進

白色発光ダイオード光源及び半導体色センサーを用いる簡易型色彩色差計の開発と評価、  
第 57 回日本分析化学会年会、2008 年 9 月 11 日、福岡大学七隈キャンパス)

### (2) 鈴木保任、橋ヶ谷尚生、久保総太郎、川久保進、

シリンジを比色セルとして用いる簡易セミマイクロ比色分析装置の開発(2)、  
第 69 回分析化学討論会、2008 年 5 月 16 日、

名古屋国際会議場

(3) 鈴木保任、高柳俊夫、本水昌二、川久保進、  
環境及びものづくり体験教育を指向した簡易分析装置教材の開発、  
第 56 回日本分析化学会年会、2007 年 9 月 19 日、徳島大学工学部

(4) 橋ヶ谷尚生、鈴木保任、川久保進、  
シリンジを比色セルとして用いる簡易セミマイクロ比色分析装置の開発、  
第 68 回分析化学討論会、2007 年 5 月 20 日、  
宇都宮大学峰キャンパス

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 保任 (SUZUKI YASUTADA)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：20262644

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし