

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：33903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288072

研究課題名(和文) 呼気フロー分析による低侵襲な化学診断法の創成

研究課題名(英文) Non-invasive chemical diagnostic methods by flow breath analysis

研究代表者

手嶋 紀雄 (Teshima, Norio)

愛知工業大学・工学部・教授

研究者番号：30292501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はフローインジェクション分析(FIA)法を始めとするフロー分析法が、呼気分析に適していることを示してきた。本研究では、拡散スクラバーによって呼気アセトンガスを捕集し、FIAによって蛍光光度測定する方法を開発した。またFIAの技術を発展させた同時注入迅速混合フロー分析(SIEMA)法が自動的な溶液ハンドリングに適していることを検証するために、微量なVとFeのSIEMA/接触分析法を開発した。この結果を基にSIEMAによってプレカラム誘導体化HPLC法における誘導体化反応を自動的に行うことに成功した。本成果は、呼気中のアルデヒド類の検出による肺がんなどの化学診断法として発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have proved so far that flow injection analysis (FIA) and related techniques are useful for human breath analysis. In this project, a flow injection fluorometric determination of acetone in human breath was developed. Gaseous acetone in breath was sampled with a porous membrane based diffusion scrubber, then the absorbing solution including acetone merged with an alkaline salicylaldehyde, and the fluorescence intensity of salicylaldehyde decreased with increasing the acetone concentration. On the other hand, SIEMA systems we conceived can minimize the amount of sample solution and the reagent consumption. Also, it is a useful concept for automatic solution handling. We also proposed a SIEMA system for automatic pre-column derivatization HPLC determination of formaldehyde, acetaldehyde, acrolein and acetone. In the near future, an automated pre-column derivatization HPLC method for the determination of aldehydes and acetone in human breath using a SIEMA system would be developed.

研究分野：分析化学

キーワード：非侵襲分析 呼気分析 流れ分析 呼気アセトン 吸光光度法 HPLC

### 1. 研究開始当初の背景

米国がん学会と米国糖尿病学会との共同研究グループは、糖尿病が、がんの罹患率を高めるとの報告をしている (Diabetes Care 33 (2010) 1674)。従って、糖尿病の食事療法における精密な経過観察は、糖尿病の進行を防ぐと共に、がん予防に役立つ。

一方、医療機関において生命維持に必須な肺機能の評価に換気血流比が測定される。測定法の1つに多種不活性ガス排泄法があるが、侵襲的かつ煩雑であり、本法を日常的な臨床検査の一環として施行される施設はない (呼吸と循環 60 (2012) 495)。そこで、緊急を要する集中治療室において利用可能な低侵襲かつ実用的な方法の開発が望まれている。

以上の背景から、がんの早期発見・食事療法の経過観察・肺機能評価に有用な呼気ガス分析に基づく低侵襲な化学診断法の開発が急務と考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

呼気ガス分析は、血液分析に代わる痛みの少ない低侵襲かつ簡便な健康管理・病態診断法として注目されている。申請者は、拡散スクラバーを用いるガス捕集に基づくフロー分析法が、呼気ガス分析に有効であることを世界で初めて示した。本研究は、がんの早期発見、糖尿病の食事療法・経過観察、並びに集中医療を支援するために、痛みを伴わない低侵襲な呼気フロー分析法に基づく化学診断法を創成するものである。

GC-MS は多種のガスの高選択的分析法として有用であるが、コストが高く、低分子量 (例えば HCHO) のガス分析は困難である。本研究では、低濃度のアルデヒド類・アセトンガスを拡散スクラバーにより捕集し、吸収液をプレカラム誘導体化 HPLC システムに導入して分離分析を行う方法論の開発を最終目標の一つとした。終了までにアルデヒド類の呼気分析に到達できなかったが、これまでのフロー分析法を進化させた同時注入迅速混合フロー分析法 (Simultaneous Injection Effective Mixing Flow Analysis, SIEMA) による自動的な誘導体化システムを確立することに成功したので、以下その成果について詳述する。

### 3. 研究の方法

図 1 に SIEMA 法の原理を示す。SIEMA 法は、我々の研究室で開発された新しいフロー分析法の一つである。典型的な分析プロトコルを示すと次のようになる。シリンジポンプにより数十～数百  $\mu\text{L}$  の試薬 1、試薬 2、試料が流路に吸引され、逆方向の流れで同時に混合コイルに送られることにより、誘導体化反応が進行する。誘導体は自動的に HPLC へ送られる。本 SIEMA の有効性を確認するために、微量バナジウム及び鉄の接触分析法を用いて、以下の成果を得た。

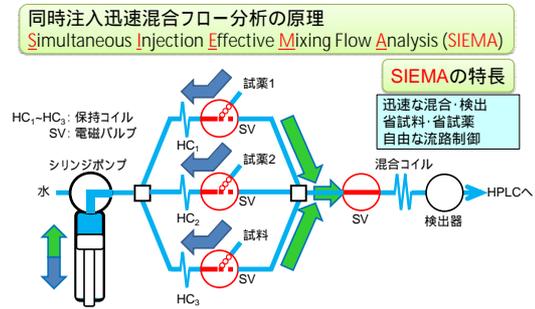


図 1 同時注入迅速混合フロー分析 (SIEMA) 法の原理。

### 4. 研究成果

まず  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ppb) レベルのバナジウム、鉄の接触 (均一触媒) 作用について検討した。*p*-アニシジンは臭素酸カリウムにより酸化発色 (510 nm) する。この発色反応がサブ  $\mu\text{g L}^{-1}$  レベルのバナジウムによって加速された。またこのバナジウムの接触反応はタイロンによって活性化された。一方 *p*-アニシジンは過酸化水素によっても酸化発色 (510 nm) し、この反応が  $\mu\text{g L}^{-1}$  レベルの鉄によって加速された。この接触反応は、1,10-フェナントロリン (phen) によって活性化されることが見いだされた。

SIEMA 法により、バナジウム定量用の試薬溶液として「*p*-アニシジン + タイロン + ニリン酸 (鉄の隠蔽剤)」混合溶液と臭素酸カリウム溶液を合計 400  $\mu\text{L}$  吸引・吐出し、100  $\mu\text{L}$  の試料溶液と混ぜ合わせた。この反応溶液をシステム内の加熱されたループに充填し、反応促進後、検出器に導入し、吸光度を測定したところ、サブ  $\mu\text{g L}^{-1}$  レベルのバナジウムに比例したシグナルが得られた。一方、鉄定量用の試薬として「*p*-アニシジン + phen」混合溶液と過酸化水素溶液を用いることで、バナジウム共存下であっても選択的に鉄の定量を行うことができた。検出限界はそれぞれ、0.67  $\mu\text{g V L}^{-1}$ 、2.20  $\mu\text{g Fe L}^{-1}$  と高感度である。本法を標準物質に応用したところ、保証値と一致する良好な結果を得た。得られたシグナルの例を図 2 に示す。

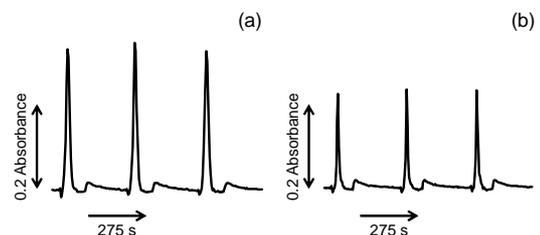


図 2 日本分析化学会頒布の河川水標準物質 (JSAC 0302-3b) を定量した際の SIEMA シグナルの例. (a) バナジウム; (b) 鉄。

以上の結果により，SIEMA システムが HPLC のための有効なプレカラム誘導体化システムとして機能することが明らかとなった。

#### 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 10 件)

- (1) M. Sawano, “Demonstration and quantification of the redistribution and oxidation of carbon monoxide in the human body by tracer analysis”, *Med. Gas Res.*, **6**, 59–63 (2016). 査読有.  
doi: 10.4103/2045-9912.184598
- (2) 村上博哉, 神谷修平, 柘植政宏, 葛谷真美, 森田健太郎, 酒井忠雄, 手嶋紀雄, “鉄鋼中リン定量法の高度化を指向した酸化処理の視覚情報収集とフローインジェクション吸光光度分析”, *分析化学*, **65**, 387–392 (2016). 査読有.  
doi: 10.2116/bunsekikagaku.65.387
- (3) G. Giakissikli, P. Zachariadis, I. Kila, N. Teshima, A. Anthemidis, “Flow injection solid phase extraction for trace metal determination using a chelating resin and flame atomic absorption spectrometry detection”, *Anal. Lett.*, **49**, 929–942 (2016). 査読有.  
doi: 10.1080/00032719.2015.1038547
- (4) A. A.-Quezada, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, S. Motomizu, “Advanced stopped-in-loop flow analysis with a reagents-merging zones technique for a catalytic successive determination of vanadium and iron”, *Anal. Sci.*, **31**, 1099–1103 (2015). 査読有.  
doi: 10.2116/analsci.31.1099
- (5) A. A.-Quezada, D. Noguchi, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, “Simultaneous injection effective mixing flow analysis system for spectrophotometric determination of palladium in dental alloy and catalyst”, *J. Flow Injection Anal.*, **32**, 13–17 (2015). 査読有.  
[http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/32\\_1/HP/JFIA32\(1\)\(2015\)PP.13.pdf](http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/32_1/HP/JFIA32(1)(2015)PP.13.pdf)
- (6) A. A.-Quezada, K. Ohara, N. Ratanawimarnwong, D. Nacapricha, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, “Stopped-in-loop flow analysis system for successive determination of trace vanadium and iron in drinking water using their catalytic reactions”, *Talanta*, **144**, 844–850 (2015). 査読有.  
doi: 10.1016/j.talanta.2015.07.006
- (7) M. A. Rizvi, N. Teshima, S. R. Maqsood, S. A. Akhoun, G. M. Peerzada,

“Thermo-Kinetic Investigation of Comparative Ligand Effect on Cysteine Iron Redox Reaction”, *Croat. Chem. Acta*, **88**, 67–72 (2015). 査読有.

doi: 10.5562/cca2479

- (8) G. Giakissikli, A. A.-Quezada, J. Tanaka, A. N. Anthemidis, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, “Automatic On-Line Solid Phase Extraction-Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Exploiting Sequential Injection Analysis for Trace Vanadium, Cadmium and Lead Determination in Human Urine Samples”, *Anal. Sci.*, **31**, 383–389 (2015). 査読有.  
doi:10.2116/analsci.31.383
  - (9) K. Ponhong, N. Teshima, K. Grudpan, J. Vichapong, S. Motomizu, T. Sakai, “Successive determination of urinary bilirubin and creatinine employing simultaneous injection effective mixing flow analysis”, *Talanta*, **133**, 71–76 (2015). 査読有.  
doi:10.1016/j.talanta.2014.05.065
  - (10) N. Ratanawimarnwong, N. Teshima, T. Sakai, D. Nacapricha, S. Motomizu, “Simultaneous Injection Effective Mixing Flow Analysis (SIEMA): Its Development and Application”, *J. Flow Injection Anal.*, **31**, 15–17 (2014). 査読有.  
[http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/31\\_1/HP/JFIA31\(1\)\(2014\)PP.15.pdf](http://jafia.kyushu-u.ac.jp/japanese/jfia/contents/31_1/HP/JFIA31(1)(2014)PP.15.pdf)
- [学会発表](計 13 件)
- (1) R. Ichisugi, K. Seebunrueng, H. Murakami, S. Srijaranai, T. Umemura, T. Sakai, N. Teshima, “Simultaneous injection effective mixing flow analysis (SIEMA) system for automatic pre-column derivatization HPLC fluorimetric determination of aldehydes and acetone”, The 13<sup>th</sup> Asian Conference of Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIII), Chiang Mai (Thailand), 2016 年 12 月 10 日.
  - (2) N. Teshima, A. Inoguchi, M. Yamashita, R. Ichisugi, H. Murakami, T. Sakai, “Auto-pretreatment systems based on sequential injection solid phase extraction”, The 20<sup>th</sup> International Conference of Flow Injection Analysis (ICFIA), Palma de Mallorca (Spain), 2016 年 10 月 6 日.
  - (3) 手嶋紀雄 (招待講演), “流れ分析法によるヒト代謝物質の非侵襲分析”, (株)東ソー分析センター主催 第 10 回分析技術セミナー, ヒルトン名古屋, 愛知県名古屋市, 2016 年 6 月 21 日.
  - (4) 一杉理香, 村上博哉, K. Seebunrueng, S. Srijaranai, 梅村知也, 手嶋紀雄, 酒井忠

- 雄, “アルデヒド類とアセトンのシーマ法によるオンライン誘導体化 / HPLC”, 第 76 回分析化学討論会, 岐阜薬科大学・岐阜大学, 岐阜県岐阜市, 2016 年 5 月 28 日.
- (5) N. Teshima (Invited lecture), H. Murakami, “Determination of biological samples by flow analysis and its potential to medical support”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), Honolulu (USA), 2015 年 12 月 16 日.
- (6) N. Teshima, H. Murakami, “Determination of Some Breath VOCs by Diffusion Scrubber Coupled to Flow-Based Chemical Analysis”, IABR (International Association of Breath Research) summit 2015 (IABR's 10<sup>th</sup> anniversary conference), Vienna (Austria), 2015 年 9 月 15 日.
- (7) 一杉理香, K. Seebunrueng, 村上博哉, S. Srijaranai, 梅村知也, 酒井忠雄, 手嶋紀雄, “CNET 誘導体化アルデヒド類, アセトンの HPLC”, 第 34 回分析化学中部夏期セミナー, 三保園ホテル(静岡県静岡市), 2015 年 9 月 1 日.
- (8) N. Teshima (Invited lecture), H. Murakami, T. Sakai, “Flow chemical analysis methods for water quality assessment”, The 13<sup>th</sup> International Conference on Flow Analysis (Flow Analysis XIII), Prague (Czech Republic), 2015 年 7 月 7 日.
- (9) H. Murakami, R. Kawamura, B. Uno, N. Teshima, Y. Ishihama, Y. Esaka, “Development of Facile Pretreatment Method Using Home-Made Pretreatment Device for LC-MS/MS Analysis of Trace Amounts of DNA Adducts”, 63<sup>rd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, St. Louis (USA), 2015 年 6 月 3 日.
- (10) Y. Yoshino, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, “Flow injection fluorimetric determination of gaseous isoprene”, The 19<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques (19<sup>th</sup> ICFIA) ACROS Fukuoka (福岡県福岡市), 2014 年 12 月 4 日.
- (11) A. A.-Quezada, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, S. Motomizu, “Catalytic determination of vanadium and iron by simultaneous injection effective mixing analysis system”, The 19<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques (19<sup>th</sup> ICFIA) ACROS Fukuoka (福岡県福岡市), 2014 年 12 月 4 日.
- (12) N. Teshima, “Affordable flow-based analysis of human metabolites”, The 2014 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry, Shenyang, (China), 2014 年 8 月 24 日.
- (13) N. Teshima, Tadao Sakai, “Flow Injection Analysis Methods for the Collection and Reagent-Based Assay of VOCs”, The 8<sup>th</sup> International Conference on Breath Research & Cancer Diagnosis (Breath Analysis 2014), Torun (Poland), 2014 年 7 月 7 日.
- 〔図書〕(計 6 件)
- (1) 角田欣一, 戸田 敬監訳, “クリスチャン Excel で解く分析化学”, 手嶋紀雄分担訳, “第 7 章 機器分析における Excel の活用”, 丸善 (2017) pp. 109–123. 総頁数 127.
- (2) 今任稔彦, 角田欣一監訳, “クリスチャン分析化学 II. 機器分析編”, 手嶋紀雄分担訳, “第 23 章 反応速度分析” pp. 311–326, “第 24 章 測定の自動化” pp. 327–337, 丸善 (2017). 総頁数 368
- (3) “医薬品、食品、化粧品、環境、工業材料における微量金属分析とその前処理技術”, 酒井忠雄, 手嶋紀雄分担執筆, “血清中の銅・鉄・亜鉛の吸光光度 FIA 及び尿中のバナジウム・カドミウム - グラファイト炉 AAS”, (技術情報協会), (2015) pp. 252–260. 総頁数 605.
- (4) 小熊幸一, 酒井忠雄編著, “基礎分析化学”, 手嶋紀雄分担執筆, “第 7 章 光分析”, 朝倉書店 (2015) pp. 119–154. 総頁数 198.
- (5) 大谷 肇編著, “機器分析(エキスパート応用化学テキストシリーズ)”, 手嶋紀雄分担執筆, “第 18 章 フローインジェクション分析”, 講談社 (2015) pp. 251–265. 総頁数 281.
- (6) 中村栄子, 酒井忠雄, 本水昌二, 手嶋紀雄共著, “環境分析化学”, 裳華房 (2014). 総頁数 211.
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.aitech.ac.jp/~analabo/>

## 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・教授  
研究者番号：30292501

### (2) 研究分担者

梅村 知也 (UMEMURA, Tomonari)  
東京薬科大学・生命科学部・教授  
研究者番号：10312901  
澤野 誠 (SAWANO, Makoto)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40242143  
村上 博哉 (MURAKAMI, Hiroya)  
愛知工業大学・工学部・准教授  
研究者番号：40515128