

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19182

研究課題名(和文) 生体試料中の酸化・還元物質の影響を受けない超高感度検出法の開発とその発展性の検証

研究課題名(英文) Development of ultra-sensitive detection method not affected by oxidation / reduction substances in biological samples and verification of its development

研究代表者

外園 栄作 (HOKAZONO, EISAKU)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：60404042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素を高感度に検出するための色素と金属の組合せ、また、それをより高感度に反応させるための至適条件を見出すことに成功した。ただし、目標とした測定感度は現行の検出技術の15～40倍ほどにとどまり、目標とする100倍程の感度には到達できなかった。今後、更に感度を追求し、本法の高感度検出技術の有用性、応用性について検証を行う。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in finding combinations of dyes and metals for highly sensitive detection of hydrogen peroxide and optimum conditions for reacting them with higher sensitivity. However, the target measurement sensitivity was only 15 to 40 times the current detection technology, and it was not able to reach the target sensitivity of about 100 times. In the future, we will pursue further sensitivity and verify the usefulness and applicability of the high sensitivity detection technique of this method.

研究分野：臨床化学

キーワード：高感度検出 錯体化学 過酸化水素

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体成分の定量や酵素活性の測定は、病態を把握する上で不可欠である。生体成分分析領域である臨床化学分析では、迅速に結果を得ることが要求される上、目的成分の含有量も少なく、しかも試料採取量は微量であることが要求される。従って、生体成分の分析法を開発する上で、その方法は簡易・迅速かつ高感度であり、優れた特異性を有することが要求されている。

(2) これまで様々な臨床検査における測定法の改良や診断バイオマーカーを含む新しい測定法の開発・研究に携わってきたが、生体試料分析において最も重要な事は、最後の検出課程におけるその感度の善し悪しが、目的物質検出において大きな鍵を握っていると考え。

本研究では、その検出感度の改善において、酵素測定法を原理とする測定系全般にわたり応用が可能であることから、汎用性の高い技術革新として、臨床検査領域に限らず研究領域における検出技術改良に大きく貢献できると考え、本研究の着想・着手に至った。

2. 研究の目的

臨床検査における生体成分の臨床化学分析では、多くのオキシダーゼ系酵素が用いられ、生成した過酸化水素をトリンダー試薬とペルオキシダーゼにより酸化縮合させ生成した色原体の呈色を検出する方法(POD-H₂O₂系)が多く用いられている。そのため、この測定系は試料中の還元物質の影響を強く受け、測定の特異性に難がある。特に尿を試料とする際には大きく影響を受ける等の問題が残されている。

(1) 本研究では従来の酸化還元反応による検出ではなく、直接、過酸化水素を定量する高感度測定系の構築を目指す。H₂O₂・金属・キレート錯体形成と界面活性剤による三元錯体の発色を誘導することで現行のオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ発色法よりもさらに高感度で特異性の高い新しい検出系の開発を試みる。

(2) 現行法とその性能、主にその測定感度や検出特異性を比較評価する事で、今後の臨床応用への可能性を探索・実証する。以上が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 異なる pH, モル濃度の緩衝液を作成し、各種金属・キレータを更に数段階の濃度の組み合わせを用いて過酸化水素に対する呈色反応性を検証した。

(2) 見出した金属・キレータについて更に細かく pH, 濃度等を振り検討を行い過酸化水素に対する最適な条件を見出す。

(3) 様々な緩衝液(pH3.0, 5.0, 7.0, 9.0)を用意して、これに過酸化水素を添加することで、様々な pH における試料を作成した。この試料を用いてさまざまな pH 環境中における過酸化水素自身の安定性について検討した。

(4) 最適な組み合わせの環境において過酸化水素を反応させ、現行法である POD-H₂O₂ 検出系との感度の比較検討を行った。比較には感度の指標の一つであるモル吸光係数()を用いて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 検討の結果、いくつかの金属キレータと金属の組み合わせにおいて過酸化水素と

の反応が確認された。呈色反応が確認された組み合わせにおいての緩衝液の pH は中性から酸性領域において過酸化水素と反応するものが多かった。反応の確認された組み合わせの一例を図 1 に示す。

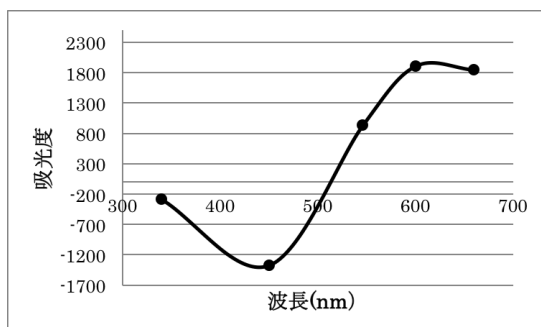


図 1 . キレート A と Fe() との組み合わせにおける過酸化水素との反応 (過酸化水素反応終濃度 3.3 $\mu\text{mol/L}$)

グラフはブランクを差し引いて作図

(2) 過酸化水素の各 pH 環境における安定性について調べるために、各種 pH の緩衝液に過酸化水素を添加し 10 分放置後に過酸化水素を POD-H₂O₂ 検出系にて検出しその呈色程度に差があるかを検証した。図 2 に示すように 10 分間放置したいずれの環境においても pH の違いによる呈色の差はほとんどなく過酸化水素は安定であった。このことは、初発酵素を含む酸化酵素の持つ反応至適 pH にとられることなく、生成した過酸化水素を本法の最適な反応条件下に導き込んだ後に検出が可能であるといえる。

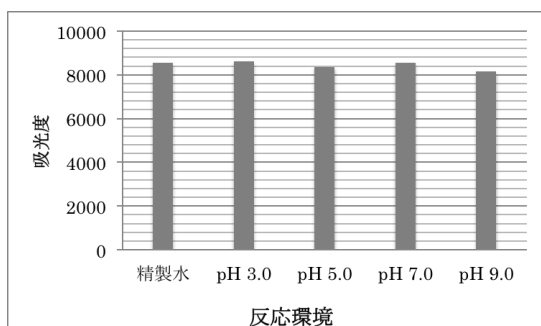


図 2 . 各種 pH 環境における過酸化水素の呈

色程度

(3) モル吸光係数()を算出して、現行法の POD-H₂O₂ 検出系(トリンダー試薬 : T00S)と本法との感度の比較を行った。表 1 に示すように本法のモル吸光係数()は 2.5×10^5 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) と現行法と比較して約 10 倍以上、NADH 検出系 (= 6,300 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)) と比較して約 40 倍もの感度を有するに至った。しかしながら、目標とする感度は 100 倍以上を目指していたため、今後更に至適条件を詰めることで高感度化を目指す。

表 1 . 現行法と本法との比較

	吸光度 [abs]	モル吸光係数 [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
POD 系呈色反応	0.025	2.4×10^4
本 法	0.26	2.5×10^5

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

Preliminary study on a high-sensitivity hydrogen peroxide detection method using the metal chelating reagent, Chromazurol B (CAB)

Eisaku Hokazono, Susumu Osawa Eri Ohta, Miki Kawano, Takiko Tateishi, Masanori Seimiya, Yuzo Kayamori

American Association for Clinical Chemistry, 2017, San Diego, USA

Development of the high-sensitivity assay of protein by new principle of three-dimensional complex with protein-copper-Chromazurol B

Eisaku Hokazono, Yuri Fukuya, Eri Ohta,
Yukari Kawamoto, Takiko Tateishi, Miki
Kawano, Susumu Osawa, Yuzo Kayamori
Asia-Pacific Federation for Clinical
Biochemistry, 2016, Taiwan

〔図書〕（計1件）

外園 栄作 他、日本臨床検査自動化学会
会誌、臨床化学検査に用いる測定試薬の成り
立ちと特徴および適正な使用方法 各論 1 .
臨床化学検査測定試薬に共通に使用される
成分、試薬としての主な発色剤とその特徴
2017 53-61

6 . 研究組織

(1)研究代表者

外園 栄作 (HOKAZONO, Eisaku)

九州大学・大学院医学研究院 保健学部
門・講師

研究者番号：60404042

(2)研究協力者

大澤 進 (OHSAWA, Susumu)

栢森 裕三 (KAYAMORI, Yuzo)

清宮 正徳 (SEIMIYA, Masanori)

河野 弥季 (KAWANO, Miki)