

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18750064
 研究課題名 (和文) ヘリコバクター・ピロリの感染診断のための呼気中アンモニア分析装置の開発
 研究課題名 (英文) Development of analytical system for determining ammonia in breath to diagnose *Helicobacter pylori* infection
 研究代表者
 小谷 明 (KOTANI AKIRA)
 東京薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号：40318184

研究成果の概要： 呼気中アンモニア測定をターゲットとしたヘリコバクター・ピロリの感染診断法として、トコフェロールの電解酸化に基づく電気化学検出フローインジェクション分析を開発した。本法は、呼気捕集バックに採取した呼気について簡便にアンモニア測定が行えることを示した。さらに、スナネズミを用いた尿素呼気試験にも適応でき、非標識尿素を用いる尿素呼気試験法として有望であることを示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	330,000	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：分析化学、電気化学、*H. pylori*、尿素呼気試験、アンモニア、フローインジェクション分析

1. 研究開始当初の背景

胃潰瘍患者の 80%、十二指腸潰瘍患者の 90%に、ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) の感染が認められる。これらの胃潰瘍及び十二指腸潰瘍患者に抗生物質を投与すると、*H. pylori* を除菌することができる。しかし、除菌治療には耐性菌の出現といった問題があり、治療の開始はもちろん、確実に除菌ができたかどうか判断できる正確な診断法が必要である。現在、*H. pylori* 感染診断法と

して、迅速ウレアーゼ試験、顕鏡法、培養法、抗体測定、尿素呼気試験、PCR 法、便中 *H. pylori* 抗原測定法、尿素呼気試験法などが確立されている。その中には非常に正確な診断方法も含まれるが、操作の利便性やコスト面で課題が残るものも見られる。

操作性に優れ、安価かつ正確な *H. pylori* 感染診断法の開発は、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の再発の防止といった患者本人のための他に、医療費の削減といった、社会全体の利益にもなると考えた。

2. 研究の目的

H. pylori の感染診断法である尿素呼気試験法は、被験者に¹³C 標識尿素を経口投与し、*H. pylori* が産生するウレアーゼにより生成する¹³CO₂を測定し、感染の有無を判定している。この呼気試験は、¹³C 標識尿素や赤外分光装置を用い汎用されているが、非標識体の利用や低価格の装置開発が望まれる。

尿素投与後の呼気中アンモニア濃度と *H. pylori* 感染の相関は認められているが、信頼性に優れた呼気中アンモニア濃度の分析法がなかったため、*H. pylori* の感染診断への適応には至っていない。

これまでに、「トコフェロールの電解酸化を利用した弱塩基物質のボルタンメトリー」を開発し、医薬品の定量へと応用してきた。この方法は、微量の弱塩基物質をトコフェロール共存下で電解酸化するとき、ボルタモグラム上にトコフェロールの酸化前置波が現れ、この波高が弱塩基物質の濃度に比例することに基づいている (図1)。

本検出法は塩基性物質に特異的であり、ボルタンメトリーによる測定では装置のセンサー化が、フローインジェクション分析 (FIA) による測定では、測定の自動化と多数検体の同時測定が可能となる。こうした新規ヒト呼気中アンモニア濃度の測定法の開発は、従来法である尿素呼気試験と異なり¹³C を用いないため、さらに汎用性に優れた *H. pylori* 感染のスクリーニング法となると考えられる。

本研究では、「トコフェロールの電解酸化に基づく弱塩基物質の定量法」を活用し、呼気中アンモニア濃度の測定法を開発し、*H. pylori* の感染診断を安価かつ正確に行える手法の確立を試みた。

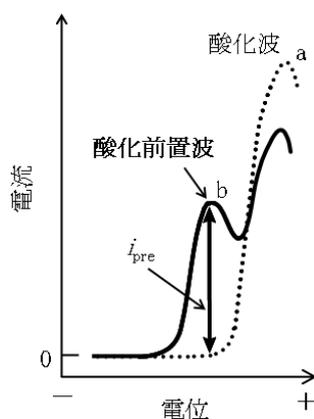


図1 弱塩基物質の存在により生じたトコフェロールの酸化前置波

a, トコフェロールのみ; b, 弱塩基物質 + トコフェロール。酸化前置波の波高 (i_{pre}) が弱塩基物質の濃度と比例する。

3. 研究の方法

(1) ボルタンメトリー

リニアスweepボルタンメトリーには、ポテンショスタット/ファンクションジェネレーター、及び記録計を使用した。電気化学セルは、50 mL の容量のビーカー型ガラス製容器と PFC (plastic formed carbon, ϕ 3 mm) を作用電極、Ag/AgCl 電極を参照電極、白金線を対極とする 3 電極を使用した。

アンモニアを 3.0 mM トコフェロールと 50 mM 塩化ナトリウムを含むエタノール-水 (4:1, v/v) 混液に溶解し、測定溶液を調製した。

(2) 電気化学検出 FIA (FIA-ECD) システム

FIA-ECD システムとその測定条件を図2に示した。印加電位は、ハイドロダイナミックボルタモグラムを基に設定した。

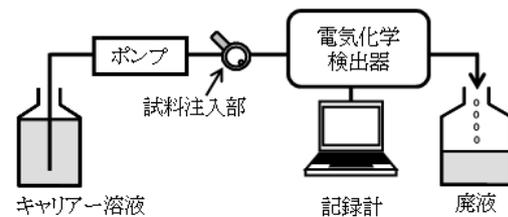


図2 FIA 装置の概略図

キャリアー溶液, 3 mM トコフェロール + 10 mM NaCl を含むエタノール-水 (4:1, v/v) 混液; 流速, 1.0 mL/min; 試料注入量, 20 μ L; 電解セル, 作用電極, グラッシカーボン, 参照電極, Ag/AgCl, 対極, SUS; 印加電位, +0.7 V vs. Ag/AgCl.

(3) 呼気中アンモニアの捕集方法及び試料溶液の調製法

NaCl 水溶液を入れた呼気捕集バック (テトラバック, 容量: 1 L) に呼気を吹き込んだ後、回収した呼気と NaCl 水溶液を十分に混和させた。この液をトコフェロール含有電解質溶液で希釈し、その 20 \cdot L を FIA-ECD に注入し、アンモニア濃度を測定した。

(4) スナネズミを用いた尿素呼気試験法

スナネズミ (MGS/Sea 系、雄、13 週齢) を 15 時間絶食し、蒸留水を経口投与した対照群、ウレアーゼ 0.47 U/g weight を経口投与した

ウレアーゼ投与群の2群に分けた。密閉したデシケター内で排気された呼気500 mLをテドラーバックに回収した。その後、それぞれの群に尿素5・g/g weightを経口投与し、再び呼気を採取した。(3)に述べた方法で試料溶液を調製した。

4. 研究成果

(1) アンモニアのボルタンメトリー

アンモニアが共存するトコフェロール溶液の電解酸化時のボルタモグラムには、アンモニアの濃度に比例する特異的なピーク(酸化前置波)が出現した。このピークは、アンモニア濃度0.082 ~ 2.14 mMの範囲で相関係数0.998のよい直線性を示した。また、0.5 mMのアンモニアに由来する酸化前置波のピーク高さの相対標準偏差(RSD, $n = 10$)は0.8%であり、精度にも優れていることが分かった。

以上のことから「トコフェロールの電解酸化に基づく弱塩基物質の定量法」をアンモニアの定量に適用できることを明らかにできた。

(2) アンモニアのFIA-ECDの開発

多数の検体を迅速かつ自動的に測定する分析装置には、FIAが有用であると考え、トコフェロールの電解酸化を利用したFIA-ECDを開発した。

FIAシグナルは、アンモニア濃度0.17~1.7 ppmの範囲で良い直線性を示し、相関係数は0.997であった。また、アンモニア濃度0.84 ppmにおけるRSDは、2.07%であった。本法の定量範囲、精度、共にヒト呼気中アンモニアを測定する上で十分であることが分かった。

呼気中アンモニアを計測できるFIA-ECDの基本を確立することができた。

(3) 呼気中アンモニアの捕集方法及び試料溶液の調製法の検討

呼気中アンモニア濃度をFIA-ECDで測定するために、呼気の採取方法及び試料溶液の調製法について検討した。

呼気中アンモニアの回収率におけるサンプリングバッグの材質の影響を評価するために、一般に大気の捕集や呼気の捕集で使用されるテドラーバックとアルミニウムバック、透明すりにより密封可能なSPC(SIBATA Precise Clear Joint)ろ過びんについて比較した。

0.45 ppmのアンモニアを含む呼気試料を用いた添加回収試験を行ったところ、回収率・

精度共にテドラーバックを用いた場合が最も優れており、その回収率は99.8% (RSD = 1.8%, $n = 3$)であった(表1)。また、この呼気採取方法は、バック内に0.5 L程度の呼気を吹き込むだけでアンモニア濃度が測定可能であるので、被験者の負担が少なく、幅広い年齢層に適応できると考えられる。

表1 アンモニアの添加回収試験

呼気採取容器	回収率 (%)	RSD (%), $n = 3$
テドラーバック	99.8	1.8
アルミニウムバック	84.9	7.1
SPCろ過びん	97.4	3.4

呼気1 Lにアンモニアが0.45 ppmになるように添加した。

(4) ウレアーゼ投与スナネズミを用いた尿素呼気試験法

本法をスナネズミ呼気中アンモニア濃度の測定及び尿素呼気試験法へ応用し、その有用性を示すこととした。ウレアーゼを経口投与したスナネズミについて、尿素投与前後の呼気を採取し、アンモニア濃度の増減を観測した。対照群として蒸留水を経口投与したスナネズミについても尿素投与前後の呼気中アンモニア濃度を測定した。

ウレアーゼを投与したスナネズミの呼気中アンモニア濃度は、尿素投与後に顕著に増加した(図3)。一方、対照群においては、尿素投与後の呼気中アンモニア濃度の増加は見られなかった。

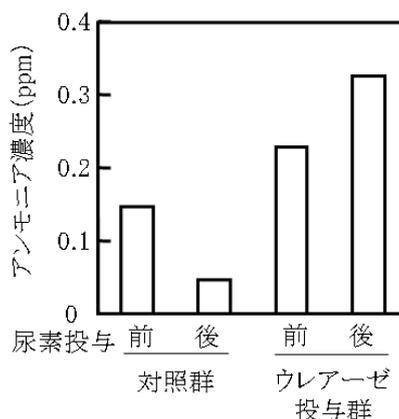


図3 スナネズミ呼気中アンモニア濃度の変化

以上のように、アンモニア測定をターゲットとした尿素呼気試験のための呼気アンモニア測定法を開発できた。本法は、*H. pylori*

の感染診断のための非標識尿素を用いる尿素呼気試験法として有望と思われる。

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4件)

- ① Akira Kotani, Satoshi Kojima, Yuzuru Hayashi, Rieko Matsuda, Fumiyo Kusu, Optimization of capillary liquid chromatography with electrochemical detection for determining femtogram levels of baicalin and baicalein on the basis of the FUMI theory, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 48, 780-787, 2008, 査読有.
- ② Akira Kotani, Masanori Odagiri, Kiyoko Takamura, Fumiyo Kusu, Voltammetric behavior of trolox in the presence of amino acid in unbuffered dimethylsulfoxide, *J. Electroanal. Chem.*, 624, 323-326, 2008, 査読有.
- ③ Akira Kotani, Kouji Takahashi, Hideki Hakamata, Satoshi Kojima, Fumiyo Kusu, Attomole catechins determination by capillary liquid chromatography with electrochemical detection, *Anal. Sci.*, 23, 157-163, 2007, 査読有.
- ④ Jing Xia, Akira Kotani, Hideki Hakamata, Fumiyo Kusu, Determination of hesperidin in Pericarpium Citri Reticulatae by semi-micro HPLC with electrochemical detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1401-1405, 2006, 査読有.

[学会発表] (計3件)

- ① 楠 文代、若林 義明、小浜 元敬、小谷明、電気化学検出 FIA によるスナネズミ呼気中アンモニア濃度の測定、第 52 回日本薬学会関東支部大会、2008 年 10 月 4 日、野田
- ② 小谷明、小浜元敬、楠 文代、呼気中アンモニア測定のための電気化学検出 FIA の開発、第 69 回分析化学討論会、2008 年 5 月 16 日、名古屋
- ③ Akira Kotani, Mototaka Kohama, Fumiyo Kusu, Kiyoko Takamura, Determination of ammonia by flow injection analysis with electrochemical detection, The 58th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE 2007), 2007 年 9 月 12 日, Banff, Canada.

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

名称: 呼気成分測定装置、及び呼気成分測定方法

発明者: 楠 文代、袴田秀樹、小谷明、高橋浩司、西田 毅、橋本英明

権利者: (学) 東京薬科大学、松下電器産業(株)

種類: 特許

番号: 特許公開 2007-205993

取得年月日: 2007 年 8 月 16 日

国内外の別: 国内

名称: 呼気成分溶解容器、呼気成分測定装置、及び呼気成分測定方法

発明者: 楠 文代、袴田秀樹、小谷明、高橋浩司、西田 毅、橋本英明

権利者: (学) 東京薬科大学、松下電器産業(株)

種類: 特許

番号: 特許公開 2007-205994

取得年月日: 2007 年 8 月 16 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 明 (KOTANI AKIRA)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 40318184

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者