

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07450

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）The development of the super high sensitive detection method not to be affected by the oxidation, a reduction material in a living body sample and the potential for expansion.

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：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し、 $H_2O_2$ ・金属・キレート錯体形成と界面活性剤による三次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た。検討の中で、本法が試料から混入する蛋白成分による反応溶液の濁りの影響を強く受けることが判明したことから、本法の分析技術の適用範囲を蛋白が少ない環境下へと制限することとして、適用対象を再検討したところ、細菌検査やウイルス診断検査における核酸増幅の検出技術としての応用の可能性があることを見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討の成果により、細菌検査やウイルス診断検査における核酸増幅の検出技術としての応用の可能性を見出すことができたことから、迅速かつ簡便な新しい核酸増幅定性・定量検出システムの構築に加え緊急時・災害時の電気、水などのライフラインの乏しい医療現場での感染症などの遺伝子検査キットの検出系全般への高感度技術の応用展開が可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop a new detection system with higher sensitivity and specificity than the current method by inducing coloration of three-dimensional complexes, aiming to construct a highly sensitive measurement system to directly quantify hydrogen peroxide, instead of the conventional detection by redox reaction. In the investigation, it was found that this method was strongly affected by turbidity of the reaction solution due to protein components mixed in from the sample, so the scope of application of this analytical technology was restricted to environments with low protein content, and the target of application was reexamined. We found that this method has potential for application as a detection technology for nucleic acid amplification in bacterial and viral diagnostic tests.

研究分野：臨床化学

キーワード：高感度検出 錯体 過酸化水素 酸化・還元

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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臨床診断上不可欠である。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。

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良し悪しが、目的物質検出において大きな鍵を握っていると考えている。

臨床検査分野における生体成分分析では、多くのオキシダーゼ系酵素が用いられ、生成した $H_2O_2$ をトリンダー試薬と POD 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が広く用いられている。

しかしながらこの方法では、最終検出過程における検出成分である  $H_2O_2$  が生体試料中に含まれる還元性物質等により還元され本来よりも低値を示すことになり、正確に目的成分をとらえることが困難であるという問題を抱えている。このことは特に還元性物質の多く存在する尿中成分分析においては特に深刻である。

このように還元性物質を代表とした生体試料中の成分から影響を受けない高感度な検出技術の開発・改良が求められるといえる。

### 2. 研究の目的

そこで、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。

$H_2O_2$ ・金属・キレート錯体形成と界面活性剤による三次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。そして、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・実証する事が本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

1) 高感度検出系の構築： $H_2O_2$ を高感度にそして生体試料中の還元物質の影響を受けづらい検出技術の構築

金属・金属キレター・界面活性剤の検索とそれぞれの組み合わせによる反応性についての検証。

高感度化：見出した組み合わせの中から、より高感度である組み合わせにおいてその反応性の評価を行い、目標とする高感度な過酸化水素検出系の確立。

還元物質の影響試験：生体試料に還元物質（尿酸やアスコルビン酸など）を添加して、測定への影響について評価し、生体試料中の還元物質の影響を回避した検出技術としての本法の可能性を検証。

2) 酵素反応を組み合わせた実験系の確立：実際に酵素反応により過酸化水素を生成させた状態で本法の実用性の検証を行う。また現行法と比較検証を行い、技術移転の可能性について検証。

### 4. 研究成果

高感度検出系の構築：金属・金属キレター・界面活性剤の検索とそれぞれの組み合わせによる反応性についての検証を行ってきた。その中でいくつかの金属と金属キレターにおいて良好な組み合わせを見出すに至った。そして、現行法との比較を行い、20~30 倍ほどの高感度化に成功するに至ったが当初の到達目標の感度（100 倍）には至らなかった。

還元物質の影響試験：生体試料中における代表的な還元物質（尿酸やアスコルビン酸など）を試料に添加して、本測定への影響について評価した。本測定法において当初予測していたとおり、還元性物質により大きな影響を受けることとなったが、ウリカーゼやアスコルビン酸オキシダーゼの試薬への添加によりこれら還元物質を除去することで、本測定法への影響は回避できることが確認された。

しかしながら生体試料中には様々な還元物質が存在すること、それ以外に今後多くの試料を対象とした際に、同様な問題が生じてくると推測される。

過酸化水素の安定性試験：外環境を酸性からアルカリの条件下（緩衝液）で過酸化水素を添加しその安定性について検証したところ、想定以上に溶液中の過酸化水素が安定であることがわかった。

蛋白による影響回避の検討：試料から混入すると考えられる蛋白成分による反応溶液の濁りの影響回避のために、種々界面活性剤および緩衝液の pH を再検討してその影響の回避を試みたが、改善の兆しを見出すには至らなかった。

本技術の展開の適用範囲の新たな試み：当初、血液や尿中における分析を想定した高感度検出

技術の構築とその臨床応用への可能性を探索・実証する事を目的としていたが、前述のような問題点を踏まえ、本法の検出技術の適用範囲を蛋白が少ない環境下へと制限することとして適用対象について再検討をおこなった。

その制限環境として、核酸増幅試料を測定対象として、増幅量の検出技術への本法の応用を想起するに至った。核酸増幅時に副二次的に生成されるピロリン酸の高感度検出への応用を試みた。

その結果、ピロリン酸を基質に酵素反応させ、生成する  $H_2O_2$  の高感度検出に成功するに至った。得られている検出感度は  $0.10 \text{ } \mu\text{mol/L}$  である。これら成果により細菌検査やウイルス診断検査における核酸増幅の検出技術としての応用の可能性を見出すに至った。

このことは、本技術が、迅速かつ簡便な新しい核酸増幅定性・定量検出システムの構築に加え、緊急時・災害時の電気、水などのライフラインの乏しい医療現場での感染症などの遺伝子検査キットの検出系全般への高感度技術の応用展開への可能性を示すものであると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福元沙織、内海 健、外園栄作
2. 発表標題 Br-PAPSを用いた過酸化水素高感度検出における基礎的検討
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福元沙織、内海 健、外園栄作
2. 発表標題 核酸増幅過程の副産物ピロリン酸の高感度検出技術に関する検討
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
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
---------	---------