

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月26日現在

機関番号：13904  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21550078  
 研究課題名（和文） 非侵襲呼気スクリーニング診断のためのマイクロ試料前処理デバイス  
 研究課題名（英文） Micro-Scale Sample Preparation Devices for Novel Non-Invasive Screening Diagnosis with Human Breath Samples  
 研究代表者  
 齊戸 美弘（SAITO YOSHIHIRO）  
 豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号：00303701

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、従来の気体試料捕集器具が有していた複数の欠点を同時に克服するとともに、抽出後の試料を分離分析までの一定時間保存可能とする、注射針形状のマイクロ試料前処理デバイスの開発を行うとともに、それらを応用した患者呼気中アセトン濃度測定に基づく糖尿病の新規非侵襲診断法を開発した。また、従来法である尿中のケトン体濃度測定との相関、および血中のグリコヘモグロビン率との相関についても系統的に検討した。

## 研究成果の概要（英文）：

In this work, a novel non-invasive diagnosis technique with human breath sample was developed for the screening of diabetic patients. The developed needle-type sample preparation method has several advantageous features such as an excellent storage performance and easy operations during the sampling process. The correlation between the acetone concentration in breath samples and the total concentrations of ketone bodies was confirmed along with a good correlation between the acetone concentration and the HbA1c% in blood, suggesting a successful development of this technique as a quick screening technique.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：マイクロ分離科学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：試料処理、呼気診断、非侵襲診断、マイクロ化、針型デバイス、糖尿病、抽出

## 1. 研究開始当初の背景

病態の初期スクリーニング診断法の一つとして、呼気による診断が、近年特に注目されてきている。特に、癌などの致死率の高い

疾患あるいは患者数が激増している糖尿病に代表される生活習慣病の診断法として、呼気中に含まれる特定の有機化合物群の構成パターン解析は、臨床医学・疫学等の観点か

らも研究されてきており、一部の化合物群およびその組成等が特定の患者の病態を反映していることが示唆されてきている。

ところが、呼気中には幅広い極性を有する、きわめて多成分の微量有機化合物が存在し、かつそれらのほとんどが揮発性であることから、全成分の同時濃縮は困難であり、その定量精度・検出感度に限界が存在し、国内外でも特定の化合物を個別に簡易測定する方法がようやく臨床研究段階になるにとどまっていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来の気体試料捕集器具が有していた複数の欠点を同時に克服するとともに、抽出後の試料を分離分析までの一定時間保存可能とする、注射針形状のマイクロ試料前処理デバイスの開発を行った。また、それらを応用した患者呼気による糖尿病の新規非侵襲診断法の開発についても系統的に検討した。

これらの試料前処理針は、汎用の検知管用ガス採取器のみで気体試料採取が可能であり、また、試料採取後の針は、そのまま分析装置の試料注入口へ挿入し、分離分析を行うため、煩雑な分析前処理操作が不要である。呼気採取の際にも、患者からガスサンプリングバッグ等に数百mL程度の呼気を採取すれば、複数の針デバイスによる迅速なオンサイトスクリーニング診断が可能である。非侵襲の試料採取であり、患者への負担が大幅に低減できるという特長も有している。

## 3. 研究の方法

本研究は、当初の研究計画に沿って、おもに以下に記載する検討項目を中心に、系統的かつ効率的に行った。

- (1) 各種合成細繊維の性能評価
- (2) 細繊維充填条件の最適化と液相の比較
- (3) 分子形状認識能を持つ新規媒体の検討
- (4) 細繊維表面への化学修飾の検討
- (5) 針内誘導体化反応の検討
- (6) 従来法との比較
- (7) 診断への応用可能性の検討

本研究では、上記の検討項目の全てについて、以下に示す通り、当初の想定を十分に上回る顕著な研究成果を得ている。

## 4. 研究成果

### (1) 各種合成細繊維の性能評価

針デバイス(図1)に充填する試料抽出媒体として用いる各種合成細繊維(図1B, 図1C)の耐熱性・機械的強度等について評価するとともに、最適耐熱性合成細繊維を決定した。

この際、当初計画に沿って、単に優れた耐熱性だけでなく、分析装置注入口で想定される高温気体状有機化合物への耐性も考慮し、

耐有機溶媒性・耐薬品性を併せ持つ、最適細繊維を決定した。

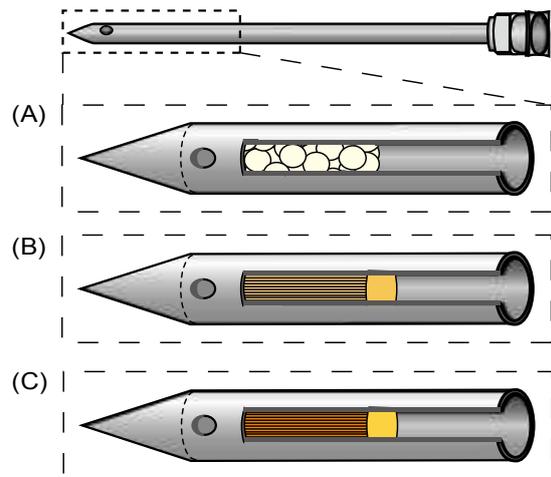


図1 各種針型試料抽出デバイスの概要。(A) 高分子粒子充填型、(B) 耐熱性細繊維充填型、(C) 液相被覆耐熱性細繊維充填型。

### (2) 細繊維充填条件の最適化と液相の比較

針内の通気性を十分に考慮しながら、針デバイスへの細繊維の最適充填条件、あるいは反復使用する際の耐久性等についても検討した。また、細繊維表面に施す液相被覆(図1C)の性能比較も行った。

更に、液相被覆の化学構造と対象化合物への抽出選択性の関係についても、複数のモデル化合物を用いて系統的に検討した。

### (3) 分子形状認識能を持つ新規媒体の検討

粒子充填針(図1A)に使用するポリマーベースの抽出媒体の合成ならびに、その抽出性能の評価を行った。

抽出媒体としてメタクリル酸(MA)/ジメタクリル酸エチレングリコール(EDMA)共重合体(図2)を用いて、各種重合添加剤による抽出性能ならびに特性に関する基本的評価を行うとともに、細繊維充填針との相補性について検討した。

### (4) 細繊維表面への化学修飾の検討

合成細繊維の表面を化学的に修飾することによる、表面改質について検討した。これにより、抽出選択性がデザイン可能となるほか、幅広い化学構造を有する新規液相の導入が可能であることが明らかとなった。

液相の選択範囲が大幅に広がることから、分析対象化合物に適した種々の誘導体化反応場を、細繊維表面の液相内に効率良く構築することが可能である。

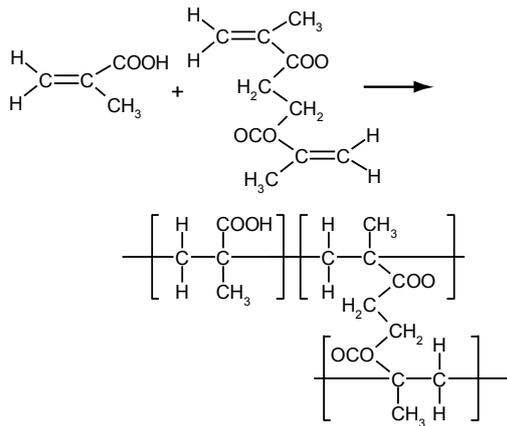


図2 MA/EDMA共重合体の構造.

(5) 針内誘導体化反応の検討

分析対象物質の各種誘導体化反応の導入についても検討した。カルボニル化合物に対する誘導体化試薬として第一選択としたDNPHを用いて、誘導体化プロセスを最適化する。試料採取前のコンディショニングから、試料採取（ここで、誘導体化と抽出を同時に行う）、そして分析装置への注入までの各種実験パラメーターを最適化した。

このDNPH等を用いた針内誘導体化反応(図3)は、本研究者らの予備の実験により、その呼気分析への実用性が示唆されているが、本研究において、他の各種誘導体化試薬、それらと分析対象物質との適合性、ならびにその最適誘導体化反応条件等についても検討し、呼気分析に応用できることが明らかとなった。

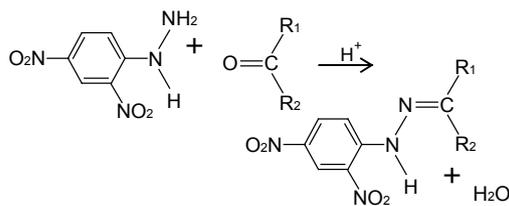


図3 DNPHを用いた誘導体化反応.

(6) 従来法との比較

従来法との比較検討を行うことにより、新規スクリーニング診断法としての有用性を確認した。従来から糖尿病患者の病態診断データとして用いられてきている、尿中ケトン体および血中グリコヘモグロビン率(HbA1c%)の定量結果との十分な相関を確認した。

これまでの予備的研究の結果、複数の健常者が絶食して擬似的に糖尿病患者と同様の状態となった場合、試作針型デバイスを用いて呼気中のアセトンならびに尿試料ヘッドスペース中のアセトンを高精度でモニターできることが立証されてきている。

本研究では、これらの定量プロファイルが、市販の糖尿病簡易検査紙によるデータと良く一致(図4)することを複数の被験者で確認(図5)した。

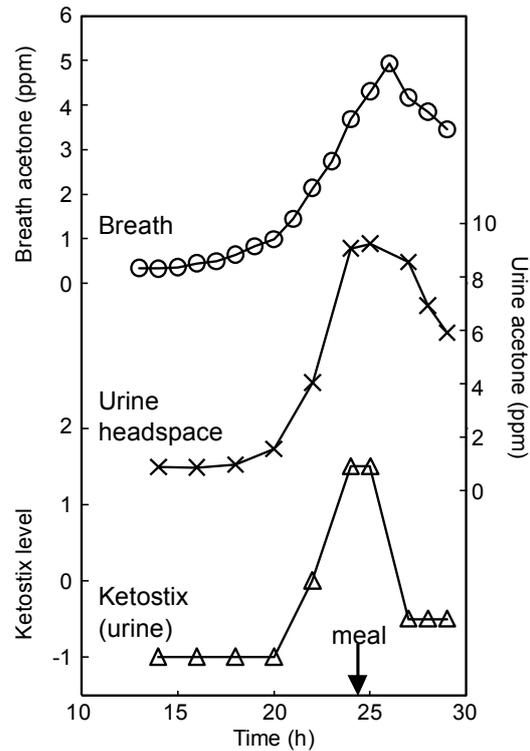


図4 健常者が絶食した際の呼気中と尿中アセトンのタイムプロファイル.

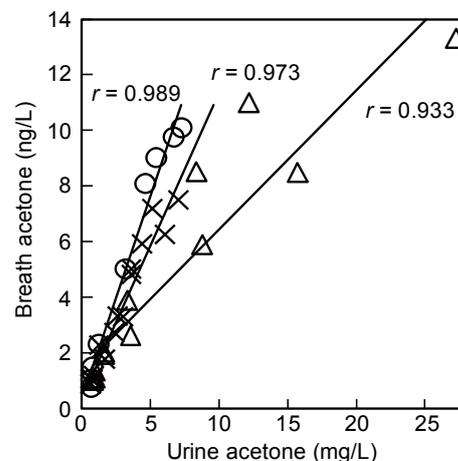


図5 呼気中と尿中アセトンの相関関係.

(7) 診断への応用可能性の検討

糖尿病と診断されて通院・加療中の患者21名(表1: 男性12名、女性9名の合計21名)の呼気中アセトン濃度と、同時に測定した血液中のHbA1c%との相関について検討した。その結果を図6(患者全体) および図7(男女別)に示す。

表1 患者リスト

No.	Sex	Age	Cure	HbA1c (%)	Breath acetone (ppm)
1	M	60	O. M.	5.3	0.274
2	M	71	O. M.	5.1	0.345
3	M	70	O. M.	7.2	0.538
4	M	57	O. M.	6.4	0.401
5	M	68	O. M.	6.3	0.447
6	M	80	I. I.	6.5	0.482
7	M	75	I. I.	7.2	0.482
8	M	50	I. I.	6.2	0.343
9	M	65	I. I.	7.1	0.411
10	M	81	I. I.	5.9	0.337
11	M	83	I. I.	7.4	0.659
12	M	67	I. I.	5.8	0.325
13	F	83	O. M.	6.2	0.320
14	F	57	O. M.	6.4	0.415
15	F	76	O. M.	6.4	0.283
16	F	67	O. M.	5.9	0.250
17	F	59	I. I.	7.2	0.604
18	F	62	I. I.	5.4	0.260
19	F	64	I. I.	5.9	0.238
20	F	68	I. I.	5.9	0.195
21	F	81	I. I.	8.0	0.487

O. M.: oral medication

I. I.: insulin injection

いずれの結果も、呼気中アセトン濃度と血中グリコヘモグロビン率との高い相関関係を示唆しており、特に、男女別に相関をとった場合には、その傾向が顕著に確認できた。

以上の結果より、本研究で開発した針型マイクロ抽出デバイスは、今後、糖尿病患者の初期スクリーニング診断に応用できる可能性があることが確認できた。

一般に、生体試料の測定には、被験者間に相当な個人差や、日間変動等があることから、

今後更に被験者数を増やし、かつ測定精度の一層の向上が必要であると考えられるものの、本研究成果は、他の病態への応用も含めた非侵襲呼気分析手法の開発において重要な進歩であったと考えられる。

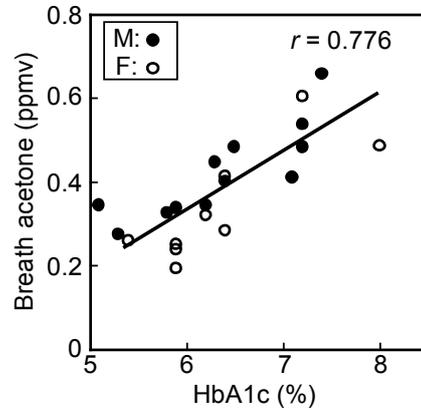


図6 患者全体に対する呼気中アセトン濃度とHbA1c%の間の相関関係.

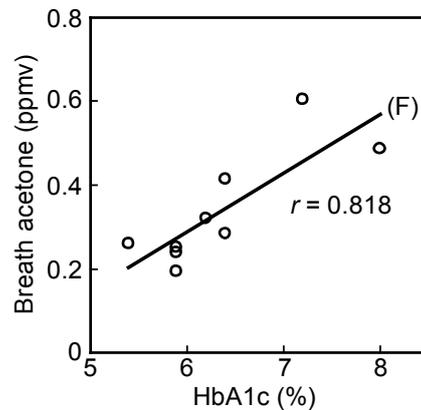
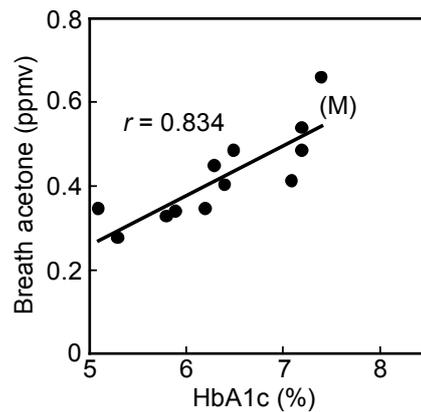


図7 呼気中アセトン濃度とHbA1c%の間の相関関係(男女別).

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13件)

- ① 齊戸美弘; "間接受動喫煙 (三次喫煙) の潜在的リスク --喫煙関連物質の精密測定による評価--" ("Potential Risk of Third-Hand Smoking"), 日本胸部臨床, 印刷中(2012年5月に掲載予定) (巻・号・ページ番号未定), 2012, 査読有
- ② 植田郁生, 齊戸美弘; "ガスクロマトグラフィーのための針型試料前処理デバイス," 分析化学, 60 (11), 833-844, 2011, 査読有
- ③ S. Shirai, K. Nakane, I. Ueta and Y. Saito; "Retention Behavior of Fluorobenzenes on Fluoro-Derivatized Poly(*p*-phenylene terephthalamide) Fibrous Stationary Phases in Microcolumn Liquid Chromatography," Chromatography, 32 (3), 127-133, 2011, 査読有
- ④ K. Nakane, S. Shirai, Y. Saito, Y. Moriwake, I. Ueta, M. Inoue and K. Jinno; "High-Temperature Separation on a Polymer-Coated Fibrous Stationary Phase in Microcolumn Liquid Chromatography," Analytical Sciences, 27, 811-816, 2011, 査読有
- ⑤ I. Ueta, Y. Saito, K. Teraoka, H. Matsuura, K. Fujimura and K. Jinno; "Novel Fire Investigation Technique Using Needle Extraction in Gas Chromatography," Analytical Sciences, 26, 1127-1132, 2010, 査読有
- ⑥ S. Shirai, Y. Saito, Y. Sakurai, I. Ueta and K. Jinno; "Retention Behavior on Aminoethyl-Modified Poly(*p*-phenylene terephthalamide) Fiber Stationary Phases in Gas Chromatography," Analytical Sciences, 26, 1011-1014, 2010, 査読有
- ⑦ M. Inoue, Y. Saito, I. Ueta, T. Miura, H. Ohkita, K. Fujimura and K. Jinno; "Rapid Temperature-Programmed Separation and Retention Prediction on Novel Packed-Capillary Column in Gas Chromatography," Analytical Sciences, 26, 687-691, 2010, 査読有
- ⑧ I. Ueta, Y. Saito, K. Teraoka, T. Miura and K. Jinno; "Determination of Volatile Organic Compounds for a Systematic Evaluation of Third-Hand Smoking," Analytical Sciences, 26,

569-574, 2010, 査読有

- ⑨ A. Abe, Y. Saito, I. Ueta, K. Nakane, T. Takeichi and K. Jinno; "Development of Novel Fiber-Packed Needle Interface for Off-Line Reversed-Phase Liquid Chromatography-Capillary Gas Chromatography," Journal of Chromatography A, 1216, 7456-7460, 2009, 査読有
- ⑩ I. Ueta, Y. Saito, M. Hosoe, M. Okamoto, H. Ohkita, S. Shirai, H. Tamura and K. Jinno; "Breath Acetone Analysis with Miniaturized Sample Preparation Device: In-Needle Preconcentration and Subsequent Determination by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy," Journal of Chromatography B, 877, 2551-2556, 2009, 査読有
- ⑪ M. Ogawa, Y. Saito, S. Shirai, Y. Kiso and K. Jinno; "Determination of Bisphenol A in Water Using a Packed Needle Extraction Device," Chromatographia, 69, 685-690, 2009, 査読有
- ⑫ I. Ueta, Y. Saito, N. B. A. Ghani, M. Ogawa, K. Yogo, A. Abe, S. Shirai and K. Jinno; "Rapid Determination of Ethylene Oxide with Fiber-Packed Sample Preparation Needle," Journal of Chromatography A, 1216, 2848-2853, 2009, 査読有
- ⑬ Y. Saito, I. Ueta, M. Ogawa, A. Abe, K. Yogo, S. Shirai and K. Jinno; "Fiber-Packed Needle-Type Sample Preparation Device Designed for Gas Chromatographic Analysis," Analytical and Bioanalytical Chemistry, 393, 861-869, 2009, 査読有

[学会発表] (計28件)

- ① Y. Saito; "Miniaturized Sample Preparation Devices for Various Analytical Situations," 11th Asia Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE 2011), November 26, 2011, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, Australia.
- ② 齊戸美弘; "針型試料前処理デバイスの開発と応用," 日本分析化学会第60年会ガスクロマトグラフィー研究懇談会特別講演会, 2011年9月14日, 愛知県名古屋市・名古屋大学
- ③ Y. Saito; "Miniaturized Sample Preparation Device Designed for Gas

Chromatographic Analysis of Various Volatile Organic Compounds," Separation Science Asia 2011 --New Horizons in Separation and Detection Techniques--, July 28, 2011, The Biopolis Science Park, Singapore, Singapore.

- ④ Y. Saito; "Miniaturized Sample Preparation Device for Gas Chromatographic Analysis of Volatile Organic Compounds," The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), December 19, 2010, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, HI, USA.
- ⑤ 齊戸美弘; "マイクロ試料前処理技術の新展開," 第41回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2010年11月6日, 愛知県豊橋市・豊橋技術科学大学
- ⑥ Y. Saito; "Sample Preparation Device for Human Breath Analysis in Capillary Gas Chromatography," 34th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC 2010), June 4, 2010, Palazzo dei Congressi, Riva del Garda, Italy.

〔図書〕(計1件)

- ① Y. Saito, I. Ueta, M. Ogawa and K. Jinno; "Needle Trap Devices for Environmental Sample Preparation," in J. Pawliszyn (ed.), "Comprehensive Sampling and Sample Preparation," Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 印刷中(2012年5月に発刊予定)(ページ番号未定), 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊戸 美弘 (SAITO YOSHIHIRO)  
豊橋技術科学大学大学院・工学研究科・准教授

研究者番号 : 00303701

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :