

## 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31日現在

機関番号：33903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550093

研究課題名（和文） 生体負荷物質のマイクロフローセンシングシステムの開発

研究課題名（英文） Development of micro-flow sensing system for important biological materials

研究代表者

酒井 忠雄（SAKAI TADAO）

愛知工業大学・工学部・教授

研究者番号：30076038

研究成果の概要（和文）：糖尿病関連物質である尿たんぱくとクレアチニン、環境水中のホルムアルデヒドなどの生体代謝に影響を与える微量物質の自動測定法の開発を行った。この測定法及びシステムは廃液・試薬消費削減が可能で、環境にやさしいマイクロフローを用いるセンシングシステムで環境化学・臨床化学・病態診断に有用である。また PC 制御によるスキルフリー化が可能である。

研究成果の概要（英文）：Micro-flow sensing systems were assembled for the urinary albumin and formaldehyde in the waste water. The proposed analytical techniques show some advantages on easy handling, less reagent consumption, fully automated operation, rapidity and reproducibility. The system is available for diagnosis and environmental analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：マイクロフローセンシング、生体負荷物質、病態診断、スキルフリー

## 1. 研究開始当初の背景

0.5mm の細管を流れる試薬溶液に試料を注入するながれ分析法としてフローインジェクション法(FIA)やシーケンシャルインジェクション(SIA)法の手法の開発が目覚ま

しい進歩を遂げている。この手法は環境化学・臨床化学・食品化学などの領域でその応用が注目され、装置化が図られている。酒井は FIA や SIA 法などのフローシステムをさらに機能化するために開発した多くの装置

は市販化されている。これらの装置は大型機器に比べ安価・小型化・機能化されており、またスキルフリー的要素があることから広範に利用されている。しかし、最近「化学分析技術の未熟さ」が懸念されていること、また「高効率の分析技術」が要求されている現状を考えると「微量成分の完全自動化検出システム」と廃液量、試薬消費量の「化学計測の環境負荷物質低減化」を図るための技術開発は必要不可欠である。

本研究では新規機能性試薬による生体関連物質や有毒性物質のナノレベルオンライン検出技術を開発し、「生命と安心への化学計測技術の提供」を目的とした。この目標は臨床化学・環境化学で最も要求度の高いもので、その成果への期待は大きい。

## 2. 研究の目的

### (1) 糖尿病疾患における尿タンパクとクレアチニンの同時分析システムの開発

現在国内では潜在的患者も含めると糖尿病疾患の患者数は700万人を超すと言われている。臨床試験としてイウ会合試薬 TBPB を含浸させた試験紙目視法が簡便迅速法として利用されているが、 $\pm 300$  ppm が誤差許容範囲である。従って精度は悪くスクリーニングの機能しかない。最近 24 時間タンパク排泄量測定が困難なことから、アルブミン/クレアチニンの比を求める ACR法が推奨されている。しかしそれぞれが単独で測定され、その結果より統計的に算出される。申請者は FI 法及び SI 法による単成分検出システムを 2004 年と 2007 年に報告しているが、この技術と上記の発色反応を融合させ、新規の ACR の測定法を開発する。

### (2) 排水中のホルムアルデヒドの高感度分析法の開発

ホルムアルデヒドは喫煙時に濃度が増大し、30分間は平常濃度に戻らないことを報

告(2008年)した。しかし1990年代にシックハウス症候群を引き起こす原因物質として問題視されるようになり、室内空気濃度は0.08 ppbv以下とされ、水道水中の指針値は0.08 mg/Lに設定されている。硫酸ヒドロキシルアミンが添加されるとホルムアルデヒドと化学量論的に反応し pH 変動が起こることを見出している。また Fe(III)共存下で起こる還元反応とフェナントロリンとの錯生成反応を利用することによりホルムアルデヒドの高感度分析が可能となる。さらに、この反応をフロー分析法に導入し、装置のミクロ化・自動化を図ることで、on-site 分析に適用できる。

### (3) SIEMA による血清アルブミンの自動分析システムの開発

FIA は溶液の流れが層流を形成することから、溶液間の混合が良好で、化学反応の促進に効果的である。SIA における混合はリバースフローのみで行われるので、化学反応の進行は不十分である。しかし溶液はシリンジで正確に吸引・吐出できる。この吸引量は200  $\mu$ L 程度であり、一試料あたりの溶液使用量は極めて少なく、トータルで1 mL あれば測定可能である。ここで提案する溶液の吸引・吐出はシリンジポンプとソレノイドバルブで選択される。吸引された試薬溶液、緩衝液、試料はミキシングポイントで同時に合流し、下流にある混合コイルで反応が促進される。反応生成物は体積8  $\mu$ L、光路長10 mmのフローセルを備えた分光光度計で吸光度が測定される。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病疾患における尿タンパクとクレアチニンの同時分析システムの開発

テトラプロモフェノールブルー(TBPB)、エオシン Y(EO-Y)、テトラヨードフルオレセイン(TIF)はタンパクと会合し、異染色性を示す

ことを見出しているが、定量条件の適正及びバックグラウンドの影響を検討した。また、Jaffee法に基づくクレアチニン発色原理を基にSI-Lab-at-Valveに導入し、装置を自動作動するためのプロトコルを確立する。このシステムは光ファイバーを用いる小型検出器が装填され、溶液の吸引・吐出はPCで制御される。アルブミンとクレアチニンを定量し、アルブミン/クレアチニン比を自動計測するシステムを確立する。

#### (2) 排水中のホルムアルデヒドの高感度分析法の開発

ホルムアルデヒドは硫酸ヒドロキシアミンが添加されると定量的に反応し、硫酸の放出によりpH変化を引き起こすことを新たに見出している。したがってpHの変動をpH指示薬でモニターすることにより、ホルムアルデヒドの濃度を計測することが出来るが、この系にFe(III)と1,10-フェナントロリン(phen)が共存すると、Fe(III) Fe(II)の還元反応が起こり、その生成量に比例してFe(II)-phen錯体が生成し、赤色に呈色する。すなわち、硫酸ヒドロキシアミンの添加は2つの異なる発色反応を誘発する。この化学反応を $\mu$ -フローシステムに導入し分析条件の最適化と装置のマイクロ化を達成する。

#### (3) SIEMAによる血清アルブミンの自動分析システムの開発

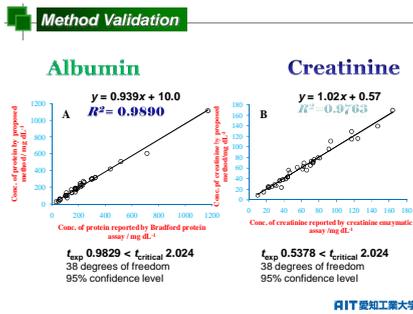
たんぱくには血清アルブミンを使用する。発色試薬にはテトラプロモフェノールブルー(TBPB)を用いる。このように染料は非イオン界面活性剤中で安定な会合体を形成し、maxも長波長側に大きくシフトし、深色効果が現れ、高感度検出が可能となる。この反応系を新たな流れ分析システム、同時注入/迅速混合分析法(Simultaneous Injection Effective Mixing Analysis System, SIEMA)に導入する。

$4 \times 10^{-5}$  M TBPB, 0.2% TX-100, 0.5M 酢酸緩衝液、アルブミン標準溶液を各々200  $\mu$ L シリンジポンプでホールディングに吸引する。三方ソレノイドバルブをoffにして溶液を同時に押し出すと五方コネクターで混合され、反応コイルを通過中に拡散混合が促進される。反応生成物の吸光度は625 nmで測定される。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖尿病疾患における尿タンパクとクレアチニンの同時分析システムの開発

通常尿タンパクの検出はTBPBを含浸させた試験紙を用いる判定量法で行われているが、精度は悪い。また一般的には24時間採尿が求められているが、タンパクの変質等で正確性に欠ける。そこで、精度が高く、高感度で簡便に尿タンパクを定量するシステムを構築した。ここで報告するシステムはアルブミンとクレアチニンを逐次測定し、最終的にはアルブミン/クレアチニン比(ACR法)を求め、判定する方法である。Eosin YはpH2.5で黄色であるが、アルブミンと会合体を形成し、547 nmに吸収を持つ化合物を生成した。またクレアチニンは強アルカリ性でピクリン酸と赤色(500 nm)の化合物を生成する。これらを検出するシステムとしてシーケンシャルインジェクション(SI)法を適用し、逐次定量するプロトコルを自作した。シリンジ作動によりスイッチングバルブの#2よりエオシンを、#3よりアルブミン(尿試料)を、また#5よりピクリン酸を、#6より、クレアチニン(尿試料)を吸引しHCに保持、この試薬ゾーンを3回往復し混合し、生成物のゾーンを吸光検出器に導入し、それぞれの波長で吸光度を測定する。アルブミンは0~20  $\text{mgL}^{-1}$ の、またクレアチニンは0~100  $\text{mgL}^{-1}$ の検量線が得られた。



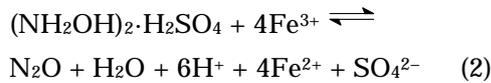
(2) 排水中のホルムアルデヒドの高感度分析法の開発

ホルムアルデヒド (HCHO) と硫酸ヒドロキシルアミンとの縮合反応と金属錯体との酸化還元反応を組み合わせた HCHO のフローインジェクション分析 (FIA) 法を開発した。HCHO は、ヒドロキシルアミンと縮合し、ホルムアルドキシムを生成する。この際、ヒドロキシルアミン濃度は HCHO 濃度に比例して減少する。残存するヒドロキシルアミンは、鉄(III)-1,10-フェナントロリン (phen) 錯体を還元し、赤色の鉄(II)-phen 錯体 ( $\lambda_{max} = 510 \text{ nm}$ ) を生成する。この赤色錯体の 510 nm における吸光度は、定量的に減少するので、HCHO 濃度を定量することができた。これらの化学反応を用いる FIA システムを構築した。最適条件下において HCHO 0.25 ~ 1.00 mg/L の濃度範囲で直線性の良好な検量線を得た。検出限界は 0.02 mg/L であった。0.25, 0.50, 1.00 mg/L の HCHO の繰り返し測定 ( $n = 5$ ) における併行精度は、2.03, 0.80, 0.27% であった。1 時間あたり 15 試料の HCHO を計測することが可能である。産業排水を蒸留処理し、本システムを用いて定量したところ、従来法と一致する結果を得た。以下に検出に用いた化学反応を示す。

HCHO は、式(1)に示すように硫酸ヒドロキシルアミンと縮合反応を起こし、ホルムアルドキシムを生成する。



ここに鉄(III)を添加すると、残存する硫酸ヒドロキシルアミンは、鉄(III)を鉄(II)に還元する (式(2))。

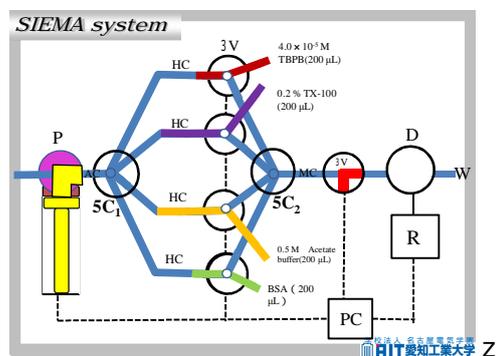


この溶液に phen を添加すると、赤色の鉄(II)-phen 錯体 ( $\lambda_{max} = 510 \text{ nm}$ ) が生成する (式(3))。



鉄(II)-phen 錯体の生成量は、式(1)に示す反応における硫酸ヒドロキシルアミンの残存量に依存する。最適条件下で HCHO 0.25 ~ 1.00 mg/L ( $8.32 \times 10^{-6} - 3.33 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) の検量線が得られた。0.25, 0.5, 1.0 ppm に対する各 5 回の繰り返し測定における相対標準偏差は、それぞれ 2.03, 0.80, 0.27 % と良好であった。フローシグナルから得られた検量線は  $y = 0.0316x + 9 \times 10^{-5}$  ( $y$  は Abs.,  $x$  は mg/L で表した HCHO 濃度) となり、相関係数は 0.999 であった。検出限界 ( $S/N = 3$ ) は 0.02 mg/L, 定量下限 ( $S/N = 10$ ) は 0.06 mg/L $^{-1}$  であった。1 時間あたり 15 試料の測定が可能であった。実試料として工場廃水中のホルムアルデヒドに適用した結果を表に示す。

(3) SIEMA による血清アルブミンの自動分析システムの開発



Simultaneous Injection/Effective Mixing Analysis System(SIEMA)はシーケンシャル

インジェクション法 (SI)・マルチコミュニケーションフロー法 (MCFA)・フローインジェクション法 (FI) を融合した「新たな流れ分析法」で新規性が高い。SI は溶液の混合が不十分で感度が悪い。MCFA はソレノイドバルブで溶液流れを制御できるが、ペリスタポンプへの負荷により溶液流れに乱れが生じる。FA は溶液の送液が連続的であるので、試薬廃棄量が多いが、溶液混合は十分で、検出感度は良好である。SIEMA はシリンジポンプ・ソレノイドバルブ・ホールディングコイル・クロスコネクター・ミクシングコイル・検出器から構成される。溶液はシリンジポンプで吸引されるが、ソレノイドバルブで流れが選択的に制御される。キャリアでホールディングコイル内の溶液を吸引・保持するが、Triton X と緩衝液の 750  $\mu\text{L}$  は予め吸引した。これらの溶液はライン・検出器の洗浄のために利用される。そのうち各 200  $\mu\text{L}$  (総量 800  $\mu\text{L}$ ) が同時に吸引され、キャリアで押し流される。5 方クロスコネクターを通して送液するが、同じ流速でなければならない。3 方ソレノイドバルブの切り替えで 2 つ目の 5 方クロスコネクターで 4 成分が混合され、3 方バルブを通過しミクシングコイルで発色する。この発色体の吸光度は 625 nm で測定される。この場合は 4 流路 (TritonX-100, 緩衝液、尿試料、染料) が組み込まれ、溶液流れ・混合は PC により制御され、測定は自動化された。洗浄用の Triton X と緩衝液の 750  $\mu\text{L}$  を用いない場合は下図に示すようにベースラインにドリフトとノイズなシグナルが見られた。用いた染料テトラプロモフェノールブルー(TBPB)は pH3.2 においてアルブミンと青色の会合体を形成した。生成された会合体はアルブミンの濃度に比例し吸光度の増大が見られた。Triton X-100 が存在すると青色会合体の呈色は安定

したことから、非イオン性界面活性剤を添加することとした。尿に存在する通常の無機イオンである  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$  はアルブミンの定量には影響をあたえない。検量線は 10-50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  の範囲で良い直線性を示し、試料処理数は 37/h であった。検量線のフローシグナルを以下に示す。

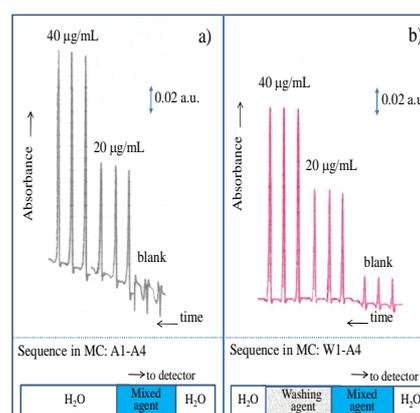


Fig.2

## 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)

- N.Teshima, M.Kuno, M.Ueda, H. Ueda, S.Ohno, T. Sakai, "Automated stopped-in-dual-loop flow analysis system for catalytic determination of vanadium in drinking water", *Talanta*, 79, 517-522 (2009). Doi: 10.1016/j.talanta.2009.04.018、査読有
- W.Siangproh, N.Teshima, T. Sakai, S.Katoh, O.Chailapakul, "Alternative method for measurement of albumin/creatinine ratio using spectrophotometric sequential injection analysis", *Talanta*, 79, 1111-1117(2009). Doi:10.1016/j.talanta.2008.12.068、査読有

N.Teshima, D.Noguchi, Y.Joichi, N. Lenghor, N.Ohno, T.Sakai, S.Motomizu, "Simultaneous Injection-Effective Mixing Analysis of Palladium", *Anal. Sci.* (Rapid Communications), 26, 143-144 (2010). 査読有

中井洋和, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, "硫酸ヒドロキシルアミンと鉄(III)-1,10-フェナントロリン錯体を用いる排水中ホルムアルデヒドのフローインジェクション吸光度分析", *分析化学*, 59, 273-278 (2010). 査読有

N.Teshima, S.K.M.Fernandez, M.Ueda, H. Nakai, T. Sakai "Flow injection spectrophotometric determination of formaldehyde based on its condensation with hydroxylamine and subsequent redox reaction with iron(III)-ferrozine complex", *Talanta*, 84, 1205-1208(2011), 査読有

安藤詩茉, 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 本水昌二, "新規な同時注入 / 迅速混合流れ分析法による残留塩素の定量", *分析化学*, 61, 115-121 (2012). 査読有

[学会発表](計 78 件)

Tadao Sakai, Kanchana Watla-iad, Weena Siangproh, Norio Teshima, Kate Grudpan, Orawon Chailapakul, "Application of flow-based techniques to diabetic diagnosis", The 16<sup>th</sup> International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA 2010) (Pataya, Thailand, 2010.4.27)

Tadao Sakai, Norio Teshima, Weena Siangproh, Nuanlaor Ratanawimarnwong, Shoji Motomizu, "Automated Analytical System for

Urinary Protein Using Flow-based Techniques", IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS 2011) (Kyoto International Conference Center, 2011.5.25)

[図書](計 3 件)

(社)日本分析化学会フローインジェクション分析研究懇談会 編, 小熊幸一, 本水昌二, 酒井忠雄 監修: 役にたつフローインジェクション分析, 手嶋紀雄 分担執筆, 医学評論社 (2009).

[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

酒井 忠雄 (SAKAI TADAO)  
愛知工業大学・工学部・教授  
研究者番号: 30076038

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: