

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620103

研究課題名(和文)新しい時間計測-化学発光反応の創出と小型分析装置の試作

研究課題名(英文)Creation of new time measurement-chemiluminescent reaction and prototyping of compact analyzer

研究代表者

五十嵐 淑郎 (IGARASHI, Shukuro)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：70150258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：クロロフィル化学発光系において、糖類マルトースの特異的な誘導時間遅延現象を見出し、 $0.1\mu\text{M}$ のマルトースの時間計測-化学発光測定法(iTem-CL法)を確立した。また、自己触媒反応における反応機構の速度論的解析を例として、本法が定感度すなわち“無限感度”法であることを証明した。小型装置の試作については、現有の化学発光測定装置(マイクロテックニチオン製ジーンライトS-200)を用いた場合、装置本体のハード面の改良を行わなくとも本法が、使用可能であった。本法は、臨床分析(点滴剤中のマルトース分析)や環境分析(河川水中のRu(III)分析)に対する簡便な分析法であり、今後広範囲な応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In chlorophyll chemiluminescence system, a specific inductive time delay phenomenon of saccharide maltose was found, and the time measurement - chemiluminescence analysis (iTem-CL method) of $0.1\mu\text{M}$ maltose was established. Moreover, by the kinetic analysis of reaction mechanism for autocatalytic reactions, it was proved that iTem-CL method is a constant sensitivity or "infinite sensitivity" method. For the prototype of compact analyzer, when using the existing chemiluminescence analyzer (Gene Light S-200 made in Microtec Niton), that even without the improvement of the hard aspect of the apparatus body is available was found. As a basis, the detailed examination of factors such as temperature, mixture, the signal detection was performed. The iTem-CL method was a simple and easy analytical method for clinical sample (maltose in an intravenous feeding agent) and the environmental sample (Ru(III) ion of river water), and extensive application is expected in future.

研究分野：計測化学

キーワード：時間計測 化学発光 時計反応 自己触媒反応 iTem-CL 微量分析 簡易分析 極限計測

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己触媒反応を用いる分析法

各種スペクトル分析法において、微量分析対象物を定量しようとした場合、そのほとんどが、シグナルのピーク高さかピーク面積の違いにより、定量する方法が用いられている。一方、時間計測法は、反応開始からシグナルピークが現れるまでの時間の違いを計測することにより分析対象物を定量する簡便な方法である。これまで、応募者は自己触媒反応を用いる目視法、pH法、吸光光度法、あるいは時間計測-マイクロデバイス法、FIA法などを開発してきた。自己触媒反応を計測化学に応用した最初の報告は、応募者を含むM.Ishiharaらのものである(文献)。この報告では、速度論的解析から自己触媒反応が無限感度(一定感度)を持つ究極の計測法となることが予言された。

(2) 最近の動向

最近では、応募者が銅(II)-フタロシアニン錯体/KBrO₃系の自己触媒反応/吸光光度法で、この反応のトリガー(引き金物質)となるRu(III)を10⁻¹⁴M(3.34ppq)まで検出できることを報告した(文献)。これは、Ru(III)の定量法としては、世界最高の検出レベルである。本研究課題のiTEm-CL法は化学発光反応におけるシグナル計測を強度ではなく発光が出現するまでの時間を計測するものである。化学発光の観点からの研究アプローチは、応募者の研究を除いてこれまで皆無である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分析化学の分野において日常的に行なわれてきた微量分析法に対し、その観点とは大きく異なる測定概念を持つ、時間計測-化学発光法の萌芽的研究を行なうことにある。その新概念とは、“光るまでの時間を計測する無限感度分析法”である。本研究では、この方法をiTEm-CL法(Inductive Time with Efficient Measurement Chemi-luminescence Method)と命名し、微量分析の分野にブレークスルーをもたらしたいと考えている。具体的には、2ヵ年の計画で化学発光系における誘導時間を変化させる特異な時計反応や自己触媒反応の探索を行うこと、反応機構に関する速度論的解析、またそれを利用したiTEm-CL専用装置の試作を目指すことにある。

3. 研究の方法

(1) 新規化学発光系を用いる微量分析法の開発

化学発光反応の誘導時間に影響を及ぼす化学発光基質(ポルフィリン類、フタロシアニン類などの新規発光体)と酸化剤/還元剤の組み合わせを検討する。これらの反応系を中心に触媒(イムノアッセイ標識酵素など)および阻害物質(有害金属イオンなど)の添加効果・最適条件を検討し、ppm ~ ppbレベルの微量成

分の分析法を開発する。

(2) 微弱発光反応の探索と速度論的解析

自己触媒反応では、強いシグナル強度を有する発光基質の存在は必要ではない。シンプルな酸化還元反応によって微弱発光が観測される(未発表データ有り)。日常でも起こっている微弱発光反応を利用することは、新しいiTEm-CL法を大きく発展させる上で重要である。したがって、この種の微弱発光反応の探索を行なう。また、新規化学発光系の反応速度論を駆使して、反応機構に関する基礎研究を行なう。

(3) iTEm-CL専用装置の試作

平成25年度申請によって購入されたルミカウンター微弱発光測定装置(NU-2600-IDM型、マイクロテックニチオン製)および、現有している簡易なルミカウンター装置(ジーンライトS-200型、マイクロテックニチオン製)の両者の性能比較を詳細に行ない、専用装置の開発に関する課題と解決法を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 新規化学発光の反応因子(触媒・阻害剤など)の調査

クロロフィル化学発光系における糖類の調査とマルトース分析法の開発

報告者は、既に、金属ポルフィリン錯体として、ポルフィリン骨格をもつ鉄-クロロフィル錯体、人工染料である銅-フタロシアニン錯体、および葉緑素であるマグネシウム錯体のクロロフィルを発光基質とする化学発光を新たに発見し、報告している。これらの発光基質の中で、植物の葉に存在するクロロフィルを用いた、クロロフィル/アセトニトリル/過酸化水素系化学発光系を選び、各種共存物添加における化学発光シグナルの誘導時間について調査を行なった。グルコース(単糖)をはじめとする糖類は、化学反応における還元剤として働くことが知られており、過酸化水素を酸化剤とする反応系では、酸化還元反応(Redox反応)に大きく影響を及ぼすことが期待される。10種類の糖をそれぞれ単独に添加した。

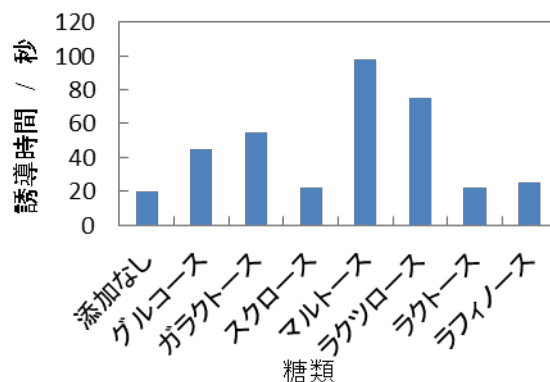


図1 糖類の誘導時間に与える効果

グルコース(単糖), ガラクトース(2糖), スクロース(2糖), マルトース(2糖), ラクトース(2糖), ラフィノース(3糖)の中で, マルトースが特異的に誘導時間に影響を与えることを見出した。これは, マルトースの分子構造上に存在するアルデヒド基の効果が顕著に現れたものと考えられ, 興味深い特性である。実際の化学発光シグナルを図2に示す。

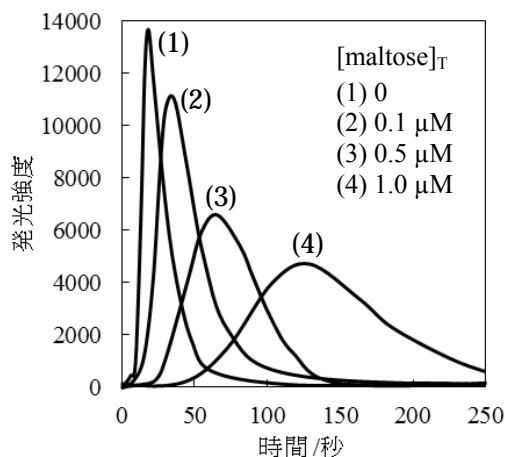


図2 マルトース濃度と誘導時間との関係

マルトースの時間計測化学発光法の開発分析操作を確立する上での実験因子(水酸化ナトリウム濃度と過酸化水素濃度)の最適化を行なった。その結果, 水酸化ナトリウムは $4.0 \times 10^{-4} \text{M}$, 過酸化水素は 0.10M であった。本法を他法と比較すると表1ようになる。

表1 他法との比較

分析法	定量範囲 / M
本法	$1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-6}$
液体クロマトグラフィー	$1.4 \times 10^{-4} \sim 2.8 \times 10^{-3}$
キャピラリー電気泳動	$1.4 \times 10^{-4} \sim 5.6 \times 10^{-3}$
ルミノール CL-FIA	$2.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3}$

結論

時間計測-化学発光分析が生体系サンプルの分析に成功した例は, 今回の研究が最初である。特に, 数多い糖類の中でも, 2糖類のマルトースが特異的に化学発光シグナルの誘導時間に影響を及ぼした現象の発見は, 研究成果としては大きいと考えられる。また, 完成された分析法は, マルトースが $1.0 \times 10^{-7} \text{M} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ の範囲で, 良好な直線を得ることができ, 他の既存の方法に比べても低濃度のマルトースを測定できる点は, 時間計測-化学発光分析の優位性を示すものである。

(2) 微弱発光反応の探索と速度論的解析

微弱発光反応のiTem-CL法への適用

自己触媒反応は, これまで目視法, pH法, 吸光度法あるいは時間計測-マイクロデバ

イス法, FIA法などで報告がある。それらの中で, 亜硫酸ナトリウム/過酸化水素系における化学発光について検討を行った。その結果, この反応系で微弱発光を見出した。この発光は, 設備品として購入したルミカウンター微弱発光測定装置によってもたらされた研究成果である。この装置を用いて時間計測-化学発光分析法を開発することが可能であることが分かった。しかし, 研究の目的が簡便な化学発光測定装置の試作にあることから, 安価かつ汎用的な化学発光測定装置(例えば, ジーンライト S-200)を用いた適用を考えた時, 最大でなくともある程度のシグナル強度および発光時間幅の狭いピークシグナルが必要との考えに至った。そこで, 亜硫酸ナトリウム/過酸化水素系に適合した化学発光基質の調査を行った。10種類の発光基質の中では, 1,10-フェナントロリンが本系に適していることが分かった。具体的な例として微量Ru(III)の分析法を開発した。本研究では, 亜硫酸ナトリウム水溶液の溶存酸素による酸化を防止するための方法も綿密に考えられている。その結果, Ru(III)の添加により化学発光するまでの誘導時間の短縮が観測され, 10^{-7}M レベルでのRu(III)の定量法を開発した。検出限界(3σ)は $2.2 \times 10^{-8} \text{M}$ であり, 蛍光光度法や原子吸光法と同程度の分析が可能であった。

反応機構の速度論的解析

iTem-CL反応系を理解する上で, 自己触媒や時計反応の速度論的観点からの有用な基礎的知見を得ることは重要である。自己触媒反応系のコバルト-PAPS錯体のコバルト(II)を触媒とする自己触媒反応に対して, 時間計測-化学発光分析法の観点から速度論的解析を試みた。反応速度式を以下に示す。

$$R + C \xrightarrow{k} 2C + P$$

$$[R] = \frac{[R_0]([R_0] + [C_0])}{[R_0] + [C_0] \exp(k[R_0] + [C_0]t)}$$

ここで, $[R]$ は発光基質濃度, $[C]$ は金属触媒濃度, P は分解生成物および下付きの0は初濃度の略である。

この結果から, iTem-CL法は, 化学発光シグナル強度に依存しない高感度(無限感度)計測系であることが明らかとなった。

結論

設備品として購入した微弱発光計装置によって通常の化学反応で起こるような単純な微弱発光(亜硫酸ナトリウム/過酸化水素系)においても, iTem-CL法が開発できることが明らかになった。このことは, iTem-CL法の分析対象物を広範囲に展開できることを示すものである。また, 簡易な装置開発に関しては, ある程度のシグナル強度, 時間幅の狭いピークが必要であることが分かった。速度

論的解析からは、シグナル強度ではなく時間計測である点が原理的に無限感度計測を意味することを証明した。

(3) 装置の試作

時間計測-化学発光分析法の装置開発における課題点

既存の化学発光強度測定装置と比較して、時間計測-化学発光分析法の装置開発上の課題点は、反応スタートの時間精度、溶液の均一な混合、温度コントロール、発光シグナルピーク形状の時間精度など、である。図3の装置内の設計は、課題点 ~ の解決に対応している。

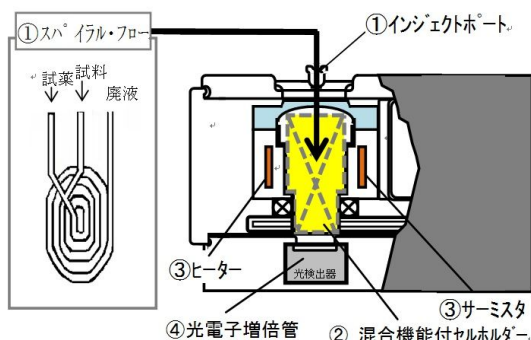


図3 装置図

市販装置の性能比較と小型専用装置開発の検討

本研究課題で購入した設備品(マイクロテックニチオン製NU-2600-IDM型ルミカウンター微弱発光測定装置)は上記 ~ の課題点を十分満足している。検出感度は 5×10^{-18} M ATP, また検出時間分解能0.01secであり、化学発光装置としては高性能である。しかし、本体サイズ300(W)×350(D)×250(H)、重さ13kgの中型分析機器で、価格も周辺機器(データ処理解析ソフト、コンピュータなど)を合算すると約300万円台である。したがって、これを時間計測-化学発光専用装置とするには、小型化の概念からは隔たりがある。本研究課題においては、現有のマイクロテックニチオン製化学発光計測装置 ジーンライトS-200型は、サイズ160(W)×240(D)×104(H)、重さ1.5kg、測定感度 5×10^{-12} M ATP, また検出時間分解能1sec、価格90万円であり、ジーンライトS-200型クラスでの改良が可能であるかの検討を行なった。S-200型の場合、の反応スタートの時間精度に関しては、サンプル注入と同時に発光測定ができる時間制御機能が搭載されている。溶液の均一な混合については、攪拌機能が付いていないため、簡易ストップフローの外部アタッチメントを取り付けることにより、課題を解決できるが、実際にはサンプル注入時の手動注入でも、30分間程度の発光測定時間では、ほとんど時間誤差を生じないことが分かった。温度コントロールについては、測定周辺での温度の変化は、液温(サンプルと試薬溶液)を予め測定するこ

とにより、反応速度をアレニウス式計算ソフトEQUATRAN-G for windows(株式会社オメガシミュレーション)を用いて補正できることが分かった。しかし、エアコンのある実験室では、恒温槽を用いて20 に液温をコントロールすることにより、発光時間誤差を軽減できることが分かった。発光シグナルピークの時間精度については、NU-2600-IDM型装置では、微弱シグナルが測定でき、そのまま使用できるが、ジーンライトS-200型では、小型化に伴う光電子増倍管が小さいため、最大でなくとも一定の化学発光シグナル強度(時間幅の狭い鋭いピーク)が必要あり、適宜、反応系に応じて増感剤の使用が必要な場合があることが分かった。

結論

時間計測-化学発光分析法には、購入設備品ではNU-2600-IDM型は、測定装置として適合しているが、価格やサイズの点で、本研究課題では、さらなる小型化が必要である。現有、ジーンライトS-200型は、価格やサイズの点で本課題と適合しているが、実験因子(温度、混合、シグナル検出)の点で、改良が必要であった。本研究では、温度補正用アレニウス式計算ソフト、ストップフロー型インジェクター外部アタッチメントおよび化学発光増感剤の使用によって、ジーンライトS-200型でも、時間計測-化学発光分析が可能であることを明らかにした。分析装置としては、既存の装置本体のハード面の改良をしない方が、既存のシグナル強度分析装置としても互換性があり、有用との結論に達した。

(4) 実サンプルへの応用展開

臨床分析(マルトース分析)

糖尿病患者には急激な血糖値の上昇を防ぐために、点滴中にはグルコースではなくマルトースが用いられている。したがって、実サンプルとして点滴剤中のマルトースの定量を行なった。本法の分析値、 4.8×10^{-7} Mに対して表示値が 5.0×10^{-7} Mであることから、本法は薬剤の成分分析に使用できる。

結論

上記例の他に、河川水中にRu(III)を標準添加したサンプルについても、添加回収実験を行ない、良好な結果を得ていることから、iTem-CL法は、臨床分析、環境分析などの簡便な分析法として応用が期待される。

<引用文献>

- M. Ishihara, S. Igarashi, *Chem. Lett.*, 1995, 349-350.
- J. Kato, S. Igarashi, *Anal. Sci.*, 21, 2005, 705-707.

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)

〔学会発表〕(計 2件)

遠藤 大介, 大友 孝郎, 五十嵐 淑郎,
『クロロフィル化学発光を用いる反応遅延成分(糖類)の時間計測—化学発光分析法の開発』第24回日本化学会関東支部 茨城地区研究交流会, 2013.11.15, ワークプラザ勝田 (茨城県ひたちなか市).

平野 恭介, 石橋 真奈美, 遠藤 大介,
加藤 潤, 山口 仁志, 五十嵐 淑郎, 『自己触媒反応を用いる時間計測—化学発光法 - 微量Ru(III)の分析 - 』, 第25回日本化学会関東支部 茨城地区研究交流会, 2014.10.31, ワークプラザ勝田 (茨城県ひたちなか市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 淑郎 (IGARASHI Shukuro)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号: 70150258

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し