

**機能性色素と金属イオンを用いる  
病態関連物質の分析法の開発に関する研究**

**2013**

**宮地 加奈子**

# 目次

第一部 序論.....	1
第二部 本論.....	3
第一章 色素－金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法	
第一節 <i>o</i> -ヒドロキシヒドロキノンフタレインとマンガン(II)を用いる スペルミン及び関連化合物の吸光光度定量.....	3
第二節 薬物とアルミニウム(III)との錯生成判定のための簡易スクリーニング法.....	21
第三節 3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロンとマンガン(II)を用いるヒストンの蛍光光度定量とその特性.....	35
第二章 色素－金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法	
第一節 <i>o</i> -ヒドロキシヒドロキノンフタレインとパラジウム(II)を用いる 尿酸の吸光光度定量.....	43
第二節 キシレノールオレンジとジルコニウム(IV)を用いる アルブミンの吸光光度定量.....	50
第三部 結論.....	69
論文目録.....	72
謝辞.....	73
引用文献.....	74

# 第一部 序 論

21 世紀は、安心・安全・健康の時代と言われ、「健康・未病・病気」の概念が広く浸透しており、疾病を早期の未病の段階で発見し、できるだけ早期の治療を行うことが現代医療には求められている。未病の起源は、紀元前の中国・漢の時代に編集され、中国最古の医学書といわれる「黄帝内経」とされ、日本でも 18 世紀に貝原益軒が「養生訓」<sup>1)</sup>で記載している。未病とは、“まだ生活に支障を及ぼす病状は現れていないが、検査値に異常があり、予備軍的な不健康領域にあると考えられる状態”，あるいは“病気の前兆を思わず軽微な症状があり、経過を重視して保健支援や養生のアドバイスが必要と考えられる状態”を指す。このように、未病の段階においては、一般には自覚症状が少なく、病態の進展を伴う場合が多い。したがって、病態を未病の段階で把握するには、該当するバイオマーカーなどの病態関連物質の簡便、高感度測定法の開発が必要である。

一方、現在の病態関連物質においては、マトリックス成分が極めて複雑な試料を扱っている関係上、分離と特異性に優れた HPLC, GC, 酵素分析法, 免疫測定法などが汎用されている<sup>2)</sup>。しかしながら、HPLC や GC では固定相と移動相の性状によるデータのばらつきが大きく、同時に多数の検体を迅速に処理することが困難で、日常検査への導入には不向きな面がある。酵素分析法には酵素自身、基質や基質濃度、反応温度、至適 pH など酵素活性に特有の問題を抱えている。また免疫測定法では、抗原抗体反応の後に未反応の試薬を分離・除去する操作が必要な場合が多く、感度と特異性が用いる抗体の結合特性に大きく左右されるなどの欠点を有している。したがって、臨床現場での多くの要求を満たす臨床化学分析法として、より簡便、迅速で高感度で信頼性のある測定法の開発が熱望されており、優れた特徴を有している光分析法の活用が大いに期待される。被分析物質の化学的性質を踏まえ、光分析法を反応様式別に分類すると、

- [1] 被分析物質の酸化還元能を利用する方法
- [2] 被分析物質の錯生成能を利用する方法
- [3] 被分析物質を誘導化する方法
- [4] その他の方法

に大別される。

このうち、[2]の方法は、他の方法に比べて、反応速度、操作の簡便性などの面で優位性があり、今回取り上げる病態関連物質のスペルミン、医薬品、尿酸、タンパク質は、その構造中に窒素原子、酸素原子、硫黄原子を含むので、それらの原子の非共有電子対を通して金属イオンと配位結合し、金属錯体が生成しやすいので、[2]の分析法が最も効果的であると考えられる。

さらに[2]は、用いる分析試薬によって、

[2-1]金属イオンとの錯生成反応を用いる方法 [2-2]有機試薬との錯生成反応を用いる方法 [2-3]有機試薬と金属イオンの両者を用いる方法

に分類される。

[2-1]、[2-2]は、単に金属イオンあるいは、有機試薬などの錯生成剤との反応により生成する二元錯体(すなわち金属-被分析物質あるいは、錯生成剤-被分析物質の二成分錯体)あるいは錯生成剤と被分析物質が錯生成することによる錯生成剤の退色を利用し、吸光度測定する方法であるが、これらの方法においては、簡便性、再現性、感度、選択性の点で不十分な場合が多いのに対し、

有機試薬、金属イオン及び被分析物質の三者間で生成する三元錯体生成反応を利用する[2-3]の方法は、簡便で高感度、高選択性などの長所を有している<sup>3-11)</sup>。さらに三元錯体としては、一般に混合配位子錯体、混合金属錯体、混合原子価錯体、イオン会合錯体、などに分類されているが、化学分析に広く利用されているのは、(1)混合配位子錯体、(2)イオン会合錯体の2つが度々利用されており、(2)は更に、(2-1)被分析物質(S)と金属イオン(M)間で生成した二元錯体が有機試薬(L)との間でイオン会合型三元錯体を利用するもの...[S-M][L]型、(2-2)金属イオン(M)と有機試薬(L)間で生成した二元錯体が被分析物質(S)との間でイオン会合型三元錯体を利用するもの...[S][M-L]型、に分類される。

また、[2-3]においては、金属イオンと有機試薬との間の呈色錯体生成反応中に、その金属イオンと錯生成能を有する被分析物質を共存させることにより、競合的錯体生成反応させ、その結果としての呈色錯体の退色を利用する分析法の考案も有効と考えられる。

これら三元錯体生成反応に適している有機試薬は、キノイド構造を形成できる高度に発達した $\pi$ 電子系(発色団)を持ち、その有効面積が大きく、五・六員環キレートを形成できる位置に塩基性官能基(錯生成基)及び電子供与性基(助色団)を持つ、更には高次錯体が生成し易いなどの特徴を有するキサントン系、トリフェニルメタン系色素、アゾ系、アントラトラキノン系、クマリン系色素などの有機試薬の利用が極めて有効であり、必然的に金属イオンに対し高感度を示すものが有利と考えられる<sup>12,13)</sup>。

さらにこのような三元錯体反応による呈色錯体は、いずれもかさ高くなることによる沈殿生成が見られる場合が多く、分散剤の共存が必要となる。したがって、生成物に対し適切な界面活性剤を選択し、形成されるミセル溶液中で反応させると、(a)高次錯体生成に伴う高感度化と呈色体の安定化、(b)生成する呈色錯体のミセル界面への濃縮効果による感度の上昇と安定性の増大、(c)選択性の向上、(d)さらなる呈色化学種の吸収断面積の増加などの効果が期待でき、極めて有効であると考えられる。

本研究では、呈色反応及び蛍光反応両面からの追跡が可能な特性を有するキサントン系と、その類似体であるトリフェニルメタン系のような機能性に富む色素を選択し、呈色反応あるいは蛍光反応より検索した結果、スペルミン、医薬品、尿酸、タンパク質の簡便、迅速、高感度な測定法を開発し、その結果を、1)色素-金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法、2)色素-金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法に分類し、記載することとした。

## 第二部 本論

### 第一章 色素－金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法

#### 第一節 *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレインとマンガン(II)を用いる スペルミン及び関連化合物の吸光光度定量

##### 1. 緒言

ポリアミンは、3個以上のアミノ基を持つ非タンパク性の脂肪族アミンの総称で、メチオニンやアルギニンに由来し、ポリアミン合成経路によりオルニチンからまずプトレッシン(Put)が生成され、ついでスペルミジン(Spd)、スペルミン(Spm)がつくられる。临床上ポリアミンの測定は、悪性腫瘍診断の補助、術後化学療法後の効果判定に有用であり、又、心筋梗塞、膠原病やその他の炎症性疾患でも高値を示し、このような病態のアセスメントに役立つ可能性が示唆されている<sup>14)</sup>。

ポリアミンの定量法としては、高速液体クロマトグラフ法<sup>15-22)</sup>(HPLC:High Performance Liquid Chromatography)、免疫酵素法<sup>23)</sup>(ELISA:Enzyme Linked Immunosorbent Assay)あるいはガスクロマトグラフ法<sup>24,25)</sup>(GC:Gas Chromatography)などが報告されているが、いずれも操作が煩雑で、選択性、感度の面で優れた分析法は殆んどない。一方、ポリアミンが複数の窒素原子を持っているので、マンガン(II){Mn(II)}、亜鉛(II)、パラジウム(II)など多くの金属イオンと錯生成することが知られている<sup>26,27)</sup>にもかかわらず、その金属配位能を利用した定量法は殆ど報告されていない。

そこで、今回ポリアミンのうち、生理化学的、臨床化学的に最も興味深いSpmを取り上げ、{金属－色素－Spm}の三元錯体生成反応を利用する簡便、高感度な吸光光度定量法の確立を目的として検討した。

また、フローインジェクション分析法(FIA:Flow Injection Analysis)は、必要な前処理、反応、検出を、テフロンチューブを通る流れの中で自動的に行う分析法で、①サンプルや試薬の消費が微量ですむ、②分析に要する時間が短い、③分析精度が高い、など、他の分析法に比べて数々の利点を持っており、臨床分析、環境分析など多くのサンプルを短時間に分析しなければならない分野で威力を発揮している。次いで、本呈色反応に基づくFIAの開発についても検討することとした。

## 2. 実験

### 2-1 試薬及び装置

スペルミン(Spm)溶液：Sigma 社製塩酸スペルミンを水に溶解して  $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$  とし、冷暗所に保存した。使用に際しては、本溶液を適宜水で希釈して用いた。その他の Spm 関連化合物(スペルミジン、アセチルスペルミンなど)は、同じくその塩酸塩(アセチルスペルミンのみ Fuluka 製)を Spm 溶液と同様に調製して用いた。

Mn(II)溶液：Merck 製原子吸光分析用マンガン標準液(1000ppm)を用時水で希釈して、 $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$  Mn(II)溶液として調製し、冷暗所に保存し、適宜希釈して用いた。

*o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン(QP) 溶液：精製 QP を塩酸 1 滴を含むメタノールに溶解し、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  溶液として調製し、褐色ビンに保存して用いた。

Tween40 溶液：キシダ化学製ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート(Tween40)を水に溶解し、1.0%溶液として用いた。

緩衝液：0.1M 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(トリス)溶液及び 0.1M 塩酸溶液を pH メーターで測定しながら混合し、pH8.0 の緩衝液として用いた。

その他の試薬は市販特級品を精製せずそのまま用いた。また、本実験では、ミリポア製超純水製造システムによる精製水を用いた。

吸光度および吸光スペクトルの測定には島津製作所製 UV-2400PC 型分光光電光度計で層長 10mm の石英製セルを使用した。また、pH の測定には堀場製 F-51 型複合電極 pH メーターを用いた。

FIA の測定に際しては、日本分光製 PU-2080 型 HPLC ポンプ及び UV-2075 型 UV-V 検出器(17 $\mu$ l フローセル)を用いた。

### 2-2 定量操作

10 ml のメスフラスコに、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  Mn(II)溶液 0.5 ml、非イオン性界面活性剤の 1.0%Tween40 液 2.0ml、0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)2.0ml、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  QP メタノール溶液 0.5ml 及び 2~15 $\mu$ g の Spm 含有液を加え、水で全量を 10 ml とする。本溶液を試験管に移し、よく攪拌後、室温で 15 分放置する。この {Mn(II)-QP-Spm} 溶液を、別に Spm のみを除いて同様に処理して得た {Mn(II)-QP} 溶液を対照として、555nm における吸光度を測定し、予め作成して得た検量線より Spm 量を求める。

## 3. 結果と考察

### 3-1 定量条件の検討

まず、使用する色素及び金属イオンの組み合わせの予備的検討を行った。色素としてはキサントン系色素の *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン(*o*-カルボキシフェニルフルオロン, QP), *m*-カルボキシフェニルフルオロン(MCPF), *p*-カルボキシフェニルフルオロン(PCPF), *o*-スルホフェニルフルオロン(SPF), バニリルフルオロン(VF), 4,5-ジブromo-*o*-カルボキシフェニルフルオロン

(DBQP), 3',4',5',6'-テトラクロロ-*o*-カルボキシフェニルフルオロン(TCQP), 3',4',5',6'-テトラブロモ-*o*-カルボキシフェニルフルオロン(TBQP), 並びに 3',4',5',6'-テトラフルオロ-*o*-カルボキシフェニルフルオロン(TFQP)を, 金属イオンに(*N, N*)配位能が高い Mn(II), コバルト(II), 亜鉛(II), パラジウム(II), ニッケル(II)などを選び, 色素と金属イオンの組み合わせを検討した. その結果, Tables1-1, 1-2に見られるように色素としてQP, 金属イオンとしてMn(II)を併用するとき, Spmとの呈色反応において, 感度の面で最も優れていることを認めた.

本呈色反応時における液性の影響を検討した. その結果, 0.05M ホウ砂-0.1M 塩酸緩衝液, 0.1M リン酸二水素カリウム-0.1M リン酸水素二ナトリウム緩衝液, 0.1M トリス-0.1M 塩酸緩衝液のうち, 0.1M トリス-塩酸緩衝液を全量 10 ml に対し 2.0 ml 加え, Fig.1-2に見られるように, 最終液性を pH7.6~8.4 に調整するとき, 吸光度は最大でほぼ一定の吸光度を示した.

三元錯体は, 性質上かさの高い凝集体を生成するので, 水溶液中では一般的に沈殿を生じる場合が多いが, 本呈色錯体も, 分散剤非共存下では, 調製後, 徐々に沈殿を生じた. したがって, 生成する呈色錯体の可溶化, 感度の上昇などを目的として, 分散剤として種々の界面活性剤の効果を検討した. 界面活性剤のうち, [ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)]のような陰イオン性, [ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート(Tween 40), ポリビニルアルコール(PVA), ポリオキシエチレンラウリルエーテル(Brij 35), ポリエチレングリコールモノ-*p*-オクチルフェニルエーテル(Triton X-100), ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(Tween 20)]のような非イオン性界面活性剤を用いて比較検討した. その結果, 1.0%Tween 40 溶液を全量 10 ml に対して 2.0 ml 以上加えるとき, Table1-3 に示すように, 最大でほぼ一定の吸光度を示した. 尚, 塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(HTAC)のような陽イオン性界面活性剤の共存は, {Mn(II)-QP}溶液との呈色反応が著しく, 試薬ブランクの{Mn(II)-QP}溶液の吸光度が高くなり, 試料溶液と試薬ブランク溶液の呈色差が殆んどなくなるので用いなかった.

$5.0 \times 10^{-6}$ M Spm に対し, 用いる Mn(II)量及びQP 量の影響を検討したところ, QP:Mn(II)を 1:1 モルに設定し, 最終 10ml に対し,  $1.0 \times 10^{-3}$ M QP 溶液 0.5ml 及び  $1.0 \times 10^{-3}$ M Mn(II)溶液 0.5ml を添加するとき, 吸光度は最大値を示した. Mn(II)量及びQP 量の検討結果を, それぞれ Figs.1-3, 1-4 に示す.

{Mn(II)-QP}溶液を対照とした{Mn(II)-QP-Spm}溶液の吸光度値は, これら両溶液を室温で 15 分以上静置したとき, 一定値が得られ, 以後少なくとも 3 時間は一定であることを認めた. また, 試薬添加順序の検討を行ったところ, 添加順序の変更に伴う吸光度の相違が認められ, Mn(II)→Tween40→緩衝液→QP→Spm の順で添加する時, 最も高い吸光度が得られた.

Table 1-1 Color reaction between Mn(II)-dye complex and Spm

Dye	Absorbance at $\lambda_{\max}$	
QP	0.480	555
MCPF	0.300	560
PCPF	0.214	565
SPF	0.395	560
VF	0.127	560
DBQP	0.055	570
TFQP	0.113	570
TBQP	0.019	545
TCQP	0.000	—

Spm: $3.0 \times 10^{-6}$ M; Mn(II): $5.0 \times 10^{-5}$ M; Dye: $5.0 \times 10^{-5}$ M; Tween40:0.2%; pH8.0;

Reference:Mn(II)-dye solution.



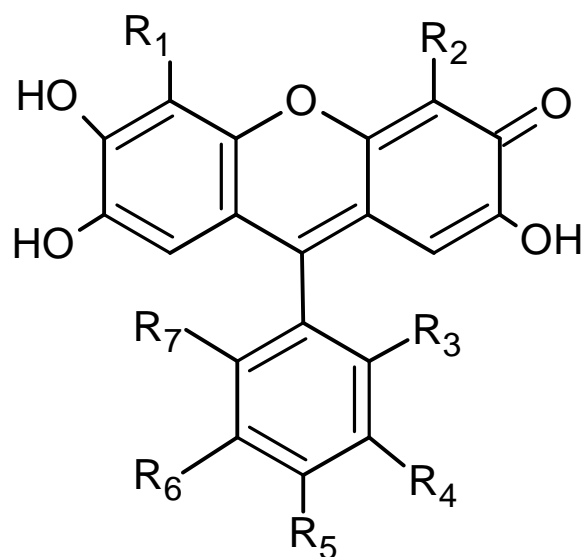


Fig. 1-1 Structure of xanthene dyes used

Dye	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
QP	H	H	COOH	H	H	H	H
MCPF	H	H	H	COOH	H	H	H
PCPF	H	H	H	H	COOH	H	H
SPF	H	H	SO <sub>3</sub> H	H	H	H	H
VF	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
DBQP	Br	Br	COOH	H	H	H	H
TFQP	H	H	COOH	F	F	F	F
TCQP	H	H	COOH	Cl	Cl	Cl	Cl
TBQP	H	H	COOH	Br	Br	Br	Br

Table 1-2 Color reaction between metal- QP complex and Spm

Metal ion	Absorbance at $\lambda_{max}$	
Mn(II)	0.480	555
Co(II)	0.342	590
Zn(II)	0.280	560
Pd(II)	0.020	560
Ni(II)	0.000	-

Spm: $3.0 \times 10^{-6}M$ ; Metal ion: $5.0 \times 10^{-5}M$ ; QP: $5.0 \times 10^{-5}M$ ; Tween40:0.2%; pH 8.0;

Reference:metal-QP solution.

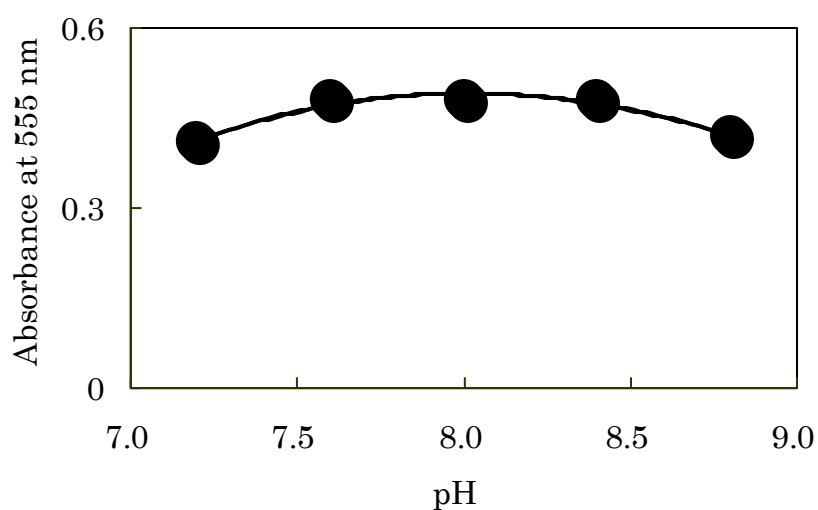


Fig. 1-2 Effect of pH

Spm: $3.0 \times 10^{-6}M$ ; Mn(II): $5.0 \times 10^{-5}M$ ; QP: $5.0 \times 10^{-5}M$ ; Tween40:0.2%;

Reference: {Mn(II)-QP} solution.

Table 1-3 Effect of surfactants

Surfactant	Absorbance at 555 nm
Tween 40	0.480
Tween 20	0.339
PVA(n:500)	0.377
Brij 35	0.427
Triton X-100	0.430
SDS	0.267

Spm: $3.0 \times 10^{-6}M$ ; Mn(II): $5.0 \times 10^{-5}M$ ; QP: $5.0 \times 10^{-5}M$ ; Surfactants:0.2%;

Reference: {Mn(II)-QP} solution.

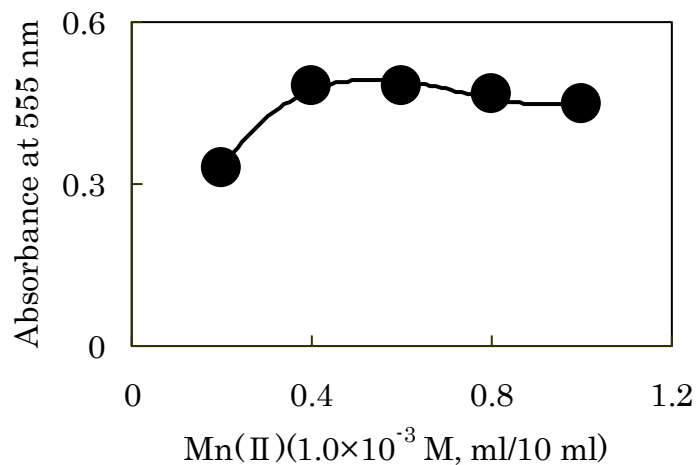


Fig. 1-3 Effect of Mn( II) concentration  
 Spm: $3.0 \times 10^{-6} \text{M}$ ; QP: $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ ; Tween40:0.2%; pH 8.0;  
 Reference: {Mn( II)-QP} solution.

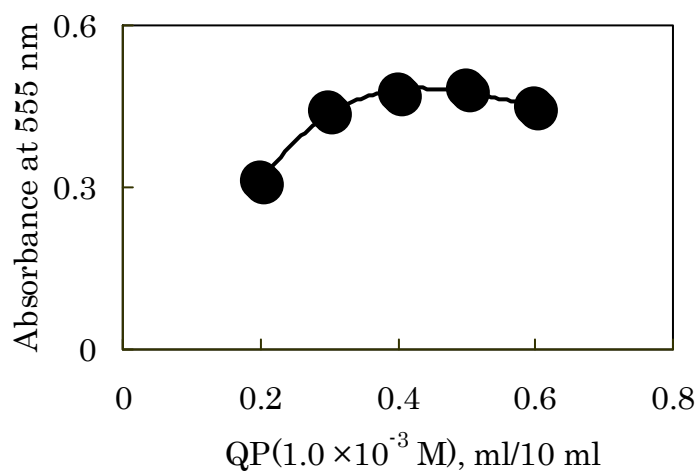


Fig.1-4 Effect of QP concentration  
 Spm: $3.0 \times 10^{-6} \text{M}$ ; Mn( II): $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ ; Tween40:0.2 %; pH 8.0;  
 Reference: {Mn( II)-QP} solution.

### 3-2 吸収スペクトル

弱塩基性域, 非イオン性界面活性剤の Tween40 共存下での {Mn(II)-QP-Spm} 溶液及び {Mn(II)-QP} 溶液の吸収スペクトルを測定した. その結果, Fig.1-5 のように両溶液の吸光度差は 555nm 付近で最大となり, Spm 濃度に比例した.

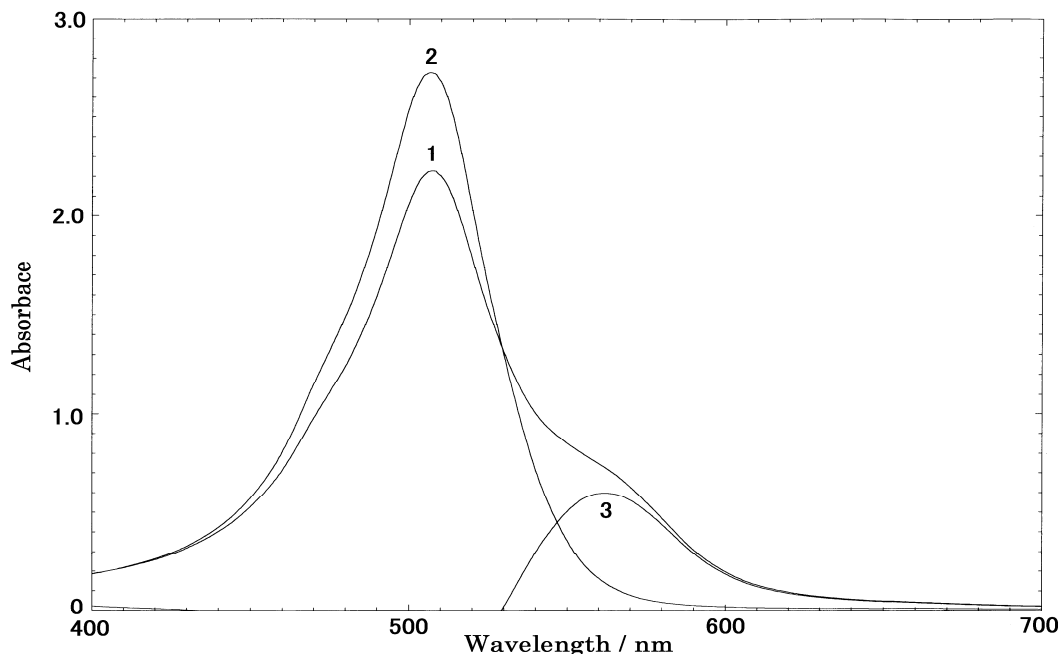


Fig. 1-5 Absorption spectra of {Mn(II)-QP-Spm} and {Mn(II)-QP} solutions  
Spm: $5.0 \times 10^{-6}$ M; Mn(II): $5.0 \times 10^{-5}$ M; QP: $5.0 \times 10^{-5}$ M; Tween40:0.2%; pH8.0; Reference:Water;  
Curve1, {Mn(II)-QP-Spm} solution; Curve2, {Mn(II)-QP} solution; Curve3, Curve1 minus Curve2.

### 3-3 検量線の作成

2-2 の標準定量操作に従って Spm の検量線を作成したところ,  $1.5 \mu\text{g/ml}$  以下の Spm 濃度範囲で原点を通る良好な直線を得ることができた. (Fig.1-6)本定量操作における {Mn(II)-QP} 溶液に対する {Mn(II)-QP-Spm} 溶液の見かけのモル吸光係数( $\epsilon$ )は,  $\epsilon=1.4 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  と高感度であった. また,  $0.5 \mu\text{g/ml}$  における相対標準偏差(RSD)は  $0.50\%$ ( $n=10$ )であり, 再現性にも非常に優れていた. Spm 及びその関連化合物の定量感度( $\epsilon$ )並びに再現性(相対標準偏差, RSD)を Table1-4 に一括表示するが, スペルミジン, アセチルスペルミンはスペルミンのほぼ 1/2 程度の感度であり, また, プトレッシン, カダベリンは殆んど本呈色反応を示さなかった.

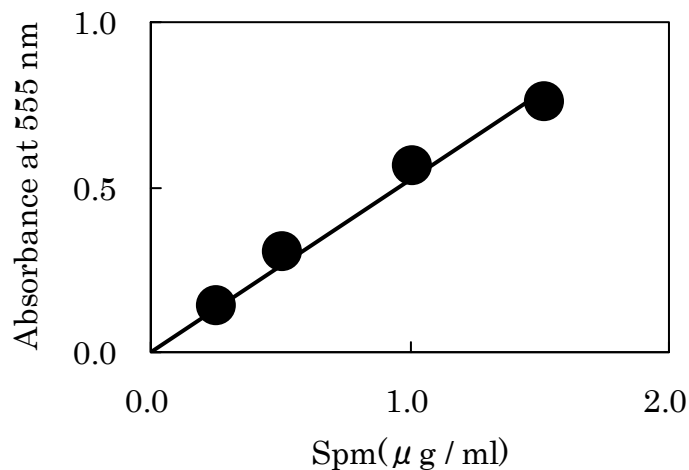


Fig. 1-6 Calibration curve for Spm

Mn(II): $5.0 \times 10^{-5}$ M; QP: $5.0 \times 10^{-5}$ M; Tween40:0.2 %; pH8.0;

Reference: {Mn(II)-QP} solution.

Table 1-4 Molar absorptivities and reproducibilities of Spm and its related compounds

Compound	$\epsilon (\times 10^4)$	RSD(%)
Spm	14.0	0.50
Spd	6.1	0.60
Put	0.06	—
Cad	0.05	—
AcSpm	7.50	—
<i>N</i> <sup>8</sup> -AcSpd	0.30	—
AcPut	0	—

Spm : Spermine  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Spd : Spermidine  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Put : Putrescine  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

Cad : Cadaverine  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$

AcSpm : Acetylspermine  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$

*N*<sup>8</sup>-AcSpd : *N*<sup>8</sup>-Acetylspermidine  $\text{CH}_3\text{COHN}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

AcPut : Acetylputrescine  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$

### 3-4 共存物質の影響

本操作法における共存物質の影響を Spm0.5 $\mu$ g/ml を用いて検討した。100 倍モル量でも影響しないものとしては、亜鉛(II)、塩化ナトリウム、硝酸カリウム、リン酸水素二ナトリウム、シアン化カリウム、グルコース、グリシン、尿素、クレアチニン、カフェインであり、20 倍モル量で影響が見られないものはチアミン、等倍モル量で影響が見られないものは銅(II)であった。微量の鉄(III)の共存は正の誤差を与えるが、シアン化物イオンの添加によってその妨害を除去することができた。これらの結果を Table1-5 に示すが、本操作法では、極めて共存物質の影響が少ないことが分かった。

Table 1-5 Effect of foreign substances

Substance	Molar ratio (Substance/Spm)	Recovery (%)
None	—	100.0
Cu(II), nitrate	1	100.0
Fe(III), sulfate	1	115.2
Zn(II), nitrate	100	100.0
NaCl	100	100.0
KNO <sub>3</sub>	100	100.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100	100.0
KCN	100	100.0
Glucose	100	100.0
Glycine	100	100.0
Thiamine	20	100.0
Urea	100	100.0
Creatinine	100	100.0
Caffeine	100	100.0

Mn(II):5.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M; QP:5.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M; Tween40:0.2 %; pH8.0;

Reference: {Mn(II)-QP} solution.

### 3-5 呈色錯体の組成

本法における呈色体の組成を Figs.1-7~1-9 に示すように連続変化法及びモル比法を用いて検討した。その結果、先ず Mn(II):QP 組成としては、Spm 非存在下では Mn(II):QP=1:1、Spm 存在下では Mn(II):QP=1:2 であった。また、QP と Spm のモル比はを同様に求めたところ、QP:Spm=1:1 であることを認めた。従って、本呈色体の組成は Mn(II):QP:Spm=1:2:2 であることが推察された。

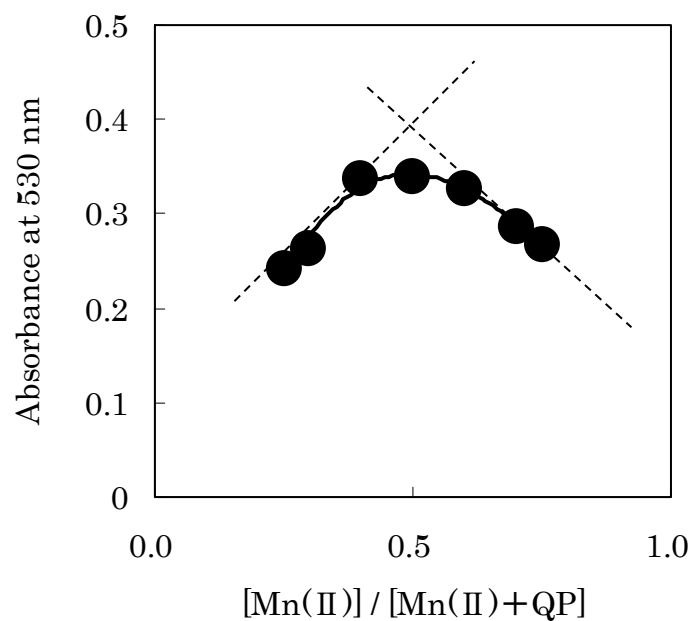


Fig. 1-7 Composition of the complex in the absence of Spm by the continuous variation method  
 $\{Mn(II) + QP\}: 1.0 \times 10^{-4} M$ ; Tween40: 0.2%; pH 8.0; Reference: QP solution.

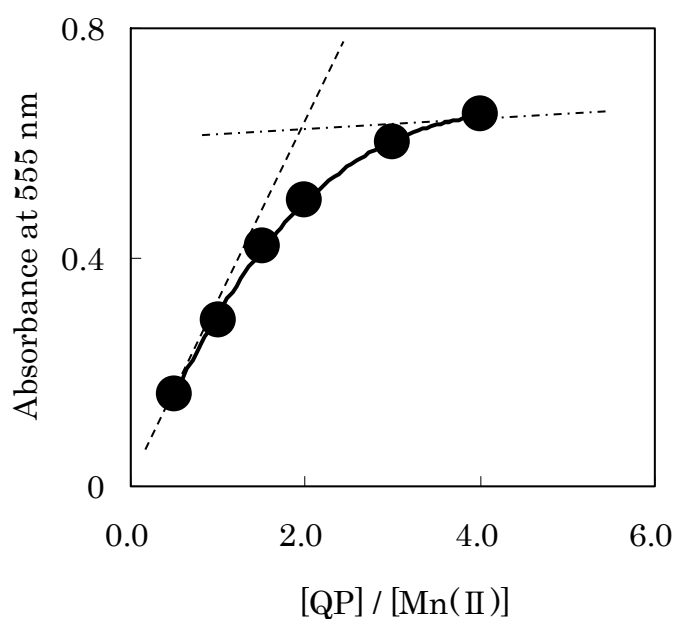


Fig. 1-8 Composition of the complex in the presence of Spm by the molar ratio method  
 $Mn(II): 1.25 \times 10^{-5} M$ ;  $QP: \{2.5 \times 10^{-4} M \times \chi\} ml/10ml$ ;  $Spm: 1.0 \times 10^{-4} M$ ; Tween40: 0.2%; pH 8.0; Reference: QP-Spm solution.

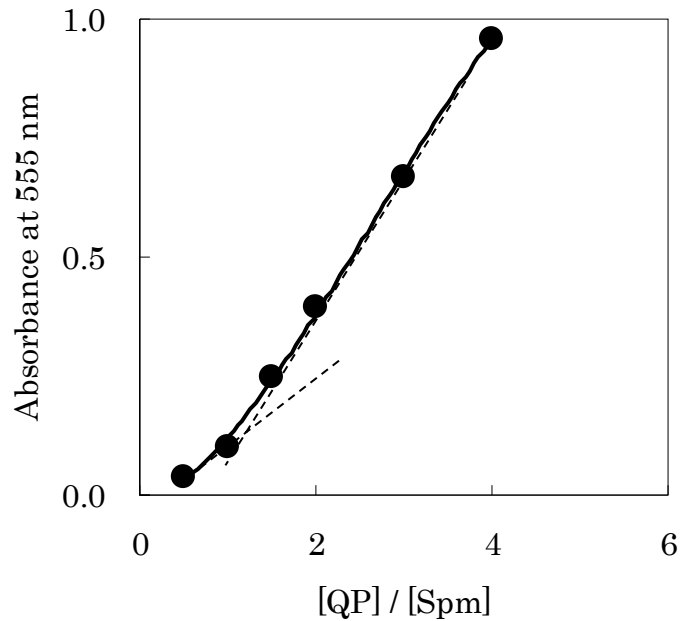


Fig. 1-9 Composition of the complex by the molar ratio method  
Mn(II):QP=1:2; QP: $5.0 \times 10^{-5}$ M; Tween40:0.2%; pH8.0;  
Reference: {Mn(II)-QP} solution.

### 3-6 Spm と AcSpm の逐次分析

生体中の Spm とその代謝物の AcSpm は、両者が共存している場合が多く、また生理機能も相違するので、それぞれの含量あるいは総量を求めることは、大変重要で意義深い。2-7 において Spm と AcSpm の間に感度差が見られることを示したが、前処理として AcSpm をけん化し、遊離の Spm とすれば、感度が同等になるので、けん化前後の Spm と AcSpm の混液の吸光度を測定することにより、Spm と AcSpm の分別定量とそれらの総定量が可能であると考えられる。したがって、AcSpm のけん化処理条件について、用いるアルカリの種類、濃度、添加量、加熱方法、加熱時間などを検討した。Table1-6 にアルカリの種類の影響を示す。その結果、*N*<sup>l</sup>-AcSpm を含む液 1.0ml を精取し、2.0M 炭酸ナトリウムを 1.0ml 及び水を加え、全量 10 ml とし、ホットプレート上で攪拌しながら 15 分加熱還流し、冷却した後、0.1M 塩酸で pH をほぼ 8.0 に調整した溶液について、第 1 節の定量操作に従って、{Mn(II)-QP-AcSpm} 溶液の吸光度を {Mn(II)-QP} 溶液を対照として 555nm で測定した。その結果、Fig.1-10 に示すように、けん化後の AcSpm は Spm と同程度の感度を示した。

したがって、Spm と AcSpm の両者が共存している場合、けん化処理前に測定した吸光度を  $A_1$ 、けん化処理後に測定した吸光度を  $A_2$ 、混液中の Spm 量に相当する吸光度を  $X$ 、AcSpm 量に相当する吸光度を  $Y$ 、けん化処理前の(AcSpm/Spm)感度比を  $a$  とすると、 $A_1 = X + aY$ 、 $A_2 = X + Y$  の二式が成立するので、 $A_1$ 、 $A_2$  を測定すれば、 $X$ 、 $Y$  を求めることができ、Spm と AcSpm の分割定量と総定量が可能となる。



Table 1-6 Absorbance of  $N^l$ -AcSpm saponified

Alkali (0.2 M)	Absorbance at 555 nm
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.350
$\text{NaHCO}_3$	0.302
$\text{NaOH}$	0.235
$\text{NH}_3$	0.207

$N^l$ -AcSpm: $2.5 \times 10^{-6}$ M; Mn(II): $5.0 \times 10^{-5}$ M; QP: $5.0 \times 10^{-5}$ M;  
 Tween40:0.2%; pH8.0; Reference: {Mn(II)-QP} solution.

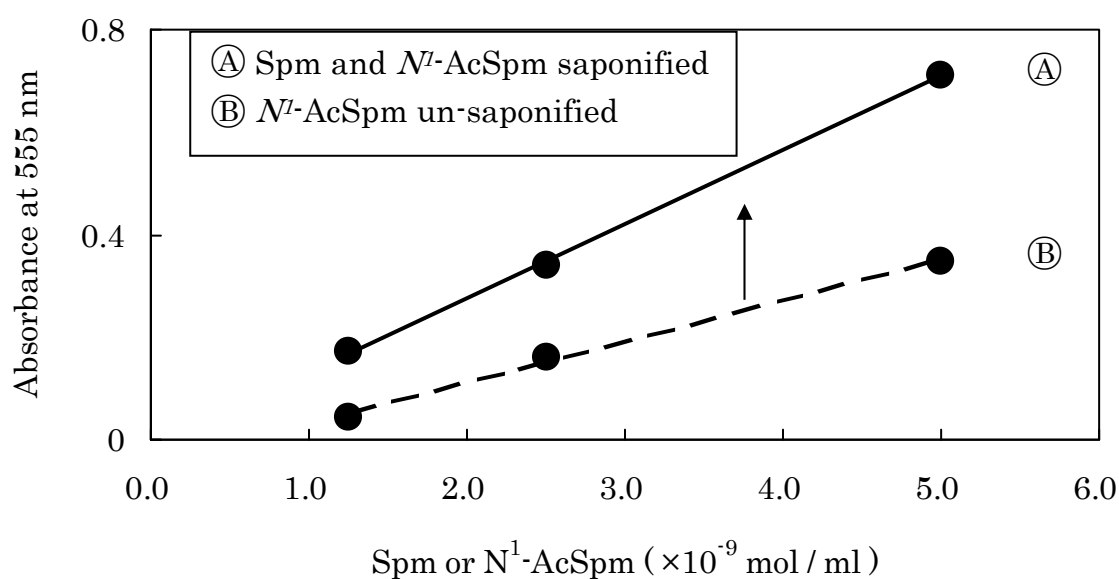


Fig. 1-10 Effect of saponification of Spm and  $N^l$ -AcSpm  
 Mn(II): $5.0 \times 10^{-5}$ M; QP: $5.0 \times 10^{-5}$ M; Tween40:0.2 %; pH 8.0 ;  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :0.2M; Reference: {Mn(II)-QP} solution.

Table 1-7 Molar absorptivities of Spm and  $N^l$ -AcSpm saponified or un-saponified

	Spm		$N^l$ -AcSpm	
	saponified	un-saponified	saponified	un-saponified
$\epsilon (\times 10^4)$	14.0	14.0	13.8	7.5

### 3-7 FIA への適用

本呈色反応は比較的速やかに進行するため、FIA による Spm 定量法の開発が可能であると考えられるので、FIA の基礎的条件、すなわち反応コイルの長さ、流速、反応温度、試料注入量、測定波長などについて、検討を加えた。このうち、反応コイルの長さ、流速及び反応温度の検討結果を、Figs.1-11～1-13 に示す。その結果、最終濃度  $1.25 \times 10^{-5} \text{M}$  Mn(II),  $1.25 \times 10^{-5} \text{M}$  QP, 0.05% Tween40,  $5.0 \times 10^{-3} \text{M}$  トリシュー塩酸緩衝液(pH8.0)に調製したキャリアー反応溶液に、試料溶液を  $20 \mu\text{l}$  注入し、5.0m の反応コイルを用いて、室温で測定したところ、波長 555nm において  $2 \sim 20 \text{pg}/\mu\text{l}$  の Spm を感度よく定量することができた。Spm 分析に用いた FIA システムの分析条件及び流路図を Table1-8, 及び Fig.1-14 に、検量線シグナルを Fig.1-15 に、また Spm の検量線を Fig.1-16 に示す。

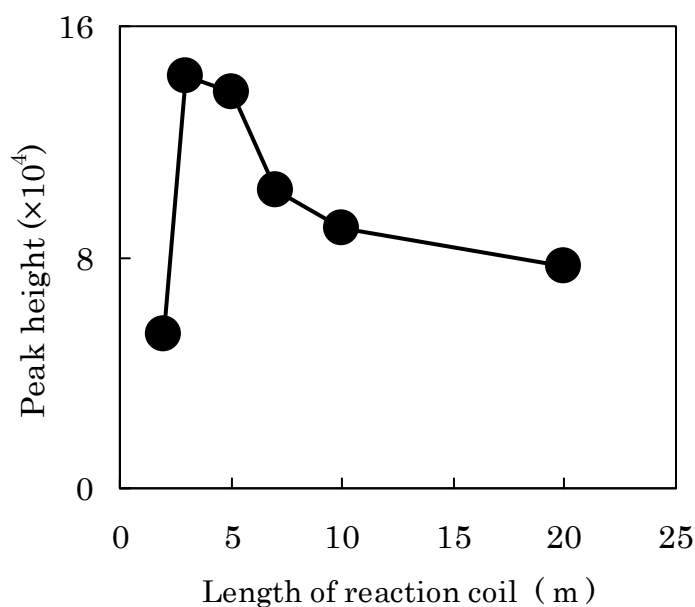


Fig. 1-11 Effect of reaction coil length

Composition of carrier reaction reagent solution (CRRS)

[Mn(II):  $1.25 \times 10^{-5} \text{M}$ ; QP:  $1.25 \times 10^{-5} \text{M}$ ; Tween40: 0.05%; pH8.0];

Flow rate: 1.0ml/min; Sample injection volume:  $20 \mu\text{l}$ ; Temperature:  $25^\circ\text{C}$ .

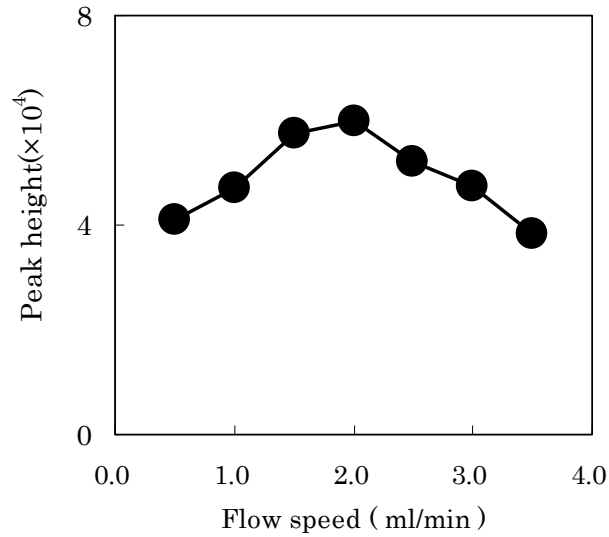


Fig. 1-12 Effect of flow speed

Composition of carrier reaction reagent solution(CRRS)

[Mn(II): $1.25 \times 10^{-5}$ M; QP: $1.25 \times 10^{-5}$ M; Tween40:0.05%; pH8.0];

Reaction coil:5.0m; Sample injection volume:20 $\mu$ l; Temperature:25 $^{\circ}$ C.

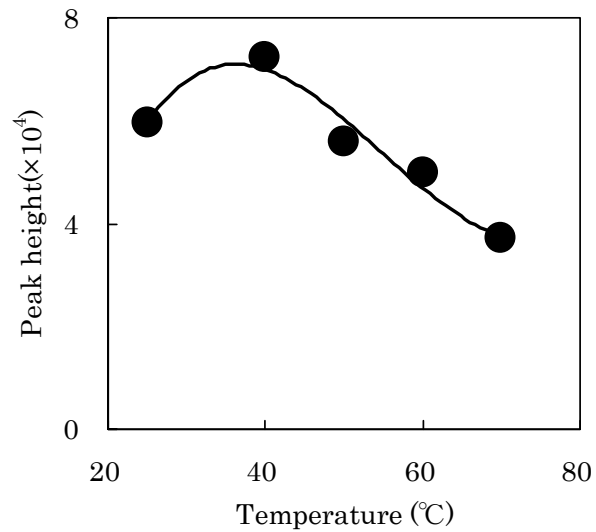


Fig. 1-13 Effect of temperature

Composition of carrier reaction reagent solution(CRRS)

[Mn(II): $1.25 \times 10^{-5}$ M; QP: $1.25 \times 10^{-5}$ M; Tween40:0.05%; pH8.0];

Flow rate:1.5ml/min; Reaction coil:5.0m; Sample injection volume:20 $\mu$ l.

Table 1-8 FIA condition for the determination of Spm

Carrier reaction reagent solution (CRRS)	Mn(II) $1.25 \times 10^{-5}$ M QP $1.25 \times 10^{-5}$ M Tween40 0.05 % Tris-HCl Buffer(pH8.0) $5 \times 10^{-3}$ M
Flow rate	1.5 ml/min
Reaction coil (r.c)	5.0 m $\times$ 0.25 cm i.d.
Sample injection volume	20 $\mu$ l
Temperature	25 $^{\circ}$ C
Wavelength of detection	555 nm

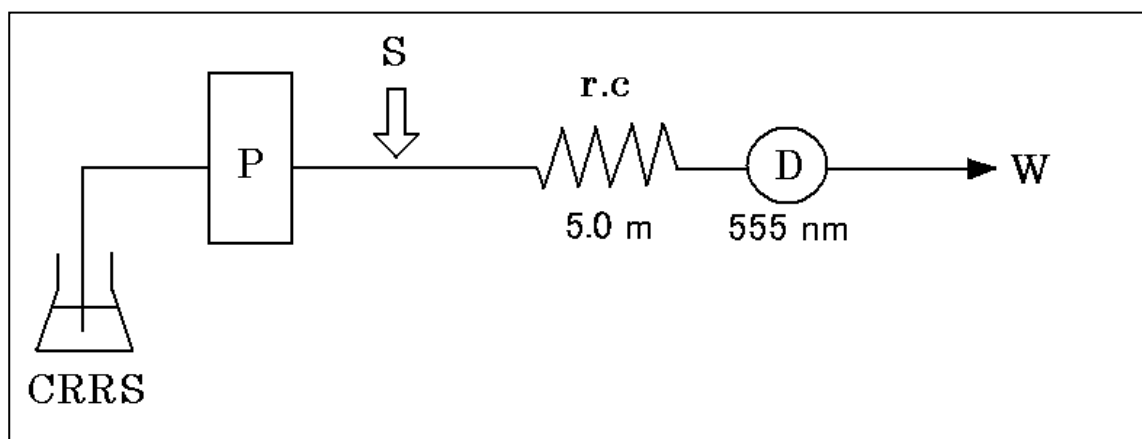


Fig. 1-14 Flow diagram of FIA system

CRRS:Carrier reaction reagent solution; P:Pump; S:Sample; r.c:Reaction coil;  
D:Detector; W:Waste-water

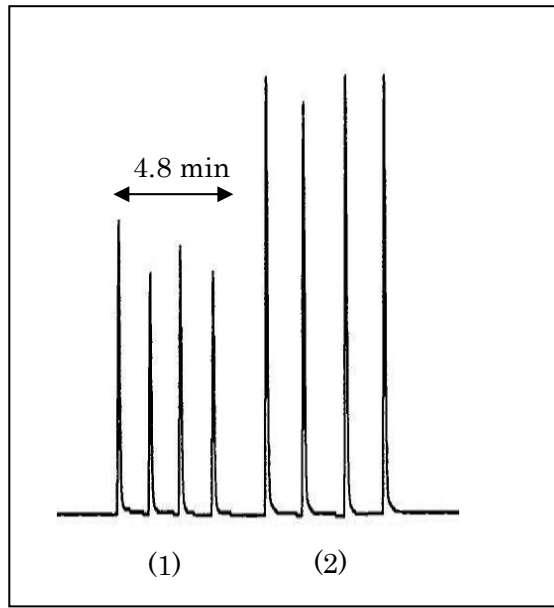


Fig.1-15 FIA signals obtained by calibration study for Spm  
 Spm concentration( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ):(1)5,(2)10

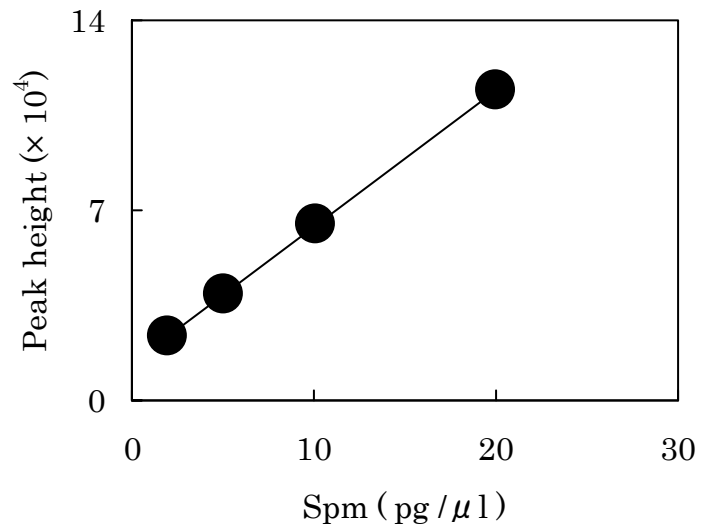


Fig. 1-16 Calibration curve for Spm by FIA

#### 4. 結語

弱塩基性下で、非イオン性界面活性剤の Tween40 共存下、QP と Mn(II)を用いることにより、測定波長 555nm で 0.2~1.5 $\mu\text{g/ml}$  濃度範囲の Spm を、定量感度  $\epsilon=1.4\times 10^5\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  の高感度で吸光光度定量することができた。本操作法における RSD は 0.50%(n=10)であり、再現性にも優れていることを認めた。本呈色体の組成を連続変化法及びモル比法で求めたところ、Mn(II):QP:Spm=1:2:2 という結果が得られた。

また、Spm と AcSpm が共存する場合、前処理としてアルカリ加水分解することにより、Spm とほぼ同感度で AcSpm を定量することができるので、Spm と AcSpm の総含量とそれぞれの個々の含量を算出することが可能であることが示唆された。

更に、本呈色反応の FIA への適用を検討したところ、測定波長 555nm で、2~20 $\text{pg}/\mu\text{l}$  濃度範囲の Spm を定量することができた。約 5 分間で 4 回試料溶液を注入することが可能であり、Spm の迅速分析法としても極めて優れていることを認めた。

## 第二節 薬物とアルミニウム(III)との錯生成判定のための簡易スクリーニング法

### 1. 緒言

現在、薬物と金属イオンの相互作用については、薬物が金属イオンと錯生成し、薬物の体内への吸収量に変化し、薬物治療の妨害や金属過剰症のような弊害として一般的に知られている<sup>28-30)</sup>。アルミニウムはアルミ製品、食品添加物、胃腸薬、抗炎症薬をはじめ種々の医薬品製剤の成分として含まれ、日常非常に多用されている金属である。しかしながら、鉄と薬物との相互作用に関する研究<sup>31)</sup>等と比べて、その報告例、並びに医薬品添付文書中のアルミニウムに関する記載例は比較的少なく、アルミニウム(III)と薬物の相互作用を探索することは医療現場において非常に重要な課題である。アルミニウム(III)と薬物の錯生成を簡便に検出する方法としては、色調差を観察する目視法がすぐれていると考えられるが、アルミニウム(III)と薬物の二者間の反応で呈色するものは極めて少ない。

一方、当研究室では従来より、色素、金属イオン及び被分析物質の三者間で生成する三元錯体生成反応を利用する薬物及び生体関連化合物の吸光光度定量法を開発<sup>32-35)</sup>しており、簡便性、再現性、感度、選択性、ブランクとの呈色差などの面で優れていることを認めている。金属イオンとしてアルミニウム(III)を用いたものとして、アルミニウム(III)と9-(2'-カルボキシ)-4,5-ジブromo-2,3,7-トリヒドロキシ-6-フルオロン<sup>36)</sup>を用いるβ-フェニルピリビン酸、アルミニウム(III)とクロムアズローS(Fig.2-1)を用いるアンストラサイクリン系抗がん剤<sup>37)</sup>及びアルミニウム(III)とエリスロシン(Fig.2-2)を用いるキノロン系抗菌剤<sup>38)</sup>の吸光光度分析法を報告している。

今回、これらの方法のうち、市販色素を用いた後二者を選び、アルミニウム(III)と薬物の錯生成判定の簡易スクリーニング法の確立を目的として検討した。尚、日本薬局方で微量アルミニウム試験法<sup>39)</sup>に記載されている8-キノリノールあるいはルモガリオンのような有機試薬では、三元錯体生成による呈色差は認められなかった。

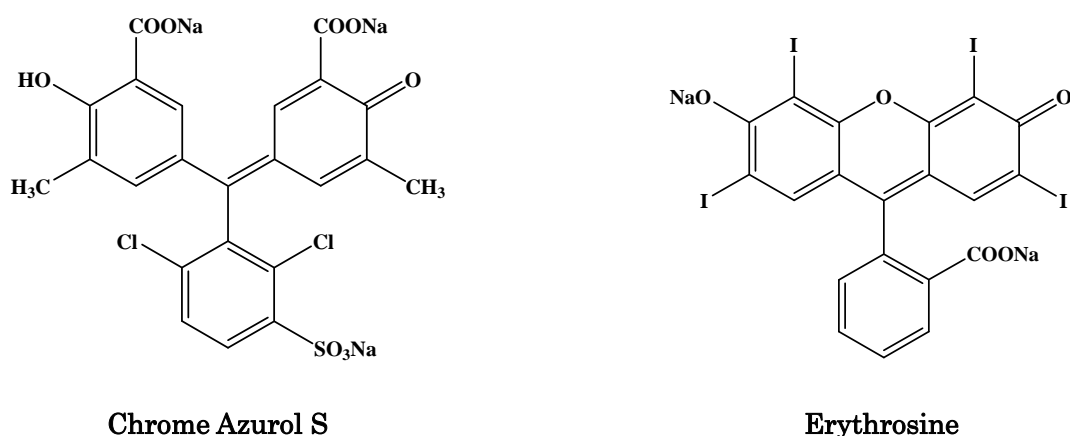


Fig. 2-1 Structures of Chrome Azurol S and Erythrosine

## 2. 実験

以下の実験において、クロムアズローSをCAS、CASを用いる方法をCAS法、エリスロシンをERY、ERYを用いる方法をERY法、並びにアルミニウム(III)をAl(III)と記載する。

### 2-1 試薬及び装置

#### 2-1-1 CAS法

緩衝液：0.4M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.4)を調製して用いた。

界面活性剤：Brij78の1.0%水溶液を調製し使用した。

CAS溶液：クロムアズローS(CAS, 和光純薬工業株式会社製)の $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 水溶液を調製して用いた。

#### 2-1-2 ERY法

緩衝液：0.2M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4)を調製して用いた。

界面活性剤：メチルセルロース(MC, 350~550cps)の0.25%水溶液を調製し使用した。

ERY溶液：エリスロシン(ERY, 和光純薬工業株式会社製)の $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 水溶液を調製して用いた。

また、以下の項目は両法に共通である。

薬物標準液：すべての薬物(2-2-3に記載)は、 $5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ 溶液として調製し、直後、冷暗所に保存し、適宜希釈して使用した。

Al(III)溶液：アルミニウム標準液(和光純薬工業株式会社製)を、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ に希釈して使用した。

なお、使用した試薬はいずれも試薬特級品を精製せずそのまま用いた。溶液の調製、実験及び器具の洗浄には、Milli-Q水を用いた。

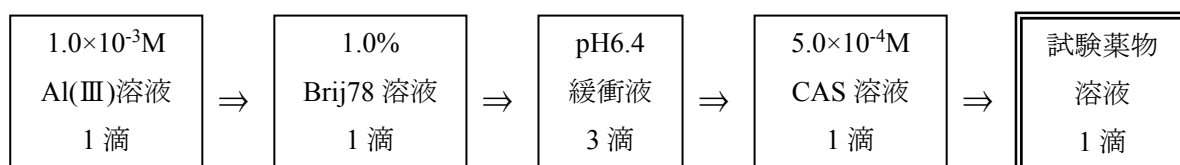
また、pHの測定には堀場製F-51型複合ガラス電極pHメーターを用いた。

### 2-2 定量操作

#### 2-2-1 CAS法

矢印の順に従って溶液を添加、混合した後、両液の呈色差(Blank溶液→赤紫色、Sample溶液→青色)を目視し比較した。

[Sample 溶液]



[Blank 溶液]

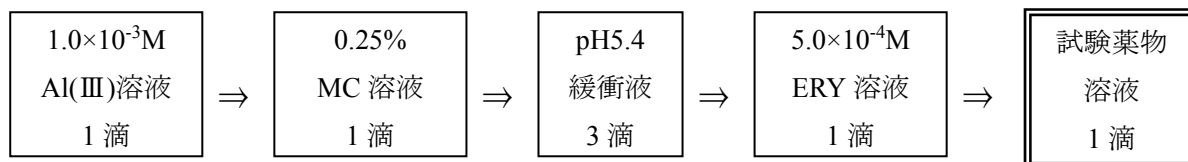




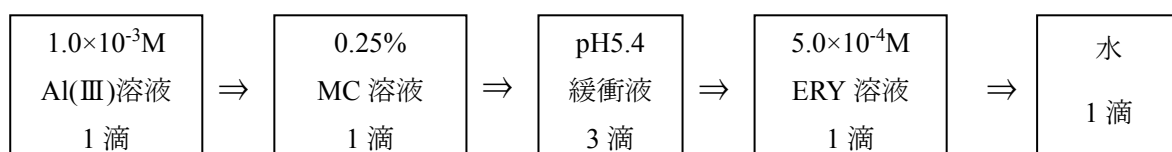
### 2-2-2 ERY 法

矢印の順に従って溶液を添加，混合した後，両液の呈色差(Blank 溶液→淡橙赤色，Sample 溶液→赤色)を目視し比較した。

[Sample 溶液]



[Blank 溶液]



白色滴板上に，調製した試薬溶液を用いて CAS 法，ERY 法についてそれぞれ Sample 溶液，Blank 溶液を調製した．滴加した溶液は，全て 2ml の駒込ピペットを使用し，その 1 滴は約 70 $\mu$ l である．試薬溶液を滴加後よく混合した後に 2ml の駒込ピペットを使用し試験薬物溶液を 1 滴(約 70 $\mu$ l)加えた．

判別には試験液混合直後，また時間の経過による呈色の確認のために 15 分後，30 分後と合計 3 回にわたり混合した Sample 液と薬物のみを除いて同様に調製した Blank 液の色調を肉眼で観察し，その色調変化を A～D の 4 段階のグレードに分類した．Blank 液との色調差が観察される薬物については，マイクロピペットを用いて試験薬物溶液の滴加量から各々の確認限界量( $\mu$ g)を示した．また，Al(III)を除いた{薬物-色素}間における錯体生成による色調変化の有無も同時に精査した．

グレード A：混合直後に顕著な色調差を確認できたもの

グレード B：色調変化の微弱なもの

グレード C：薬物と色素が直接反応し色調変化したもの

グレード D：色調変化が全く認められなかったもの

### 2-2-3 CAS 法及び ERY 法における被験薬物

Al(III)との錯生成の判別に用いた薬物は次の 50 種類である．

アスピリン，アザチオプリン，アスコルビン酸，アモキシシリン，アロプリノール，イブプロフェン，エチルコハク酸エリスロマイシン，塩酸アミトリプチリン，塩酸イソプロテレノール，塩酸イミプラミン，塩酸クロチアゼパム，塩酸クロルプロマジン，塩酸ジブカイン，塩酸ダウノルビシン，塩酸チアミン，塩酸パパベリン，塩酸バンコマイシン，塩酸ヒドララジン，塩酸ピロカルピン，塩酸ピリドキシン，塩酸プロカインアミド，塩酸プロプラノロール，塩酸ミノサイクリン，オフロキサシン，カプトプリル，サラゾスルファピリジン，サリチル酸，シアノコバラミン，臭化水素酸デキストロメトर्फアン，スルファメトキサゾール，セフォペラゾンナトリウム，テオフィリン，トルブタミド，ノスカピン，ノルアドレナリン，バルビタール，ファモチジン，フ

マル酸ケトチフェン, フルフェナジン, ペニシラミン, マレイン酸エルゴメトリン, メサラジン, メトトレキサート, 葉酸, 酪酸リボフラビン, リファンピシン, 硫酸キニーネ, 硫酸ストレプトマイシン, レセルピン, レボドパ.

### 3. 結果と考察

#### 3-1 定量条件の検討

##### 3-1-1 CAS法の検討

予備的検討として, 文献値<sup>37)</sup>を参考に pH6.4 付近における, Al(III), CAS, テトラサイクリン系抗生物質のミノサイクリン(MYC)の三者間における三元錯体生成による白色滴板上での呈色反応の有無を確認した. 方法としては,  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の CAS 溶液,  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  Al(III)溶液, 1.0%Brij78 溶液, 0.4M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.4,最適 pH6.3~6.6),  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の MYC 溶液をそれぞれ 2ml の駒込ピペットを用いて 1 滴ずつ滴板上に滴加し, よく混合した Sample 溶液に対して, MYC を除いた Blank 溶液を対照にその色調差を観察した. その結果, Al(III), 色素混合溶液に MYC を滴加した際, 瞬時に呈色反応を示し, Blank 溶液と Sample 溶液の間に色調差が現れることを確認したので, 次に, Al(III)濃度, 界面活性剤の有無, CAS 濃度, 緩衝液量等を詳細に検討した. 先ず界面活性剤の有無を検討したところ, 界面活性剤を有する方が Sample 溶液と Blank 溶液の間に顕著な色調差が認められたので, 以後の実験では界面活性剤として, 1.0%Brij78 溶液を 1 滴加えることとした.

次に, 緩衝液量についても検討したところ, 3 滴加えたときに最も顕著な呈色体を生成した. Al(III)濃度について,  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $2.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $3.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $4.0 \times 10^{-3} \text{M}$  溶液の各濃度において検討したが, どの濃度においても同様の呈色反応を示したので,  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  溶液を 1 滴加えることとした. 最後に CAS の濃度について  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ ,  $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$  の各 CAS 濃度であり, それぞれ 1 滴加えたときの色調差を観察した. その結果,  $5.0 \times 10^{-4} \text{M}$  溶液を 1 滴用いたとき, その色調差が最も顕著であったので, 以後の操作においては,  $5.0 \times 10^{-4} \text{M}$  CAS 溶液を 1 滴用いることとした.

試薬の添加順序の変更による呈色反応への影響を検討したが, 特に色調差の違いは認められなかった. また, CAS と {MYC-Al(III)} 錯体との呈色反応は室温において瞬時に起こるが, 2 時間以上室温で放置するとき, 水分の蒸発に伴う試薬の濃縮により呈色反応の確認が困難になった. したがって, 薬物溶液滴加直後, 15 分後, 30 分後での色調差を観察した.

##### 3-1-2 ERY法の検討

CAS 法を参考に,  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の ERY 溶液,  $4.0 \times 10^{-3} \text{M}$  Al(III)溶液, 0.2M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4),  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  オフロキサシン(OFX)溶液をそれぞれ 2ml の駒込ピペットを用いて 1 滴ずつ滴板上に添加し, よく混合した Sample 溶液と, OFX を除いて調製した試薬ブランク溶液, Al(III)をのぞいた ERY と OFX の混合溶液を対照にその呈色反応を観察した. その結果, Al(III), 色素混合溶液では, OFX を滴加した際, 瞬時に呈色反応するが, Al(III)を除いた色素溶液では色素と薬物間の反応はおこらず, 試薬ブランク溶液と同様の色調であった. このことより, 滴板上では先ず Al(III)と OFX が反応し, その後色素と錯生成することで呈色反応が生じていると考えら

れる。この結果に基づき、CAS 法と同様に反応条件を詳細に検討した結果、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の  $\text{Al(III)}$  溶液 1 滴、0.25%MC 溶液を 1 滴、0.2M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.4)を 1 滴、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の ERY 溶液を 1 滴、試験薬物溶液を 1 滴加えたものを Sample 溶液とし、試験薬物溶液を除いて同様に調製して得た Blank 溶液を対照としてその色調差を確認することとした。

試薬の添加順序の変更による呈色反応への影響を検討したが、特に色調差の違いは認められなかった。また、ERY と OFX- $\text{Al(III)}$ 錯体との呈色反応は室温において瞬時に起こるが、2 時間以上室温で放置するとき、水分の蒸発に伴う試薬の濃縮により呈色反応の確認が困難になった。したがって、薬物溶液滴下直後、15 分後、30 分後での色調差を観察した。

## 3-2 白色滴板上での呈色反応

### 3-2-1 CAS 法の検討

2-2-1 の標準操作に準じて、薬物として MYC を用いたときの色調差を確認したところ、Fig.2-3 の a)~d)に示すような結果を観察することができた。a)は{ $\text{Al(III)}$ +CAS}溶液であり、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$   $\text{Al(III)}$ 溶液、1.0%Brij78 溶液、をそれぞれ 1 滴、0.4M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.4)を 3 滴、それに  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の CAS 溶液 1 滴及び水を滴板上でよく混合して得た Blank 溶液である。b)は{MYC+ $\text{Al(III)}$ +CAS}溶液であり、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$   $\text{Al(III)}$ 溶液、1.0%Brij78 溶液、をそれぞれ 1 滴、0.4M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.4,最適 pH4.8~5.7)を 3 滴、次に  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の CAS 溶液 1 滴を滴板上でよく混合し、そこに試験薬物である  $5.0 \times 10^{-2} \text{M}$  の MYC 溶液 1 滴を滴加した Sample 溶液である。c)は色素と薬物で直接反応がないことを確認するための確認溶液で{薬物+CAS}混合溶液で、1.0%Brij78 溶液 1 滴、0.4M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.4)緩衝液を 3 滴、それに  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の CAS 溶液 1 滴及び水を滴板上でよく混合し、そこに試験薬物を添加したものである。最後に、対照として、同量の CAS 溶液と 0.4M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.4)と界面活性剤である 1.0%Brij78 溶液及び水の混合溶液の図を d)に示す。

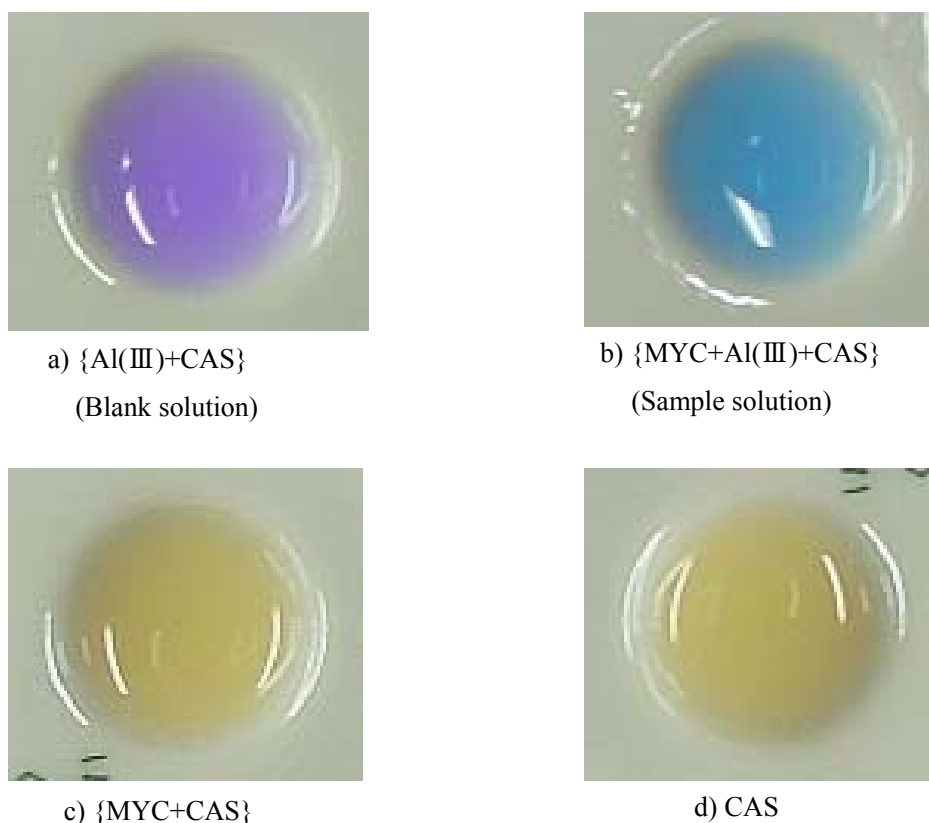


Fig. 2-3 Color reaction on white spot plate

a) Al(III)-CAS solution; b) MYC-Al(III)-CAS solution;  
c) MYC-CAS solution; d) CAS solution.

### 3-2-2 ERY 法の検討

標準操作に準じて、薬物として OFX を用いたときの色調差を確認したところ、Fig.2-4 の a)～d)に示す結果を観察することができた。a)は{Al(III)+ ERY}溶液であり、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の Al(III)溶液、0.25%MC 溶液、をそれぞれ 1 滴、0.2M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.4)緩衝液を 3 滴、それに  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の ERY 溶液 1 滴及び水を滴板上でよく混合して得た Blank 溶液である。b)は{OFX+ Al(III)+ ERY}溶液であり、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の Al(III)溶液、0.25%MC 溶液をそれぞれ 1 滴、0.2M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4)緩衝液を 3 滴、それに  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の ERY 溶液 1 滴を滴板上でよく混合し、そこに試験薬物を滴加した Sample 溶液である。c)は色素と薬物が直接反応ないことを確認するための確認溶液で{OFX+ERY}混合溶液で、0.25%MC 溶液 1 滴、0.2M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.4)を 3 滴、それに  $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  の ERY 溶液 1 滴及び水を滴板上でよく混合し、そこに試験薬物を滴加したものである。最後に対照として、同量の ERY と 0.2M 酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.4)と界面活性剤である 0.25%MC 溶液の混合溶液の色調の図を d)に示す。



Fig. 2-4 Color reaction on white spot plate  
 a)Al(III)-ERY solution; b)OFX-Al(III)-ERY solution;  
 c)OFX-ERY solution; d)ERY solution.

### 3-3 各種医薬品との呈色反応

種々の反応条件の検討結果より 2 の標準操作を設定し、それに従って簡易スクリーニングを行った。簡易スクリーニングに用いた薬物は 2-2-3 に示した。これらの薬物は、医薬品添付文書中で金属とのキレート形成による相互作用発現の可能性が示唆されているか、もしくは記載がなくとも、その構造から Al(III)とのキレート形成を起こす可能性があると考えられるものである。その判別方法は 2-2 に記載した通り、混合直後に顕著な色調差を確認できたものをグレード A、色調変化の微弱なものをグレード B、薬物と色素が直接反応し呈色したものをグレード C、呈色反応が認められなかったものをグレード D と、四段階で判定した。またグレード A と B の薬物については、その色調差が目視で確認できる限界量を  $\mu\text{g}$  であわせて表記し、グレード C、D の薬物についてはそれぞれ一括して記載する(Tables2-1,2-2)

Table 2-1 Grade of color reaction after mixing drug, Al (III) and CAS solutions

<b>Grade A</b> {Drug, Detection Limit( $\mu\text{g}$ )}
Ofloxacin(1.8), Chlorpromazine(1.8), Minocycline(2.5), Ibuprofen(2.6), Daunorubicin(2.8), Fluphenazine(3.3), Salazosulfapyridine(4.0), Imipramine(7.9), Dibucaine(9.5), Propranolol(14.8), Amitriptyline(15.7), Ergometrine(22.1), Streptomycin(36.4), Quinine(39.1), Hydralazine(49.1), Pyidoxine(77.1)
<b>Grade B</b> {Drug, Detection Limit( $\mu\text{g}$ )}
Methotrexate(113.6), Amoxicilin(209.8), Cefoperazone(333.9), Thiamine(409.2), Folic acid(1102.5)
<b>Grade C</b>
Reserpine, Papaverine, Levodopa, Norepinephrine, Ketotifen, Cyanocobalamine, Vancomycine
<b>Grade D</b>
Erythromycin, Rifampicin, Azathiopurine, Tobutamide, Isoproterenol, Penicillamine, Captopril, Riboflavin, Clotiazepam, Norcapine, Dextromethorphan, Ibuprofen, Mesalazine, Sulfamethozazole, Procainamide, Barbitol, Salicylic acid, Aspirin, Theophylline, Famotidine, Allopurinol, Pilocarpine, Ascorbic acid

Table 2-2 Grade of color reaction after mixing drug, Al (III) and ERY solutions

<b>Grade A</b> {Drug, Detection Limit ( $\mu\text{g}$ )}
Ofloxacin(1.8), Minocycline(2.5), Daunorubicin(2.8), Pyridoxine(10.4), Methotrexate(13.6), Salazosulfapyridine(19.9), Ergometrine(22.1)
<b>Grade B</b> {Drug, (Detection Limit( $\mu\text{g}$ ))}
Cyanocobalamine, Amoxicillin(104.9), Thiamine(163.7), Cefoperazone(166.9), Folic acid(1102.5)
<b>Grade C</b>
Chlorpromazine, eserpine, Papaverine, Vancomycin, Imipramine, Dibucaine, Amitriptyline, Propranolol, Hydrilazine, Quinine, Ketotifen, Fluphenazine
<b>Grade D</b>
Streptomycin, Erythromycin, Rifampicin, Levodopa, Norepinephrine, Iproterenol, Penicillamine, Captopril, Riboflavin, Clotiazepam, Norcapine, Dextromethorphan, Ibuprofen, Mesalazine, Sulfamethoxazole, Procainamide, Barbitol, Salicylic acid, Aspirin, Theophylline, Famotidine, Allopurinol, Pilocarpine, Azathiopurine, Ascorbic acid, Tobutamide

### 3-4 {薬物-アルミニウム(III)}錯体の吸収スペクトル

CAS 法, ERY 法ともに顕著な色調差を示した OFX, MYC, ダウノルビシン(DAU), ピリドキシン(PYD), 並びに両法において色調差の認められなかったファモチジン(FTD)について, 薬物と Al(III)の混液と, 薬物だけの吸収スペクトルを測定することにより, 本簡易スクリーニング法の有効性を検討した. その結果, Al(III)と錯体を生成していると推定される薬物では, 顕著な吸収スペクトル変化が認められ, 簡易スクリーニング法での陽性判定と一致する良好な相関関係がみられた. また, 色調差の全く見られず陰性と判定された FTD では, 吸収スペクトルの変化は全く見られなかった. これらの結果を Figs.2-5~2-9 に示す.

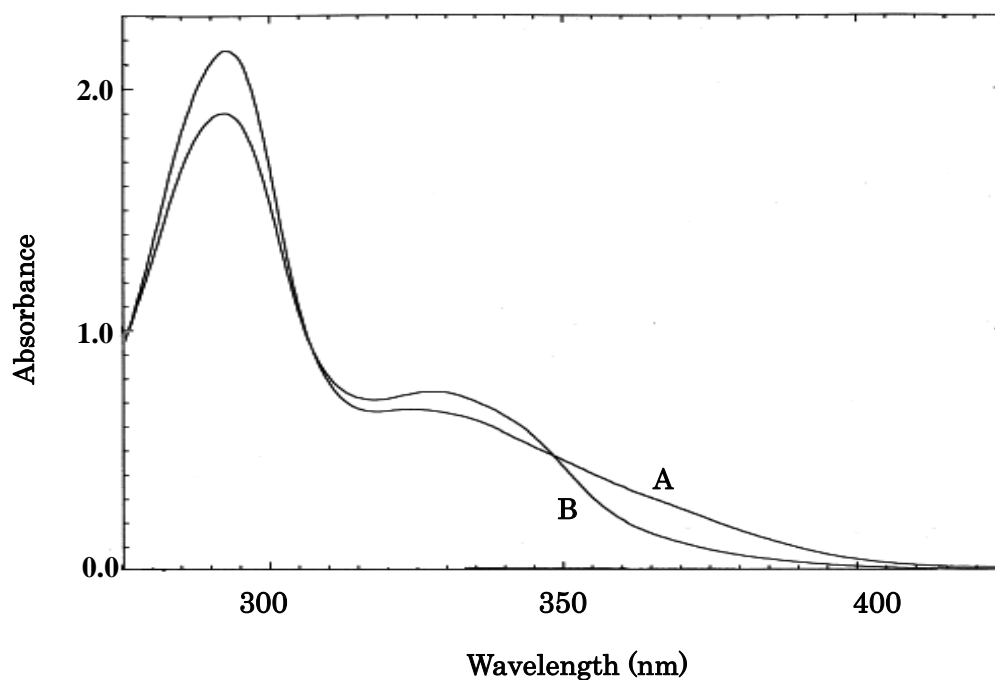


Fig. 2-5 Absorption spectra of {OFX-Al(III)} and OFX solutions  
OFX:  $1.0 \times 10^{-4}$  M; Al(III):  $1.0 \times 10^{-4}$  M; MC: 0.025%; pH: 5.4;  
Curve A: {OFX-Al(III)} solution; Curve B: OFX solution.

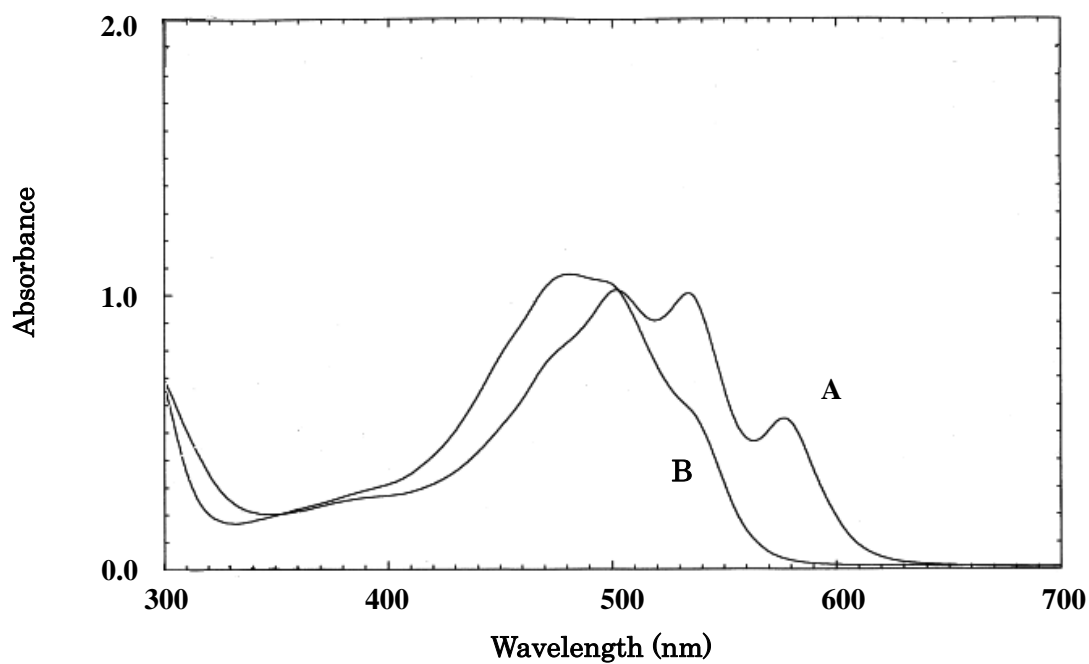


Fig. 2-6 Absorption spectra of {DAU-Al(III)} and DAU solutions  
 DAU: $1.0 \times 10^{-4}$ M; Al(III): $1.0 \times 10^{-4}$ M; MC:0.025%; pH:5.4;  
 CurveA: {DAU-Al(III)} solution; CurveB:DAU solution.

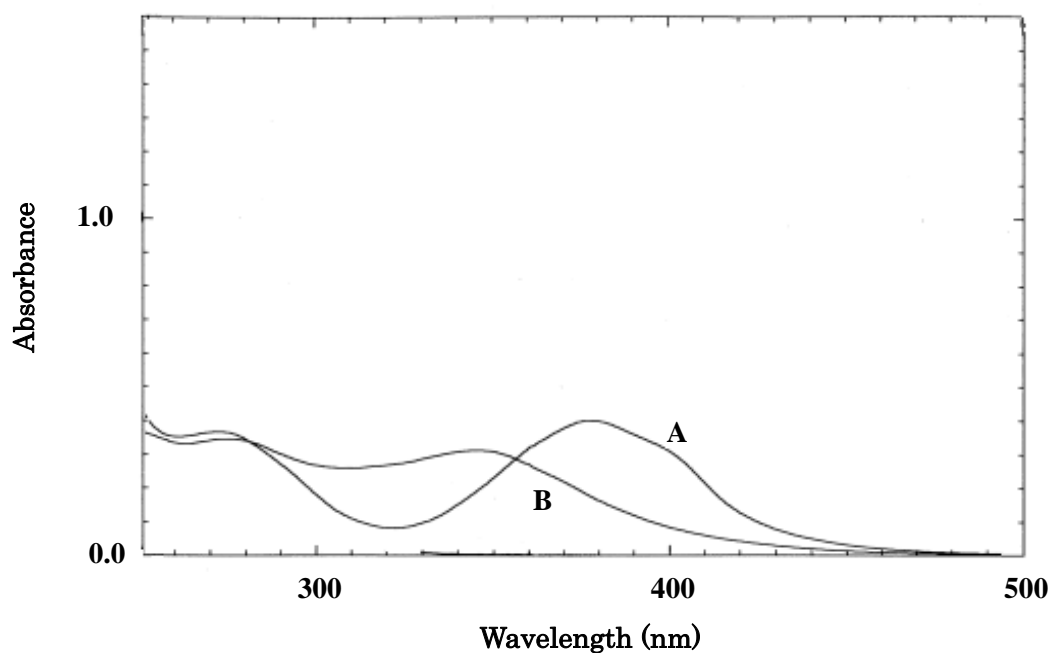


Fig. 2-7 Absorption spectra of {MYC-Al(III)} and MYC solutions  
 MYC: $1.0 \times 10^{-4}$ M; Al(III): $1.0 \times 10^{-4}$  M; MC:0.025%; pH:5.4;  
 CurveA: {MYC-Al(III)} solution; CurveB:MYC solution.



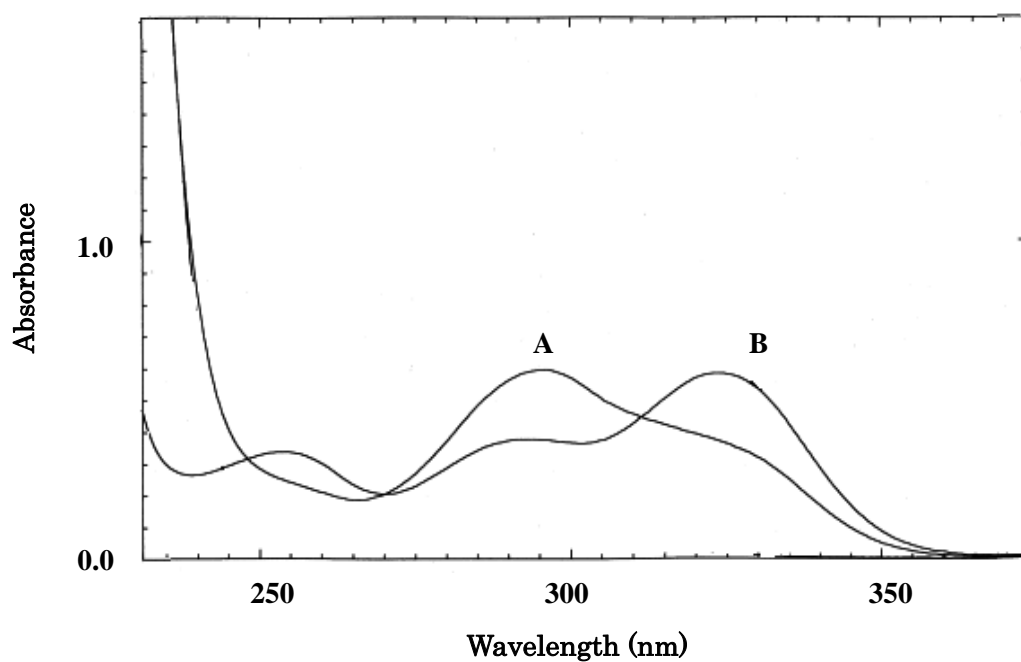


Fig. 2-8 Absorption spectra of {PYD-Al(III)} and PYD solutions  
 PYD: $1.0 \times 10^{-4}$ M; Al(III): $1.0 \times 10^{-4}$ M; MC:0.025%; pH:5.4;  
 CurveA: {PYD-Al(III)} solution; CurveB:PYD solution.

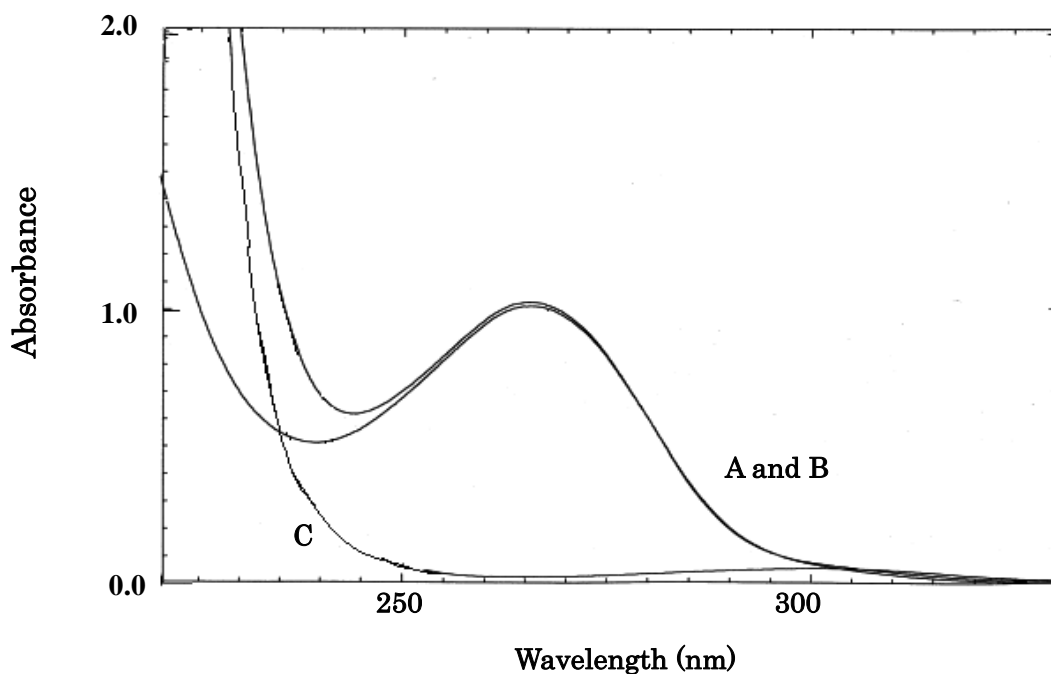


Fig. 2-9 Absorption spectra of {FTD-Al(III)} and FTD solutions  
 FTD: $1.0 \times 10^{-4}$ M; Al(III): $1.0 \times 10^{-4}$ M; MC:0.025%; pH:5.4;  
 CurveA: {FTD-Al(III)} solution; CurveB:FTD solution;  
 CurveC:Al(III) solution.

## 4. 結 語

CAS法によるTable2-1及びERY法によるTable2-2の結果を薬物ごとにTable2-3にまとめるが、両法とも薬物と同モル濃度の鉄(III)、銅(II)、カルシウム(II)、クエン酸イオンなどの共存の影響は全く見られなかった。グレードAとBを陽性とした場合、CAS法の場合、50種中20種が、ERY法を用いた場合では50種中12種で陽性と判定された。また、両法で陽性と判断されたのは11種であった。このうち、医薬品添付文書中、アルミニウムと相互作用し、併用が注意されている薬物はオフロキサシンとミノサイクリンの2種のみであった。陽性と判断された薬物の構造の類似性を検索すると、互いに近接するカルボキシル基、水酸基などの酸素原子含有官能基、あるいは酸素原子含有官能基とそれと近接するアミノ基などの窒素原子含有官能基を持つ薬物が多いことがわかった。すなわちAl(III)は、(O, O)配位または(O, N)配位によって薬物と錯生成しているものと考えられる。一方、ERY法で陰性を呈し、CAS法で陽性を示した薬物は、CASと直接反応し、(薬物-CAS)型のイオン会合体を生成することによりCASとの色調差となってあらわれたものと推定された。従って、Al(III)と薬物との錯生成から考えると擬陽性と判断できるので、Al(III)との錯生成を推測する場合、CAS法よりERY法が優れていると判断できる。しかしながら、CAS法の方がサンプルとブランクとの呈色差がより鮮明なこと、更には擬陽性薬物も多剤併用療法時や生体内のような多成分反応系においては、{対象薬物-Al(III)-他成分}型の三元錯体が生成する可能性も十分考えられる。また、Dと判定された薬物の中には、色素と薬物のAl(III)に対する競合反応の結果、色素-Al(III)呈色錯体の退色を伴う薬物が含まれる可能性があるが、これについては今後検討する必要がある。

Table 2-3 Summary of Color reactions of drugs tested by CAS and ERY methods

Drug	CAS	ERY	Drug	CAS	ERY
	Grade	Grade		Grade	Grade
Ofloxacin	A	A	Minocycline	A	A
Daunorubicin	A	A	Salazosulfapyridine	A	A
Ergometrine	A	A	Pyridoxine	A	A
Methotrexate	B	A	Amoxicillin	B	B
Cefoperazone	B	B	Thiamine	B	B
Amitriptyline	A	C	Folic acid	B	B
Chlorpromazine	A	C	Imipramine	A	C
Fluphenazine	A	C	Hydralazine	A	C
Quinine	A	C	Propranolol	A	C
Streptomycin	A	D	Dibucaine	A	C
Cyanocobalamin	C	B	Ibuprofen	A	D
Vancomycin	C	C	Ketotifen	C	C
Reserpine	C	C	Papaverine	C	C
Levodopa	C	D	Noradrenaline	C	D
Ascorbic acid	D	D	Aspirin	D	D
Isoproterenol	D	D	Azathioprine	D	D
Procainamide	D	D	Pilocarpine	D	D
Salicylic acid	D	D	Captopril	D	D
Dextromethorphan	D	D	Sulfamethoxazole	D	D
Theophylline	D	D	Clotiazepam	D	D
Noscapine	D	D	Tolbutamide	D	D
Penicillamine	D	D	Barbital	D	D
Allopurinol	D	D	Mesalazine	D	D
Famotidine	D	D	Erythromycin	D	D
Riboflavin	D	D	Rifampicin	D	D

CAS 法及び ERY 法において両スクリーニング試験において陽性と判定された薬物及び陰性と判定された 2,3 の薬物と薬物-Al(III)の吸収スペクトルを測定したところ、陽性と判定された薬物では、Al(III)共存下では、顕著な吸収極大波長のシフトが認められたが、陰性の薬物ではこのようなスペクトルの変化は認められず、吸収スペクトルで得られた結果と簡易スクリーニング法での結果は良く一致した。また、Al(III)と薬物が錯生成することによるこのようなスペクトルの変化は、ダウノリビシン以外は紫外領域におけるものが多く、肉眼による色調変化として確認できるものは殆どなかった。

今回提案した薬物、Al(III)及び色素の三元錯体生成反応を利用する簡易スクリーニング法は、従

来では容易に目視できなかつた Al(III)錯体の生成を，目視によって瞬時に判別することができ，非常に有効な方法であると考えられる．更に，本呈色反応系，すなわち三元錯体生成反応系は，これまでに確認されていなかった Al(III)をはじめとする金属イオンと薬物あるいは生体関連化合物との錯生成，薬物の薬効への影響，あるいは薬物相互作用などを推察するための一つのツールに十分なり得ると考えられる．

### 第三節 3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロンとマンガン(II)を用いるヒストンの蛍光光度定量とその特性

#### 1. 緒言

哺乳類細胞の核内においてゲノム DNA は裸の状態では存在せず、高度に組織化された DNA - タンパク質複合体を形成している。この高次構造をクロマチン<sup>40,41)</sup>と呼んでおり、ヌクレオソームの繰り返し構造がらせん状につながったものである。ヌクレオソームは、H2A, H2B, H3, H4 ヒストンタンパク質<sup>42,43)</sup>が2分子からなるヒストンオクタマーに、146塩基対の DNA が約2回転巻き付いた構造をとっている(Fig.3-1)。ヒストンはリシン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸を多数もつ塩基性タンパク質<sup>44)</sup>で、酸性である DNA と結合している。以前は、DNA をコンパクトに束ねるためのみの構造体として考えられてきたが、ヒストンがクロマチン構造の構成体であるだけでなく、遺伝子発現など、ゲノム機能や動態を制御するために中心的な役割<sup>45,46)</sup>を果たすことが次第に明らかになってきた。

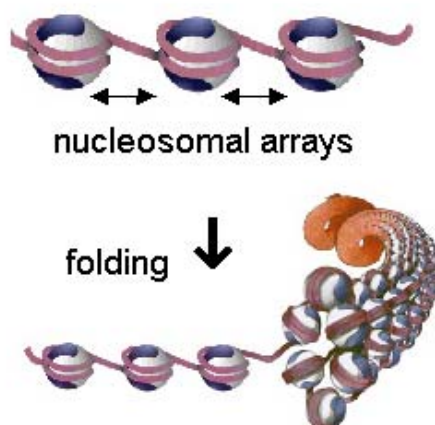


Fig. 3-1 Histone<sup>47)</sup>

ヒストンの N 末端は、ヒストンテールとよばれ、ヌクレオソームコアから少し離れて存在しており、ヒストンは主にこの N 末端の部分で様々な修飾を受けている。アセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化、ADP リボシル化、グリコシル化などが報告されているが、特に、アセチル化やメチル化はヒストンに特徴的な修飾である。近年、このようなヒストン修飾によるクロマチン構造変換が転写誘導の際に重要な働きをすることが解明されてきた。ヒストンの修飾は、遺伝子の発現制御のほか、染色体の凝集、アポトーシス、DNA 複製、DNA 修復、細胞分化など多くの生命現象と密接に関連している。このように、ヒストンの種々の役割や動態が注目されているにもかかわらず、ヒストンの定量法としては、わずかに ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 法<sup>48-51)</sup>が報告されているのみで、それ以外の方法は殆ど報告されていない。従って、ヒストンの簡便迅速で高感度な定量法の開発が熱望されている。

一方、タンパク質は、色素、金属イオンなど種々の化合物と錯生成することが知られており、これら色素あるいは金属イオンを用いる分析法も数多く報告されている。特に、ブロモフェノールブルー、ブロモクレゾールグリーン、メチルオレンジ、エオシン、クーマシーブリリアントブルー、ポンソーなどの色素<sup>52,53)</sup>を用いるとき、これら色素とタンパク質との相互作用の結果、色素の $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移によるメタクロマジー現象を示すことにより色素の色調が変化することが知られている。しかしながら、これら[色素-タンパク質]の二元錯体を用いるよりも金属イオンと錯生成する色素と金属イオンを併用し、[色素-金属]錯体にタンパク質を添加した場合、タンパク質との間にかさ高い三元錯体が生成し、色素の $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移もより大きな確率で起こり、感度の面で大きく向上することが期待できる。この考えに基づき、当研究室では、色素としてピロガロールレッド、金属イオンにモリブデン(VI)を用いる尿タンパク質<sup>54)</sup>をはじめ、多くのタンパク質量法を開発した<sup>55,56)</sup>。

蛍光光度法は、吸光光度法に比べ、定量感度、選択性などの面で優れているので、微量分析が要求される生体分析、臨床分析分野などで広く用いられている分析法である。本研究に用いている3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロン(TFCPF, Fig.3-2)は、優れた蛍光試薬として汎用されているフルオレセインと類似した構造を有している強い蛍光を発するキサントン系色素である。従って、このTFCPFとMn(II)を用いる吸光光度法<sup>57)</sup>を参考にし、TFCPFの蛍光性を利用すれば、微量ヒストンの蛍光光度定量法の開発も可能であることが推察されるので、本章ではTFCPFとMn(II)を用いる蛍光光度定量法について検討することとした。

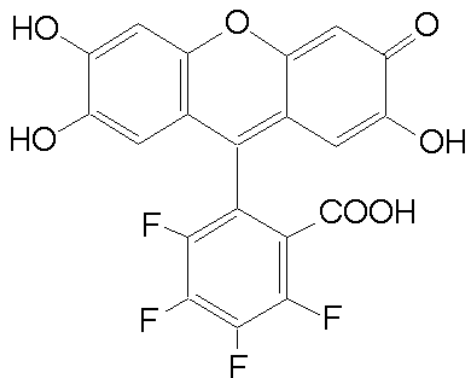


Fig. 3-2 The Structure of TFCPF

## 2. 実験

### 2-1 試薬及び装置

ヒストン溶液：Sigma製ヒストン(II-S, II-AS, III-S, VII-S, VIII-S)を水に溶解して0.01%とし、冷暗所に保存した。使用に際しては、本液を適宜、水で希釈して用いた。

Mn(II)溶液：Merck製原子吸光用1000ppm溶液のMn(II)溶液を希釈し、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ とした。使用に際しては、本液を適宜、水で希釈して用いた。

TFCPF溶液：TFCPF一定量を塩酸1滴含むメタノールに溶解し、 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ 溶液として調製し、

褐色瓶に保存して用いた。

トリトン X - 100 溶液:ナカライテスク製トリトン X - 100 を水に溶解し, 1.0%液として用いた。

緩衝液 : 0.2M トリス溶液及び 0.2M 塩酸を pH メーターで測定しながら適宜混合し, pH9.0 の緩衝液として用いた。

その他の試薬は, 市販特級品を精製せずにそのまま用いた。また本実験ではミリポア製 Academic A10 型 Milli - Q による精製水を用いた。

蛍光強度及び蛍光スペクトルの測定には日立製 F-4500 型蛍光分光光度計を用い, セルは層長 10mm の石英製セルを使用した。また, pH の測定には堀場製 F - 11 型ガラス複合電極 pH メーターを用いた。

## 2-2 定量操作

10ml メスフラスコに, 0.2M トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)2.5 ml, 1.0 %トリトン X - 100 液 1.0ml,  $1.0 \times 10^{-5}$ M TFCPF 液 1.0ml,  $1.0 \times 10^{-5}$ M Mn(II)溶液 1.5ml を加え, 次に 20 $\mu$ g 以下のヒストンを含有する溶液及び水を加えて, 全量 10ml とする。次いで室温で 15 分放置後, ヒストン含有の溶液(S)と同様の操作で得たヒストンを含まない液(B)の蛍光強度をそれぞれ, 励起波長 494nm, 蛍光波長 552nm で測定し, B を 100 としたときの S の蛍光強度の減少( $\Delta F$ , %)を用いてヒストン濃度を求める。

# 3. 結果と考察

## 3-1 定量条件の検討

本反応時における液性の影響を検討した。吸光光度法の標準操作を参考に, 弱塩基性域で緩衝能を持つ緩衝液, すなわち, 0.05M ホウ砂-塩酸緩衝液, 0.2M トリス-塩酸緩衝液, 0.1M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を検討したが, 緩衝液の種類による大きな差異は認められなかった。従って, 吸光光度法の場合と同様, 0.2M トリス-塩酸緩衝液を用いることとし, Fig.3-3 に示すように, その最適 pH 範囲を検討したところ, pH9.0 付近で S, B 両者において最大の蛍光強度差  $\Delta F$  を示すので, 最終的に 0.2M トリス-塩酸緩衝液 2.5ml を用い, 液性を pH9.0 に調整することにした。

次に, ヒストン 2.0 $\mu$ g/ml の一定量に対して, 最適 TFCPF 濃度を検討した。その結果, TFCPF 濃度の減少に依存して, その S, B の  $\Delta F$  は大きくなるが, 蛍光強度の大きさ及びヒストンの検量線範囲を考慮して, 最終的に,  $1.0 \times 10^{-5}$ M TFCPF 液 1.0ml を用いることにした。次に TFCPF 量を固定し Mn(II)量を変化させたとき, TFCPF:Mn(II)が 2:3 の濃度比で Mn(II)を加えるとき, 最適であることを認めたので, 全量 10ml に対し, TFCPF を  $1.0 \times 10^{-5}$ M 1.0ml 及び Mn(II)溶液を  $1.0 \times 10^{-5}$ M 1.5 ml 加えることにした。

本反応における蛍光の安定性について検討したところ, [Mn(II) - TFCPF - ヒストン]溶液と [Mn(II) - TFCPF]溶液を室温で 15 分以上放置するとき, 両溶液の蛍光強度は一定となり, またその  $\Delta F$  がヒストン濃度に比例することを認めたので, 室温で 15 分放置後の両溶液の蛍光強度の差

を測定することとした。

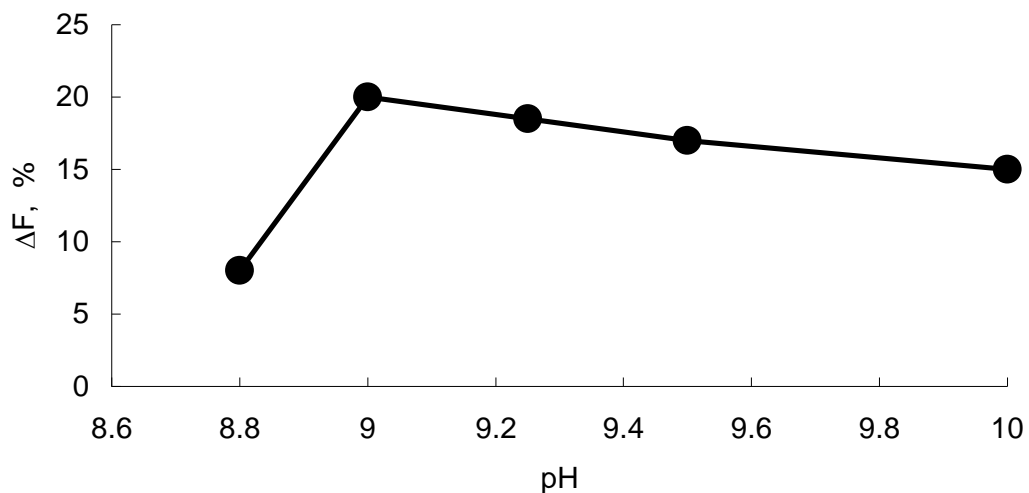


Fig. 3-3 Effect of pH

Histone:1.0 $\mu$ g/ml; Mn(II): $5.6 \times 10^{-6}$ M; TFCPF: $5.0 \times 10^{-6}$ M; 1.0ml of 1.0% TritonX-100.

### 3-2 蛍光スペクトル

[Mn(II) - TFCPF]溶液及び[Mn(II) - TFCPF - ヒストン]溶液の蛍光スペクトルおよび励起スペクトルを測定した。その結果を Fig.3-4, Fig.3-5 に示す。本蛍光体の極大励起波長は 528nm に見られるが、励起波長にこの波長を選択した場合、極大蛍光波長の 552nm との重なりが大きくなるので、蛍光体の蛍光強度を測定する際の励起波長として 494nm を選定した。



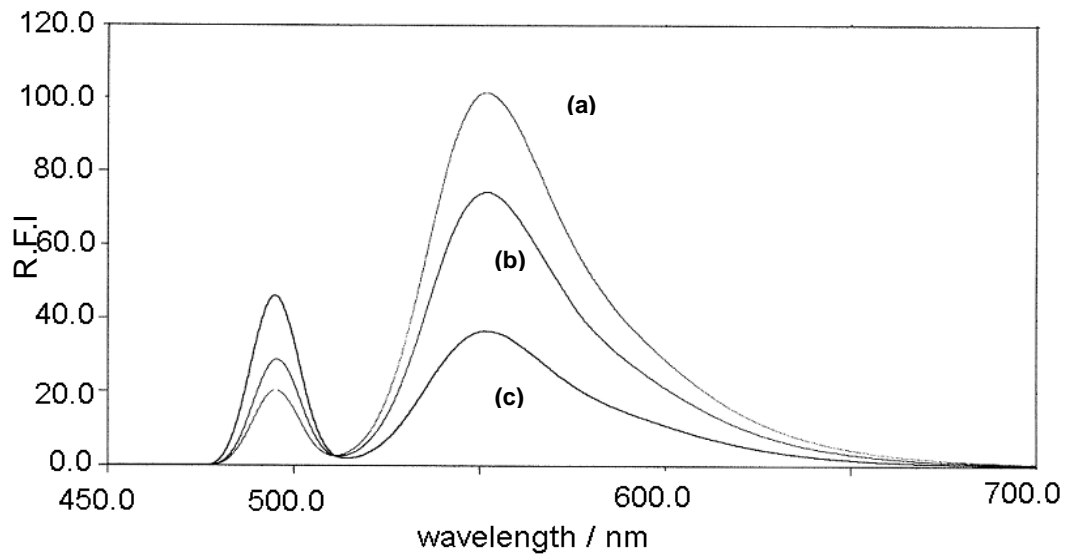


Fig. 3-4 Fluorescence emission spectra

Mn(II): $1.5 \times 10^{-6}$ M; TFCPF: $1.0 \times 10^{-6}$ M; 1.0ml of 1.0%TritonX-100; pH:9.0; Excitation wavelength:494nm;  
 Curve(a):Mn(II)-TFCPF solution; Curve(b):Mn(II)-TFCPF-histone(1.0 $\mu$ g/ml)solution;  
 Curve(c):Mn(II)-TFCPF-histone(2.0 $\mu$ g/ml)solution.

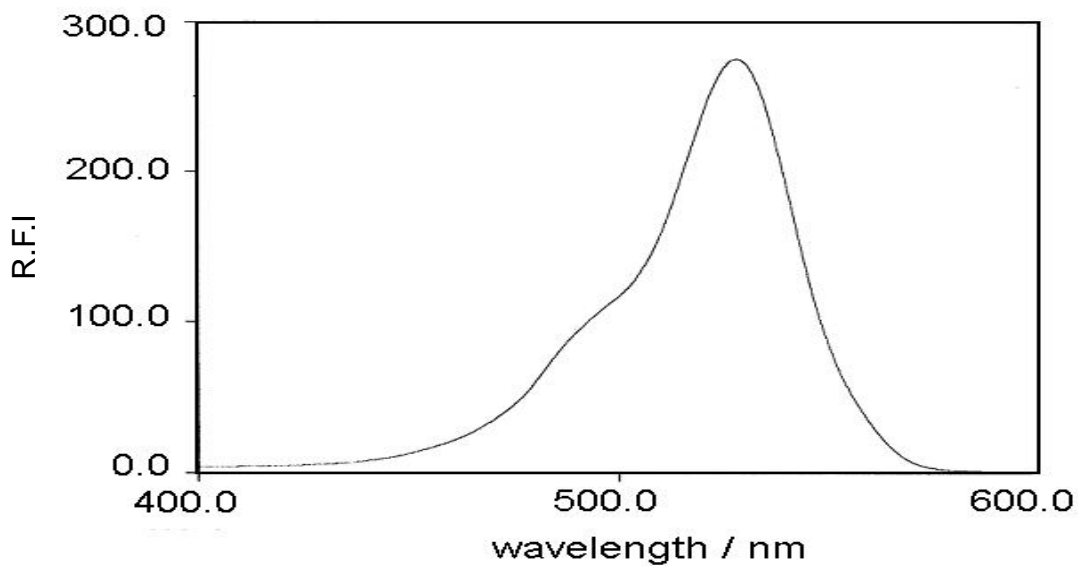


Fig. 3-5 Fluorescence excitation spectrum

Mn(II): $1.5 \times 10^{-6}$ M; TFCPF: $1.0 \times 10^{-6}$ M; 1.0ml of 1.0%TritonX-100; pH:9.0; Emission wavelength:552nm.

### 3-3 検量線の作成

2-2 の定量操作に従って、ヒストンの検量線を作成したところ、Fig.3-6 に見られるように、0.5 ~2.0 $\mu$ g/ml のヒストン濃度範囲で良好な直線を得ることができた。また、ヒストン濃度 1.0 $\mu$ g/ml における RSD は 3.94%(n = 5)であり、再現性にも比較的優れていた。

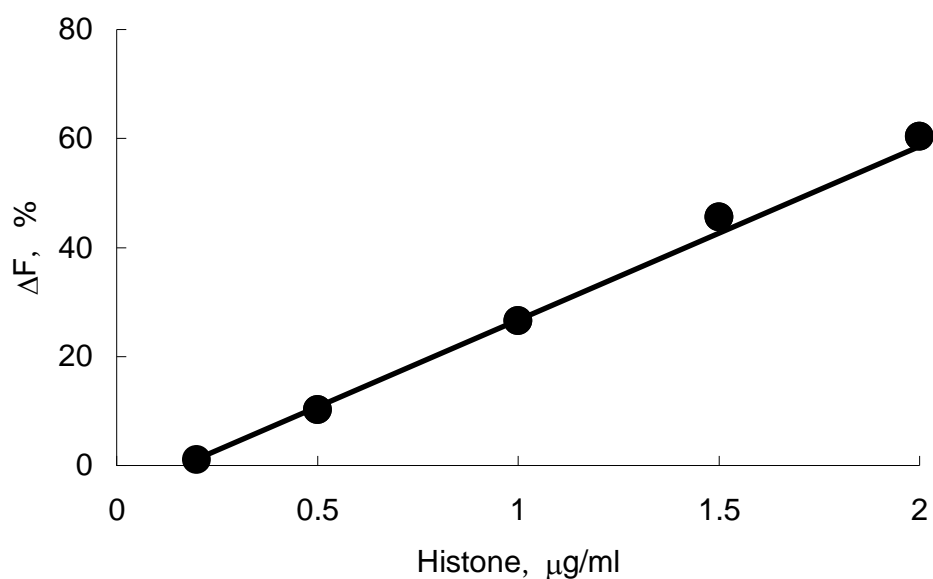


Fig. 3-6 Calibration curve for histone (VIII-S)

Mn(II): $1.5 \times 10^{-6}\text{M}$ ; TFCPF: $1.0 \times 10^{-6}\text{M}$ ; 1.0ml of 1.0%TritonX-100; pH:9.0; Excitation wavelength:494nm; Emission wavelength:552nm.

### 3-4 共存物質の影響

本法における共存物質の影響について、 $1.0\mu\text{g/ml}$  ヒストンを用いて検討した。その結果を Table3-1 に示すが、TFCPF と錯生成すると考えられる鉄(II)や亜鉛(II)のような金属イオンあるいは DNA などの共存は正の誤差を示す。これら金属イオンは適当なマスク剤、例えば、鉄(II)にはシアン化物イオン、銅(II)にはイミノ二酢酸(IDA)を添加することによりそれぞれその影響を除去することができた。一方、その他の検討した陰イオンおよび有機化合物の影響は殆ど見られず、本蛍光光度法は吸光光度法と比較して、共存物質の影響が極めて少ない特徴を有している。

Table 3-1 Effect of foreign substances

Substance	Added, $\mu\text{g}/10\text{ ml}$	Recovery, %
None	—	100.0
NaCl	$1.0 \times 10^4$	100.0
$\text{NH}_4\text{Cl}$	$1.0 \times 10^3$	100.0
$\text{KNO}_3$	$1.0 \times 10^4$	100.0
$\text{NaHCO}_3$	$5.0 \times 10^2$	100.0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$1.0 \times 10^2$	100.0
$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	$1.0 \times 10^1$	100.0
KCN	$6.5 \times 10^3$	100.0
Cu(II)	1.0	147.3
Cu(II)+IDA ( $5.0 \times 10^{-4}\text{ M}$ )	1.0	100.0
Fe(II)	$1.0 \times 10^{-1}$	137.7
Fe(II)+ $\text{CN}^-$ ( $5.0 \times 10^{-3}\text{ M}$ )	$1.0 \times 10^{-1}$	100.0
Zn(II)	$1.0 \times 10^{-1}$	100.0
Mg(II)	$1.0 \times 10^{-1}$	100.0
Glucose	$1.0 \times 10^4$	100.0
Ascorbic Acid	$1.0 \times 10^3$	100.0
Citric Acid	$1.0 \times 10^1$	100.0
Arginine	$1.0 \times 10^2$	100.0
Glycine	$5.0 \times 10^2$	100.0
Glutamic acid	$5.0 \times 10^2$	100.0
Lysine	$1.0 \times 10^2$	100.0
Urea	$1.0 \times 10^4$	100.0
Uric acid	$5.0 \times 10^1$	100.0
Thymine	$1.0 \times 10^3$	100.0
Guanine	1.0	100.0
RNA	1.0	100.0
DNA	$1.0 \times 10^{-1}$	100.0
HSA	$5.0 \times 10^2$	100.0
$\gamma$ - Globulin	$1.0 \times 10^2$	100.0
Fibrinogen	1.0	100.0

Histone:  $1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ; Mn(II):  $1.5 \times 10^{-6}\text{ M}$ ; TFCPF:  $1.0 \times 10^{-6}\text{ M}$ ;  $1.0\ \text{ml}$  of  $1.0\ \%$  Triton X-100; pH: 9.0.

### 3-5 各種たんぱく質との反応

種々のタンパク質と[Mn(II)-TFCPF]錯体との相互作用の結果、生じる[Mn(II)-TFCPF]錯体と[Mn(II)-TFCPF-タンパク質]錯体の蛍光強度差を検討した。その結果、Table3-2に示すように、ヒト血清アルブミン(HSA)や $\gamma$ -グロブリンなどは、大量に加えても殆ど(B)の蛍光強度は変化しなかった。また、吸光光度法の際、呈色反応を示したリゾチームも全く反応しないなど、吸光光度法に比べ、選択性が向上する結果が得られた。

Table 3-2 Reaction between several proteins and manganese (II)-TFCPF complex

Protein <sup>a)</sup>	$\Delta F$ , %		pI <sup>c)</sup>	MW <sup>d)</sup> / KDa
	/	% <sup>b)</sup>		
Histone	27.3	/ 100.0	10.5	21.5
Myelin basic protein	13.9	/ 50.9	12.0 - 13.0	18.4
Lysozyme	0.0	/ 0.0	10.5 - 11.0	14.5
Cytochrome C	3.3	/ 12.1	10.1	12.4
Trypsin	1.3	/ 4.8	10.1 - 10.5	24.0
Lactoferrin	1.0	/ 3.7	8.2 - 9.2	75 - 80
HSA	0.0	/ 0.0	4.7	60.4
Protease ( <i>S.griseus</i> )	2.5	/ 9.2	8.5 - 9.2	19.0
$\gamma$ Globulin	0.3	/ 1.1	6.9	155 - 160
Fibrinogen	0.0	/ 0.0	5.5 - 5.8	340

Mn(II): $1.5 \times 10^{-6}$ M; TFCPF: $1.0 \times 10^{-6}$ M; 1.0ml of 1.0%TritonX-100; pH:9.0;

a)Protein taken, 1.0 $\mu$ g/ml; b)Percent with respect to histone; c)isoelectric point; d)Molecular weight.

## 4. 結語

0.2M トリシュー塩酸緩衝液とトリトン X-100 共存下、[Mn(II) - TFCPF - ヒストン]の錯体生成反応の結果、[Mn(II) - TFCPF]錯体の消光現象を利用することにより、ヒストンの簡便かつ高感度な蛍光光度定量法を構築することができた。本法はヒストン濃度 0.5~2.0 $\mu$ g/ml において定量可能である。また、共存物質の影響が極めて少なく、更に、各種タンパク質の反応性を比較するとき、ヒストンにかなり特異的で、生体中の微量のヒストンの分析法として十分適用できると考えられる。

## 第二章 色素－金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法

### 第一節 *o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレインとパラジウム(II)を用いる尿酸の吸光光度定量

#### 1. 緒言

尿酸(Fig.4-1)は、プリン塩基の最終代謝分解産物として尿中に排泄されるが、ヒトは、尿酸を可溶化型に変換する酵素を所有していないことからさまざまな問題がおこっている。尿酸のほとんどは尿中に排泄され、血清中や尿中の尿酸の定量は高尿酸血症、悪性リンパ腫、貧血、糖尿病、腎不全、Lesch-Nyhan(レッシュナイハン)症候群<sup>58)</sup>などの治療や診断においても大変重要であると考えられ、メタボリックシンドローム<sup>59)</sup>の有用な指標であるということも知られている。

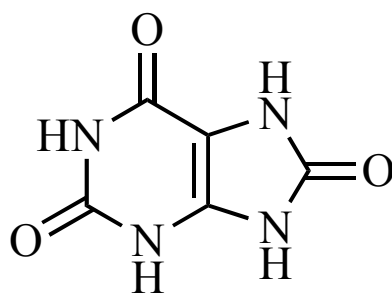


Fig. 4-1 Structure of Uric acid

尿酸の分析方法としては、分光光度法<sup>60-64)</sup>、電気分析<sup>65-69)</sup>、高速液体クロマトグラフィー<sup>70)</sup>、蛍光光度法<sup>71-73)</sup>、化学発光法<sup>74-76)</sup>などがあげられる。比色法<sup>77,78)</sup>では、低感度、低再現性、操作の煩雑さ、アスコルビン酸などの共存物質の影響などが問題とされ、満足のいく方法とはいえない。筆者は、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(HTA)共存下、*o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン(QP)とパラジウム(II){Pd(II)}を用いることによりQP-Pd(II)-HTA複合体の呈色が、痕跡量の尿酸を加えることにより、退色することに着目し、今回、尿酸の新規定量法の開発についての開発とヒト尿中での分析について検討した。

#### 2. 実験

##### 2-1 試薬及び装置

尿酸(UA)溶液：尿酸(和光純薬社製)を少量の 0.1M 水酸化ナトリウム溶液で溶解し、水で希釈して  $1.0 \times 10^{-2}$ M 溶液として調製した。使用に際しては、本液を適宜、水で希釈して用いた。

パラジウム(II){Pd(II)}溶液：パラジウム標準液(和光純薬社製、1000ppm)を水で希釈し、 $5.0 \times 10^{-4}$ M 溶液として調製した。

*o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレイン(QP)溶液：精製QPを塩酸1滴を含むメタノールに溶解し、

$1.0 \times 10^{-3} \text{M}$  溶液として調製し、褐色ビンに保存して用いた。

臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(HTAB)溶液：再結晶化することによって精製した HTAB(東京化成工業社製)を水で溶解し、 $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$  溶液として調製した。

緩衝液：0.05M ホウ砂溶液及び 0.1M 塩酸溶液を pH メーターで測定しながら混合し、pH 8.2 の緩衝液として用いた。

その他の試薬は、市販特級品を精製せずにそのまま用いた。また本実験ではミリポア製超純水製造システムによる精製水を用いた。

吸光度および吸収スペクトルの測定には島津製作所製 UV-160 型分光光電光度計で層長 10nm の石英セルを使用した。また、pH の測定には堀場製 F-11 型ガラス複合電極 pH メーターを用いた。

## 2-2 定量操作

10ml のメスフラスコに緩衝液 3.0ml,  $1.0 \times 10^{-2} \text{mol dm}^{-3}$  HTAB 水溶液 0.4ml,  $5.0 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3}$  Pd(II)0.4ml, 尿酸を含む水溶液,  $5.0 \times 10^{-4} \text{mol dm}^{-3}$  QP 溶液を 1.0ml を加え、試験管に移す。ついでこれらを  $60^\circ\text{C}$ , 30 分間加温, 5 分水冷した後の吸光度を試薬空試験液を対照に 635nm で測定する。

# 3. 結果と考察

## 3-1 定量条件の検討

まず、色素および金属イオンの組み合わせの検討を行った。色素-金属呈色錯体の退色反応に基づく尿酸の定量法の有用性を検討するために、尿酸存在下で種々の色素と金属イオンの呈色反応を比較検討した。まず初めに、本反応機構における金属イオンの影響について検討した。Table4-1 に示すように、弱塩基領域で種々の金属イオン、Pd(II), 銅(II), 亜鉛(II), ニッケル(II), コバルト(II), 鉄(II), マンガン(II), モリブデン(VI)を検討した結果、Pd(II)が最も優れていた。次に、色素としてフェニルフルオロン(PF), ピロガロールレッド(PR), ピロカテコールバイオレット(PV), キシレノールオレンジ(XO), メチルチモールブルー(MTB), 4-(2-ピリジルアゾ)レゾルシノール(PAR)を検討し、結果を Table4-2 に示した。

本反応における最適液性および用いる緩衝液の種類について検討した。検討した緩衝液、すなわち、0.05M ホウ砂-0.1M 塩酸緩衝液, 0.1M リン酸二水素カリウム-0.1M リン酸水素二ナトリウム, 0.1M クエン酸-0.1M リン酸水素二ナトリウム, 0.1M リン酸二水素カリウム-0.05M ホウ砂, 0.1M 塩酸-0.1M トリス, 0.1M 塩酸-0.1M 5,5-ジエチルバルビツール酸ナトリウムのうち、0.05M ホウ砂-0.1M 塩酸緩衝液を 3.0ml 用いて最終的に pH 7.7-8.5 に調整するとき、最大でほぼ一定の  $\Delta A$  が得られた。

呈色錯体の安定化、感度の上昇などを目的として、分散剤として種々の界面活性剤の効果を検討した。界面活性剤のうち、陽イオン性[HTAB, 臭化ヘキサデシルピリジニウム(HPB), 塩化テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム(Zephiramine, Zep), 塩化ステアリルメチルアンモニウム(STAC)], 非イオン性[Tween20, TritonX-405, ポリビニルアルコール(PVA), Brij35], 陰イオン性[ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), ジ(2-エチルヘキシル)スルホサクシネートナトリウム(Aerosol OT), 両イオン性[アンヒトール 24B, スワノール AM-101]を用いて比較検討した。陽イオン性界面活性

剤の共存下では、非イオン性、陰イオン性、両イオン性界面活性剤に比べ、QP-Pd(II)錯体の吸収スペクトルがレッドシフトし、吸光度が増大した。この結果は Table4-3 にまとめた。

尿酸の最終濃度を 0.10 $\mu$ g/ml に固定し、QP と Pd(II)濃度の影響を検討した。QP と Pd(II)のモル比が等モルよりも大きい場合最大の $\Delta A$  値を示したので、尿酸の定量下限およびQP-Pd(II)-HTAB 溶液の吸光度に関する以後の検討は、2.0 $\times 10^{-5}$ M Pd(II)溶液と 5.0 $\times 10^{-5}$ M QP 溶液を用いた。

本反応系は、室温では迅速に呈色しなかった。したがって、加温時間と加温温度の影響について、10~60 分および 50 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ Cの条件で検討した。その結果、Fig.4-2 に示すように、60 $^{\circ}$ C で 20~40 分加温し、5 分水冷後に最大でほぼ一定の $\Delta A$  が得られた。

Table.4-1 Effect of metal ions

Metal ion	$\Delta A$ at	$\lambda_{\max}/\text{nm}$
Pd (II)	0.400	635
Fe (II)	0.024	605
Zn (II)	0.073	555
Cu (II)	0.035	580
Mn(II)	0.022	575
Co (II)	0	—
Ni(II)	0	—
Mo(VI)	0	—

UA, 0.10 $\mu$ g/ml ; Metal ions, 2.0 $\times 10^{-5}$  M ; QP, 5.0 $\times 10^{-5}$ M ;  
HTAB, 4.0 $\times 10^{-4}$ M ; pH8.2 ; reference, water.

Table.4-2 Selection of dyes

Dye	$\Delta A$ at	$\lambda_{\max}/\text{nm}$
QP	0.400	635
PF	0.068	625
XO	0.016	600
MTB	0.006	630
PR	0	—
PV	0.008	505
PAR	0.058	530

UA, 0.10 $\mu$ g/ml ; Pd(II), 2.0 $\times 10^{-5}$ M ; dyes, 5.0 $\times 10^{-5}$ M ;  
HTAB, 4.0 $\times 10^{-4}$ M ; pH8.2 ; reference, water.

Table. 4-3 Effect of surfactants

Surfactant	$\Delta A$ at	$\lambda_{\max}/\text{nm}$
HTAB	0.400	635
HPB	0.240	635
STAC	0.202	635
Zep	0.086	665
SDS	0	—
Aerosol OT	0	—
Tween 20	0.012	500
Triton X-405	0.008	500
Brij 35	0.010	500
PVA	0.005	500
Amphitol 24B	0	—
Swanol AM-101	0	—

UA, 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ; Pd(II), 2.0 $\times 10^{-5}\text{M}$  ; QP, 5.0 $\times 10^{-5}\text{M}$  ;  
surfactants, 0.1% ; pH8.2 ; reference, water.

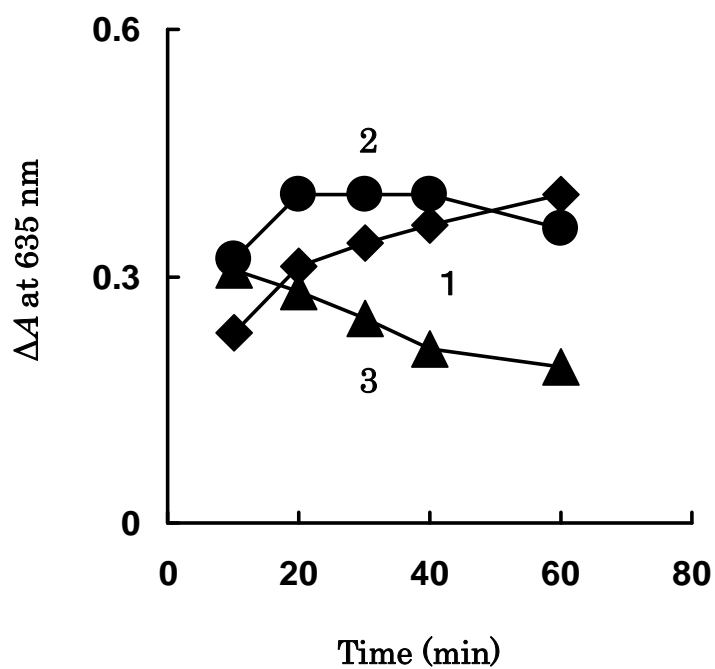


Fig.4-2 Effect of time and temperature

UA, 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Pd(II), 2.0 $\times 10^{-5}\text{M}$ ; QP, 5.0 $\times 10^{-5}\text{M}$ ;

HTAB, 4.0 $\times 10^{-4}\text{M}$ ; pH8.2; reference, water. Curve1, 50°C; 2, 60°C; 3, 70°C.



### 3-2 吸収スペクトル

定量操作で得られた吸収スペクトルを Fig.4-3 に示す. 635nm における吸光度差は, 尿酸の濃度に比例して増加している.

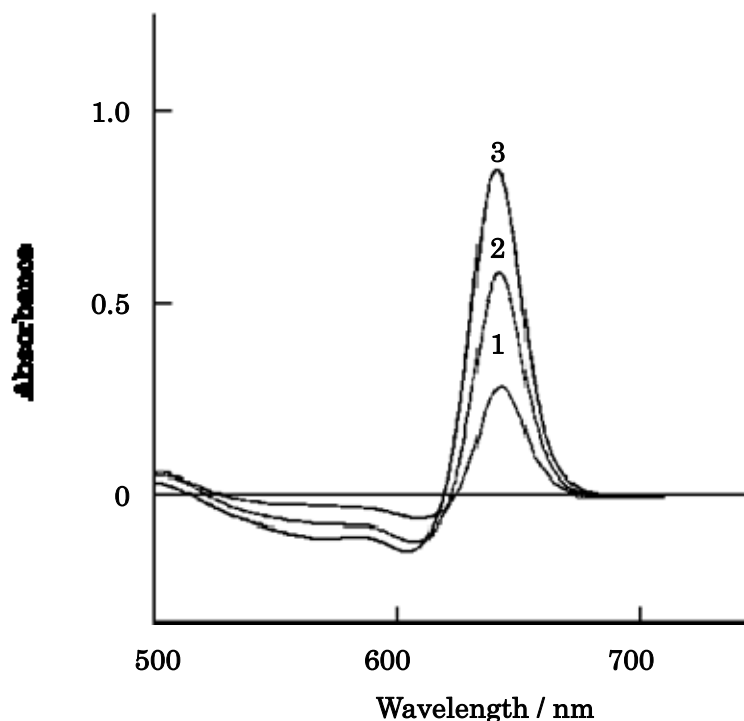


Fig. 4-3 Difference spectra of Pd(II)-QP solution and UA-Pd(II)-QP solution.

UA : Curve1, 0.067 $\mu\text{g/ml}$  ; Curve2, 0.13 $\mu\text{g/ml}$  ; Curve3, 0.20 $\mu\text{g/ml}$ .

Pd(II) :  $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  ; QP :  $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  ; CTAB :  $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  ; pH 8.2.

### 3-3 検量線の作成

標準操作における検量線を作成したところ, 尿酸 0.01~0.20 $\mu\text{g/ml}$  の範囲において良好な直線性が得られた. 見かけのモル吸光係数( $\epsilon$ )は検量線の勾配より,  $6.5 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  と算出された. また, 0.10 $\mu\text{g/ml}$  における相対標準偏差(RSD)は 1.5%(n=5)であり, 既存の方法<sup>77,78)</sup>よりも 20 倍の感度を示し, 優れた再現性を示した.

### 3-4 共存物質の影響

標準定量条件下, 種々の物質の共存による影響を検討したところ, ナトリウム, カリウム, カルシウム, マグネシウム, 塩化物イオン, 硝酸イオン, 硫酸イオン, リン酸イオン, グルコース, カフェイン, グリシン, ビリルビン, 尿素の共存に関して大過剰量の添加にもかかわらずまったく影響を示さなかった. また, 還元剤であるアスコルビン酸, シュウ酸の共存でも影響はなかった. 鉄(III), クレアチニン, ヒト血清アルブミンでは大過剰の添加の際に影響を示したが, 635nm における吸光度差においては, 通常の試料濃度において全く影響を及ぼさないことがわかった. これらの結果を Table4-4 に示す.

Table. 4-4 Effect of foreign substances

Substance	Added as	Added		$\Delta A$ at 635 nm	Recovery, %
		$/\mu\text{g ml}^{-1}$	Mole ratio <sup>a</sup>		
None	–	–	–	0.400	100.0
Fe(III)	Alum	$3.3 \times 10^{-2}$	1	0.320	80.0
Cu(II)	Sulfate	0.76	20	0.400	100.0
Na(I)	Chloride	6.9	500	0.400	100.0
K(I)	Nitrate	11.7	500	0.400	100.0
Mg(II)	Chloride	7.3	500	0.400	100.0
Ca(II)	Chloride	12.0	500	0.400	100.0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Disodium	5.8	100	0.400	100.0
C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sodium	5.3	100	0.400	100.0
Citrate	Trisodium	7.6	100	0.400	100.0
Glucose	–	53.5	500	0.400	100.0
Glycine	–	22.5	500	0.400	100.0
Urea	–	26.0	500	0.400	100.0
Caffeine	–	58.3	500	0.400	100.0
Ascorbic acid	–	10.6	100	0.400	100.0
Bilirubin	–	35.1	100	0.400	100.0
Creatinine	–	0.68	10	0.515	128.8
HSA	–	10.0	–	0.476	119.0

UA, 0.10 $\mu\text{g/ml}$  ; Pd(II),  $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$  ; QP,  $5.0 \times 10^{-5}\text{M}$  ; HTAB,  $4.0 \times 10^{-4}\text{M}$  ; pH8.2 ; reference, water.

a. Mole ratio:substance/UA.

### 3-5 実試料の適用

尿中の尿酸定量について試みたところ、前処理なしで100倍希釈するのみで共存物質の影響を除去することができた。同条件での尿酸の添加回収率は、98~104%で相対標準偏差(RSD)は、3.1%であった。ウリカーゼ/N-(3-スルホフェニル)-3-メトキシ-5-メチルアニリン法(LタイプワコーUA-Mクリニカルキット, 和光純薬)と本法との結果についてT検定を行った結果、95%の信頼区間で危険率( $p=0.05$ ,  $n=4$ )  $t = 0.159 \quad 2.776$  と有意差は認められず、よい一致を示した。これらの結果をTable4-5に示す。

Table 4-5 Determination of UA in human urine samples

Sample <sup>a</sup>	Found, $\mu\text{g ml}^{-1}$		RSD <sup>b</sup> (%)	Recovery <sup>c</sup> (%)
	Present method	Other method <sup>a</sup>		
A	$155 \pm 4.8^{\text{d}}$	146	3.1	101.5
B	$224 \pm 5.6$	230	2.5	98.2
C	$224 \pm 5.6$	182	2.8	103.6

The calculated  $t=0.159$  was lower than critical  $t$  value ( $p=0.05$ ,  $n=4$ ) of 2.776.

a. Other method: the uricase *N*-(3-sulfopropyl)-3-methoxy-5-methylaniline method (a. clinical kit, L type Wako UA-M, Wako Pure Chem.)

b. Average of 5 determination

c. UA taken,  $5.0 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g/ml}$ . d. Average  $\pm$  standard deviation.

### 3-6 反応機構の検討

反応機構を明らかにするため、呈色錯体の組成比を連続変化法とモル比法で検討したところ、 $[\text{Pd}(\text{II})] : [\text{QP}]$ は、 $[1:1]$ であり界面活性剤共存下でも同様に $[\text{Pd}(\text{II})] : [\text{QP-HTA}]$ は、 $1 : 1$ であり、 $\{\text{Pd}(\text{II}) : \text{QP} : \text{HTA}\}$ の三元錯体の組成比は、 $[1:1:1]$ であることが推定され、尿酸はパラジウム(II)と $[1:1]$ で錯体を形成していると考えられた。さらに $\{\text{Pd}(\text{II})\text{-QP-HTA}\}$ 三元錯体の組成比などの反応機構について明らかにするためには詳細な検討が必要である。

## 4. 結語

QP と Pd(II) と HTA を用いる尿酸の本定量法は、高感度( $\epsilon = 6.5 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )であり、既存のキットを用いた方法との比較では測定値は良い一致を示し、感度、回収率ともに優れた結果を得ることができた。また、共存物質とくにアスコルビン酸の妨害を受け難いという点においても非常に優れている方法といえる。本法は、抽出操作を全く必要とせず実試料においても簡便高感度な尿酸の定量法であるといえる。

## 第二節 キシレノールオレンジとジルコニウム(IV)を用いる アルブミンの吸光光度定量

### 1. 緒 言

タンパク質は、金属イオンあるいは色素など種々の物質と相互作用を起こしやすく、ブロモクレーゾールグリーン、ブロモフェノールブルーなどの色素との間に、{タンパク質-色素}会合体生成によるメタクロマジー現象を示し、それらの色素の吸収スペクトルが大きく変化すること(タンパク誤差)が知られており、このことを利用するタンパク質測定法が数多く報告され、利用されている。したがって、色素に代えて{色素-金属}錯体をタンパク質に共存させることによっても、その{色素-金属}錯体の吸収スペクトルが大きく変化すると予測される。

一方、タンパク質は、界面活性剤と同様にその分子中に極性部分と非極性部分を有している高分子化合物なので、水中では界面活性剤と、特に等電点(ヒト血清アルブミンではほぼ pI4.2~4.8 程度)以下では陽イオン性界面活性剤と類似の挙動を示すので、{色素-金属}錯体を用いても陽イオン性界面活性剤と同様に、タンパク質の定量法が設定できると考え<sup>79)</sup>、前述したように、{タンパク質-色素-金属}錯体生成反応を利用する種々のタンパク質分析法が開発された<sup>80-83)</sup>。しかしながら、これらの方法にも多くの問題点があり改良の余地がある。また、単にタンパク質の多少が分かるだけで充分であった時代から、尿の個々の構成微量タンパク質量と各種疾患の関連性、例えばアルブミンと糖尿病性腎症などを迅速、正確に測定することが必要となってきた<sup>79)</sup>。

今回、トリフェニルメタン系色素のキシレノールオレンジ(XO, Fig.5-1)と、金属イオンのジルコニウム(IV) {Zr(IV)}との組み合わせを利用する簡便、迅速で高感度な尿微量アルブミンの吸光光度定量法の開発を目的として検討した。また、ヒト尿を試料として、本法と PR 法との比較検討を行い、反応機構に関しても一部検討を加えた。

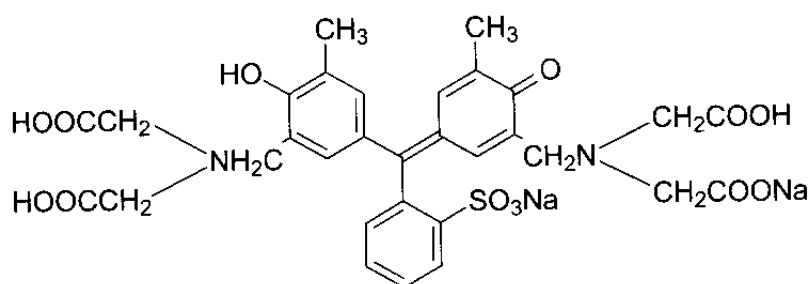


Fig.5-1 Structure of Xylenol orange

## 2. 実験

### 2-1 試薬及び装置

HSA 溶液：蛋白標準液(100mg/dl アルブミン含有，和光純薬製)を 0.9%塩化ナトリウム水溶液で希釈して 5 $\mu$ g/ml 溶液とし，透明ポリ試薬瓶に入れ，冷所保存した．使用時は室温に戻し用いた．

XO 溶液：市販のキシレノールオレンジ(同仁化学製)71.66mg を精密に量り，精製水で溶解し，全量 100ml の  $1.0\times 10^{-3}$ M XO 溶液として調製し，褐色瓶に入れ保存した．

ジルコニウム(IV)溶液：原子吸光分析用ジルコニウム標準液(1,000 $\mu$ g/ml，和光純薬製)を適宜精製水で希釈し，全量 100 ml の  $1.0\times 10^{-3}$ M 溶液とした．

分散剤溶液：CTAC(塩化セチルトリメチルアンモニウム，東京化成製)を 0.8g 及び，Tween20(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート，キシダ化学製)を 0.2g 秤量し，精製水を加えてよく混和し，全量 100 ml とした．

緩衝液：0.2M 酢酸ナトリウム溶液及び 0.2M 塩酸溶液を適宜混合し，pH2.5 の緩衝液として用いた．

その他の試薬は市販特級品を精製せずそのまま用いた．また，本実験ではミリポア製 Academic A10 型 Milli Q による精製水を用いた．

吸収スペクトル及び吸光度の測定には島津製 UV-1700 型分光光度計を用い，セルは層長 10mm の石英製セルを使用した．また，pH の測定には堀場製 F-11 型ガラス複合電極 pH メーターを用いた．陰イオン物質の除去のため，陰イオン交換樹脂にはジーエルサイエンス製 Meta CEP IC-MA を用いた．

### 2-2 定量操作

10ml のメスフラスコに，1.0~9.0 $\mu$ g/ml の HSA 溶液，分散剤溶液 1.5ml，0.2M 塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 2.5)2.5ml， $1.0\times 10^{-3}$ M Zr(IV)溶液 0.4ml を加え，さらに  $1.0\times 10^{-3}$ M XO 溶液 0.4ml を加え，精製水で全量 10 ml とする．次いで，本溶液を試験管に移してよく攪拌し，40 $^{\circ}$ C で 10 分静置後，HSA のみを除いて同様に処理して得た試薬ブランク溶液と共に，水を対照として 605nm での吸光度を測定し，両溶液の吸光度差( $\Delta A$ )を求め，あらかじめ作成して得た検量線より HSA 量を求める．

## 3. 結果と考察

### 3-1 定量条件の検討

まず，色素および金属イオンの組み合わせの検討を行った．微量アルブミン測定法を開発するにあたり，ヒト血清中に特に多く存在するアルブミン， $\gamma$ -グロブリン( $\gamma$ -G)を用いて，アルブミンのみに特異性が認められる反応を検討することにした．{色素-金属}錯体の組み合わせとして，金属イオンとしては，共存イオンの影響が少ない酸性領域において，色素と金属イオン間での反応が進行しやすい Zr(IV)，Ti(IV)，Mn(II)などの金属イオンを比較した．タンパク質は等電点以下で，カチオン型として存在することより，色素としては，酸性領域で反応しやすいスルホン酸を

有する市販色素のキシレノールオレンジ(XO), Fig.5-2 に示すメチルチモールブルー(MTB), ピロカテコールバイオレット(PV)を選択した<sup>84)</sup>. その結果, Table5-1 に示すように, 金属として Zr(IV) 溶液, 色素として XO 溶液を用いる際に,  $\gamma$ -G とは全く反応せず, HSA とのみ選択的に XO-Zr(IV) 呈色体の退色を認めたので, この組み合わせを用いることにした.

本退色反応における最適液性及び用いる緩衝液の種類について検討した. 検討した緩衝液, すなわち, 0.1M 塩酸-0.1M フタル酸水素カリウム, 0.1M グリシン-0.1M 塩酸, 0.05M クエン酸-0.1M 水酸化ナトリウム, 0.2M 塩酸-0.2M 酢酸ナトリウムのうち, 0.2M 塩酸-0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液を最終的に pH2.3~2.9 に調整するとき, Fig.5-3 に見られるように 605nm において最大でほぼ一定の  $\Delta A$  が得られたので, 全量 10ml に対して, pH2.5 に調整した 0.2M 塩酸-0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液を 2.5ml 添加して用いることにした.

一般に, {色素-金属}錯体生成反応において, 界面活性剤の共存による低 pH での錯形成, 吸収スペクトルのレッドシフト, モル吸光係数( $\epsilon$ )の増大, 選択性の向上, 錯体の可溶化などの効果が注目されている. これらの現象は, ミセル界面での発色試薬の酸解離の促進, 高次錯体の生成, 濃縮効果, 錯体の励起状態の安定化などによるとされている<sup>84)</sup>. したがって, これらの効果を期待して, 種々の分散剤の影響を検討した. 本反応における分散剤として, 非イオン性{N-ポリビニルピロリドン(PVP), TritonX-405, TritonX-100, Brij741, Brij78, Brij58, Brij35, Tween80, Tween20}, 陰イオン性{ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)}, 陽イオン性{塩化テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム(Zephiramine), 塩化セチルピリジニウム(CPC), 塩化トリメチルステアリルアンモニウム(TSAC), 塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC)}界面活性剤の単独, 2種の界面活性剤の組み合わせとして, 非イオン性{TritonX-100, Tween20}, 陽イオン性{TSAC, CTAC}界面活性剤を検討したところ, Table5-2 に見られるように, 非イオン性界面活性剤と陽イオン性界面活性剤を組み合わせるとき有効であり, 今回は, その中でも最も安定性の面で優れている Tween20 溶液と CTAC 溶液を, 1:4 の割合で混合した 1.0%溶液を, 全量 10 ml に対して 1.5ml 用いることとした.

Zr(IV)一定量( $4.0 \times 10^{-5}M$ )における XO 濃度の  $\Delta A$  への影響を検討したところ, Fig.5-4 に示すように, 全量 10ml に対し  $1.0 \times 10^{-3}M$  XO 溶液を 0.4ml 加えるとき, 最大の  $\Delta A$  値を示したので, 最終的に  $1.0 \times 10^{-3}M$  XO 溶液を 0.4ml 加えることにした.

XO 一定量( $4.0 \times 10^{-5}M$ )に対する Zr(IV)濃度の影響を検討したところ, Fig.5-5 に示すように, 全量 10ml に対し  $1.0 \times 10^{-3}M$  Zr(IV)溶液を 0.4ml 加えるとき, 最大の  $\Delta A$  値を示したので, XO:Zr(IV)=1:1 となる 0.4ml を加えることにした.

{XO-Zr(IV)}溶液と {HSA-XO-Zr(IV)}溶液の加温温度と加温時間の条件について検討したところ, Fig.5-6 に示すように, 40°Cにおいて 10 分反応させるとき最も良好であり, その  $\Delta A$  は Fig.5-7 に示すように, 整置後 60 分までほぼ一定であることを認めたので, 40°Cで 10 分静置し, 5 分冷後の  $\Delta A$  を測定することにした.

試薬の添加順序の相違による呈色体生成への影響を検討した. その結果, Table5-3 に見られるように, HSA 溶液を最初に, XO を最後に, すなわち HSA 溶液→界面活性剤(Surf)→緩衝液(Buffer)→Zr(IV)→XO の順序に従って試薬を添加するとき, 最も吸光度差が大きいことを認めた.

Table 5-1 Effect of dyes and metal ions for the reaction with HSA

Metal ions	XO	MTB	PV
Zr(IV)	0.536	0.000	-0.004
Ga(III)	0.288	0.000	0.003
Ti(IV)	0.325	0.000	0.000
Ta(V)	0.077	-0.053	-0.006
Pd(II)	-0.050	0.000	0.000
Nb(V)	-0.045	-0.046	-0.016
Mn(II)	0.000	0.002	0.000
Co(II)	0.000	0.012	0.000
Rh(III)	0.000	0.000	0.000
Cu(II)	0.000	0.000	0.000

HSA : 5 $\mu$ g/10ml ; Metal ion : 4.0 $\times 10^{-5}$ M ; Dye : 4.0 $\times 10^{-5}$ M ; Surfactant : 0.15% ; pH : 2.5 ;

Reference : {XO-dye} solution.

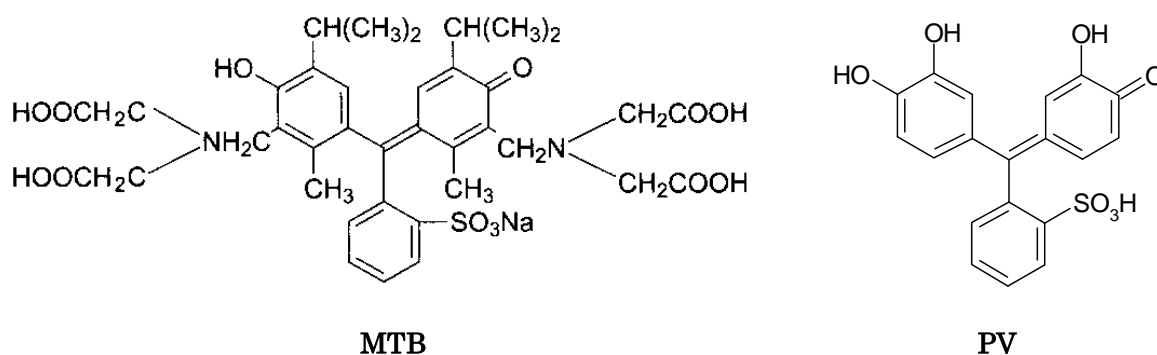


Fig.5-2 Structure of MTB and PV

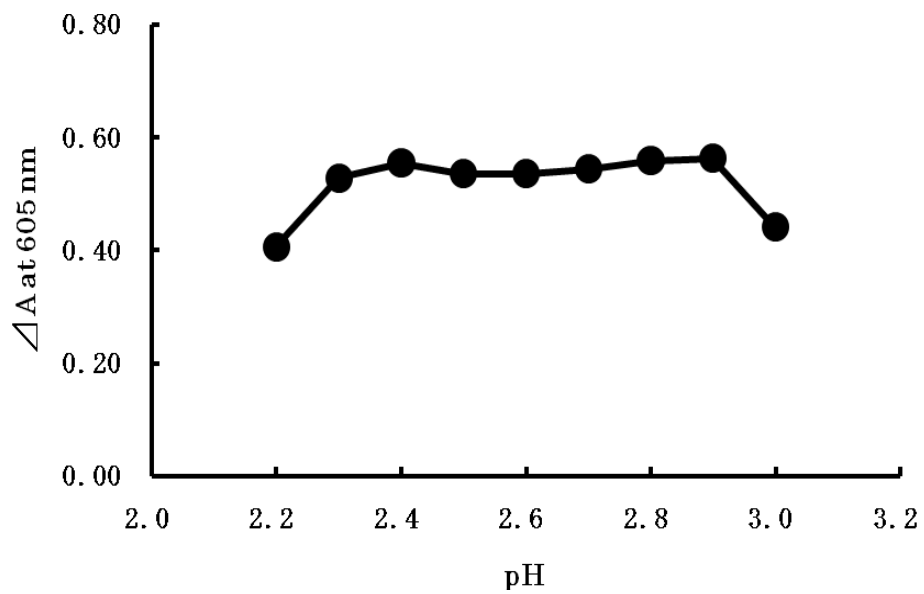


Fig.5-3 Effect of pH

HSA :  $5\mu\text{g}/10\text{ml}$  ; Zr(IV) :  $4.0 \times 10^{-5}\text{M}$  ; XO :  $4.0 \times 10^{-5}\text{M}$  ; Surfactant : 0.15% ; Reference : water.



Table 5-2 Effect of surfactants

Surfactant	$\Delta A$ at $\lambda_{\max}$
PVP	0.253
Triton X-405	0.132
Triton X-100	0.196
Brij 741	0.134
Brij 78	0.151
Brij 58	0.107
Brij 35	0.220
Tween 80	0.129
Tween 20	0.119
SDS	0.045
Zephiramine	0.099
CPC	0.333
TSAC	0.429
CTAC	0.461
Tween 20+TSAC(1:1)	0.473
Tween 20+CTAC(1:4)	0.536
Tween 20+CTAC(1:3)	0.493
Tween 20+CTAC(1:1)	0.515
Triton X-100+TSAC(1:1)	0.473
Triton X-100+CTAC(1:1)	0.507

HSA : 5 $\mu$ g/10ml ; Zr(IV) : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; XO : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ;

Reference : water.

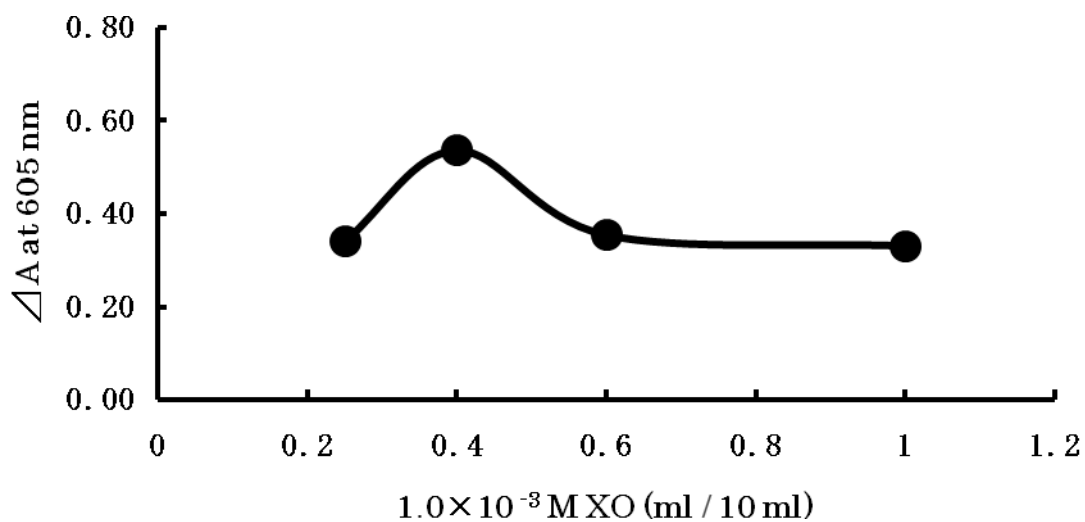


Fig.5-4 Effect of XO concentrations

HSA :  $5\mu\text{g}/10\text{ml}$  ; Zr(IV) :  $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ; Reference : reagent blank solution.

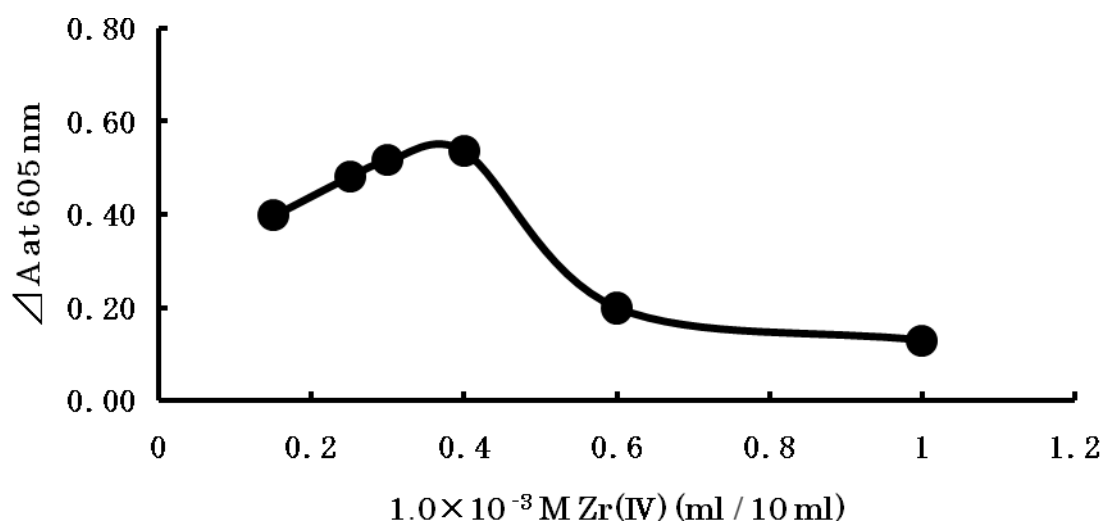


Fig.5-5 Effect of Zr(IV) concentrations

HSA :  $5\mu\text{g}/10\text{ml}$  ; XO :  $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ; Reference : water.

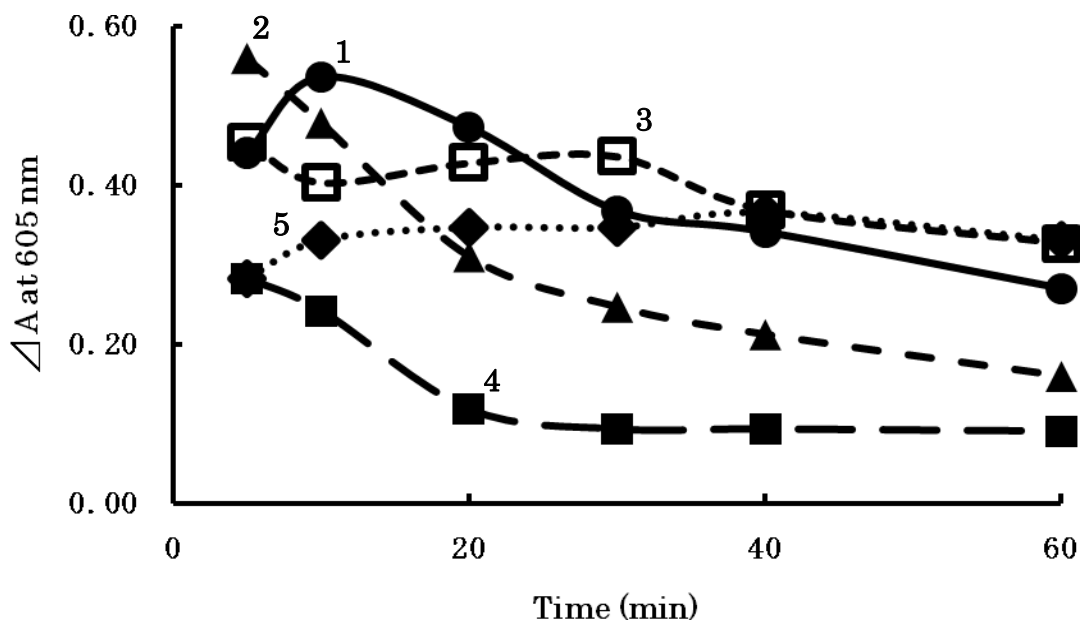


Fig.5-6 Effect of Heating temperatures and Incubation times

HSA : 5 $\mu$ g/10ml ; Zr(IV) : 4.0 $\times 10^{-5}$ M ; XO : 4.0 $\times 10^{-5}$ M ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ;

Reference : water.

Curve 1(●) : 40°C ; Curve 2(▲) : 50°C ; Curve 3(□) : 30°C ; Curve 4(■) : 60°C ;

Curve 5(◆) : Room Temperature(25°C)

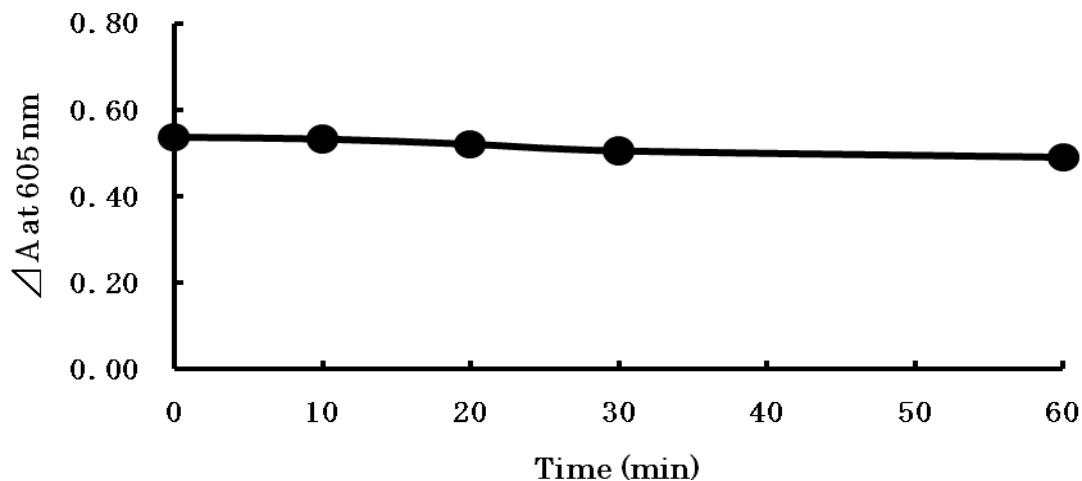


Fig.5-7 Stability after allowed to stand at room temperature

HSA : 5 $\mu$ g/10ml ; Zr(IV) : 4.0 $\times 10^{-5}$ M ; XO : 4.0 $\times 10^{-5}$ M ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ; Reference : water.

Table 5-3 Effect of the addition order of reagents

The addition order of reagents	$\Delta A$ at 605 nm
HSA→Surf→Buffer→Zr→XO	0.536
HSA→Surf→Zr→Buffer→XO	0.522
HSA→Buffer→Zr→Surf→XO	0.504
HSA→Zr→Surf→Buffer→XO	0.502
Surf→Buffer→HSA→Zr→XO	0.497
Zr→Surf→Buffer→HSA→XO	0.448
Zr→HSA→Surf→Buffer→XO	0.447
HSA→Buffer→Surf→Zr→XO	0.439
Surf→Buffer→Zr→HSA→XO	0.416
XO→Surf→Buffer→HSA→Zr	0.397
HSA→Surf→Buffer→XO→Zr	0.389
Surf→Buffer→HSA→XO→Zr	0.363
XO→Surf→Buffer→Zr→HSA	0.054
Zr→Surf→Buffer→XO→HSA	-0.023

HSA : 5 $\mu$ g/10ml ; Zr(IV) : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; XO : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ; Reference : water.

### 3-2 吸収スペクトル

基礎的定量条件の検討の結果, {HSA-XO-Zr(IV)}溶液と{XO-Zr(IV)}溶液の吸収スペクトルを測定したところ, Fig.5-8 に示すように, 明瞭な呈色差が認められ, 605nm 付近での $\Delta A$ が最大で, HSA 濃度に比例するので, 以下の定量操作 605nm を用いることにした. 尚, XO 溶液と{XO-HSA(100  $\mu$ g)}溶液の吸収スペクトルの相違は全くないことを認めた.

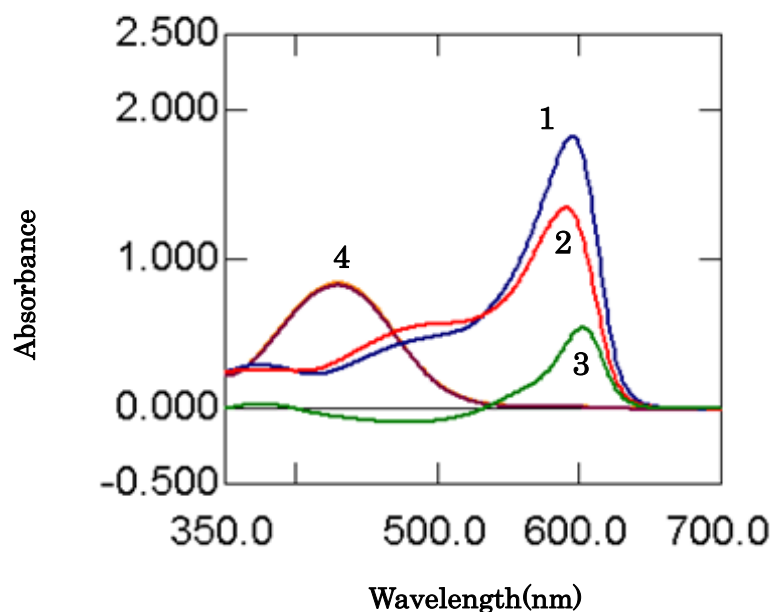


Fig.5-8 Absorption spectra obtained by the standard procedure

HSA : 5 $\mu$ g/10ml ; Zr(IV) : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; XO : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ; Reference : water.  
 Curve 1 : XO-Zr(IV) solution ; Curve 2 : HSA-XO-Zr(IV) solution ; Curve 3 : Curve 1 minus Curve 2 ;  
 Curve 4 : XO and XO-HSA(100  $\mu$ g) solution.

### 3-3 検量線の作成

2-2 の標準定量操作に従って HSA の検量線を作成したところ、Fig.5-9 に示すように、1.0～9.0 $\mu$ g/10ml HSA 濃度範囲において原点を通る良好な直線を得ることができた。定量感度は、Table5-4 に示すように、PR 法<sup>85)</sup>の約 50 倍、CBB 法<sup>86)</sup>の約 100 倍と高感度で、より低濃度の HSA を正確に定量できることを認めた。さらに、HSA5 $\mu$ g/10ml での 6 回繰り返し操作における相対標準偏差(RSD)は、3.46%であり、再現性にも優れていた。また、 $\gamma$ -G や、トランスフェリン、 $\beta_2$ -ミクログロブリンのようなタンパク質についても同様に HSA 標準定量操作を適用してみたが、いずれのタンパク質についても、全く反応を示さないことを認めた。

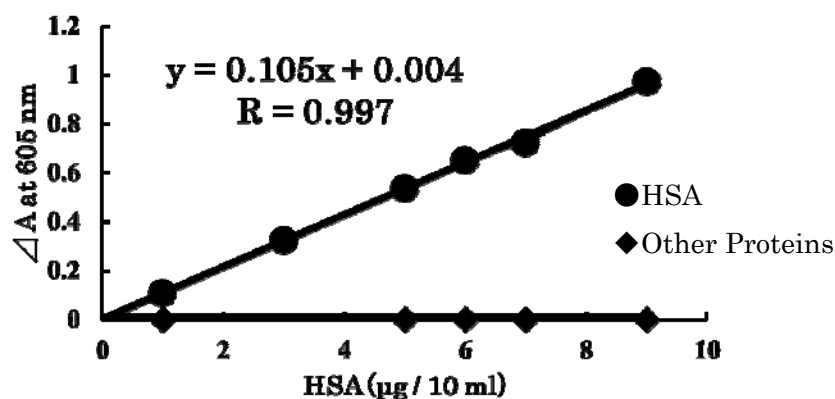


Fig.5-9 Calibration curve for HSA

Table 5-4 Calibration ranges and sensitivities of various methods

Method	Calibration range (µg / 10 ml)	Sensitivity <sup>*)</sup>
CBB method	50 - 700	0.005
PR method	20 - 400	0.010
This method	1 - 9	0.536

<sup>\*)</sup>Absorbance corresponding to 5µg/10ml of HSA

### 3-4 各種タンパク質の反応性

尿には多くのタンパク質が共存しており<sup>87)</sup>、個々のタンパク質によって疾患部位との関連性が異なるため、本法におけるそれらのタンパク質との反応性の相違を検討することは、临床上非常に重要である。γ-G、ヘモグロビン、ミオグロビン、トランスフェリンなどのタンパク質のほか、糖尿病の血糖コントロール指標であるグリコアルブミンあるいは、近年、糸球体濾過量(GFR)にかかわる新たな指標として注目されているシスタチン C<sup>88)</sup>などについても、その反応性を検討した。その結果、本法はPR法と比較して、ヘモグロビンは約1/20倍以下、α<sub>1</sub>-酸性糖タンパクは約1/10倍以下の感度を示し、多量投与によってもΔAの変化はなかった。また、検討した他のタンパク質では全く反応が見られず、アルブミンにのみ特異性が見られることが考えられたが、今後より詳細について検討する必要がある。他のタンパク質の感度をその分子量、等電点とともにTable5-5に示す。

Table 5-5 Reaction between several proteins and XO-metal complex

Protein <sup>1)</sup>	This method (%) <sup>2)</sup>	PR method (%) <sup>2)</sup>	Molecular weight	pI <sup>3)</sup>
HSA	100	100	$6.9 \times 10^4$	4.8
$\gamma$ -G	0	61	$1.5 \times 10^5$	5.8~7.2
Hemoglobin	5	38	$6.5 \times 10^4$	6.8
Myoglobin	0	53	$1.7 \times 10^4$	6.8
$\beta_2$ -Microglobulin	0	137.2	$1.2 \times 10^4$	
Transferrin	0	115	$7.5 \times 10^4$	
Fibrinogen	0	6	$4.0 \times 10^5$	5.5
$\alpha_1$ -Acid Glycoprotein	10	35	$4.4 \times 10^4$	2.7
Albumin, glycated human	0	95.7		
$\alpha_1$ -Antitrypsin	0	28	$5.1 \times 10^4$	
Lysozyme	0		$1.4 \times 10^4$	11.1
Cystatin C	0	77.7	$1.3 \times 10^4$	9.3
Tamm-Horsfall Glycoprotein	0	41.5	$7.0 \times 10^6$	
$\alpha_1$ -Microglobulin	0		$3.0 \times 10^4$	

1) Uncorrected. 2) Percent with respect to HSA. 3) Isoelectric point.

### 3-5 共存物質の影響

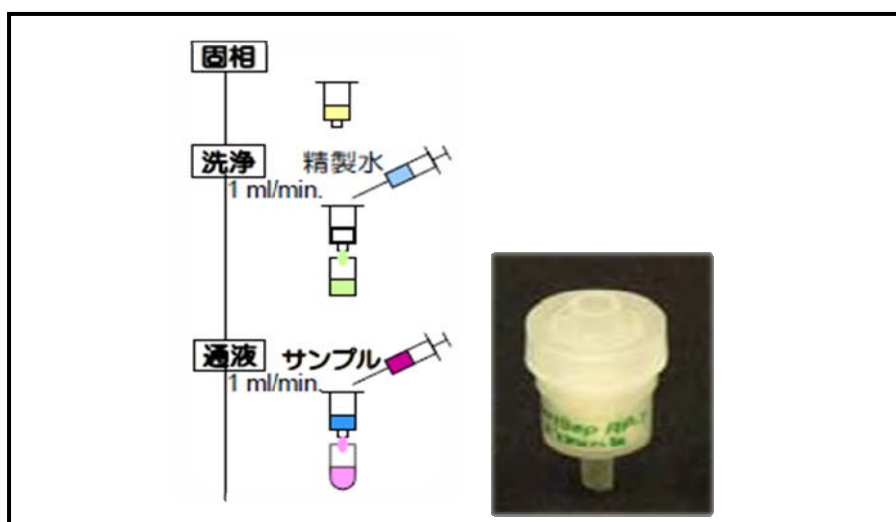
本 HSA 定量法における共存物質の影響を、HSA5 $\mu$ g/10ml を用いて検討した。その結果、金属イオン及び無機陰イオンのうち、銅(II)、鉄(II)、カルシウム(II)、モリブデン(VI)、コバルト(II)、亜鉛(II)、ランタン(III)や、生体中や尿中に存在する塩化ナトリウム、シュウ酸、グルコース、グリシン、クレアチニン、尿酸、尿素、ビリルビンなどの物質はほとんど影響しないことが認められた。一方、チタン(IV)、鉄(III)共存はわずかに負の誤差を示し、ニッケル(II)、アルミニウム(III)共存下においてわずかに正の誤差を示したが、尿を実試料とする場合、それほど問題となる量ではないと考えられる。また、アスコルビン酸、チアミン、カフェイン、あるいはその他の物質の共存も、ほとんど影響しないことが認められた。しかしながら、リン酸イオンの共存は、低濃度においても影響するため、その除去方法について検討したところ、前処理として、Fig.5-10 に示す陰イオン交換樹脂の Meta CEP IC-MA(ジーエルサイエンス製)を用いるとき、その影響を取り除くことができた。以上の結果を一括して Table5-6 に示す。



Table 5-6 Effect of foreign substances

Substance	$\mu\text{g} / \text{ml}$	$\Delta A$ at 605 nm	Recovery (%)
None	—	0.536	100.0
Cu(II), chloride	1.0	0.536	100.0
Fe(II), sulfate	2.8	0.536	100.0
Ca(II), nitrate	2.4	0.536	100.0
Ti(IV), sulfate	$4.8 \times 10^{-2}$	0.487	90.9
Mo(VI), nitrate	$9.6 \times 10^{-1}$	0.536	100.0
Fe(III), nitrate	$5.6 \times 10^{-2}$	0.479	89.4
Co(II), nitrate	$5.9 \times 10^{-1}$	0.536	100.0
Ni(II), nitrate	$5.9 \times 10^{-2}$	0.581	108.4
Zn(II), nitrate	6.5	0.536	100.0
Al(III), nitrate	$2.7 \times 10^{-2}$	0.580	108.2
La(III), nitrate	$1.4 \times 10^{-1}$	0.536	100.0
NaCl	$3.0 \times 10^2$	0.536	100.0
Oxalic acid	$9.0 \times 10^{-2}$	0.536	100.0
Ascorbic acid	$2.5 \times 10$	0.536	100.0
Glucose	$9.0 \times 10^2$	0.536	100.0
Glycine	$7.5 \times 10$	0.536	100.0
Creatinine	$1.5 \times 10^2$	0.536	100.0
Uric acid	$1.7 \times 10$	0.536	100.0
Urea	$3.0 \times 10^3$	0.536	100.0
Thiamine nitrate	3.3	0.536	100.0
Caffeine	$2.1 \times 10$	0.536	100.0
Bilirubin	1.0	0.536	100.0

HSA :  $5\mu\text{g}/10\text{ml}$  ; Zr(IV) :  $4.0 \times 10^{-5}\text{M}$  ; XO :  $4.0 \times 10^{-5}\text{M}$  ; Surfactant : 0.15% ; pH2.5 ; Reference : water.



(陰イオン交換樹脂 Meta CEP IC-MA ジーエルサイエンス製)

Fig.5-10

### 3-6 各種アルブミンの反応性

従来の{色素-金属}錯体を用いる方法では、動物種によって、アルブミンに対する反応が異なることが知られているが<sup>82)</sup>、本法における動物種別アルブミンとの反応性についても検討した。Fig.5-11 に示すように、ウサギ(Albumin,from rabbit serum), 羊(Albumin,from sheep serum), 山羊(Albumin,from goat), ネズミ(Albumin,from rat serum), 鶏卵(Albumin,from chicken Egg), ウシ(Albumin,from bovine serum)について検討したところ、HSA とは感度において差はあるものの、いずれのアルブミンも、5.0~300 $\mu$ g/10ml の濃度範囲において原点を通る良好な検量線を得ることができた。

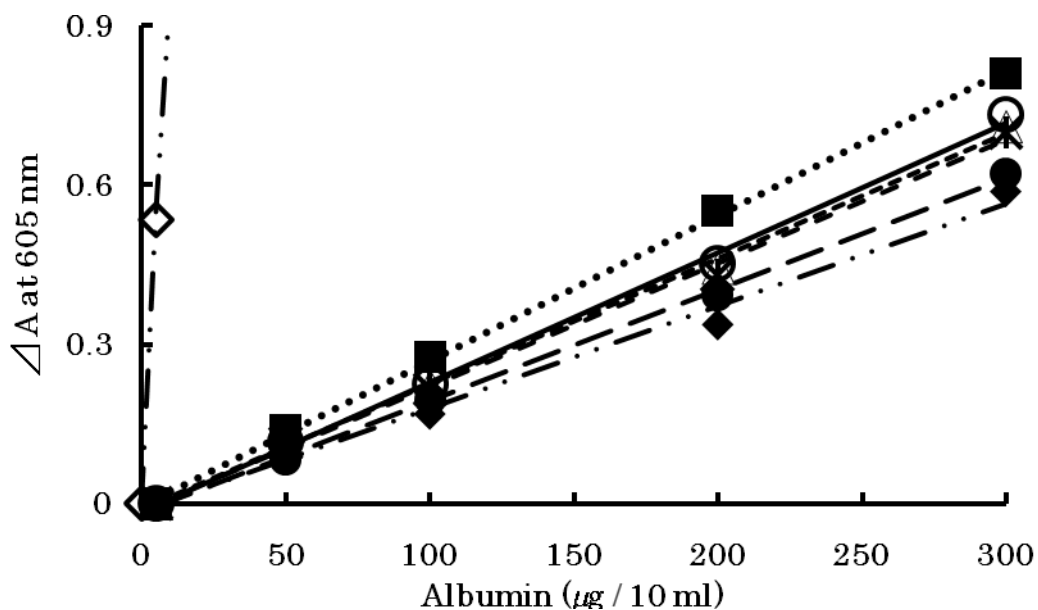


Fig.5-11 Calibration curve of Albumin Derived from the Different Animal Species  
 Zr(IV) :  $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$  ; XO :  $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$  ; Surfactant : 0.15% ; pH : 2.5 ; Reference : water.  
 Curve ◇ : human serum albumin ; Curve ■ : albmin from rabbit ; Curve ○ : albmin from sheep ; Curve  
 △ : albmin from goat ; Curve \* : albmin from rat ; Curve ● : albmin from chicken egg ; Curve ◆ : albmin  
 from bovine

### 3-7 組成比の検討

本呈色錯体における XO : Zr(IV)の組成比について、モル比法、連続変化法で検討したところ、HSA 共存下、非共存下に関わらず XO : Zr(IV)=1 : 1 の結果が得られた。モル比法による結果を Fig.5-12 に、連続変化法による結果を Fig.5-13 に示す。

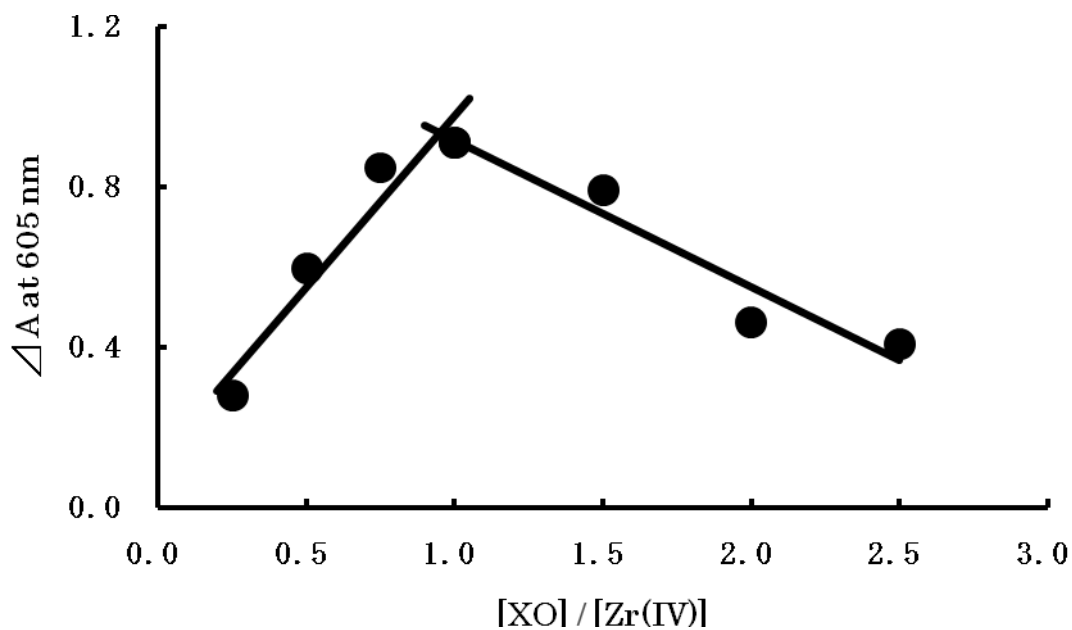


Fig.5-12 The Molar Ratio Method in the absence of HSA

Zr(IV) :  $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$  ; XO :  $2.0 \times 10^{-4} \text{M} \times \text{Xml}/10\text{ml}$  ; Surfactant : 0.15% ; pH : 2.5 ; Reference : XO solution.

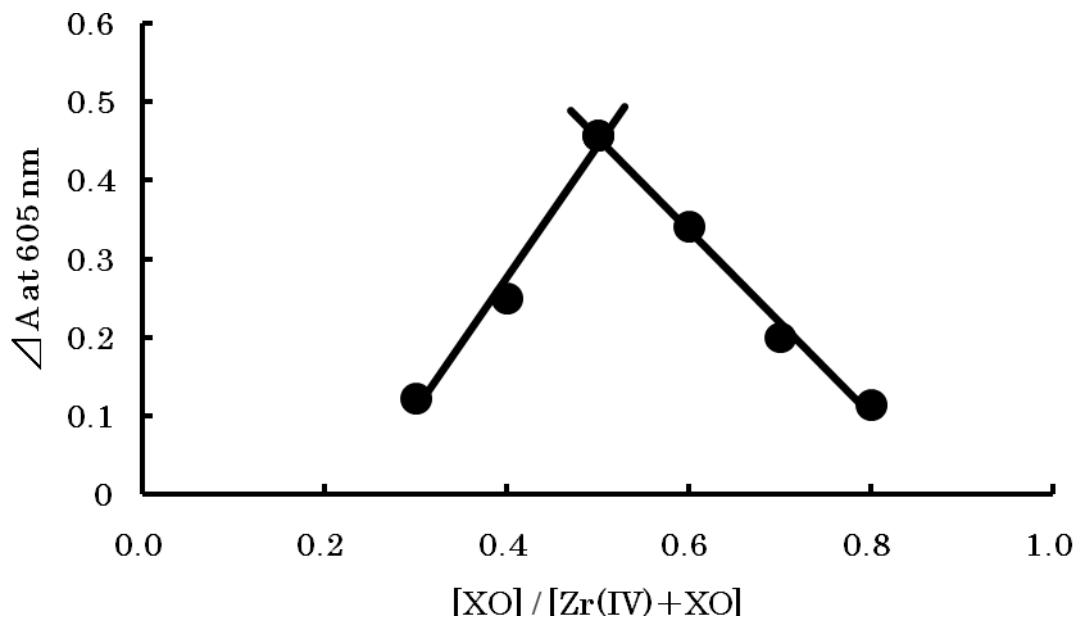


Fig.5-13 The continuous variation method in the presence of HSA

HSA :  $5 \mu\text{g}/10\text{ml}$  ; [ Zr(IV)+XO ] :  $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$  ; Surfactant : 0.15% ; pH : 2.5 ; Reference : water.

### 3-8 ヒト尿タンパク質測定への応用と PR 法との比較

ヒト尿試料を用いて、本法と PR 法(和光純薬株式会社製, 総タンパク質定量用キット Micro TP-Test Wako を使用)の分析結果及び相関を比較検討した. 尿は, 健康人の中間尿を前処理なしで採取し, PR 法ではそのまま, 本法では 20 倍希釈したものを試料とした. 回帰直線は, 最小二乗法を用いて作成した. その結果, Fig.5-14 に示すように, 尿に対する本法と PR 法との間には, 相関係数  $r=0.844$  を示し, 比較的良好な相関性があることを認めた.

また, 本法により得られた平均値( $\bar{y} = 34.3$ )は PR 法により得られた平均値( $\bar{x} = 44.9$ )より低かった. これは, 本法がアルブミンのみと反応し, 他のタンパク質との反応性が極めて低いことを反映していることが原因と考えられるが, 詳細についてはさらに精査する必要がある.

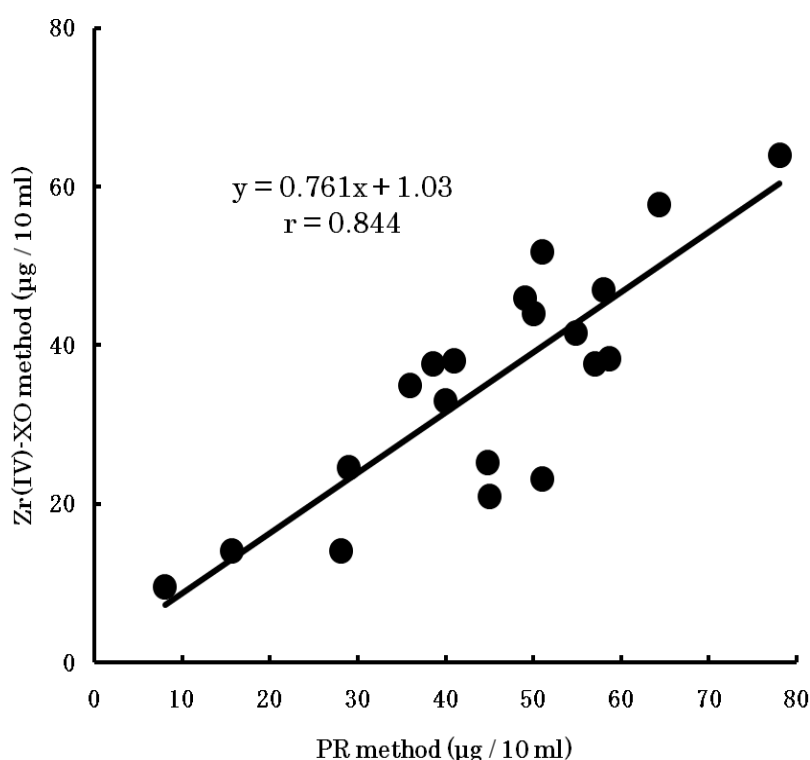


Fig.5-14 Correlation between results for urinary protein assays, as obtained by the PR method(X) and the present method(Y).

### 3-9 アルブミン結合サイトと Zr(IV)の親和性

ヒト以外の他の動物種アルブミンとの反応性を検討したところ, Fig.5-11 に示すように, 他の動物種では, 著しく定量感度が劣ることが認められた. この結果から, 動物種によるアルブミンの構造の違いが関与しているものと考え, 様々な角度から検討を加えた.

アルブミンは, 種間で 70%~80%のアミノ酸一次配列の相同性があり, 分光学的, 熱力学的には若干違いはあるが, かなり類似していることが知られており, 各動物のアルブミン分子上にはヒトと同様, 特異的な薬物結合サイトが存在している. 一方, ウシ, ウサギ及びラットアルブミ

ン分子上にはサイトⅡのうち、ジアゼパム結合サイトが欠落していることが報告されており<sup>89)</sup>、本法での定量感度の相違がサイトⅡに起因する可能性を考え、今回、サイトⅠに親和性を持つフロセミド、フェニルブタゾン、サイトⅡに親和性を示すジアゼパム、イブプロフェン、また、サイトⅢに親和性を示すジギトキシンを用いて、それら薬物の XO-Zr(IV)呈色体への影響を調べた。その結果を Table5-7 に示すが、初めの予想とは相違して、Zr(IV)がサイトⅢと親和性を示す可能性が示唆された。

Table 5-7 Effect of Drug

Albumin Binding Site	Drug	Recovery(%)
Ⅰ (ワルファリンサイト)	フロセミド	99.1
	フェニルブタゾン	100.0
Ⅱ (ジアゼパムサイト)	ジアゼパム	100.0
	イブプロフェン	100.0
Ⅲ (ジギトキシンサイト)	ジギトキシン	85.7

HSA : 10 $\mu$ g/10ml ; Drugs : 1.0 $\times$ 10<sup>-3</sup>M ; Zr(IV) : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; XO : 4.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ; Surfactant : 0.15 % ; pH : 2.5 ; Reference : water.

#### 4. 結 語

界面活性剤共存下での酸性域において、色素として XO、金属イオンとして Zr(IV)を用いる、XO-Zr(IV)錯体の退色を利用する尿微量アルブミンの簡便、高感度な吸光度定量法を開発することができた。本法の感度は、PR 法をはじめ従来の尿タンパク質定量法の 50 倍以上を示し、また、(1)アルブミンのみに反応を示す、(2)非常に微量の濃度範囲を正確に定量できる、(3)反応時間が短い、(4)共存物質の影響が少ない、などの利点を有している。

本法を実試料中の尿タンパク質測定に応用したところ、PR 法(和光純薬株式会社製、総タンパク質定量用キット Micro TP-Test Wako を使用)と本法との相関係数  $r=0.844(n=20)$ 、回帰式  $Y=0.761X+1.03$  と、良好な回帰直線と相関関係が認められ、実用的な尿微量アルブミン定量法として十分適用可能であることを認めた。次に、各種動物アルブミンを用いた際の定量感度の相違から、アルブミン結合サイトに注目し、本反応機構について検討を行ったところ、ジギトキシンを共存させた場合のみ、吸光度差の減少が認められ、本反応が、Zr(IV)がジギトキシンサイト(サイトⅢ)に親和性を示す反応である可能性が推測された。

## 第三部 結論

本研究では、呈色反応及び蛍光反応両面からの追跡が可能な特性を有するキサンテン系、その類似体であるトリフェニルメタン系のような機能性に富む色素を選択し、呈色反応あるいは蛍光反応より、病態関連物質のスペルミン、医薬品、尿酸、タンパク質（ヒストン、アルブミン）の新規測定法を検討した。その結果を、(1)色素-金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法、(2)色素-金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法に分類し、以下に列挙する。

### (1)色素-金属錯体との三元錯体生成反応を利用する分析法

#### (1-1)*o*-ヒドロキシヒドロキノンフタレインとマンガン(II)を用いるスペルミン及び関連化合物の吸光光度定量

弱塩基性下で、非イオン性界面活性剤の Tween40 共存下、QP と Mn(II)を用いることにより、測定波長 555nm で 0.2~1.5 $\mu$ g/ml 濃度範囲の Spm を、定量感度  $\epsilon=1.4\times 10^5$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> の高感度で吸光光度定量することができた。本操作法における RSD は 0.50%(n=10)であり、再現性にも優れていることを認めた。本呈色体の組成を連続変化法及びモル比法で求めたところ、Mn(II):QP:Spm=1:2:2 という結果が得られた。また、Spm と AcSpm が共存する場合、前処理としてアルカリ加水分解することにより、Spm とほぼ同感度で AcSpm を定量することができるので、Spm と AcSpm の総含量とそれぞれ個々の含量を算出することが可能であることが示唆された。更に、本呈色反応の FIA への適用を検討したところ、測定波長 555nm で、2~20pg/ $\mu$ l 濃度範囲の Spm を定量することができた。約 5 分間で 4 回試料溶液を注入することが可能であり、Spm の迅速分析法としても極めて優れていることを認めた。

#### (1-2)薬物とアルミニウム(III)との錯生成判定のための簡易スクリーニング法

CAS 法と ERY 法により、50 種の薬物と Al(III)との錯生成反応について検討した。両法とも薬物と同モル濃度の鉄(III),銅(II),カルシウム(II),クエン酸イオンなどの共存の影響は全く見られなかった。グレード A と B を陽性とした場合、CAS 法の場合、50 種中 20 種が、ERY 法を用いた場合では 50 種中 12 種で陽性と判定された。また、両法で陽性と判断されたのは 11 種であった。このうち、医薬品添付文書中、アルミニウムと相互作用し、併用が注意されている薬物はオフロキサシンとミノサイクリンの 2 種のみであった。陽性と判断された薬物の構造の類似性を検索すると、互いに近接するカルボキシル基、水酸基などの酸素原子含有官能基、あるいは酸素原子含有官能基とそれと近接するアミノ基などの窒素原子含有官能基を持つ薬物が多いことがわかった。すなわち Al(III)は、(O, O)配位または(O, N)配位によって薬物と錯生成しているものと考えられる。一方、ERY 法で陰性を呈し、CAS 法で陽性を示した薬物は、CAS と直接反応し、(薬物-CAS)型のイオン会合体を生成することにより CAS との色調差となってあらわれたものと推定された。従って、Al(III)と薬物との錯生成から考えると擬陽性と判断できるので、Al(III)との錯生成を推測する場合、CAS 法より ERY 法が優れていると判断できる。しかしながら、CAS 法の方がサンプルとブランクとの呈色差がより鮮明なこと、更には擬陽性薬物も多剤併用療法時や生体内のよう

な多成分反応系においては、{対象薬物-[Al(III)-他成分]}型の三元錯体が生成する可能性も十分考えられる。また、Dと判定された薬物の中には、色素と薬物のAl(III)に対する競合反応の結果、色素-Al(III)呈色錯体の退色を伴う薬物が含まれる可能性があるが、これについては今後検討する必要がある。

(1-3)3,4,5,6-テトラフルオロ-2-カルボキシフェニルフルオロンとマンガン(II)を用いるヒストンの蛍光光度定量とその特性

0.2M トリス-塩酸緩衝液とトリトン X-100 共存下、[Mn(II) - TFCPF - ヒストン]の錯体生成反応の結果、[Mn(II)-TFCPF]錯体の消光現象を利用することにより、ヒストンの簡便かつ高感度な蛍光光度定量法を構築することができた。本法はヒストン濃度 0.5~2.0 $\mu$ g/ml において定量可能である。また、共存物質の影響が極めて少なく、更に、各種タンパク質の反応性を比較するとき、ヒストンにかなり特異的で、生体中の微量のヒストンの分析法として十分適用できると考えられる。

## (2)色素-金属錯体との競合的生成反応を利用する分析法

(2-1)o-ヒドロキシヒドロキノンフタレインとパラジウム(II)を用いる尿酸の吸光光度定量

QP と Pd(II) と HTA を用いる尿酸の本定量法は、高感度( $\epsilon=6.5\times 10^5$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)であり、既存のキットを用いた方法との比較では測定値は良い一致を示し、感度、回収率ともに優れた結果を得ることができた。また、共存物質とくにアスコルビン酸の妨害を受け難いという点においても非常に優れている方法といえる。本法は、抽出操作を全く必要とせず実試料においても簡便高感度な尿酸の定量法であるといえる。

(2-2)キシレノールオレンジとジルコニウム(IV)を用いるアルブミンの吸光光度定量

界面活性剤共存下での酸性域において、色素として XO、金属イオンとして Zr(IV)を用いる、XO-Zr(IV)錯体の退色を利用する尿微量アルブミンの簡便、高感度な吸光光度定量法を開発することができた。本法の感度は、PR 法をはじめ従来の尿タンパク質定量法の 50 倍以上を示し、また、(1)アルブミンのみに反応を示す、(2)非常に微量の濃度範囲を正確に定量できる、(3)反応時間が短い、(4)共存物質の影響が少ない、などの利点を有している。本法を実試料中の尿タンパク質測定に応用したところ、PR 法(和光純薬株式会社製、総タンパク質定量用キット Micro TP-Test Wako を使用)と本法との相関係数  $r=0.844$ ( $n=20$ )、回帰式  $Y=0.761X+1.03$  と、良好な回帰直線と相関関係が認められ、実用的な尿微量アルブミン定量法として十分適用可能であることを認めた。次に、各種動物アルブミンを用いた際の定量感度の相違から、アルブミン結合サイトに注目し、本反応機構について検討を行ったところ、ジギトキシンを共存させた場合のみ、吸光度差の減少が認められ、本反応が、Zr(IV)がジギトキシンサイト(サイト III)に親和性を示す反応である可能性が推測された。

以上のように、三元錯体生成反応法あるいは競合的錯生成反応法により、従来法に比べ感度、選択性、簡便性の点で優れた実用的光分析法を、病態関連物質のスペルミン、医薬品、尿酸、タ



ンパク質（ヒストン，アルブミン）について開発することができた.

## 論文目録

本論文の内容は、以下の雑誌に公表した。

- 1) Spectrophotometric Determination of Spermine and Related Compounds Using *o*-Hydroxyhydroquinonephthalein and Manganese(II).  
Kanakano Miyachi, Kenzo Moriyama, Takako Yamaguchi, Hiroshi Tominaga, Shinichiro Kamino, and Yoshikazu Fujita, *Anal. Sci.*, **23**(9), 1103–1107(2007).
- 2) 薬物とアルミニウム(III)との錯生成判定のための簡易スクリーニング法.  
宮地加奈子, 中尾 昌弘, 黒川 央, 富田真由, 神野伸一郎, 森山健三, 山口敬子, 藤田芳一, *Yakugaku Zasshi*, **129**(12), 1551-1558 (2009).
- 3) Fluorophotometric Determination of Histone with 3,4,5,6-Tetrafluoro-2-carboxyphenylfluorone-Manganese(II) Complex and Its Characterization.  
Kanakano Miyachi, Mitsuru Hoshino, Hiroko Kadobayashi, Kenzo Moriyama, Mamiko Asano, Takako Yamaguchi, and Yoshikazu Fujita, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**(4), in press (2013).
- 4) Spectrophotometric Determination of Uric Acid Based on Fading of *o*-Hydroxyhydroquinonephthalein–Palladium(II)–Hexadecyltrimethylammonium Complex.  
Takako Yamaguchi, Kohei Hasegawa, Shinichiro Kamino, Kanakano Miyachi, Hiroshi Tominaga, and Yoshikazu Fujita, *Anal. Sci.*, **23**(2), 223 – 226 (2007).
- 5) Spectrophotometric Determination of Micro Amounts of Albumin Using Zirconium(IV) and Xylenol Orange.  
Kanakano Miyachi, Hisashi Kurokawa, Kenzo Moriyama, Shigefumi Morimoto, Katsuyoshi Tabuse, Mamiko Asano, Takako Yamaguchi, and Yoshikazu Fujita, *Chem. Lett.*, **41**(1), 58–59 (2012).

## 謝辞

本研究を進めるにあたり，終始ご懇篤なるご指導，ご鞭撻を賜りました，大阪薬科大学臨床化学研究室教授 藤田芳一先生に深謝なる意を表します。

また，本研究の機会を賜りました近畿大学医学部附属東洋医学研究所准教授 森山健三先生、ならびに近畿大学医学部附属病院薬剤部薬局長 山添譲先生に心より感謝いたします。

また，本研究を進めるにあたり，多岐にわたる有益なご助言，ご鞭撻を賜りました，大阪薬科大学臨床化学研究室 山口敬子 講師・博士，浅野麻美子 助手・博士，星野満 博士，神野伸一郎 博士，門林宏子 修士，中尾昌弘 修士，黒川央 修士に心より感謝の意を表します。

さらに，本研究の遂行にあたりご協力いただきました独立行政法人大阪南医療センター副院長 田伏克惇先生，ならびに同センター薬剤科(博士) 森本茂文先生に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 貝原益軒, “養生訓”, 1712 年; (伊藤友信 訳, 講談社, 東京, 1982 年).
- 2) 藤田芳一: *ぶんせき*, **2008**, 596 (2008).
- 3) Y.Fujita, I.Mori and S.Kitano, *Bunseki Kagaku*, **32**, E379(1983).
- 4) Y.Fujita, I.Mori, S.Kitano, H.Kawabe, and Y.Kamada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 1828(1984).
- 5) Y.Fujita, I.Mori, S.Kitano, H.Kawabe, and Y.Koshayama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 815 (1985).
- 6) Y.Fujita, I.Mori, K.Fujita, S.Kitano, and T.Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5385, (1985).
- 7) I.Mori I, Y.Fujita Y, H.Kawabe, K.Fujita, T.Tanaka, H.Kawabe, and A.Kishimoto, *Analyst(London)*, **111**, 1409 (1986).
- 8) Y.Fujita, I.Mori, K.Fujita K, Y.Nakahashi, and Tanaka T, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**(12), 5004(1987).
- 9) Y.Fujita, I.Mori, and M.Toyoda M, *Anal. Sci.*, **8**, 313 (1992).
- 10) 藤田芳一, 森 逸男, 豊田美奈子, 田口一彦, *分析化学*, **42**, T1 (1993).
- 11) Y.Fujita, I.Mori, and T.Matsuo, *Anal. Sci.*, **12**, 115(1996).
- 12) E.B.Sandell and H.Onishi, “Photometric Determination of Traces of Metals General Aspects”, John Wiley & Sons, New York, (1978).
- 13) 無機応用分析編集委員会, “無機応用分析 6”, 共立出版, 東京, 1979 年.
- 14) 五十嵐一衛, “神秘の生命物質—ポリアミン”, 共立出版, 東京(1993)
- 15) 永津俊治編, “生理活性アミンと生体防御(上・下)”, 共立出版, 東京(1981)
- 16) N.Seiler, *J.Chromatogr.*, **379**, 157(1986).
- 17) C.Molins-Legua, P.Campins-Falco, A.Sevillano-Cabeza, M.Pedron-Pons, *Analyst(London)*, **124**, 477(1999).
- 18) K.Maruta, R.Teradaira, N.Watanabe, T.Nagatsu, M.Asano, K.Yamamoto, T.Matsumoto, Y.Shionoya, K.Fujita, *Clin.Chem.*, **35**, 1694(1989).
- 19) K.Shinpo, K.Fujita, K.Maruta, R.Teradaira, T.Nagatsu, *Clin.Chim.Acta*, **131**, 143(1983).
- 20) N.Seiler, N.Frank, F.N.Bolkenius, B.Knodgen, *Biochem.J.*, **225**, 219(1985).
- 21) C.Loser, U.Wunderlich, U.R.Fosch, *J.Chromatogr.*, **430**, 249(1988).
- 22) T.Weiss, G.Bernhardt, A.Buschauer, K.W.Jauch, H.Zirngibl, *Anal.Biochem.*, **247**, 294(1997).
- 23) K.Fujiwara, H.Kanetake, K.Furukawa, Y.Masuyama, G.Bai, H.Tanimori, T.Kitagawa, *J.Biochem.*, **118**, 1211(1995).
- 24) M.D.Denton, H.S.Glazer, D.C.Zellner, F.G.Smith, *Clin.Chem.*, **19**, 904(1973).
- 25) M.Niitsu, K.Samejima, S.Matsuzaki, K.Hamana, *J.Chromatogr.*, **641**, 115(1993).
- 26) D.C.Weatherburn, *Aust.J.Chem.*, **36**, 433(1983).
- 27) L.Lomozik, R.Jastrzab, *J.Inorg.Biochem.*, **93**, 132(2003).
- 28) 古泉秀雄, 荒義明 編集, “飲食物と医薬品の相互作用”, 改訂 3 版, (株式会社薬業時報社)(1998).
- 29) 大西憲明 編集, “医薬品と飲食物・サプリメントの相互作用とマネージメント”, (有限会社フジメディカル出版) (2003).
- 30) 杉山正康 編集, “薬の相互作用としくみ”, 第 7 版, (医歯薬出版株式会社) (2005).
- 31) 砂金信義, 吉延悦子, 村上信子, 寺脇康文, 上村直樹, 宇留野強, *薬学雑誌*, **125**, 197(2005).
- 32) 藤田芳一, 森逸男, 北野尚子, *分析化学*, **32**, E379(1983).

- 33) Fujita Y., Mori I., Matsuo T., Hoshino M., Shigemura Y., Shimano M., *Anal. Sci.*, **17**, 853-857(2001).
- 34) 山崎智香子, 須崎菜穂子, 中尾昌弘, 神野伸一郎, 山口敬子, 藤田芳一, *分析化学*, **55**(9), 733-737(2006)
- 35) 山崎智香子, 臣永 宏, 三馬女久美, 磯野里絵, 神野伸一郎, 山口敬子, 藤田芳一, *分析化学*, **56**(10), 879-884 (2007)
- 36) Y Fjita, I Mori, S Kitano, Y Koshiyama, *Chem.Pharm.Bull.*, **33**, 242-248(1985).
- 37) M Nakao, C Ymazaki, H Tominaga, T Yamaguchi, Y Fujita, *Anal.Sci.*, **22**, 313-316(2006).
- 38) T Yamaguchi, M Nakao, R Nakahara, Y Nishioka, C Ikeda, Y Fujita, *Anal. Sci.*, **25**, 125-128(2009).
- 39) “Commentary on the Japanese Pharmacopoeia,” 15th ed., F-199, Hirokawa Shoten Ltd., Tokyo(2006).
- 40) 岩井浩一, 三田隆 編, “クロマチン”, 講談社, 東京(1979).
- 41) 大場義樹, “クロマチン”, 東京大学出版会, 東京(1986).
- 42) S. Budavari, M. J. O’Neil, A. Smith, E. Patricia Heckelman, “The Merck Index”, 11th ed., Merck & Co., Inc., Rahway, N.J., U.S.A. **4643** (1989).
- 43) “Methods in Enzymology **170** Nucleosomes”, ed. by P. M. Wassarman and R. D. Kornberg, Academic Press, Inc., San Diego, California(1989).
- 44) E. H. Nooij, H. G. K. Westenbrink, *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 608-609(1962).
- 45) 中尾光善, *細胞工学*, **20**, 342-349(2001).
- 46) 北林一生, *細胞工学*, **23**, 1134-1138(2004).
- 47) <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/IntroItems/ChromatinEducEng.html>.
- 48) P. Kurki, M. Gripenberg, P. Parlanen and T. Helve, *J. Clin. Pathol.*, **40**, 1475-1480(1987).
- 49) C. Geisler and M. Hoier-Madsen, *J. Immunol. Methods*, **80**, 211-219(1985).
- 50) T. Biswas, F. W. Miller, Y. Takagaki and P. H. Poltz, *J. Immunol. Methods*, **98**, 243-248(1987).
- 51) R. L. Rubin, “Manual of Clinical Laboratory Immunology”, 4th ed., ed. by N. R. Rose, et al, Am. Soc. Microbiol., Washington**108** (1992).
- 52) 芝紀代子, “蛋白尿の考え方”, 医学書院, 東京(1990).
- 53) 日本腎臓学会 編, “腎機能(GFR)・尿蛋白測定ガイドライン”, 東京医学社, 東京(2003).
- 54) 藤田芳一, 森逸男, 北野尚子, *分析化学*, **32**, E379-386(1983).
- 55) 藤田芳一, 森逸男, 豊田美奈子, *Anal. Sci.*, **8**, 313-316(1992).
- 56) 藤田芳一, *ICMR Annals*, **20**, 237-241(2000).
- 57) H Kadobayashi, T Nakamori, T Yamaguchi, and Y Fujita, *Chem.Lett.*, **33**, 610(2004).
- 58) S. Fujimori, *Diagnosis and Treatment*, **93**, 1445(2005).
- 59) H. Gomi and T. Hosoya, *Sogo Rinsho*, **55**, 1499(2005).
- 60) V. S. E. Dutt and H. A. Mottola, *Anal. Chem.*, **46**, 1777(1974).
- 61) S. Matsuo, C. Omiya, and M. Ota, *Eisei Kensa*, **21**, 1068(1972).
- 62) N. Kageyama, *Clin. Chim. Acta*, **31**, 421(1971).
- 63) H. Dubois, M. Dulcoux, and V. Greiling, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **27**, 151(1989).
- 64) E. Maehata and T. Irino, *Eisei Kensa*, **21**, 1080(1979).
- 65) Z. Wang, D. Zhang, Y. Zhang, and S. Zhou, *Anal. Lett.*, **35**, 1453(2002).

- 66) Z. Wang, Y. Wang, and G. Luo, *Analyst* [London], **127**, 1353(2002).
- 67) S. B. Khoo and F. Chen, *Anal. Chem.*, **74**, 5734(2002).
- 68) J.-S. Ye, W. D. Zhang, L. M. Gan, G. Q. Xu, and F.-S. Sheu, *Electroanalysis*, **21**, 1693(2003).
- 69) J. Wang, S. Yang, R. Cai, Z. Lin, and Z. Liu, *Talanta*, **65**, 799(2005).
- 70) J.-F. Jen, S.-L. Hsia, and K.-H. Liu, *Talanta*, **21**, 711(2002).
- 71) D. M. Amunson and M. Zhou, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **38**, 43(1999).
- 72) A. H. Palamakumbura and P. C. Trackman, *Anal. Biochem.*, **300**, 245(2002).
- 73) J. Galbán, Y. Andreu, M. J. Almenara, S. de Marcos, and J. R. Castillo, *Talanta*, **54**, 847(2001).
- 74) H. Kubo and A. Toriba, *Anal. Chim. Acta*, **353**, 345(1997).
- 75) D. J. Zhang, Y. M. Huang, and Z. J. Zhang, *Chin. J. Anal. Chem.*, **29**, 446(2001).
- 76) S. Han, E. Liu, and H. Li, *Anal. Sci.*, **21**, 111(2005).
- 77) A. K. Bhargava, H. Lal, and C. S. Pundir, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **39**, 125(1999).
- 78) M. Suzuki, M. Takayanagi, and T. Yashiro, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2745(1991).
- 79) 藤田芳一 : *ぶんせき*, **6**, 486(1997).
- 80) Y.Fujita, I.Mori and S.Kitano, *Bunseki Kagaku*, **32**, E379(1983).
- 81) W.D.Comper, T.M.Osicka, M Clark and R.J.MacIsaac, : *Kidney International*, **65**, 1850(2003).
- 82) Y.Fujita, I.Mori, M.Toyoda, K.Kato, M.Nakamura and T.Nakanishi, *Chem.Pharm.Bull.*, **38**, 956(1990).
- 83) Y.Fujita, I.Mori and M.Toyoda, *Anal.Sci.*, **7**, 771(1991).
- 84) I.Mori, *YAKUGAKU ZASSI*, **121**, 707(2001).
- 85) 藤田芳一 : *ぶんせき*, **6**, 320(2005).
- 86) F.B.Kingsbury and C.Clark, *J.Lab.Clin.Med.*, **11**, 981(1926).
- 87) 小田切玲子, *臨床検査*, **33**, 921(1989).
- 88) J.Kyhse-Andersen, C.Schmidt, G.Nordin, B.Andersson and P.Nilsson-Ehle, *Clin. Chem.*, **40**, 1921(1994).
- 89) M.Otagiri, *YAKUGAKU ZASSI*, **129**, 413(2009).