報 文

全反射蛍光 X 線分析法のための血液試料 サンプリング方法の検討

松岡代志子¹, 細川 好則², 日野 雅之³, 辻 幸一^{①1,4}

Study of the Sampling Method of Blood Samples for Total-Reflection X-ray Fluorescence

Yoshiko MATSUOKA¹, Yoshinori HOSOKAWA², Masayuki HINO³ and Kouichi TSUJI^{①1,4}

¹ Graduate School of Engineering, Osaka City University, 3-3-138, Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka-shi, Osaka 558-8585

² X-ray Precision, Inc., Goshokaido-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8585

³ Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3, Asahimachi, Abeno-ku, Osaka-shi, Osaka 545-8585

⁴ PRESTO-JST, 4-1-8, Honcho, Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012

(Received 14 March 2005, Accepted 21 June 2005)

We investigated the sampling method of blood samples for total-reflection x-ray fluorescence (TXRF) analysis. Three types of samples, such as whole blood, serum and blood plasma, were prepared. After these samples were diluted by Milli-Q water, they were allowed to fall in drops onto an acrylic flat substrate, which was used as a sample carrier for TXRF analysis. In the case of a whole blood sample, the detection limits of Fe and Cl were improved by adding Milli-Q water to the sample. We consider that the improvement of the detection limits resulted from destruction of the red blood cells. This suggests that whole blood diluted by Milli-Q water is a suitable sample-preparation method for TXRF analysis without a time-consuming procedure.

Keywords : TXRF; sampling methods; whole blood; destruction of the red blood cells.

1 緒 言

全反射蛍光 X 線分析 (TXRF) 法では X 線の全反射現象により 1 次 X 線の散乱を激減させることができる¹⁾。また試料基板表面から発生した蛍光 X 線は、試料の真上に取り付けた検出器で検出する配置となっているため、大きな立体角で検出される。よって微量元素分析が可能である。また、試料表面が平坦かつ均一であるほど散乱 X 線が発

生しにくいため表面分析も可能である²⁾³⁾。

このような特徴を有する TXRF 法は医療現場での血液中の金属元素分析法としてその応用が期待される。現在血液試料中に含まれる遷移金属元素は電気量滴定法や比色法、原子吸光法などにより分析されている⁴⁾。微量金属元素分析の主力となっている原子吸光法に注目してみると、多元素同時測定が困難、測定時間が数時間を有する、測定試料の体積が数 ml 程度必要という短所がある。このような欠点は TXRF 法の利点により克服することができると考えられる。既に TXRF 法の利点を生かして血液試料を測定した例が報告されている。例えば、A. Prange らは、全血及び血清中のリン、硫黄、カリウム、カルシウム、鉄、銅、亜鉛、セレン、ルビジウム、鉛について、硝酸中に溶かしマイクロウェーブで完全に溶解させた試料について

¹ 大阪市立大学大学院工学研究科: 558-8585 大阪府大阪市東住吉区杉本 3-3-138

² 株式会社エクスレプレジジョン: 606-8585 京都府京都市左京区松ヶ崎御所海道町

³ 大阪市立大学大学院医学研究科: 545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-4-3

⁴ PRESTO-JST: 332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8

TXRF法により定量分析を行い、重元素の濃度が0.02～0.08 mg/mlであるという結果を得ている⁵⁾。しかし、現在までの分析手法は、測定を行う前に強酸を加えてマイクロウェーブによるかくはん処理やキレート試薬による過剰に存在する金属元素の除去などの複雑な化学処理を必要としている。そのような複雑な処理を行わず TXRF法により迅速に血液試料を測定することができるサンプリング方法について検討した。具体的には Milli-Q 水による血液試料

の希釈効果について検討した。

2 実験方法

2.1 装置及び測定条件

装置図を Fig. 1 に示す。測定には市販されている卓上 TXRF 装置 (PicoTAX, RÖNTEC) を使用した。X 線源には Mo ターゲットを使用しており、モノクロメーター (Ni/C multilayer) により Mo K α 線のみを選択的に単色化して試料に照射している。X 線管は管電圧 50 kV、管電流 1000 μ A、測定時間 300 秒であり、大気圧下で測定を行った。検出器はエネルギー分散型検出器 (detection area 10 mm², <160 eV FMWH at 5.9 keV) を用いた。

2.2 試料作製方法

サンプリング方法の概要図を Fig. 2 に示す。採血した全血試料は時間の経過とともに凝固するため、抗凝固剤として EDTA-K (ethylenediaminetetra-acetate) を加えた。この全血試料から遠心分離機により血清と、1 時間程度放置することにより血しょうを得た。よって、試料としては血清、血しょう、全血試料を含む合計 3 種類を用意した。それぞれの試料に Milli-Q 水を加えて 2 倍に希釈したものと希釈していない原液を用意した。全血試料では希釈による検出限界の向上が観測されたため、希釈していない原液

Fig. 1 Schematic diagram of PicoTAX

Fig. 2 Sampling method of whole blood, serum and blood plasma

Fig. 3 Typical spectrum of the whole blood

Fig. 4 X-ray spectra of the whole blood with different diluted rate

Table 1 DL factors of Cl K α and Fe K α between the whole blood without dilution and that diluted by 2 times with Milli-Q water

Diluted rate α	DL factor of Cl K α ($\times 100$)	DL factor of Fe K α ($\times 100$)
1	0.885	0.209
2	0.464	0.123

と 2 倍に希釈した試料に加えて, 4, 8, 16 倍に希釈した試料を更に作製した. 希釈したそれぞれの試料はアクリル保持板上に 1 μ l を滴下, 乾燥した.

2.3 スペクトルの評価方法

サンプリング方法及び希釈効果は式(1)に示すように, 検出限界値 (detection limits) を用いて評価した³⁾.

$$DL = 3 \frac{C_s}{I_s} \sqrt{\frac{I_B}{t}} \quad (1)$$

C_s は試料中の元素濃度, I_s はシグナル強度, I_B はバックグラウンド強度, t は測定時間を表す. 今回は希釈の効果を表すために元素濃度 C_s を式(2)のように表した.

$$C_s = \frac{1}{\alpha} \times C \quad (2)$$

ここで, C は希釈していない原液試料中に含まれる元素濃度, α は希釈した試料の希釈倍率を表す. 希釈倍率 α とは, 希釈していない溶液の場合は $\alpha = 1$ を代入し, Milli-Q 水で 2 倍に希釈した時には $\alpha = 2$ を代入することで希釈した倍率を表すものである. よって, 式(1)は式

(3) のように表せる.

$$DL = \frac{3C}{\sqrt{t}} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{\sqrt{I_B}}{I_s} \quad (3)$$

ここで希釈していない試料中に含まれるある元素の濃度 C 及び測定時間 t は今回すべての測定条件で同じであるため, 式(3)において α , I_s , I_B から成る項についてそれぞれ算出し比較を行った. 以後, この項を検出限界値の評価値 (DL factor) と呼ぶ. 式(3)より検出限界値の評価値が小さいほど, 検出限界も小さくなることが分かる. したがって, より小さい検出限界値の評価値を与えるサンプリング方法ほど, 微量元素を検出するためのサンプリング方法として適していると考えた. 例として示した Fig. 3 の全血のスペクトルよりシグナルが重なっていない塩素と鉄に注目して, 検出限界値の評価値を算出した.

3 結果と考察

3.1 全血試料の測定結果

希釈していない原液と 2 倍に希釈した全血試料の検出限界値の評価値を Table 1 に示す. その結果, 2 倍に希釈した試料のほうが鉄, 塩素共に検出限界値の評価値が小さくなることが分かった.

そこで, 希釈倍率の範囲を 1, 2, 4, 8, 16 倍にして再度測定を行った. 1, 2, 4, 8, 16 倍に変化させたときのスペクトル形状変化を Fig. 4 に示す. その結果, 希釈倍率が 4 倍のときに最もスペクトル強度が大きくなることが分かった. 次に希釈した濃度の寄与を含んだ数値として検出限界値の評価値と希釈倍率の関係を Fig. 5 に示す. その結果, 8 倍に希釈するまで検出限界値の評価値は減少するという傾向が見られた. しかし, 16 倍に希釈すると検出限界値の評価値は大きくなるという傾向が見られた.

Fig. 5 Relationship between the diluted rates and DL factors (Fe K_{α} , Cl K_{α}). Sampling method is falling a drop of whole blood and drying in air

16 倍で検出限界値の評価値が大きくなる原因としては、Milli-Q 水によって過剰に希釈したため式(3)における各元素の蛍光 X 線強度 I_s が小さくなり相対的にバックグラウンド強度 I_B が大きくなるためと考えられる。一方、8 倍に希釈するまで検出限界値の評価値が低下した原因としては、全血試料に Milli-Q 水を加えることによる溶血が考えられる⁶⁾。一般に試料表面が平坦かつ均一でない場合、散乱 X 線が発生しやすくなりスペクトルのバックグラウンド強度が大きくなる。そのため TXRF 法により微量分析を行うときは試料表面を平坦かつ均一に作製する必要がある。本研究で使用した全血試料中には細胞膜に覆われた赤血球や白血球などの血球成分があり、その細胞膜内外ではイオン濃度に大きな差がある。赤血球は通常、数 μm から数十 μm 程度の大きさをもっているため、細胞どうしが積み重なっていると試料表面は凹凸のある状態であると考えられる。このような細胞を含んだ全血試料に Milli-Q 水を加えると、血球細胞内外の浸透圧の差により細胞が破壊される。このような現象を「溶血」という。この現象が起こることにより数 μm から数十 μm の大きさである赤血球が破壊され、試料表面が平坦になり検出限界値の評価値が向上したと考えられる。

3.2 血清の測定結果

希釈していない原液試料と 2 倍に希釈した血清試料の検出限界値の評価値を Table 2 に示す。その結果、2 倍に希釈した場合も希釈していない場合も検出限界値の評価値に大きな違いは見られなかった。

このように検出限界値の評価値に変化がなかった原因としては、血清中の赤血球が非常に少ないため Milli-Q 水を加えても赤血球が破壊される溶血は起こらないと考えられる。以上のことから血清試料では Milli-Q 水による検出限

Table 2 DL factors of Cl K_{α} and Fe K_{α} between the serum without dilution and that diluted by 2 times with Milli-Q water

Diluted rate α	DL factor of Cl K_{α} ($\times 100$)	DL factor of Fe K_{α} ($\times 100$)
1	0.264	20.09
2	0.206	25.86

Table 3 DL factor of Cl K_{α} and Fe K_{α} between the blood plasma without dilution and that diluted by 2 times with Milli-Q water

Diluted rate α	DL factor of Cl K_{α} ($\times 100$)	DL factor of Fe K_{α} ($\times 100$)
1	0.426	13.44
2	0.654	25.62

界値の評価値の向上は得られなかった。

3.3 血しょうの測定結果

希釈していない原液試料と 2 倍に希釈した血しょう試料の検出限界値の評価値を Table 3 に示す。血清及び血しょう試料において、Fe のシグナル強度が非常に小さいために、式(3)においては I_s が小さく I_B が大きくなり、結果として DL が非常に大きく評価された。この影響を考慮すると、2 倍に希釈した場合も希釈していない場合も検出限界値の評価値に有意な違いは認められなかった。

このように検出限界値の評価値に変化がなかった原因としては、血清と同様に血しょう中には赤血球が存在しないため Milli-Q 水を加えることによる溶血が起こらないと考えられる。以上のことから、血しょう試料では Milli-Q 水による検出限界値の評価値の向上は得られなかった。

4 結 言

TXRF 測定のためのサンプリング方法について検討した。通常血液成分を測定する際、遠心分離器を用いて血清を分離する作業や化学試薬による金属成分の濃縮作業を必要とする。しかし、サンプリング方法として Milli-Q 水で血液試料を希釈することにより、全血試料に関しては検出限界値の評価値が向上するという結果が得られた。血清、血しょう試料については全血試料のような検出限界値の評価値は向上しなかった。この違いは溶血現象が試料内で起こるかどうかによるものであると考えられる。このような血液試料のサンプリング方法を適用することにより、TXRF 法への応用が可能となると考えられる。

文 献

- 1) Y. Yoneda, T. Horiuchi: *Rev. Sci. Instrum.*, **42**, 1069 (1971).
- 2) R. Klockenkamper: “*Total-Reflection X-ray Fluorescence Analysis*”, p. 188 (1997), (John Wiley and Sons, New York).
- 3) 辻 幸一: “新訂版・表面科学の基礎と応用”, 日本表面科学会編, p. 709 (2004), (エヌティーエス).
- 4) 金井 泉, 金井正光: “臨床検査法提要”, p. 717 (1993), (金原出版).
- 5) A. Prange, H. Boddeker, W. Michaelis: *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **335**, 914 (1989).
- 6) 小杉隆一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏高: “岩波生物学辞典”, 第 4 版, p. 1428 (1996), (岩波書店).

要 旨

著者らは, 全反射蛍光 X 線分析法のための血液試料のサンプリング方法について検討した. 血清, 血しょう, 全血の 3 種類の試料を用意した. これらの試料は, Milli-Q 水により希釈した. それらの試料は滴下乾燥により試料基板に保持した. 全血試料では Milli-Q 水を加えることにより Fe K_{α} と Cl K_{α} の検出限界が向上した. これは溶血によると考えられる. 全血試料を Milli-Q 水により希釈することは検出限界を向上させるために有効であることが確認された.