技術論文

銅-フタロシアニン錯体の酸化分解反応を用いる微量 ヘモグロビンのマイクロプレート吸光光度定量

堀口 高英¹, 間 中 淳¹, 久保田俊夫¹, 五十嵐淑郎^{®1}

Spectrophotometric Multi-Sample Determination for Trace Amounts of Hemoglobin Using Microtiter Plate Based on the Oxidative Decomposition of the Copper(II)-Phthalocyanine Complex

Takahide HORIGUCHI¹, Atsushi MANAKA¹, Toshio KUBOTA¹ and Shukuro IGARASHI¹

¹ Department of Biomolecular Functional Engineering, Faculty of Engineering, Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi-shi, Ibaraki 316-8511

(Received 11 April 2005, Accepted 10 June 2005)

Spectrophotometric multi-sample determinations for small amounts of hemoglobin were performed using a 96-well microtiter plate based on an oxidative decomposition reaction of the copper(II)-phthalocyanine complex. As a result of examining the optimization of various conditions, the concentration of peroxomonosulfate as an oxidizing agent was 3.6×10^{-2} M, the pH was 2.0, and the concentration of sodium sulfate as a salt, which was contained in the pH buffer solution, was about 6.5×10^{-2} M. In the proposed method, the calibration range was 30–258 ng/ml. The detection limits (3σ) were 16.99 ng/ml, and the relative standard deviation for 96 samples was 3.64% at the midpoint of the calibration range. As a result of examining foreign substances, cobalt(II), iron(III) and albumin had some influence, but other metal ions and organic compounds did not have any effect. The proposed method was successfully applied to the detection of trace amounts of hemoglobin in human serum samples. Moreover, the hemoglobin analysis for 96 samples was possible to be simultaneously performed within about ten minutes, including not only the time spent for the quantitative operation, but also for the measurement time.

Keywords : 96-well microtiter plate; catalytic analysis; hemoglobin; copper(II)-phthalocyanine; oxidative decomposition reaction.

1 緒 言

ポリスチレン製マイクロタイタープレート（マイクロプレート）は、これまでエンザイムイムノアッセイ（EIA）^{1)~4)} の一種である酵素標識固相免疫測定（ELISA）法などの生体分析の分野で主に利用されてきた。最近では、化学分析の分野においても、マイクロプレートを用いた血清中微量金属及びタンパク質の比色分析法が牧野によって報告されている⁵⁾⁶⁾。しかし、通常用いられている 96

穴マイクロプレートでは、一つ一つのウェルに入る溶液体積が小さいため、従来の 1 cm 角セルを使用する吸光光度法と比較して、光路長に起因する感度の低下が問題である。また、吸光光度法の場合、モル吸光係数の大きな高感度比色試薬、例えば、ポルフィリン^{7)~11)}などの分子設計による高感度化には限界がある。そこで、本研究ではマイクロプレートウェル内での接触分析法の開発を試みた。接触分析法^{12)~15)}は、触媒が循環再生し指示反応に関与するため、通常の平衡論的な反応系を用いるよりも更に高い感度で触媒の計測ができる方法である。その一方で、この計測法は、触媒作用という動的な過程に着目しているので、

¹ 茨城大学工学部生体分子機能工学科: 316-8511 茨城県日立市中成沢町 4-12-1

Fig. 1 Scheme for oxidative decomposition reaction of Cu-PTS with KHSO_5

本質的に時間の因子に強く影響を受けるという欠点を有している。また、温度の変動にも大きな影響を受けるなど、改善すべき余地を残している。一方、著者らは、これまでに、パッチ法による銅-フタロシアニン錯体の酸化分解反応が示すL字型吸光度-時間曲線を用いる計測法を報告した^{16)~18)}。この反応におけるヘモグロビンを含んだサンプルと空試験との吸光度差-時間曲線は特徴的なL字型を示すため、一定時間後は、時間による吸光度差の変動が少ない。したがって、一定時間後からは時間の制約なしに触媒の濃度を計測することができる。本研究では、銅-フタロシアニン錯体の酸化分解反応を用いてマイクロプレートウェル内での微量ヘモグロビンの多検体吸光光度法を開発した。

2 実験

2.1 試薬

10^{-4} M フタロシアニン水溶液は銅フタロシアニン-3,4,4'',4'''-テトラスルホン酸ナトリウム塩 (Cu-PTS, 有効成分 85%, Aldrich 製) を蒸留水で溶解し調製した。pH 緩衝溶液は硫酸 (関東化学製) を蒸留水で希釈し、0.1 M にしたもの、硫酸ナトリウム (関東化学製) を蒸留水で溶解し 0.5 M にしたものを両者混合し、pH メーターを用いて pH 2.0 に調整して使用した。0.2 M ペルオキソ-硫酸水溶液は OXONE {一過硫酸塩化合物 ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$) Aldrich 製} を蒸留水で溶解し、その都度調製して使用した。ヘモグロビン標準溶液はヒトヘモグロビン (Sigma 製) を蒸留水で溶解し、その都度調製して使用した。特に断らない限り、試薬は市販特級品を用いた。

2.2 装置

マイクロプレートリーダー (MPR) はコロナ電気製 MTP-500 型吸光マイクロプレートリーダーを用いた。pH メーターは堀場製 F-22 を、恒温槽はヤマト科学製恒温槽 CTE-42A を用いた。また、マイクロプレートは 96 ウェルタイプを用いた。NICHIRYO 製 8, 12-チャンネルデジタルマイクロピペット (40~200 μl) にディスプレイブルチップを装着させたピペットは、試料及び試薬溶液をウェル内に添加するために用いた。また、ハンドシェーカーは、GL Sciences 製を用い、ウェル内での溶液の混合を行った。

2.3 実験操作

10^{-4} M Cu-PTS 水溶液 40 μl をマイクロプレートに取り、これに pH 緩衝液 (pH 2.0) を 40 μl 加える。この混合溶液にヘモグロビンが含まれた試料溶液を 100 μl 加える。その後、0.2 M ペルオキソ-硫酸を 40 μl 加え、溶液をハンドシェーカーでかくはんする。ペルオキソ-硫酸溶液添加後、5 分後の 610 nm における吸光度を測定する。空試験反応との吸光度差を $\Delta A [= A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}]$ としてあらかじめ作成しておいた標準ヘモグロビンによる検量線から、試料溶液中のヘモグロビン濃度を決定する。ここで、反応時間 5 分後における空試験反応とサンプル反応の吸光度をそれぞれ A_{blank} , A_{sample} とする。

3 結果及び考察

3.1 指示反応

本研究で用いた酸化分解反応スキームを Fig. 1¹⁶⁾ に示す。この反応は、銅-フタロシアニンテトラスルホン酸

Fig. 2 Absorbance(610 nm)-time curve

(a) Absorbance(610nm)-time curve; (b) $\Delta A'$ (610 nm)-time curve

$\Delta A'$: $A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$; $[\text{Cu-PTS}]_T = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Na}_2\text{SO}_4]_T = 7.5 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{KHSO}_5]_T = 3.6 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{hemoglobin}]_T$: (A) 0 ng/ml, (B) 90 ng/ml, (C) 150 ng/ml, (D) 210 ng/ml

(Cu-PTS) のペルオキソー硫酸 (KHSO_5) による酸化分解反応とヘモグロビンの触媒作用と失活反応が同時に進行するものと考えられる。Fig. 2 の (a) に, Cu-PTS の吸光度 (610 nm) の時間変化を示すが, Cu-PTS の吸光度は, 共存する触媒の濃度に応じて時間の経過とともに減少した。更にヘモグロビンは分解していき, ヘモグロビンの検量線の濃度範囲においては, 反応開始後 4 分以内にヘモグロビンはほとんどが完全に分解した。すなわち, ヘモグロビンは, 触媒活性を失い, その後は, サンプル反応と空試験反応の吸光度-時間曲線の接線の傾きは等しくなった。ここで, Fig. 2 の (a) の結果からサンプルと空試験の吸光度の差を縦軸にとることにより, Fig. 2 の (b) に示されるような, 時間的に吸光度差が安定な L 字曲線を描くことができた。したがって, ヘモグロビンの分解が完全に終了した後の一定時間では, 測定時間の因子の影響をほとんど受けない触媒の吸光度定量法を確立することができ

Table 1 Effect of oxidizing agents

Oxidizing agents	ΔA
NaIO_4	0.0111
KBrO_3	0.0022
H_2O_2	0.0135
NaClO_3	0.0040
KHSO_5	0.0346

$[\text{Cu-PTS}]_T = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Na}_2\text{SO}_4]_T = 6.5 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{oxidizing agent}]_T = 3.6 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{hemoglobin}]_T = 150 \text{ ng/ml}$

Fig. 3 Concentration of peroxomonosulfate

$[\text{Cu-PTS}]_T = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Na}_2\text{SO}_4]_T = 6.3 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{hemoglobin}]_T = 250 \text{ ng/ml}$

た。

3・2 最適条件の検討

3・2・1 酸化剤の選定と酸化剤濃度の影響 数種類の酸化剤の検討を行った。その結果を Table 1 に示す。酸化剤としては吸光度差が最も大きくなった KHSO_5 を選んだ。また, $(1.8 \sim 5.5) \times 10^{-2} \text{ M}$ の濃度範囲でペルオキソー硫酸濃度の影響の検討を行った。その結果を Fig. 3 に示す。ペルオキソー硫酸濃度の増加とともに, 吸光度差は増大していくが, $3.6 \times 10^{-2} \text{ M}$ 以上では, ヘモグロビンの分解及び指示薬の分解が大きく進行するため, 吸光度差の減少が見られた。したがって, 定量操作では, 吸光度差の大きい $3.6 \times 10^{-2} \text{ M}$ をペルオキソー硫酸濃度として選んだ。

3・2・2 pH の影響 硫酸ナトリウム濃度を一定とし, pH 2.0~4.0 の範囲で反応における pH の影響の検討を行った。その結果を Fig. 4 に示す。pH の上昇に伴う吸光度差の減少は, pH の上昇に伴いペルオキソー硫酸の Cu-PTS に対する酸化力が増加したためと考えられる。また, pH の減少に伴う吸光度差の減少は Cu-PTS の会合によって, 分解反応が阻害されるためと考えられる。したがっ

Fig. 4 Effect of pH

$[\text{Cu-PTS}]_{\text{T}} = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Na}_2\text{SO}_4]_{\text{T}} = 8.8 \times 10^{-2} \text{ M}$;
 $[\text{KHSO}_5]_{\text{T}} = 3.6 \times 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{hemoglobin}]_{\text{T}} = 250 \text{ ng/ml}$

Fig. 5 Effect of salt concentration

$[\text{Cu-PTS}]_{\text{T}} = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{KHSO}_5]_{\text{T}} = 3.6 \times 10^{-2} \text{ M}$;
 $[\text{hemoglobin}]_{\text{T}} = 250 \text{ ng/ml}$

て、定量操作では反応の安定性も考慮して pH 2.0 とした。また、pH 緩衝溶液は反応系への影響の少ない硫酸-硫酸ナトリウム水溶液を使用した。

3・2・3 硫酸ナトリウム濃度の影響 pH を一定とし $(2.8 \sim 16.2) \times 10^{-2} \text{ M}$ の濃度範囲で硫酸ナトリウムの濃度の影響の検討を行った。その結果を Fig. 5 に示す。硫酸ナトリウムの濃度の増加に伴う吸光度差の減少は、Cu-PTS の会合により、分解反応が阻害される¹⁶⁾ためと考えられる。したがって、定量操作では硫酸ナトリウムの濃度を約 $6.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ とした。

3・2・4 温度の影響 $10 \sim 40^\circ\text{C}$ の範囲で反応における温度の影響の検討を行った。 $10 \sim 40^\circ\text{C}$ では吸光度差に変化はほとんど見られなかった。したがって、定量操作では温度設定を行わず、室温で行うことにした。

Table 2 Influence of foreign substances

Foreign substances	Amount added	Error, % ^{a)}
SO_4^{2-}	$\times 100$	+2.0
CO_3^{2-}	$\times 100$	+14.4
	$\times 50$	+0.6
Al^{3+}	$\times 100$	+3.3
K^+	$\times 100$	-0.9
Ca^{2+}	$\times 10$	+1.9
Ti^{4+}	$\times 100$	+4.8
Mn^{2+}	$\times 100$	-2.8
Fe^{3+}	$\times 1$	+3.3
Co^{2+}	$\times 0.1$	-1.1
Cu^{2+}	$\times 100$	+2.4
Zn^{2+}	$\times 100$	-2.4
Mo^{6+}	$\times 100$	+2.2
Pb^{2+}	$\times 100$	0.0
Histidine	$\times 100$	0.0
Albumin	$\times 5$	+12.0
	$\times 2.5$	0.0
Transferrin	$\times 10$	-2.8
Citric acid	$\times 1000$	+2.9
EDTA	$\times 10$	-1.0

a) The value(%) of error was calculated by $(\Delta A_2 - \Delta A_1) / \Delta A_1 \times 100$. ΔA_1 : Absorbance difference for 120 ng/ml of hemoglobin; ΔA_2 : Absorbance difference for 120 ng/ml of hemoglobin plus foreign substances

3・2・5 検量線 最適条件に基づく実験から、ヘモグロビン濃度の検量線は $30 \sim 258 \text{ ng/ml}$ の範囲で吸光度差 (ΔA) に対し良好な直線性を示した (相関係数 ≈ 1.000)。検量線中央値における 96 検体の同一サンプルに対する相対標準偏差は 3.64%，検出限界 (3σ) は 16.99 ng/ml であった。

3・2・6 共存物質の影響 検量線中央値であるヘモグロビン濃度 120 ng/ml に対し各種金属イオン、タンパク質などを共存させたときの影響を検討した。その結果を Table 2 に示す。共存物質は重量比で示し、 ΔA の変動が $\pm 5\%$ 以内であれば許容範囲内と見なした。Fe(III) に対しては重量比で同量、すなわちモル比で 1000 倍、Co(II) では重量比で 0.1 倍、すなわちモル比で 100 倍共存させても影響は見られなかった。生体試料中に多く含まれるアルブミンの影響は多少見られたが、重量比で 2.5 倍まで許容できた。鉄錯体を有するタンパク質であるトランスフェリンは 10 倍まで許容できた。血液の抗凝固剤中に含まれるクエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) の影響はほとんど見られなかった。

3・2・7 実試料への応用 本法の応用として、血清 (HUMAN SERUM, TYPE AB, Whittaker 製) 中に含まれる微量ヘモグロビンの定量を行った。実験は標準添加法により行い、その結果、蒸留水で 25000 倍に希釈した血清中に含まれるヘモグロビン濃度は 50 ng/ml (変動係数: 2.57%, 96 回測定) であった。これは、既報¹⁶⁾のバッチ法で得られている値とほぼ一致した。

本研究では, 接触反応をマイクロプレートに応用することで, マイクロプレート比色法の欠点である光路長すなわち測定溶液の高さに起因する感度の低下を前段濃縮なしで改善することができ, また, 定量操作だけでなく測定時間を含めても, 約 10 分程度で微量ヘモグロビンの 96 検体同時分析が可能となった。

文 献

- 1) 前田昌子: ぶんせき (*Bunseki*), **1999**, 839.
- 2) 牛山正志: ぶんせき (*Bunseki*), **1998**, 736.
- 3) 澤田純一, 田中東一: ぶんせき (*Bunseki*), **1996**, 277.
- 4) 今堀和友, 山川民夫監修: “生化学辞典”, 第 3 版, p. 232 (1998), (東京化学同人).
- 5) 牧野鉄男: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 921 (2000).
- 6) 牧野鉄男: ぶんせき (*Bunseki*), **1998**, 49.
- 7) 五十嵐淑郎, 川上貴教: ぶんせき (*Bunseki*), **2002**, 114.
- 8) 田端正明: ぶんせき (*Bunseki*), **1999**, 1025.
- 9) 五十嵐淑郎: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 1 (1997).
- 10) 田端正明: ぶんせき (*Bunseki*), **1994**, 188.
- 11) 五十嵐淑郎: ぶんせき (*Bunseki*), **1989**, 190.
- 12) 手嶋紀雄, 酒井忠雄: ぶんせき (*Bunseki*), **2003**, 749.
- 13) 遠藤昌敏: ぶんせき (*Bunseki*), **1999**, 588.
- 14) 中野恵文: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **48**, 285 (1999).
- 15) 山田真吉: ぶんせき (*Bunseki*), **1995**, 285.
- 16) K. Takahata, S. Igarashi: *Clin. Chim. Acta*, **283**, 129 (1999).
- 17) K. Takahata, K. Ohguchi, S. Igarashi: *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1936 (1998).
- 18) K. Takahata, T. Nagoshi, S. Igarashi: *Chem. Lett.*, **1997**, 865.

要 旨

銅-フタロシアニン錯体の酸化分解反応を用いて 96 穴マイクロプレートのウェル内での微量ヘモグロビンの多検体吸光度定量を行った。各種条件の最適化を検討した結果, 酸化剤であるペルオキソー硫酸の濃度は 3.6×10^{-2} M, pH は 2.0, pH 緩衝溶液に含まれる塩である硫酸ナトリウムの濃度は約 6.5×10^{-2} M であった。また, 本法の定量範囲は 30~258 ng/ml, 検出限界 (3σ) は 16.99 ng/ml であった。検量線中央値における 96 検体の同一サンプルに対する相対標準偏差は 3.64% であった。共存物質の検討を行った結果, Co(II), Fe(III), アルブミンの影響は多少認められたが, その他の金属イオン, タンパク質などの影響はほとんどなかった。本法は実試料として人血清に応用でき, 良好な結果を得た。また, 定量操作だけでなく測定時間を含めても, 約 10 分程度で微量ヘモグロビンの 96 検体同時分析が可能であった。