

生体触媒を利用した揮発性化学成分の可視化に関する研究

A chemiluminescence visualization system for volatile component using biocatalyst

○神白匠 (東京工科大) 北和昂 (東医歯大) 王昕 (東医歯大) 荒川貴博 (東医歯大)

工藤寛之 (東医歯大) 矢野和義 (東京工科大) 三林浩二 (東医歯大)

Takumi KAJIRO, Tokyo University of Technology, Kazutaka KITA, Tokyo Medical and Dental University, Wang XIN, Tokyo Medical and Dental University, Takahiro ARAKAWA, Tokyo Medical and Dental University, Hiroyuki KUDO, Tokyo Medical and Dental University, Kazuyoshi YANO, Tokyo University of Technology, Kohji MITSUBAYASHI, Tokyo Medical and Dental University

Abstract:

A novel 2-dimensional spatiotemporal visualization system of expired gaseous ethanol after oral administration for real-time illustrated analysis of alcohol metabolism has been developed, which employed a low level light CCD camera to detect chemiluminescence (CL) generated by catalytic reactions of standard gaseous ethanol and expired gaseous ethanol after oral administration. The system measures ethanol concentrations as intensities of chemiluminescence (460 nm) by luminol reaction. This bioimaging system achieved the two-dimensional real-time visualization of ethanol gas distribution. The intensity of chemiluminescence was linearly related to the concentration of ethanol gas. The luminescent of the bioimaging system was high sensitive enough to detect the standard (approximately 78 ppm). Also the bioimaging system was applied to the detection of exhaled breath after drinking (500 ml, alcohol concentration 6 %), measurement and visualization of the alcohol in exhaled breath was established.

**Key Words:** gaseous ethanol visualization system, biocatalyst, chemiluminescence, volatile information, exhaled breath

1.はじめに

生活環境中には口臭・体臭などの生体ガスや住居内の臭気、食品由来の香りなど多様な揮発性化学成分が存在している<sup>(1)</sup>。その中でも特に、呼吸や皮膚ガス等の生体由来のガスには代謝過程で産生される成分や、疾患に起因する化学物質が含まれ<sup>(2)</sup>、これらを測定・分析することで代謝機能の評価や疾病をスクリーニングできるものと期待される<sup>(3-7)</sup>。さらに、呼吸や皮膚ガス中の揮発性生体成分の空間的な広がりや時間変化を可視化することができれば、評価者や被験者が視認できることから簡便かつ迅速な評価方法となるものと考えられる。本研究では、対象成分としてエタノールガスを選択し、その時間的・空間的な濃度変化を、生体触媒を用いたルミノール化学発光へ誘導することで光学情報に変換し、高感度 CCD カメラを用いて動画撮影を行う揮発性成分の可視化システムの構築を行った。

にて調整した各濃度のエタノールガスを負荷 (流量: 200 ml/min、負荷時間: 10 秒) し、酵素反応により生じたルミノール発光を高感度 CCD カメラにて動画撮影した。なおルミノール発光にて励起状態の3-アミノフタル酸が基底状態に戻る際の青色発光(ピーク波長: 460 nm) を可視化するため、その発光領域に感度を有するオンチップの電子増倍型 CCD カメラ(L3C95, e2v INC.)を用いた。撮影した動画は、多機能汎用画像解析ソフト (cosmos32, ㈱ライブラリー) を用いて解析を行った。

2.実験

2-1 エタノールガス可視化システムの構築

本システムは、エタノールを酸化触媒するアルコール酸化酵素(alcohol oxidase, AOD)と、その生成物である過酸化水素を基質としてルミノール発光を生じる西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) を同時に固定化した酵素メッシュ、そして発光現象を観察する高感度 CCD カメラをそれぞれ暗箱内に設置し、エタノールを含むガスを固定化メッシュに負荷し、その際に生じる発光現象を可視化するものとした (Fig.1)。

酵素メッシュの作製では、市販のコットンメッシュに上記 2 種類の酵素、リン酸緩衝液 (PBS)、紫外線架橋樹脂 (PVA-SbQ) の混合液を均一に塗布し、4°Cの冷暗所にて乾燥させた後、紫外線を照射することにより酵素を包括固定化した (Fig.2)。可視化実験では、酵素メッシュをルミノール溶液に浸漬し暗箱内に設置した後、標準ガス発生装置

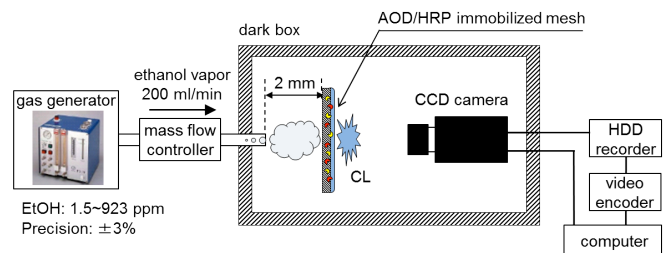


Fig.1 Schematic illustration of the chemiluminescence visualization system for ethanol

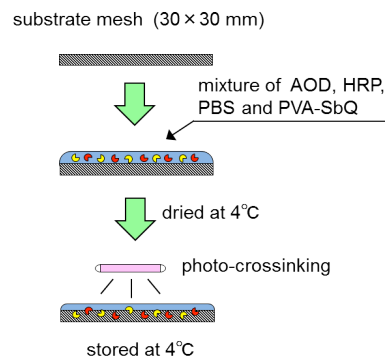


Fig.2 Fabrication process of AOD/HRP immobilized mesh

## 2-2 呼気中エタノールの可視化計測

本システムを、飲酒後の呼気中エタノールガスの可視化計測に適用した。被験者には予め、アルコールパッチテストを行い、アルコール代謝に関連する判定を実施し、飲酒実験が可能と判断された被験者に対し実験を行った(東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・倫理委員会 承認番号: 0908-1)。実験では健康な男性被験者を対象として、飲酒(体重 1 kg あたり 0.4 g エタノール)後の呼気ガスを可視化計測に供した。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 エタノールガスの可視化計測と選択性の評価

構築した可視化システムに標準エタノールガス (30, 100, 400 ppm) を負荷した結果、負荷点を中心として周囲に発光が広がっていく様子が観察され、ガス濃度に応じた発光分布の画像が得られた。発光強度はガスの負荷 (200 ml/min, 10 秒間) に伴い増加し、ピーク強度に達した後に漸次消光しており、エタノールガスによる発光の様子 (濃度分布及び経時変化) を二次元的に可視化することが可能であり (Fig. 3)、高さ方向で発光強度を示した三次元プロファイルとして画像化することも可能であった。得られた動画像をもとに画像解析にて発光強度を算出したところ、ガス負荷に対する著しい平均発光強度の上昇と、濃度に応じたピーク値が観察され、エタノールガスの負荷に伴うルミノール発光の経時変化を数値化することが可能だった。また、エタノールガス濃度と動画像の発光強度に相関性が確認され、酒気帯び運転の判断値の 78 ppm を含む、30~400 ppm の範囲でエタノールガスの定量が可能であった。

また、呼気ガス中の他のガスの影響を評価するため、呼気に含まれる主な成分 (メタノール、アセトアルデヒド、トリメチルアミン、アセトン、メチルメルカプタン、硫化ジメチル) を呼気ガス中の濃度にて負荷したところ、エタノールガス以外の成分では発光が観察されず、酵素の基質特異性に基づく高い選択性が確認され、呼気計測ではエタノールガスの選択的な測定が可能であることを確認した。

以上より、本システムにてエタノールガスの濃度分布と経時変化を動画像として可視化することができ、画像解析によりエタノールガスの濃度定量が可能であった。

### 3-2 呼気中エタノールの可視化計測

構築したシステムの生体ガスに対する有用性を確認するため、飲酒後の呼気中エタノールを用いて、可視化計測を行った。本システムに呼気流量制御装置を介し、飲酒後の呼気ガス (200 ml/min) を供したところ、呼気中エタノールガスにおいても二次元の可視化動画像が得られ、ガス濃度を算出したところ、飲酒後 30 分の呼気では濃度が 110 ppm となり、エタノールガス検知管 (楕ガステック) での結果と同程度の値であることを確認した。可視化画像を用いて、飲酒後の呼気エタノールガス濃度の経時変化を調べた結果 (Fig.4)、アルコール摂取後直ちに呼気中エタノールガス濃度は上昇し、30 分後にピーク値に達した後、アルコール代謝に伴う一次関数的な濃度低下が観察された。血中アルコール濃度は Widmark の式に従い、時間に比例して減少することが報告されていることから<sup>(8)</sup>、得られた実験結果を同様に Widmark の式を用いて評価したところ、体内エタノールの除去に要する時間は約 6 時間程度であることが確認された。これは既報結果と矛盾するものではなく、可視化システムを用いたアルコール代謝評価の可能性が示唆された。

以上より、本システムにて生体ガスである呼気中エタノール成分の可視化計測を行うことが可能で、本システムの生体ガスに対する有用性が確認された。

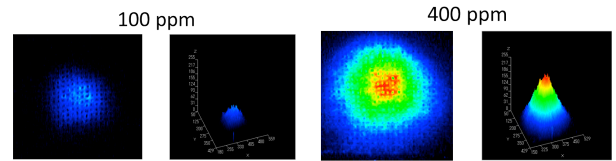


Fig.3 Chemiluminescence images and 3 dimensional profiles of CL to standard gaseous ethanol at 100 ppm and 400 ppm.

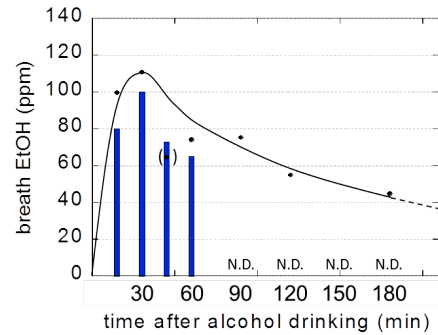


Fig.4 Gaseous ethanol concentration in breath after alcohol drinking. (blue bar: gas detecting tube)

## 4. まとめ

揮発性化学情報であるエタノールガスをモデル成分とし、酵素反応によるルミノール発光を高感度 CCD カメラにて可視化する計測システムを構築した。AOD/HRP 固定化メッシュを作製し、エタノールガス可視化システムを構築した。その結果、円形状のルミノール発光が観察され、エタノールガスの濃度分布とその経時変化を CCD カメラにて可視化することが可能であった。また、解析結果のもと 30~400 ppm の濃度範囲でエタノールガスの定量が可能であったさらに飲酒後の呼気サンプルに適用したところ、アルコール代謝能に応じた出力を得ることができ、本システムの生体ガスに対する有用性を確認することができた。

## 5. 参考文献

- (1) 高木貞敏, 匂いの化学, 朝倉書店, 3, 4-9, 19-27, 1989
- (2) 植田秀雄, 特集「健康提案センターになろう」呼気からわかるさまざまな病態像, アポロニア 21, 6月号, 54-59, 2006
- (3) Boguslaw Buszewski, et al., Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases, Biomedical Chromatography, 21, 553-566, 2007
- (4) Audrey N. Martin, et al., Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396, 739-750, 2010
- (5) Gang Peng, et al., Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles, nature nanotechnology, 14, 669-673, 2010
- (6) Nador Marczin, et al., Disease Markers in Exhaled Breath, Basic Mechanisms and Clinical Applications, IOS Press, 2002
- (7) Nador Marczin, et al. Lung Biology in Health and Disease, Disease Markers in Exhaled Breath, MARCEL DEKKER, INC., 170, 2003
- (8) L. Lindberg, et al., Breath alcohol concentration determined with a new analyzer using free exhalation predicts almost precisely the arterial blood alcohol concentration, Forensic Science International, 168, 200-207, 2007