

電子スピン共鳴法によるラジカル消去能自動測定システムの開発

江 本 匡 [株式会社エコニクス／技術開発部統括マネージャー]

藤 井 博 匡 [札幌医科大学医療人育成センター／教授]
郡 俊 志 [札幌医科大学医療人育成センター／研究支援者]

多 田 憲 司 [株式会社エコニクス／技術開発部研究開発チームチーフコンサルタント]

高橋 かおり [株式会社エコニクス／技術開発部研究開発チームアソシエイト]

背景・目的

近年、酸化ストレスが様々な疾病の原因になっていることが明らかにされて、酸化ストレスを抑制する力である“抗酸化能”は健康維持や予防医学の観点から評価されている。

抗酸化能測定方法はこれまで種々の方法が提唱されてきたが、蛍光や発光を利用する測定法では抗酸化能を比較的簡単に算出することができるものの、発生するフリーラジカルとの反応を直接観測していないなどの課題がある。ESR(電子スピン共鳴法)を用いた抗酸化能測定ではこれらの課題が解決できるものの、既存の装置では実用化に向けた迅速な測定に熟練を要する。

本研究では ESR 装置による測定の簡素化、迅速化にむけた連続測定システムの検討及び試作を行う。

内容・方法

これまでの研究開発での結果をもとに、本事業で開発するラジカル消去能自動測定システムを構築するため3つのテーマについての研究開発を実施した。

まず一つ目として、フローセルを用いた ESR 測定装置による連続測定を行った。測定ごとにセルの位置変化がなくなることで、マイクロ波とセル間のチューニング

作業回数を減らすことが可能となる。フローセルを用いた測定結果とこれまでの測定方法による結果の比較・検討を行った。

二つ目に空洞共振器内にて光照射を行った場合、光照射により発生する熱がラジカルの発生に与える影響について懸念されていたことから、空洞共振器外で試料に光照射を行う系を作製することとした。フローセルと組み合わせた空洞共振器外光照射条件についての検討を行った。

最後に試料調整の自動化装置の組み立てを行い、数 μL ～数十 μL の試薬及びサンプルを正確に分取・混合することで実用化に向けたシステムのモデルを構築して測定結果の精度向上に向けた課題等を抽出する。

結果・成果

フローセルを用いた連続測定を行う為、既存の ESR 装置にフロー扁平セル、HPLC 用ポンプ及び六方切り替えバルブを接続した。ライン図を図1に示す。発生させるラジカルによって光照射時間を変えているため光照射時及び測定時はラインの切り替えを行って移動相がフローセルに流れないようにした。この系を用いてアルコキシラジカル、ペルオキシラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカルを対象としたトロロックスのラジカル消去能濃度依存性の確認をした。フロー測定を用いる前のデータと比較して、発生するラジカルのピーク高さは小さくなるもののアルコキシラジカル及びペルオキシラジカルを対象としたトロロックスのラジカル消去能濃度依存性を確認することができた。スーパーオキシドアニオンラジカルについてはピークが小さくラジカル消去能を測定できるレベルではなかった。スーパーオキシドアニオンラジカルは過酸化水素を経てヒドロキシラジカルを発生することがあり、このことが原因と推測される。

次に空洞共振器外で光照射を行うラインを作成した。ライン図を図2に示す。光照射部分には測定用フローセルを用いた。測定用フローセルは通常廃液側をシリコー

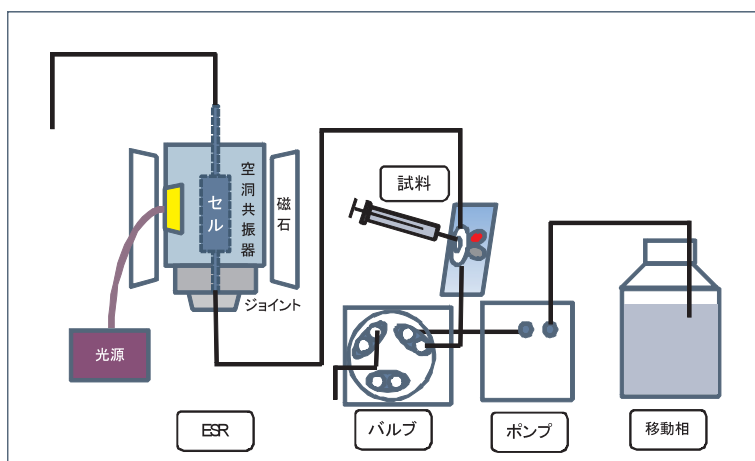


図1 フローセルを用いたライン図

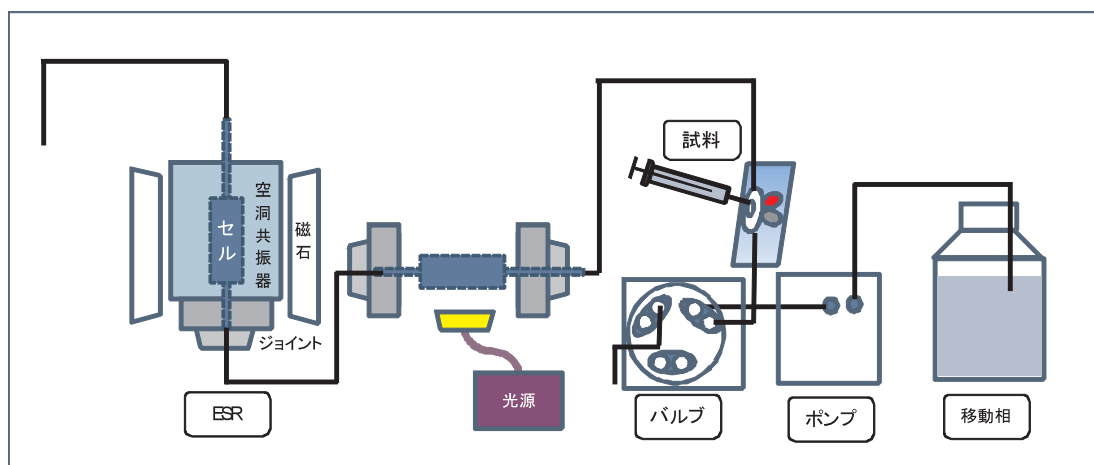


図2 外部照射ライン図

ンチューブで解放状態にして使用しているが、ここでは両端を PEEK チューブで接続するため測定部分よりも高い圧力がかかりジョイント部分での水漏れ、セルの割れなどの課題があった。直径0.13mm の PEEK チューブを使用していたが、光照射用フローセルの両端は直径0.50mm の PEEK チューブを用いて圧力を下げることにした。

フロー下での光照射となるため光照射時間は短くなりラジカル発生量が少なくなることが考えられる。光源とサンプルとの距離を短くすることでラジカル発生量は従来の方法と比較して増えたものの、セル全体を照射できる距離ではなかった。セル全体を照射できる光源との距離を確保し、照度を高くすることで従来と変わらないラジカル発生量を確保できる条件を探した。また、スーパーオキシドアニオンラジカルについても照度を高くすることで、ラジカル消去能を測定できるレベルのピーク高さを得ることができた。

試料調整の自動化には、株式会社ワイエムシィ製のシリンジポンプ4台及び KeyChem ミキサ3台を用いた。ピペッティングによる作業誤差をなくし繰り返し精度の向上を図ることができた。

今後の展望

本研究で作成した ESR フローインジェクションシステムの系では、シリンジポンプで調整された試料は手作業によりシリンジを用いてフローシステムへ導入されている。調整された試料が自動で測定システムへ注入されることが可能となれば、他の分析機器と変わらない迅速な自動測定システムになりうると考えられる。試料調製から測定までに時間をおいてしまうとラジカルトラップに影響を与える可能性があるため、通常のオートサンプラーは ESR 測定には適さない。グラジエント機能をもつ試料調製装置の開発や注入装置としてオートピペットを用いたロボットシステムの開発を進めることができれば、全工程において自動化された ESR 測定が可能となるだろう。