

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5158747号  
(P5158747)

(45) 発行日 平成25年3月6日(2013.3.6)

(24) 登録日 平成24年12月21日(2012.12.21)

(51) Int. Cl. F I  
**GO 1 N 27/447 (2006.01)** GO 1 N 27/26 3 O 1 A  
**GO 1 N 37/00 (2006.01)** GO 1 N 27/26 3 3 1 E  
 GO 1 N 27/26 3 3 1 K  
 GO 1 N 37/00 1 O 1

請求項の数 5 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2007-22564 (P2007-22564)	(73) 特許権者	301021533
(22) 出願日	平成19年2月1日(2007.2.1)		独立行政法人産業技術総合研究所
(65) 公開番号	特開2008-190882 (P2008-190882A)		東京都千代田区霞が関1-3-1
(43) 公開日	平成20年8月21日(2008.8.21)	(72) 発明者	官道 隆
審査請求日	平成21年2月27日(2009.2.27)		大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立
審判番号	不服2011-19395 (P2011-19395/J1)		行政法人産業技術総合研究所関西センター
審判請求日	平成23年9月8日(2011.9.8)		内
(31) 優先権主張番号	特願2007-4028 (P2007-4028)	(72) 発明者	脇田 慎一
(32) 優先日	平成19年1月12日(2007.1.12)		大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		行政法人産業技術総合研究所関西センター
			内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 除血球機能を統合した電気泳動チップを用いた一酸化窒素最終代謝物の分析法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

全血サンプル中の一酸化窒素の代謝物である硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)及び亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)をマイクロチップの分離検出流路内で電気泳動により分離し、検出部において光学的に検出することを特徴とし、硝酸イオンと亜硝酸イオンの合計量で体内における一酸化窒素の産生量を推定する方法。

【請求項2】

分離検出流路内を緩衝液で満たすことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

緩衝液が、ヒト血清と同様な高いイオン強度を有し、かつ、硝酸イオン及び亜硝酸イオンの紫外線吸収に基づく測定を妨げないような、紫外線領域の低い吸光度を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記検出部が紫外線透過性の材料で形成されていることを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

電気泳動を、電界強度250～750 V/cm、分離泳動時間1～30秒、温度0～80 の条件下で行う、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、全血サンプル中の一酸化窒素の代謝物である硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) 及び亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) を分析する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

一酸化窒素 (NO) は、一酸化窒素合成酵素 (NOS) によってアルギニンと酸素から合成される。一酸化窒素は、細胞内の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化してサイクリック GMP (cGMP) を合成させることによりシグナル伝達に参与する。血管内皮は一酸化窒素をシグナルとして周囲の平滑筋を弛緩させ、それにより動脈を拡張させて血流量を増やす。これがニトログリセリンが心臓病の治療に用いられる理由である。一酸化窒素を気管内に吸入させることにより、肺動脈の血管平滑筋を弛緩させ、肺高血圧を改善させることができる。さらに、免疫に参与する細胞の一種であるマクロファージは病原体を殺すために一酸化窒素を産生する。しかしこれは逆に悪影響を及ぼすこともある。敗血症ではマクロファージが一酸化窒素を大量に産生し、それによる血管拡張が低血圧の主因となると考えられている。

10

## 【0003】

一酸化窒素 (NO) は、このような種々の機能を有するため、その血中濃度を測定することが種々の疾患の診断等に有用であり、さらに空腹時採血は臨床的意義が認められることから、血中の一酸化窒素 (NO) を簡便に測定する方法が求められている。

20

## 【0004】

一酸化窒素 (NO) は比較的不安定な物質であり、代謝されて亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) や硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) として血液中で存在する。したがって、一酸化窒素 (NO) を検出するために、亜硝酸イオン及び硝酸イオンが従来から測定されている。

## 【0005】

マイクロ電気泳動チップにより生物学的サンプル(血清、唾液)から一酸化窒素の測定を行う方法が、非特許文献 1, 2 に記載されている。

## 【0006】

非特許文献 1, 2 は、いずれも血清などのサンプルを除蛋白した後、硝酸イオン、亜硝酸イオンを測定し、それにより血清中の NO 量を推定している。

30

## 【0007】

また、非特許文献 3 では、従来法であるグリース法により血漿中の硝酸イオンと亜硝酸イオンを測定するためには、除タンパクを行わない場合、測定値のばらつきが大きくなるなどの結果が記述され、さらに「全血」状態では迅速に亜硝酸イオンが硝酸イオンに酸化されると明記されている。

## 【0008】

これらの文献に記載されるように、一酸化窒素を分析する場合、まず血液サンプルの除血球及び除蛋白をすることが必要であると考えられていたが、一方、これらは煩雑な操作であった。さらに、除蛋白は検出感度を向上させるためにも必要であると考えられていた。

40

【非特許文献 1】 J. Chromatogr. A1051 (2004) 185-191

【非特許文献 2】 J. Chromatogr. A, 1109 (2006) 174-178

【非特許文献 3】 Clinical Chemistry, Vol.41, No.6, 892-896, 1995

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

本発明は、血液中的一酸化窒素をより簡便かつ正確に分析することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

本発明者は、上記の課題に鑑み検討を重ねた結果、全血サンプルを直接マイクロ電気泳

50

動チップで分離すると、一酸化窒素を正確に分析することができ、かつ、血球ないし蛋白質などの夾雑物質の影響は問題にならないことを見出した。

【0011】

本発明は、以下の一酸化窒素の産生量を推定する方法に関する。

1. 全血サンプル中の一酸化窒素の代謝物である硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) 及び亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) をマイクロチップの分離検出流路内で電気泳動により分離し、検出部において光学的に検出することを特徴とし、硝酸イオンと亜硝酸イオンの合計量で体内における一酸化窒素の産生量を推定する方法。

2. 分離検出流路内を緩衝液で満たすことを特徴とする、項1に記載の方法。

3. 緩衝液が、ヒト血清と同様な高いイオン強度を有し、かつ、硝酸イオン及び亜硝酸イオンの紫外線吸収に基づく測定を妨げないような、紫外線領域の低い吸光度を有する、項2に記載の方法。

4. 前記検出部が紫外線透過性の材料で形成されていることを特徴とする、項1～3のいずれかに記載の方法。

5. 電気泳動を硝酸イオンと亜硝酸イオンの分離を行うのに適した流体制御を得るための条件下で行う、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

6. 血球と硝酸イオンおよび亜硝酸イオンを含むサンプルを、これらがアニオンで存在する条件下で電気泳動にかけて、移動度の違いにより血球を硝酸イオンおよび亜硝酸イオンから分離する、除血球方法。

7. 電気泳動を血球と硝酸イオンおよび亜硝酸イオンの分離を行うのに適した流体制御を得るための条件下で行う、項6に記載の方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、電気泳動のみで全血サンプルの前処理から分離まで行うことができ、一酸化窒素のハイスループット測定が可能になる。また、チップ流路内に特別な加工を施す必要がなく、単純な流路形状のチップで一酸化窒素の分析が実現可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明では、電気泳動にかけるサンプルとして全血をそのまま使用することができる。

【0014】

従来の赤血球の分離除去には、遠心力を用いる方法、膜等のろ過材や陽及び陰イオン交換物質の積層体を用いる方法が用いられているが、本発明ではこのような操作は不要であり、全血をそのまま電気泳動にかけて、一酸化窒素を分析することができる。

【0015】

全血としては、抗血液凝固剤を加えた全血サンプルを使用することができる。電気泳動に使用するサンプル量としては、特に限定されないが、例えば3～10  $\mu\text{l}$ 程度である。全血サンプルは、必要に応じて2～10倍程度に希釈した後、電気泳動に供してもよい。

【0016】

抗血液凝固剤としては、クエン酸、ヘパリン、EDTAなどが挙げられる。

【0017】

全血サンプルの由来は、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、サル、ヤギ、マウス、ラットなどの哺乳動物が挙げられ、好ましくはヒトが例示される。

【0018】

本発明の測定対象である一酸化窒素は、一酸化窒素合成酵素 (NOS) によってアルギニンと酸素から合成されるが、一酸化窒素の半減期が極めて短いため、血液中では亜硝酸イオン及び硝酸イオンに代謝される。血液中の亜硝酸イオンと硝酸イオンはいずれも一酸化窒素に由来するため、本発明では、亜硝酸イオンと硝酸イオンの合計量により一酸化窒素の産生量を推定する。硝酸イオンは安定であるが、亜硝酸イオンはアミンと反応性を有する比較的不安定なイオンであるので、迅速に分析する必要がある。本発明によれば、硝酸イオンだけでなく、亜硝酸イオンを正確に分析することができる。

10

20

30

40

50

## 【0019】

本発明では、電気泳動を行うためにマイクロチップを利用する。該マイクロチップには、全血サンプルを電気泳動により分離する分離検出流路が形成され、該流路内に亜硝酸イオンと硝酸イオンを検出するための検出部が備えられている。該流路内で分離された物質(特に亜硝酸イオンと硝酸イオン)が検出部において光学的に検出が可能なように、検出器がさらに用いられる。例えば分離検出流路全体或いは少なくとも検出部は、流路中で分離された物質の光学的検出が可能なように光透過性の材料(例えば石英ガラス或いは非常に薄い透明フィルム)から構成され、紫外線などの光学的な検出を可能にするのが望ましい。なお、分離検出流路全体がこのような材料から構成されてもよく、硝酸イオンと亜硝酸イオンが検出可能であれば、分離検出流路の一部のみが光学的検出が可能な材料で構成されてもよい。光透過性の材料としては、石英ガラス以外に、樹脂、例えばポリメチルメタクリレート(PMMA)、ポリカーボネート(PC)、シクロオレフィンポリマー(COP)、シクロオレフィン・コポリマー(COC)、ポリジメチルシロキサン(PDMS)などが挙げられる。

10

## 【0020】

亜硝酸イオンと硝酸イオンは、例えば205~215 nmの光を照射し、その透過率により検出することができる。

## 【0021】

本発明で使用する泳動液としては、通常緩衝液を使用する。緩衝液としては、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液、人工海水、ヒト血清成分に基づく溶液などが挙げられ、緩衝液のpHとしては、5~10程度、好ましくは7~8程度が挙げられる。泳動液中に蛋白質の吸着抑制や流体制御などのために両性イオンやポリマーなどを添加して用いてもよい。

20

## 【0022】

本発明において、電気泳動としてはゾーン電気泳動が好ましく使用できるが、ゲル電気泳動、ミセル動電クロマトグラフィー、等電点電気泳動、等速電気泳動などの他の手段を用いてもよい。

## 【0023】

分離検出流路の泳動距離は特に限定されないが、10~70mm程度、好ましくは20~35mm程度である。このような範囲であれば、公知の検出器(特に紫外線検出器)が容易に使用できる。

30

## 【0024】

本発明のマイクロチップの例を図1に示す。図1-Aのマイクロチップは、泳動液リザーバー、廃液リザーバー、試料リザーバー、試料廃液リザーバー、試料導入流路、分離検出流路を備え、該分離検出流路には硝酸イオンと亜硝酸イオンの光学的検出を可能にする検出部(図示せず)が備えられている。該検出部は、硝酸イオンと亜硝酸イオンが分離・検出可能である限り分離検出流路のいずれの位置に形成されてもよいが、好ましくは分離検出流路の中心付近或いは試料廃液リザーバー側に形成されるのが好ましい。全血サンプルを試料リザーバーに加え、試料リザーバーから試料廃液リザーバーに向けて全血サンプル中の各成分を電気泳動により移動させる。全血サンプル中の成分が試料導入流路と分離検出流路の交叉位置まで送られると、該サンプル成分中の硝酸イオンと亜硝酸イオンは分離検出流路に送られる。このときの分離検出流路の泳動条件としては、以下の条件が挙げられる。

40

## 【0025】

血球と硝酸イオンと亜硝酸イオンの分離を行うのに適した流体制御を得るための電気泳動の条件、或いは、硝酸イオンと亜硝酸イオンの分離を行うのに適した流体制御を得るための電気泳動の条件は、電界強度1~1000 V/cm程度、好ましくは250~750 V/cm程度、分離泳動時間1~600秒程度、好ましくは1~30秒程度、温度0~80 程度、好ましくは0~30 程度である。

## 【0026】

全血中の血球、蛋白質などは試料リザーバー付近にとどまり、分離検出流路にほとんど

50

流れ込まないか、或いは、分離検出流路に入った場合でも硝酸イオンと亜硝酸イオンの分離にはほとんど影響なく、一酸化窒素の分析を問題なく行えることが明らかになった。

【0027】

図1のAの例では4つのリザーバーに、各々電圧を印加できるように電極が形成されているが、本発明で使用するマイクロチップでは、分離検出流路の両側に1対の電極は必要であるが、試料導入流路及び試料リザーバーと試料廃液リザーバーは必ずしも必要ない。すなわち、マイクロチップを泳動液リザーバーと廃液リザーバー、さらに分離検出流路で構成し、全血サンプルを該流路上に滴下し、電気泳動を行う方法でも、全血サンプル中の硝酸イオンと亜硝酸イオンの分離検出にほとんど影響はなく、一酸化窒素の分析を問題なく行えることが明らかになった。図1のB~Jには、本発明の方法に使用する種々の実施形態のマイクロチップが示されている。

10

【0028】

シングルチャンネル型(図1-B)は泳動液リザーバー、廃液リザーバー、試料リザーバーと分離検出流路から構成されている。このチップ形状では泳動液リザーバーと廃液リザーバーに設置された2つの電極で流体制御を行う。

【0029】

シングルT型(図1-C,G)は試料リザーバー、泳動液リザーバー、廃液リザーバーと試料導入流路、分離検出流路から構成されている。このチップ形状では試料リザーバー、泳動液リザーバーと廃液リザーバーに設置された3つの電極で流体制御を行う。

【0030】

ダブルT型(図1-D,H)は試料リザーバー、試料廃液リザーバー、泳動液リザーバー、廃液リザーバーと試料導入流路、分離検出流路から構成されている。この形状の特長は試料リザーバー側の試料導入流路と試料廃液リザーバー側の流路にずれ(オフセット)がある点である。このチップ形状では試料リザーバー、試料廃液リザーバー、泳動液リザーバーと廃液リザーバーに設置された4つの電極で流体制御を行う。

20

【0031】

クロス型(図1-E,I)はダブルT型のオフセットがない形状であり、試料リザーバー、試料廃液リザーバー、泳動液リザーバー、廃液リザーバーと試料導入流路、分離検出流路から構成されている。このチップ形状では試料リザーバー、試料廃液リザーバー、泳動液リザーバーと廃液リザーバーに設置された4つの電極で流体制御を行う。

30

【0032】

図1-F,Jはクロス型の試料導入流路と分離検出流路の交差角度が90度以下の場合である。

【0033】

図1-G~Jは試料導入流路の幅や深さを狭めた(ナローチャンネル化された)チップ形状である。この形状の特長は分離検出時に試料導入流路から分離検出流路への試料の流れ込みを防ぐための流体制御をより簡便に行うことが可能である点である。具体的には、流路が均一なチップ図1-C~Fでは分離検出時に試料導入流路から分離検出流路への試料の流れ込みを防ぐために、引き戻すための電圧を試料リザーバーと試料廃液リザーバーに印加する必要がある。これに対し、図1-G~Jのように試料導入流路の幅を狭めること(ナローチャンネルにすること)で引き戻すための電圧を印加しなくても流れ込みを防ぐことができ、流体制御をより簡便に行うことが可能となる。

40

【0034】

さらに、流路は直線である必要はなく、途中で折り返す構造を有していたり、蛇行していたりしても良い。

【0035】

一つのマイクロチップには、一つの分離検出流路を設け、一つのサンプルのみを分析してもよく、一つのマイクロチップに複数の分離検出流路を設け、複数のサンプルを同時に分析するようにしてもよい。全血サンプルを適用した場合、血球又は血液中の蛋白質が分離検出流路に付着し汚染することが考えられるが、このような構成のマイクロチップは使

50

い捨てにすればよい。

【0036】

図2には、全血サンプルに調製後の最終濃度が500 μM 硝酸イオン、500 μM 亜硝酸イオン、1 mM EDTAとなるように硝酸イオンと亜硝酸イオンの標準溶液とEDTA水溶液を添加した85%の全血を図1-Aのマイクロチップを用いて分離したときの結果を示す。

具体的には、泳動液として、2.00 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12.0 mM KCl, 412 mM NaCl, 5.43 mM 尿素, 4.72 mM ブドウ糖を含み、0.1 M 塩酸でpH 7.4に調節された溶液を用いる。泳動条件は、試料導入時には試料廃液リザーバーに0.4 kV、泳動液と廃液リザーバーに0.2 kV、試料リザーバーに0 kVを25秒間印加し、分離時には廃液リザーバーに1.8 kV、試料と試料廃液リザーバーに0.15 kV、泳動液リザーバーに0 kVを6.5秒間印加する。

10

【0037】

一酸化窒素の定量が適切に行われた場合には、健康診断、疾病リスク診断、或いは食品機能性評価などに応用することができる。一酸化窒素は典型的な酸化ストレスマーカーであるため、酸化ストレスと関係しているといわれている疾患、例えば、動脈硬化、高血圧、心筋梗塞、脳血管系障害などの循環器系疾患、ガン、糖尿病、或いは、肝炎、消化性潰瘍、腸疾患(炎症性、虚血性)、膵炎などの消化器疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの各種の疾患に対し、本発明の方法により簡便・迅速に一酸化窒素(NO)を測定することで、血中一酸化窒素レベルと各種疾患との関係についての臨床医学的知見が蓄積されることにより、これらの疾患の臨床診断に応用され得る。また、酸化ストレスマーカーである一酸化窒素の測定により体内の酸化ストレス状態を把握することが可能であり、ある食品を

20

摂取することによる酸化ストレス状態の改善を、血中一酸化窒素レベルの変化により評価

することができる。

【産業上の利用可能性】

【0038】

上記のように、一酸化窒素(NO)を簡便・迅速に測定することができる本発明は、健康診断、疾病リスク評価、食品の機能性評価などに応用され得る。

【図面の簡単な説明】

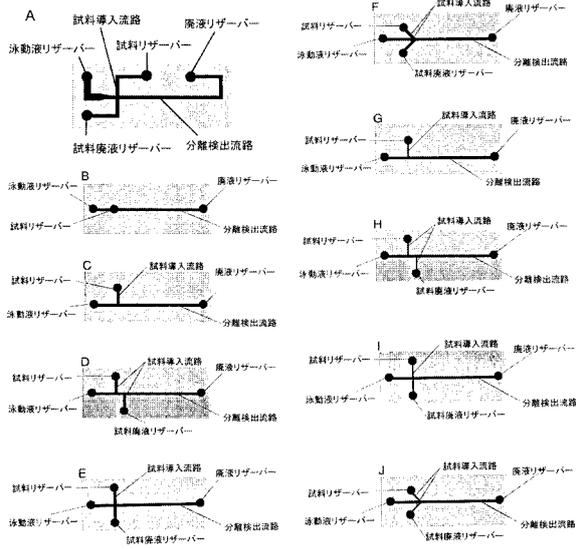
【0039】

【図1】マイクロチップの平面図

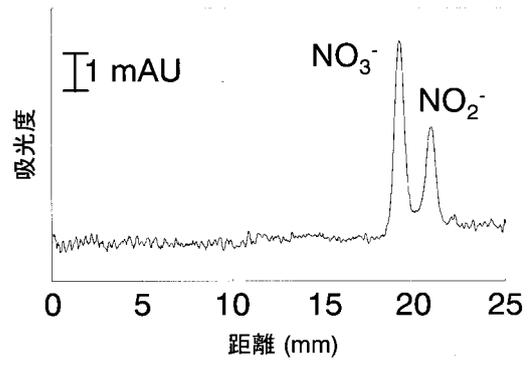
【図2】実証例(硝酸、亜硝酸イオン標準溶液添加85%全血)

30

【 図 1 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

合議体

審判長 岡田 孝博

審判官 福田 聡

審判官 信田 昌男

(56)参考文献 特表2001-510394(JP,A)

特表平9-510792(JP,A)

特開平5-196604(JP,A)

脇田慎一(外5名),血清中のNO迅速アッセイ電気泳動チップの予備的検討, Chemical Sensors Vol. 18 Supplement A, 2002年4月1日, p. 145-147

H. Moshage et al., Clinical Chemistry, 1995, Vol. 41, No. 6, p. 892-896

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/447