

ホルムアルデヒド酵素サイクルセンサの開発

月精 智子*¹⁾ 和田 俊明*²⁾ 左成 信之*²⁾ 紋川 亮*¹⁾

Development of formaldehyde sensor based on an enzyme cycling assay

Tomoko Gessei*¹⁾, Toshiaki Wada*²⁾, Nobuyuki Sanari*²⁾, Akira Monkawa*¹⁾

キーワード: ホルムアルデヒド, 酵素サイクリング, 水溶性テトラゾリウム塩

Keywords: Formaldehyde, Enzyme cycling assay, Water-soluble tetrazolium salt

1. はじめに

ホルムアルデヒドは防腐剤や接着剤等をはじめとする様々な工業材料に用いられており, 我々の生活環境中に多く存在する化合物である。その一方で, シックハウス症候群の原因物質としても知られており, 人体への健康被害が問題となっている。国際がん研究機関では, ヒトに対する発癌性が認められるグループ 1 に分類しており, 厚生労働省は, ホルムアルデヒドの水質基準値を 0.08 mg/L 以下, 室内濃度指針値を 0.08 ppm に設定し, 規制措置をとっている。

現在, ホルムアルデヒドの分析は, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) で誘導体化した後, HPLC や GC/MS で検出する方法が公定法として用いられている。これらの分析装置は, 高感度であり, 正確な測定が可能であるものの, 装置が大型かつ煩雑で時間を要するという問題がある。一方, 簡易法としては, ガス検知管や化学センサが製品化されており, 実際の現場で広く使用されている。これらのセンサは, 小型で携帯可能であるという利点があるものの, 低濃度のホルムアルデヒド計測には 30 分もの時間を要し, 夾雑物質の影響を受けやすく, 選択性が低いという問題点がある。

一方で, 酵素を用いた高感度測定法の一つに酵素サイクリング法がある。酵素サイクリング法では, 他の種類の酵素と組み合わせて, 従来法の発色反応が増幅して起こるようにすることで, 高感度な測定を可能としている。1993 年に水溶性テトラゾリウム塩 (Water-soluble tetrazolium salts; WST) が開発され, 細胞増殖能や毒性テストで広く利用されるようになった⁽¹⁾。近年では, 医療や食品分野の微量物質検出において研究展開されている⁽²⁾⁽³⁾。

そこで本研究では, WST を用いた酵素サイクリング法をホルムアルデヒドの測定に応用し, 簡易で小型化が可能なガス及び水溶液での測定に適したホルムアルデヒド酵素サ

イクルセンサの開発を試みた。

2. 実験方法

WST を用いたホルムアルデヒド検出原理を図 1 に示す。酵素サイクリング法によるホルムアルデヒドの検出では, ホルムアルデヒド脱水素酵素反応により生成した NADH をジホラーゼを用いて NAD⁺へ脱水素すると共に, WST を還元しホルマザン色素を生成させる。生成したホルマザン色素を比色定量することで, 間接的にホルムアルデヒドの検出を行う。

リン酸緩衝液 (pH8.0, 100 mmol/L) を用いて, EDTA 0.1 mmol/L, WST-8 1.0 mmol/L, DI 1.0 U/ml, NAD⁺ 0.3 mmol/L, FALDH 1.0 U/ml になるように各試薬を調整した。調整した溶液を石英セルに注入し, ホルムアルデヒド溶液を目的の濃度 (10~1000 ppb) となるように注入し, 3 回転倒混和して 3 分後に生成したホルマザン色素の吸光度を測定した。

また, パーミエーターで発生させたホルムアルデヒドの標準ガスを, 溶液の実験と同様に調整した溶液を注入した気体計測用の石英セルに 20 ml/min で導入した。酵素反応により生成したホルマザン色素の検出は, ハロゲン光源と分光器 (オーシャン옵ティクス社製) を用いた吸光度計測で行った。

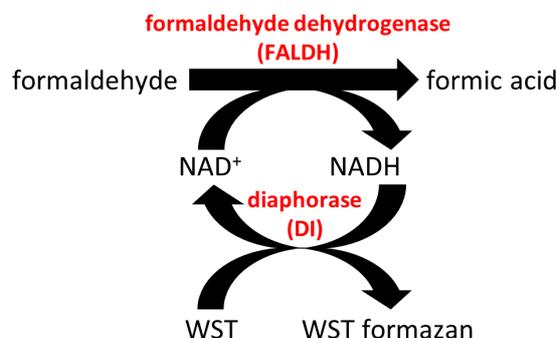


図 1. WST を用いたホルムアルデヒド検出原理

事業名 平成 24 年度 共同研究

*¹⁾ バイオ応用技術グループ*²⁾ 柴田科学株式会社

3. 結果及び考察

図 2 に、ホルムアルデヒド溶液の濃度変化に伴うホルマザン色素の呈色状態を示す。ホルムアルデヒド溶液の濃度に依存して、ホルマザン色素が濃い橙色に呈色する様子が観察できた。生成したホルマザン色素の吸光スペクトルを分光器にて計測した結果を図 3 に示す。ホルムアルデヒド濃度が高くなるにつれ、460 nm 付近にホルマザン色素の顕著なピークが観察された。また、図 4 に示すように、各ホルムアルデヒド濃度に対する波長 460 nm における吸光度には直線性が確認された。そのため、ホルマザン色素の吸光度測定により、ホルムアルデヒド濃度の定量が可能であることが分かった。

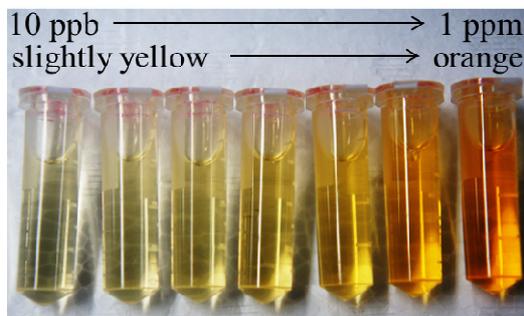


図 2. ホルムアルデヒド濃度毎のホルマザン色素の呈色

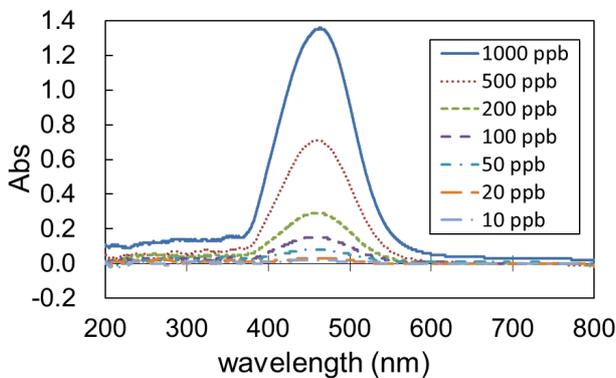


図 3. ホルムアルデヒド溶液濃度に対する吸光スペクトル変化

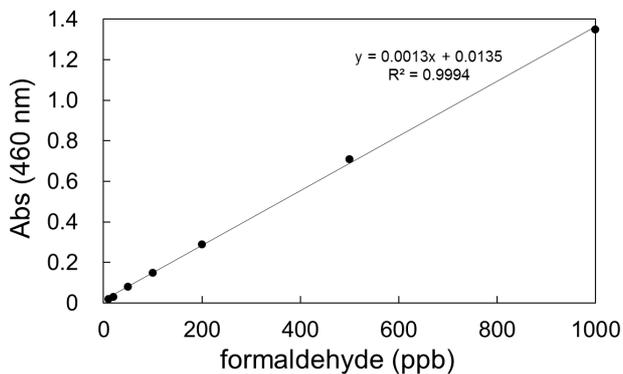


図 4. ホルムアルデヒド溶液濃度に対する吸光度変化

酵素サイクリング法をホルムアルデヒドガス計測に展開したところ、各ホルムアルデヒドガス濃度において、時間経過に伴い、ホルムアルデヒドが溶解し、一定速度で吸光度が上昇していく様子が確認できた。図 5 に、ホルムアルデヒドガス導入後 10, 20, 30 分経過時のホルムアルデヒドガス濃度に対する波長 460 nm の吸光度を示す。どの経過時間においても、ホルムアルデヒド濃度と吸光度には相関関係が確認され、10 分以上で 5 ppb 以上のホルムアルデヒドガスが検出できることが分かった。

酵素サイクリング法を用いたホルムアルデヒド計測は、ホルマザンの比色定量であり、構造を簡略化できるため、装置の小型化が期待できる。また、NADH の蛍光検出と比較して光源の価格も抑えられるため、短時間で高感度な計測が可能な小型かつ低価格な装置開発が可能であると考えられる。

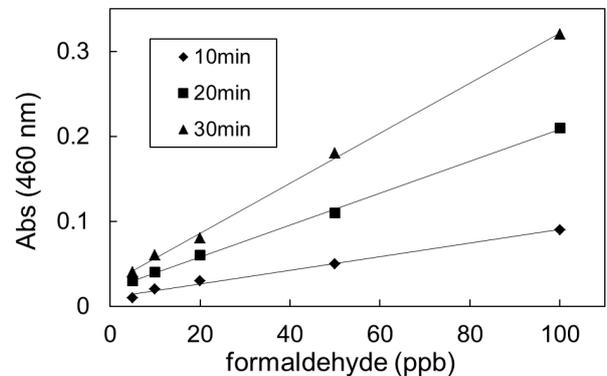


図 5. ホルムアルデヒドガス濃度に対する吸光度変化

4. まとめ

本研究では、酵素サイクリング法を用いてホルムアルデヒド溶液及びガス計測を試みた。その結果、10~1000 ppb の範囲でホルムアルデヒド溶液の検出が可能であった。また、10 分で 5 ppb のホルムアルデヒドガスの検出が可能であり、迅速かつ高感度なホルムアルデヒドガス計測が可能であった。装置の小型化については、ハンディタイプのホルムアルデヒド測定器の製品化に展開する予定である。

(平成 26 年 7 月 7 日受付, 平成 26 年 8 月 8 日再受付)

文 献

- (1) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi and P. G. He : "A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye", Chem. Pharm. Bull., Vol.41, No.6, pp.1118-1122 (1993)
- (2) L. H. Lam, T. Shimamura, S. Manabe, M. Ishiyama and H. Ukeda : "Assay of Angiotensin I-converting Enzyme-inhibiting Activity Based on the Detection of 3-Hydroxybutyrate with Water-soluble Tetrazolium Salt", Analytical Sciences, Vol.24, No.8, pp.1057-1060 (2008)
- (3) W. Khampha, V. Meevootisom and S. Wiyakrutta : "Spectrophotometric enzymatic cycling method using l-glutamate dehydrogenase and d-phenylglycine aminotransferase for determination of l-glutamate in foods", Analytica Chimica Acta, Vol.520, No.1, pp.133-139 (2004)