

化学発光による新しい水質検査法

杉田 収、中野正春、関谷伸一
佐藤一範¹⁾、岡田正彦²⁾

新潟県立看護短期大学、新潟県立中央病院¹⁾、新潟大学医学部検査診断学²⁾

New Method of Water Quality Test by Chemiluminescence

Osamu SUGITA, Masaharu NAKANO, Shin-ichi SEKIYA,
Kazunori SATO¹⁾, Masahiko OKADA²⁾

*Niigata College of Nursing, Niigata Prefectural Center Hospital¹⁾,
Department of Laboratory Medicine, Niigata University of Medicine²⁾*

Summary A new method of water quality test for the determination of active oxygen species in water, by chemiluminescence using acridinium ester is described. The assay is simple and sensitive. The active oxygen species produced by the action of supersonic with distilled water could eliminate by the effect of superoxide dismutases (SOD) and catalase.

In faucet water, deionized water and distilled water, distilled water showed the lowest concentration of active oxygen species. And deionized water showed the secondary concentration. Similarly, the concentration of active oxygen species in an upper stream of river was lower than downstream.

We considered that this assay measured hydrogen peroxide in active oxygen species (oxygen free radicals) because of the principle of the method and stability in water.

The following point is left as future problem : the correlation between the purity of water and the concentration of hydrogen peroxide.

要 旨 新しい水質検査法として、アクリジニウムエステルを用いた化学発光による、水中の活性酸素（種）を測定する方法を提案した。本法は水中の活性酸素を鋭敏にかつ簡便に測定可能であった。蒸留水を超音波処理により得た活性酸素は、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)とカタラーゼにより消去可能であった。また水道水、脱イオン水、蒸留水中の活性酸素は、純度の高い水ほど、低い活性酸素濃度（少ない発光量）を得た。同じ傾向は河川の水に対しても認められ、上流の綺麗な水ほど少ない発光量を得た。本法が測定している活性酸素は、水中での安定性や測定原理から、活性酸素種のなかの過酸化水素を測定しているものと考えられた。しかしその過酸化水素が、なぜ水の純度に相応した発光量として観測されるかが不明であり、残された研究課題である。

キーワード : 水道水 (faucet water), 水質検査 (water quality test), 化学発光 (chemiluminescence), アクリジニウムエステル (acridinium ester), 活性酸素 (active oxygen), 過酸化水素 (hydrogen peroxide).

1、はじめに

水道水は毎日飲むゆえに、まず安全でなければならぬ。上越市で実施している水質検査項目は合計80項目になるが¹⁾、今後も測定せねばならない化学成分は増加するものと考えられる。個々の化学成分の定量分析の追加と共に、水道水の安全性確保のために、水の純度を定性的に簡単に測定する方法も重要と思われる。また身近な問題では、市販の浄水器や市販のミネラルウォーター類を正しく評価できる手軽な手段が望まれている。

ここではそのような包括的な新しい水質検査法の1つになり得るとと思われるアクリジニウムエステルを用いた化学発光法を報告する。本法の測定原理は、活性酸素種の中の過酸化水素を測定するものである。ここでは過酸化水素を、きわめて反応性に富む電子をもった遊離基(フリーラジカル)としての位置づけから、より広い意味の活性酸素に含ませた。

McCabra²⁾の方法に基づくアクリジニウムエステル(AE)を用いた化学発光法は、図1に示す如く、本来蛋白質やDNAに結合したAEを一定量の過酸化水素(H₂O₂)の存在下で、アルカリを加えて発光させるものである^{3, 4, 5)}。われわれはそれを応用し、一定量のAE存在下で、試料中のH₂O₂を測定する系に組み直した⁶⁾。

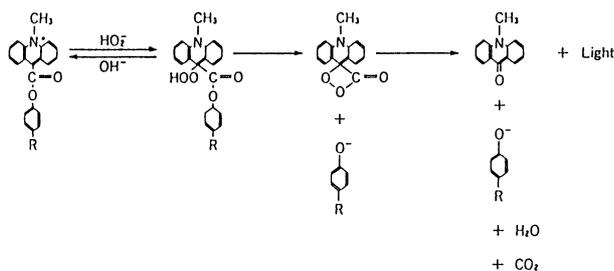


図1 アクリジニウムエステルを用いた化学発光法による活性酸素の測定原理

2、実験方法

アクリジニウムエステルは同仁社から、硝酸鉄、硝酸、水酸化ナトリウム、過酸化水素、ウシ肝臓由来のカタラーゼ、ウシ赤血球由来のSOD(スーパーオキシドデイスムターゼ)は和光純薬(株)から得た。測定機器は化学発光測定装置ケミルミアナライザーII(チバ・コーニング・ダイアグノステック社)である。

試薬組成を表1に、操作法を表2に示した。測定はすべて5重測定で、その平均値を測定値とした。

表1 活性酸素測定用試薬組成

【第一試薬】		
HNO ₃	(比重1.38)	0.75ml
Fe(NO ₂) ₂ · 9H ₂ O	(2mg/ml)	8.36ml
アクリジニウムエステル	(5ng/ml)	3.34ml
合計 (H ₂ Oでメスアップ)		100ml

【第二試薬】	
NaOH	0.25N

表2 ケミルミアナライザーII型を用いた活性酸素測定操作法

試料	100μl	
第一試薬	300μl	混和
	37℃	インキュベーション 15分
第二試薬	300μl	混和
発光量の測定		2秒間

a. 市販の約30%濃度の過酸化水素水を用い、それを蒸留水で10⁶~10⁹倍希釈して、4種の濃度の過酸化水素を調整した。そしてそれらの過酸化水素水を用いて、本法の直線性をみた。

b. カタラーゼとSODの作用で、活性酸素が除去できた場合、活性酸素が存在した証明となる⁷⁾ことから、その除去能をみた。蒸留水を超音波処理し、活性酸素を生成させて、その活性酸素を含む蒸留水10mlに、それぞれ0.05mol/lのリン酸緩衝液pH7.8に溶解したカタラーゼ100U/5μlとSOD33U/0.1mlを添加し、活性酸素の除去の有無を観察した。

c. 水道水、脱イオン水、蒸留水など、入手できた6種類の水(表4)について、活性酸素を測定した。表上段からの水道水、脱イオン水、蒸留水(東洋科学産業GS-20N)はいずれも、採取直後の水である。「蒸留水(新大病院)24時間室温放置」は、表下段の「蒸留水(新大病院)採取直後」に相当する蒸留水を実験前日に用意して、ガラスビーカーに入れて室温で、埃の混入しない状態で放置した水である。富士山麓水は、正確には富士山麓水の蒸留水で、ポリタンクで新潟まで運搬された水である。

d. 上越市を流れる関川、矢代川の水や新潟県立看護短大に供給されている水道水、及びその蒸留水、また妙高山麓の苗名滝近くの沢水中の活性酸素を測定した。水試料はテフロン製の試薬ビンに収集し、冷蔵庫で保管して3日後に測定した。

3、結果

a. 市販の過酸化水素水を $10^6 \sim 10^9$ 倍まで蒸留水で希釈し、その発光量（カウント）をみた。1,000～100,000カウントまでほぼ直線が得られた（図2）。なお同時再現性（CV）（ $n=10$ ）は2.5%であった。

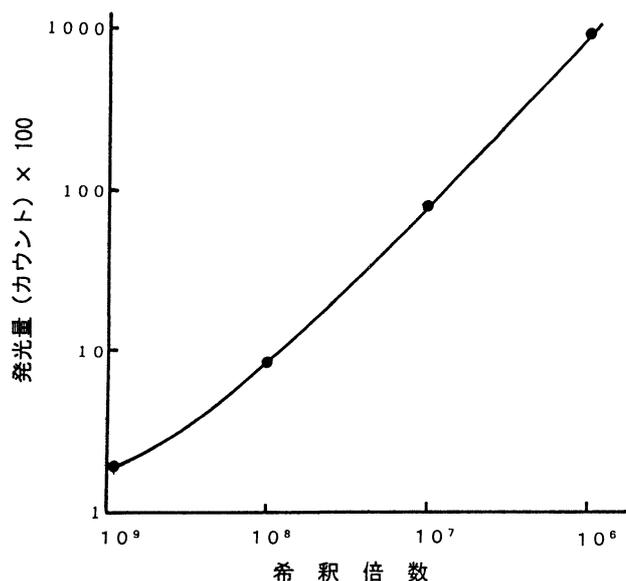


図2 過酸化水素の希釈液による発光量の直線性
（市販の約30%過酸化水素を蒸留水で希釈した）

b. 活性酸素の消去実験の結果を表3に示した。カタラーゼにより63.7%、SODにより33.6%消去され、カタラーゼとSODの両者の添加で100%消去された。

c. 測定した6種類の水のなかで、「蒸留水（新大病院）採取直後」の水試料が最も発光量が少なく、脱イオン水、水道水の順で発光量が増加した。また蒸留水でも、24時間室温放置したものは、若干の上昇が見られた（表4）。

表3 活性酸素の消去実験

試料	発光量	ブランクを引いた発光量
蒸留水	1620	0
超音波処理蒸留水	7600	5980
上記試料+カタラーゼ	3790	2170(63.7%)
蒸留水	1590	0
超音波処理蒸留水	5840	4250
上記試料+SOD	4410	2820(33.6%)
蒸留水	1750	0
超音波処理蒸留水	6000	4250
上記試料+カタラーゼ+SOD	1700	-50(100%)

表4 水道水、脱イオン水、蒸留水中の活性酸素

水の種類	発光量 (カウント)	ブランクを引いた値
水道水（新潟市旭町）	8330	800
脱イオン水（東洋科学産業GS-20N）	8020	490
蒸留水（新大病院）24時間室温放置	7800	270
富士山麓水（協和メデックスKK工場）	7700	170
蒸留水（東洋科学産業GS-20N）	7600	70
蒸留水（新大病院）採取直後	7530	0

表5 河川、沢水、水道水中の活性酸素
（看護短大：新潟県立看護短期大学）

試料	発光量 (カウント)	ブランクを引いた値
直江津河口近くの関川	802	162
看護短大近くの八代川	742	102
看護短大近くの関川	692	52
苗名滝近くの沢水	658	18
水道水（看護短大、上越市新南町）	644	4
蒸留水（看護短大）	640	0

d. 関川や看護短大の水道水を測定した結果は表5に示した。蒸留水の発光量はもっとも少なく、次に水道水、上流の苗名滝近くの沢水と続いた。河川では下流の採水地の水ほど、多い発光量であった。

4、考察

活性酸素の存在を証明することは難しい。前述の如く、「カタラーゼ・SOD系でそのものが消去されたならば、そのものは活性酸素である。」といわれている。提示した新しい水質検査法は、カタラーゼ・SOD系で、そのものが完全に消去された（表3）ことから、活性酸素を測定する系であるといえる。

本法の同時再現性は2.5%であるから、表4の「富士山麓水の蒸留水」と「蒸留水（東洋科学産業GN-20N）」および「新大病院の採取直後の蒸留水」とは、有意差は認められない。しかし「新大病院の採取直後の蒸留水」と「蒸留水（新大病院）24時間室温放置」とは危険率5%で、また「新大病院の採取直後の蒸留水」と「脱イオン水（東洋科学産業GN-20N）」では、危険率1%で有意差が認められた。このように水道水、脱イオン水、蒸留水の微妙な水質の違いが示されており、水の純度の高いものほど、発光量が少ないと考えられた。データは示さなかったが、調査した数

機種⁹⁾の市販の浄水器からの水は、同時に採水した水道水より、どの機種も明らかに、少ない発光量であった。

河川、沢水、水道水および蒸留水中の活性酸素も、水に溶存する化学物質が少ないと思われる水ほど、少ない発光量として観測された。看護短大近くで矢代川が関川に合流し、そこから数km下流が直江津河口になる。その合流地点から直江津河口の間の関川には、何本もの排水管や小川から生活雑排水が流れ込んでいる。従ってもっとも汚れた水は、直江津河口近くの関川であり、それに対応して発光量も多かった。

水中での安定性⁸⁾と、測定原理から、本法は過酸化水素を測定しているものと考えられる。本法の発光量が、水の純度に対応する事は、やはり活性酸素種⁹⁾の1種である過酸化脂質の研究中に偶然発見された¹⁰⁾。そのため発光と水の純度の関係は、まだ不明である。

本法の問題点は、化学発光という極めて高感度な検出系のため、測定当日の実験室の照度、温度、試薬調整時からの経過時間等でブランク値が大きく異なる点である。それが表4、表5に示されている。表5の実験の発光量は少ない。この原因はA E液調整後の経過時間(-70℃1年保存)によるものと考えられる。

本法はまだ幾つかの問題点を含むものの、水道水の原水、および水道水の「純水さの判定」には役立つものと考えられる。

本研究は新潟県立看護短期大学共同研究事業より補助を受けた。

文 献

- 1) 杉田収、中野正春、関谷伸一他：上越市の水道水。新潟県立看護短期大学紀要、1、1-8、1996。
- 2) McCapra, F. : Chemical mechanisms in bioluminescence. *Acc. Chem. Res.* 9, 201-208, 1976.
- 3) Weeks, I., Beheshti, I., McCapra, F. et al. : Acridinium esters as high specific-activity labels in immunoassay. *Clin. Chem.* 29, 1474-1479, 1983.
- 4) Bagazgoitia, F. J., Garcia, J. L., Diequez, C. et al. : Effect of surfactants on the intensity of chemiluminescence emission from acridinium ester labelled proteins. *J. Bioluminescence Chemiluminescence.* 2, 121-128, 1988.
- 5) Stockman, L., Clark, K. A., Hunt, J. M. et al. : Evaluatuon of commercially available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for

culture identification of blastomyces dermatitidis, coccidioides immitis, cryptococcus neoformans, and histoplasma capsulatum. *J. Clin. Microbiol.* 31, 845-850, 1993.

- 6) 杉田収、山田俊幸、岡田正彦他：アクリジニウムエステルを用いた化学発光による活性酸素の測定。臨床化学、21, 104b, 1992.
- 7) 井上正康監訳、脂質過酸化反応を抑制する酵素系、活性酸素と疾患、学会出版センター、東京、303-304, 1987.
- 8) 浅田浩二、中野稔、柿沼カツ子編、活性酸素測定マニュアル、講談社サイエンティフィック、東京、1-7, 1992.
- 9) 大柳善彦著、フリーラジカル、活性酸素とは、SODと活性酸素調整剤、日本医学館、東京、3-6, 1989.
- 10) 杉田収、岡田正彦、木村聡他：ヒト血清過酸化脂質測定法の改良。臨床病理、41, 914-918, 1993.