

固定化ピルビン酸オキシダーゼおよび固定化乳酸 オキシダーゼを用いた血漿中ピルビン酸、 乳酸の自動蛍光測定法

池 本 正 生, 田 畑 勝 好

Automated fluorometric determination of pyruvate and lactate in
plasma using immobilized pyruvate oxidase and immobilized
lactate oxidase in column form

Masaki IKEMOTO, Masayoshi TABATA

ABSTRACT: A highly sensitive method for the automated fluorometric determination of pyruvate and lactate in human plasma using immobilized pyruvate oxidase and immobilized lactate oxidase in column form that does not require a blank correction is described. The method was based on the fluorometric determination of hydrogen peroxide formed by the action of pyruvate oxidase or lactate oxidase. Since the addition of sodium chloride to the recipient solution improved the dialysis rate of pyruvate by approximately three times, this method did not require a blank correction for the constituents that occurred in the fluorescent reaction. The present method was found to give perfect linearity of the data up to 0.4 mM for pyruvate and 8.0 mM for lactate with satisfactory precision, reproducibility and accurate reaction recoveries. The immobilized enzyme reactor unit showed good operational stability for a 5-week period, during which time it was repeatedly used for analysis over 2000 times. The results correlated satisfactorily with those obtained by well-established chemical and enzymatic methods.

Key words: Immobilized enzyme, Pyruvate, Lactate, fluorometric determination

緒 言

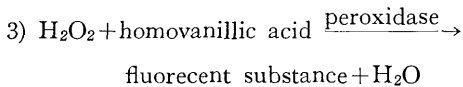
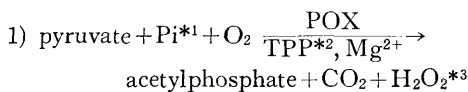
血液中の非蛋白成分であるピルビン酸、乳酸

は健常人では比較的低濃度で存在する。現在、これらの成分の測定に広く用いられている方法は、乳酸脱水素酵素 (LDH) を作用させ、その際に増減する NADH の 340 nm の吸光度変化を捉える方法^{1~3)} またはその蛍光強度を捉える方法^{4~7)} である。蛍光法は、非常に測定感度が高くピルビン酸、乳酸はそれぞれ 0.56 mM,

京都大学医療技術短期大学部衛生技術学科
Division of Medical Technology, College of Medical
Technology, Kyoto University.
1988年7月7日受付

3.3 mM の濃度まで測定可能である。しかし従来の方法は、試料が多量必要であること、また NADH の蛍光発生に対する干渉物質除去のための除蛋白操作⁶⁾が必要であった。さらに、分析操作に長時間を要すること、また検量線の直線性も十分満足できるものではなかった⁷⁾。

そこで我々は、固定化ピルビン酸酸化酵素 (POX) 及び固定化乳酸酸化酵素 (LOX) を用いて、ピルビン酸、乳酸の迅速で高感度な自動蛍光測定法の開発を試みた。本法の測定原理を下記に示す。



*1: 無機リン, *2: チアミンピロリン酸, *3: 過酸化水素

ピルビン酸測定は、反応式1)で固定化 POX によりピルビン酸を酸化し H₂O₂ を発生させ、反応式3)で水溶性ペルオキシダーゼ^{8,9)} によって蛍光物質を生成しその蛍光強度を測定する。乳酸測定においては、反応式2)で固定化 LOX により乳酸を酸化して得られた H₂O₂ を反応式3)によってピルビン酸と同様に測定する方法である。本法の特徴は、ダイアライザー受け側の受容液に塩化ナトリウムを添加することによって未添加の場合に比較し微量にしか存在しないピルビン酸の透析率を約3倍に効率よく高めることができたことである。他方乳酸に対しては顕著な変化はなかった。その結果、ピルビン酸測定においては盲検を測定する必要がなくなり、高感度で迅速な自動蛍光測定法の開発に成功した。

材料および方法

1. 機器

- 1) テクニコン・オートアナライザー I 型
- 2) 蛍光分光光度計: 日立650-10 S (光路長

10 mm, フローセル)

2. 試薬

- 1) ピルビン酸オキシダーゼ (EC 1.2.3.3, 509 U/ml, Bacteria, 協和発酵, 東京)
- 2) 乳酸オキシダーゼ (EC 1.1.1.27, 18.0 U/mg, *Pediococcus* sp., 東洋醸造, 東京)
- 3) ペルオキシダーゼ (EC 1.1.1.17, grade III, 117 U/mg, 西洋ワサビ, 東洋紡, 大阪)
- 4) NADH, NAD (興人, 東京)
- 5) その他の化学試薬は半井テスク (京都) より得た
- 6) 多孔性アルキルアミンガラス (No. 23908, 20~80 mesh, 孔径 50 nm, Pierce 化学社)

3. 酵素の固定化と固定化酵素カラムの作成

POX 及び LOX は、シッフ塩基結合法に基づいてグルタルアルデヒドを用いてアルキルアミン粒子に固定化した¹⁰⁾。収率は遠藤らの方法¹¹⁾によりそれぞれ90%であった。さらに固定化 POX および固定化 LOX ガラスビーズを内径 1.5 mm, 長さ 2 mm, 10 mm のプラスチックチューブにそれぞれ充填して固定化酵素カラムとした。カラムには POX および LOX がそれぞれ 2.5 mg および 1.8 mg 含まれる。

4. 分析方法

そのフローダイアグラムを図1に示す。サンプルを吸引後蒸留水で希釈する。受容液 (10 mM リン酸緩衝液, pH 6.5, TPP, Mg²⁺, 1% NaCl を含む) に対して透析する。ピルビン酸および乳酸を含む透析外液の一部を乳酸測定用に取り、残りをピルビン酸測定用とする。試料は、カラムを通過する際に固定化酵素により酸化されその結果 H₂O₂ が発生する。その H₂O₂ をペルオキシダーゼおよびホモバニリン酸 (HVA) の存在下において定量的に HVA の二量体に変換し、励起波長 315 nm, 蛍光波長 425 nm でその蛍光強度を測定する。測定操作は、全て室温で行った。但し、図1には同時測定用としての分析システムを示してあるが、蛍光光度計が1チャンネルであるため一方を測定しているときは他方の流路は直接廃棄に導きピルビン酸、乳酸をそれぞれ別々に測定している。

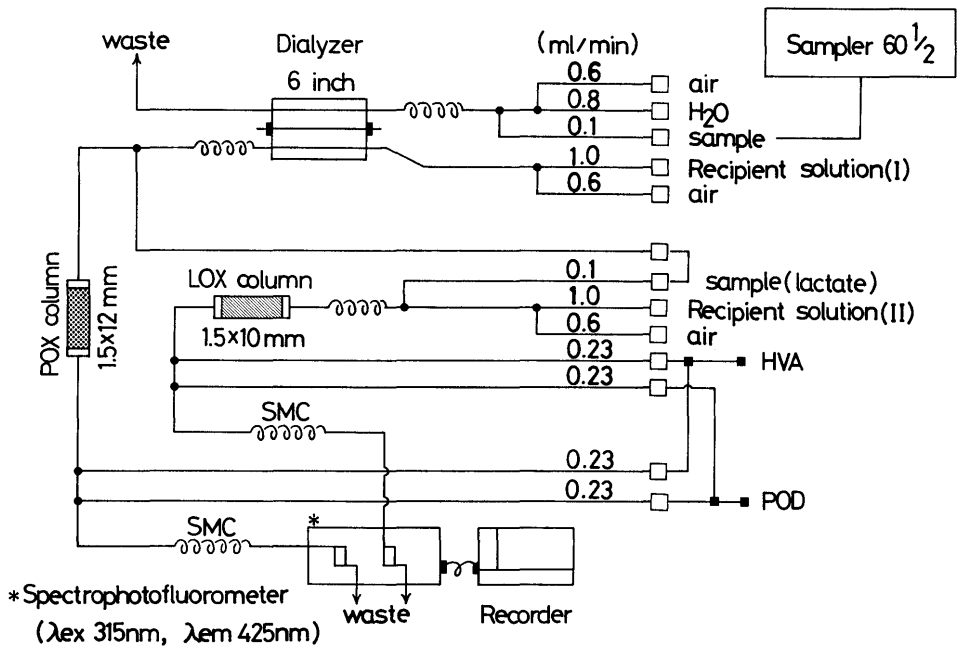


図1 固定化ピルビン酸オキシダーゼおよび固定化乳酸オキシダーゼ充填カラムを装着したオートアナライザーの分析システム

受容液(I): 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に 1% NaCl および至適濃度の TTP, Mg²⁺ を含む。受容液(II): 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 1% NaCl を含む。
HVA: ホモバニリン酸, POD: ペルオキシダーゼ

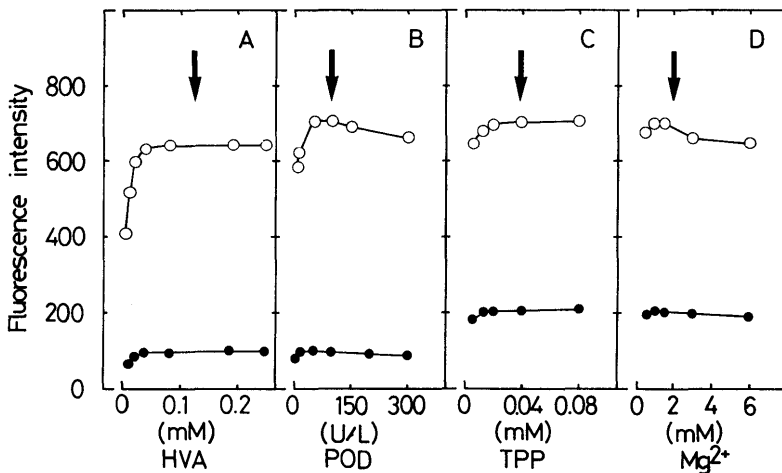


図2 ホモバニリン酸 (HVA), ペルオキシダーゼ (POD), チアミンピロリン酸 (TPP), マグネシウム (Mg²⁺) の至適濃度の検討

(○) 5%ウシ血清アルブミンで調製したピルビン酸標準液, (●) プール血清, なおこの分析は, 図1の分析システムで行った。検討項目以外の試薬濃度は, 少し過剰に添加した。

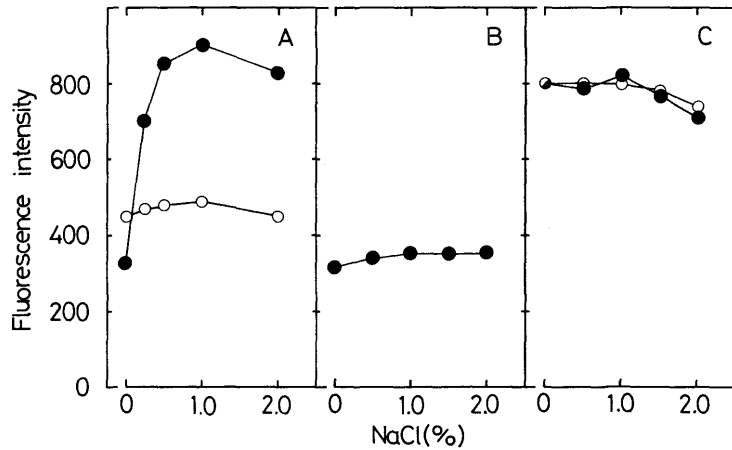


図3 受容液中への塩化ナトリウムの添加効果の検討
 (●) 固定化ピルビン酸オキシダーゼ, (○) 固定化乳酸オキシダーゼ
 (A) : 図1の分析システムを使用した。
 (B) : 塩化ナトリウムのペルオキシダーゼ反応への影響。
 (C) : 塩化ナトリウムの固定化酵素反応への影響

結 果

1. HVA, POD, TPP および Mg²⁺ の至適濃度

HVA, POD (ペルオキシダーゼ), TPP および Mg²⁺ の至適濃度を検討した。目的とする試薬を検討する際は、他の試薬濃度を少し過剰に設定して行った。図2の矢印で示されているように、至適濃度はそれぞれ 0.13 mM, 100 U/L, 0.04 mM, 2 mM であった。

2. 緩衝液の選択

試料は H₂O₂ (10⁴~10⁵倍希釈) を用い緩衝液としてリン酸, ホウ酸, グリシンおよびトリス塩酸緩衝液を使用して pH 5.0~9.0の範囲で POD-HVA-Peroxidase の反応系を基に用手法で検討した。これらの緩衝液の中では、トリス塩酸緩衝液を用いた場合の蛍光強度が最も高かった。そこでさらに数種類のグッドの緩衝液を用いて検討したところ、ビストリスプロパン緩衝液における蛍光強度が最大強度を示した。しかし、アルカリ側ほどブランク値も高くなる傾向にあった。

3. 受容液中への塩化ナトリウムの添加効果

図1の分析システム中のダイアライザーでの

ピルビン酸および乳酸の透析率を高める目的で受容液に塩化ナトリウムを添加しその効果を検討した。図3に示すようにピルビン酸においては、無添加に比べ塩化ナトリウムの濃度が1%のとき約3倍の透析率を示したが、乳酸においてはほとんどその効果は認められなかった(図3-A)。一方塩化ナトリウムによるPOXの活性化効果および蛍光反応の増強効果はなかった(図3-B, C)。

4. 液性および固定化 POX の pH 活性曲線

液性および固定化 POX の pH 活性曲線を pH 6.0~8.0の範囲でリン酸緩衝液を用いて検討した。液性POXのpH活性曲線は報告されているもの¹²⁾と変化はなかったが、固定化POXのpH活性曲線は、至適pHの範囲が酸性側、アルカリ性側の両側に少しひろがりを見せた(図4)。その結果固定化POXの至適pHは6.5であることが判明した。

5. 固定化 POX および固定化 LOX の使用安定性

約2000回の分析回数に対して固定化POX及び固定化LOXの残存活性率は、それぞれ90%, 85%であった。また50mMリン酸緩衝液

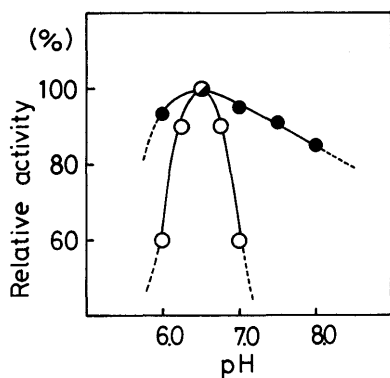


図4 ピンビン酸オキシダーゼのpH 活性曲線

- (○) 水溶性ピルビン酸オキシダーゼ
- (●) 固定化ピンビン酸オキシダーゼ

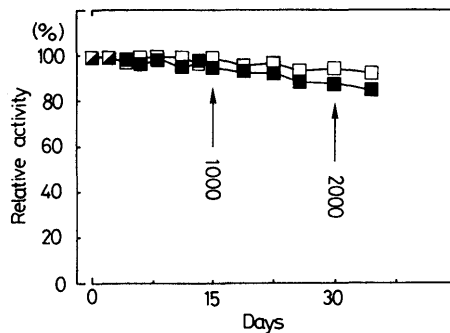


図5 固定化ピンビン酸オキシダーゼおよび固定化乳酸オキシダーゼの図1の分析システムでの使用安定性

- (□) ピルビン酸オキシダーゼ
- (■) 乳酸オキシダーゼ

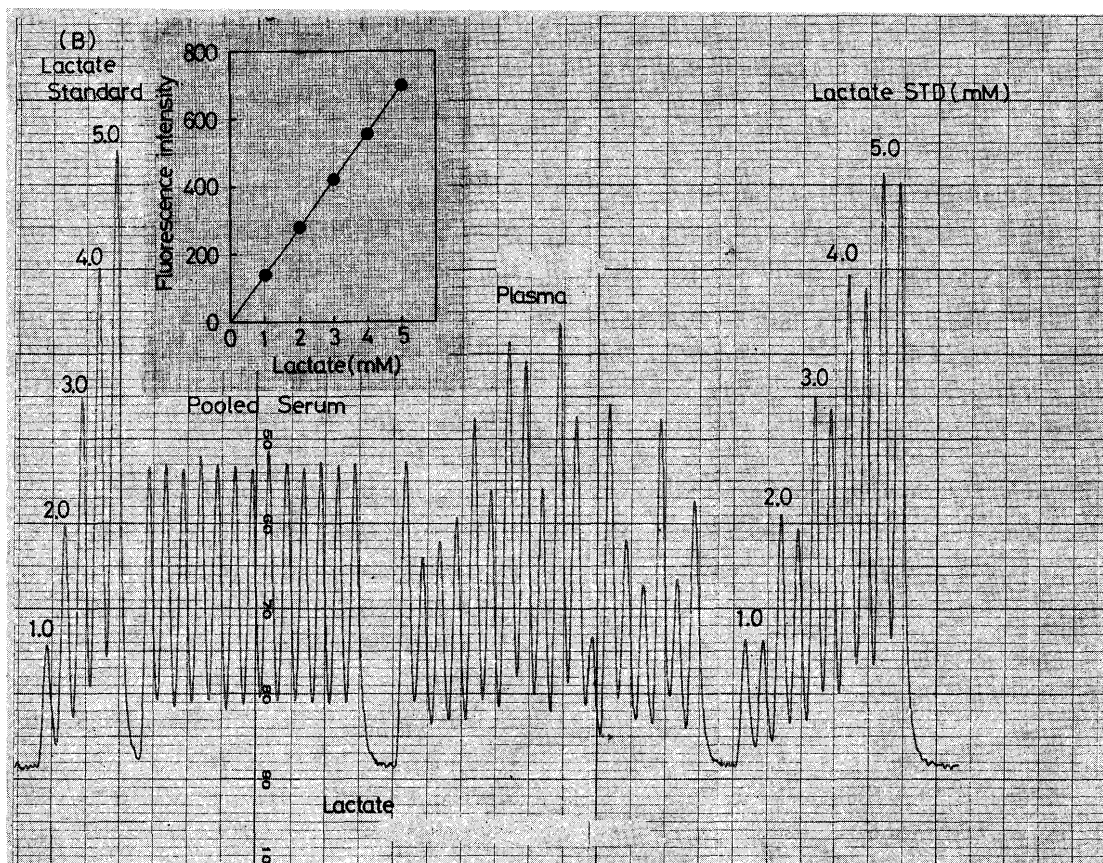


図6 図1の分析システムによる乳酸測定のプロージャートと検量線
(●) 蒸留水で調製したピンビン酸標準液

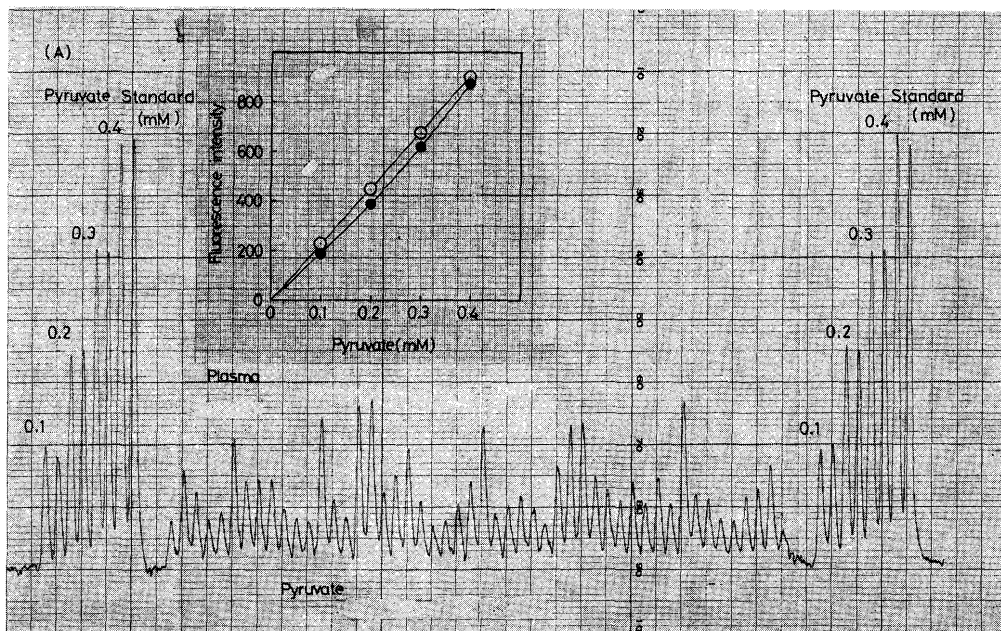


図7 図1の分析システムによるピルビン酸測定のプロークャートと検量線
 (○) 5%ウシ血清アルブミン水溶液で調製したピルビン酸標準液
 (●) 蒸留水で調製したピルビン酸標準液

(pH 7.0) 中冷蔵保存(約4°C)した場合、約3カ月間は活性に変化はなかった(図5)。

6. 検量線の直線及びプロークャート

5%牛血清アルブミン溶液および蒸留水に溶解している標準液を用いてピルビン酸及び乳酸の検量線の直線性を検討した。乳酸は、いずれの標準液においても5 mMまで十分に直線性

Table 1 Reproducibility and precision of pyruvate and lactate determination

	concentration (mM)	coefficient of variation (%)	
		within day	day to day
Pyruvate			
Sample [I]	0.1	1.7	2.0
Sample [II]	0.25	1.4	1.9
Lactate			
Sample [I]	1.0	1.9	2.2
Sample [II]	4.0	1.5	1.8

ピルビン酸および乳酸の同時再現性ならびに日差再現性をプール血清を試料として用い、図1の分析システムを用い測定した。同時再現性は30回同時測定から、日差再現性は30日間連日測定をそれぞれの試料を用いて行った結果から求めた。

を確認したが、ピルビン酸においては5%牛血清アルブミン標準溶液でのみ0.4 mMまで直線性を確認した(図6, 7)。

7. 日内および日差再現性

低濃度および高濃度のピルビン酸および乳酸を含むプール血清を用いて日内および日差再現性を検討し、表1に示す結果を得た。

8. 回収試験について

プール血清9容に対し2 mMピルビン酸および40 mM乳酸を1容の割合に添加し図1の分析システムにおいて添加回収試験を行った。ピルビン酸、乳酸共に96~98%の結果を得た。

9. 他の酵素法との相関

京大病院外来患者の検体を用いて、本蛍光法とLDH(液性)を用いた従来法との相関を検討した。ピルビン酸および乳酸に対して、回帰直線は、それぞれ $y=0.97+0.001x$, $y=1.03x-0.1$, 相関係数は、それぞれ $r=0.996$, $r=0.984$ であった(図8)。

10. 還元物質およびその他の影響

アスコルビン酸、還元型グルタチオン、尿酸、

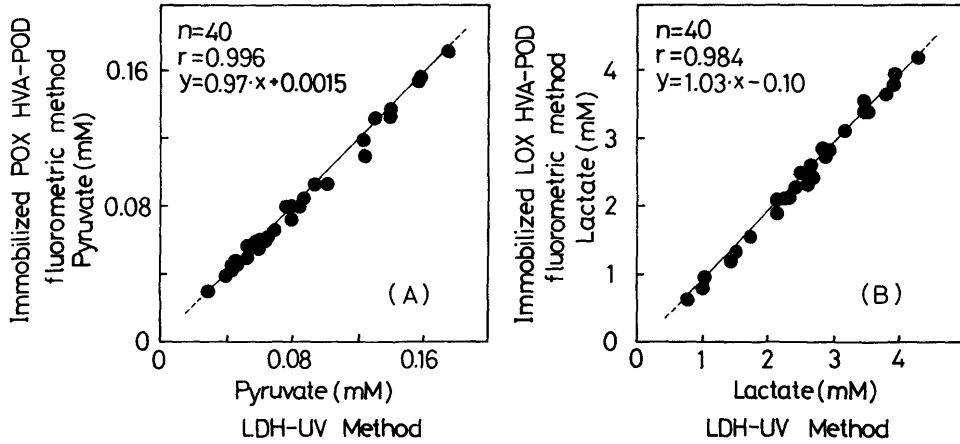


図8 水溶性酵素を用いた方法と固定化酵素法との相関

クレアチン, クレアチニンについて本蛍光法への影響に関する検討を図1の分析システムを用いて行った。その結果, 還元型グルタチオン, 尿酸, クレアチン, クレアチニンは, それぞれ 100 mg/dl, 20 mg/dl, 20 mg/dl, 20 mg/dl まで影響が認められなかったが, アスコルビン酸に関しては, 10 mg/dl の濃度で約 5% の負の影響を与えた。

考察および結論

ピルビン酸は, ヒト血清中に微量しか存在せず乳酸の約20分の1でその正常濃度は, 0.03 ~ 0.10 mM である。従ってピルビン酸の測定は, 通常の測定感度よりもより感度の高い測定方法が必要である。従来の LDH を用いた酵素法は, サンプル量も多く操作も煩雑であった。また同酵素の作用により変化した NADH の蛍光強度を測定する方法でも, 比較的サンプル量が多いこと, ブランク値を必ず必要とすること, かつ直線性が十分でないという欠点があった。我々の方法は, 図1のフローダイアグラムに示すようにサンプル中のピルビン酸および乳酸をダイアライザーで透析する際, 蛍光反応を阻害したり非酵素的反応の原因となる大部分の共存物質を除去するとともに受容液に1%の割合で塩化ナトリウムを添加することにより, 効果的にピルビン酸の透析率を約3倍に高めることに

成功した。そのため未添加の際に見られた僅かのブランク値も相対的にほぼ完全に無視することが可能となった。一方乳酸においては, このような顕著な効果はなかった。この効果の主な理由としては, pH が6.5で陰に帯電しているピルビン酸が, 受容液のナトリウムイオンの正電荷に引かれることおよび浸透圧の上昇による受容液側への吸引効果によるものと考えられる。以上から本蛍光法は, サンプル量も従来の10分の1以下ですみ, かつ相対的にブランクチャンネルが必要でない有用な測定方法である。また, 処理速度も 60~80/hr と比較的速く, 再現性回収率および他の酵素法との相関も十分満足できるものである。さらに今回は, 機器条件の制約によるピルビン酸, 乳酸を別々に測定したが, 実際には2チャンネルの蛍光光度計を使用すればピルビン酸, 乳酸を一度のサンプリングで同時に測定できることも大きな利点である。

文 献

- 1) Segal, S., et al.: An enzymatic spectrophotometric method for the determination of pyruvic acid in blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 48: 137-143, 1956.
- 2) Wiggins, H. S., et al.: The determination of pyruvate in plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, 47: 978-984, 1956.
- 3) Landon, J., et al.: Blood pyruvate concentration

- measured by a specific method in method in control subjects. *J. Clin. Path.*, 15: 579-584, 1962.
- 4) Hadjivassilou, A. G. & Rieder, S. V.: The enzymatic assay of pyruvic and lactic acid. A definitive procedure. *Clin. Chim. Acta*, 19: 357-361, 1968.
 - 5) Antonis, A., et al.: A semiautomated fluorimetric method for the enzymatic determination of pyruvate, lactose, acetoacetic acid, β -hydroxybutyrate level in plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, 68: 340-356, 1966.
 - 6) Passen, S. & Gennaro, W.: An automated system for the fluorometric determination of serum lactate dehydrogenase. *Am. J. Clin. Path.*, 46: 69-81, 1966.
 - 7) Cramp, D. G.: Automated enzymatic fluorimetric method for the determination of pyruvate and lactic acids in blood, *J. Clin. Path.*, 21: 171-174, 1968.
 - 8) Guilbault, G. G., et al.: New substrate for the fluorometric determination of oxidative enzymes. *Analy. Chem.*, 40: 1256-1259, 1968.
 - 9) Guilbault, G. G., et al.: Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. *Analy. Chem.*, 40: 190-194, 1968.
 - 10) Weetall, H. H.: *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides*, Marcell Dekker, New York, NY, 1975.
 - 11) Endo, J., et al.: Use of immobilized enzymes in automated clinical analysis. Determination of uric acid and glucose using immobilized enzymes in column form. *Clin. Chim. Acta*, 95: 411-418, 1979.
 - 12) TOYO JYOZO Enzyme catalog, Tokyo, Japan, 1984.