

固定化クレアチナーゼを利用した血清クレアチニンのけい光測定法の研究

池 本 正 生, 田 畑 勝 好

Fluorimetric Determination of Serum Creatinine Using Immobilized Creatininase

Masaki IKEMOTO and Masayoshi TABATA

ABSTRACT: A fluorimetric method using immobilized creatininase is described for the determination of creatinine in serum by continuous-flow analysis. In this method, creatinine in serum was dialyzed against acceptor buffer solution with a dialyzer after conversion of preformed creatine with creatine kinase-pyruvate kinase coupled enzymatic system and transformed to creatine by the immobilized creatininase column.

The creatine reacted with ninhydrin in strongly alkaline solution to form highly fluorescent products, which were measured fluorimetrically. This reaction has been used as the basis for a simple, sensitive fluorimetric method for the determination of creatine in serum and urine.

The present method offers the advantages of automation, high sensitivity, high precision, small sample volume and enhanced specificity owing to the use of enzyme.

In addition, the method gave a linear standard curve for creatinine concentration up to 100 mg/l and the results well correlated with those obtained by Jaffé's method.

は じ め に

クレアチニンの測定は, Jaffé 反応¹⁾に基づいており Folin²⁾ によってクレアチニンの定量に導入されて以後, 数多くの研究者^{3,4)} によりその反応機構の解明と定量法の改良が試みられている。この反応は, 活性メチレン基の反応であ

ると考えられているためクレアチニンに特異的ではなく多くの干渉物質^{5,6)} が存在し, 最近では薬剤の影響も注目され問題点の一つとなっている。また感度不足のため多量の血清が必要であることも実用上の問題である。

一方, 特異性の増加と操作の簡便化の問題を解決するために酵素法⁷⁻⁹⁾ が考案されたが, それでも感度, 経済性その他の問題が残されている。

クレアチンは, アルカリ性下でニンヒドリンと反応し強力なけい光¹⁰⁾ (励起波長 λ_{ex} : 400

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
1982年9月受付, 同年10月受領

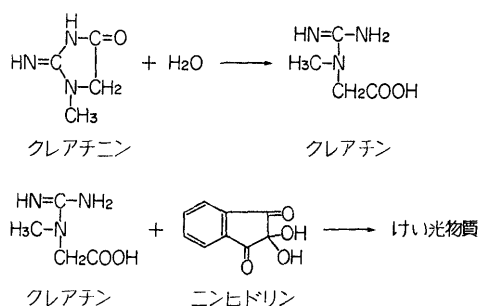


図1 クレアチンとニンヒドリンとの反応式

nm, けい光波長 λ_{em} : 505 nm) を発するが, クレアチンはほとんどこの反応を示さないという性質を持っている¹⁰⁾。また, 我々は, クレアチンリン酸もこの反応を示さないことを確認したので, この性質を利用し血清クレアチニンのけい光測定を試みた。その測定原理は, まず血清中の既存クレアチンを Creatine kinase-Pyruvate kinase (CK-PK) 共役酵素系の反応を用いてクレアチンリン酸に変換し, あらかじめ完全に除外する。次に, 血清クレアチンを固定化クレアチナーゼによりクレアチンとし, そのクレアチンとニンヒドリンとの反応(図1)により生ずるけい光を測定することにより, 血清クレアチニン量を求めるものである。

けい光測定法の特徴は, 非常に高感度であるが, 一方血清中の干渉物質によって盲検値が存在するという短所を同時に有しているので, 我々は, 特異性を維持し検体量の微量化を最大の目的として, クレアチニンのけい光測定法の研究を行なった。

材 料 と 方 法

〔機 器〕

1. けい光分光光度計: Hitachi 650-10 S (フローセル; 90 μ l 用)
2. テクニコン・オートアナライザー I 型

〔試 薬〕

1. クレアチンキナーゼ (CK, EC 2. 7. 3. 2, 25 U/mg, ベーリンガー・マンハイム山ノ内, 東京)

2. ビルビン酸キナーゼ (PK, EC 2. 7. 1. 40, 213 U/mg, from rabbit muscle, Grade III, 東洋紡)
 3. クレアチナーゼ (EC 3. 5. 2. 10, 1.5 U/mg, from pseudomonas, Grade III, 東洋紡)
 4. ATP (Adenosine-5'-triphosphate, disodium salt, Lot. 3437, 半井化学)
 5. PEP (Phospho (enol) pyruvic acid trisodium salt, No. p 7002, Lot. 71 F-3845, Sigma)
- その他の試薬は半井化学 (京都) のものを使用した。
6. 多孔性アルキルアミンガラス粒子 (孔径 500 Å, 粒子サイズ 125~177 μ , Lot. 092980-3, Pierce 化学社)

〔酵素の固定化と固定化酵素カラムの作成〕

図2に示されているグルタルアルデヒドによる Schiff 塩基結合法¹¹⁾により, クレアチナーゼをアルキルアミンガラス粒子に固定化した。遠藤らの方法¹²⁾により計算し, タンパク質の収率は92%であった。この固定化酵素を遠藤らの方法¹²⁾により内径 1.5 mm, 長さ 20 mm のカラムに充填して固定化クレアチナーゼカラムを作成した。

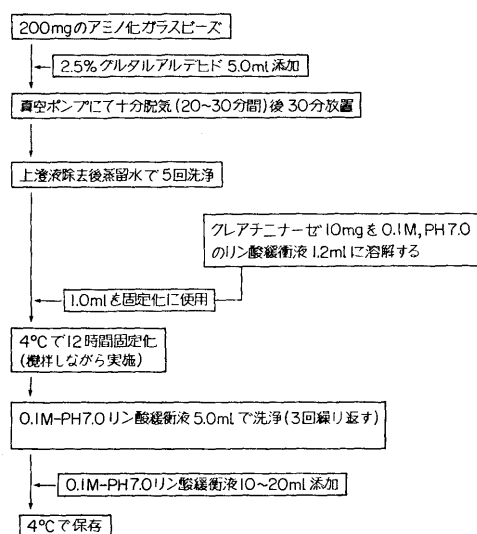


図2 クレアチナーゼ固定化法の概略

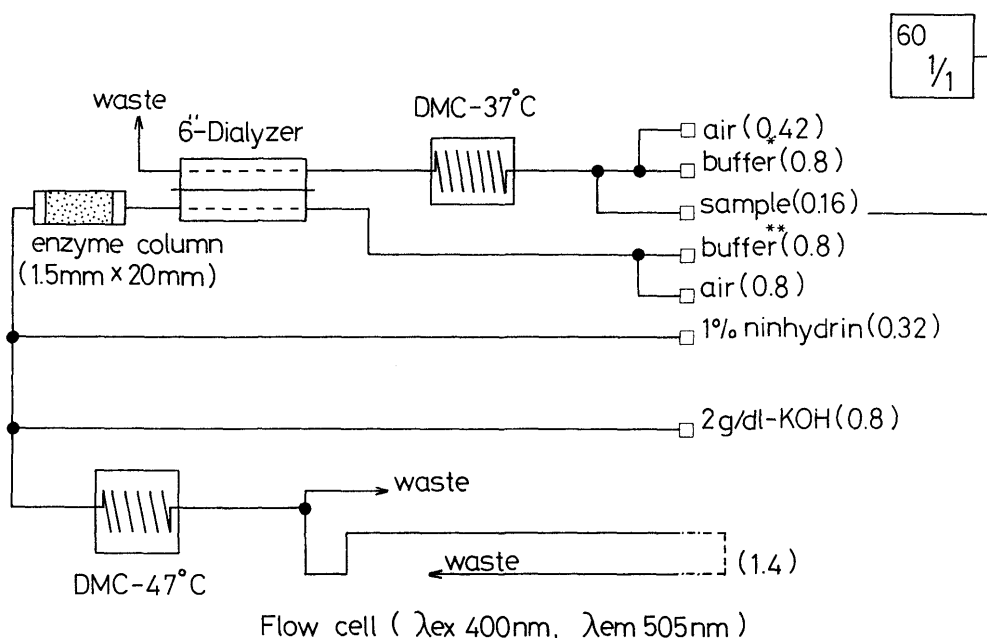


図3 オートアナライザーに装着された固定化クレアチナーゼカラムリアクターを使用した血清クレアチニンの分析システム. () 内 ml/min, *印 0.1M, pH 9.0 グリシン緩衝液, **印 0.1M, pH 7.4 リン酸緩衝液, DMC; double mixing coil

[分析方法]

1. 用手法

用手法は、以下に示す順序で測定した。

1) サンプル (標準液または患者血清) 0.1ml に CK-PK 酵素緩衝液 0.5ml を加え 37°C 10 分間放置後ソモジーの除蛋白法により除蛋白する。その上清 0.1ml を採取する。

2) クレアチナーゼを 40 U/ml の濃度に調製した酵素緩衝液 (リン酸緩衝液) または緩衝液のみを 0.9ml 添加後 37°C 10 分間放置する。

3) 0.6 N 水酸化バリウム, 1 g/dl 硫酸亜鉛溶液をこの順番にそれぞれ 2.25 ml 添加混合し, 除タンパクを行う。

4) 3) で得られた上清 1.0 ml に 1% ニンヒドリンを 0.2 ml 添加する。

5) 2 g/dl 水酸化カリウムを 2.0 ml 添加しよく混和する。10 分間反応させた後, けい光強度を測定する (λ_{ex} 400 nm, λ_{em} 505 nm)。

2. 自動分析法

図3にクレアチニン測定用フローダイアグラ

ムを示す。固定化クレアチナーゼカラムリアクターをフローダイアグラムのように分析系の中に組み込む。血清中既存クレアチンを CK-PK によりほぼ完全にピルビン酸にまで変換し分析系から除外する。6 インチのダイアライザーでクレアチニンをリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 M) を受容液として透析後, リアクターを通過させクレアチニンを一部クレアチンとする。生成したクレアチンに 1% ニンヒドリン水溶液, 2.0 g/dl 水酸化カリウム水溶液を加え 47°C, 2.5 分間反応させる。そして, 400 nm の励起波長を照射しその結果生じる波長 505 nm のけい光 (図4) の強度を測定する。

結 果

1. 固定化クレアチナーゼの pH 活性曲線
試料として 2.0 mg/dl クレアチニン標準液, 緩衝液として 0.1 M リン酸緩衝液, トリス塩酸緩衝液を用いて pH 6.0~9.0 の範囲で固定化クレアチナーゼの pH 活性曲線を求めた (図5)。図5から, リン酸緩衝液では pH 7.4, ト

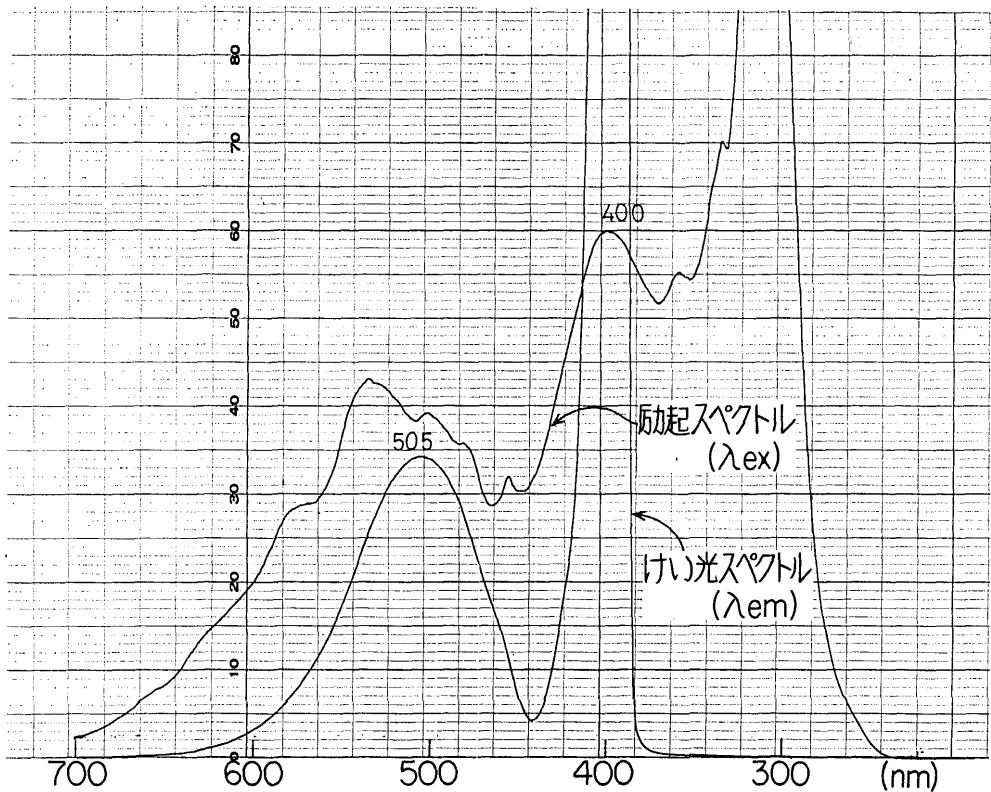


図4 励起スペクトルとけい光スペクトル (220nm~700nm)

(けい光スペクトルの励起波長は 400nm, スリット幅は励起, けい光スペクトル共に 10nm)

リス塩酸緩衝液では pH 8.0 で相対的最大活性を示し, それぞれの前後の pH で酵素活性の低下を示した。また両緩衝液間での活性は, リン酸緩衝液のほうがより高い活性を示した。

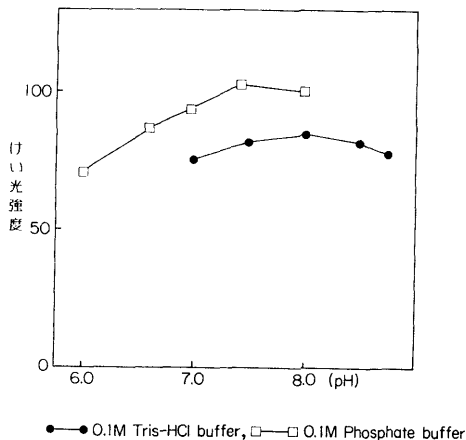
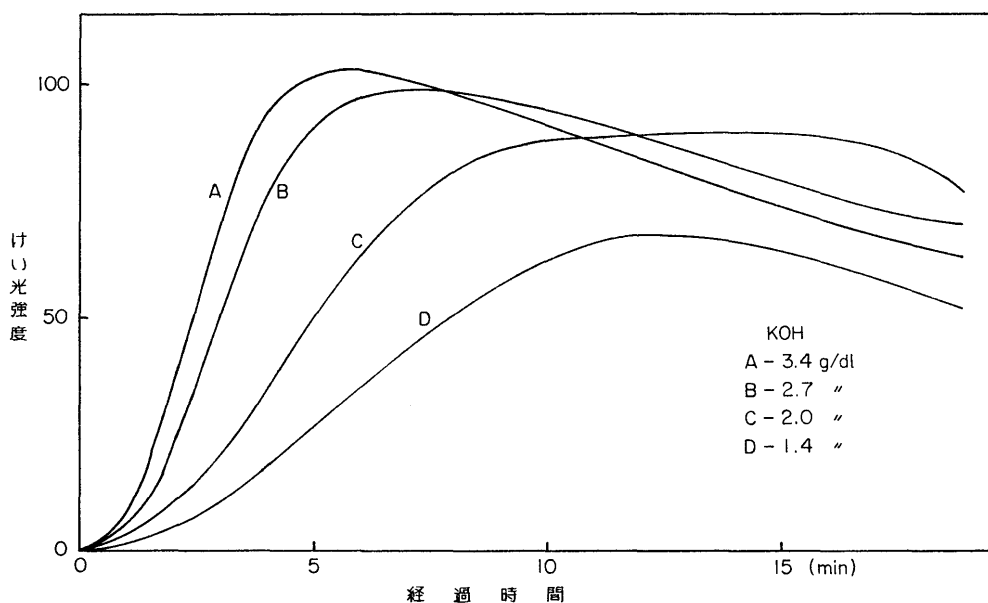


図5 固定化クレアチナーゼの pH 活性曲線

2. 水酸化カリウムとニンヒドリン濃度のけい光強度への影響

けい光強度に対する水酸化カリウム濃度の影響を検討するためニンヒドリン濃度を1%に暫定的に固定し, 水酸化カリウム濃度を1.4, 2.0, 2.7, 3.4 g/dl に変化させ水酸化カリウム添加後のタイムコースを検討した (図6)。最大けい光強度に達する時間は, アルカリ濃度が高いほど短く, 低濃度で長い傾向にあり, 安定性は高濃度ほど不安定で, 低濃度で安定な傾向を示した。しかし, ある濃度 (1.4 g/dl) 以下は反応速度も遅くかつけい光も安定ではなく相対的けい光強度も低下した。

一方, 水酸化カリウム濃度を 2.0 g/dl に設定し, ニンヒドリン水溶液の濃度を0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4%に変化させ, 2.0, 6.0 mg/dl クレアチン標準液, 3.0mg/dl 患者血



試料; 4.0 mg/dl クレアチニン

図6 KOH 添加後のけい光の Time course

清を用いてアルカリ添加後の反応時間10分でのけい光強度を測定した(図7)。図より, 約0.8%濃度までニンヒドリンの濃度の増加と共にけい光強度も増し, 0.8%以上の濃度ではほとんど一定のけい光強度を示した。

3. ニンヒドリン反応によるクレアチン, クレアチニンのけい光強度

クレアチン, クレアチニンの濃度をそれぞれ2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mg/dl とし, 1%ニンヒドリン, 2.0 g/dl 水酸化カリウム水溶液の条

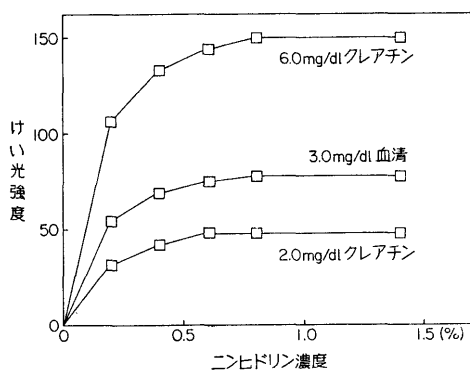


図7 けい光強度へのニンヒドリン濃度の影響

件下においてアルカリ添加後10分間のけい光強度を測定した(図8)。図8より, クレアチニンによるけい光は全くなく, クレアチンによるけい光のみ測定できた。

4. CK-PK 共役酵素系によるクレアチン変換条件 (オートアナライザー使用)

ATP, Mg^{2+} の濃度をそれぞれ 1 mM, 5 mM

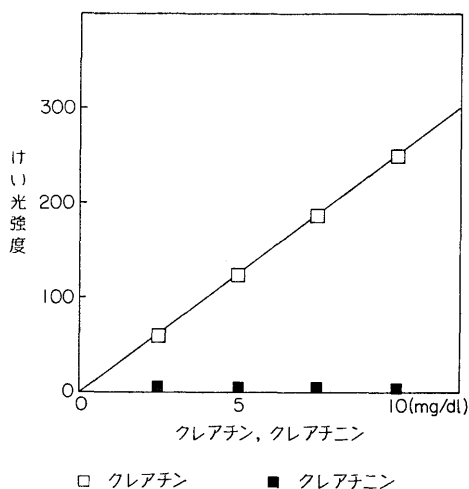
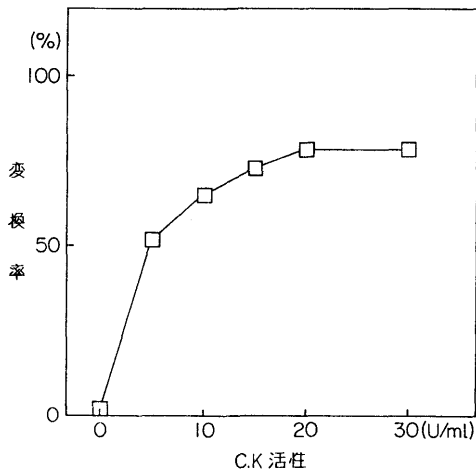


図8 ニンヒドリン反応によるクレアチン, クレアチニンのけい光強度

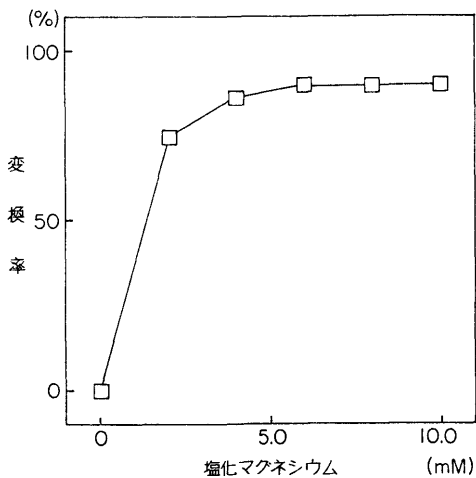
と暫定的に定め, CK 活性を 5~30 U/ml の範囲で 10 mg/dl クレアチンを検体として用いそのけい光の減少率を変換率として検討したところ, CK 活性の増加に伴い双曲線的変換率を示し, 10 U/ml の活性で60~70%の変換率, 30 U/ml の活性でも完全に変換することはできず 70~80%の変換率にとどまった (図9)。

Mg²⁺ の濃度は, 0~10 mM の範囲で変化させクレアチン分解率を求めた結果, 約 5 mM



試料; 10mg/dl クレアチン, ATP; 1mM, Mg²⁺; 5mM

図9 CK によるクレアチン変換率の検討

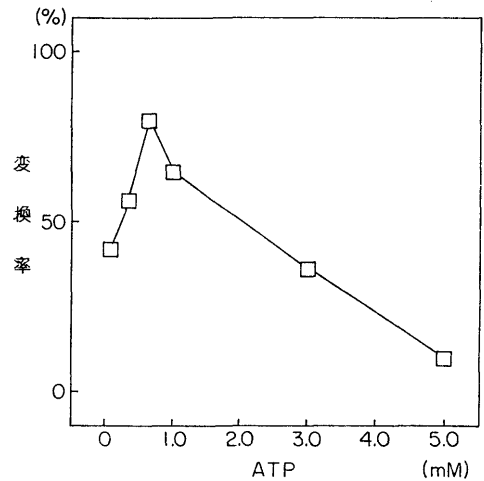


試料; 5, 10 mg/dl クレアチニン, CK 活性 ATP; 1mM

図10 CK によるクレアチンの変換に及ぼす Mg²⁺ 濃度の影響

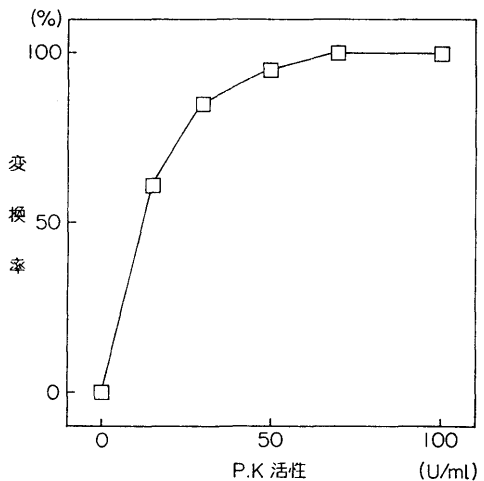
の濃度で飽和の状態にあり 5 mM~10 mM までの間では変化なかった (図10)。また, ATP の濃度を 0~5 mM の濃度に設定し, Mg²⁺ 6 mM, CK 活性を過剰の状態に求めたクレアチンの変換率は, 0.7 mM で最大の変換率を示しその前後の濃度では, 変換率の低下を示した (図11)。

同様に, CK 活性, Mg²⁺, ATP, PEP をそれ



試料; 10mg/dl クレアチン, CK 活性; 100 U/ml Mg²⁺; 6 mM

図11 CK によるクレアチンの変換に及ぼす ATP 濃度の影響



試料; 10mg/dl クレアチン, CK 活性; 100 U/ml, ATP; 1mM, Mg²⁺; 5 mM, PEP; 0.7mM

図12 CK-PK によるクレアチン変換率

ぞれ暫定的に 10 U/ml, 5 mM, 1 mM, 0.7 mM に定め PK 活性を 15~100 U/ml に変化させ PK 活性の違いによるクレアチンの変換率を求めた(図12)。PK 活性値が約70 U/ml の終濃度で 10 mg/dl クレアチン標準液を完全に変換することができた。

5. けい光強度の直線性について

固定化クレアチナーゼを内蔵した 2 cm または 4 cm の Enzyme column を図3のフローダイアグラムに挿入し直線性の検討を実施した。クレアチンのみを含む標準液で 10 mg/dl まで直線性を確認できた(図13)。

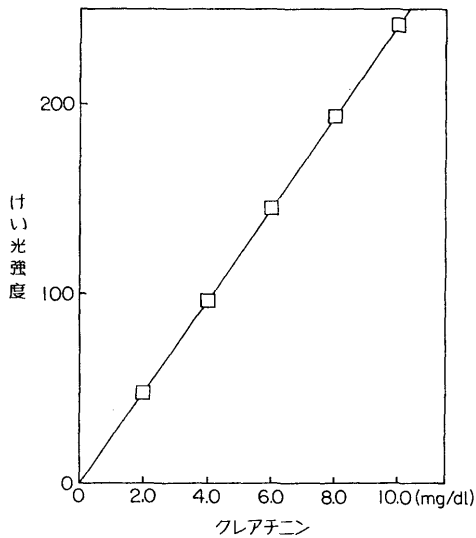
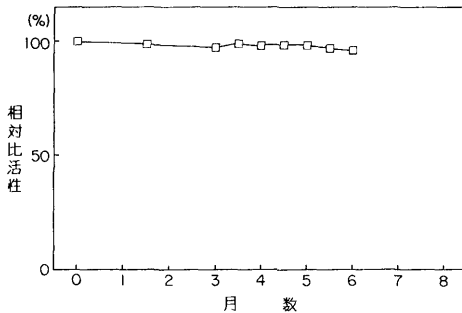


図13 検量線



(使用カラムは図2に示されている分析システムにおいて使用された)

図14 カラム状で使用する固定化クレアチナーゼの使用安定性

Enzyme column の長さ (2 cm, 4 cm) の違いによる変換率の差はほとんどなかった。また、冷蔵庫 (4°C~8°C) に保存しておいたリアクター内の固定化クレアチナーゼの安定性は図14より6ヶ月間で2~3%の活性の低下を示したにすぎなかった。

6. 各種アミノ酸など血中物質の影響

各種アミノ酸20種類を全て 10 mg/dl の濃度に調製し、クレアチンリン酸、ブドウ糖、果糖、尿酸、尿素窒素、アスコルビン酸は、それぞれ 20, 1000, 10, 20, 50, 10 mg/dl の濃度の水溶液に調製し検体と同様にして測定した。アミノ酸であるアルギニン以外は全く影響なく、グアニジド基を有するアルギニンは、10 mg/dl の濃度でクレアチンの濃度として 3 mg/dl に相当する量の正誤差を示した(表1)。

7. 再現性について

2.0, 8.0 mg/dl の濃度のクレアチニン標準液、患者血清について20回同時測定による同時再現性を求めたところ、クレアチニン標準液の 2.0 mg/dl で 3.0%, 8.0 mg/dl で 2.1%, 患者血清においては、それぞれ 3.1%, 2.3% の結果を得た。

8. Jaffé 法とけい光法との相関について

日立 726 自動分析機を用いた Jaffé 法とけい光法との相関は、相関係数 $r=0.995$, 回帰直線

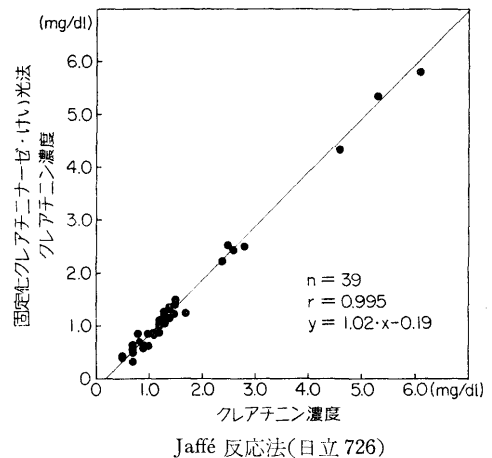


図15 Jaffé 反応法と固定化クレアチナーゼ けい光法との相関

表1 各種アミノ酸, 血中物質のけい光法への影響

	serum substance	sample conc. (mg/dl)	creatinine conc. (mg/dl)
amino acids	L-methionine	10	0
	L-phenylalanine	10	0
	L-ornithine	10	0
	L-lysine	10	0
	L-alanine	10	0
	L-homoserine	10	0
	L-proline	10	0
	L-cystine	10	0
	L-leucine	10	0
	L-threonine	10	0
	γ -aminobutyric acid	10	0
	L-glutamic acid	10	0
	γ -aminocaproic acid	10	0
	L-aspartic acid	10	0
	L-citrulline	10	0
	L-histidine	10	0
	glycine	10	0
	L-arginine	10	3
	L-isoleucine	10	0
	L-glutamine	10	0
others	creatine phosphate	20	0
	glucose	1000	0
	uric acid	20	0
	fructose	10	0
	blood urea nitrogen	50	0
	bilirubin	20	0
	ascorbic acid	10	0
	hemoglobine	1000	0

$y=1.02x-0.19$ とよい相関を得ることができたが, けい光法のほうが, やや低値を示した(図15)。

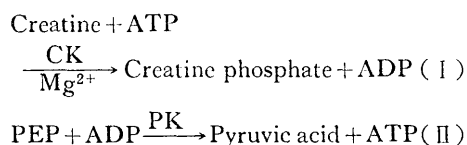
考 按

クレアチニンのけい光測定法は, アルカリ性下におけるニンヒドリンとクレアチンとの反応によって生じる強力なけい光^{10,13)}を測定することに基づいているが, これは, 強アルカリ性下においてニンヒドリンが O-carboxyphenylglyoxal に変化¹⁰⁾し, それとグアニジド基を有する化合物とが反応するものである。強アルカリ性下における O-carboxyphenylglyoxal は安

定な物質ではなく O-carboxymandelic acid に変化し易く, また過剰の O-carboxyphenylglyoxal は励起波長を吸収することによってけい光反応に干渉を与えるという性質があるため適当なアルカリ濃度の設定が必要となる。図5より, 水酸化カリウムの濃度は 2.0 g/dl が適当と思われるが, それ以上の濃度では, けい光物質も結果的に不安定である。けい光の不安定性は, 図6よりけい光強度が極大を経て順次低下していることから, O-carboxymandelic acid による妨害とは考えにくく生成したけい光物質の強アルカリ下での不安定性に基づくものと考えられる。

一方、グアニジド化合物以外の物質との反応は、表1からもわかるように、グアニジド基を有するアルギニンが正常値の約7倍の濃度で3 mg/dl のクレアチニンに相当する量だけ正の誤差を与える以外は、血中物質やクレアチニン酸などの諸物質の影響もほとんどない。しかし、検体を用いてブランク値を測定すると検体間で多少のバラツキは存在するがクレアチニンの正常値の約1/4に相当する値が得られた。これは、表1より血清中に存在するアルギニンによるものと考えられる。

この測定法では、クレアチナーゼによってクレアチニンから変換されたクレアチンとニンヒドリンとの反応により生じたけい光を測定するため、血清のように両者が共存する場合は、あらかじめ既存のクレアチンを変換しないと正しいクレアチニン量が測定できない。我々は、CK-PK 共役酵素系を用いてクレアチンを完全に変換することができた(図12)。



の反応式において、CK だけを用いる方法では第一段の反応段階である CK 反応は、pH が9.0において平衡は著しく右方向に傾いておりほぼ完全にクレアチンを変換可能であると考えられるが、実際は、完全に分解することができず約75%の変換率を得た(図9)。この反応段階に作用する阻害剤は、リン酸化合物、アデノシン、 Ba^{2+} (不活性)、 Z^{2+} 、 Cu^{2+} などの金属イオン、 Mg^{2+} と複合体を形成する物質などが考えられるが、特に、ADP は強力な阻害剤である。従って、反応の進行と共に ADP が生成されるため強い阻害性を示すため、CK 活性の増加にもかかわらず反応は進まず、ある一定の比率で平衡に達するものと考えられる。そこで、第I段の反応を完全に右方向に進めるためには、ADP を反応系から除外しなければならないと考え、第II段の反応を利用し PK を作用させ

ることにより、ADP を完全に ATP に変換することで反応を完結しクレアチンを全て変換することができた。

固定化クレアチナーゼは安定で約6ヶ月間冷蔵庫で保存しても、わずか2~3%の活性の低下を示すにすぎず、極めて安定性が高い(図14)。低値、高値の同時再現性は2~3%と良好で精度も十分満足でき、使用血清量も従来の1/10の微量で測定可能となった。また、Jaffé法との相関も良好であった。

結 語

固定化クレアチナーゼと強アルカリ性下におけるニンヒドリンとクレアチンとの反応によって生じたけい光を応用した血清クレアチニンの測定法は、従来の Jaffé 法、酵素法より10倍近い感度で測定できるため検体量が微量で可能という特徴を持つが、その測定にあたって血清中既存のクレアチンを変換しなければならないこと、ブランク値が存在するという短所を有する。しかし、検体の微量化に結びつき、かつ固定化クレアチナーゼを利用することによって迅速、高感度で再現性も満足できる測定法となった。

謝 辞

本研究に対し、御協力いただいた京大病院中央検査部化学検査室の皆様へ深謝の意を表します。

文 献

- 1) Jaffé, M.: Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. Z. Physiol. Chem. 10: 391-400, 1886.
- 2) Folin, O.: Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harn. Z. Physiol. Chem. 41: 223-242, 1904.
- 3) Slot, C.: Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffé reaction method. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17: 381-387, 1965.
- 4) Heingare, D. & Tiderstrom, G.: Determination

- of serum creatinine by a direct colorimetric method. Clin. Chim. Acta 43: 305-310, 1973.
- 5) Van Pilsum, J. F., Martin, R. P., Kito, E. & Hess, J.: Determination of creatine, creatinine, arginine, guanidinoacetic acid, guanidine, and methylguanidine in biological fluids. J. Biol. Chem. 222: 225-236, 1956.
 - 6) Taussky, H.: A procedure increasing the specificity of the Jaffe reaction for the determination of creatine and creatinine in urine and plasma. Clin. Chim. Acta 1: 210-223, 1956.
 - 7) Moss, G. A., Bondar, R. J. L. & Buzzelli, O. M.: Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine. Clin. Chem. 21 (10): 1422-1426, 1975.
 - 8) Marymont, J. H., Smith, J. N. & Klotz, S.: A simple method for urine creatine. Am. J. Clin. Path. 49 (2): 289-292, 1968.
 - 9) Kibrick, A. C.: Creatine in urine: Its determination by means of creatine phosphokinase. Clin. Chim. Acta 11: 408-413, 1965.
 - 10) Conn, R. B. & Davis, R. B.: Green fluorescence of guanidinium compounds with ninhydrin. Nature 183: 1053-1055, 1959.
 - 11) Mosbach, K.: Immobilized Enzymes, Method in Enzymology. Vol. XLIV, p. 134-148, Academic Press, New York, 1976.
 - 12) Endo, J., Tabata, M., Okada, M. & Murachi, T.: 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.
 - 13) Conn, R. B., Jr.: Fluorimetric determination of creatine. Clin. Chem. 6 (6): 537-548, 1960.