

連結固定化酵素カラムを用いるヒト血漿中イノシンの 蛍光フローインジェクション分析

財 津 潔, 林 要 司, 大 倉 洋 甫

九州大学薬学部薬品分析化学教室
〒812 福岡市東区馬出3-1-1

ヒト血漿中イノシンの蛍光フローインジェクション分析法を開発した。連結固定化酵素カラム(プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ウリカーゼ及び西洋ワサビペルオキシダーゼを、それぞれアミノプロピルガラスビーズ上に固定化し、テフロンチューブ中にそれぞれを充填し、順に連結した固定化酵素カラム)を流路に設け、イノシンをアラントインにまで分解する。この間に生成する過酸化水素と流路に流すペルオキシダーゼの発蛍光性基質 3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸は、固定化ペルオキシダーゼの触媒によって蛍光体を生成する。この蛍光体を蛍光検出することにより定量下限 $0.5 \text{ pmol} / 20 \mu\text{l}$ 注入量でイノシンを測定できる。

緒 言

イノシン、グアノシンなどの代謝酵素であるプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) の欠損は細胞性免疫不全症と密接に関係し、この症例では血液中及び尿中のイノシン、グアノシンなどが異常に増加する。^{1), 2)} また、アデノシンデアミナーゼ (ADA) の欠損は細胞性及び体液性の免疫機構の不全を伴う重症複合免疫不全症と密接に関係があり、血液中や尿中のアデノシンやデオキシアデノシンの異常高値を伴う。^{3) - 6)} また、キサンチン尿症では、キサンチンオキシダーゼ (XOD) の活性低下による血液中や尿中のオキシプリン (ヒポキサンチン及びキサンチン) の増加と尿酸の著明な減少が知られている。⁷⁾ このような理由から、これらのプリン代謝物の簡便、迅速かつ高感度な測定法の開発は医療分野における一つの重要な課題である。

アデノシン、イノシン、及びオキシプリンなどのプリン代謝物の同時定量法には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法^{8), 9)} がある。この方法

は複数のプリン代謝物を同時に測定できる利点を有するが、多数の検体の測定には長時間を要する。そこで、迅速性に特長を有するフローインジェクション分析法 (FIA) によるこれらプリン代謝物の分析を目的として、まず、血漿中イノシンの分析について検討した。イノシンはChart I に示す一連の酵素反応により過酸化水素を生成する。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の存在下に、過酸化水素は発蛍光性基質 3-(P-ヒドロキシフェニル) プロピオン酸 (HPPA)¹⁰⁾ との反応により蛍光物質を生成させ得る。著者らは、この一連の酵素反

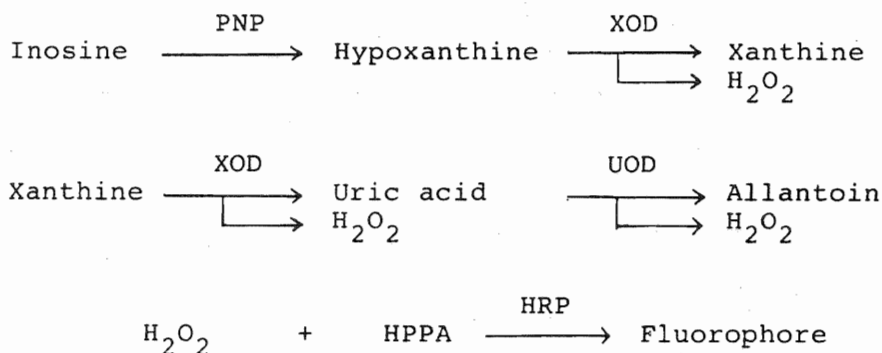


Chart I

応をFIAシステムの流路内で実現するために、PNP、XOD、ウリカーゼ (UOD) 及びHRPをそれぞれアミノプロピルガラス上に固定化してテフロンチューブ内に充填し、各カラムを順に繋いだ連結固定化酵素カラムを流路内に設けた。上記の反応により蛍光物質を生成させ蛍光検出するFIAによる迅速なイノシンの測定法を開発した。

実 験

装置： フローシステム及び連結して用いる同一形状の固定化酵素カラムの一つをそれぞれFig. 1とFig. 2に示す。送液ポンプは、日本分光レシプロ型RP-4型ポンプの試作機を使用した。条件検討には、流速の変更と溶液の交換が容易である理由から日立655型HPLC用ポンプを併用した。サンプルインジェクターはRheodyne製7125型に20 μ lサンプルループを装着して使用した。検出器は島津RF-530型蛍光スペクトロモニター (12 μ lフローセル) を励起側305nm、蛍光側405nmに設定して用いた。ゲルろ過HPLCにはWaters M-45型ポンプ及び440型吸光度検出器 (254nm用フィ

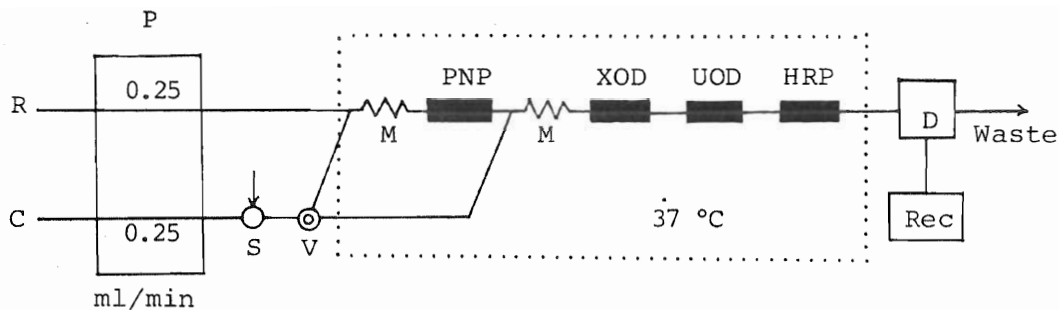


Fig. 1 Flow diagram for the determination of inosine

R: 5 mM HPPA in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.15 M NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 and 10 mM EDTA

C: The same as R, but HPPA being omitted

P: Pump

S: Sample injector (sample volume, 20 μl)

V: Three-way-valve

M: Mixing coil (1 m X 0.25 mm I.D.)

D: Fluorescence detector

Rec: Recorder

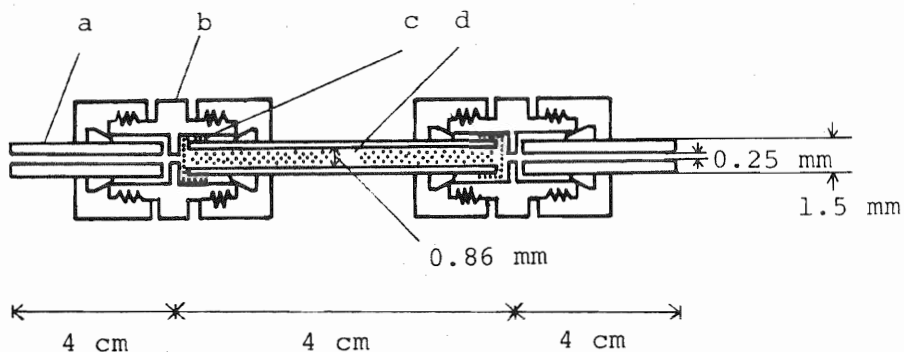


Fig. 2 Immobilized enzyme column

a: Teflon tube

b: Union (1/16)

c: Polyamide net

d: Immobilized enzyme glass beads

ルター装着) を使用した。

配管: "テフロンチューブ" (内径0.25mm、外径1.5 mm ; ガスクロ工業)、固定化酵素カラムには"テフロンスパゲティチューブ" (内径0.86mm、外径1.46 mm ; サンコープラスチック) を用いた。ダイフロン製のユニオン(1/16 UHD)、三方ジョイント(1/16 OT)及びフェラル(1/16 FD)はガスクロ工業製を、三方切り換えバルブは協和精密製(KMM-3V型)を使用した。

試薬: 特に記さない限り市販特級品を用いた。水は脱イオン蒸留水にKMnO₄及びNaOHをそれぞれ少量加え、蒸留したのち、再蒸留して用いた。HPPAは同仁薬化学研究所製または大塚化学製を用いた。トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)はCalbiochem製(Ultrol grade)を用いた。

酵素: PNP(19.5U/mg、子牛脾)、XOD(約0.4U/mg、牛乳)及びカタラーゼ(260000 U/ml, 牛肝)は、いずれもBoehringer Mann.製を、UOD(4.0 U/mg、Candida sp.)は東洋紡製を、HRP(Type VI、285 purpurogallin units/mg、西洋ワサビ)はSigma製を用いた。

PNPの精製: 上記市販PNP(ADA活性60 mU/mg、グアナーゼ活性2.3mU/mg含有)を5 mM Naリン酸塩緩衝液(pH 7.0)に対して透析後、凍結乾燥により約1/2に濃縮し、50 mM Naリン酸塩緩衝液(pH 7.0、0.15M NaCl含有)を溶離液としてTSKgel G3000SW(600 X 7.5 mm内径、東洋曹達)カラムを用いてゲルろ過HPLCに付した(流速0.7 ml/min、254 nm UV検出)。ADA、グアナーゼ及びPNP活性をフラクションごとに測定し、PNP活性の強いフラクションを5 mM Naリン酸塩緩衝液(pH 7.0)に対して透析後、凍結乾燥により約1/5まで濃縮した。同様の精製を再度行い53.1 U/mgのPNP(ADA活性2.63 mU/mg含有、グアナーゼ活性は検出されない)を得た。PNP、ADA及びグアナーゼ活性の測定は成書の方法¹¹⁾で行った。

固定化酵素カラム: 固定化PNP、XOD及びUODガラスビーズの調製は、グルタルアルデヒドを用いるTawaらの方法^{12)、13)}で行った。但し、固定化担体にはアミノプロピル基を有するガラスビーズ(AMP-CPG 1400、平均孔径1500 Å、120-200メッシュ、Electro-nucleonics製)を使用し、ガラスビーズ250mgに対し、酵素2 mgを用いた。固定化HRPの調製は既報¹⁴⁾のHRPの過ヨウ素酸酸化法に従って行った。固定化PNPは3.2M 硫酸アンモニウム溶液(pH 6.0)に、固定化XODは3.2M 硫酸アンモニウム溶液(pH 8.0、10 mM EDTA・2Na含有)に、固定化UODは50%グリセロール溶液(pH 10.2、50 mM グリシン、0.13M 炭酸ナトリウム含有)に、固定化HRPは0.1 M Tris-塩酸緩衝液(pH 8.5、0.15M NaCl、1% (w/v)牛血清アルブミ

ン、0.25mM メルチオレートナトリウム含有)に浸漬し、4℃で保存した。固定化酵素のカラムへの充填は水流ポンプによる減圧吸引下、密に充填(いずれも400 X 内径 0.86 mm)した。なお、固定化酵素カラム作成用の固定化酵素担体の流出防止用のストッパーはカラムクロマトグラフィー用のポリアミドネット(20 μm孔径、Pharmacia)を直径5 mmに切り取り用いた。

キャリアー液: 0.1 M Tris-塩酸緩衝液(pH 8.0、0.15M NaCl、50 mM Na₂HPO₄、10 mM EDTA-2Na含有)を用いた。

試薬溶液: 5.0 mM HPPA(キャリアー液に用時溶解)を用いた。なお、試薬溶液及びキャリアー液は固定化酵素カラムの目詰まりを防ぐためにメンブランフィルター(TM-2, 0.45 μm、東洋濾紙)でろ過し、さらに脱気した。

注入試料の調製: EDTA処理血漿(1 mg EDTA/ml全血)100 μlに1 M 過塩素酸100 μlを加え、1000 xGで10分間、4℃で遠心する。上清100 μlに0.5 M 炭酸カリウム80 μlを加え、同様に遠心する。上清140 μlに下記のUOD溶液及びカタラーゼ溶液各30 μlを加え、37℃で30分間加温し、4 M 過塩素酸30 μlを添加後、2 M 炭酸カリウム60 μlを加え、同様に遠心する。上清210 μlに0.4 M Tris-塩酸緩衝液(pH 8.0、0.6 M NaCl、0.2 M Na₂HPO₄、40 mM EDTA-2Na含有)70 μlを加え注入試料とする。但し、UOD溶液は、市販UODを50 mM Na-Kリン酸塩緩衝液(pH 8.0)で0.5 U/mlとして、カタラーゼ溶液は市販カタラーゼ溶液10 μlを30%グリセロール溶液(10%(v/v)エタノール含有)で100倍に希釈し4℃で保存し、用時50 mM Na-Kリン酸塩緩衝液(pH 8.0)で40 U/mlとして用いた。

結 果 及 び 考 察

血漿を除タンパクせずにフローシステムに注入すると、系の圧力が次第に増加した。また、血漿を放置すると、ATPの分解に基づくヒポキサンチンの生成が起こる。一方血漿中の酵素(PNP)によりイノシンが消費される。従って、血漿を可及的速やかに除タンパクすることにした。この除タンパク血漿はヒポキサンチンやキサンチンのほかに、尿酸などを含む。尿酸は固定化HRPが関与する蛍光反応を阻害した。この阻害を防止するため、試料中の尿酸をあらかじめUOD溶液の添加により分解することにした。即ち、除タンパク血漿中にウリカーゼ及びカタラーゼ溶液を加え37℃で加温し、尿酸を分解すると共に、これに伴い生成する過酸化水素を分解し、その後、これらの酵素を除タンパクにより除去し

た（この一連の操作により血漿は9.94倍希釈される）。このように、血漿に内在する尿酸の分解処理を行っても、イノシン及びオキシプリン（ヒポキサンチン及びキサンチン）から固定化酵素カラムによる酵素反応により尿酸は生成する。イノシンやオキシプリンの血漿中の最大レベルから生成する尿酸は $400 \text{ pmol} / 20 \mu\text{l}$ 注入量程度と見積られる。この濃度の尿酸の注入は、本法の固定化酵素カラム中の固定化UODカラムのみ除いた系で、 $10 \text{ pmol} / 20 \mu\text{l}$ （注入量）のイノシンの測定に対し約40%の負の誤差を与えた。この誤差の原因は固定化HRPによる蛍光反応への尿酸による妨害であるので、この誤差を取り除くため、固定化UODカラムを用いて尿酸を分解する必要があった。

酵素を用いる分析においては、用いる酵素に混在する極めて微量の夾雑酵素による正または負の誤差についての対策が必要なことがある。使用したBoehringer Mann. 社のPNP ($19.5 \text{ U} / \text{mg}$) 中にはADA及びグアナナーゼ活性（それぞれ60及び $2.3 \text{ mU} / \text{mg}$ ）の夾雑が認められた。なお、Sigma社のPNPにもこれらの酵素活性が認められた。前者のPNPを精製せずに固定化して用いた場合、 100 pmol のアデノシンまたはグアニンの注入では同量のイノシンの注入で得られる蛍光強度のそれぞれ26.5及び35.8%の蛍光強度を与え、アデノシンやグアニンを含む試料中のイノシンは測定し得ない。そこで、実験の部に記したゲルろ過HPLCにより市販のPNPを精製し、固定化して用いると、 100 pmol のアデノシンまたはグアニンの注入で、それと同量のイノシンの注入の場合に比べて、それぞれ0.6及び1%の蛍光強度を与えるに過ぎない。なお、 100 pmol のキサンチンの注入では有意な蛍光の発現は認められなかった。2'-デオキシイノシン（PNPの基質）は同濃度のイノシンの注入により得られる蛍光強度の約80%の蛍光強度を示した。なお、ヒト血漿中2'-デオキシイノシン濃度は不明である。

HPPA濃度は試薬溶液中 5 mM とし、キャリアー液との合流により 2.5 mM となるように設定した。この濃度で最高の蛍光強度が得られた。キャリアー液として用いるTris-塩酸緩衝液のpHの蛍光強度への影響を検討した。中性からpH8.5までの検討で、pHが高いほど強い蛍光強度が得られたが、酵素の安定性を考慮し、pH8.0の緩衝液を用いることにした。PNPの反応に無機オルトリン酸が必要であるのでキャリアー液中 50 mM のリン酸水素二ナトリウム（キャリアー液中 25 mM 以上ではほぼ一定の蛍光強度を与えた）を添加した。キャリアー液中のEDTAは金属イオンをマスクングすることによりXODを安定化するために添加した。

イノシン量の算出は固定化PNP、XOD、UOD、及びHRPを連結した流路系（流路I）で得られる蛍光強度から、固定化PNPを通さない流路系（流路II）

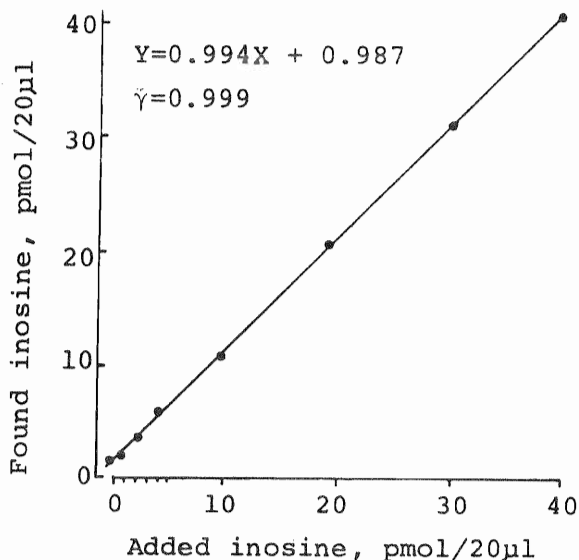


Fig. 3 Correlation between The inosine values added and found

で得られる蛍光強度（ブランク）を差し引くことにより原理的には求められる。三方切り換えバルブによりこの流路の切り換えを行った。流路の切り換えが蛍光強度（ピーク高さ）に与える影響を検討した。流路Iにイノシン標準液を注入して得られる検量線と流路IIにヒポキサンチン標準液を注入して得られる検量線を比較すると、イノシン検量線の傾きはヒポキサンチン検量線のその82.7%であった。そこで、注入試料につき流路Iで得られる蛍光強度から同じ注入試料について流路IIで得られる蛍光強度の82.7%をブランクとして差し引き、イノシン検量線を用いてイノシン量を求めることにした。EDTA処理血漿について添加したイノシン量（X）とこの方法により求めたイノシン量（Y）との相関をFig. 3に示す。極めて良好な相関（相関係数0.999）が得られた。また、 $Y=0.994X+0.987$ （pmol/20µl注入量）となった。直線回帰式の傾きがほぼ1となったが、本法のイノシン値の算出法は、流路Iに試料を注入したときのブランクがヒポキサンチンに基づくものとして計算した。血漿中には、ヒポキサンチン、キサンチン、その他種々のブランクの原因となる物質の量は変動する。この変動は誤差の原因になると考えられる。この点に関して改善の余地がある。固定化PNP及び固定化UODカラムは少なくとも4ヶ月安定である。固定化XODカラムは4ヶ月の使用で、得られる蛍光強度が約10%低下した。本法によるイノシンの定量下限は注入試料中0.5 pmolであった。試料の注入は20回/h行える。イノシン標準液2.5-100 pmol/20µlの10回連続注入における変動係数

は、いずれの濃度においても1 %以下であった。

(1984年4月 日本薬学会104年会にて一部発表)

文 献

- 1) A.Cohen, D.Doyle, D.W.Martin, Jr. and A.J.Ammann, *N.Engl.J.Med.*, 295, 1449 (1976).
- 2) 太神和広, 代謝, 19, 10月臨時増刊号, p 222 (1982).
- 3) R.A.Hartwick and P.R.Brown, *J.Chromatogr.*, 143, 383 (1977).
- 4) R.Hirshchorn, *Fed.Proc.*, 36, 2166 (1977).
- 5) J.F.Kuttesch, F.C.Schmalstieg and J.A.Nelson, *J.Liq.Chromatogr.*, 1, 97, (1978).
- 6) C.A.Koller, P.L.Stetson, L.D.Nichamin and B.S.Mitchell, *Biochem.Med.*, 24, 179 (1980)
- 7) 小島 司, 飯森糸子, 仁科甫啓, 北村元仕, 西岡久寿樹, 細谷龍男, 河野英雄, 米沢 博, 臨床化学, 11, 324 (1982).
- 8) R.A.Hartwick, M.Krstulovic and P.R.Brown, *J.Chromatogr.*, 186, 659 (1979).
- 9) M.Zakaria, P.R.Brown, M.P.Farnes and B.E.Barker, *Clin.Chim.Acta*, 126, 69 (1982).
- 10) K.Zaitzu and Y.Ohkura, *Anal.Biochem.*, 109, 109 (1980).
- 11) H.U.Bergmeyer, K.Gawehn and M.Grassl, "Methods of Enzymatic Analysis", 2nd ed., Ed. by H.U.Bergmeyer, p 490, 426 and 471 (1974), (Academic press)
- 12) R.Tawa, M.Kito and S.Hirose, *Chem.Lett.*, 745 (1981).
- 13) R.Tawa, M.Kito and S.Hirose, *Chem.Pharm.Bull.*, 30, 615 (1982).
- 14) Y.Hayashi, K.Zaitzu and Y.Ohkura, *Anal.Sci.*, 1, 65 (1985).

(1985年 5月29日受理)

FLUORIMETRIC FLOW INJECTION ANALYSIS FOR INOSINE IN HUMAN
PLASMA USING MULTI-CONNECTED IMMOBILIZED ENZYME COLUMNS

Kiyoshi ZAITSU, Yohji HAYASHI and Yosuke OHKURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 62,
Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812

Flow injection analysis for inosine in human plasma with fluorescence detection was developed. Multi-connected immobilized enzyme columns (purine nucleoside phosphorylase, xanthine oxidase, uricase and horseradish peroxidase were chemically bonded on aminopropyl glass beads (120-200 mesh), respectively, and these immobilized enzymes were packed in Teflon tubes (40 X 0.86 mm I.D.), then connected in the above order) were placed on a flow line. Hydrogen peroxide formed in the enzymatic degradation of inosine through allantoin was measured fluorimetrically by using the peroxidase substrate, 3-(p-hydroxyphenyl)propionic acid. The limit of determination for inosine was 0.5 pmol/20- μ l injection volume.