

化学発光酵素活性測定法とその F I A への応用

昭和大学薬学部薬品分析化学教室 辻章夫、前田昌子

1. まえがき

臨床化学分析の領域では、血液、尿、組織などきわめて複雑なマトリックスである生体試料中の特定成分、しかもきわめて微量な成分を迅速かつ精密に分析することが要求され、高感度、高選択的、高特異的分析法の開発が行なわれている。特に高感度分析法として化学発光・生物発光分析法が注目され、その基礎的研究と共に臨床化学分析の領域への応用開発が行なわれている^{1)~5)}。

多くの生体成分の測定には特異的酵素を用いる酵素法の開発が行なわれ、表 1 に示すように、多くの生体成分が選択的なオキシダーゼまたはデヒドロゲナーゼを用いる酵素法で測定されている。これらの方法の最終の検出システムは、前者は H_2O_2 を、後者は補酵素の NADH または NADPH を吸光度法で測定する方法である。より高感度な検出システムとして化学発光や生物発光法の応用が行なわれている。

本総説では、筆者らの研究室で開発してきた種々の酵素活性の化学発光測定法とそれらの応用について述べる。

表 1 酵素および補酵素 (NAD⁺, NADH) を試薬とした生体成分分析

測定項目	酵素試薬	最終信号
グルコース	ヘキソキナーゼまたはグルコースキナーゼ	NAD(P)H
	／グルコース-6-リン酸脱水素酵素	
	グルコース脱水素酵素	NADH
コレステロール	グルコースまたはピラノース酸化酵素	H_2O_2
	コレステロール脱水素酵素	NAD(P)H
	コレステロール酸化酵素	H_2O_2
中性脂肪	リパーゼ／グリセロール脱水素酵素	NADH
	リパーゼ／グリセロールキナーゼ／	NADH
	グリセロール-3-リン酸脱水素酵素	
	リパーゼ／グリセロール酸化酵素	H_2O_2
遊離脂肪酸	アシル CoA 合成酵素／アシル CoA 酸化酵素	H_2O_2
リン脂質	ホスホリパーゼ D／コリン酸化酵素	H_2O_2
尿素	ウレアーゼ／グルタミン酸脱水素酵素	NAD(P)H 減少
	ウレアーゼ／グルタミン酸脱水素酵素／	H_2O_2
	L-グルタミン酸酸化酵素	
アンモニア	グルタミン酸脱水素酵素	NAD(P)H 減少
	グルタミン酸脱水素酵素／L-グルタミン酸	H_2O_2
	酸化酵素	

尿酸	ウリカーゼ	H ₂ O ₂
クレアチニン	クレアチナーゼ／クレアチナーゼ／ サルコシン酸化酵素	H ₂ O ₂
胆汁酸	3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素	NADH
乳酸	乳酸脱水素酵素 乳酸酸化酵素	NADH H ₂ O ₂
ビルビン酸	乳酸脱水素酵素 ビルビン酸酸化酵素	NADH 減少 H ₂ O ₂
シアル酸	ノイラミニダーゼ／NANA-アルドラーゼ／ ビルビン酸酸化酵素	H ₂ O ₂
L,D-アミノ酸	L,D-アミノ酸酸化酵素	H ₂ O ₂
ポリアミン	ポリアミン酸化酵素	H ₂ O ₂
マグネシウム	ヘキソキナーゼまたはグルコースキナーゼ ／グルコース-6-リン酸脱水素酵素	NADPH
無機リン	ビルビン酸酸化酵素 プリンヌクレオシドホスホリラーゼ／ キサントシン酸化酵素	H ₂ O ₂ H ₂ O ₂
コリンエステ ラーゼ活性	コリン酸化酵素	H ₂ O ₂
アミラーゼ活性	α -グリコシダーゼ／グルコース酸化酵素	H ₂ O ₂
A S T 活性	グルタミン酸脱水素酵素 リンゴ酸脱水素酵素 オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ／ ビルビン酸酸化酵素	NADH NADH 減少 H ₂ O ₂
A L T 活性	乳酸脱水素酵素 ビルビン酸酸化酵素 L-グルタミン酸酸化酵素	NADH 減少 H ₂ O ₂ H ₂ O ₂
L D H 活性	ビルビン酸酸化酵素 乳酸酸化酵素	H ₂ O ₂ H ₂ O ₂

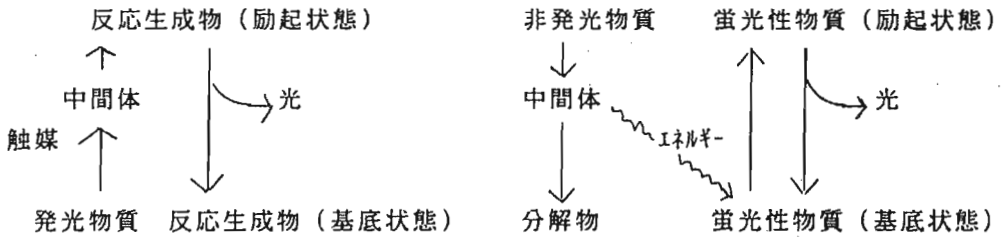
2. 化学発光⁴⁾

化学発光は発光物質の化学反応に伴い光が放出される現象である。種々の化学発光反応はほとんどが酸化反応である。化学発光反応の一般的過程を図1に示す。発光分子が酸化されることによりエネルギーの高い中間体 (key intermediate) を生成し、次いでそれから励起状態の反応生成物を生じ、光を放出して基底状態の生成物となる。また、高エネルギー状態の中間体または励起分子のエネルギーが共存する他の発光分子 (エネルギー受容体) にエネルギー転移してその分子が励起されて光を発する機構もある。ルミノール誘導体、ルシゲニン、N-メチルアクリジニウム誘導体が知られている。過ユウ酸エステル誘導体はそれ自身では発光しないが共存する蛍光物質にエネルギーを転移

して励起させることにより発光する。

化学発光反応に基づく分析法は、1)極めて高感度であり、2)定量範囲が広く、3)測定装置は簡単で、安価であるなどの特徴がある。

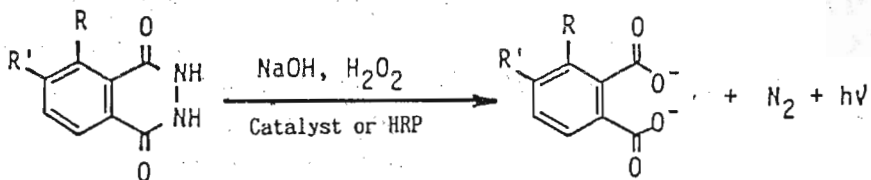
図1 一般的な化学発光反応機構



2. 1. ルミノール発光反応

ルミノールは古くから知られた発光物質で、アルカリ性 (pH 11) で酸化剤 (H₂O₂ など) と触媒 (重金属イオン、ヘム蛋白質など) の存在で光 (max 425 nm) を発する。また、pH 7 - 8 でペルオキシダーゼと過酸化水素により発光する (図2)。したがって、ルミノール発光は、過酸化水素、金属イオン、ヘム蛋白質などの測定法や表1に示すように種々の酵素反応と組み合わせることで生体成分や酵素活性の測定法に応用されている。

発光効率を増大させるためルミノールの種々の誘導体が合成されている。ルミノールはそのアミノ基がアルキルまたはアセチル化されると著しく発光効率が低下する。イソルミノールはルミノールより発光効率が低いですが、アルキル化されると発光効率が增大する⁶⁾。化学発光標識試薬として種々のイソルミノール誘導体が合成され、化学発光イムノアッセイに用いられている⁷⁾。



R	R'	
NH ₂	H	luminol
H	NH ₂	isoluminol (IL)
H	N(CH ₂) ₄ NH ₂	N-(4-aminobutyl)-N-ethyl isoluminol (ABEI)

図2 ルミノール、イソルミノール化学発光反応

2. 2. ルシゲニン発光反応

ルシゲニンは、ルミノールと同様に古くから知られている化学発光物質である。アルカリ性で過酸化水素により酸化されてジオキセタン構造の中間体を経て励起状態の N-メチルアクリドンとなり光 (λ_{max} 445 nm) を発して基底状態となる (図3)。また、ルシゲニンは種々の nucleophilic 試薬、還元性化合物、 α -ヒドロキシカルボニル基を有する化合物により強く発光する^{8) 9)}。金属イオンの分析や還元性生体成分の分析に用いられている。

最近、ルシゲニンの発光機構に基づいて N-メチルアクリジニウム誘導体が合成され、化学発光イムノアッセイの標識試薬として用いられている¹⁰⁾。

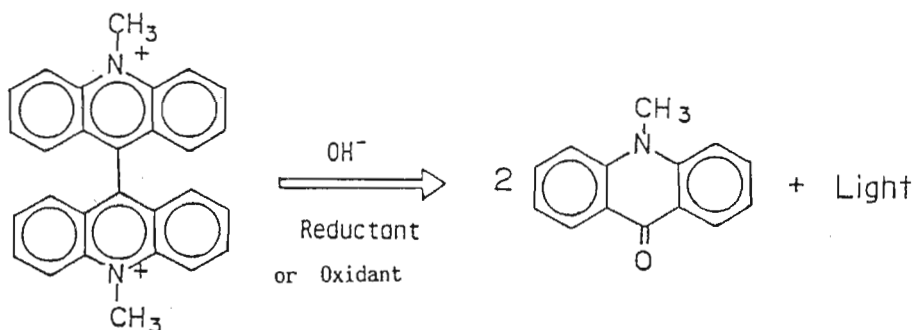


図3 ルシゲニンの化学発光反応

2. 3. ベルオキシオキサレート/蛍光色素発光反応

ビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキサレート (TCPO) のようなシュウ酸ジエステルは H_2O_2 のような過酸化物との反応により高エネルギーの活性中間体 1,2-ジオキセタンジオンが生成し、分解する際に共存する蛍光物質に過剰の分解エネルギーを転移して励起させ発光する^{11) 12) 13)}。発光反応機構を図4に示す。この発光反応は量子収率が比較的高く (約 20%)、発光寿命も長く、高感度の過酸化水素の測定およびその生成系酵素反応と組み合わせた生体成分の分析法、酵素活性測定法、酵素イムノアッセイ法などに応用されている¹⁴⁾。また、本法により蛍光物質を高感度に検出することが出来る。アミノ酸、カテコールアミン、ケトステロイド、多環芳香族化合物などの化学発光高速液体クロマトグラフィーに応用されている^{15) 16)}。

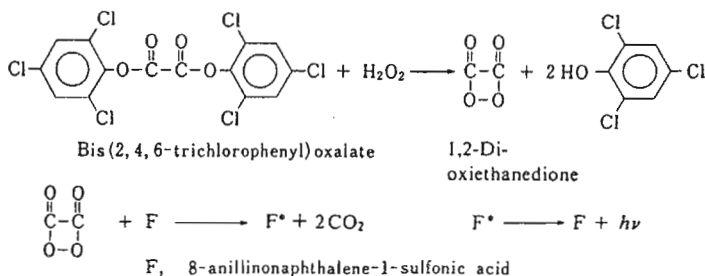


図4 ベルオキシオキサレート/蛍光色素系の化学発光反応

3. NADH および ATP の化学発光測定法

3. 1. NADHの化学発光測定法¹⁷⁾

種々の脱水素酵素の補酵素である NADH, NADPHは主として UV 法か蛍光法で測定されている。また、バクテリアルシフェラーゼによる生物発光法が最も高感度であるが、酵素が不安定であるため臨床分析には適していない。NAD(P)H は電子伝達系化合物の存在で溶存酸素と反応してスーパーオキシドアニオン (O_2^-)を生成し、次いで H_2O_2 を生成する。Seits らはメチレンブルーを用いたが、筆者らはより安定で、反応が迅速な 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート (1-MPMS) を使い、生成した H_2O_2 をイソルミノール/マイクロペルオキシダーゼにより化学発光検出するシステムを開発した。図5にその反応機構を示す。

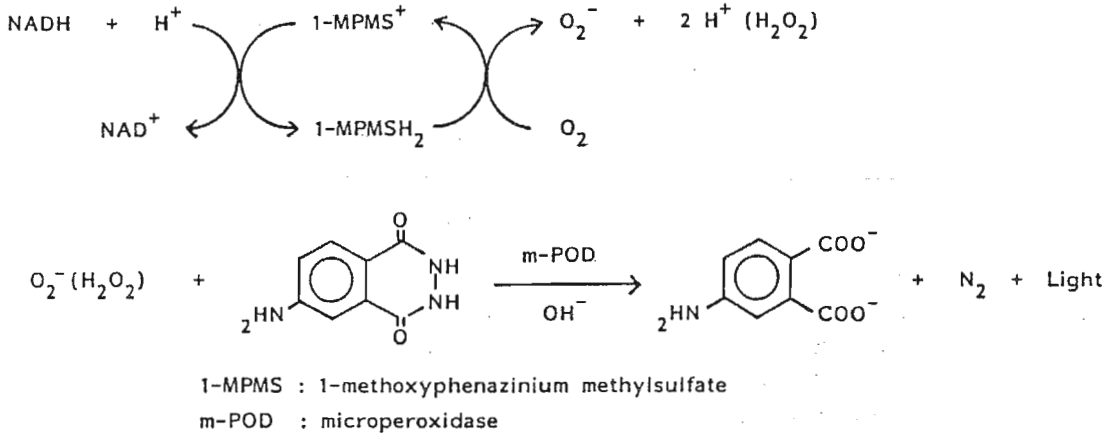


図5 NADHの化学発光反応

本法による NADH の検出感度は 2×10^{-12} mol/L (2 pmol/assay) で、生物発光法の感度には及ばなかった。より高感度化するため $NAD^+/NADH$ サイクリング反応を用いる増幅化学発光法を開発した¹⁸⁾。図6に示すように、アルコール脱水素酵素とリンゴ酸脱水素酵素を用いる酵素サイクリングにより増幅する方法である。サイクリングにより生成したリンゴ酸に過剰の NAD^+ を加え、リンゴ酸脱水素酵素により NADH とし化学発光検出する。この反応は可逆反応であるためグルタミン酸/オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) により平衡を右方向に偏らせるシステム¹⁸⁾を採用したが、malic enzyme を用いることによりより簡易化することが出来た¹⁹⁾。NADH の検出感度は 3×10^{-14} mol/L となり、約 300倍感度が向上した。表2に各種測定法の検出感度の比較をまとめて示した。本化学発光法は、酵素サイクリング法と組み合わせることにより生物発光法とほぼ同程度の感度に達した。

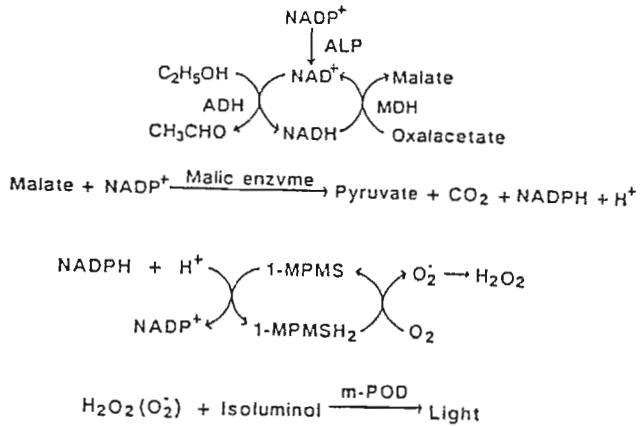


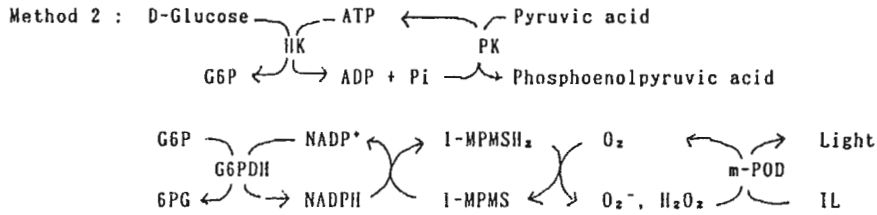
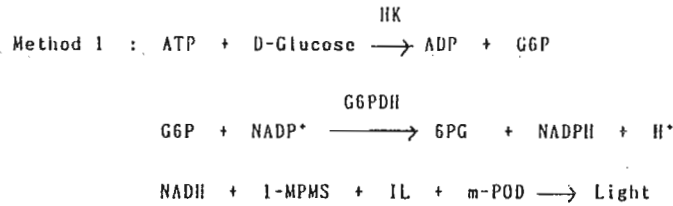
図6 酵素サイクリングによる増幅 NADH 化学発光反応

表2 各種測定法によるNADHの検出感度

測定法	NADH検出感度 (mol/L)
吸光度法	1×10^{-9}
蛍光光度法	1×10^{-10}
化学発光法	2×10^{-12}
増幅化学発光法	3×10^{-14}
生物発光法	1×10^{-14}

3. 2. ATP の化学発光測定法¹⁷⁾

ATP の化学発光測定法として、ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸脱水素酵素を用い生成する NADH を前述の NADH の化学発光法により測定するシステム (図7-A) を開発した。この方法により ATPとして 10 pmolまで測定できるが、さらに高感度化するためホスホエノールピルビン酸/ピルビン酸キナーゼと共役させた酵素サイクリング法を用いることにより約1000倍感度を向上させることに成功した。図8に両方法の検量線を示す。



HK : Hexokinase, G6P : Glucose-6-phosphate, G6PDH : Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6PG : Glucose- δ -lactone 6-phosphate, 1-MPMS : 1-Methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate, IL : Isoluminol, m-POD : Microperoxidase,

図7 ATPの化学発光測定法の原理

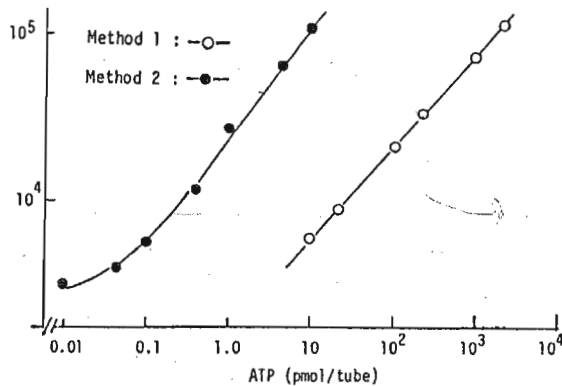


図8 ATPの化学発光測定法の検量線

4. 酵素活性の化学発光測定法²⁰⁾

種々の酵素活性の化学発光測定法をまとめて表3に示す。ペルオキシダーゼは pH 7 - 8.5 でルミノールおよび H_2O_2 を基質として化学発光し、その検出限界は 6×10^{-10} mol である。ビス(2,4,6-トリクロロフェノール)オキサレート (TCPO)/蛍光色素(8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸, ANS)を用いるグルコースオキシダーゼ (GOD) の検量線は $3 \times 10^{-17} - 3 \times 10^{-12}$ molでよい直線性を示した。 β -D-ガラクトシダーゼ (BGase)は、ラクトースを基質として酵素反応させるとグルコースとガラクトースを生成する。このグルコースに GODを作用させ、 H_2O_2 を生成させて TCPO/ANS により発光検出すると、 1.5×10^{-14} mol/L まで検出可能であった。

BGase の酵素活性測定は、0-フェニル- β -D-ガラクトシドを基質として酵素反応により生成するガラクトースにガラクトースデヒドロゲナーゼ (GalDH)を共役させ、NADHを生成させて化学発光検出する。BGase として 10^{-19} mol/assayまで直線性を示し

、さらに測定条件を注意深く厳守すれば 10^{-20} mol/assayまでの検出が可能であった。BGase の化学発光法には、表3に示したようにラクトースを基質として生成するグルコースに GODを共役酵素として作用させて生成する H_2O_2 を TCPO/ANS 法で化学発光検出する方法、同様に生成した H_2O_2 を m-POD/ イソルミノールで化学発光検出する方法がある。これらの方法と他の測定法の検出感度の比較を表4に示す。石川らの生物発光法を利用する方法に次いで高感度である。

表3 化学発光法による酵素活性測定法

Enzyme	Chemiluminescence reaction
Peroxidase (POD)	$\text{Luminol} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow[\text{POD}]{\text{pH } 7-8} 5\text{-Aminophthalate} + \text{N}_2 + h\nu$
Glucose oxidase (GOD)	$\text{D-Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{D-Gluconic acid} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{TCPO} \rightarrow \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C} - \text{C} \\ \quad \\ \text{O} - \text{O} \end{array} + 2,2,4,6\text{-Trichlorophenol}$ $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{C} - \text{C} \\ \quad \\ \text{O} - \text{O} \end{array} + \text{ANS} \rightarrow 2\text{CO}_2 + \begin{array}{c} \text{ANS}^* \\ \downarrow h\nu \\ \text{ANS} \end{array}$
β -D-Galactosidase (BGase)	<p>1) $\text{Lactose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{BGase}} \alpha\text{-D-Glucose} + \beta\text{-D-Galactose}$</p> <p>$\alpha\text{-D-Glucose} \rightleftharpoons \beta\text{-D-Glucose}$</p> <p>$\beta\text{-D-Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{D-Gluconic acid} + \text{H}_2\text{O}_2$</p> <p>$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{TCPO} + \text{ANS} \rightarrow h\nu$</p> <p>or $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{IL} + \text{mPOD} \rightarrow h\nu$</p> <p>2) $o\text{-Nitrophenyl-}\beta\text{-D-galactoside} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{BGase}} o\text{-Nitrophenol} + \text{D-Galactose}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{D-Galactose} \xrightarrow{\text{GalDH}} \text{D-Galacto-1,5-lactone} + \text{NAD}^+ \\ \text{D-Galacto-1,5-lactone} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GalDH}} \text{D-Galactose} + \text{NAD}^+ \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{1-MPMSH}_2} \text{1-MPMS}^+ \\ \text{1-MPMS}^+ \xrightarrow{\text{1-MPMSH}_2} \text{NAD}^+ \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{O}_2 \xrightarrow{\text{mPODM}} \text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \\ \text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{mPODM}} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{IL}} h\nu \\ \text{H}_2\text{O}_2 + \text{IL} \xrightarrow{\text{mPODM}} h\nu \end{array}$</p>
Invertase (INV)	$\text{Sucrose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{INV}} \text{D-Glucose} + \text{D-Fructose (Reducing sugar)}$ $\text{Lucigenin} + \text{Reducing sugar} \xrightarrow{\text{OH}^-} \text{N-Methylacridone} + h\nu$
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	<p>$\begin{array}{c} \text{G6P} \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{6PG} + \text{NAD(P)}^+ \\ \text{6PG} + \text{NAD(P)H} \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{G6P} + \text{NAD(P)}^+ \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{NAD(P)}^+ \xrightarrow{\text{1-MPMSH}_2} \text{1-MPMS}^+ \\ \text{1-MPMS}^+ \xrightarrow{\text{1-MPMSH}_2} \text{NAD(P)}^+ \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{O}_2 \xrightarrow{\text{mPOD}} \text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \\ \text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{mPOD}} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \end{array}$</p> <p>$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{IL}} h\nu \\ \text{H}_2\text{O}_2 + \text{IL} \xrightarrow{\text{mPOD}} h\nu \end{array}$</p>
Alkaline phosphatase (ALP)	<p>1) $\text{D-Glucose-1-phosphate} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{D-Glucose} + \text{Pi}$</p> <p>$\text{D-Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{D-Gluconic acid} + \text{H}_2\text{O}_2$</p> <p>$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{IL} + \text{mPOD} \rightarrow h\nu$</p> <p>2) $\text{D-Galactose-1-phosphate} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{D-Galactose} + \text{Pi}$</p> <p>$\text{D-Galactose} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{GalDH}} \text{D-Galacto-1,5-lactone} + \text{NADH}$</p> <p>$\text{NADH} + \text{1-MPMS}^+ + \text{IL} + \text{mPOD} \rightarrow h\nu$</p> <p>3) $\text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{NAD}^+ + \text{Pi}$</p> <p>$\text{NAD}^+ + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{NADH} + \text{CH}_3\text{OH}$</p> <p>$\text{NADH} + \text{1-MPMS}^+ + \text{IL} + \text{mPOD} \rightarrow h\nu$</p>

G6P, glucose 6-phosphate; 6PG, glucose- δ -lactone 6-phosphate; ADH, alcohol dehydrogenase.

表4 種々の測定法の β -D-ガラクトシダーゼの検出感度の比較

Method	Substrate	Detection limit (mol/assay)
Spectrophotometry	o-NPGal	5×10^{-10}
Fluorophotometry	4-MU-Gal	2×10^{-14}
Chemiluminescence	Lactose/GOD/IL/mPOD	5×10^{-16}
	Lactose/GOD/TCPO/ANS	2×10^{-16}
	o-NPGal/GADH/NADH-CL	1×10^{-20}
Bioluminescence	o-NPGal/GADH/NADH-BL	2×10^{-22} *

o-NPGal, o-nitrophenol- β -D-galactoside; 4-MU-Gal, 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside; GOD, glucose oxidase; GADH, galactose dehydrogenase.

* E. Ishikawa et al., Anal. Lett., 19, 433 (1987)

グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH)もグルコース-6-リン酸を基質とし酵素反応により生成する NADH を化学発光検出する。G6PDH を 10^{-18} - 10^{-14} mol で高感度に測定できた。ヘキソキナーゼ/G6PDH によるグルコース測定に適用し、グルコース 10 pmol - 40 nmolで測定できた。G6PDH の活性を測定したところ 10^{-18} mol 以上で検出出来た。G6PDH の酵素反応後、過剰の NAD⁺ をアルカリ性にして分解し、生成した NADH を増幅化学発光法により測定するシステムを開発した。検量線は 3×10^{-21} - 3×10^{-17} mol/assay であった。この方法による検出感度は上記の化学発光法に比べて約 300倍の高感度であった。

アルカリホスファターゼ (ALP) 活性の化学発光測定法として表3に示すように3方法を検討した。NADP⁺ を基質とし、生成する NAD⁺ をエタノール/アルコールデヒドロゲナーゼにより NADH とし、上述の化学発光法で測定する方法が最も高感度であり、 1.8×10^{-18} mol/assay の高感度である。NAD/NADHの酵素サイクリング反応を組み合わせることにより更に高感度化し、ALP の検出感度は 3.6×10^{-20} mol/assay になった。

最近、新しい化学発光酵素基質、アダマンチル 1,2-ジオキセタン誘導体、が開発された²¹⁾。リン酸エステルやグルコシドが合成され、市販されている。酵素反応により生成する中間体は不安定で直ちに分解し、そのエネルギーが methyl m-oxybenzoate anion に転移して励起状態となり発光する。反応機構を図9に示す。この基質による ALP の検出感度は 10^{-21} mol/assay の高感度である。酵素イムノアッセイ法や DNA-ハイブリダイゼーションアッセイに応用されている。

筆者らも ALP の新しい化学発光基質としてアスコルビン酸-2-リン酸や 5-プロモ-4-クロロ-3-インドキシルリン酸を開発し、検討している²²⁾。

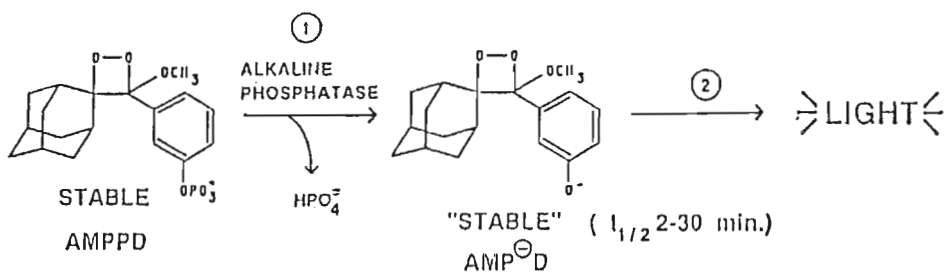


図9 アダマンチル1,2-ジオキセタン誘導体の化学発光反応

5. 化学・生物発光フローインジェクション分析法

化学・生物発光を検出法とするフローインジェクション分析法 (FIA) のシステムは、次の4種に大別される。

1. ルミノール化学発光に基づくシステム：過酸化水素、金属イオン、ヘム蛋白質など
2. ルシゲニン化学発光に基づくシステム： 金属イオン、還元性化合物（アスコルビン酸、クレアチニン、尿酸、ヒアルロン酸）など
3. 過シュウ酸ジエステル/蛍光色素化学発光に基づくシステム： 過酸化水素、蛍光色素など
4. 固定化酵素リアクターを用いるシステム： グルコース、胆汁酸、乳酸、尿素、尿酸など

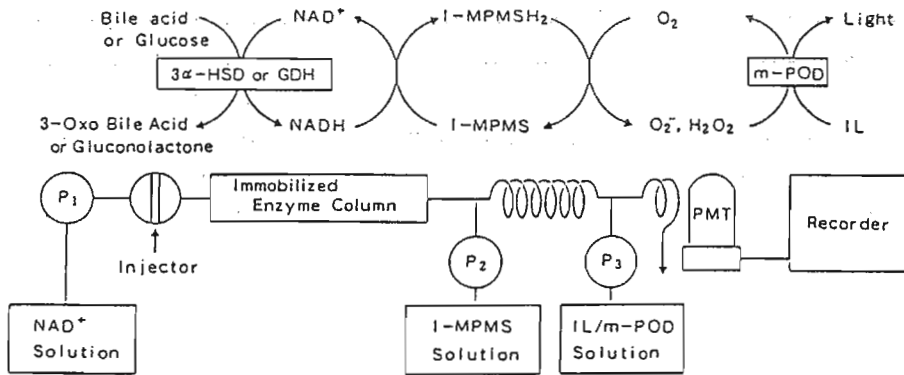
これらの化学発光 FIA については、黒田ら²³⁾、田端ら²⁴⁾ による総説があるので、ここでは筆者らが開発した前記の NADH の化学発光反応に基づく FIA システムについて述べる。

5. 1. NADHの化学発光法を用いる胆汁酸およびグルコースの化学発光 FIA^{18) 25)}

胆汁酸の酵素定量法には胆汁酸が 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (3 α -HSD) により 3-オキシ胆汁酸となり、その際、補酵素の NAD⁺ が NADH になることに基づく UV 法または蛍光法がある。また、生成する NADH をジアホラーゼ/レサズリンにより発色させて吸光度法により測定する方法がある。NADH の化学発光法を確立し、バッチ法による胆汁酸の化学発光分析法を確立した。

一般に 3 α -HSD を用いる酵素法では、酵素反応により生成する 3-ケト胆汁酸をヒドラゾンとしてトラップして反応系から除去するためにヒドラチン試薬を添加しているが、化学発光法ではヒドラチンが発光を阻害した。3 α -HSD を固定化したミニカラムを用いる方式にした。さらに全操作をフローシステムとした。

グルコースもグルコース脱水素酵素 (GDH) の固定化酵素リアクターにより同様のフローシステムにより測定できた。図10にそのシステムを示す。



Conditions

- P₁ ; BIP-1 HPLC pump (JASCO), 1.2 ml/min
- I ; Injector (1 - 20 μl)
- EC ; Enzyme Column (Immobilized 3α-HSD or GDH/glass beads, 4 mm x 40 mm)
- P₂, P₃ ; SNK pump, 1-MPMS and Isoluminol/m-POD (1 : 1), 0.55 ml/min
- D ; LC30-DPC10 (JEOL)

図 1 0 胆汁酸およびグルコースの化学発光 FIAシステム

血清試料について測定した結果を図 1 1 に示す。 いずれも日常分析法と良い相関が得られた。 本システムは表 1 に示す NAD⁺ を補酵素とする他の脱水素酵素系にも応用可能である。

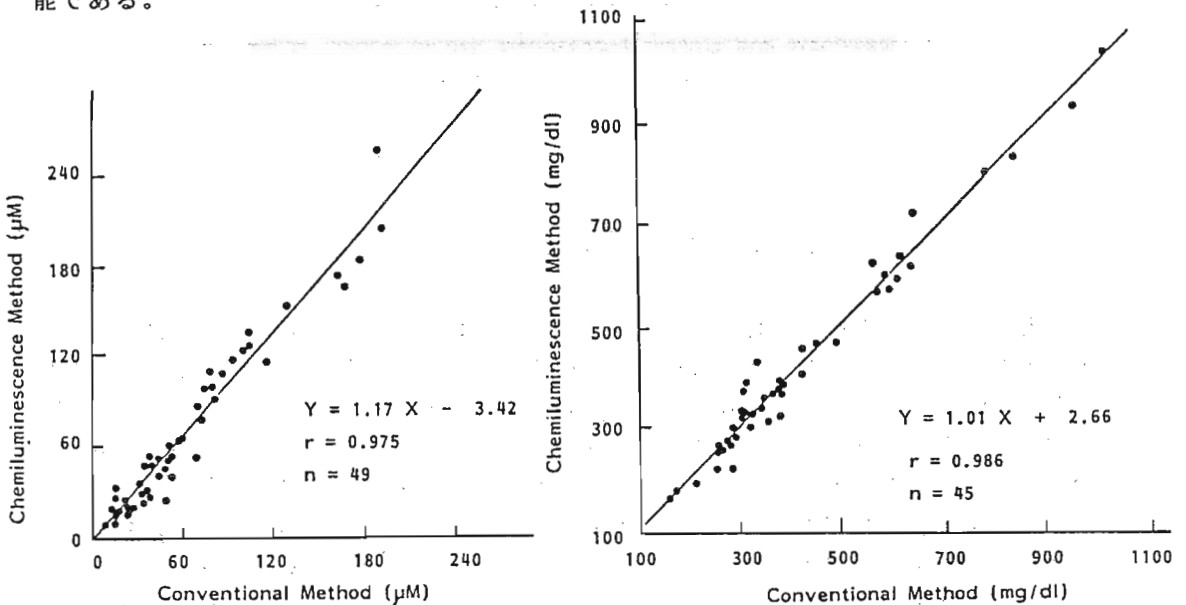


図 1 1 血清胆汁酸及びグルコースの化学発光 FIAと日常分析法との相関

5. 2. ATP の化学発光・生物発光 FIA^{26) 27)}

ATP はホタルルシフェラーゼを用いる生物発光法により測定されているが、試薬のルシフェラーゼが不安定であり、また高価であるためルーチン分析には適していない。(3. 2) の ATP の化学発光法のフローシステムを検討した。ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH) を固定化した酵素リアクターを装着したフローシステムで ATP を NADPH に変換し、NADPH を前述の化学発光検出システムを用い化学発光する方法である。図 1 2 に FIA のフローダイアグラムを示す。

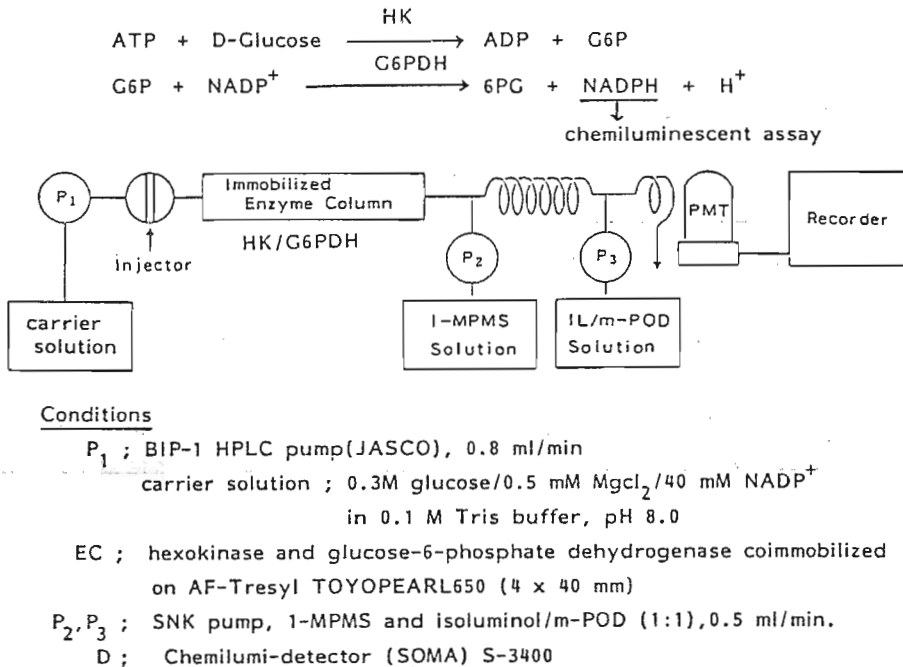


図 1 2 ATP の化学発光 FIA システム

至適条件での ATP の検量線は、 10^{-7} mol/L から 10^{-4} mol/L であり、生物発光法よりは感度が低い。一日 30 検体連続測定し、使用後 4°C で保存し、10 日間同様に繰り返し使用した後でも約 80% の酵素活性が保持されていた。

最近、遺伝子工学によりホタルルシフェラーゼが生産されるようになった。筆者らはリコンビナントのホタルルシフェラーゼを AF-トレスルヨパール 650 (東ソー) を固相としてガラスカラムの固定化酵素リアクターを調製し、ATP の生物発光 FIA システムを確立した。この FIA システムでは ATP の検量域は 10^{-8} - 10^{-10} mol/L であり、市販の ATP 測定キットより 10 倍高感度であった。この固定化ルシフェラーゼ酵素リアクターによる発光は 100 検体測定すると約 60% に減少したが、ATP の標準液と比較することにより正確に測定できる。種々の安定化剤について検討し、4 mM ジチオスレイトールの添加が有効で

あった。本システムにより活性汚泥中の ATP を測定し、生物検定法と比較し、良い相関性が認められた。

6 まとめ

化学発光分析法は高感度でアトモレベルの分析が可能であることから、微量生体成分の分析法として有用である。ルミノール発光、ルシゲニン発光、ペルオキシオキザレートエステル・蛍光色素発光、NADH 化学発光に基づく種々の酵素活性の化学発光測定法が開発され、固定化酵素リアクターとし高感度な胆汁酸、グルコース、ATP の化学発光 FIA が開発された。

7. 文 献

1. L. J. Kricka and T. J. N. Carter: Chemical and Biochemical Luminescence, Marcel Dekker, New York, Basel (1982)
2. L. J. Kricka, P. E. Stanley, G. H. G. Thorpe and T. P. Whithead : Analytical Application of Bioluminescence and Chemiluminescence, Academic Press, London, New York, Tokyo (1984)
3. K. van Dyke (ed) : Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications, Vol. I and II, CRC Press, Boca Raton, Florida (1985)
4. 今井一洋 編 : 生物発光と化学発光、広川書店、東京 (1988)
5. K. van Dyke and R. van Dyke : Luminescence Immunoassay and Molecular Applications, CRC Press, Boca Raton, Florida (1990)
6. H. R. Schroeder and F. M. Yeaget : Anal. Chem., 50, 1114 (1978)
7. H. R. Schroeder, R. C. Boguslaki, R. J. Carrico and R. T. Buckler : in "Methods in Enzymology" ed. M. A. DeLuca, pp. 424 - 445, Academic Press, London and New York (1978)
8. R. C. Veazey and T. A. Nieman : Anal. Chem., 51, 2092 (1974)
9. M. Maeda and A. Tsuji : Anal. Sci., 2, 183 (1986)
10. I. Weeks, M. Stergess, R. C. Brown and J. S. Woodhead : in "Methods in Enzymology" ed. M. A. DeLuca and W. D. McElroy, 133, pp. 366 - 387, Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London (1986)
11. M. M. Rauhut et al. : J. Am. Chem. Soc., 89, 6515 (1967)
12. M. M. Rauhut : Acc. Chem. Res., 2, 80 (1969)
13. R. A. Sherman, J. Holzbecher and D. E. Ryan : Anal. Chim. Acta, 97, 21 (1978)
14. A. Tsuji, M. Maeda and H. Arakawa : in "Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications, Vol. I, ed. K. van Dyke, pp. 185 - 201, CRC Press, Boca Raton, Florida (1985)
15. K. Imai, K. Miyaguchi and K. Honda : in "Bioluminescence and Chemiluminescence : Instruments and Applications, Vol. II, ed. K. van Dyke, pp. 65 - 76, CRC Press, Boca Raton (1985)
16. K. Imai : in "Method in Enzymology", ed. M. A. DeLuca and W. D. McElroy, 133,

435. Academic Press, Orlands. San Diego, New York, London (1986)
17. 田部一也、河崎孝男、前田昌子、辻章夫 : 分析化学、36, 82 (1987)
 18. A.Tsuji, M.Maeda and H.Arakawa : J. Biolumi & Chemilumi., 4, 454 (1989)
 19. 河本美津子、荒川秀俊、前田昌子、辻章夫 : 日本薬学会第106年会講演要旨集, 3, p. 270 (1990)
 20. M.Maeda, H.Arakawa and A.Tsuji : J. Biolumi & Chemilumi., 4, 140-148 (1989)
 21. I.Bronstein, B.Edwards and J.C.Voyte : ibid., 4, 99 - 111 (1989)
 22. 荒川秀俊、前田昌子、辻章夫 : 第9回生体成分の分析化学シンポジウム講演要旨集、p.129 (1990)
 23. 黒田六郎、小熊幸一郎、中村洋 : フローインジェクション分析法、pp. 151 - 166, 共立出版、東京 (1990)
 24. 田畑勝好、村地孝 : 生物発光と化学発光 (今井一洋編)、広川書店、東京、pp. 211 - 247 (1989)
 25. 前田昌子、辻章夫 : 日本分析化学会第36年会講演要旨集、p. 413 (1986)
 26. 前田昌子、辻章夫、大島信夫、福岡正芳 : 第11回フローインジェクション研究会講演要旨集、p. 12 (1989)
 27. 前田昌子、辻章夫、大島信夫、福岡正芳、本間茂 : 第12回フローインジェクション研究会講演要旨集、p. 20 (1989)