

フローインジェクション分析法による グアナーゼ活性の測定

友田正子, 内田和秀, 樋口誠彦, 佐治京子, 斎藤真一
上智大学理工学部一般科学研究室
〒102 千代田区紀尾井町7-1
防衛医科大学校麻酔学教室
〒359 所沢市並木3-2

Flow Injection Analysis for Guanase Activity

Masako Tomoda, Kazuhide Uchida*, Nobuhiko Higuchi, Kyoko Saji,
and Shin-ichi Saito

Department of Natural Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia
University, 7-1 Kioicho, Chiyoda-ku, Tokyo 102

*Department of Anesthesiology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki,
Tokorozawa-shi, Saitama 359

A more simple and convenient method for the determination of guanase activity was established using FIA. This new flow method is based on measuring the hydrogen peroxide formed by guanase and coupled enzymes: xanthine oxidase and uricase. FIA system is made up of series injection method, stopped flow method and merging zone method. A good linear relationship ($r = 0.9999$) was obtained for the standard curve between the activity of guanase (37°C , $0 - 1.84 \text{ UI}^{-1}$) and the absorbance. The reproducibility was good (RSD $< 1\%$, $n = 10$) and the mean recovery was 97%. Since the endogenous xanthine and uric acid in each biological sample can be eliminated completely in the FIA system, a blank test was not needed. This method allows relatively rapid analysis, because forty samples can be treated during about 6 hours.

1. 緒 言

グアナーゼ (Guanase; Guanine deaminase) は, グアニンを脱アミノ化してキサンチンとアンモニアに分解する核酸代謝系酵素で, 1932年 Schmidt¹⁾ が初めて家兎の肝ホモジネート中に発見したものである. 1963年 Passanenti²⁾ が肝疾患時に血清中のグアナ

ーゼ活性が上昇することを見いだして以来、肝機能検査として血清グアナーゼ活性が臨床的に有意義であることが数多く報告されている。³⁻⁵⁾ グアナーゼのヒトにおける臓器分布は肝、腎、脳に多く存在することが知られており、従来から肝機能検査の代表的な項目である GOT (Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (Glutamic pyruvic transaminase) が肝以外に骨格筋、心筋、膵などにも比較的多く存在して急性心筋梗塞や筋疾患でも増加するのに対し、グアナーゼは増加せず、これらの酵素よりも肝に特異的であることが報告されている。³⁾ しかし、血清中のグアナーゼ活性は正常人において極めて低く、そのためその活性測定には高感度が要求される。⁶⁾ グアナーゼの測定法として、基質に 8-アザグアニンを用いて生成するアンモニアを直接測定する方法、⁷⁾ グアニンを基質としてキサンチンオキシダーゼ (XOD) 反応時に生じる O_2^- の還元作用を利用する方法、⁸⁾ アイソトープを用いる方法、⁹⁾ XOD 及びウリカーゼ、ペルオキシダーゼ (POD) 共役系により生成した過酸化水素を定量する方法¹⁰⁻¹²⁾ などが報告されている。¹³⁾ 最近ではグアナーゼ活性測定用酵素キットが発売されており、取扱いが難しいとされる酵素の試薬調製も安全かつ迅速に行うことができる。しかしながら、これらの方法は操作上まだ煩雑であったり、精度に難点を有しているものもあり、日常検査には適応しがたい面がある。著者らは、グアナーゼ活性測定をフローインジェクション分析法 (FIA法) に応用することを試みたので報告する。

2. 実 験

2. 1. 反応経路

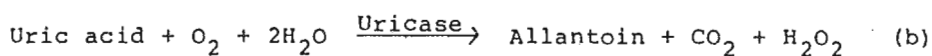
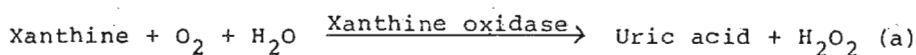
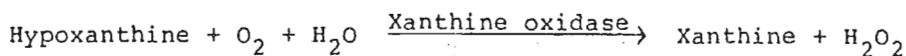
反応経路を Fig. 1 に示す。Step 1 で内因性キサンチン類及び尿酸により生成する過酸化水素をカタラーゼにより分解する。この段階で内因性物質による妨害を消去する。Step 2 ではグアニンを基質としてグアナーゼを作用させ、生成するキサンチンから Step 1 の反応 (a) (b) と同じ過程で 2 分子の過酸化水素を生成させる。生成した過酸化水素によりペルオキシダーゼの作用でメチルベンゾチアゾリノンヒドラゾン (MBTH) と N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン (ESPAS) を酸化縮合させ、インダミン色素 (赤紫色) に導く。従ってグアナーゼ活性は過酸化水素濃度に直接比例し、グアナーゼ標準液の検量線より活性値が定量可能である。

2. 2. 装 置

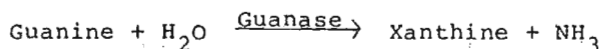
ポンプ: Gilson製 minipuls-2 型ペリスタ式ポンプ (A法)、あるいは日本精密科学製 SP-D-2501 プランジャー型ポンプ (B法) を用いた。

サンプルインジェクター: 協和精密製 KMM-6V-4 型 (A法) あるいは KMM-6V-2 型 (B法) を用いた。

Step 1: Elimination of endogenous compounds



Step 2: Determination of guanase



Reaction (a)

Reaction (b)

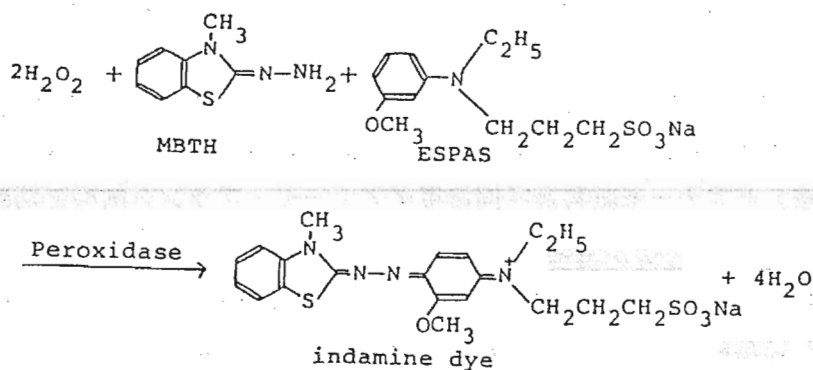


Fig. 1 Reaction paths

Table 1 Reagent system

Reagent 1 (R ₁)	0.01 U/ml	Xanthine oxidase
	0.5 U/ml	Uricase
	6 U/ml	Superoxide dismutase
	14 U/ml	Catalase
	1.25 U/ml	Peroxidase
	2 U/ml	Ascorbate oxidase
	0.05 M	Phosphate buffer (pH 7.4)
Reagent 2 (R ₂)	200 μM	Guanine
	200 μM	3-Methyl-2-benzothiazolinonehydrazone (MBTH)
	1 mM	N-Ethyl-N-(3-sulphopropyl)-m-anisidine (ESPAS)

切り換えバルブ及びプログラムタイマー：日本精密科学製 NV-508-2-6 型自動二連六方バルブを、同社製 PP-1100 型プログラムタイマーにて制御した。

検出器：日本分光製 UVIDEC-340 型分光光度計に FIC-36 型フローセル（光路長：10 mm，セル容量：20 mm³）を取り付け、波長 570 nm で測光した。また、メチルオレンジによる試験において、塩酸溶液では波長 510 nm を、水溶液では 460 nm を用いた。

恒温槽：三陽理化機器製 SYK-382-M 型恒温槽を使用した。

記録計：理研電子製 SP-G12 型記録計を用いた。

2. 3. 試薬と試料

試薬調製の迅速化のために小野薬品工業製グアナーゼ測定用酵素キット（ダイヤカラー-GUA）を利用した。キット内容を Table 1 に示す。これらは常に 4℃ で保存した。

界面活性剤を除く試薬は特級品を用い、水は日本ミリポア製 Milli-RO 及び Milli-Q システムで精製した超純水を使用した。

グアナーゼ標準液は、各ロット毎に活性値が表示された小野薬品工業製ダイヤカラー-GUA用グアナーゼ標準品を用いた。これを生理食塩水で適当に希釈して、活性系列を調製した。

内因性物質の影響を検討する目的で、以下に調製法を示す各母液を生理食塩水で希釈し、10 mg dl⁻¹ キサンチンまたは 20 mg dl⁻¹ 尿酸を含む 1.25 UI⁻¹（A法）及び 2.45 UI⁻¹（B法）グアナーゼ試料及び同濃度グアナーゼ・ブランク試料を調製した。

2. 3. 1. A法での母液の調製

キサンチン 5 mg あるいは尿酸 10 mg を、各々 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液 1.0 または 2.0 cm³ に溶解し、0.1 M リン酸カリウム緩衝溶液（pH = 7.4）を加えて全量を 10 cm³ とした。

2. 3. 2. B法での母液の調製

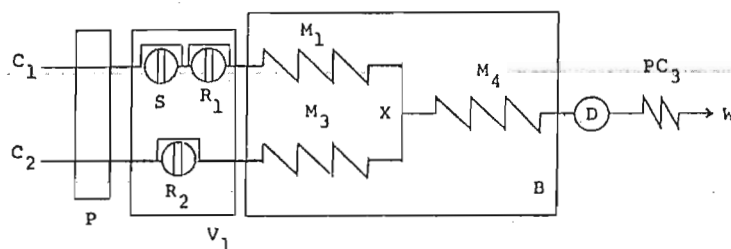
キサンチンナトリウム 25 mg を水に溶解、あるいは尿酸 22 mg を 0.12 % (w/v) 炭酸リチウム水溶液に溶解して、全量を 10 cm³ とした。

2. 4. 流路及び試料注入法

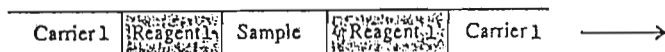
シリーズインジェクション法とマーキングゾーン法を組み合わせたA法（Fig. 2）と更にストップフロー法を組み合わせた改良法（B法，Fig. 3）を設計した。A法，B法共に酵素反応を円滑に進行させるために、各コイルを恒温槽にて加温した。また、気泡による測定妨害を防ぐために背圧コイル（PC₃）を取り付け、キャリアー使用前に脱気した。

A法はポンプ（P）によって送液されるキャリアー（C₁）中にサンプルインジェク

ター (V_1) を用いて試料 (S) と酵素試薬 (R_1) を、キャリアー (C_2) 中に基質発色試薬 (R_2) をそれぞれ注入する。 V_1 には、 S 、 R_1 及び R_2 が同時に注入できるように四連六方バルブ¹⁴⁾ を用い、 S と R_1 が混合コイル (M_1) 中で完全に反応するように、 S を R_1 ではさむシリーズインジェクション^{15・16)} を取り入れた。 S 、 R_1 及び R_2 体積は、 V_1 に取り付けられたループ容積とバルブ内の死体積 (デッドボリューム) との和とした。 S 注入体積は機械的に可能な最少量 50 mm^3 に固定した。 また、 注入方法はオーバーフロー法¹⁷⁾ を用い、 総注入量は 200 mm^3 とした。 S と R_1 は M_1 中で Fig. 1 で示した Step 1 のように反応し、 内因性のキサンチン類及び尿酸が消去される。 次に合流点 (X) で R_2 と合流し、 反応コイル (M_4) 中で Step 2 の反応が進行する。

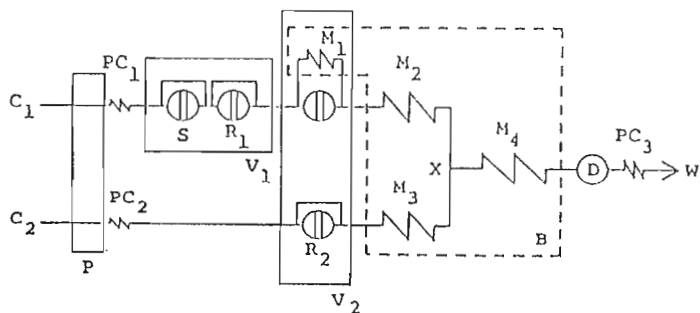


The state of the series injection in flow line:



C_1 and C_2 : Carrier solution (0.05 M KH_2PO_4 - NaOH buffer, pH = 7.4 and 6.0, containing 1.2 % (v/v) Triton X-100); P: Peristaltic pump; V_1 : Injector, the synchronized system using four circuits of six-way valves; S: Sample (injection volume = 50 mm^3); R_1 : Enzyme solution (consisting mainly of XOD, UOD, catalase and POD, injection volume = 350 mm^3); R_2 : substrate and color reagent solution (consisting mainly of guanine, MBTH and ESPAS, injection volume = 200 mm^3); M: Mixing and reaction coil (0.5 mm id, $M_1 = 32 \text{ m}$, $M_3 = 20 \text{ m}$, and $M_4 = 36 \text{ m}$); B: Water bath at $45 \text{ }^\circ\text{C}$; D: Detector, spectrophotometer fixed flow cell, $\lambda = 570 \text{ nm}$; PC_3 : Back pressure coil (0.25 mm id x 0.15 m); W: Waste, Flow rate: $C_1 = 0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $C_2 = 0.3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

Fig. 2 A flow diagram of A method with series injection method



C_1 and C_2 : Carrier solution (0.05 M KH_2PO_4 - NaOH buffer, pH = 7.4 and 6.0, containing 1.2 % (v/v) Triton X-100); P: Plunger pump; PC_1 and PC_2 : Pressure coil (0.25 mm id x 8 m and 12 m); V_1 : Injector; S: Sample (injection volume = 50 mm^3); R_1 : Enzyme solution (injection volume = 350 mm^3); V_2 : Automatic a pair of six-valve systems (controlled by program timer); R_2 : Substrate and color reagent solution (injection volume = 250 mm^3); M: Mixing and reaction coil (0.5 mm id, $M_1 = 14 \text{ m}$, $M_2 = 1 \text{ m}$, $M_3 = 3.1 \text{ m}$, $M_4 = 36 \text{ m}$); B: Water bath at 45°C ; D: Detector, spectrophotometer fixed flow cell, $\lambda = 570 \text{ nm}$; PC_3 : Back pressure coil (0.25 mm id x 0.15 m); W: Waste, Flow rate: $C_1 = 0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $C_2 = 0.3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

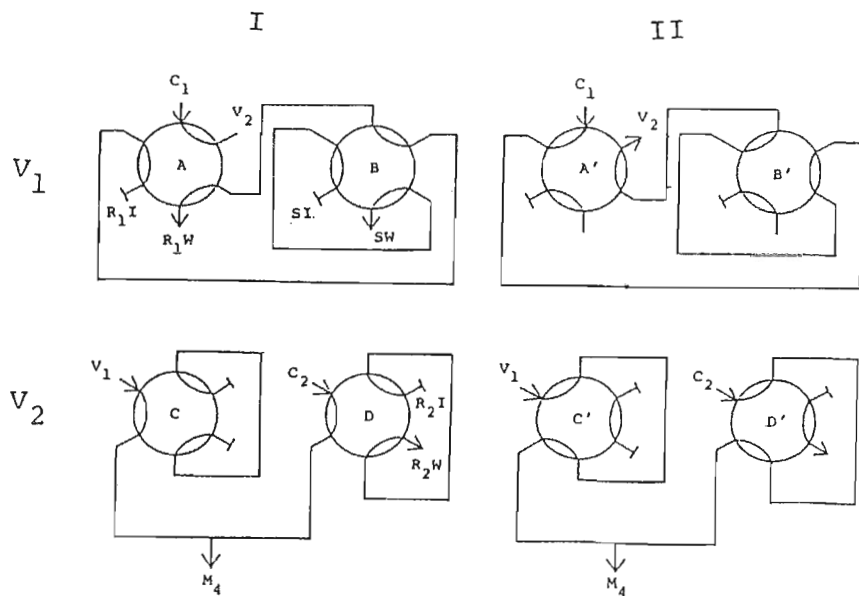


Fig. 3 A flow diagram of B method with series injection, stopped flow and merging zone methods (upper) and connection ways of V_1 and V_2 (lower)

B法は M_1 中で進行する Step 1 の反応を更に完全にす目的及び感度低下を防ぐ目的で、ストップフロー法を導入した。 V_1 によりSと R_1 を C_1 中にシリーズインジェクションし、丁度 M_1 におさまった時点(T_1)で自動二連六方バルブ(V_2)を作動させ(Fig. 3, II→I), 一定時間(T_2) M_1 中に滞留させる。その間に R_2 をループ中に充填させる。次に V_2 を作動させて(I→II), Sと R_1 の混合液が再び流れ出す時点で, R_2 が C_2 中に注入される。

2. 5. A法における最適条件の検討

2. 5. 1. M_4 長の検討

$M_1 = M_3 = 2 \text{ m}$ (0.5 mm i. d.), $R_1 = 100 \text{ mm}^3$, $R_2 = 200 \text{ mm}^3$, $T = 37^\circ\text{C}$, 両キャリアー流量(FC_1 , FC_2) = $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ 及び C_1 , C_2 組成共に 0.6% Triton X-100を含む 0.1 M リン酸一カリウム/水酸化ナトリウム緩衝液(pH = 7.4)に固定し, M_4 を 18 ~ 24 m (0.5 mm i. d) で変化させ, 標準系列を用い吸光度を測定した。

2. 5. 2. M_1 長, M_3 長, R_1 体積及びTの検討

内因性キサンチン及び尿酸の消去を目的に, 2. 5. 1. で用いた C_1 , C_2 , FC_1 , FC_2 , R_2 条件及び2. 5. 1. で得られた M_4 の最適条件を使用し, M_1 , M_3 , R_1 及びTを Table 2 に示すように変化させ, キサンチンあるいは尿酸含有試料及びブランク試料を用い吸光度を測定した。ここで M_3 は M_1 に関連し, 両流路注入化合物がXで良好に混合するように順次変化させ設定した。これにはSあるいは R_2 にメチルオレンジ塩酸溶液を別個に注入測定し, 得られる2つの波形のピークトップが同調する時間をチャート紙から求める別の試験を行った。

2. 5. 3. FC_2 の検討

下記諸条件のもと, $FC_1 = 0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ に固定し, FC_2 を 0.3, 0.5 及び $0.7 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ と変化させ, 標準系列を用い吸光度を測定した。 FC_2 の可変により, Sと R_2 がXで良好に混合するように, 上記同様メチルオレンジを用いた試験を行った。設定条件は $M_1 = 32 \text{ m}$ (0.5 mm i. d.), $T = 45^\circ\text{C}$, $R_1 = 350 \text{ mm}^3$ とし, 他は2. 5. 2. と同様である。

2. 5. 4. C_1 , C_2 組成の検討

以上求められた条件下で, C_1 , C_2 中の界面活性剤の種類及び濃度を変化させ, 標準系列を用い吸光度を測定した (Table 3 参照)。また, 緩衝溶液の種類及びpHについても同様に検討した (Table 4 参照)。

2. 5. 5. 添加回収試験

添加回収試験を添加回収試験試案¹⁸⁾に準じて行った。グアナーゼ標準液を被検試料

の 1/10 添加し、回収率を算出した。

2. 6. B法における最適条件の検討

A法で求めた最適条件下、 M_1 長、 T_1 (Delay time)、 T_2 (Stopped flow period) 及び R_2 体積を検討した。

2. 6. 1. M_1 長及び T_1 の検討

R_1 の代わりにメチルオレンジ水溶液を注入し、 M_1 及び T_1 を変化させ、ピーク形状を観察した。S、 R_1 混合溶液の M_1 中への流入以前、即ち最適時間より短い状態、または S、 R_1 混合溶液の一部あるいは全部の M_1 からの流出以後、即ち最適時間より長い状態を作るバルブ操作を避けるように考慮した。

2. 6. 2. T_2 の検討

内因性キサンチン類及び尿酸の消去反応に直接関連する T_2 を、2. 5. 2. における M_1 検討法と同様にして行った。

2. 6. 3. R_2 体積の検討

R_2 体積を 200 ~ 350 mm³ の間で変化させて、グアナーゼ標準液 (1.23 または 3.68 UI⁻¹) を各々 10 回測定し、相対標準偏差を比較した。

2. 6. 4. 添加回収試験及び応用検体の測定

添加回収試験を各種試料で行った。また、管理血清及びプール血清 (9種類) を応用検体として定量し、ダイヤカラー GUA を用いた用手法と比較した。

3. 結果と考察

3. 1. A法による最適条件の検討

M_4 長の吸光度に及ぼす影響を Fig. 4 に示す。直線の傾きと直線性より 36 m を選択した。

M_1 及び M_3 長、 R_1 体積及び T が内因性物質の消去に及ぼす影響を Table 2 に示す。一般に酵素反応は 37°C 付近が最適条件とされる。しかし本法では試料注入後短時間で最適温度に到達させるため、 $T > 37^\circ\text{C}$ で検討を行った結果、45°C が最も反応が効率よく進行した。また、 M_1 中での反応、即ち内因性物質の消去反応が確実に行われなければ、測定値に正の誤差を生じる。 M_1 長は S と R_1 の混合及び反応時間に影響し、32 m (内径 0.5 mm) で内因性物質をほぼ消去し得た。

FC_2 の吸光度に及ぼす影響を Fig. 5 に示す。直線の傾きより 0.3 cm³min⁻¹ を選択した。

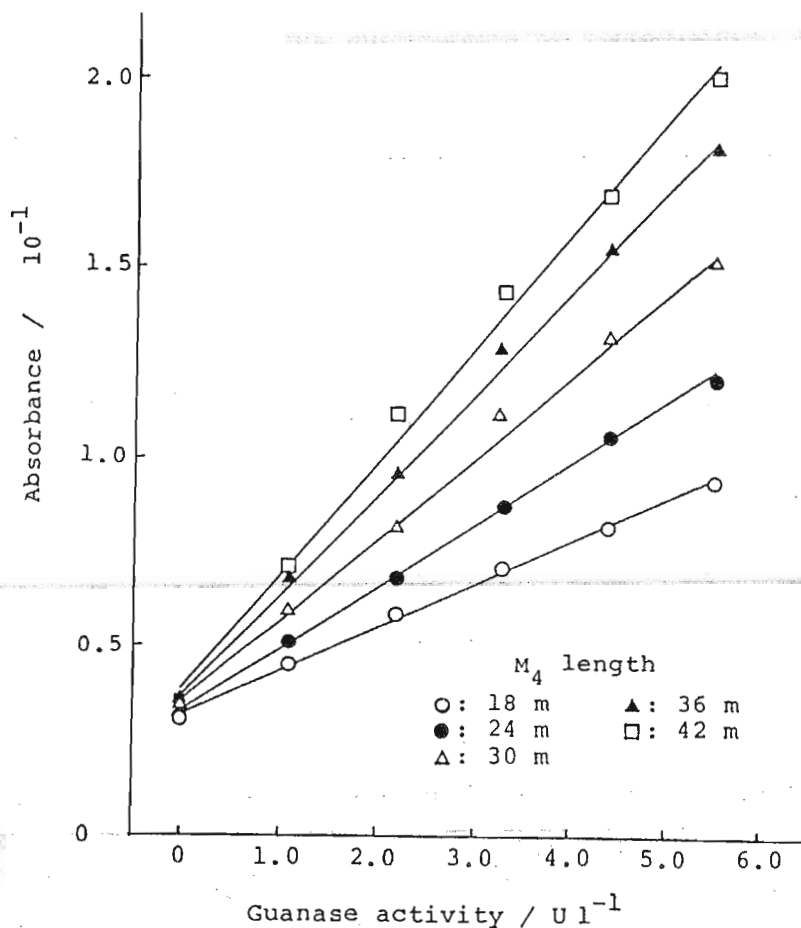


Fig. 4 Effect of reaction coil (M_4) length on absorbance in A method

求めた条件下で検量線を作成したところ、 $0 \sim 0.1 \text{ UI}^{-1}$ 間の吸光度にほとんど差がみられなかった。しかし試薬ブランク値に対し、 0.13 UI^{-1} で +4% と明らかな吸光度差を示したので、この濃度を定量限界とした。グアナナーゼ活性 $0.13 \sim 1.05 \text{ UI}^{-1}$ の範囲で、良好な検量線（勾配 $a = 0.0268$ ，相関係数 $r = 0.9983$ ）が得られた。

試料または試薬中の蛋白質などの流路（テフロンチューブ）への付着は、定量の再現性に影響を及ぼす。この汚染防止に界面活性剤の添加は必要不可欠であるが、試薬ブランクや酵素反応阻害の問題もあり、最適条件の検討が必須である。C₁及びC₂に添加した界面活性剤の種類及び濃度が、検量線に及ぼす影響を Table 3 に示す。検量線の傾き、直線性及びy切片（試薬ブランク値）を考慮し、1.2% Triton X-100 を選択した。また、緩衝溶液の種類及びpHが、検量線に及ぼす影響を Table 4 に示す。検量線の傾き及び直線性より、C₁はリン酸一カリウム緩衝溶液（pH 7.4）を、C₂には同緩衝溶

Table 2 Eliminated of endogenous xanthine and uric acid in A method

No.	M ₁		M ₃		R ₁		Resident ^{a)} time in M ₁ /min	Temp. °C	Ratio of absorbance	
	length/m	i.d./mm	length/m	i.d./m	vol./mm ³	i.d./mm			(G+X)/G*	(G+U)/G**
1	6.00	0.5	6.00	0.5	100	1.0	2.36	37	11.4	-
2	2.00	1.0	2.00	1.0	100	1.0	3.14	37	9.10	-
3	0.41	2.2	0.41	2.2	100	1.0	3.14	37	5.10	-
4	0.83	2.2	16.00	0.5	150	1.0	6.28	37	6.35	2.35
5	0.83	2.2	16.00	0.5	150	1.0	6.28	40	5.80	2.14
6	0.83	2.2	16.00	0.5	150	1.0	6.28	45	4.00	1.68
7	0.83	2.2	16.00	0.5	150	1.0	6.28	50	4.24	1.91
8	1.24	2.2	24.00	0.5	150	1.0	9.42	45	2.79	1.48
9	1.24	2.2	24.00	0.5	500	1.0	9.42	45	1.31	1.21
10	1.24	2.2	32.00	0.5	500	1.0	12.56	45	1.20	-
11	+8.00 1.24	0.5 2.2	32.00	0.5	500	2.2	12.56	45	1.15	-
12	8.00	1.0	32.00	0.5	500	2.2	12.56	45	1.08	-
13	32.00	0.5	32.00	0.5	500	2.2	12.56	45	1.06	0.99
14	40.00	0.5	40.00	0.5	500	2.2	15.70	45	1.03	1.01
15	40.00	0.5	40.00	0.5	350	2.2	15.70	45	1.04	1.01
16	32.00	0.5	32.00	0.5	350	2.2	12.56	45	1.01	1.00

* (Absorbance of guanase with xanthine)/(Absorbance of guanase)

** (Absorbance of guanase with uric acid)/(Absorbance of guanase)

a) The time which S and R₁ mixture passes through M₁

液 (pH 6.0) を選択した。色原体 MBTH-ESPAS は酸性側 (pH 5.5 ~ 7.0) で安定である¹²⁾ ことから C₂ の pH は適当と考えた。最近、生化学領域でグッド緩衝液¹⁹⁾ が広く使用されており、グアナナーゼ活性の測定にも用いられている。²⁰⁾ しかしながらグッド緩衝液は比較的高価であり、本法での多量使用を考慮し、試薬調製も簡単な緩衝溶液を使用した。

ここまで求められた条件で標準液及び管理血清のグアナナーゼ添加回収試験を行ったところ、標準液では良好な値が得られたが、管理血清の回収率は大きくばらついた。これは各血清中の共存物質の種類及び粘度の違いから、測定値に与える影響が異なるためと考えられた。そこで生理食塩水の代わりに種々の希釈液を用いた標準液で検量線を作成し、それにより回収率を求め、それが 100 % に近くなるような希釈液を検討した。結果を Table 5 に示す。管理血清 EXA normal を用いた時最も良い回収率を示した。また、EXA normal そのものの吸光度は試薬ブランク吸光度 (グアナナーゼ活性 0 U l⁻¹) に近く、検量線の傾きも日差変動が少なかったので希釈液を EXA normal とした。A 法における最適条件を Fig. 2 に示す。0.14 ~ 4.9 U l⁻¹ の範囲で良好な検量線が得られた (a = 0.0199, r = 0.9994)。

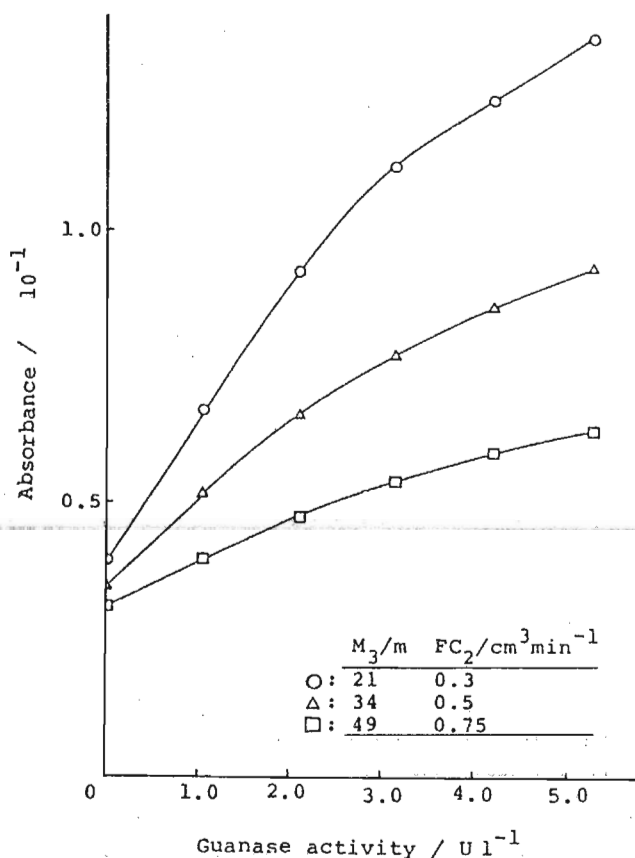


Fig. 5 Effect of flow rate (FC_2) on absorbance in A method

3. 2. B法による最適条件の検討

A法においては検出下限が $0.13 U l^{-1}$ であったため、管理血清あるいはヒト血清試料の一部が定量限界以下となってしまった。これは M_1 中で Step 1 の反応を完結させるためにコイル長が長くなり、その間に S , R_1 および R_2 の拡散が進行し、感度が下がったものである。そこで低活性領域にも適用できるシステムを考案した。 M_1 をできる限り短くし、 R_1 と S が M_1 に充填された時点で流れを止めるストップフロー法を採用した。フローダイヤグラム、最適条件及びバルブの配管を Fig. 3 に示す。また、希釈液にA法では管理血清 EXA normal を用いたが、EXA normal の添付資料によるとグアナゼ活性値が $0.8 \pm 0.5 U l^{-1}$ であるので、希釈液を生理食塩水とした。

Table 3 Effect of type and concentration of surfactant in carrier on correlation between guanase activity and absorbance (A method)

Surfactant	Concentration %(v/v)	Correlation between guanase activity* and absorbance		
		Slope	y-Intercept	r
Triton X-100	0.6	0.0254	0.0416	0.9991
	1.2	0.0276	0.0401	0.9993
	1.8	0.0189	0.0398	0.9976
Brij 35	0.15	0.0268	0.0930	0.9981
	0.3	0.0281	0.0955	0.9997
	0.6	0.0234	0.1298	0.9972
Tween 80	0.12	0.0281	0.0807	0.9988
	0.3	0.0284	0.1163	0.9992
	0.6	0.0276	0.2091	0.9989
	1.2	0.0139	0.3446	0.9924
Tween 20	0.12	0.0255	0.1169	0.9997
	0.3	0.0162	0.2259	0.9993
	0.6	0.0200	0.3416	0.9955
	1.2	0.0051	0.5050	0.9931

* Guanase activity: 0.14 - 2.1 U l⁻¹
C₁ and C₂: 0.1 M(KH₂PO₄ - NaOH), pH = 7.4

Table 4 Effect on type and pH of buffer in carrier on correlation between guanase activity and absorbance (A method)

Buffer				Correlation between guanase activity* and absorbance		
C ₁		C ₂		Slope	y-Intercept	r
Type	pH	Type	pH			
K-phosphate	7.4	K-phosphate	7.4	0.0276	0.0811	0.9996
Na-phosphate	7.4	Na-phosphate	7.4	0.0281	0.0872	0.9997
Citric acid	7.4	Citric acid	7.4	0.0210	0.0896	0.9966
Tris	7.4	Tris	7.4	0.0294	0.0828	0.9991
K-phosphate	7.4	K-phosphate	6.0	0.0337	0.0897	0.9999
K-phosphate	7.4	Citric acid	6.0	0.0278	0.1045	0.9988

* Guanase activity: 0.14 - 0.21 U l⁻¹
K-phosphate: KH₂PO₄ - NaOH, Na-phosphate: Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄
Surfactant: 0.3% Birj 35
Concentration of buffer: 0.1 M

T₁及びM₁長の検討結果を Table 6 に示す. SとR₁の混合液が反応コイルM₁中に入り切らないうちに, また, M₁コイルより先に出てしまってからバルブを切りかえると, M₁滞留中にS, R₁混合物の一部が先にDに到達してしまうので, ピーク形状はダブルピークを示す. M₁ = 20 m の時, T₁ > 230 秒でシングルピークとなった. T₁ = 230 秒に固定し, M₁を短くして行ったところ, M₁ = 14 m の時, SとR₁を完全にM₁中に充填することができた.

内因性キサンチンと尿酸の消去に T_2 の及ぼす影響は、5, 7, 10 及び 12 分で検討したところ、共に + 2 ~ 3 % の誤差を示しほぼ一定で変化はなかったため、最短時間の 5 分を選択した。 $T_2 < 5$ 分は検討しておらず、今後の検討課題である。

R_2 を検討した結果、2 種試料共に $RSD = 0.62$ 及び 0.81% ($n = 10, 1.23 \text{ UI}^{-1}, 3.68 \text{ UI}^{-1}$) と変動が最少であった 250 mm^3 を選択した。

Table 5 Influence of diluent for recovery test in A method ($n = 3$)

Diluent	Sample	Guanase activity/ UI^{-1}			Recovery/%
		Added	Found	Recovered	
0.85% NaCl	Guanase Std.	0	0.38	-	-
		0.51	0.91	0.53	104
		0	0.90	-	-
		0.51	1.43	0.53	104
		0	1.20	-	-
		0.51	1.68	0.48	94
	Precipath E	0	0.76	-	-
		0.51	1.31	0.55	108
	Seronorm	0	0.19	-	-
		0.51	0.53	0.34	67
0.85% NaCl + 5% Albmin	Guanase Std.	0	0.90	-	-
		0.51	1.46	0.56	110
	Precipath E	0	1.03	-	-
		0.51	1.42	0.39	76
KH_2PO_4 - NaOH Buffer (pH 7.4)	Guanase Std.	0	0.93	-	-
		0.51	1.52	0.59	115
	Precipath E	0	0.93	-	-
		0.51	1.49	0.56	110
Control Serum I	Guanase Std.	0	0.98	-	-
		0.51	1.37	0.39	77
	Precipath E	0	1.45	-	-
		0.51	2.13	0.68	134
CONSER A (N)	Guanase Std.	0	0.96	-	-
		0.51	1.40	0.44	86
	Precipath E	0	1.46*	-	-
		0.51	2.23	0.77	151
EXA normal	Guanase Std.	0	0.35	-	-
		0.51	0.85	0.50	98
		0	0.88	-	-
		0.51	1.40	0.52	102
		0	1.24	-	-
		0.51	1.72	0.48	94
	Precipath E	0	1.26	-	-
		0.51	1.77	0.51	100
	Seronorm	0	0.37	-	-
		0.51	0.88	0.51	100

Table 6 Determination of delay time (T_1) and M_1 coil length in B method

M_1 m	T_1 / sec										
	150	180	190	200	210	220	230	240	250	300	
10	d	d	d	d	d	d	-	-	d		
20	-	-	-	d	d	d	s	s	s	s	

T_1 sec	M_1 / m					
	13	14	15	16	18	20
230	d	s	s	s	s	s

d: double peak, s: single peak, T_2 : 5 min

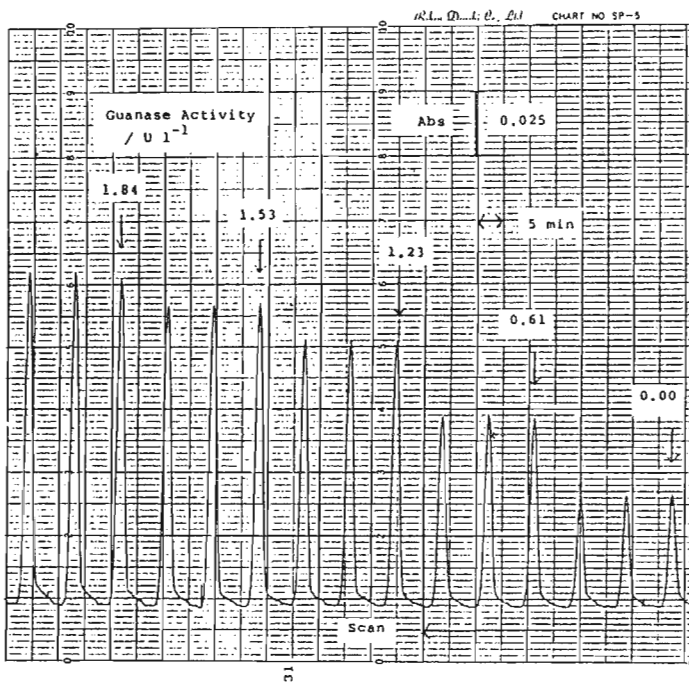


Fig. 6 Peak chart for triplicate injection of standard solution in B method

以上決定した最適条件下で検量線を作成した。グアナーゼ低活性域 (0 ~ 1.23 $U l^{-1}$) に高い直線性 ($a = 0.0475$, $r = 0.9996$) を示す検量線が得られ、高活性域 (1.84 ~ 4.9 $U l^{-1}$) でそれとは異なる直線 ($a = 0.0307$, $r = 0.9995$) が得られた。これにより少なくとも 0.06 $U l^{-1}$ の定量が可能となった。血清中グアナーゼ活性の正常上限値は 1.02 $U l^{-1}$ ⁵⁾ であるので、検量線の範囲及び使用標準液濃度を更に検討した結果、0 ~ 1.84 $U l^{-1}$ の範囲で高感度で高い直線性を示す検量線 ($a = 0.0499$, $r = 0.9999$) が最終的に得られた。その時のピークチャートを Fig. 6 に示す。なお、前述のように 1.23 $U l^{-1}$ グアナーゼ標準試料を用いた場合、RSD = 0.62 % ($n = 10$) と高い再現性が得られた。

標準液及び管理血清における添加回収率を Table 7 に示す。管理血清の回収率が比較的低いのは、A法と同様、希釈液組成に由来するものであるが、低活性域の定量を考慮し、生理食塩水を希釈液に用いた。

Table 7 Recovery test of guanase activity in B method ($n = 3$)

Sample	Guanase activity / $U l^{-1}$			Recovery/%
	Added	Found	Recovered	
Guanase Std.	0	0.94	-	-
	0.19	1.12	0.18	96
	0	0.89	-	-
	0.45	1.33	0.45	100
	0	0.94	-	-
	0.19	1.13	0.19	100
	0	0.93	-	-
	0.45	1.38	0.45	100
	0	0.87	-	-
	0.45	1.30	0.43	96
	0	0.67	-	-
	0.45	1.14	0.47	106
	0	0.64	-	-
	0.45	1.07	0.43	98
Precinorm E	0	0.89	-	-
	0.45	1.34	0.45	100
NESCOL-XA	0	0.57	-	-
	0.45	0.95	0.38	85
	0	0.59	-	-
Seronorm	0.45	0.98	0.39	86
	0	0.51	-	-
	0.45	0.91	0.40	89

Table 8 Determination of guanase activity in control sera by manual method and FIA method (B method)

Control serum	Guanase activity / $U l^{-1}$	
	Manual method	FIA method
CONSERA (N)	0.60	0.39
	0.57	0.44
CONSERA (A)	0.64	0.43
	0.39	0.43
EXA normal	0.34	0.17
	0.60	0.19
NESCOL-XA	0.18	0.62
	0.83	0.63
Seronorm	0.18	0.49
Precinorm E	0.18	0.93
Control Serum I	0.14	0.31
SeraChem	0.26	0.28
Q-PAK I	0.04	0.17

管理血清及びプール血清（9種類）を試料として、F I A法（B法）と用手法で測定した結果をTable 8 に示す。F I A法については再現性良く値が得られたが、用手法については変動が大きく、相関関係を求めるに至らなかった。例えば、管理血清 EXA normal についてF I A法と用手法での各々 10 回測定による 2 S Dの値は、F I A法 $0.028 U l^{-1}$ ($M = 0.21 U l^{-1}$)、用手法 $0.20 U l^{-1}$ ($M = 0.25 U l^{-1}$) でF I A法の方が1ケタ小さい。

本法における一検体当りの測定所要時間は約 20 分である。しかし 8 分 30 秒毎に試料を注入できるため、40 検体を約 6 時間で処理でき迅速であるのに対して、用手法では約10 時間かかる。

グアナーゼ活性測定のF I A法への応用は林ら²¹⁾によって既に報告されているが、彼らの方法ではグアニンを基質に用いて、グアナーゼを介しキサンチンを生成させる前処理を用手法により予め行い、その後キサンチンの定量をF I A法で行っている。したがって試料中に内因性のキサンチン類が共存するため、ブランク試験を行う必要がある。一方、本法は試料の前処理なしに直接注入するだけでグアナーゼ活性を測定することができる。また内因性キサンチン類、尿酸はF I Aシステム中で除去できるのでブランク試験の必要がないので簡便である。

4. 結 語

グアニンを基質として、キサンチンオキシダーゼ、ウリカーゼ、ペルオキシダーゼ共役系により、生成する過酸化水素をインダミン色素により比色定量するグアナーゼ活性測定法を、シリーズインジェクション、ストップフロー、マーキングゾーン法を組み

合わせることによりFIA法に応用した。グアナーゼ活性測定範囲は $0 \sim 1.84 \text{ UI}^{-1}$ であり、平均回収率は 97%，同時再現性は 1% 以下で正確、精密であった。一検体当りの測定所要時間は約 20分であるが、8.5 分毎に試料注入できるため、40 検体を約 6 時間で処理でき、用手法と比較して迅速である。更にブランク試験の必要もなく、試料を直接注入でき、簡便である。

謝 辞

本論文提出にあたり英文要旨を御校閲いただいた上智大学理工学部化学科 F. S. Howell 博士に感謝致します。

文 献

- 1) G. Schmidt, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 208, 185 (1932).
- 2) G. Passanenti, Med. World News, 4, 84 (1963).
- 3) 伊東進, 他, 肝臓, 16, 10 (1975).
- 4) 西川洋子, 他, 臨床病理, 30, 1241 (1982).
- 5) 松本啓子, 他, 臨床病理, 34, 1059 (1986).
- 6) 藤井節郎, 他, 臨床化学, 12, 208 (1983).
- 7) S. Ito, et al., Clin. Chim. Acta, 115, 135 (1981).
- 8) 西川洋子, 他, 臨床病理, 33, 1413 (1985).
- 9) U. A. S. AL-KKhalidi, et al., Clin. Chim. Acta, 29, 381 (1970).
- 10) M. Sugiura, et al., Chem. Pharm. Bull., 29, 426 (1981).
- 11) T. Ando, et al., Anal. Biochem., 130, 295 (1983).
- 12) 杉山正康, 他, 臨床化学, 12, 304 (1983).
- 13) 手登根稔, 他, 検査と技術, 13, 901 (1985).
- 14) 友田正子, 他, J. Flow Injection Anal., 6, 30, (1989).
- 15) 桐栄純一, 他, J. Flow Injection Anal., 2(2), 151 (1985).
- 16) B. C. Erickson, et al., Anal. Chem., 59, 1246 (1987).
- 17) 内田和秀, 他, J. Flow Injection Anal., 2(2), 143 (1985).
- 18) 日本臨床化学会分析部会精度管理部会委員会, 臨床化学, 14(補), 29 (1985).
- 19) 今村寿明, 他, 化学の領域, 30, 167 (1976).
- 20) 穴野宏治, 他, 衛生検査, 35, 1410 (1987).
- 21) Y. Hayashi, et al., Anal., Chim., Acta, 197, 51 (1987).

(1990年10月29日受理)