

# オリゴ糖デヒドロゲナーゼを固定したビタミンK<sub>3</sub>練り込みグラファイトペースト電極を用いる血清中のグルコースの定量及びアミラーゼ活性の測定

木 下 英 明

Determination of Glucose Concentration and Amylase Activity in Serum Using an Oligosaccharide Dehydrogenase Modified Graphite Paste Electrode Containing Vitamin K<sub>3</sub>.

Hideaki Kinoshita,  
Kwassui Women's College, Nagasaki

## Summary

Oligosaccharide dehydrogenase modified graphite paste electrode containing vitamin K<sub>3</sub> produced biocatalytic current due to the oxidation of glucose and oligosaccharide in the potential region where the oxidation of ascorbic acid and uric acid do not occur. The magnitude in current due to the saccharides was inversely proportional to the amount of glucose in saccharide. The glucose concentration in serum determined by measuring the current at  $-100\text{mV}$  and  $\text{pH}8.0$  agree well that by a glucokinase-UV method ( $r=0.997$   $n=20$ )

Five min after the addition of maltopentaose to the buffer solution containing serum, the current increased linearly and the magnitude of increase for a given time was proportional to the amount of serum. This increase in current based on the hydrolysis of maltopentaose to the maltose and maltotriose by amylase. So amylase activity can be easily determined by measuring the current increase with time after determination of glucose concentration in serum and the addition of maltopentaose.

## 1. 緒 言

電気化学分析は簡便な装置で測定でき、試料の着色や濁りに影響されずダイナミックレンジが比色法に比べて広い利点がある。著者は被膜固体電極を用いて、主として血清中の酵素測定法を研究してきた<sup>1-3)</sup>。この方法は酵素反応において基質か生成物のどちらかが電極で直接酸化される場合に有効であるが、電極で直接酸化される物質の種類は多くない。普通の電極では酸化されない物質の測定を目的として、酵素を固定した電極が開発されてきた<sup>4)</sup>。これまでの酵素電極では固定された酸化酵素によって基質が酸化され、そのときに減少する酵素あるいは生成する過酸化水素を測定することで基質が定量される。最近では酵素と電極間の電子伝達を介するベンゾキノンのようなメディエーターを練り込んだグラファイトペースト

ト表面に酵素を固定した、新しい型の酵素機能をもった“バイオカタリスト電極”が考案され注目されている<sup>5)</sup>。

図1にバイオカタリスト電極でのカイネティックスキームを示した。透析膜を透過してきた基質は酸化型の酵素によって酸化される。基質の酸化によって生成した還元型の酵素は、グラファイトペーストから酵素層に溶出してきた酸化型のメディエーターによって元の酸化型の酵素に戻る。還元型になったメディエーターは至適電圧下で酸化され、電流が発生する。つまり透析膜を透過して電極に到達した基質量に相応した電流が測定される。この型の電極は従来の酵素電極に比べて、作製が容易で（酵素膜を作製する必要がない）、被測定液の酵素濃度に影響されず、オキシダーゼのみならずデヒドロゲナーゼも使用できるなどの利点がある。しかし適当なメディエーターが存在しない酵素も多々ある。バイオカタリスト電極ではメディエーターの酸化電流が測定されるので、メディエーターが酸化される電位より負の電位で酸化される物質が混在する試料の測定では正の誤差が生じる。多くの酸化還元酵素のメディエーターとして機能するベンゾキノン<sup>6)</sup>は0.5V近傍で酸化されるので、0.5Vより負の電位で非酵素的に酸化されるアスコルビン酸や尿酸を含む血清中物質の測定にはメディエーターとして適していない。但し、酵素活性を測定する場合のように、ある物質の経時変化を追跡する場合には問題にならない<sup>6)</sup>。測定される電流値にアスコルビン酸による電流値が加算されても経時変化は同一だからである。2-メチル-1,4-ナフトキノン（ビタミンK<sub>3</sub>）をメディエーターとする酵素電極ではアスコルビン酸や尿酸が酸化される電位より負の電位でバイオカタリティックな電流の測定が可能で<sup>7)</sup>、血清成分の測定には望ましい。オリゴ糖デヒドロゲナーゼはグルコース及びオリゴ糖を基質とする酵素で<sup>8)</sup>、これを固定したベンゾキノン<sup>9)</sup>をメディエーターとする電極の特性<sup>9)</sup>及び応用<sup>6)</sup>について報告されている。この酵素を固定したビタミンK<sub>3</sub>をメディエーターとする電極を試作してグルコースやオリゴ糖に対する応答を調べると、ベンゾキノン<sup>9)</sup>をメディエーターとする電極による応答と同様であった。従って本電極を使用すれば、オリゴ糖をほとんど含まない血清中のグルコースを、尿酸やアスコルビン酸の影響を受けることなく定量できると考えられる。

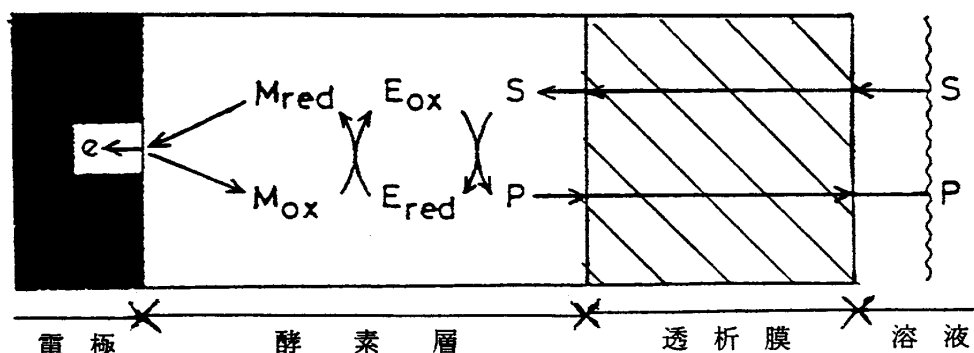


図1. メディエーター練り込み酵素電極でのカイネティックスキーム  
 S: 基質、P: 生成物、Eox: 酸化型酵素、Ered: 還元型酵素、  
 Mox: 酸化型メディエーター、Mred: 還元型メディエーター、e: 電子

本報告では、オリゴ糖デヒドロゲナーゼを固定したビタミンK<sub>3</sub>練り込みグラファイトペースト電極を用いて血清中グルコース濃度を測定し、グルコキナーゼ-UV法で測定した結果と比較したこと、さらにアミラーゼ活性も同時に測定できることについて述べる。

## 2. 実験

### 2. 1. 酵素電極の作製

粉末グラファイト（日本黒鉛製）に対して33%の液体パラフィン、及び10%のビタミンK<sub>3</sub>（ナカライテスク製）を加えて練り合わせた後、カーボンペースト電極（BAS社製）に充てんし、電極表面（0.07cm<sup>2</sup>）を滑らかにした。オリゴ糖デヒドロゲナーゼ（ODHと以後略記する。国際生化学連合に未登録、Staphylococcus由来、マルトースを基質にしたとき170Umg<sup>-1</sup>、旭化成より寄贈）1mgを含んだ10μl溶液を電極表面に注ぎ、水分を蒸発させた後、丸く切った直径6mmの透析膜（ユニオンカーバイド社製コード441-03）で被覆した。透析膜をナイロンネット（女性用ストッキングの素材）で覆い、電極側面のナイロンネットをラボラトリーフィルムで固定した。このように作製した電極を以後ODH-K<sub>3</sub>電極と略記する。

### 2. 2. 試薬、測定機器及び電気化学測定

グルコース、マルトペンタオースはナカライテスク製、α-グルコシダーゼは国際試薬製、比色法による血糖の測定には和光純薬製のキット、グルコースHR IIワコー、を使用した。血清は長崎大学病院で目的の検査を終えたものを使用した。

緩衝液1mlをH型セルに取り、試料をマイクロピペットで注入し、37°Cで定常状態での電流値を柳本ボルタメトリックアナライザーP1000及び東亜電波t-YレコーダーEPR-151Aを用いて、飽和カロメル電極（SCE）を対極にした2電極方式で測定した。測定中は透析膜近傍の溶液の濃度分極を無くす目的で、磁気かき混ぜ機で溶液を攪はんした。

## 3. 結果

ODH-K<sub>3</sub>電極を用いて、pH8.0のトリス緩衝液にマルトペンタオースを1mmol/l（G5）、グルコースを0.5mmol/l（G1）、及び血清（ser）を1/30希釈になるように添加したときの-100mVでの電流値と時間の関係を図2に示した。マルトペンタオースによる電流は5分後に一定値になるのに対しグルコースによる電流は2分後に一定になった。グルコース単位濃度あたりの電流値はマルトペンタオースのそれに比べて7倍大きかった。その他のオリゴ糖でも、その中のグルコース結合数が多くなるほど単位濃度あたりの電流値は小さくなった。したがって本電極で測定されるバイオカタリティックな電流はODHの基質特異性の他に、基質が透析膜を通過する速度に依存すると考えられる。このことは溶液の攪はんを強めていくと、電流値は増加していくが、さらに攪はんを強めても電流値は一定になることから示された。ビタミンK<sub>3</sub>を練り込まないグラファイトペースト表面にODHを固定した電極はグルコースやオリゴ糖に応答しなかった。ビタミンK<sub>3</sub>を練り込んでいくと、

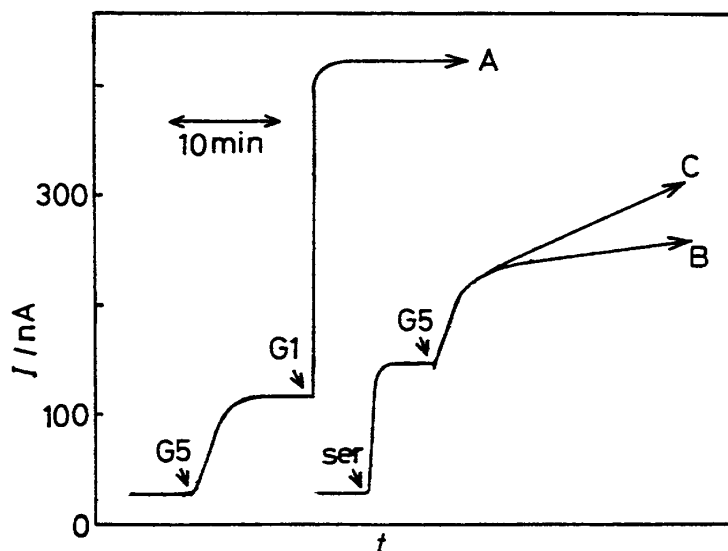


図2. ODH-K<sub>3</sub>電極で得られた、 $-100\text{mV}$ 、 $37^\circ\text{C}$ での電流—時間曲線。  
 A,B: トリス緩衝液 (pH8.0)、C:  $\alpha$ -グルコシダーゼ $90\text{Uml}^{-1}$  含むトリス緩衝液、  
 G1, G5, ser: グルコースを $0.5\text{mmol}/\ell$ 、マルトペンタオースを $1\text{mmol}/\ell$ 、  
 血清を $1/30$ 希釈になるように添加した時点

練り込みに比例した電流が測定されたが、ビタミンK<sub>3</sub>をグラファイトに対して5%以上練り込んでも、一定濃度のグルコース溶液で測定される電流は一定になった。このような結果を基に本研究ではグラファイトに対して10%のビタミンK<sub>3</sub>を練り込んだ電極を使用した。

血清中に存在する物質を電気化学的に測定する場合は、非酵素的に低電位で酸化されるアスコルビン酸及び尿酸が妨害する。図3にODH-K<sub>3</sub>電極を用いて、pH8.0のトリス緩衝液(A)、及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のグルコース(B)、アスコルビン酸(C)、尿酸(D)、溶液で得られた定常状態の電流値と電位の関係を示した。グルコースによるバイオカタリテッ

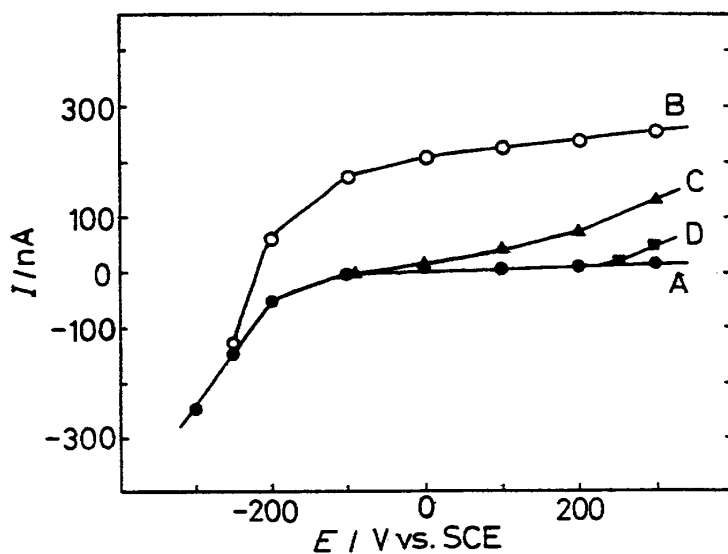


図3. ODH-K<sub>3</sub>電極で測定された定常状態での電流値と電位の関係  
 A: トリス緩衝液  
 B, C, D: グルコース、アスコルビン酸、及び尿酸の $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液

クナ電流は-250mVより出現、-100mVではほぼ限界値になった。アスコルビン酸及び尿酸による酸化電流はそれぞれ-100mV及び200mVより出現した。したがって-100mVで測定すれば、アスコルビン酸や尿酸の影響を受けることなくグルコース及びオリゴ糖による電流が得られる。血清中にオリゴ糖はほとんど存在しないので<sup>10)</sup>、本電極を用いて-100mVの電流値を測定すれば血清中のグルコース濃度を得ることができると考えられる。

図4にはpH8.0 (A)、9.0 (B) 及び7.2 (C) のトリス緩衝液、pH5.5 (D) の酢酸緩衝液中のグルコース濃度とODH-K<sub>3</sub> 電極で測定された-100mVでの電流値の関係を示した。いずれのpHでも電流値はグルコース濃度に5~125 μg/ml (28~700 μmol/l)の間で直線的に比例した。

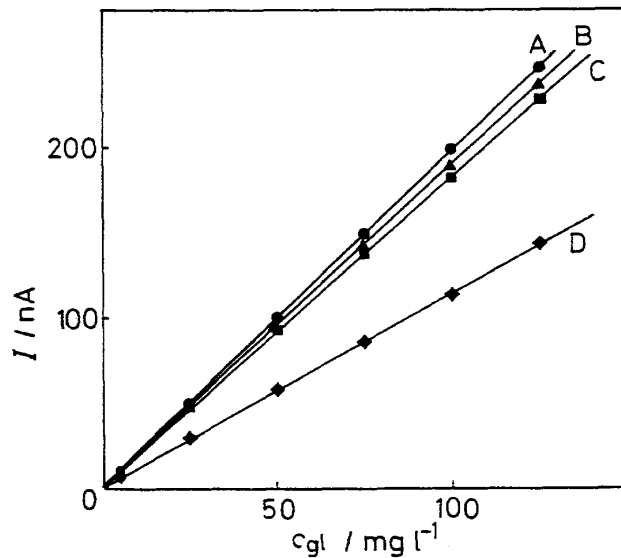


図4. pH8.0 (A)、9.0 (B)、7.2 (C) 及び5.5 (D) での-100mVでのバイオカタリティック電流値とグルコース濃度の関係

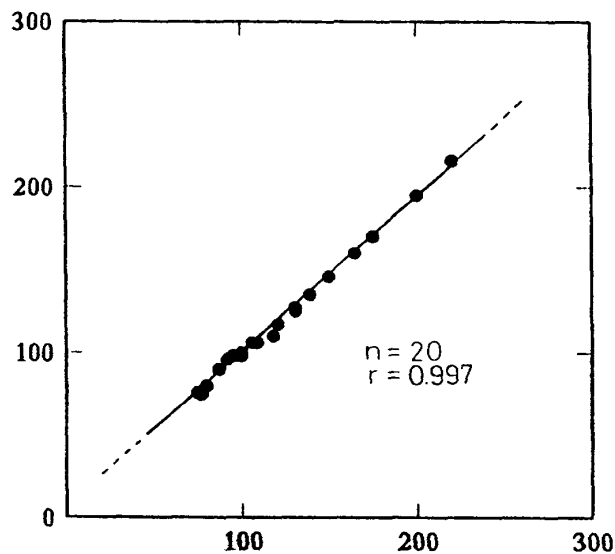


図5. ODH-K<sub>3</sub> 電極及びグルコキナーゼ-UV法で測定した血清グルコース濃度の相関  
 たて軸:  $C_{gl} / \text{mg dl}^{-1}$  (電極法)  
 よこ軸:  $C_{gl} / \text{mg dl}^{-1}$  (比色法)

pH8.0のトリス緩衝液1 mlに、100mg/dlのグルコース液及び血清を30  $\mu$  l 添加し、グルコース溶液による電流値を基に血清のグルコース濃度を測定した。20試料について本法で測定した値とグルコキナーゼ-U V法で測定した値との相関を図5に示した。相関係数  $r = 0.997$ で両者はよく相関した。同一血清を5回測定したときのCVは2.8%であった。

#### 4. 考 察

ODHを固定した電極は非常に安定で<sup>6)</sup>、本電極も1日2時間の使用で4ヶ月間はグルコースに対する応答は劣化しなかった。

図2のBには緩衝液に血清を添加したあとマルトペンタオースを添加するとマルトペンタオースによる電流が一定になったと考えられる5分後から電流値が時間に対して直線的に増加していくことを示した。これはマルトペンタオースがアミラーゼによって分解され、マルトトリオースとマルトースが生成したためで、マルトペンタオース単位濃度あたりの電流値がマルトース及びマルトトリオースのそれより小さいことによっている。つまり時間あたりの電流値増加がアミラーゼ活性を示す。図2のCに示したように $\alpha$ -グルコシダーゼを予め添加した溶液では、アミラーゼによって生成したマルトース及びマルトトリオースはさらにグルコースまで分解されるので、単位時間の電流値変化はより顕著になり測定が容易になる。アミラーゼ活性の測定だけであればベンゾキノンを経典電極とする電極と本電極の使用に差異はない。グルコース濃度を測定したあと、そのままの試料でアミラーゼ活性を測定できるのが本電極の利点である。ODH-K<sub>3</sub>電極はマンノースやガラクトースにも応答する。生体試料中のガラクトースやマンノースの定量は多くの場合共存するグルコースによって妨害されるが、それらの増減する例えばガラクトシダーゼやマンノシダーゼ活性の測定には有効であろう。

本稿で述べた内容は1993年度日本臨床化学会（神戸）で発表した。

#### 文 献

- 1) 木下英明、池田篤治、臼井敏明：透析膜被覆電極を用いるヒト血清中のコリンエステラーゼ活性の測定、臨床化学、21:92-96,1992.
- 2) Kinoshita H, Usui T, Oishi E, Kakiuchi T, Ikeda T : Serum Alkaline Phosphatase Assay Using a Dialysis Membrane-Covered Glassy-Carbon. Electrode, Jpn J Chem 21:127-130,1992.
- 3) 木下英明、臼井敏明、高山勝己、池田篤治：透析膜を被覆したグラッシーカーボン電極を用いる血清中の $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性の測定、分析化学、42:197-199,1993.
- 4) 日本化学会編：バイオセンシングとそのシステム、p.68-121、学会出版センター、東京、1988.

- 5) 池田篤治：酵素機能電極に基礎を置く電気化学バイオセンサー、食品工業、34:31-42,1991.
- 6) 木下英明、臼井敏明、兼田喜明、池田篤治：オリゴ糖デヒドロゲナーゼを固定したベンゾキノン練り込みグラファイトペースト電極を用いる血清アミラーゼアッセイ、分析化学、41:T145-T149,1992.
- 7) Miki K, Ikeda T, Todoroki S, Senda M : Bioelectrocatalysis at NAD-Dependent Dehydrogenase and Diaphorase-Modified Carbon Paste Electrodes, Anal. Sci,5:269-274,1989.
- 8) 東洋醸造編：東洋醸造酵素カタログ、1985.
- 9) Ikeda T, Shibata T, Todoroki S, Senda M, Kinoshita H : Amperometric response to reducing carbohydrates of an enzyme electrode based on oligosaccharide dehydrogenase, Analytica Chimica Acta, 230:75-82,1990.
- 10) 日本生化学会編：生化学データブック [ 1 ]、p.1549、東京化学同人、東京、1979.