還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの酸化電流測定 に基づく血清中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ及びアラ ニントランスアミナーゼ活性の測定

木下英明^{8*1}, 須田吉久, 川窪隆昌^{*2}, 白井敏明^{*3},
池田篤治^{*4}

(1994年4月18日受理)

新炭素素材 (plastic formed carbon) を使用した PFC 電極に透析膜を被覆した電極を用いて還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の定常状態での酸化電流値を測定すると, pH 5~9 の溶液では 500~300 mV (対 SCE) で限界値に達した. その電流値は NADH 濃度と 2.5~1500 μ M の間で直線比例した. pH 7.8 で 200 μ M NADH を 5 回測定したときの相対標準偏差は 2.6% であった. NADH, アスパラギン酸, 2-オキシグルタル酸, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LD) を含むトリス緩衝液 (pH 7.8) に血清を添加し NADH の時間変化より血清中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) 活性を測定した. UV 法による結果との相関は $r=0.996$ ($n=17$) であった. AST 測定と同様に, NADH, アラニン, 2-オキシグルタル酸, LD を含む pH 7.5 のトリス緩衝液に血清を添加しアラニントランスアミナーゼ (ALT) 活性を測定した. UV 法による結果との相関は $r=0.992$ ($n=17$) であった.

1 緒 言

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) は多くの酸化還元酵素の補酵素であるので, NADH を簡便に測定できれば NADH と共役する酵素の活性及びその酵素反応の基質あるいは生成物の濃度を簡便に測定できると考えられる. グラッシーカーボンや白金電極を用いて NADH の酸化電流を測定すると, 測定ごとに NADH に対する応答が劣化し再現性の良い測定値が得にくい, 又限界値に達する電位が高いなどの欠点がある. このような欠点を改良する目的で, 電子伝達メディエーターを使用する¹⁾, 電極表面に酵素を固定する²⁾, 電極表面を化学修飾する³⁾などが試みられたが実分析に応用されるまでには至っていない. 最近著者らのうちの川窪らによって, 新しい炭素素材である plastic formed carbon を使用した PFC 電極が開発された⁴⁾. こ

の電極を用いると NADH の酸化電流をグラッシーカーボンや白金電極を用いた場合に比べて数百 mV 低電位で再現性よく測定できた. 著者らはこれまでこの電極の電気化学特性⁵⁾, 及びこの電極を用いて血清中の乳酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.27, LD と略記) 及び α -ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.96.6, HBD と略記) の活性を簡便に測定できた⁶⁾ ことについて報告した.

本報告では心筋障害, 筋肉疾患及び肝疾患の指標となり臨床検査項目の中でもとりわけ重要な血清中のアスパラギン酸トランスアミナーゼ (EC 2.6.1.1, AST と略記, GOT と同略記) 及びアラニントランスアミナーゼ (EC 2.6.1.2, ALT と略記, GPT と同略記) の活性を透析膜を被覆した PFC 電極を用いて, NADH の定常状態での酸化電流値の時間変化より測定できたこと, 及び本法で測定した血清中の活性値と UV 法で測定した値と比較したことについて述べる.

2 実 験

2・1 電 極

結晶性炭素粉末と有機粘性剤を分散させた組成分を,

*1 活水女子大学: 850 長崎県長崎市東山手町 1-50

*2 三菱鉛筆(株)研究開発センター: 375 群馬県藤岡市立石 1091

*3 長崎大学医学部: 852 長崎県長崎市坂本 1-12-4

*4 京都大学農学部: 606 京都府京都市左京区北白川追分町

1000°C で還元雰囲気中で燃焼して炭素 100% の電極素材 (plastic formed carbon) を製造した⁴⁾。直径 3 mm の円筒素材を直径 6 mm, 長さ 55 mm のプラスチックに埋め込み, 電極を作製した。同じ仕様の電極が BAS 社より PFCE 電極, コード 11-2408 として販売されている。電極表面 (0.07 cm²) を No. 3000 の SiC 研磨紙で研磨した後, 直径 6 mm の丸く切った透析膜 (ユニオンカーバイド製, コード 411-03, 厚さ 20 μm, 分画分子量 1~2 万) で被覆した。それをナイロンネットで覆い, 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本研究に使用し, 以後これを mPFC 電極と略記する。

2.2 試薬

L-アスパラギン酸, L-アラニン, 及び 2-オキシグルタル酸はナカライテスク製, NADH は興人製, ブタ心臓由来の LD, リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MD) は東洋紡製, ブタ心臓由来の AST, ALT は Sigma 製のものをそのまま使用した。UV 法による AST 及び ALT 活性の測定には極東製薬製のキット “GOTHQ オート” 及び “GPTHQ オート” 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。

2.3 電気化学測定

目的に応じた基質あるいは補助酵素を含む緩衝液 0.9~1.5 ml を H 型セル (内径 12 mm) に採り, 血清あるいは標準酵素を 1~300 μl マイクロシリンジあるいはマイクロピペットで添加し, 1.5 ml の溶液を直径 10 mm, 厚さ 3 mm の回転子を磁気かき混ぜ機で 700 rpm でかき混ぜながら 37°C で測定した。電流値は柳本製ポーラログラフィックアナライザー P1100 及び東亜電波製 t-Y レコーダー EPR-151A を使用して, 飽和カロメル電極を対極とする 2 電極方式で測定した。

3 結果と考察

3.1 mPFC 電極を用いる NADH の酸化電流の測定

pH 5.0 の酢酸緩衝液 (a), pH 6.8 のリン酸緩衝液 (b) 及び pH 9.0 のトリス緩衝液 (c), それらの緩衝液に NADH を 100 μM (A, B, C) 及び 200 μM (A', B', C') になるように添加し, かき混ぜた溶液に mPFC 電極を浸して測定した定常状態での電流値と電位の関係を Fig. 1 に示した。溶液の pH が高くなると基底電流がより低電位で増大していくという従来の固体電極を使用した場合と同様な結果が得られた。NADH の酸化電流はいずれの溶液でも 200 mV のような低電位で出現

Fig. 1 Steady-state current vs. potential curves for 1/5 M acetate buffer of pH 5.0 (a, A, A'), 1/10 M phosphate buffers of pH 6.8 (b, B, B') and 1/5 M Tris buffer of pH 9.0 (c, C, C') in the absence (a, b, c) and the presence of 100 μM (A, B, C) and 200 μM NADH (A', B', C') obtained with a membrane-covered PFC electrode (mPFC) at 37°C

し, pH 9.0 では 300 mV, pH 6.8 では 400 mV, pH 5.0 では 500 mV でほぼ限界値に達した。NADH 溶液で測定した電流値から基底電流値を差し引いた NADH による正味の電流値は, 限界値に達した電位では pH 5~9 の間で同じであった。

37°C の pH 7.8 のトリス緩衝液に NADH を添加して, 500 mV で測定した電流値は NADH 濃度に 2.5~1500 μM の間で直線比例した (Fig. 2)。電極に更に厚い膜を被覆すると NADH に対する応答は小さくなったが, NADH 濃度が 1500 μM 以上でも, 電流値は NADH 濃度に直線比例した。Fig. 2 に示した条件下で 200 μM の NADH 溶液を 5 回測定したときの相対標準偏差は 2.6% であった。ここに使用した電極のほかに, 同様に作製した 4 本の mPFC 電極を用いて NADH の

Fig. 2 Dependence of steady-state current due to the oxidation of NADH on the concentration of NADH in 1/10 M Tris buffer of pH 7.8 measured with mPFC at 500 mV and 37°C

酸化電流を測定したところ、いずれの電極を用いた場合も 2.5~1500 μM の NADH 濃度と電流値は直線比例した。但し、同一 NADH 濃度での電流値は電極によって異なり、本実験に使用した電極は NADH 1 μM 当たりの電流値が 0.17 nA で 5 本の電極の中では最大の応答を示した。最も応答の低い電極のそれは 0.11 nA であった。従って定量実験では電極固有の標準曲線が必要である。又、5 本の電極で測定された基底電流も互いに異なり、最大値は最小値の 2.8 倍であった。

透析膜を被覆しない PFC 電極を pH 7.8 のトリス緩衝液に浸し、尿酸、NADH 及び血清を 1 回の添加でそれぞれ 12 μM , 96 μM になるように及び 1/12 に希釈されるように添加していった場合の電流値の時間変化を Fig. 3 に示した。尿酸及び NADH を添加していくと電流値は増大していくが、電流値は振れ、溶液のかき混ぜを最大にしてもここに検討した濃度範囲では物質濃度と電流値は直線比例しなかった (Fig. 3 の A と B)。血清を添加すると内在する被酸化性物質 (主に尿酸) による電流が出現し、時間とともに減少していった。この溶液に NADH 及び尿酸を添加すると電流が出現したが、緩衝液中で測定された値に比べるとたいへん小さかった。このことは血清中のタンパク質が時間とともに電極表面に吸着し、電極反応を妨害したことによると考えられる。アルブミンやリゾチムを添加した溶液でも同じ結果が得られた。一方 mPFC 電極を用いた場合は、例えば 12 μM の尿酸あるいは 96 μM の NADH の電流値は被膜しない電極での測定値の 1/40~1/50 ほどであった

Fig. 3 Current at 500 mV vs. time curves for 1/5 M Tris buffer solutions of pH 7.8 which were stirred by a magnetic stirrer and measured with a bare plastic formed carbon electrode (A, B, C) and by an mPFC electrode (D) at 37°C

Three microliter portion of 6 mM uric acid solution, 6 μl portion of 24 mM NADH solution and 75 μl of serum were added into the 1500 μl of buffer at the points indicated by "U", "N" and "S".

が、溶液中に存在するタンパク質の影響を受けなかった。多くの場合タンパク質を含む生物試料の定量には被膜しない電極は不适当である。しかし細胞に直接挿入して使用するような微小電極に被膜することは困難である。このようなマイクロ電極で生物試料を測定するときは、タンパク質をあらかじめ吸着させた電極で生体物質の挙動を検討する必要があると考えられる。

3・2 mPFC 電極を用いる血清中の AST 及び ALT 活性の測定

健康者の血清には AST 及び ALT は微量 (5~20 U/l) しか存在しないが、細胞の損傷によりこれらの酵素が血中に放出されるので組織の破壊や変性進行の指標として用いられる。臨床的に AST 及び ALT 活性の測定についてはこれまで多くの UV 測定に基づく方法が提出されてきたが⁷⁾、日本をはじめ多くの国では AST 反応で生成するオキサロ酢酸及び ALT 反応で生成するビルビン酸を MD 及び LD で還元させ、それらの補酵素である NADH の減少を UV 法で測定する方法が利用されている⁸⁾⁹⁾。その概要を Fig. 4 に示した。AST 活性を測定するときに生成するオキサロ酢酸は不安定でビルビン酸に変化する場合がある。すると負の誤差が生じるので MD に加えて LD を添加しビルビン酸を乳酸に変化させ、オキサロ酢酸がリンゴ酸に変化するときと同量の NADH を減少させるようにしている。血清には 100

Fig. 4 Schematic diagram of the reactions by AST and ALT and the reactions for the AST and ALT assays

μM ほどのピルビン酸が存在し、これが血清中の LD によって徐々に変化すると正の誤差を与える。そこで AST 及び ALT 反応が始まる前に内在性のピルビン酸を消去するためにも多めの LD の添加が必要である。日本臨床化学会の勧告法⁸⁾に準じて調製した、200 mM L-アスパラギン酸、10 mM 2-オキソグルタル酸、500 U/l MD 及び 500 U/l LD を含む pH 7.8 のトリス緩衝液に NADH を 250 μM になるように添加した後、市販の AST を 6 (a), 12 (b), 24 (c) 及び 48 U/l (d) になるように添加したとき (37°C, pH 7.5, UV 法による値) 及び UV-酵素法により 37°C, pH 7.8 で 60 U/l と測定された血清を 1/12 (A), 1/6 (B) 及び 1/4 (C) に希釈されるように添加した場合の 500 mV での電流値の時間変化を Fig. 5 に示した。NADH を添加して電流値が一定になった後、AST を添加すると、3 分ほど後より電流値は直線的に減少し始め、NADH が 2/3 ほど消費されてからは減少がにぶり始めた。NADH 1 μM の変化は 0.17 nA に対応することを基に (Fig. 2 参照) 直線部分の 1 分当たりの電流値変化量より AST 活性を算出するとそれぞれ 6, 12, 22 及び 42 U/l で試薬の標示値とほぼ一致した。血清を添加すると血清中の被酸化性物質による電流が出現し、添加して 3~4 分後から電流は直線的に減少し始めた。直線部分の単位時間当たりの電流値変化より A は 5 U/l (1/12 希釈), B は 9 U/l (1/6 希釈), C は 13 U/l (1/4 希釈) と算出され、血清濃度が高くなると測定される AST 活性は小さくなった。Fig. 5 の A' は 2-オキソグルタル酸だけを含まない溶液に血清を A と同様に添加した場合の結果で、数分

Fig. 5 Current vs. time curves for 1/10 M Tris buffer solutions of pH 7.8 containing 10 mM 2-oxoglutarate (except A'), 200 mM L-aspartate, 500 U/l LD, and 500 U/l MD, 250 μM NADH (added at the points indicated by "N"), to which serum was added to give concentrations of 1/12 (A, A') 1/6 (B) and 1/4 (C) of the serum sample at the points indicated by "Ser", and AST was added to give concentrations of 6 (a), 12 (b), 24 (c) and 48 U/l (s) at the point indicated by "AST", as measured with an mPFC electrode at 500 mV and 37°C

Fig. 6 Comparison of the activities of aspartate aminotransferase (AST, A) and alanine aminotransferase (ALT, B) in serum samples determined by the present method and by an enzymatic-UV method

後に電流値は一定になった。これは内在するピルビン酸が数分内に分解されてしまったことを示すものである。アスパラギン酸, オキサロ酢酸, LD 及び MD を含む緩衝液に血清を最終的に 1/12 に希釈されるように添加して 5 分後より直線的に減少する電流値を 5 分間測定し, 17 種の血清の AST 活性を算出した。これらの活性値と UV-酵素法で測定した値との相関を Fig. 6 の A に示したが, 両者の相関係数 $r=0.996$ であった。

ALT 活性の測定も日本臨床化学会の勧告法⁹⁾に準じて 500 mM L-アラニン, 15 mM 2-オキシグルタル酸, 2000 U/l LD を含むトリス緩衝液 (pH 7.5) に市販の ALT 及び血清を添加して行った。mPFC 電極を用いて市販の ALT 活性を測定した値は試薬の標示した値とよく一致した。17 種類の血清の ALT 活性を本法で測定し, UV-酵素法で測定した値との相関を Fig. 6 の B に示した。両者の相関係数 $r=0.992$ であった。

NADH 濃度が 200 μ M 以上の溶液を UV 法で定量することは困難である。オキシグルタル酸などが共存すると NADH の測定可能な濃度は更に小さくなる。一般に酵素活性の測定は最大値を測定できる条件が理想的とされている。ALT 及び AST 活性の NADH 濃度が 100 μ M 以上ではほぼ同じであって UV 法に比べて本法が優れるとはいえないが, NADH 濃度が高いほど直線的な変化を長く測定でき, 活性の高い試料の測定には適し

ている。又, NADH に対する K_m 値の大きな酵素の測定 (例えば LD) に本法は有用と思われる。臨床検査は 30°C と 37°C のどちらで行うか議論されているが, 37°C で測定された NADH の電流値及び AST 活性は 30°C で測定された値の 1.22 倍及び 1.45 倍であった。

Fig. 1, 2, 5, 6 に示した結果は同一の電極に一度被膜し, 測定後流水で 20 秒ほどすすいで, 繰り返し使用して得られたものである。電極面を水に浸し, 4°C で保存しておけば半永久的に使用可能である。

文 献

- 1) Z. Samec, P. J. Elving: *J. Electroanal. Chem., Interfacial Electrochem.*, **144**, 235 (1983).
- 2) K. Miki, T. Ikeda, M. Senda: *Anal. Sci.*, **5**, 269 (1989).
- 3) N. Cenas, J. Rozgaite, J. Kulys: *J. Electroanal. Chem., Interfacial Electrochem.*, **144**, 217 (1983).
- 4) 川窪隆昌, 須田吉久, 金子浩子, 根岸 明, 山田雅引: 炭素, **152**, 106 (1992).
- 5) H. Kinoshita, Y. Suda, T. Kawakubo, K. Takayama, T. Ikeda: *Microchem. J.*, **49**, in press.
- 6) 木下英明, 須田吉久, 川窪隆昌, 臼井敏明, 池田篤治: 臨床化学, **22**, 185 (1993).
- 7) 松崎広子: 検査と技術, **15**, 27 (1987).
- 8) 日本臨床化学会: 臨床化学, **18**, 226 (1989).
- 9) 日本臨床化学会: 臨床化学, **18**, 250 (1989).

Amperometric determination of the activities of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase based on the measurement of anodic current due to NADH. Hideaki KINOSHITA^{*1}, Yoshihisa SUDA, Takamasa KAWAKUBO^{*2}, Toshiaki USUI^{*3} and Tokuji IKEDA^{*4} (^{*1}Kwassui Women's College, 1-50, Higashiyamate-cho, Nagasaki-shi, Nagasaki 850; ^{*2}Mitsubishi Pencil Co. Ltd., 1091, Tateishi, Fujioka-shi, Gunma 375; ^{*3}Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki 852; ^{*4}Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University, Kitashirakawa, Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606)

A dialysis membrane-covered plastic formed carbon electrode which has been newly developed produced reproducible steady-state currents due to the oxidation of NADH at potentials more positive than 0.2 V (*vs.* SCE). The limiting currents due to NADH were in the range of 0.3~0.5 V in solutions of pH 5 to 9 and proportional to the NADH concentration in the range of 2.5 to 1500 μ M. The relative standard deviation for the measurement of limiting current due to 200 μ M NADH was 2.6% for five runs. NADH reacts with oxaloacetate produced from aspartate by an aspartate aminotransferase (AST) catalyzed reaction in the presence of malate dehydrogenase (MD) and reacts with pyruvate produced from alanine by an alanine aminotransferase (ALT) catalyzed reaction in the presence of lactate dehydrogenase (LD). Based on the magnitude of the current due to 1 μ M NADH being 0.17 nA, the activities of AST and ALT in serum were assayed by measuring the decrease in current due to NADH for five min in Tris buffer of pH 7.8 containing aspartate, 2-oxoglutarate and MD for AST assay and buffer of pH 7.5 containing alanine, 2-oxoglutarate and LD for ALT assay. The activities determined amperometrically for seventeen serum samples were in excellent agreement with those determined by the UV-enzymatic method. Correlation coefficients between the two sets of results were 0.996 for AST assay and 0.992 for ALT assay.

(Received April 18, 1994)

Keyword phrases

amperometric assay for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase; plastic formed carbon electrode; alanine aminotransferase in serum; aspartate aminotransferase in serum.