Table 1 Composition of uric acid sensor

Sensor No.	Dimension of the micro bed :		Wet weight of immobilized uricase particle in micro bed [mg]
	diameter [mm]	depth [mm]	
1	5.5	1.5	40
2	5.5	3.0	78
3	5.5	5.0	129

固定化は以下の手順によった。オキシランアクリル粒子 1000mg を緩衝液 100cm³ に懸濁し 5°C で数日間保持した後、混合液中の 200mesh ふるい上粒子を緩衝液で更に洗浄した。得られた粒子を、別に用意したウリカーゼ 125 units を溶かした 100cm³ の緩衝液に添加、混合し 5°C で数日間保持した。この間、時々ゆるやかに混合した。この混合液の 200mesh ふるい上粒子を水、1M-NaCl、水の順で十分に洗浄し、緩衝液に浸して 5°C で保存した。必要に応じて、この保存粒子を取り出して用いた。なお、固定化前後のウリカーゼ溶液の物質収支から求めたウリカーゼの固定化率は約 60% であった。

2) ウリカーゼ固定化粒子による尿酸の分解速度の測定

内径 62.5mm の反応器に、pH 6.5–9.5 の所定の緩衝液 150cm³ と pH が同値の尿酸供試液 3cm³ を添加し、尿酸初濃度が 0.98mg/dl の溶液を用意した。液の一部は 400 mesh 金網を取り付けた吸い込み口からマイクロチューブポンプにより分光光度計（島津製作所製、UV-360）のフローセルを通り反応器に戻る経路とした。攪拌機（新東工業製、1200R 型）に取り付けた直径 35mm のプロペラ羽根を反応器の中央の底部より 15mm の所定位置にセットし 500r.p.m. で攪拌した。溶液が所定温度に達したら、前述のウリカーゼ固定粒子 150mg（wet: 濾紙を用いて粒子表面の水分を除去した湿潤粒子）を添加し液中の尿酸濃度の経時変化を分光光度計により 293nm で測定した。

3) 尿酸センサーの構成

外径 22mm、厚み 1.5–5mm のゴム板の中央部に 5.5mm の孔を開け片面に 400mesh の金網を接着した。この孔部に前述のウリカーゼ固定化粒子を充填し、金網と反対の面に布（東レ製、#8600 シルソフィ）を接着してマイクロベッド（以下、M.B. と呼ぶ）を構成した。この M.B. の布面を市販の溶存酸素センサー（東亜電波製、OE-232A 型）のテフロン膜面に密着させ所定のソケットを用いて取り付けた。尿酸センサーの構成に用いた M.B. の粒子充填部寸法と粒子充填量を Table 1 に示す。

Fig. 1 The experimental apparatus and the structure of the uric acid sensor and the micro bed (M.B.) of immobilized uricase particle

4) 尿酸センサーの濃度応答特性

測定装置、マイクロベッドおよび尿酸センサー（以下、センサーと呼ぶ）の略図を一括して Fig. 1 に示す。測定容器は幅 6mm の邪魔板を設けた内径 48mm、高さ 85mm の平底容器である。攪拌子としては直径 6mm、長さ 35mm のテフロン被覆製のものをを用いた。センサーは、その先端と攪拌子との間隔を 3mm とし、容器の中心から 7mm 偏位した位置に設置した。センサーの応答を溶存酸素計（東亜電波製、DO-1B 型、以下 DO 計と呼ぶ）によって測定するとともにその出力を記録計（CHINO-EPB100）に記録した。測定にさいしては、緩衝液 80cm³ を入れ、センサーを所定位置に取り付けた測定容器を、恒温槽の所定位置にセットした。

所定温度で、所定の攪拌子回転数で、緩衝液のみの場合における DO 計の指示値 Q_0 を記録計に記録した。この時、攪拌子の回転数を大にすると Q_0 は大となるが 1100r.p.m. 以上では一定とみなせたので、全測定を 1100r.p.m. で行った。ついで、pH 8.5 の尿酸供試液を 0.5–4cm³ ずつ数回にわけて緩衝液に添加し DO 計の指示値 Q の時間変化を記録計により記録し Q の定常値 Q_s を求めた。実験進行に伴う DO 計の指示値（記録値）の経時変化の典型的な様子を Fig. 2 に示す。既報³⁾と同様に、 Q を次式によって R に換算した。 R をセンサーの濃度応答値と呼ぶことにする。

$$R = 1 - \frac{Q}{Q_0} \quad (2)$$

Fig. 2 Schem of experimental process

Eq. (2)で Q を Q_s としたときの R を R_s とする。なお、センサーは不使用時は室温の緩衝液に浸して保存した。

2. 実験結果および考察

2.1 ウリカーゼ固定化粒子による尿酸分解における pH および温度の影響

1.2の2)で述べた方法によって、尿酸分解初速度を測定することによりウリカーゼ固定化粒子の活性の pH および温度の影響について調べた。

25°Cで pH の影響を調べると可溶性ウリカーゼの場合と同様に至適 pH は 8.5 であった。

pH 8.5 における温度の影響については、尿酸分解初速度は 50°C で最大であった。つぎに、所定温度で 30 分間尿酸分解に用いたウリカーゼ固定化粒子を再度同一温度で用いて測定した尿酸分解初速度は、40°C 以上では低下したが 35°C 以下では殆ど認められなかった。したがって、以下のセンサーの使用温度は 35°C 以下とした。

2.2 センサーのステップ濃度応答

後述のように、液温、センサーの種類に関係なく、尿酸濃度 C_b が 2.5–3.0 mg/dl 以下では R_s と C_b の間に比例関係が成立した。そこで、液温 15–35°C、各センサーについて液中の尿酸濃度 C_b を 0 から 0.62, 1.22, 2.38 mg/dl の 3 種の濃度までステップ状に変化させてセンサーのステップ濃度応答を測定した。測定結果の例を Fig. 3 に示す。図に示すように各センサーとも、応答の速さは尿酸濃度にはほぼ無関係であった。また、応答速さは No. 1, No. 2, No. 3 の順であった。そこで、センサーの応答速度は次の一次おくれの Eq. (3) で表されると仮定した。

$$\frac{R}{R_s} = 1 - \exp\left(-\frac{t-t_d}{T}\right) \quad (3)$$

各温度、センサーごとに、各濃度に対する各時間ごとの応答値の平均値を測定応答値の平均値と呼ぶ。この測定応答値の平均値を Eq. (3) に適用してむだ時間 t_d と時定数 T を求めた。測定温度ならびにセンサーによって異なる

Fig. 3 Examples of effect of the uric acid concentration on the stepwise response of the uric acid sensor, and comparison between its calculated and observed response

が、 t_d は 0.1–0.68 min、 T は 0.18–0.6 min であった。Fig. 3 には測定応答値の平均値を実線で、 t_d と T の値を用いた Eq. (3) による計算値を破線で示している。センサー No. 1 と No. 2 では両者はほぼ一致し、センサー No. 3 については、 R/R_s が約 0.2 以上ではほぼ両者が一致した。15°C および 35°C についても同様な結果を得た。したがって、これらのセンサーは一次おくれで表せるとした。

2.3 センサーの検量線

尿酸濃度が C_b が 0–10 mg/dl、液温 15–35°C について R_s と C_b の関係 (検量線) を調べた。センサーの M.B. 厚みの影響についての測定結果の例を Fig. 4 に示した。No. 1 の検量線は測定ごとの変動が大きかった。これはセンサーの先端にセットされた M.B. の厚みが薄いためウリカーゼ固定化粒子の充填状態が変動し易いためと考えられる。No. 2 と No. 3 の検量線は測定ごとの変動が数%以下であった。図に示した値はいずれも複数回の測定値の中で最も高い値をプロットしたものである。Fig. 4 の検量線で R_s と C_b との間に直線関係が成り立つ C_b の範囲は No. 1 が約 2.5 mg/dl 以下、No. 2, No. 3 は約 3 mg/dl 以下であった。また、同一の C_b に対する No. 2, No. 3 の R_s はほぼ同値で No. 1 の R_s よりも大きい。他の液温でも同様な結果を得た。なお、再現性のある検量線を得るには、動的応答の速さは犠牲になるがマイクロベッドの厚みがある程度以上でなければならない (例えば、本研究の場合は 3 mm 以上) と思われる。同一センサーの各温度 (15°C–35°C) における検量線については、温度が大きい程同一の C_b に対する R_s は大きく、検量線の直線部分の

Fig. 4 Correlation of R_s with C_b at 25 °C for the various sensor set up

勾配 m も大であった。検量線の直線部分の勾配 m の測定値をTable 2に示した。

センサーのM.B. 内の液相および電極近傍における尿酸および溶存酸素の濃度分布としてFig. 5を考える。このセンサーに用いている溶存酸素センサーの指示値はテフロン膜面に接する酸素濃度に比例する。すなわち、 Q_s/Q_0 は O_{2L}/O_{2L0} に等しい。したがってEq.(2)はEq.(4)で表される。

$$R_s = 1 - \frac{Q_s}{Q_0} = \frac{O_{2L0} - O_{2L}}{O_{2L0}} \quad (4)$$

Eq.(4)において、 $0 \leq O_{2L} \leq O_{2L0}$ 、したがって R_s は0と1の間にある。固定化ウリカーゼの活性は充分大きいと仮定する。 C_b が大きい場合、M.B. 内での尿酸分解に消費される酸素量が大きくなり、 O_{2L} はゼロに近づく、その結果 R_s は1に近づくことになる。一方、 C_b がある値以下では、M.B. に供給される尿酸はテフロン膜面に達するまでに完全に分解されて $C_L = 0$ になると考えられる。外部拡散抵抗は無視できると仮定し、M.B. 内の液相の濃度分布は尿酸、溶存酸素ともに直線で表されると仮定する。電極表面での溶存酸素濃度は0と考えられる。定常状態においては、外部溶液からM.B. に入る溶存酸素の流束から電極表面で消費される溶存酸素の流束を差し引いたものは外部溶液からM.B. に入る尿酸の流束に等しい。このことから、Eq.(5)の関係が得られる。

$$\frac{O_{2L0} - O_{2L}}{O_{2L0}} = \frac{D_U}{D_{O_2}} \cdot \frac{C_b - C_L}{O_{2b}} \quad (5)$$

ここで、 D_{O_2} 、 D_U はM.B. 内の液相における溶存酸素および尿酸の拡散係数を現す。Eq.(5)をEq.(4)に代入するとEq.(6)が得られる。

Table 2 Slope m of linear correlation of R_s and C_b : unit [dl/mg]

Sensor No.	15 °C	25 °C	35 °C
1	0.126	0.154	0.184
2	0.152	0.190	0.210
3	0.152	0.190	0.210

Fig. 5 Concentration profiles of uric acid and oxygen in the liquid phase and vicinity of the micro bed of immobilized uricase particles. O_{2L0} and O_{2L} correspond to Q_0 and Q_s of DO meter reading, respectively

$$R_s = \frac{D_U}{D_{O_2}} \cdot \frac{C_b - C_L}{O_{2b}} \quad (6)$$

D_U 、 D_{O_2} 、 O_{2b} はある温度においては一定値を取る。Eq.(6)で $C_L = 0$ が成り立つ条件下では、 R_s は C_b に比例することになる。この時、その勾配 m は O_{2b} に逆比例することになる。

前述のTable 2の勾配 m について、15 °Cを基準とした勾配 m および溶存酸素濃度の逆数の相対値、すなわち、 $m/(15^\circ\text{C} \text{の} m)$ 、 $(15^\circ\text{C} \text{の} O_{2b})/O_{2b}$ と温度の関係をFig. 6に示す。両者は比較的良好に一致している。このことはEq.(4)–Eq.(6)が近似的に成立することを示すものと考えられる。

2.4 センサーの安定性

センサーNo. 2について、25 °C、 $C_b = 2.38 \text{ mg/dl}$ に対する濃度応答値を長期間にわたり測定した。センサー不使用時は室温の緩衝液に浸して保存した。センサーを製作してから約10日間の R_s の平均値を $R_{s,ini}$ として $R_s/R_{s,ini}$ の経時変化を示したのがFig. 7である。250日間以上にわたって、その濃度応答値は $\pm 5\%$ の範囲内の安定した値を示した。このように長期間にわたって安定であったのはウリカーゼの活性がオキシランアクリル粒子に固定化することにより安定化されたためと推測される。

Fig. 6 Comparison of temperature dependence of m with that of $1/O_{2b}$

結 言

ウリカーゼをオキシランアクリル粒子に固定化しそれを用いてマイクロベッド(M.B.)を作製した。このM.B.と市販の溶存酸素センサーを組み合わせる尿酸センサーを構成し、その尿酸濃度応答特性を測定した。測定はpH 8.5の50mM トリス・ホウ酸緩衝液中で液温15–35°C、尿酸濃度0–10mg/dlの範囲で行った。その結果、

1) 尿酸濃度のステップ状変化に対する応答はほぼ、むだ時間は0.1–0.68min、時定数は0.18–0.6minの一次おくれで表現できた。

2) 尿酸濃度2.5–3mg/dl以下では直線的な検量線を得た。

3) センサーは不使用時には室温の緩衝液中で保存した場合、センサーNo.2の25°C、尿酸濃度2.38mg/dlに対する濃度応答値は250日間以上安定であった。

4) 検量線の直線部分の勾配が溶存酸素濃度の逆数に比例することを近似的な解析および実測結果によって示した。

5) 再現性のある検量線を得るにはある程度以上(本例では3mm以上)のマイクロベッド厚みが必要である。

Nomenclature

- C_b = uric acid concentration in bulk solution [mg/dl]
 C_L = uric acid concentration at the interface between micro bed and teflon membrane of the uric acid sensor [mg/dl]
 m = slope of linear correlation of R_s and C_b [dl/mg]

Fig. 7 Running stability of the uric acid sensor

O_{2b} = oxygen concentration in bulk solution [mol/l]

O_{2L} = oxygen concentration at the interface between micro bed and teflon membrane of the uric acid sensor [mol/l]

$O_{2L0} = O_{2L}$ in the case of $C_b = 0$ [mol/l]

Q = readings of dissolved oxygen meter [–]

R = response value of the uric acid sensor defined by Eq.(2) [–]

T = time constant [min]

t = time [min]

t_d = dead time [min]

x = axial coordinate in particle bed [m]

<Suffix of Q and R >

0 = value for $C_b = 0$

s = steady value

Literature cited

- 1) Aizawa, M. and S. Suzuki: *DENKI KAGAKU*, **44**, 279 (1976)
- 2) Koya, H., M. Morishita and S. Gondo: *Fukuoka Kodai Electronics Kenkyujo Shoho*, **1**, 71 (1984)
- 3) Morishita, M., T. Osaki and S. Gondo: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **7**, 320 (1981)
- 4) Nagata, R.: *Ariake Kosen Sogoteki Jikkenjisshu*, No. 9, 38 (1985)
- 5) Nagata, R., A. Yamasaki, H. Koya and S. Gondo: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **11**, 217 (1985)
- 6) Rhöm Pharma Co.,: "Material for EupergitC", (1983)
- 7) Tuchida, T. and K. Ida: *Kagaku Kaishi*, **8**, 1347 (1982)

Uric Acid Sensor with Immobilized Uricase Using Oxirane Acrylic Beads as Supporting Material

Ryoichi Nagata and Mitsugu Tanaka*

Dept. of Ind. Chem., Ariake National College of Tech., Omuta 836

Shinichiro Gondo

Dept. of Elect. Mat. Eng., Fukuoka Inst. of Tech., Fukuoka 811-02

Key Words : Uric Acid, Oxirane Acrylic Beads, Immobilized Uricase, Sensor, Stable Response

Uricase was immobilized on oxirane acrylic beads to attain stabilized activity of uricase. The immobilized uricase particles were packed in a micro bed (5.5 mm in dia. and 1.5~5.0 mm in depth) and attached to the top of a dissolved oxygen sensor of galvanic type. The concentration response characteristics and the stability of the sensor were studied for uric acid concentrations of 0~10 mg/dl in 50 mM tris borate buffer solution of pH 8.5 at a temperature of 15~35°C. The results are summarized as follows.

1) Dynamic response of the sensor to stepwise change of uric acid concentration was approximately expressed by an equation of first-order response. The dead time was 0.1~0.68 min and the constant was 0.18~0.6 min. 2) Steady-state response of the sensor was proportional to the uric acid concentration up to 2.5~3 mg/dl. 3) When it was stored in the buffer solution at room temperature while not used, the sensor showed stable response within $\pm 5\%$ fluctuation for 250 days and more. 4) The slope of the linear correlation of sensor response with uric acid concentration was shown theoretically and experimentally to be inversely proportional to the dissolved oxygen concentration.

* Dan Polymer Co., Ltd.