— 論 文 —

(日本化学会誌, 1982, (8), p.1347~1351)

© 1982 The Chemical Society of Japan)

過酸化水素透過膜へのウリカーゼの固定化 と酵素電極への応用

(1982 年 1 月 27 日 受理)

土田 寿男*・依田 賢太郎

酢酸セルロース系非対称膜の多孔質層に、キトサン包括法によってウリカーゼを固定化した。得られた固定化酵素膜の見かけの活性は 6.9×10^{-4} 単位/cm² であった。固定化後の酵素特性を調べた結果、至適温度は 50°C, 至適 pH は 6~8 であった。この固定化ウリカーゼ膜と過酸化水素電極を用いて酵素電極を構成し、尿酸分析に供した。酵素電極の応答時間は、20 秒以内であり、尿酸濃度 0~50 mg/dl の範囲にわたって電極電流値と尿酸濃度の間に良好な直線関係が認められた。血液中の尿酸分析に応用した場合の分析精度は、血漿または全血において、おのおの CV 0.6, 2.2% であった。管理血清を用いて、添加回収試験を行なった結果、平均回収率は 99.9% であった。酵素電極法と酵素比色法の相関性は、相関係数 $r=0.985$, 回帰式 $y=0.977x+0.05$ であった。17 日間にわたって、全血 815 検体、血漿 185 検体を測定したのちも酵素電極の活性は初期活性の 56% を保持していた。この固定化ウリカーゼ膜は、空气中、4°C の保存条件下において、17 箇月以上安定であった。本法によって、簡単な操作で、血液中の尿酸が精度よく測定できた。

1 緒 言

血液、尿などの体液中の尿酸は、プリン体の代謝異常を始め、核タンパク質の崩壊や腎臓の排泄機能障害によって増加する。したがって、尿酸の測定は、痛風、白血病、金属中毒、尿毒症などの診断または治療の指標として不可欠な検査であり、これまでに種々の測定法が開発されてきた。尿酸分析法として、酵素の基質特異性と温和な反応条件を利用する酵素比色法¹⁾がある。この方法は、簡便で、しかも安価に測定できる反面、尿酸類似化合物によって正誤差が生じたり、試料中に共存する L-アスコルビン酸やグルタチオンなどの水素供与体と酵素反応生成物の過酸化水素が反応して、色原体の酸化が妨害され、負誤差が生じるという欠点がある。

一方、より簡便な尿酸分析法として、固定化酵素を用いる酵素

電極法がある。酵素電極の概念が、Clark²⁾ や Updike³⁾ らによって報告されて以来、酵素電極、あるいは微生物電極による各種物質の測定が報告されてきた。たとえば、D-グルコース⁴⁾、D-ガラクトース⁵⁾、L-アミノ酸⁶⁾、コレステロール⁷⁾、コリン⁸⁾、尿素⁹⁾、アルコール類¹⁰⁾、乳酸¹¹⁾、クレアチニン¹²⁾¹³⁾、尿酸¹⁴⁾、ビルビン酸¹⁵⁾などが酵素電極法で測定されている。

酵素反応によって生じる物質をポテンシオメトリー、あるいはアンペロメトリーによって検知する電極法においては、電極反応を妨害する物質は透過させないが、電極検知物質は透過させる機能を有する固定化酵素膜を作製し、これと特定の電極とを組み合わせることが重要である。すなわち、酸素、過酸化水素、アンモニア、二酸化炭素のような酵素反応によって生成、あるいは消費される物質に対して選択透過性を有することは、特異的な酵素反応と合わせて、酵素電極用固定化酵素膜の機能として大切である。

東洋紡績株式会社総合研究所, 520-02 大津市堅田

- 1) N. Kageyama, *Clin. Chim. Acta*, 31, 421(1971).
- 2) L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102, 39(1962).
- 3) S. J. Updike, G. P. Hicks, *Nature*, 214, 886(1967).
- 4) D. R. Thevenot, R. Sternberg, P. R. Coulet, J. Laurent, D. C. Gautheron, *Anal. Chem.*, 51, 96(1979).
- 5) P. J. Taylor, E. Kmetec, J. M. Johnson, *ibid.*, 49, 789(1977).
- 6) L. Macholan, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 43, 1811(1978).
- 7) I. Satoh, I. Karube, S. Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1096(1977).
- 8) K. Matsumoto, H. Seijo, I. Karube, S. Suzuki, *ibid.*, 22, 1071(1980).

- 9) M. Mascini, G. Guilbault, *Anal. Chem.*, 49, 795(1977).
- 10) M. Hikuma, T. Kubo, T. Yasuda, *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1845(1979).
- 11) D. L. Williams, A. R. Doig, Jr., A. Korosi, *Anal. Chem.*, 42, 118(1970).
- 12) M. Meyerhoff, G. A. Rechnitz, *Anal. Chim. Acta*, 85, 277(1976).
- 13) T. Tsuchida, K. Yoda, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 19, 861(1981).
- 14) M. Nanjo, G. G. Guilbault, *Anal. Chem.*, 46, 1769(1974).
- 15) F. Mizutani, K. Tsuda, I. Karube, S. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 118, 65(1980).

Fig. 1 Principle of uric acid analysis by the enzyme electrode method

電極が白金アノードと銀カソードからなり、過酸化水素に対して感受性を有するポーログラフ電極である場合、試料中に存在する過酸化水素以外の電極応答物質の干渉を除外するために、電極をおおう膜の過酸化水素に対する選択透過性が要求される。つまり、測定精度を向上させるために、血清や尿などの検体中に含まれる尿酸、アルコール、還元型グルタチオンなどの還元性物質による電極への妨害を最小限にすることが必要である。さらに、このような機能を有する膜は、製膜や酵素の固定化の工程において、取り扱いやすく、そして十分な機械的強度を有することも要求される。

著者らは、このような性質と機能を有する膜として、緻密層と多孔質層からなる非対称構造膜が適していることを示した。すなわち、酢酸セルロース系非対称膜を製膜し、膜の多孔質側にグルコースオキシダーゼを固定化して酵素電極に応用した¹⁶⁾。本報では、同じ酢酸セルロース系非対称膜にキトサン包括法によってウリカーゼを固定化し、過酸化水素電極と組み合わせて酵素電極を構成した。得られた酵素電極を用いて、図1に示す測定原理に基づいて、全血または血清中の尿酸の測定を試みたので、それらの結果について報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

Candida utilis を起源とするウリカーゼ (EC 1.7.3.3) は、東洋紡績(株)生化学事業部から入手した。牛血清アルブミンは、Reheis Chemical 社から購入した。キトサンは、共和油脂工業(株)のフロンナック N をそのまま使用した。その他の試薬は、市販特級品をそのまま使用した。酵素比色法による血清中の尿酸は、尿酸測定用試薬キット、ウリカー 400 (東洋紡績製)を用いて測定した。実験の用水は、イオン交換水をさらに1回蒸留したものを使用した。全血または血漿の抗凝固剤として、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物を 1 mg/ml の濃度になるように添加した。

2.2 装 置

酵素活性の測定および比色法による尿酸の測定には、日立分光光度計 200-10 型を使用した。実験に使用した酵素電極法による測定系は、反応セル、マグネティックスターラー、過酸化水素電極、アンプ、レコーダーによって構成した¹⁶⁾。過酸化水素電極は YSI オキシデースプローブ 2510 (Yellow Springs Instrument Co.), アンプは YSI オキシデースメーター 25 型、レコーダーはユニコーダー 228 型 (日本電子科学) をそれぞれ用いた。血清、血漿または全血中の尿酸測定には、固定化ウリカーゼ膜を装

着した YSI グルコースアナライザー 23 A 型を用いた。

2.3 ウリカーゼの固定化

非対称酢酸セルロース膜の多孔質側に、(3-アミノプロピル)トリエトキシシラン 1 ml, 酢酸 0.3 ml, 蒸留水 2 ml からなる溶液を均一に流延したのち、95°C の空気雰囲気下で、60 分間、熱処理した。0.1 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液に室温で 10 分間、つづいて 5% グルタルアルデヒド水溶液に室温で 30 分間浸漬した。蒸留水で十分洗浄後、平滑なガラス板で支持し、4°C の空气中で風乾した。このように前処理した非対称膜の多孔質に、ウリカーゼ 180 単位、1% キトサン、1% 酢酸からなる酵素溶液を 120 cm² の面積に均一に流延した。膜面を水平に支持した状態で 4°C、空气中に 1 時間、放置した。膜をガラス板から剝離し、pH 10 の 0.05 mol/l ホウ酸緩衝液に 10 分間、つづいて、pH 8.5 の 0.05 mol/l ホウ酸緩衝液に 20 分間、室温で浸漬した。4°C の空气中で風乾して、固定化ウリカーゼ膜を得た。

2.4 酵素活性の測定

酵素活性は、ウリカーゼの作用により尿酸がアラントインに変化するさいの尿酸の減少量から求めた。尿酸は 290 nm に強い吸収を示すが、ウリカーゼの作用によって生成するアラントインはこの波長では吸収をもたないので、290 nm の吸光度の測定からウリカーゼ活性を測定できる。酵素活性はつぎのようにして測定した。0.01 mol/l ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解した 0.001% 尿酸溶液 4 ml と蒸留水 1.0 ml を試験的に入れて、25°C 恒温水中で 5 分間予備加温する。つぎに酵素溶液 1.0 ml を加えてから正確に 5 分間反応させる。反応液の 290 nm における吸光度 (尿酸のモル吸光係数、12.2 cm²/μmol/l) を測定する。1 単位は与えられた条件下で、1 分間に 1 μmol/l の尿酸を酸化する酵素の活性である。固定化酵素膜の活性も上記の方法に準じて測定し、単位面積あたりの活性によって表示した。

2.5 酵素電極法による尿酸濃度の測定

固定化ウリカーゼ膜電極による尿酸濃度の測定は、0.05 mol/l リン酸緩衝液 (pH 8.5) を用いて、37°C で行なった。所定の濃度の尿酸標準液は、緩衝液 10 ml に対して 0.5 ml を添加した。血清、血漿または全血中の尿酸は、固定化ウリカーゼ膜を YSI グルコースアナライザー 23 A 型の電極上に装着して測定した。測定条件は、サンプル量 25 μl, 応答時間 20 秒とした。

3 結 果

3.1 固定化ウリカーゼ膜の性質

非対称酢酸セルロース膜の多孔質側に、キトサン包括法によってウリカーゼを固定化した。尿酸の減少量から求めた固定化ウリカーゼ膜の活性は、 6.9×10^{-4} 単位/cm² と非常に低い値を示した。表1に、遊離のウリカーゼと固定化ウリカーゼ膜の酵素特性を比較して示した。比色法によって評価した至適 pH は 6~8 と広範囲な挙動を示した。固定化によって至適温度は、約 10°C 高温側に移動した。電極法によって評価した場合には、アルカリ性が強くなるにもなって見かけの活性が上昇した。この固定化ウリカーゼ膜と過酸化水素電極を組み合わせて酵素電極を構成し、尿酸の分析を行なった。

図2は、標準尿酸溶液に対する酵素電極の応答曲線である。標準尿酸溶液の添加と同時に、酵素反応によって生成する過酸化水素に基づく還元電流が速かに増加し、20 秒以内に定常電流値に

16) T. Tsuchida, K. Yoda, *Enz. Microb. Technol.*, 3, 326 (1981).

Table 1 Properties of free and immobilized uricase

	Free	Immobilized	
	Colorimetric method	Colorimetric method	Electrode method
Activity ^{a)}	4.5 unit/mg	6.9×10^{-4} unit/cm ²	—
Optimum pH (at 37°C)	pH 8.5	pH 6.0~8.0	pH 8.5
Optimum temperature (at pH 8.5)	40°C	50°C	37°C

a) One unit causes the oxidation of one μ mole of uric acid per minute.

Fig. 2 Response curves of the immobilized uricase membrane electrode

Uric acid (mg/dl) :

(1) ; 10, (2) ; 20, (3) ; 30, (4) ; 40, (5) ; 50

The determination was carried out the following conditions : Temperature 37°C, pH 8.5, 0.05 mol/l phosphate buffer, Ratio of standard to buffer was 0.5 ml to 10 ml.

Fig. 3 Calibration curve for uric acid analysis by the immobilized uricase membrane electrode

達した。図3に示されているように、このときの電極電流は、尿酸濃度に比例し、尿酸濃度 0~50 mg/dl の範囲で良好な直線関係を示した。

Table 2 Analytical precision for the determination of uric acid in human blood by the enzyme electrode method

Within-day				
	<i>n</i>	$\bar{X}$ (mg/dl)	<i>SD</i> (mg/dl)	<i>CV</i> (%)
Plasma	15	6.42	0.041	0.6
Whole blood	20	2.26	0.051	2.2
Between-day				
	<i>n</i>	$\bar{X}$ (mg/dl)	<i>SD</i> (mg/dl)	<i>CV</i> (%)
Validate	10	4.06	0.052	1.3
Validate-A	10	8.51	0.185	2.2

Table 3 Analytical recovery by the enzyme electrode method

	Uric acid (mg/dl) determined	Uric acid (mg/dl) calculated	Recovery (%)
1	3.6 ^{a)}	—	—
2	13.3	13.3	100.0
3	13.6	13.8	98.6
4	14.6	14.3	102.1
5	14.6	14.7	99.3
6	15.0	15.4	97.4
7	15.5	15.7	98.7
8	16.4	16.1	101.9
9	16.6	16.6	100.0
10	17.3	17.1	101.2
$\bar{X}$	—	—	99.9

a) Versatol.

3.2 臨床分析への応用

血液中の尿酸測定は、固定化ウリカーゼ膜を YSI グルコースアナライザー 23A 型に装着して行なった。この装置は、エンドポイント法によるディスクリット方式の測定系になっている。試料量は 25 μ l, 反応セルの容量は 350 μ l であり、したがって測定時の試料希釈倍率は 14 倍である。試料を注入してから 20 秒後の出力から、10 mg/dl の濃度の尿酸溶液を基準にして血液中の尿酸濃度を算出した。

表2に測定値の同時再現性と日差再現性を示した。血漿試料の場合、尿酸濃度 6.4 mg/dl に対し、CV 0.6%, 全血試料の場合、尿酸濃度 2.3 mg/dl に対し、CV 2.2% が得られた。同一測定条件下で、市販管理血清バーサトル (General Diagnostics Div. of Warner-Lambert Co.) を用いて添加回収試験を行なった。結果を表3に示した。回収率は 97.4~102.1% の範囲であり、平均回収率は 99.9% であった。血清中の尿酸測定における酵素比色法と酵素電極法による測定値を比較した結果を図4に示す。相関係数 $r=0.985$, 回帰式 $y=0.977x+0.05$ (y : 酵素電極法, x : 酵素比色法) とすぐれた相関性を示した。

図5に酵素電極の測定耐久性を示した。17 日間にわたって、血漿 185 検体、全血 815 検体の測定を行なったのちの酵素電極の活性は、初期活性の 56% を保持した。4°C の空气中に 14 箇月間、保存した固定化ウリカーゼ膜の測定耐久性と測定精度を検討した。16 日間にわたり、市販管理血清 1000 検体中の尿酸を測定したのちも酵素電極の活性は初期活性の 79% を保持した。

Table 4 Analytical precision

Elapsed time (day)	Validate				Validate-A			
	n	$\bar{X}$ (mg/dl)	SD (mg/dl)	CV (%)	n	$\bar{X}$ (mg/dl)	SD (mg/dl)	CV (%)
1	20	3.99	0.104	2.6	20	8.71	0.083	1.0
2	20	3.91	0.121	3.1	20	8.47	0.080	1.0
3	20	4.08	0.121	3.0	20	8.45	0.315	3.7
8	20	4.09	0.118	2.9	20	8.82	0.190	2.2
9	20	3.94	0.082	2.1	20	8.46	0.060	0.7
10	20	4.14	0.080	2.0	20	8.56	0.105	1.2
11	20	4.08	0.041	1.0	20	8.37	0.049	0.6
12	20	3.93	0.086	2.2	20	8.45	0.136	1.6
15	20	4.13	0.085	2.2	20	8.51	0.112	1.3
16	20	4.07	0.059	1.4	20	8.09	0.037	0.5

Fig. 4 Correlation between the immobilized uricase membrane electrode method and the colorimetric method using free enzyme for the determination of uric acid in human serum

Fig. 5 Durability of the immobilized uricase membrane electrode

A human plasma (185 assays) and A human whole blood (815 assays) was used for the determination of uric acid.

○ : Relative activity of enzyme electrode
● : Assay number

表4に示すように、このときの測定精度は、正常血清（バリデート）を検体としたとき、CVは1.6~3.0%，異常血清（バリデートA）を検体としたとき、CVは0.6~3.7%であった。

4 考 察

非対称構造の酢酸セルロース膜は、血液中に存在するアスコルビン酸、尿酸、還元型グルタチオンなどの物質は透過させず、酵素反応によって生成される過酸化水素を透過させる機能を有することは、すでに報告した¹⁶⁾。このような膜特性は、酵素電極用の固定化酵素の担体の性質として重要である。この性質を有することによって、過酸化水素に対し感応するポーログラフ電極と固定化酵素膜で構成される酵素電極を用いて血液中の尿酸を測定する場合、種々の電極感応物質による妨害を最小限にして、精度を向上させることができる。

過酸化水素透過性を有する非対称膜の多孔質側に、キトサン包括法により固定化されたウリカーゼの性質は、表1に示されている。膜活性が 6.9×10^{-4} 単位/cm² と低く、したがって見かけの活性収率もグルコースオキシダーゼで得られた活性収率6.8%より非常に低い。しかし、固定化酵素膜を酵素電極の活性として評価した場合、同じ濃度で検知される電極電流値は、固定化グルコースオキシダーゼ膜に比較して、固定化ウリカーゼ膜の方が大き

い。この事実、尿酸濃度の減少を比色法で測定する固定化酵素膜の活性測定法が適切でないとは推定される。

また、酵素電極活性のpH依存性は、アルカリ側になるほど、見かけ上大きな活性を示す。これは酢酸セルロース膜に対する過酸化水素の透過性がアルカリ溶液中で大きくなるためと推定される¹⁷⁾。これと同じ傾向は、固定化グルコースオキシダーゼ膜の場合にも観察された¹⁸⁾。至適温度は、比色法で比較したとき、固定化によって約10°C高温側に移動する。これは固定化酵素の一般的な傾向である。しかし、均一系の遊離酵素と不均一系の固定化酵素の特性を直接比較するのは適切でなく、あくまでも見かけの酵素特性としての比較である。

酵素電極法による血清、尿中の尿酸測定は、NanjoとGuilbault¹⁴⁾によって最初に報告された。彼らは、ウリカーゼ、牛血清アルブミン、およびグルタルアルデヒドの混合溶液を凍結下で橋かけ反応させた。そして、得られたスポンジ状の固定化ウリカーゼをナイロンネットによって酸素電極に装着して、酵素電極を構成した。著者らは、酢酸セルロースの非対称膜にキトサン包括法

17) Kenneth D. Vos, A. P. Hatcher, U. Merten, *Ind. Eng. Chem., Prod. Res. Dev.*, 5, 211(1966).

によってウリカーゼを固定化した。そして、過酸化水素電極に固定化ウリカーゼ膜を装着して酵素電極を構成した。本法では、血清尿酸の測定において、良好な同時再現性、添加回収率、他法との相関性が得られたのみならず、前処理操作を必要としないで、全血中の尿酸が直接測定できることが示された。

非対称構造の酢酸セルロース膜は、イ) 過酸化水素電極の妨害物質は透過させず、酵素反応生成物の過酸化水素を透過させ、しかも、その透過速度が大きい。ロ) 成形や固定化操作に耐える十

分な機械的強度がある。ハ) 酵素が物理的あるいは化学的に結合できる有効面積が大きい。ニ) 親水性である。などの機能を有している。この膜を利用した尿酸測定用酵素電極は、Nanjoらの酵素電極と比較して、とくに、応答速度、測定精度、測定耐久性、保存安定性、取り扱いやすさにすぐれている。本酵素電極法は迅速、簡便で、しかも経済的な尿酸分析法として臨床分析への応用が可能である。

(1981年11月, 第21回臨床化学シンポジウム(一部)発表)

Immobilization of Uricase onto a Hydrogen Peroxide Permeable Membrane and Application for an Enzyme Electrode

Toshio TSUCHIDA* and Kentaro YODA

*Katata Research Center, Toyobo Co., Ltd. ;
Katata, Otsu-shi 520-02 Japan*

A rapid, specific, and simple enzyme electrode method for the analysis of uric acid was developed. A cellulose acetate membrane with asymmetric structure which has the permeability toward hydrogen peroxide was prepared. Uricase (EC 1.7.3.3) was immobilized onto the porous side of the membrane by entrapping with chitosan. The enzyme electrode was constructed with combination of the immobilized uricase membrane and a polarographic electrode sensing hydrogen peroxide. The enzyme electrode responded linearly to concentration of uric acid over zero to 50 mg/dl. Response time was within 20 s. The enzyme electrode was applied to the analysis of uric acid in human blood. Only 25 μ l of human serum or human whole blood was required for analysis. Analytical precision was 0.6% at 6.4 mg/dl on human plasma and 2.2% at 2.3 mg/dl on human whole blood. Analytical recovery was 99.9% on controlled human serum. Correlation was established with enzyme colorimetric method; $r=0.985$, $y=0.977x+0.05$ (x : Enzyme colorimetric). The immobilized uricase membrane was sufficiently stable to perform 1000 assays (17 days operation) for the determination of uric acid in human blood. The storage shelf life of dried membrane was more than 14 months at 4°C. The present enzyme electrode method offers an excellent assay procedure for uric acid in clinical analysis.