Ti(IV)–4-(2-Pyridylazo)resorcinol 試液の生体成分分析への応用
Lipoprotein Lipase, Acyl CoA Synthetase, Acyl CoA Oxidase を用いる
血清トリグリセリドの吸光光度定量

松原チヨ, 西川雄司, 高村喜代子*
東京薬科大学

Application of the Ti(IV)–4-(2-Pyridylazo)resorcinol Reagent to the Assay for
Biological Substances. A Spectrophotometric Method for the Determination of
Triglycerides in Serum Using Lipoprotein Lipase, Acyl CoA
Synthetase and Acyl CoA Oxidase

CHIYO MATSUBARA, YUJI NISHIKAWA, and KIYOKO TAKAMURA*
Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo

(Received February 28, 1983)

A mixture of Ti(IV) and 4-(2-pyridylazo)resorcinol (Ti-PAR reagent) is found to be useful for the spectrophotometric determination of trace amounts of H_2O_2 . The absorbance at 508 nm was proportional to the concentration of H_2O_2 added. The reagent was successfully applied to the assay of triglycerides in the serum. Triglycerides are enzymatically hydrolyzed to produce glycerol and fatty acids. The fatty acids were determined by the detection of H_2O_2 using the Ti-PAR reagent by the combined use of acyl CoA synthetase and acyl CoA oxidase.

It was possible to determine triglycerides in 5 μl of serum ranging in concentration from 5 to 600 mg/100 ml. The coefficient of variation was less than 2.5%. The analytical recovery of triglycerides in the human serum was more than 97%. By this method the absorbance was hardly affected in the presence of reducible substances such as CoA and ascorbic acid.

Keywords—triglyceride; fatty acid; spectrophotometric determination; hydrogen peroxide; Ti-PAR reagent; acyl CoA synthetase; acyl CoA oxidase; lipoprotein lipase

臨床分析において血清トリグリセリド (TG) 値は、臓器疾患や内分泌疾患に見られる脂質代謝異常の診断の指標や動脈硬化症の成因解明などの手掛りとして重要である。¹⁾ したがって血清 TG の定量法は、古くから多様な試みがなされて来たが、²⁾ 従来の化学的測定法に代って近年では酵素技術の進歩に伴い酵素法が主流になりつつある。酵素法では、lipoprotein lipase (LPL) 存在下に TG の加水分解によって生じたグリセロールを定量しており、その検出にはグリセロールの酸化過程で生じる NADH, H_2O_2 などを、diaphorase あるいは peroxidase を用いる呈色反応系と組み合わせて捕える吸光光度法が用いられている。³⁻⁶⁾ しかしこれらの方法では、グリセロールが酵素反応において定量的に酸化されていないおそれがあり、呈色反応についても共存物質の影響などの問題点が指摘されている。⁷⁾ このような難点を避けるためには、TG の加水分解によって生じる脂肪酸 (FA) を定量する方法が有用であろう。

既に著者らは Ti-PAR 試液 (Ti(IV) と 4-(2-pyridylazo)resorcinol との混合溶液) を用いた血清遊離脂肪酸 (FFA) の吸光光度定量法を報告した。⁸⁾ これは、acyl CoA synthetase (ACS) および acyl CoA oxidase (ACO) の存在下に FFA を酸化した場合に生じる H_2O_2 を Ti-PAR 試液により捕える方法である。したがって、LPL による TG の加水分解で生じた FA を Ti-PAR 試液を用いて検出することにより、TG の定量が可能と考えられる。

Ti-PAR 試液による呈色は、^{8,9)} H_2O_2 を含む Ti(IV) 錯体生成に基づいており、peroxidase による酸化反応に依存しないので、アスコルビン酸など還元性共存物の影響を受け難い。また錯体のモル吸光係数は $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

であり H_2O_2 に対する呈色感度が高い。本試液を用いることにより少量の試料による分析を容易とし、十分希釈した溶液について測定可能な共存物の影響が小さくなる。したがって、このような特長を有する本試液を用いれば、従来のグリセロール-peroxidase 法などと比較して、少量の試料による感度、精度高い TG の定量が期待される。

本報では、Ti-PAR 試液を用いる TG 測定のための基礎的な条件を検討し、実際の血清試料中の TG の定量を試みた。本法の反応過程を Chart 1 に示す。

Chart 1

実験の部

試薬 Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.3) 起源 *Chromobacterium viscosum*, acyl CoA synthetase (EC 6.2.1.3) 起源 *Candida lipolytica* および acyl CoA oxidase 起源 *Candida utilis* は、三菱化成工業(株)製を使用した。また CoA およびトリオレインは Sigma Chemical Co. 製、ATP は Boehringer Mannheim Biochemicals Co. 製を使用した。その他の試薬は市販特級品をそのまま使用した。

Ti-PAR 試液の調製 Ti-PAR 試液 ($\text{Ti(IV)} 4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$, $\text{PAR} 4.0 \times 10^{-4} \text{ M}$) は、前報⁹⁾と同様に調製した。すなわち、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ TiCl_4 溶液 40 ml と $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 4-(2-pyridylazo)resorcinol 溶液 40 ml を混合し、水で全量 100 ml とした。

トリオレイン標準溶液 (200 mg/100 ml) の調製 トリオレイン 200 mg に 70% エタノール溶液を加え全量 100 ml とした。

血清 TG の測定 酵素溶液 0.5 ml (74 U LPL, 0.4 U ACS, $0.6 \mu\text{mol}$ CoA, $2.5 \mu\text{mol}$ ATP, $6 \mu\text{mol}$ MgCl_2 および 0.25 mg トリトン X-100 を含む pH 8.6 の 100 mm トリス緩衝溶液) に血清 5 μl を加え、 37°C で 30 min 加温する。続いて、0.25 U ACO を含む 100 mm トリス緩衝溶液 (pH 8.6) 2.1 ml および Ti-PAR 試液 0.4 ml 加え、 37°C で 10 min 加温後 508 nm における吸光度を測定する。^{8,9)} LPL を加えず同様に操作した溶液を対照として用いた。

結果と考察

1. 定量条件の設定

酵素反応の諸条件の変化が Ti-PAR 試液による呈色に与える影響を検討し、TG 定量の至適条件を定めた。血清の代わりにトリオレイン標準溶液を用い、操作は実験の部に述べた測定法によった。

酵素および補酵素量 まず、トリグリセリドの加水分解に必要な LPL の最適量を求めた。Fig. 1 に示したように、LPL 20 U 以上でほぼ一定の吸光度が得られた。そこで反応中の酵素失活の可能性を考慮し、LPL 量を 74 U と定めた。また、FA の活性化および酸化に必要な ACS, ACO, ATP, CoA および MgCl_2 量を検討したところ、ACS 0.4 U, ACO 0.25 U, ATP $2.5 \mu\text{mol}$, CoA $0.6 \mu\text{mol}$ および MgCl_2 $6 \mu\text{mol}$ とした場合に反応を定量的に行わせることが可能であった。これは、先に著者らが報告した血清 FFA の定量の場合と全く同一条件である。⁸⁾

pH の影響 酵素反応に呈色反応を接続させる場合の至適 pH を定めるため、pH による吸光度変化を調べたところ、pH 7—9 の間でほぼ一定の吸光度が得られた。Ti-PAR 試液による H_2O_2 の呈色は、pH 7.5—12.0 の間で一定吸光度を示すこと、⁹⁾

Fig. 1. Effect of LPL Activity on the Absorbance Obtained after 10 min Incubation at 37°C

Concentration of TG: 0.004 mg/ml in the final solution.

LPL の至適 pH が 4—9,¹⁰⁾ ACS および ACO が最大活性を示す pH も 8 前後であることを考慮すると、この結果は妥当なものと考えられる。そこで酵素反応、呈色反応共に pH 8.6 のトリス緩衝溶液中で行うこととした。

加温条件 本実験で用いた LPL は、40°C まで安定であるが、60°C では 20 min で失活する。またその活性は 70°C で最大となる。¹⁰⁾ ACS および ACO は 30°C まで安定であり、40°C で最大活性を示す。¹¹⁾ 一方臨床分析では、反応時の温度を 37°C に設定している場合が多い。そこで酵素の特性と臨床検査への応用を考慮して、温度はすべて 37°C とした。

上述の酵素量を用いて、37°C で反応させた場合、LPL および ACS による酵素反応は 30 min で終了し一定吸光度が得られたので、加温時間を 30 min と定めた。LPL による加水分解は 10 min 以内で完了しているので、ACS による活性化に時間を要するものと考えられる。また前報に述べたように、⁸⁾ ACO による反応は短時間 (1 min 以内) で終了するので、この反応を Ti-PAR 試液による呈色反応と同時に進行させ加温時間を 10 min とした。

検量線および精度 以上の検討結果に基づいて、TG 測定法を実験の部に述べたように定めた。Fig. 2 にトリオレイン標準溶液を用いて得た検量線を示す。血清中濃度 5—300 mg/100 ml の範囲で良い直線性が得られ、また各プロットにおける変動係数は 2.5% 以下であった。また 2 倍濃度の Ti-PAR 試液を用いた場合には、FFA 600 mg/100 ml まで直線性が得られた。TG の構成成分である FA 1 分子あたりのモル吸光係数は $31200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、これは血清 FFA の定量時の FA のモル吸光係数⁸⁾ と一致した。

Fig. 2. Relation between the Absorbance and the Concentration of TG in Serum

TABLE I. Effects of Inorganic and Organic Substances on the Determination of TG by the Ti-PAR Reagent

Substance	Concn. in serum (mg/100 ml)	TG found ^{a)} (%)
None	—	100
Na ₂ HPO ₄	100	100
NaF	1000	100
Sodium citrate	1000	100
EDTA 2Na	200	98
Heparin ^{b)}	80	100
	160	96
Amino acids ^{c)}	100	100
Ascorbic acid	20	100
Bilirubin	5	100
Cysteine	50	98
Glucose	500	100
Glutathione	40	100
Pyruvic acid	20	100
Uric acid	20	100

a) Concentration of TG: 0.004 mg/ml in the final solution.

b) U/ml.

c) Amino acids used: Arg, His, Met, Asn, Asp, Gly, Ala, Thr, Ser, Orn, Cit, Trp, Tyr.

リオレイン標準溶液を用いて得た検量線を示す。血清中濃度 5—300 mg/100 ml の範囲で良い直線性が得られ、また各プロットにおける変動係数は 2.5% 以下であった。また 2 倍濃度の Ti-PAR 試液を用いた場合には、FFA 600 mg/100 ml まで直線性が得られた。TG の構成成分である FA 1 分子あたりのモル吸光係数は $31200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、これは血清 FFA の定量時の FA のモル吸光係数⁸⁾ と一致した。

ところで本実験に使用した LPL は、炭素数 14—18 の FA で構成される TG の加水分解を触媒し、¹²⁾ また ACS および ACO はそれぞれ炭素数 14—18 の FA およびアシル CoA に対し特異性が高い。ACS および ACO の活性は FA の不飽和度には影響されず、FA の定量の場合にオレイン酸を用いて得た検量線は、パルミチン酸のそれと全く一致した。^{8,11)} 血清 TG を構成する FA は、パルミチン酸 (炭素数 16)、オレイン酸 (炭素数 18, 2 重結合 1) およびリノール酸 (炭素数 18, 2 重結合 2) が全体の 80% を、炭素数 14—18 の FA が全体の 95% を占めている。²⁾ したがって、本酵素系と Ti-PAR 試液による呈色系を組み合わせた本定量法は、血清中の長鎖脂肪酸を構成成分とする TG をほぼ完全に定量出来る。

2. 血清中の TG の定量

本定量法を用いて実際に血清中の TG の定量を試みた。

共存物質の影響 本定量法を実際試料に適用するのに先立ち、血清中に存在すると考えられる共存物質の影響を検討した。その結果を Table I に示す。本呈色系は比較的高感度であるため、血清採取量は 5 μ l で十分測定可能である。したがって、検

Fig. 3. Correlation of the Results by the GK-G3POD-Peroxidase and the Proposed Methods

GK: Glycerol kinase,
G3POD: Glycerol-3-phosphate oxidase.
 $Y=0.800X+92$, $r=0.953$

Fig. 4. Correlation of the Results by the ACS-ACO-Peroxidase and the Proposed Methods

$Y=1.054X-27$, $r=0.962$

液中の共存物質の濃度は非常に小さくなり、その影響はほとんど無視出来る。各種無機イオンの存在は、血清中に存在が予想される濃度範囲で全く影響を与えない。ヘパリンは、高濃度では酵素反応の阻害による負誤差を与えたが、⁸⁾ 本法では試料が十分希釈されるので通常使用量 (16 U/ml) で全く影響を示さない。また、アスコルビン酸、グルタチオンなど還元性物質の影響もほとんど見られなかった。

アルブミンは FFA と結合し、ACS による活性化反応を阻害することが知られている。前報の血清 FFA 定量の場合には、アルブミンによる酵素反応の阻害を避けるために解離剤の添加を必要とした。⁸⁾ しかし本実験では、アルブミンの影響はほとんど見られなかった。これは、すでにアルブミンと結合して血清中に存在する FFA の場合と異なり、TG の加水分解により生じた FA は、アルブミンと結合することなく ACS による活性化を受けるためと考えられる。

定量精度 血清 (TG 値 200 mg/100 ml) にトリオレイン標準溶液 (133 mg/100 ml, 53.2 mg/100 ml) を添加したところ、回収率 97% 以上、変動係数 2.8% 以下 ($n=10$) という良好な結果が得られた。

多摩地区の臨床検査センターに提出された血清 54 例について本法による TG 定量を試み、加水分解により生じるグリセロールを捕える glycerol-3-phosphate oxidase 法⁹⁾ (Wako triglyceride G test, 呈色系は、peroxidase-4-アミノアンチピリンクロールフェノール法) と比較した。その結果を Fig. 3 に示す。相関係数 $r=0.953$, 回帰直線 $Y=0.800X+92$ であり、本法による結果がより高値を示した。また本法による結果を、TG の加水分解によって生じる FA を ACS-ACO-peroxidase¹³⁾ によって定量した結果と比較した (Fig. 4)。この場合は相関係数 $r=0.962$, 回帰直線 $Y=1.054X-27$ ($n=19$) であり、2 種の方法による定量値は良い一致を示した。このような対照の方法の相違による相関の差は、TG の加水分解の結果生成するグリセロールを捕えるか、FA を捕えるかによって生じたものと考えられる。松宮は、TG の加水分解により生じるグリセロールを捕える比色法を用いた場合に、添加回収率が著しく低いことから、血清の TG から生じるグリセロールとグリセロール標準溶液とでは酵素反応の進行過程が異なることを指摘し、血清中のグリセロールが完全に反応していない可能性を示唆している。⁷⁾ Fig. 3 に見られる本法と対照法との差は、対照法として用いた glycerol-3-phosphate 法が低値を示す傾向にあることが原因と考えられる。

結 語

以上、Ti-PAR 試液による血清 TG の定量を試み、良い結果を得た。本法は、TG の加水分解によって生じた FA を ACS および ACO を用いて酸化し、その時に生じた H_2O_2 を Ti-PAR 試液を用いて測定するものである。したがって、TG の加水分解により生じるグリセロールを測定することに起因する従来法の問題点を避けることが出来る。グリセロールを測定する従来法は大別すると 2 種ある。まず、glycerol kinase など数種の酵素を組み合わせ、生成した NADH を捕える方法^{3,4)}では、酵素反応過程が複雑であり、血清中のビルビン酸などの

共存物により生成した NADH が消費されるため大きな正誤差を示すことが指摘されている。⁷⁾ また, glycerol-3-phosphate oxidase⁵⁾ または glycerol oxidase⁶⁾ の作用によって生じる H_2O_2 を peroxidase を用いる呈色系で測定する方法は, アスコルビン酸など還元性物質の影響を強く受ける難点がある. したがって, 両方法とも TG の定量法としていずれも十分満足出来るものとは言い難い.

これに対して, 本法で用いた ACS-ACO による FA の酸化反応系は, 比較的簡単で, 用いる酵素の選択性も高い. また H_2O_2 の検出に用いた Ti-PAR 試液による呈色は,^{8,9)} H_2O_2 と PAR を含む Ti(IV) 錯体 (λ_{max} , 508 nm) の生成によるもので,¹⁴⁾ H_2O_2 の呈色反応として広く実用されている peroxidase 法と発色機構が根本的に異なっている. したがって, 還元性共存物の影響を受け難く, 種々の還元性物質の共存する血清試料への応用に大きな利点を有する.

以上のように, Ti-PAR 試液による呈色系と LPL-ACS-ACO による酵素系との組み合わせによって, 感度ならびに精度の高い血清 TG 定量が可能である.

引用文献および注

- 1) 板倉弘重, クリニカルニュース, **2**, 75 (1981).
- 2) 丹羽正治, 北村元仕, 斉藤正行編, “臨床化学分析 III—糖および脂質—,” 第2版, 日本分析化学会編, 分析ライブラリー3, 東京化学同人, 東京, 1981, pp. 92—126.
- 3) R. E. Megraw, D. E. Dunn, H. G. Biggs, *Clin. Chem.*, **25**, 273 (1979).
- 4) H. Winartasaptra, V. N. Mallet, S. S. Kuan, G. G. Guilbault, *Clin. Chem.*, **26**, 613 (1980).
- 5) P. Fossati, L. Prencipe, *Clin. Chem.*, **28**, 2077 (1982).
- 6) T. Uwajima, O. Terada, *Trends. Anal. Chem.*, **1**, 55 (1981).
- 7) 松宮和人, 臨床病理, **24**, 657 (1976).
- 8) C. Matsubara, Y. Nishikawa, Y. Yoshida, K. Takamura, *Anal. Biochem.*, **130**, 128 (1983).
- 9) 松原チヨ, 高村喜代子, 分析化学, **29**, 759 (1980).
- 10) M. Sugiura, M. Isobe, *Biochem. Biophys. Acta*, **341**, 195 (1974).
- 11) 三菱化成工業(株) より私信.
- 12) M. Sugiura, M. Isobe, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1226 (1975).
- 13) 血清 FFA 定量用キット (ヤトロン(株) 製, MCI NEFA-E (Color)) に LPL を加えて TG 定量用に改めたものを使用.
- 14) 岩本武夫, 松原チヨ, 高村喜代子, 矢野重信, 吉川貞雄, 第43回分析化学討論会講演要旨集, 山形, 1982年6月, p. 333.