

酵素的サイクリングを利用したアンモニアの高感度測定法

栢森 裕三[®], 片山 善章*

(1988 年 11 月 8 日受理)

酵素的サイクリング法を利用したアンモニアの高感度測定法についての検討を行った。使用した酵素はグルタミン酸脱水素酵素 (GLDH) とグルタミン酸酸化酵素 (GLOD) の二つであり、測定は NADPH の 340 nm における吸光度を連続的な減少量としてとらえる方法で行った。本法は試料量が 50 μ l でよく、検量線や感度は反応時間により左右されるが、例えば GLDH 1.5 U/assay (3.0 ml), GLOD が 21 U/assay の場合で 30 分間反応させると、その直線域の上限は約 300 μ g/100 ml であり、GLOD 無添加系と比較するとその感度は 13 倍と高感度で測定が可能である。この条件下では、吸光度 0.001 の変化が 1.7 μ g/100 ml のアンモニア量に相当し、サイクリング率は、約 2 cycle/min であった。又本法で使用した GLOD は L-グルタミン酸に特異的であるため試料中にその存在が考えられる場合にはグルタミン酸脱炭酸酵素 (GLDC) を用い、あらかじめ L-グルタミン酸を消去した後アミノオキシ酢酸で GLDC を抑え、本サイクリング法を適用した。この方法での消去能は 6.0 U/ml の GLDC を 37°C 10 分間反応させた場合、80 mM の L-グルタミン酸の消去が可能であった。更に GLOD の基質特異性より、L-アスパラギン酸、L-グルタミンが大量に存在する場合には本法は正の誤差を与える。

1 緒 言

アンモニアはその毒性から、生体中はもちろんのこと食品や飲料水中などにおいて測定する意義は大きい。一方、その測定は従来より拡散法¹⁾²⁾、イオン交換樹脂法³⁾⁴⁾、インドフェノール法⁵⁾、更にグルタミン酸脱水素酵素 (GLDH) による酵素法⁶⁾ が報告されている。しかし、いずれの場合でも感度が低く、検体量を多く必要とするなどの問題点をもっている。そこで著者らは、二つの酵素を用いた酵素的サイクリング法を利用し、アンモニアを高感度に測定する方法について検討を行った。使用した酵素は GLDH とグルタミン酸酸化酵素 (GLOD) であり、Fig. 1 に示す反応によりアンモニアをサイクリングさせる。この場合、最終検知物質は過酸化水素か NADPH の 340 nm における吸光度の減少をとらえる方法が考えられるが、今回は後者の方法により測定を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

GLDH は *Yeast* 由来 (オリエンタル酵母) を使用し、GLOD は *Streptomyces sp.* 由来 (ヤマサ醤油) の標

品を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) に対して、24 時間 4°C で透析した後に使用した。又、試料中に共存する L-グルタミン酸を消去するために用いたグルタミン酸脱炭酸酵素 (GLDC) は、*E. coli* 由来 (シグマ, Type II) の標品を 50 mM コハク酸緩衝液 (pH 5.0) に対して、24 時間 4°C で透析した後に使用した。その他の試薬類に関しては、すべて市販の特級品を用いた。又、試薬の調製など実験に使用する精製水はすべて陽イオン交換樹脂で処理したものを用いた。

2.2 装置及び操作法

本法の測定は島津 UV-160 型分光光度計 (島津製作

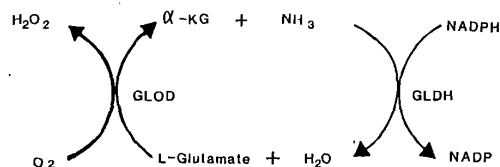


Fig. 1 Principle of enzymatic cycling assay for ammonia determination

α -KG: α -ketoglutarate; GLDH: glutamate dehydrogenase; GLOD: glutamate oxidase; NADP(H): oxidized(reduced) nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

* 国立循環器病センター臨床検査部: 565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

所) を使用し, 37°C の温度制御は同社の CPS-コントローラーを用いた. 又, GLDC による L-グルタミン酸の分解条件の設定に当たり, その分解の程度をアミノ酸アナライザー (DIONEX 製) により測定した. 本法の測定操作法は特に指示しないかぎり, 以下に示すものを基本とした.

試料 50 μ l に 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 2.63 ml, 0.2 mM NADPH 溶液 100 μ l, α -ケトグルタル酸 (α -KG) 溶液 200 μ l, GLOD 溶液 10 μ l を加え 5 分間 37°C で加温し, そのときの 340 nm での吸光度 E_1 を読む. 次に GLDH 溶液 10 μ l を加え反応を開始し, 一定時間後の吸光度 E_2 を読みとる. 同様に標準物質及びから試験液の吸光度を測定し, から試験液の吸光度を試料, 標準物質の吸光度から差し引き, 標準物質の吸光度を基準にして比例計算により試料中のアンモニア濃度を求める. 反応液の終容量は 3.0 ml とした.

なお, 本反応は反応開始後, ある一定時間後に吸光度を読みとる fixed time rate assay による測定方法であり, 吸光度の誤読を防ぐためその全行程をレコーダーで記録し吸光度を読みとった.

3 結果及び考察

3.1 至適濃度条件の設定

測定系の緩衝液 GLDH, GLOD の至適 pH を考慮して, 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 pH 8.3 を使用した. 又, NADPH の濃度は高ければそれに応じて高濃度のアンモニアを測定することも可能となるが, 分光光度計の 340 nm における直線性も考えて 0.2 mM とした. α -

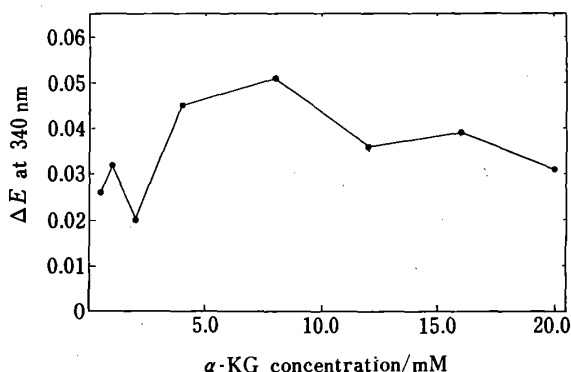


Fig. 2 Effect of α -ketoglutarate concentration on the measurement of ammonia by GLDH/GLOD method

Assay conditions (final concentrations): 7U/assay GLOD, 1.5U/assay GLDH; Reaction time: 15 min; Sample: 50 μ l (143 μ g/100 ml NH_3)

ケトグルタル酸, GLDH, GLOD 濃度との関係は Fig. 2~4 に示す. これより本測定法での条件設定は α -ケトグルタル酸 8 mM, GLDH 1.5 U/assay とし, 又 GLOD は Fig. 3 のように, 濃度が増すにつれて 340 nm での吸光度変化量は大きくなるが, GLOD 濃度と吸光度変化量から考えて 7~21 U/assay とした.

3.2 反応の経時変化, 検量線, 感度, 精度

Fig. 5 に, 最適条件下で測定した本反応の経時変化を示す. 硫酸アンモニウム水溶液の各濃度とも GLDH 添加後約 2 分程度の遅滞現象の後に 43, 277, 523 μ g/100 ml の試料は直線的に吸光度の減少が認められるが, 1075 μ g/100 ml の試料では基質不足のため 15 分以降は直線性が失われる. 又, ここでのブランク反応は試薬か

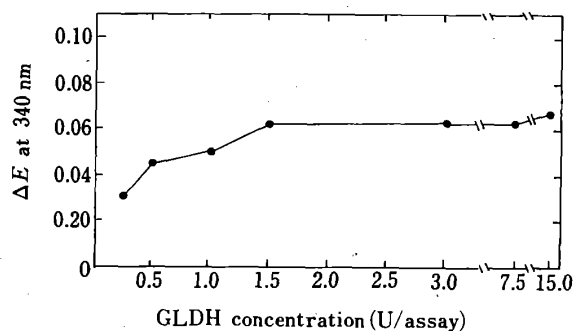


Fig. 3 Effect of GLDH concentration on the measurement of ammonia by the GLDH/GLOD method

Assay conditions (final concentrations): 8.0 mM α -ketoglutarate, 7U/assay GLOD; Reaction time: 15 min; Sample: 50 μ l (277 μ g/100 ml NH_3)

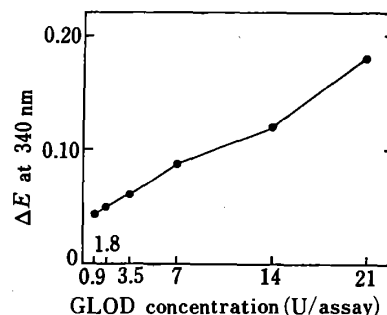


Fig. 4 Effect of GLOD concentration on the measurement of ammonia by the GLDH/GLOD method

Assay conditions (final concentrations): 8.0 mM α -ketoglutarate, 1.5U/assay GLDH; Reaction time: 15 min; Sample: 50 μ l (277 μ g/100 ml NH_3)

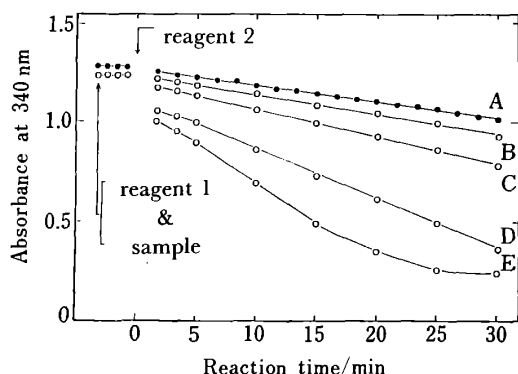


Fig. 5 Time course on the measurement of ammonia by the GLDH/GLOD method

Concentration of ammonia: A, blank; B, 43 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$; C, 277 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$; D, 523 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$; E, 1075 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Reagent 1: 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.3, 0.2 mM NADPH, 8.0 mM α -KG, 21 U/assay GLOD; Reagent 2: GLDH (1.5 U/assay)

ら試験値のことであり、主に使用した試薬中に存在するアンモニアに起因するものである。このため、測定に際しては常にこの試薬から試験液の吸光度変化量を各試料の変化量から差し引かなければならない。更に、Fig. 5に示すように 523 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 以上の試料では GLDH 添加後急速な吸光度の減少が認められるが、GLOD 21 U/assay の条件下では反応が急速に進み、GLDH を添加し混合している間でも高濃度のアンモニア試料の場合には吸光度変化が大きい。従ってこのような試料は希釈して測定する必要がある。

又、Fig. 6, 7 には各々 GLOD の濃度が 7 U/assay, 21 U/assay のときの検量線を示す。検量線は、本法の測定が NADPH の減少量をとらえる方法であるため、GLDH 添加後何分後の吸光度を読み取るかによって変化する。

Fig. 5 より本法の反応時間は GLDH 添加後 10~30 分間が適当と考えられるが、例えば GLOD 7 U/assay の濃度で GLDH 添加後 15 分間反応させた場合には、その直線域は 0~1000 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ 、感度は吸光度 0.001 当たり 4.0 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ となり、GLOD 21 U/assay の濃度で GLDH 添加後 30 分反応させた場合には、その直線域は 0~300 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ で感度は吸光度 0.001 当たり、1.7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ である。又、このときのサイクリング率は 2 cycle/min であった。更に、GLOD を加えないサイクリング反応なしの系と GLOD 21 U/assay の濃度を添加した場合の感度を比較すると、GLDH 添加後 10 分、15 分、30 分間反応させた場合では各々 4, 7, 13 倍と本法のほうが、高感度で測定が可能となる。

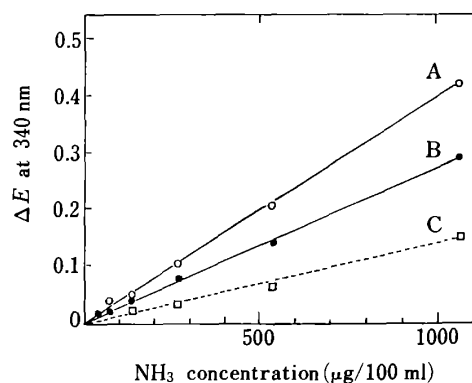


Fig. 6 Typical standard curve for ammonia with GLOD 7 U/assay

Reaction time: A, 30 min; B, 15 min; C, without GLOD; Sample: 50 μl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution as samples)

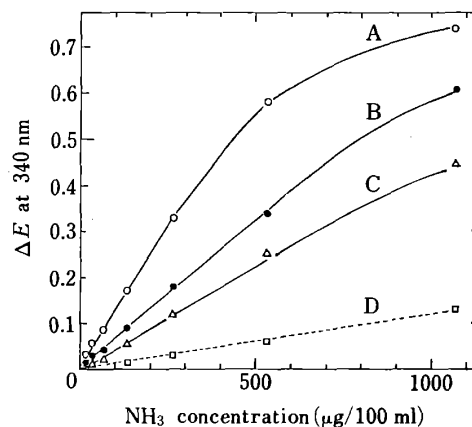


Fig. 7 Typical standard curve for ammonia with GLOD 21 U/assay

Reaction time: A, 30 min; B, 15 min; C, 10 min; D, without GLOD. Sample: 50 μl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution as samples)

又、同時再現性に関しては 141 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ と 24 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ の硫酸アンモニウム水溶液の 2 種類を用い、GLOD 21 U/assay で反応時間 15 分間の条件で 6 回同時測定を行った。その結果相対標準偏差は各々 2.36%, 11.1% であった。

3.3 妨害物質の影響

酵素的サイクリングを利用し物質を測定する方法では、用いる酵素の基質特異性が大きく反応系に影響する。

今回使用した *Streptomyces* sp. 由来の GLOD は、L-体に特異性をもっているため生体試料や特定の食品を試料

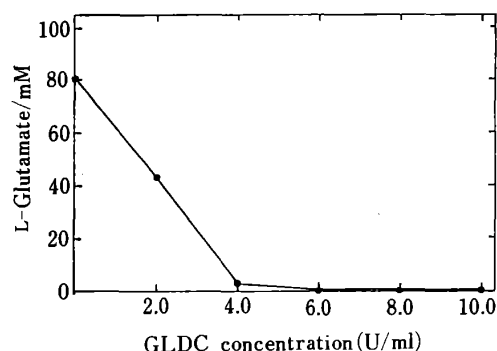


Fig. 8 Effect of GLDC for elimination of L-glutamate

Reaction time : 10 min; Temperature : 37°C

とする場合には問題となる場所である。このため、L-グルタミン酸の影響を回避する目的で本反応に先立って GLDC により L-グルタミン酸 $\rightarrow$ γ -アミノ酪酸 + CO_2 の反応を利用して L-グルタミン酸を消去した後、GLDC をアミノオキシ酢酸で阻害しサイクリング反応を開始する方法を考えた。Fig. 8 に、L-グルタミン酸濃度とそれを消去するのに必要な GLDC 濃度との関係を示す。この図より、80 mM L-グルタミン酸を GLDC 終濃度 6.0 U/ml で 37°C 10 分間で完全に消去できることが分かる。そしてこの GLDC を用いたサイクリング反応の分析系は以下ようになる。第一反応は、コハク酸緩衝液 (50 mM, pH 5.0) 0.9 ml に試料 50 μl , GLDC 溶液 (終濃度 6.0 U/ml) 50 μl を加え、10 分間 37°C で反応させた後に阻害剤であるアミノオキシ酢酸 (終濃度 1.6 μM) を 50 μl 加え、5 分間反応させ GLDC 反応を停止させる。次に、 α -KG (8 mM), NADPH (0.2 mM), GLOD (21 U/assay, いずれも終濃度) を含む 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) 1.62 ml を加えた後に GLDH (1.5 U/assay) 10 μl でサイクリング反応を開始する。

この際、GLDC 反応はアミノオキシ酢酸を添加せずとも次のサイクリング試薬中の 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) で pH が 5.0 から 8.3 に移行するため GLDC はほとんど L-グルタミン酸への作用を失うが、より完全にするために加えることにした。なお、アミノオキシ酢酸がサイクリング反応には何ら影響しないことは確認してある。実際にこの方法で 4 mM L-グルタミン酸水溶液を試料として消去能をみると、GLDH 添加後 15 分間の吸光度変化が 0.154 であり、L-グルタミン酸水溶液の代わりに H_2O を試料とした場合には 0.156

の変化量となり完全に消去されていることが確認できた。このほか、Kusakabe ら⁷⁾ は GLOD の基質特異性に関しては L-アスパラギン酸も反応すると報告している。このアミノ酸の本法への影響を調べたところ 5 mM の試料で 37 $\mu\text{g}/100$ ml のアンモニアに相当することが分かった。このほかのアミノ酸では、グルタミンも GLOD の基質になり 5 mM のグルタミンで 90 $\mu\text{g}/100$ ml のアンモニアに相当することを確認した。

生体試料、特に血しょうを試料とする場合にはアスパラギン酸、グルタミンは各々平均 0.013 mM, 0.63 mM 含まれているとされている⁸⁾。従って、これらが最大に存在するような場合、特に輸液などにより大量にアミノ酸を静注する場合には大きな正の誤差を与えることになる。

文 献

- 1) E. J. Conway, R. Byrne : *Biochem. J.*, **27**, 419 (1933).
- 2) D. Seligson, H. Seligson : *J. Lab. Clin. Med.*, **38**, 324 (1951).
- 3) S. G. Dienst : *J. Lab. Clin. Med.*, **58**, 149 (1961).
- 4) K. Konitzer, S. Voigt : *Clin. Chim. Acta*, **8**, 5 (1963).
- 5) 奥田拓道, 藤井節郎: 最新医学, **21**, 622(1966).
- 6) A. Mondzac, G. E. Ehrlich, J.E. Seegmiller : *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 526 (1965).
- 7) H. Kusakabe, Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kuninaka, H. Yoshino : *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **47**, 1323 (1983).
- 8) 日本生化学会編: “生化学データブック [I]”, p. 1548 (1979), (東京化学同人).

☆

An enzymatic cycling method for the determination of ammonia. YUZO KAYAMORI and Yoshiaki KATAYAMA (Clinical Laboratory, National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita-shi, Osaka 565)

An enzymatic cycling method for the determination of ammonia has been developed by using glutamate dehydrogenase (GLDH) and glutamate oxidase (GLOD). The measurement was carried out by observing the decrease in light absorbance of NADPH continuously at the wavelength of 340 nm. The sample volume necessary for one assay is only 50 μl . The calibration curve and the sensitivity were dependent on the reaction time. In the case of 1.5 U/assay for GLDH and 21 U/assay for GLOD with the reaction time of 30 min for example, there was linearity up to 300 $\mu\text{g}/100$ ml. Compared with the other method without any addition of GLOD, this method was 13 times more sensitive. Under the conditions of this method, a change of 0.001 in light absorbance was equivalent to an ammonia volume of 1.7 $\mu\text{g}/100$ ml, and the number of cycles was two per

minute. Since the GLOD used in this method is specific for L-glutamate, its application to this cycling method was carried out by inhibiting glutamate decarboxylase (GLDC) with aminooxyacetic acid after eliminating L-glutamate with GLDC, when any L-glutamate was suspected to exist in the samples. L-Glutamate at 80 mM could be eliminated by reacting with GLDC at 6.0 U/ml for 10 min at 37 °C. Due to the high substrate specificity of GLOD, this method is strongly affected by the presence of large amounts of L-aspartate and L-glutamine in

the samples.

(Received October 8, 1988)

Keyword phrases

enzymatic cycling method using glutamate dehydrogenase and glutamate oxidase; determination of ammonia; decrease in absorbance at 340 nm caused by oxidation of NADPH.
