The Japan Society for Analytical Chemistry

中空型固定化酵素リアクターを用いた血清中の尿素の測定

保田 健二®*, 高田 芳矩**

(1990年6月19日受理)

ウレアーゼを固定化した中空型酵素リアクターと,アンモニウムイオン選択性電極とを組み合わせて,血清中の尿素のフローインジェクション法による測定を行った.尿素2 mMから300 mMまでの範囲で測定でき,同時再現性については,相対標準偏差が尿素の標準溶液で0.65%,管理血清で1.19%であった.キャリヤー緩衝液のpH,流量,試料注入量,安定性などを検討し,pHは6.5,流量は1.0 ml min^{-1},試料注入量は20 μlとした.安定性を改良し,血清からの干渉を防ぐために,酵素ゲルの表面を酢酸セルロースで覆った.その結果,40日以上安定した性能を得ることができた.血清試料に本法を適用し,測定結果を比色法と比較したところ,良好な相関が見られた.

1 緒 言

血清中の尿素を迅速かつ正確に測定することは,肝臓やじん臓の機能を診断するうえで,極めて重要である.臨床検査における尿素の測定は,通常比色法[1]によって行うが,近年の酵素固定化技術の進歩により,固定化酵素カラムや固定化酵素膜をセンサーと組み合わせた測定法が多数報告されている[2)3)].アンモニウムイオンを測定するのにガス電極[4)~6)]又は,アンモニウムイオン電極[7)~9)]を用いた例や固定化担体としてゲル[7)],ビーズ[5)6)8)],中空キャピラリー[10)],膜[9)11)]を用いた例が知られている.著者らは既報[9)]で固定化ウレアーゼ膜をイオン選択性電極に直接接触させて尿素を測定する方法について報告したが,酵素膜がセンサーの感応膜上にかぶさっているため,応答が遅くなること,又膜に固定化できる酵素量が少ないため,酵素膜の寿命が短いことなどの問題点があった.そこで中空型酵素リアクターとイオン選択性電極とを接続することにより,上記問題点の解決を試みることにした.

本報告では,安価で化学的に安定なシリコンゴムチューブ内にウレアーゼを固定化した中空型酵素リアクターを作製し,ニュートラルキャピラリー型アンモニウムイオン選択性電極[8)]で迅速に検出を行う方法について検討した結果を述べる.

* (株)日立製作所中央研究所:185 東京都国分寺市東恋ヶ窪1-280
** 現在 (株)日立製作所那珂工場:312 茨城県勝田市市毛882

2 実 験

2・1 試 薬

ウレアーゼ(ナタマメ,17.2 U/mg,東洋紡製)を,精製せずにそのままで使用した.ウシ血清アルブミン(BSA)はSigma製Fraction Vを使用した.ノナクチンはSigma, 3-アミノプロピルトリエトキシシランはAldrich Chemicalのものを用いた.酢酸セルロースは和光純薬工業から,又シリコンゴムチューブは古江サイエンス社から購入した.その他の試薬はいずれも既報[9)]と同様に高純度なものを使用した.

2・2 キャリヤー緩衝液

20 mMリン酸一ナトリウム溶液と20 mMリン酸二ナトリウム溶液とを混合し,適当なpHに調節した.酵素活性の安定化のために1 mMのEDTA二ナトリウム塩を,又浸透圧を血清試料と同じにするため,200 mMのD-ソルビトールを加えた.

2・3 アンモニウムイオン及び尿素標準溶液

アンモニウムイオン標準溶液は,特級塩化アンモニウムをキャピラリー緩衝液に溶解し,適当な濃度に希釈して調製した.尿素標準溶液は,生化学用尿素粉末を乾熱器で乾燥後ひょう量し,キャリヤー緩衝液に溶解し,適当な濃度に希釈して調製した.

2・4 固定化ウレアーゼリアクターの調製

標準的に使用したリアクターの調製方法は次のとおり

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

である．内径 1 mm，外径 2 mm，長さ 2.0 m のシリコンゴムチューブを用意し，管内に洗剤を 2 時間循環させ，洗浄した後，脱イオン水で洗剤を洗い落し，これをドライヤーで乾燥した．次にチューブ内に 10%（重量%）の 3-アミノプロピルトリエトキシシランのメタノール溶液を満たした．そのまま 30 分間室温に放置した後，シラン溶液のはいったシリコンチューブを乾燥オーブンに入れ，90°C で 30 分間加熱し，アミノシラン化した．一方，ウレアーゼ 90 mg とウシ血清アルブミン（BSA）90 mg を 0.8 ml の 20 mM，pH 7.0 のリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し，氷水で冷し，これに 0.35 ml の 2.5% グルタルアルデヒド溶液を加え，よく混合した．直ちに，この混合溶液をアミノシラン化したシリコンチューブにペリスタポンプで吸い上げ，チューブ内に溶液が完全に詰まったところでポンプを停止した．そして，チューブを氷水に浸漬し，固定化速度を遅くした．シリコンチューブ内にはあらかじめ，外径 0.41 mm，長さ 1.0 m のステンレスチューブを入れておき，酵素混合溶液のチューブ内への導入を容易にした．このステンレスチューブをゲル化終了後引き抜くことにより，ウレアーゼチューブリアクターのゲル中央の流路を確保できるようにした．ステンレスチューブの長さは固定化後スムーズにチューブを引き抜くために，1.0 m と短くした．酵素の固定化は混合後 10～15 分で終了した．次に 1～2 ml のアセトンを 2 回ウレアーゼチューブリアクターに流し，ゲル層を脱水し，ゲルを収縮させた．これに約 2%（重量 %）の酢酸セルロースのアセトン溶液を，ペリスタポンプを使って数秒間 2 回流した．アセトンを蒸発させた後，シリコンチューブリアクターをコイル状に巻き，78 巻きで直径 9 mm のリアクターとし，試料注入バルブと電極の間に設置した．コイル状に巻くことにより，副次的な流れを起こし，変換効率を高めるようにした．

2・5 装置及び測定操作

測定装置の模式図を Fig. 1 に示す．電極及び増幅器は自作のものを使用し，レコーダーは日立 056 形を使用した．電極の感応膜は直線状の流れの方向に対して平行になるように設置した．流路系の接続には Tygon チューブを使用した．尿素の比色定量は日立製 400 形自動分析機によりウレアーゼ-インドフェノール法で行った．アンモニウムイオン選択性電極の作製方法は既報[9]のように，感応物質ノナクチンを含むポリ塩化ビニル膜をポリ塩化ビニル製の電極ボディーにはり付ける方法を採用した．本電極の，他のイオンに対する選択係数は，

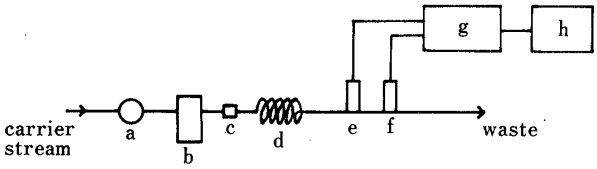

Fig. 1 Schematic diagram of measurement system

a : peristaltic pump; b : air damper; c : sample injection port; d : urease tubular reactor; e : NH_4^+ ion selective electrode; f : reference electrode; g : amplifier; h : strip chart recorder

Thanei-Wyss らの報告[8]に示されているものと同様で，K^+ は約 0.1，Na^+ は約 1×10^{-3} であった．

測定は試料注入バルブから試料をマイクロシリンジで導入し，電極からの出力を，銀-塩化銀参照電極を基準にして，レコーダーで記録して行った．測定は室温下（23°C）で行い，特に恒温槽を用いなかった．

2・6 血清試料

血清試料は健康な女性 20 名の採血血液を用いた．又市販の管理血清を回収率及び再現性の試験に用いた．

2・7 変換効率

リアクターによる尿素の変換効率を電極の出力記録上のピーク高さから評価した．すなわち，アンモニウムイオン標準溶液で作成したアンモニウムイオンの検量線を基にして，ウレアーゼリアクターで変換されて生じるアンモニウムイオン濃度を求めた．次に流路の中での試料中の尿素及びリアクターで変換を受けて生じたアンモニウムイオンの分散が，流路に試料注入バルブより導入したアンモニウムイオンとほぼ同じであると仮定して，尿素のウレアーゼリアクターによる見掛けの変換効率を下式から求めた．

$$CE=([NH_4^+]_{out}/[NH_4^+]_{cal})\times100$$

CE は見掛けの変換効率(%)，$[NH_4^+]_{out}$ は電極出力ピーク高さから求めたアンモニウムイオン濃度，$[NH_4^+]_{cal}$ は完全に尿素が分解して生じる計算上の生成アンモニウムイオン濃度である．

3 結果及び考察

3・1 pH の影響

キャリヤー緩衝液の pH がリアクターの性能に及ぼす影響を調べた．緩衝液の pH は 20 mM のリン酸二ナトリウム溶液と 20 mM のリン酸一ナトリウム溶液の混

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

合比を変えて調節した．結果を Fig. 2 に示す．pH 6.5 以上では出力，変換効率ともあまり大きな変化がなく，50 mM 尿素では pH 6.0 で最大であったが，10 mM 尿素の pH 依存性，及び変換効率の pH 依存性を見ると，pH 6.5 が最も高くなり，安定した測定には，これが最も適当であると考えられる．そこで pH 6.5 を選択し，実験を行うことにした．

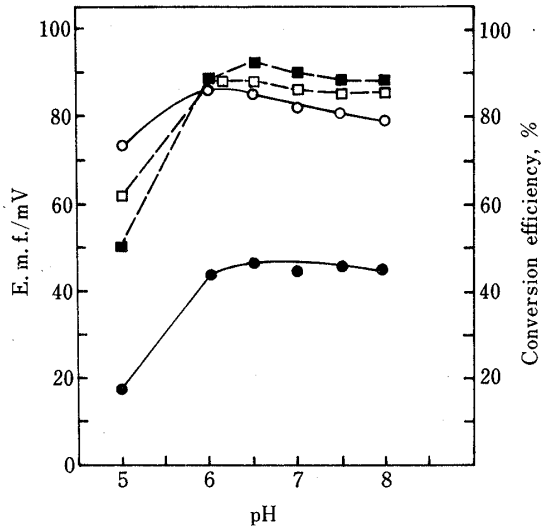

Fig. 2　Effect of pH on the response of urea and the conversion efficiency of urease reactor

Solid lines : e.m.f. output changes; Broken lines: conversion efficiency; Urea concentration : 10 mM (●, ■), 50 mM (○, □); Sample volume : 20 μl; Mean flow rate : 1.0 ml min^{-1}

3・2　流量の影響

キャリヤー緩衝液の流量を変化させたときの検量線への影響と変換効率への影響を Fig. 3 に示す．流量を大きくすると，流れの方向に沿った試料の分散が大きくなり，出力が低下し，検量線の直線性が低下した．又変換効率も低下した．しかし，この影響は酵素膜で電極を覆った場合に比較すると，小さかった．これは尿素のリアクター内に滞留する時間が，酵素膜の場合に比べて長いために，ウレアーゼによる変換効率が高くなると共に，流量の変化による分散の影響が小さくなったためと考えられる[12]．1.0 ml min^{-1} 以下の流量では出力ピークのベースラインへの復帰が非常に遅くなるので，測定には変換効率が高く，直線性の範囲が広い 1.0 ml min^{-1} の流量を採用した．

3・3　試料量の影響

流路に導入する試料量と電極出力との関係を調べた．結果を Fig. 4 に示す．試料量を 10 μl から 50 μl の範囲で変えたところ，試料量の増加と共に，電極出力も増加した．変換効率は試料量が 20 μl の場合が高く，約 90% であった．30 μl 以上導入すると，メモリー効果があり，ベースラインへの復帰が遅くなった．そこで測定に用いる試料量は 20 μl とした．

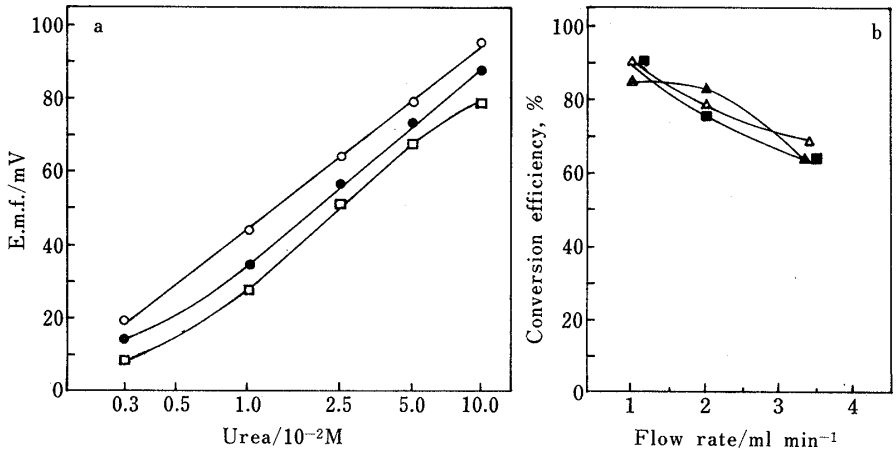

Fig. 3　Effect of flow rate of the carrier on peak height (a) and conversion efficiency (b)

(a) : 1.0 ml min^{-1} (○), 2.0 ml min^{-1} (●), 3.4 ml min^{-1} (□); (b) : 10 mM urea (■), 25 mM urea (△), 50 mM urea (▲); Sample volume : 20 μl; pH of the carrier : 6.5

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

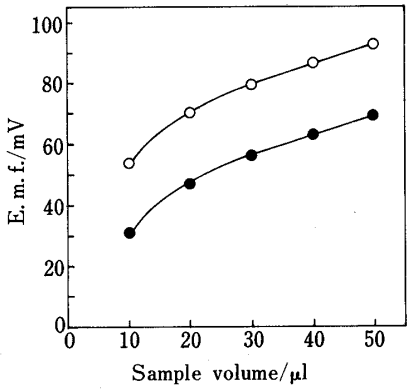

Fig. 4 Effect of sample volume on the output of the present system
Urea concentration : 10 mM (●), 25 mM (○)

Table 1 Standard conditions of the present method

Buffer carrier solution	20 mM Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 1 mM EDTA disodium salt 200 mM D-sorbitol† pH 6.5
Mean flow rate	1.0 ml min^{-1}
Sample volume	20 μl
Reactor tubing	1.0 mm i.d. 2.0 m length
Coil	78 turns 0.9 cm, diameter

† D-Sorbitol was added to balance the osmotic pressure of the carrier solution with that of sera.

3・4 検量線の作成

標準的な測定条件は Table 1 に示すとおりである．測定可能な範囲は 2.0～300 mM，直線性のよい範囲は 3.0～200 mM であり，既報[9]の酵素膜電極での直線性の範囲（3.6～107 mM）よりも広くなった．これは尿素のリアクター内滞留時間が酵素膜内の滞留時間よりも長くなったからと考えられる．血清中の尿素濃度は通常 3.6～5.4 mM であるので，本法を血清に適用することは可能である．同時繰り返し再現性を同一試料について調べた結果を，Table 2 に示す．尿素標準溶液で 0.65%，管理血清で 1.19% と良好であった．正確さについては，尿素標準溶液を凍結乾燥した管理血清に添加し，その回収率を調べた．結果は Table 3 に示すように，良好であった．測定に要する時間は試料の導入からピーク頂までの時間が約 30 秒であった．

Table 2 Reproducibility of the present method (n =10)

Sample	Average emf/mV	SD/mV	RSD, %
10 mM NH_4^+	26.0	0.19	0.72
25 mM urea	61.9	0.40	0.65
Control serum†	29.3	0.35	1.19

† Consera (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.)

Table 3 Results of recovery test

Control serum	Urea concentration†/mM			Recovery, %
	Total	Added	Recovered	
Consera	6.3	0	—	—
	9.2	3.0	2.9	96.7
	15.9	10.0	9.6	96.0
	30.0	25.0	24.7	98.8
Seronorm	8.7	0	—	—
	19.6	10.0	10.9	109
	3.9	0	—	—
Calibrate, Level 1	13.7	10.0	9.8	98.0

† Urea concentrations in control sera indicated by the manufacturers were as follows : Consera, 6.1 mM; Seronorm, 8.2～10 mM; Calibrate, Level 1, 3.2 mM. Control sera were obtained from Nissui Pharmaceutical Co. (Consera) and General Diagnostics (Seronorm and Calibrate, Level 1).

3・5 リアクターの安定性

固定化ウレアーゼリアクターの長期安定性を 50 mM の尿素標準溶液の変換効率で調べた結果を，Table 4 に示す．リアクターは随時使用し，使用しないときには，4°C で冷蔵して保存した．この使用期間中，リアクターは全血や血清などとしばしば接触したが，変換効率を 80% 以上に保持できた．酵素層を酢酸セルロース薄膜でコーティングしたため，長期間活性を保つことができたと考えられる．酢酸セルロースでコーティングしなかったリアクターでは，活性が 15 日間の使用及び保存で調製時に比べて 23% 低下したので，本法のコーティングが有効であることが明らかになった．

3・6 血清への適用

健常女性 20 名の血清の尿素を本法と比色法で測定した結果を，Table 5 に示す．血清中のアンモニウムイオンは微量なので出力に影響しなかった．一方，血清中の

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

Table 4　Long-term stability of urease reactor[a)]

	Elapsed time/d						
	0	5	7	21	27	35	48
Conversion efficiency (%)	91.5[b)]	84.0[c)]	80.2	85.9	84.0	86.0	83.0

a) the urea concentration used for the test was 50 mM. b) before cellulose coating. c) after cellulose coating.

Table 5　Determination of serum urea by two methods

Sample No.	Determined urea concentration/mM	
	Present method	Urease-indophenol method
1	7.9	7.5
2	6.4	6.4
3	4.2	4.3
4	5.3	5.4
5	4.1	4.3
6	5.1	5.4
7	3.6	3.9
8	4.3	4.6
9	4.2	4.6
10	3.9	4.3
11	5.7	5.7
12	4.9	5.0
13	4.4	4.6
14	3.2	3.2
15	3.9	3.9
16	6.3	6.1
17	2.4	2.1
18	4.9	5.0
19	6.0	6.1
20	4.9	5.0
	Y	X

Regression line $Y=-0.2742+1.0378X$

Correlation coefficient $r=0.986$

The values are the average of two determinations.

ナトリウムやカリウムイオンは，流れで希釈されても濃度がアンモニウムイオン濃度に比べて高いので，アンモニウムイオン選択性電極にバックグラウンド出力を与えたが，どの血清でもほぼ一定の値を示すので，これを血清によるバックグラウンド値として差し引いた後，尿素に基づくアンモニウムイオン濃度を求め，検量線から尿素濃度に換算した．両法による測定値の相関係数は $r=0.986$ であり，良い相関性を示した．

文　献

1) A. L. Chaney, E. P. Marbach: *Clin. Chem.*, **8**, 130 (1962).
2) P. W. Carr, L. D. Bowers: "*Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*", (1980), (J. Wiley & Sons, New York).
3) R. K. Kobos: "*Ion-Selective Electrodes in Analytical Chemistry, Vol.* 2", Edited by H. Freiser, pp. 1～84 (1980), (Plenum Press, New York).
4) G. G. Guilbault, M. Tarp: *Anal. Chim. Acta*, **73**, 355 (1974).
5) G. Johansson, L. Ögren: *Anal. Chim. Acta*, **84**, 23 (1976).
6) L. Gorton, L. Ögren: *Anal. Chim. Acta*, **130**, 45 (1981).
7) G. G. Guilbault, G. Nagy: *Anal. Chem.*, **45**, 417 (1973).
8) U. Thanei-Wyss, W. E. Morf, P. Lienemann, Z. Štefanac, I. Mostert, R. Dörig, R. E. Dohner, W. Simon: *Mikrochim. Acta* (Wien), **1983 III**, 135.
9) K. Yasuda, H. Miyagi, Y. Hamada, Y. Takata: *Analyst* (London), **109**, 61 (1984).
10) P. V. Sundaram, W. E. Hornby: *FEBS Lett.*, **10**, 325 (1970).
11) H. M. Abdulla, G. M. Greenway, A. E. Platt: *Analyst* (London), **114**, 1575 (1989).
12) W. E. Morf: *Mikrochim. Acta* (Wien), **1980 II**, 317.

☆

Determination of serum urea using an open-tubular immobilized enzyme reactor. Kenji Yasuda and Yoshinori Takata* (Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd., 1-280, Higashi-koigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo 185; *Present address: Naka Works, Hitachi, Ltd., 882, Ichige, Katsuta-shi, Ibaraki 312)

An open-tubular enzyme reactor and an ammonium ion selective electrode using nonactin were prepared and connected sequentially to determine serum urea by flow injection method. Urease was immobilized on the inner surface of aminosilanized silicone rubber tubing. The effects of sample size, pH value and flow rate of the carrier solution on the enzyme reactor were investigated. The following practical standard conditions for the measurement were decided; sample size: 20 μl, pH value: 6.5, and flow rate of the carrier solution: 1.0 ml min^{-1}. The calibration range for urea concentration was from 2.0 up to 300 mM. The relative standard deviations for 10 replicate measurements of a urea standard

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

and a control serum were 0.65% and 1.19%, respectively. Long-term stability of the urease reactor was improved by coating thin film of cellulose acetate over the whole immobilized enzyme layer. The measurement system was applied to serum samples from 20 healthy women. Good correlation between the present method and colorimetry was observed.

(Received June 19, 1990)

Keyword phrases

open-tubular immobilized urease reactor; ammonium ion selective electrode; FIA; serum urea determination.

NII-Electronic Library Service