

## ピルビン酸オキシダーゼを用いる血清中のピルビン酸の 化学発光定量法

上館民夫<sup>®</sup>, 奥山真人, 瀬川 規, 渡辺寛人\*

(1990年8月30日受理)

ピルビン酸とピルビン酸オキシダーゼとの酵素反応から生成する過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) をビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレートを用いる化学発光法 (CL) で測定し, ピルビン酸を定量する方法を開発した. 酵素反応及び CL 測定の条件を最適化し, その条件でのピルビン酸の定量域は  $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  M であり, 検出下限は  $3.5 \times 10^{-7}$  M であった. 本法の検出感度はロイコ色素を用いる酵素比色法と同程度であったが, 検量線の直線範囲は大幅に広がった. 又, CL 強度は 1 分以内に最大となり, 酵素比色法と比較してより迅速な分析が可能である. 相対標準偏差は 3.5% ( $n=5$ ,  $5.5 \times 10^{-5}$  M) であった. 又, 血清中のタンパク質が CL 強度を減少させることから除タンパク操作をすることにより, 本法を血清中のピルビン酸の定量に応用できることが明らかとなった.

### 1 緒 言

ピルビン酸は解糖系, アミノ酸系あるいは TCA 系の代謝において重要な代謝中間体であり, その血中濃度は糖やタンパク質の代謝障害の程度あるいは組織の酸素分圧の変動などを反映することから, これまでに種々の分析法が開発されてきた. 現在, ピルビン酸の定量には, 乳酸脱水素酵素を作用させて還元型ニコチンアミドアデニンジスクレオチド (NADH) の減少を比色法及び蛍光法で測定する方法, あるいはピルビン酸オキシダーゼとパーオキシダーゼを共役して用いて生成するキノン色素を比色法で測定する方法が広く用いられている<sup>1)~3)</sup>.

一方, 化学発光法及び生物発光法は, 検出能が高く, 又, 定量域が広いなどの利点を有することから, 生体中の微量物質の高感度分析法に数多く応用されている. これまで, ピルビン酸については生物発光法を応用した例が報告されている<sup>4)</sup>. しかし, 生物発光法はピルビン酸の定量下限が 0.5 pmol と高感度であるが, ピルビン酸を二段階の酵素反応で NADH に変換し, その後, 生成した NADH をバクテリア由来のルシフェラーゼを用いる生物発光により検出するために, 分析操作が複雑である.

そこで, 本報ではピルビン酸の定量に化学発光

(CL) 法を応用するため, ピルビン酸オキシダーゼを用いて過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を生成させ, その CL 測定にビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレート (TCPO) とペリレンを用いる方法について検討を行った. 更に本法をコントロール血清中のピルビン酸の測定に応用した.

### 2 実 験

#### 2.1 試 薬

ピルビン酸オキシダーゼは協和醗酵製を用いた. TCPO は東京化成工業製を用いた. 酵素比色法によるピルビン酸及び  $H_2O_2$  の定量には, ロイコ色素としてビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチル-アミノフェニル]アミンを用いる協和メデックス製デタミナー PA を使用した. コントロール血清は和光純薬工業製のコントロール血清 I ワコーを使用した. その他の試薬は市販特級品を使用し, 試薬の調製にはイオン交換水を用いた.

#### 2.2 装 置

CL の測定には自製の装置を使用した. 暗箱内にはガラス製キュベット (22 mm $\phi$ ×20 mm) を固定できる磁気かき混ぜ機を置き, キュベットの上部には CL を検出する光電子増倍管 (浜松ホトニクス製 R453 型) を取り付けた. 検出された CL は電流値に変換された後, 東亜電波工業製高感度直流電圧電流計 PM-18R 型を用

\* 北海道大学工学部: 060 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

いて測定した。CL 応答曲線は電流値の時間的変動として記録計に記録した。CL 試薬はオートインジェクターにより暗箱の外部からキュベットに注入した。

吸光度測定には日立製吸光光度計 U-2000 型を、又、pH 測定には東亜電波工業製 pH メーターを使用した。

### 2・3 測定方法

0.02 M リン酸緩衝溶液 (pH 6.8) で調製したピルビン酸オキシダーゼ (9U) 250  $\mu$ l とピルビン酸溶液 1 ml をキュベットに加えて、酵素反応を 38°C で 5 分間行った。その後、キュベットを CL 測定装置にセットし、かき混ぜ機でかき混ぜる。次に CL 試薬 100  $\mu$ l をキュベットに注入して CL 反応を開始し、CL 応答曲線を得た。CL 試薬はクロロホルムとヘキサンとの混合溶媒 (容量比=6:4) に、 $4.5 \times 10^{-2}$  M TCPO,  $1.2 \times 10^{-2}$  M ペリレン及び  $1.0 \times 10^{-3}$  M 水酸化セチルトリメチルアンモニウム (CTAOH) を溶解して調製した。なお、CL 応答曲線の最大のシグナルの電流値から、ピルビン酸あるいは  $H_2O_2$  を含まない溶液のシグナルの電流値 (ブランク強度) を差し引いた値を CL 強度とした。

## 3 結果及び考察

### 3・1 酵素反応の最適条件

ピルビン酸オキシダーゼとピルビン酸との酵素反応で生成する  $H_2O_2$  の測定からピルビン酸を定量する場合、酵素反応からより多く  $H_2O_2$  が産出されることが望ましい。そこで、 $H_2O_2$  の生成量に及ぼす反応時間、反応温度及び pH の影響を検討した。ピルビン酸オキシダーゼ (9U) 2.5 ml に  $3.4 \times 10^{-4}$  M ピルビン酸溶液 10 ml を加えて種々の条件で酵素反応を行い、生成する  $H_2O_2$  を酵素比色法<sup>3)</sup>で定量した。その結果、 $H_2O_2$  の生成量は pH 6~8 の範囲及び反応温度 35~40°C の範囲で最大となった。以上の条件で、ピルビン酸は反応開始 3 分後には  $H_2O_2$  にほぼ 100% 変換された。そこで、酵素反応は pH 6.8 (0.02 M リン酸緩衝溶液) 並びに反応温度 38°C で 5 分間行い、その後、生成した  $H_2O_2$  を CL 測定することにした。

### 3・2 CL 測定の最適条件の検討

酵素反応で生成した  $H_2O_2$  の最適 CL 測定条件を確立するため、 $H_2O_2$  標準溶液を用いて検討した。CL 反応の最適化は以下の操作で行った。0.02 M リン酸緩衝溶液 (pH 6.8) を用いて調製した  $1.0 \times 10^{-4}$  M  $H_2O_2$  溶液 1.25 ml をキュベットに入れ、次に、種々の条件で CL 試薬を 100  $\mu$ l 添加して CL 測定を行った。

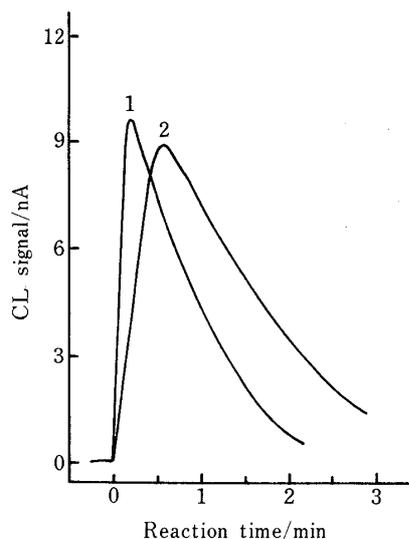
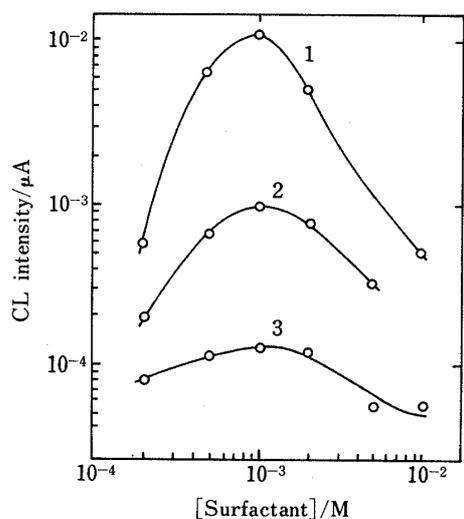


Fig. 1 Typical flash response of hydrogen peroxide (1) and pyruvic acid (2)

1:  $1.0 \times 10^{-4}$  M  $H_2O_2$ ; 2:  $1.0 \times 10^{-4}$  M pyruvic acid; Perylene:  $1.2 \times 10^{-2}$  M; TCPO:  $4.5 \times 10^{-2}$  M; CTAOH:  $1.0 \times 10^{-3}$  M

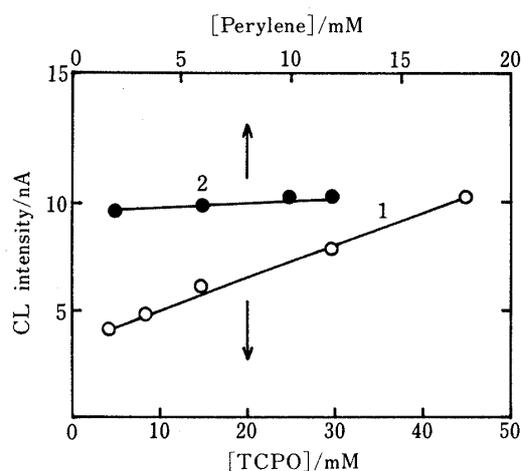
界面活性剤の種類と濃度の影響: TCPO 及び蛍光物質として用いるペリレンは水に難溶であることから、それらを  $H_2O_2$  溶液に可溶化するため、界面活性剤を含む有機溶媒に溶解した。その際、用いる界面活性剤の電荷タイプにより、CL 強度がどのように変化するか検討した。界面活性剤には陽イオン性の水酸化セチルトリメチルアンモニウム (CTAOH)、非イオン性のポリオキシエチレン (23) ドデカノール (Brij-35) 及び陰イオン性のドデシル硫酸ナトリウム (NaLS) を使用した。CTAOH を用いた場合の CL 応答曲線を Fig. 1 の曲線 1 に示す。CL シグナルは反応開始後、数秒で最大となり、その後、速やかに減少した。いずれの界面活性剤を用いた場合にも同様な CL 応答曲線が得られたが、用いる界面活性剤により CL 強度は変化した。そこで、CL 強度に対する界面活性剤の濃度の影響を検討した。結果を Fig. 2 に示す。陰イオン性、非イオン性並びに陽イオン性の界面活性剤の順に CL 強度が増大した。いずれの界面活性剤の場合にも、臨界ミセル濃度 ( $1.0 \times 10^{-3}$  M)<sup>3)</sup> 付近で CL 強度は最大となった。以上の結果より、界面活性剤には陽イオン性界面活性剤である CTAOH を  $1.0 \times 10^{-3}$  M で使用することにした。

クロロホルムとヘキサンの容量比の影響: クロロホルムとヘキサンの容量比を 3:7, 5:5, 6:4 及び 8:2 と変化した溶媒を用いて CL 試薬を調製し、CL 応答曲線



**Fig. 2** Variation in the chemiluminescence intensity with surfactant concentration

1: CTAOH; 2: Brij-35; 3: NaLS;  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $1.0 \times 10^{-4}$  M; Perylene:  $1.2 \times 10^{-2}$  M; TCPO:  $4.5 \times 10^{-2}$  M



**Fig. 3** Variation in chemiluminescence intensity with TCPO and perylene

1: TCPO;  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $1.0 \times 10^{-4}$  M; CTAOH:  $1.0 \times 10^{-3}$  M; Perylene:  $1.2 \times 10^{-2}$  M. 2: perylene;  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $1.0 \times 10^{-4}$  M; CTAOH:  $1.0 \times 10^{-3}$  M; TCPO:  $4.5 \times 10^{-2}$  M

を測定した。CL 強度はクロロホルムとヘキサンの容量比が 6:4 のときに最大となった。そのときの CL 強度を 100 とした場合、クロロホルムとヘキサンの容量比が 3:7, 5:5 及び 8:2 のときの相対 CL 強度はそれぞれ 10, 90 及び 95 であった。従って、クロロホルムとヘキサンの最適容量比は 6:4 とした。

TCPO 濃度の影響: TCPO 濃度を  $3.0 \times 10^{-3}$

$\sim 4.5 \times 10^{-2}$  M の範囲で変化させて、CL 強度を測定した。その結果、Fig. 3 の曲線 1 に示すように、CL 強度は TCPO 濃度が増大するに従って増大し、飽和濃度である  $4.5 \times 10^{-2}$  M で最大となった。従って、TCPO の最適濃度は  $4.5 \times 10^{-2}$  M とした。

ペリレン濃度の影響: ペリレン濃度を  $2.0 \times 10^{-3} \sim 1.2 \times 10^{-2}$  M の範囲で変化させて、CL 強度への影響を検討した。その結果、Fig. 3 の曲線 2 に示すように、ペリレン濃度による CL 強度への影響は見られなかった。そこで、ペリレン濃度は飽和濃度である  $1.2 \times 10^{-2}$  M とした。

CL 試薬の添加量の影響:  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液に CL 試薬を  $50 \sim 125 \mu\text{l}$  の範囲で添加して CL 強度への影響を検討した。その結果、CL 試薬の添加量が  $100 \mu\text{l}$  以上で CL 強度が一定となることから、CL 試薬の添加量は  $100 \mu\text{l}$  とした。

### 3.3 検量線

最適 CL 測定条件を用いて、 $1.0 \times 10^{-4}$  M ピルビン酸とピルビン酸オキシダーゼとの酵素反応から生成する  $\text{H}_2\text{O}_2$  の測定を行った。CL 応答曲線を Fig. 1 の曲線 2 に示す。CL 応答は反応開始後約 30 秒で最大となり、その後、しだいに減少した。 $\text{H}_2\text{O}_2$  の標準溶液から得られる CL 応答曲線と比較して、CL シグナルが最大に到達する時間が遅くなり、又、CL 強度は約 10% 減少した。この原因は、酵素が共存すると CL 反応速度が遅くなり、その結果、CL 強度が減少したものと思われる。

種々の濃度のピルビン酸溶液を用いて酵素反応を行い、検量線を作成した。検量線は、酵素比色法の検量線と比較するため、ピルビン酸の最終濃度を用いて作成した。Fig. 4 の曲線 1 に示すようにピルビン酸の最終濃度が  $7.4 \times 10^{-7} \sim 7.4 \times 10^{-3}$  M の範囲 (初濃度で  $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-2}$  M の範囲) で良好な直線性を示し、検出下限は  $3.5 \times 10^{-7}$  M であった。 $5.5 \times 10^{-5}$  M ピルビン酸の 5 回の繰り返し測定より得られた相対標準偏差は 3.5% であった。

現在、ピルビン酸の高感度定量法として、ピルビン酸とピルビン酸オキシダーゼとの酵素反応で生成する  $\text{H}_2\text{O}_2$  にロイコ色素とパーオキシダーゼを作用させ、ロイコ色素をキノン色素に変換し、比色法で測定する酵素比色法が広く用いられている<sup>3)</sup>。そこで、本法と酵素比色法の検出感度を比較するため、酵素比色法の検量線を作成した。結果を Fig. 4 の曲線 2 に示す。定量下限は本法と酵素比色法において同程度であったが、検量線の

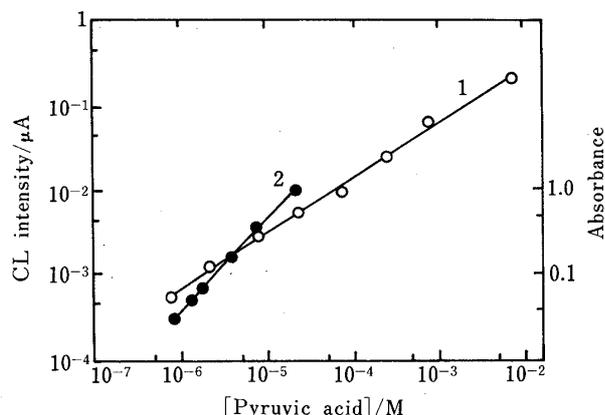


Fig. 4 Standard curve of pyruvic acid obtained by the present method (1) and the enzymatic colorimetric method (2)

直線性を示す濃度範囲は大幅に広がった。

### 3・4 コントロール血清中のピルビン酸の測定

コントロール血清にピルビン酸を標準添加して CL 測定を行った。その結果、得られた CL 強度は同濃度のピルビン酸標準溶液から得られる CL 強度の約 1/100 となった。CL 強度が減少する原因を明らかにするため、コントロール血清の構成成分をピルビン酸標準溶液に添加して CL 測定を行ったところ、アルブミンなどのタンパク質を添加した際に CL 強度が大幅に減少することが明らかとなった。そこで、除タンパク剤としてメタリン酸を用いて以下の検討を行った。5.5×10<sup>-6</sup> M のピルビン酸を標準添加したコントロール血清 1 ml に 5% メタリン酸溶液 3 ml を添加して混和後、3500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を 1 ml 分取した。この上清 1 ml に 0.02 M リン酸緩衝溶液と水酸化ナトリウム溶液を 2 ml 添加して溶液の pH を 6.8 に調整した。同様な操作を 5.5×10<sup>-6</sup> M ピルビン酸標準溶液についても行った。次にそれぞれの溶液から試料を 1 ml 分取し、測定方法に従って酵素反応並びに CL 測定を行

い、CL 強度の比較を行った。その結果、除タンパク操作を行った試料から得られた CL 強度はピルビン酸標準溶液の CL 強度の 97% の値となった。又、種々の濃度のピルビン酸をコントロール血清に標準添加して同様な操作を行い、ピルビン酸濃度と CL 強度の関係を求めたところ、両者の間に良好な直線関係が得られた。

以上、本法は生物発光法の検出感度には劣るが、分析操作はより簡便となった。現在、ピルビン酸の高感度定量法として広く用いられている酵素比色法と比較した場合、本法の定量感度は酵素比色法と同程度であったが、検量線の直線範囲は大幅に広がった。又、本法の CL 測定に要する時間は 1 分以内であるが、酵素比色法の発色反応においては吸光度が一定になるまでに要する時間は約 5 分であり、本法を用いることにより、より迅速な分析が可能となる。本法を血清中のピルビン酸の定量に応用する場合には、除タンパク液及び pH 調整液が加えられるため、ピルビン酸は除タンパク操作をしない場合と比較して 1/12 希釈される。そのため、定量下限は初濃度で 1.2×10<sup>-5</sup> M となるが、健康人のピルビン酸値の範囲は 31~62×10<sup>-3</sup> M であり<sup>6)</sup>、本法は十分に血清中のピルビン酸の定量に応用できるものと考えられる。

### 文 献

- 1) E. P. Marbach, M. H. Weil: *Clin. Chem.*, **13**, 315 (1967).
- 2) P. T. Hansen, O. S. Andersen: *J. Clin. Lab. Invest.*, **27**, 15 (1971).
- 3) 浅沼和子, 有賀利弥, 会田尚之, 宮坂朱美, 永井美彦, 宮川富三雄, 箕輪正和, 吉田光孝, 津田 満, 多々納俊雄: *生物試料分析*, **8**, No. 3, 16 (1985).
- 4) A. Agren, C. Berne, S. E. Brolin: *Anal. Biochem.*, **78**, 229 (1977).
- 5) W. L. Hinze, T. E. Riehl, H. N. Singh, Y. Baba: *Anal. Chem.*, **56**, 2180 (1984).
- 6) 北村元仕, 三輪史朗, 三輪谷俊夫, 狩野恭一, 江部充, 高橋正宜: “臨床検査マニュアル”, p. 205 (1988), (文光堂).

☆

**Chemiluminescent determination of pyruvic acid in serum using pyruvate oxidase.** Tamio KAMIDATE, Masato OKUYAMA, Tadashi SEGAWA and Hiroto WATANABE (Faculty of Engineering, Hokkaido University, Nishi 8, Kita 13, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060)

A chemiluminescence (CL) method was developed for the determination of pyruvic acid using enzymatic production of hydrogen peroxide from pyruvic acid. The oxidation of pyruvic acid was carried out with pyruvate oxidase at pH 6.8. Hydrogen peroxide

formed was subsequently determined with a mixed solution of bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate-perylene reagent containing a surfactant. The CL intensity depended upon the charge-type of surfactants. The best sensitivity was achieved using a cationic surfactant, hexadecyltrimethylammonium hydroxide. The calibration curve was linear in the range of  $1 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-2}$  M and the detection limit was  $3.5 \times 10^{-7}$  M for pyruvic acid. The relative standard deviation was 3.5% at  $5.5 \times 10^{-5}$  M of pyruvic acid. Determination of pyruvic acid in control serum was investigated. Proteins such as albumin caused a reduction of the CL intensity. The interference by proteins can be avoided by employing 5% metaphosphoric acid as the protein-precipitating reagent. The present method may be applicable for the determination of pyruvic acid in serum.

(Received August 30, 1990)

***Keyword phrases***

chemiluminescent determination of pyruvic acid; chemiluminescent determination of enzymatically generated hydrogen peroxide; pyruvic acid; bis(2,4,6-trichlorophenyl)-oxalate.

---