

総合論文*

臨床化学分析における新規な酸化及び還元発色試薬の開発

溝口 誠^{®**}, 石山 宗孝^{**}, 志賀 匡宣^{**}, 佐々本一美^{**}

The development of new type oxidative and reductive chromogenic reagents in clinical analysis

Makoto MIZOGUCHI, Munetaka ISHIYAMA, Masanobu SHIGA and Kazumi SASAMOTO^{**}^{**}Dojindo Laboratories, Kumamoto Techno Research Park,
2025-5, Tabaru, Mashiki-machi, Kamimashiki-gun, Kumamoto 861-22

(Received 20 September 1995)

Enzymatic methods for determining biogenic compounds are a key technology in quantification of various analytes of clinical interest in the biomatrix and have found wide application in clinical diagnosis due to their high selectivity and rapidity. The enzymes employed for this purpose are primarily oxidases and dehydrogenases. Upon reacting with target compounds, these enzymes produce hydrogen peroxide or NAD(P)H, amounts of which are then determined by using oxidative or reductive chromogenic reagents, respectively. In chromogenic reagents, the following properties are desirable: 1) a long absorption wavelength, 2) strong resistance to interferences caused by various compounds (such as bilirubin) in the biomatrix, 3) stability of the stock solutions for long-term storage, 4) stability of the resulting dye, and 5) high water solubility. There have been no conventional reagents so far that meet all of these criteria. In the effort to develop such a compound, we recently synthesized the following new reagents for colorimetric enzymatic determination. A series of oxidative chromogenic reagents, Bis-MAPS, do not require any coupling reagents in the peroxidase-mediated oxidation reaction producing dyes that absorb at ~ 650 nm with a large molar absorptivity. New coupling reagents, NCP, give a green color upon reaction with the aniline derivatives known as Trinder's reagents. Hydrogen donors, DADB, were found not to suffer from interference by bilirubin. As a reductive chromogen for use in clinical diagnosis like LDH analysis, we have developed a novel tetrazolium salt, WST-1, that produces a highly water soluble formazan dye. WST-1 proved to be also valuable as a chromogenic indicator in cell proliferation assays where MTT is used most widely.

Keywords : chromogen; hydrogen donor; bilirubin; coupler; tetrazolium salt.

1 緒 言

臨床検査が病気の診断や治療効果の判断に不可欠な手

段であることは今さら言うまでもない。この臨床検査の中の、人の体液や組織中の成分(酵素を含む)分析を臨床化学検査といい、診断のために行われる検査件数の大部分を占めている。臨床化学検査では、測定対象成分の量を色素量として検出定量する方法があり、この方法に用いる試薬を発色試薬と呼んでいる。

* 関東支部創立 40 周年記念

^{**} (株)同仁化学研究所: 861-22 熊本県上益城郡益城町
田原 2025-5 熊本テクノリサーチパーク

発色試薬のなかで、無機質分析にはキレート性比色分析試薬の生成による発色を測定するもの、例えば *o*-クレゾールフタレインコンプレキソンによるカルシウムイオンの分析¹⁾や、バソフェナントロリン、ニトロソPSAPによる血清鉄の測定があり、タンパク分析にはプロモクレゾールグリーン、ヒドロキシアゾ-2-安息香酸などの色素が用いられているが、その他の分析法は、ほとんどが酵素反応を利用する測定法に変遷した。従って、現在の臨床化学検査はこの酵素的測定法を利用し、自動化とともに、ここ数十年の間に急速に進歩発展し、臨床診断や、それに基づく治療に大きく貢献している。

2 酵素的測定法について

2・1 酵素的測定法の特徴²⁾

酵素的測定法の利点としては、

- 1) 酵素の基質特異性を利用して、多成分系である生体試料中の目的成分を除タンパクや溶媒抽出などの

煩雑な前処理なしに測定することができる。

- 2) 反応を穏和な条件で行うことができる。又、用いる試料を微量化できる。
- 3) 試薬の使用が少なくなるので、環境汚染を少なくすることができる。

などの諸点を挙げるることができる。

又、酵素的測定法によって生体成分を測定する場合、そこに利用される酵素反応は単独で組み立てられることは少なく、ほとんどが複数の酵素を組み立てて構築される。目的成分に直接反応する酵素を初発酵素と呼び、その種類は酸化酵素、脱水素酵素、加水分解酵素、リン酸化酵素などがある。そして反応の結果、検出に用いられる酵素を指示酵素と呼び、ペルオキシダーゼ (POD)、脱水素酵素 (デヒドロゲナーゼ-DH) が主流を占めている。脱水素酵素は初発酵素であるとともに指示酵素の場合もある。

Table 1 Enzymatic determination of various compounds of clinical interest in biomatrix

Compound	Enzymatic system	Detection signal
Glucose	Glucose oxidase-POD	H ₂ O ₂
	Hexokinase(glucokinase)-glucose-6-phosphate dehydrogenase	NADPH
	Glucose dehydrogenase	NADH
Lactate	Lactate dehydrogenase	NADH
	Lactate oxidase-POD	H ₂ O ₂
Pyruvate	Lactate dehydrogenase	NADH ↓
	Pyruvate oxidase-POD	H ₂ O ₂
NH ₃	Glutamate dehydrogenase	NADH ↓
Urea	Urease-glutamate dehydrogenase	NADH ↓
Urate	Uricase-POD	H ₂ O ₂
	Uricase-catalase-formaldehyde dehydrogenase	NADH
Creatinine	Creatinine deiminase-glutamate dehydrogenase	NADH ↓
	Creatininase-creatinase-superoxide dismutase-POD	H ₂ O ₂
	Creatininase-creatinase-superoxide dismutase-formaldehyde dehydrogenase	NADH
	Creatininase-creatinase-kinase-pyruvate kinase-lactate dehydrogenase	NADH ↓
Polyamine	Acetylpolyamine amidohydrolase-putresine oxidase-POD	H ₂ O ₂
	Polyamine oxidase-POD	H ₂ O ₂
Cholesterol	Cholesterol oxidase-POD	H ₂ O ₂
	Cholesterol dehydrogenase	NADH
Triglyceride	Lipoprotein lipase-glycerol kinase-glycerol-3-phosphate oxidase	H ₂ O ₂
	Lipoprotein lipase-glycerol kinase-pyruvate kinase-lactate dehydrogenase	NADH ↓
Phospholipase	Phospholipase D-POD	H ₂ O ₂
Fatty acid	Acyl CoA synthetase-acyl CoA oxidase-POD	H ₂ O ₂
Phosphorous	Purine nucleotide phosphorylase-xanthine oxidase-POD	H ₂ O ₂
	Sucrose phosphorylase-phosphoglucosemutase-glucose-6-phosphate dehydrogenase	NADPH
Mg	Hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase	NADPH
	Glycerol kinase-glycerol-3-phosphate oxidase-POD	H ₂ O ₂
Bilirubin	Bilirubin oxidase-POD	H ₂ O ₂
Bile acid	3 α -Steroid dehydrogenase	NADH

2.2 日常検査に利用されている酵素的測定法

初発酵素と指示酵素を組み合わせる構成された各種生体成分の酵素的測定法を Table 1 に示した。

Table 1 から分かるように, 系中に含まれる測定物質の量は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) か過酸化水素 (H_2O_2) 量として検出される。NADH はそれ自体の 340 nm での吸光度変化量として, 又テトラゾリウム塩による還元発色反応によって検出されるが, オキシダーゼ系の酵素を作用させて生じる H_2O_2 を検出するには, 酸化発色試薬が用いられる。

3 酸化系発色基質

3.1 酸化系発色基質開発の背景と問題点

酵素を用いる酸化発色反応は, 1956 年 Keston³⁾, Teller⁴⁾ のグルコースオキシダーゼ (GOD) によるグルコースの測定法に端を発している (Fig. 1)。

この方法はそれまでの化学的方法に比べて反応条件が穏和であり, 除タンパクなどの前処理が不要な画期的な方法であった。しかし, この方法が普及するにつれて発

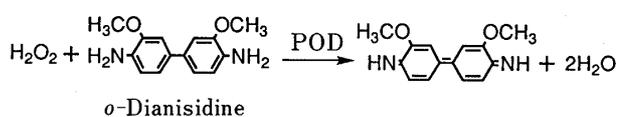
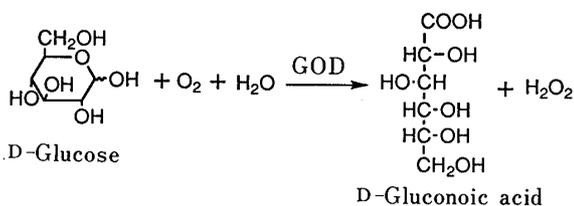


Fig. 1 Reaction scheme for D-glucose quantitation

Table 2 New Trinder's reagents

Compound	Abbr.	R ¹	R ²	R ³	λ_{max} / nm	ϵ / $\times 10^4$
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -sulfopropyl- <i>m</i> -anisidine	ADPS	C ₂ H ₅	OCH ₃	H	540	2.79
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -sulfopropylaniline	ALPS	C ₂ H ₅	H	H	561	4.13
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -sulfopropyl-3,5-dimethoxyaniline	DAPS	C ₂ H ₅	OCH ₃	OCH ₃	590	1.77
<i>N</i> -sulfopropyl-3,5-dimethoxyaniline	HDAPS	H	OCH ₃	OCH ₃	580	1.73
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -sulfopropyl-3,5-dimethylaniline	MAPS	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	628	2.28
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -sulfopropyl- <i>m</i> -toluidine	TOPS	C ₂ H ₅	CH ₃	H	550	3.74
<i>N</i> -sulfopropylaniline	HALPS	H	H	H	554	3.10
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)- <i>m</i> -anisidine	ADOS	C ₂ H ₅	OCH ₃	H	542	2.72
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)aniline	ALOS	C ₂ H ₅	H	H	565	5.02
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline	DAOS	C ₂ H ₅	OCH ₃	OCH ₃	593	1.75
<i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline	HDAOS	H	OCH ₃	OCH ₃	583	1.73
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethylaniline	MAOS	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	630	2.25
<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -(2-hydroxy-3-sulfopropyl)- <i>m</i> -toluidine	TOOS	C ₂ H ₅	CH ₃	H	555	3.92

色試薬の問題点が指摘されるようになった。

- 1) 発がん性であるベンジジン系である。
- 2) 空気や光による酸化を受けやすく、用時調製の必要がある。
- 3) 水溶性に乏しい。

このような欠点を克服するため、1969年、Trinder⁵⁾⁶⁾は GOD-POD の酵素系を用いるグルコースの定量に際しフェノールと 4-アミノアンチピリン (4-AA) を用い、POD-H₂O₂ の酸化によって両者を酸化的にカップリングさせ、形成された色素の吸光度を測定するという方法を開発した。この 4-AA をカプラーに用いる方法はトリンダー法とも呼ばれ、臨床化学分析の重要な手法になっている。その後、水素供与体としてフェノールの代わりにアニリン誘導体が用いられるようになり、更に水溶性、波長特性が向上したトリンダー試薬が開発された^{7)~12)}。それら新トリンダー試薬を Table 2 に示す。

しかし、一層臨床化学分析が普及していくにつれて、新たな問題が出てきた。試験項目が増加するにつれて自動化が進み、省力化、高感度化が要求されてきたことに伴うものである。

- 1) 感度不足
- 2) 測定に用いられる 500~600 nm の波長では溶血や乳びによる誤差が出る。
- 3) ビリルビンなど生体内に存在する、還元物質の影響を受ける。

上記の問題点をすべて改善できた試薬は今のところ開発されていない。これらの問題点を克服するため、新規な酸化発色試薬の合成を行い、有効な化合物を見いだした。

3・2 Bis[4-(*N*-alkyl-*N*-sulfopropyl)amino-2,6-dimethylphenyl]methane (Bis-MAPS) 誘導体¹³⁾

高感度化、長波長化を目的として、吸収極大波長を 600 nm 以上に持ち、H₂O₂ 換算のモル吸光係数が、40000 以上の色素を生成する基質を目標に各種化合物の合成、評価を行った。その結果、メタンベース誘導体が有効であることが分かった。それは Fig. 2 のようなジアミノジフェニルメタン系の化合物で、アニリン誘導体を酸触媒下、ホルムアルデヒドと縮合させ、容易に得ることができる¹⁴⁾¹⁵⁾。

ジアミノジフェニルメタン系化合物はカプラーを必要とせず、POD/H₂O₂ で酸化されて、キノニンイミン型の色素を形成する。

しかし、Bis-ALPS (R¹=R²=H) などのジアミノジフェニルメタン化合物は溶液状態での安定性に問題がある

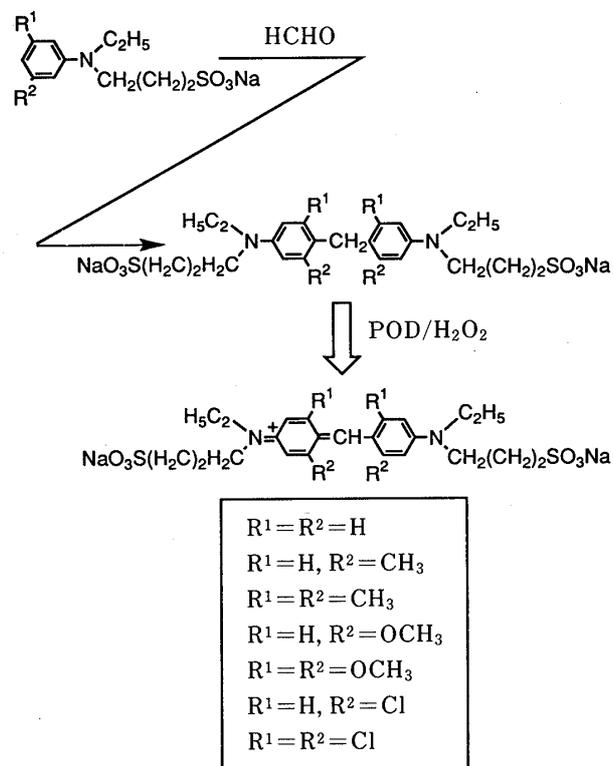


Fig. 2 Synthesis of diaminodiphenylmethane derivatives and the oxidative reaction

ことが分かった。発色試薬は溶存酸素、光、金属等の存在によって酸化を受け、発色することが多く、安定性を向上させるためには酸化を受けにくい構造とする必要がある。現在よく使われているトリンダー法が、カプラーを用いる 2 試薬系であることは、この試薬安定性の問題を軽減するための手段でもある。そこで反応性を保持し、溶存酸素による酸化を防ぐため活性メチレン部分の近傍に置換基を導入することで、安定化を図ることとし、R¹, R² の部分に置換基を導入した化合物を合成し、評価をした。当然、この位置への置換基の導入は、酸化電位に大きく影響を与え、置換基の立体障害によって、酸化反応に直接影響を与えることが考えられる。

その結果、各種誘導体のうち、R¹, R² 両方にメチル基を導入した場合のみ、試薬安定性が向上し、R¹, R² のいずれかのみにメトキシ基を導入した場合は反対に安定性を下げ、ハロゲンを導入すると発色感度を下げる、という結果を与えた。Fig. 3 に R¹, R² にメチル基を導入した Bis-MAPS C2, C3, C4 の構造を示す。

又、Fig. 4 に酸化発色時の吸収スペクトルを従来のトリンダー試薬と比較した。

Bis-MAPS C2, C3, C4 のいずれも 650 nm 付近の吸

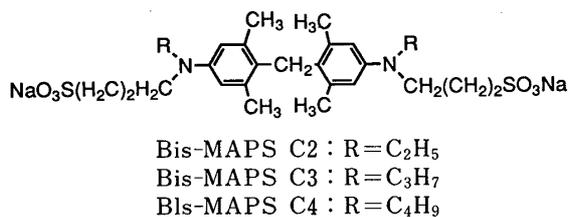


Fig. 3 Bis-MAPS derivatives

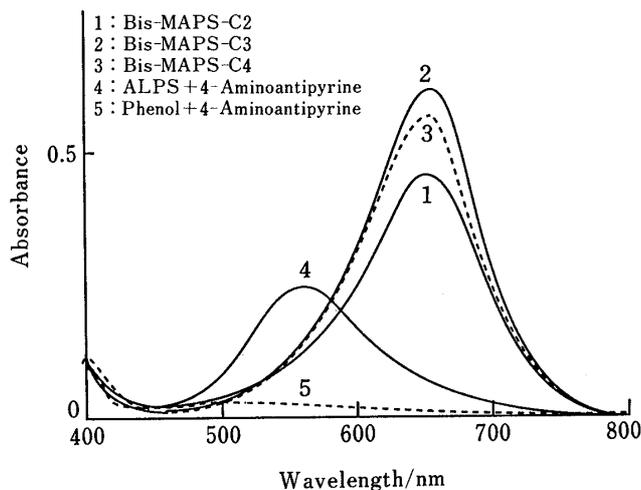


Fig. 4 Absorption spectra of Bis-MAPS derivatives in the oxidative condensation reactions

収極大波長を持ち, ALPS-4AA の 2 ないし 3 倍の感度, 又 phenol-4AA と比較すると約 15 倍の感度を持つことが分かる. この Bis-MAPS を用いて過酸化水素量を測定すると, 良い直線性が得られ, 最低 0.1 μM レベルまで検出可能であることが分かる (Fig. 5).

Table 3 に Bis-MAPS の試薬安定性のデータを示す. 臨床化学分析においては, 試薬は自動分析機器中で溶液状態に置かれるため, その間試薬空試験値が上昇してはならない. Table 3 は基質の緩衝溶液を, 室温中で光, 空気に暴露して, 試薬空試験値の上昇を見たものであるが, いずれの基質も 60 日暴露後の変化はほとんどなく, 溶液中の溶存酸素や, 紫外線の影響を受けないことが分かる. 従って, 現在各臨床検査薬メーカーで進められている試薬の液状化へも対応できる.

GOD を用いてグルコースを測定した結果を Fig. 6 に示す. 試薬による GOD への阻害もなく, 0.1 mg/dl レベルの検出が可能である. 又, ヒト血清を 100 分の 1 に希釈し添加した添加検量線も示した.

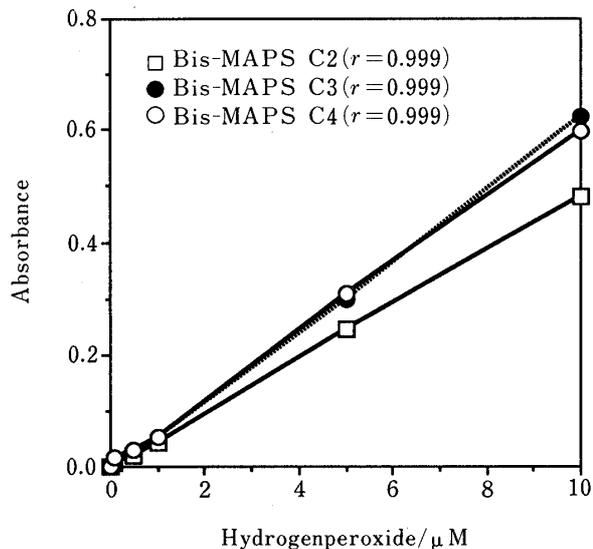


Fig. 5 Standard curves of Bis-MAPS derivatives for hydrogen peroxide at pH 5.5

A mixture of 30 μl of Bis-MAPS derivatives solution (10 mM), 30 μl of POD solution (3.3×10^3 U/ml) and 30 μl of hydrogen peroxide solution (0.01~1 mM), was diluted to 3.0 ml with 50 mM MES buffer solution (pH 5.5). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank. (□): Bis-MAPS C2; (●): Bis-MAPS C3; (○) Bis-MAPS C4

Table 3 Stability of Bis-MAPS derivatives

Reagent	Variation of absorbance during 60 days (ΔA)	Wavelength
Bis-MAPS C2	0.001	647 nm
Bis-MAPS C3	0.015	649 nm
Bis-MAPS C4	0.019	651 nm

Bis-MAPS derivatives were dissolved in 50 mM MES buffer solutions (pH 5.5) at a concentration of 100 μM . They were stored at 25°C for 60 days; the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank.

3.3 ビリルビンの影響が少ない酸化発色試薬

酸化発色系に対する生体サンプル中の干渉物質としては, アスコルビン酸, ビリルビンが挙げられる. これらの干渉作用は主に還元活性によるものとされている. アスコルビン酸については, 系中にアスコルビン酸オキシダーゼ等を添加してアスコルビン酸を消去し, 干渉を防

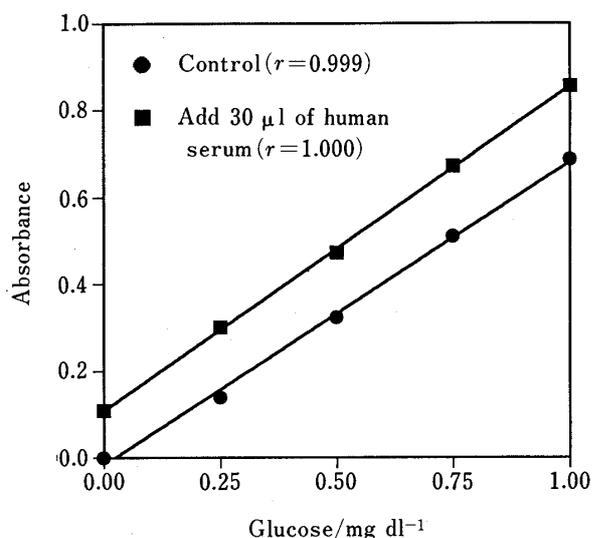


Fig. 6 Standard curve of Bis-MAPS derivatives for glucose at pH 6.0

A mixture of 30 μl of Bis-MAPS C2 solution (10 mM), 30 μl of POD solution (3.3×10^3 U/ml), 30 μl of GOD solution (3.3×10^3 U/ml), and 30 μl of glucose solution (20 mg / dl ~ 100 mg/dl), was diluted to 3.0 ml with 50 mM MES buffer solution (pH 6.0). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank.

●: control; ■: add 30 μl of human serum

いでいるが、ビリルビンに関しては、今のところ有効なものがなく、使用する試薬の処方に依存するところが大きい¹⁶⁾¹⁷⁾。すなわち、既存の水素供与体をビリルビンの存在する系で 4-AA と反応させ、その干渉が最も少ない組み合わせを選択したり、4-AA を過剰に添加して干渉を回避しているのが現状である。又、ビリルビンに対して酸化活性を持つフェロシアン化カリウムなどが用いられることもあるが、完全にビリルビンの影響を消去するに至っていない¹⁸⁾¹⁹⁾。微量分析の要求が高まっている中、ビリルビンの影響をいかに回避するかは臨床検査薬メーカーの大きな課題の一つである。前述のビリルビンの酸化反応に及ぼす干渉作用のメカニズムはまだ明確には解明されていないが、酸化発色後の色素がビリルビンからプロトンを受け取り、色素はロイコ体に、ビリルビンはビルベリジンに変わるという一つの経路が考えられる²⁰⁾。そこでビリルビンの干渉作用に対する置換基効果を調べるため、Fig. 7 に示す化合物を合成した。各化合物に及ぼすビリルビンの影響を Table 4 に示す。

その結果、芳香環の置換基としては、メトキシ基が最

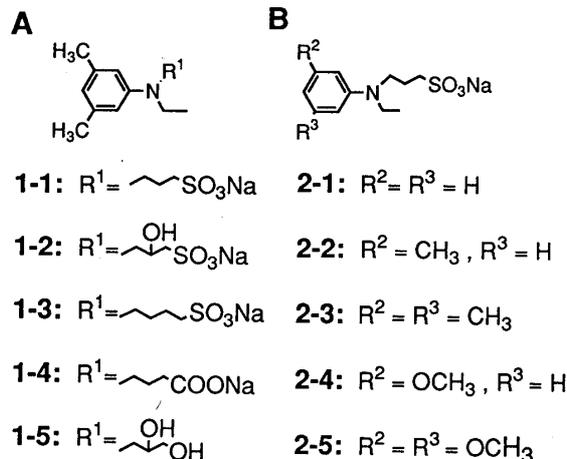


Fig. 7 Derivatives of hydrogen donor

Table 4 Interference of bilirubin with the oxidative condensation at pH 7.0 of various Trinder's reagents

Compound	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	Bil -	Bil +	Ratio of bilirubin interference (Bil - / Bil + X 100)
1-1	628	0.208	0.158	76.0
1-2	630	0.205	0.148	72.2
1-3	626	0.194	0.160	82.5
1-4	621	0.191	0.140	73.3
1-5	630	0.173	0.129	74.6
2-1 (ALPS)	561	0.317	0.250	78.9
2-2 (TOPS)	555	0.452	0.337	74.6
2-3 (MAPS)	628	0.208	0.158	76.0
2-4 (ADPS)	540	0.292	0.202	69.2
2-5 (DAPS)	590	0.205	0.183	89.3

A mixture of 30 μl of hydrogen donor solution (10 mM), 30 μl of POD solution (3.3×10^3 U/ml), 30 μl of 4-AA solution (10 mM) and 30 μl of hydrogen peroxide solution (2 mM), was diluted to 3.0 ml with 50 mM HEPES buffer solution (pH 7.0). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank.

Bil - : control; Bil + : add 5 μl of bilirubin solution (220 mg/dl)

も効果的で、又 N 置換の水溶性基としては、ブチルスルホン酸が有効であるということが分かる。これらのことを総括して DADB (Fig. 8) のような化合物を今回新たに合成してビリルビン存在下、酸化発色反応を行わせ、同条件でビリルビンの影響を調べた。その結果を

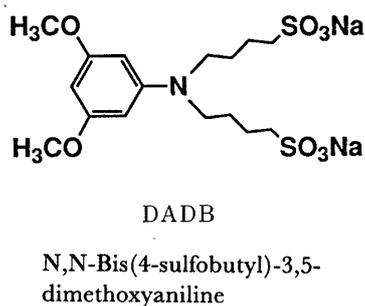


Fig. 8 Structure of DADB

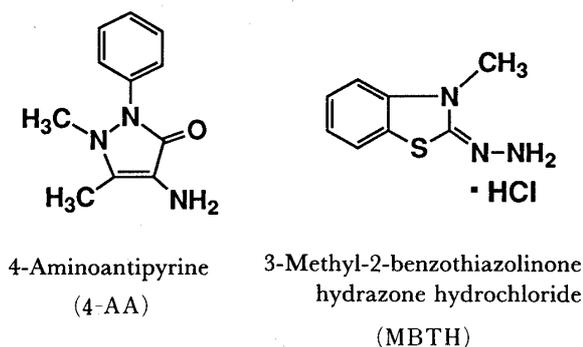


Fig. 9 Conventional couplers in Trinder's method

Table 5 Interference of bilirubin with the oxidative condensation at pH 7.0 of DADB

λ_{\max}/nm	Bil-	Bil+	Ratio of bilirubin interference (Bil- / Bil+ X100)
592.0	0.201	0.195	97.0

A mixture of 30 μl of DADB solution (10 mM), 30 μl of POD solution (3.3×10^3 U/ml), 30 μl of 4-AA solution (10 mM) and 30 μl of hydrogen peroxide solution (2 mM), was diluted to 3.0 ml with 50 mM HEPES buffer solution (pH 7.0). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank.

Bil-: control; Bil+: add 5 μl of bilirubin solution (220 mg/dl)

Table 5 に示す。

DADB と Table 2 に示したトリンダー試薬を比較すると、吸収極大波長も 600 nm 付近とはん用の自動分析機器のフィルター波長に適合し、ビリルビンの干渉作用が抑制されていることが分かる。これらは、二つのメトキシ基の立体的及び電気的效果によるもの、あるいはスルホン酸の導入による、親水性の向上に伴う効果が考えられるが、この作用については明らかではない。今後は更に誘導体を合成し、その立体的見地、電位的な見地から解明していきたい。

又、ビリルビンの影響を化合物の置換基効果などによって防ぐ方法だけではなく、酸化発色系に影響を及ぼすことなしに、ビリルビンを化学的に分解する方法が要求される。

4 新規カプラーの開発

前述したように、現在広く臨床化学分析で使われているトリンダー法での、水素供与体はアニリン、又はフェノール誘導体が多い。カプラーについても、幾つか紹介

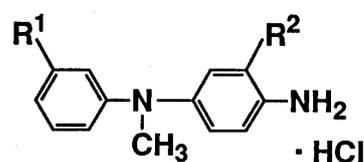


Fig. 10 New couplers in Trinder's method

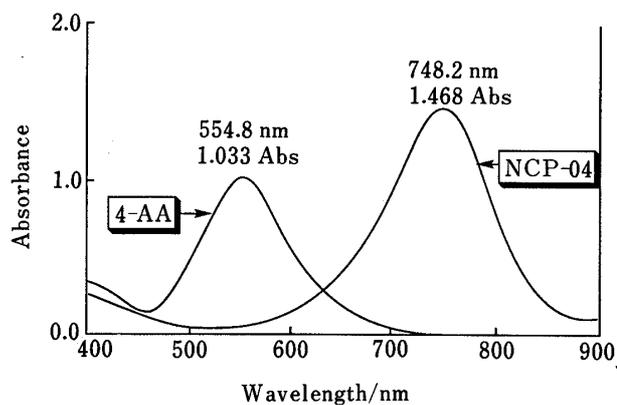


Fig. 11 Absorption spectra of TOOS with NCP-04 in the oxidative condensation at pH 7.0

されているが水素供与体の数に比べるとその種類は少ない^{21)~25)}。それはカプラーになり得る基本構造がまだ明確にされておらず、単にアミノ基を持っていればよいというものでもないことに起因する。Fig. 9 に現在紹介されているカプラーを示すが、ほとんど 4-AA を用いているのが現状である。

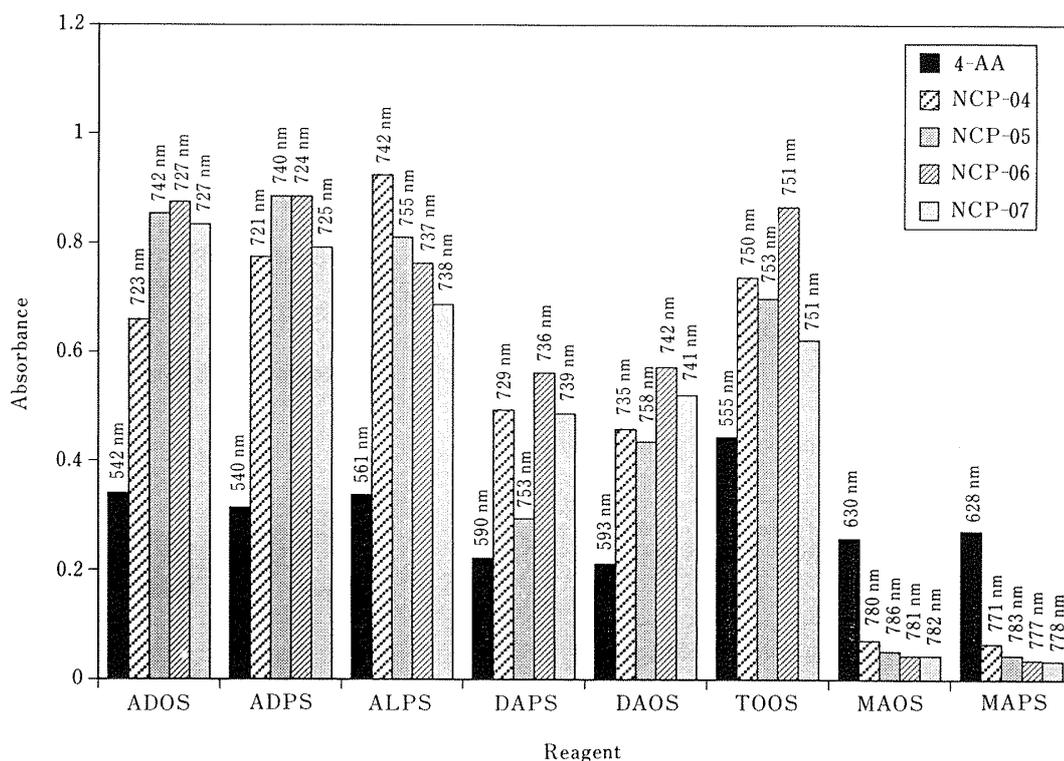


Fig. 12 Comparison of the sensitivity of NCP derivatives with new Trinder's reagents. A mixture of 30 μ l of Trinder's reagents solution (10 mM), 30 μ l of POD solution (3.3×10^3 U/ml), 30 μ M of NCP derivatives and 30 μ l of hydrogenperoxide solution (2 mM), was diluted to 3.0 ml with 50 mM HEPES buffer solution (pH 7.0). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank.

その理由としては、4-AA は溶液状態での保存安定性が高いのに対し、MBTH は試薬安定性が悪く、溶液状態では空気酸化により着色するため保存に耐えないことにある²⁵⁾。しかし、カプラーを4-AA に固定してしまうと、発色色素の吸収極大波長、モル吸光係数に限界を生じる。又、生体内の還元物質の影響も完全に除くことはできない。従って、現在抱えている問題点を解決するには、カプラーの開発によるアプローチも重要になってくる。

カプラーになり得る構造を持った化合物を合成し、従来の水素供与体とカップリングさせ、4-AA による発色反応と比較しながら検索を行ったところ、Fig. 10 に示すような、アミノジフェニルアミン誘導体が、従来の水素供与体と POD/H₂O₂ 系でカップリングし、4-AA よりも長波長側に吸収極大波長を持つ色素を形成することが分かった。Fig. 11 に NCP-04 と TOOS を POD/H₂O₂ でカップリングさせ生じた発色色素のスペクトルを示す。

Fig. 11 からカプラーに4-AAを使用した場合の発色色素の吸収スペクトルと比較して、吸収極大波長が約200 nm 長波長側にシフトし、モル吸光係数も2倍程度上昇していることが分かる。Fig. 12 に、各種トリンダー試薬と NCP-04 から NCP-07 の4種の新規カプラーを酸化カップリングさせ、生じる色素の吸収極大波長と、その吸収極大波長における吸光度を示した。

Fig. 12 から、大部分のトリンダー試薬と酸化カップリングし、吸収極大波長が750 nm 程度の色素を形成するということが分かる。又、4-AA 使用時に比べ、感度も2~3倍に上昇している。溶液中の濁度の検出には600~650 nm の波長域が用いられるが、700~750 nm の波長は、乳びや溶血などの吸収に及ぼす妨害も少なく、又光源として半導体レーザーも用いることができる。

しかし、MAPS, MAOS とは、他のトリンダー試薬とは異なり、ほとんど色素を形成しない。おそらく酸化電位のずれに起因するものと思われる。NCP-04 から07のカプラーを用いて過酸化水素を定量してみると、

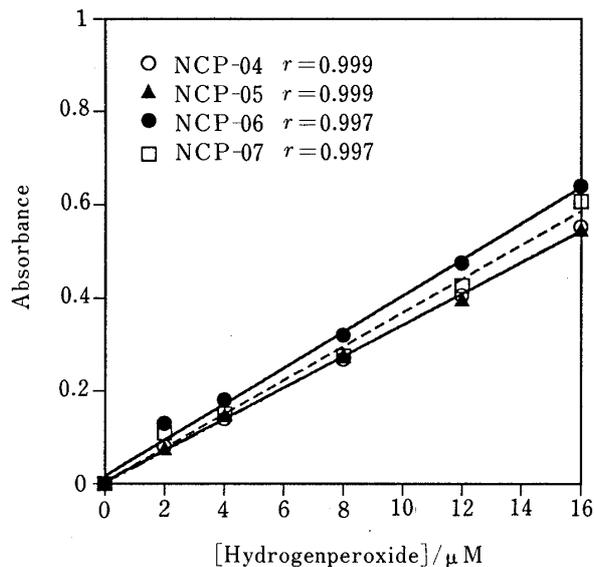


Fig. 13 Standard curves of NCP derivatives for hydrogenperoxide at pH 7.0

A mixture of 30 μ l of TOOS solution (10 mM), 30 μ l of POD solution (3.3×10^3 U/ml) and 30 μ l of hydrogenperoxide solution (0.2~1.6 mM), was diluted to 3.0 ml with 50 mM HEPES buffer solution (pH 7.0). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank.

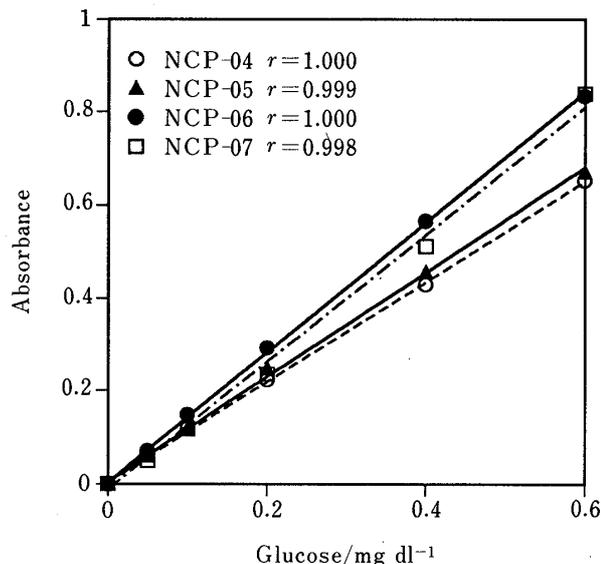


Fig. 14 Standard curves of NCP derivatives for glucose at pH 7.0

A mixture of 30 μ l of TOOS solution (10 mM), 30 μ l of GOD solution (3.3×10^3 U/ml), 30 μ l of glucose solution (3.3×10^3 U/ml), and 30 μ l of GOD solution (3.3×10^3 U/ml), was diluted to 3.0 ml with 50 mM HEPES buffer solution (pH 7.0). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank.

Table 6 Stability of NCP derivatives

Reagent	Absorbance at 750 nm after 25 days	
	Aqueous solution at 30°C	Aqueous solution containing 100 μ M TOOS at 4°C
NCP-04	0.009	0.147
NCP-05	0.001	0.095
NCP-06	0.000	0.002
NCP-07	0.001	0.005

いずれのカプラーも Fig. 13 に示すように良い直線性を示す。

カプラーは塩酸塩の形であるので、純水に溶解して冷蔵及び常温中での安定性、又水素供与体の TOOS と共存させた状態での安定性を 25 日間にわたって調べた。その結果を Table 6 に示す。

いずれの化合物も実際の測定波長となる 750 nm 付近の吸光度の変化はほとんどないことが分かる。又、TOOS と共存させた系においては、NCP-06、NCP-07

の吸光度空試験値は上昇せず安定であることが分かる。グルコース/GOD 系における TOOS とのカップリング反応を行った結果を Fig. 14 に示す。

Fig. 14 から酵素系においても良好な直線性を示すことが分かる。次に NCP-04 から 07 を用いた酸化発色系に及ぼすビリルビンの影響を調べた結果を Fig. 15 に示す。

Fig. 15 から、4-AA の場合と同じく、各種水素供与体によってビリルビンから受ける影響の度合は異なるものの、その中でも NCP-06 と DAPS の組み合わせは、最もビリルビンの影響が少ないということが分かった。これらのカプラーは、まだ誘導体化の余地が多く残されており、更にビリルビンの影響を受けにくい構造を検索していかなければならない。

5 還元系発色基質

5.1 還元系発色基質開発の背景と問題点

前述したように臨床化学分析に用いられている還元系発色試薬は、ほとんどテトラゾリウム塩である。テトラゾリウムは、既に 19 世紀末、von Pechmann ら²⁶⁾によ

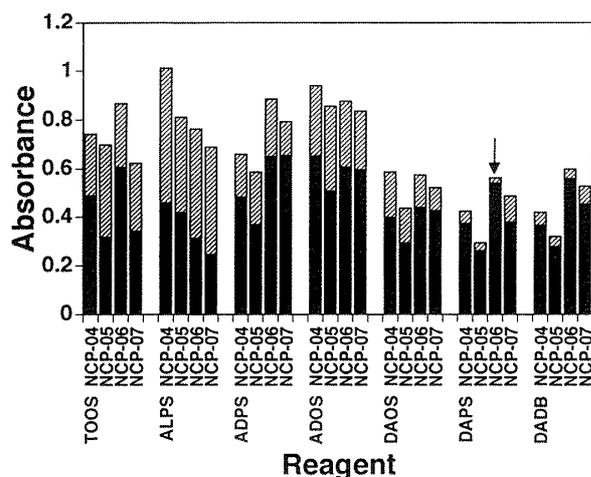


Fig. 15 Bilirubin interference for oxidative condensation at pH 7.0

A mixture of 30 μl of Trinder's reagents solution (10 mM), 30 μl of POD solution (3.3×10^3 U/ml) and 30 μl of hydrogen peroxide solution (2 mM), was diluted to 3.0 ml with 50 mM HEPES buffer solution (pH 7.0). After the solution had been incubated at 37°C for 10 min, the absorbance at the wavelength of maximum absorption was measured against the reagent blank. \square : control, \blacksquare : add 5 μl of bilirubin solution (220 mg/dl)

って研究された化合物である。そして生化学的に利用されるようになったのは、Kuhn²⁷⁾らの研究に始まる。更に Lakon²⁸⁾は、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム塩酸塩 (TTC) を使い、いろいろの植物、特に穀類の種子の発芽力と、そのはい (胚) の TTC 染色とが平行することを認めた。そして細菌、あるいは植物種子によるテトラゾリウム塩のこのような還元は、生体に含まれる還元糖、グルタチオン、システインあるいはアスコルビン酸などの作用によるものではなく、還元酵素、特にピリジンヌクレオチド系脱水素酵素の作用によることを明らかにした。

その後多くの研究者によって組織染色にテトラゾリウム塩が用いられ²⁹⁾³⁰⁾、微細染色の観察のために、コントラストが明りょうで、青色色素を生成するテトラゾリウム塩が開発された³¹⁾³²⁾。その結果、Fig. 16 に示すような、INT³³⁾³⁴⁾、NTB³⁵⁾、TNTB³⁶⁾などが組織化学的研究に用いられるようになった。又、臨床化学分析では還元酵素活性あるいは基質量をテトラゾリウム塩から生じるホルマザンの量として測定する手法が開発された³⁷⁾。

Table 1 に示したように、初発酵素に脱水素酵素を用

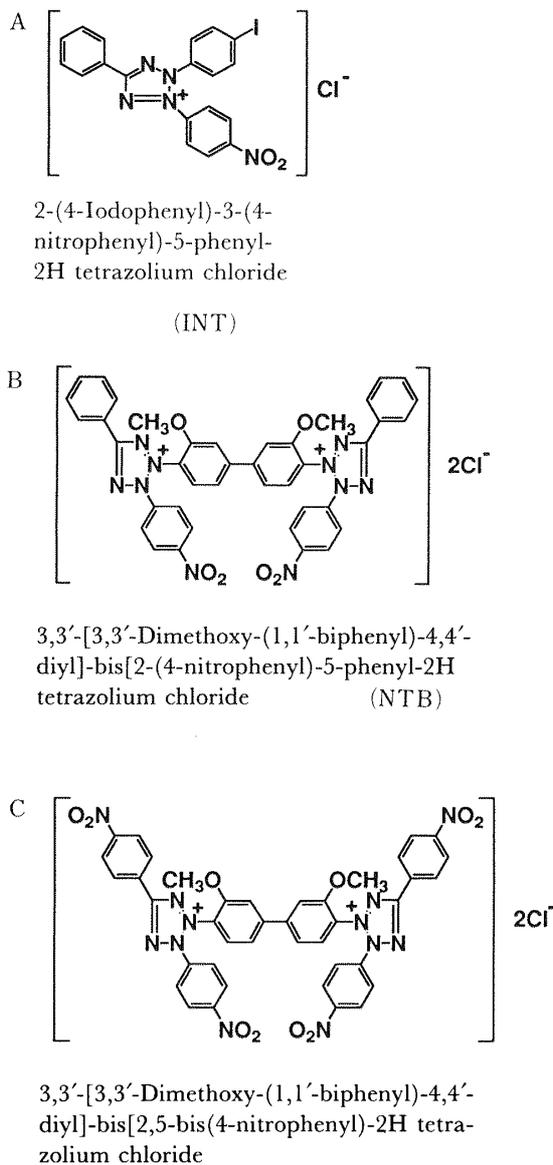


Fig. 16 Conventional tetrazolium salts

いた場合、生じる NADH が検出物質となる。NADH を測定する方法は、前述の H_2O_2 を測定する方法より感度は劣るが、生体内マトリックスの影響は少ないと言われている。NADH は 340 nm に吸収を持つため、その波長での吸光度を測定する方法 (UV 法) があるが、更に検出感度を上げるため上記のテトラゾリウム塩が用いられる。その測定原理を、Fig. 17 に示す。目的物質 (基質) に脱水素酵素を作用させ、生じた水素を NAD や 1-メトキシ PMS などの中間電子運搬体を介して、テトラゾリウム塩が受容し、生成したホルマザンの量を吸光度測定することによって、脱水素酵素活性、あるいは基質量を測定できる³⁸⁾³⁹⁾。

通常、乳酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グル

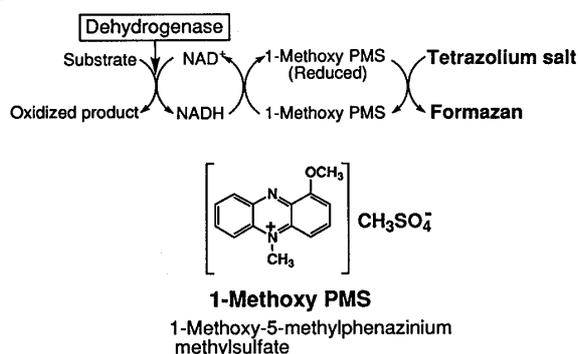


Fig. 17 The principle of determination

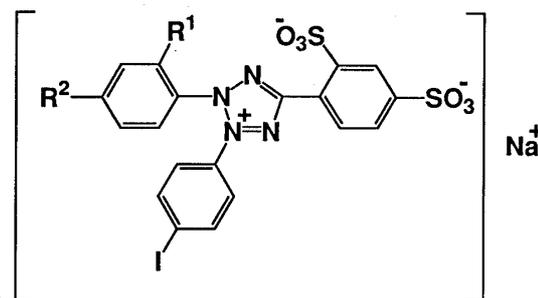
タミンド水素酵素などの各種脱水素酵素を検出, 定量する目的で使用され, 特に乳酸脱水素酵素 (LDH) の測定は, 心筋こうそく, 悪性しゅようあるいは肝疾患などの診断に重要とされている。

臨床化学分析における還元発色試薬には, 主に NTB, INT が用いられてきた。しかし, 生成したホルマザンは全く水溶性を持たない。従って, ホルマザンが析出するため, 吸光度を測定する場合, ホルマザンの析出を抑えるため界面活性剤等を用いて分散させる必要がある。又, 分析装置のセルやチューブへの付着, 沈着が問題となってきた。そのため現在, LDH, 中性脂肪 (トリグリセリド) 及び, 胆汁酸の測定に利用されているに過ぎない。そのため, 臨床化学分析では以前より水溶性のホルマザンを生じるテトラゾリウム塩の開発が進められている⁴⁰⁾⁴¹⁾。

5.2 水溶性ホルマザンを生じるテトラゾリウム塩の開発⁴²⁾⁴³⁾

4.1 で述べた水溶性の問題点を克服するため, 従来のテトラゾリウム塩にスルホン酸を導入することとし, 合成検討を行った。しかし, 単に水溶性基を導入してもその導入場所によっては, 酸化還元電位に影響を与えるため, テトラゾリウム塩からホルマザンへ還元されない。従ってスルホン酸基の導入場所を検討し, Fig. 18 に示すテトラゾリウム塩, WST-1, WST-3 を合成した。又, これらのテトラゾリウム塩から生じるホルマザンは水溶性が高く, 1 M 以上の水溶液を長期保存しても, 沈殿などの不溶物は現れないことが分かった。WST-1 のホルマザンの吸収スペクトルを Fig. 19 に示す。

1-メトキシ PMS 存在下, NADH を作用させると, NADH 濃度に応じて, 430 nm 付近に吸収極大を持つホルマザンを生じることが分かる。次に, 還元酵素を用い



WST-1 : $R^1 = H, R^2 = NO_2$

2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-
5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,
monosodium salt

WST-3 : $R^1 = R^2 = NO_2$

2-(4-Iodophenyl)-3-(2,4-dinitrophenyl)-
5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,
monosodium salt

Fig. 18 Water-soluble tetrazolium salts

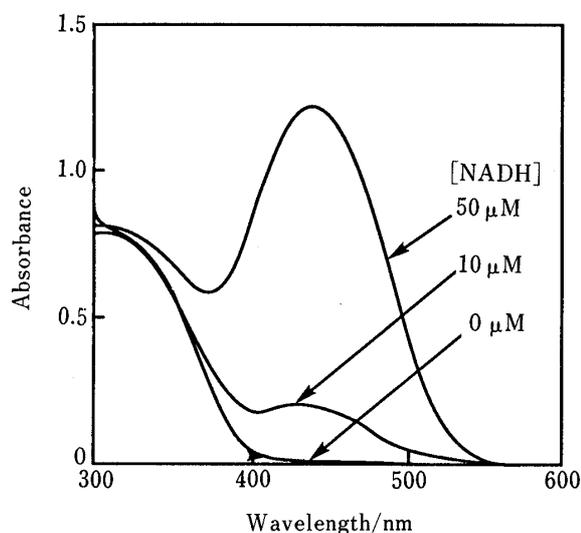


Fig. 19 Absorption spectra of WST-1 in 1-methoxy PMS-mediated reduction by NADH

た分析例として LDH を用い, 乳酸の濃度を測定した結果を Fig. 20 に示す。

比較として NTB を用いた。WST は界面活性剤を用いることなく乳酸量を測定でき, 感度も NTB に比べて約 1.5 倍増加していることが分かる。NTB ホルマザン及び WST-1 ホルマザンのモル吸光係数は, 3.6×10^4 , 3.7×10^4 であり³⁵⁾, モル吸光係数は同程度にもかかわ

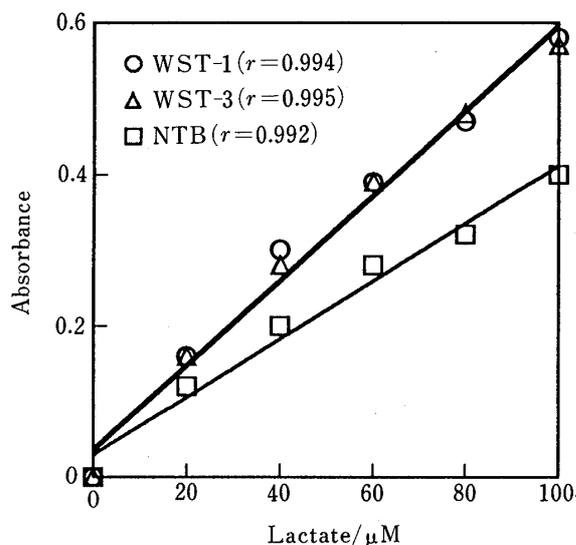


Fig. 20 Standard curves of WST-1 and WST-3 for lactate at pH 9.0

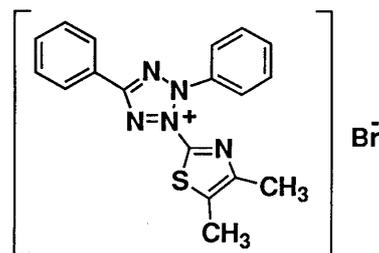
A mixture consisting of 3 ml of 100 mM Tris-HCl buffer solution (pH 9.0), 30 μ l of WST derivatives solution (10 mM), 3 μ l of 1-methoxy PMS solution (5 mM), 30 μ l of β -NAD⁺ solution (10 mM) and 30 μ l of lactate solution (2~10 mM) was incubated at 37°C. To this solution, 3 μ l of LDH solution (1.0×10^3 U/ml) were added and the mixture was incubated at 37°C for 15 min; the reaction was stopped by adding 100 μ M of 1 M-HCl. The absorbance at 433 nm was measured against the reagent blank. ○: WST-1 (438 nm); △: WST-3 (431 nm); □: NTB (530 nm) (add 30 μ l of 10% TritonX-100)

らず、乳酸/LDH系ではWST-1ホルマザンのほうが検出感度が高い。おそらく1-メトキシPMSとWST-1との間の電子移動効率に関係しているものと考えられる。

5.3 WST-1のCell Counting Kitへの応用⁴⁴⁾

WST-1の高い水溶性を活かして、臨床化学分析以外に、細胞培養における細胞数測定への応用を検討した。従来、細胞数の測定法には、MTT (Fig. 21) が用いられており、通常MTTアッセイと呼ばれている⁴⁵⁾。MTTアッセイは細胞の還元酵素活性(コハク酸脱水素酵素活性)を指標にして細胞数を測定する方法である。同様にMTTホルマザンが水に溶けにくいため、析出したホルマザンの溶解操作が必要で、多くのサンプルを処理する際に障害となっている。

しかし、WST-1ホルマザンは高水溶性のため、WST-1を培養液に溶解し、細胞と一定時間インキュベーションした後、直接吸光度を測定することができ



MTT

3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide

Fig. 21 Structure of MTT

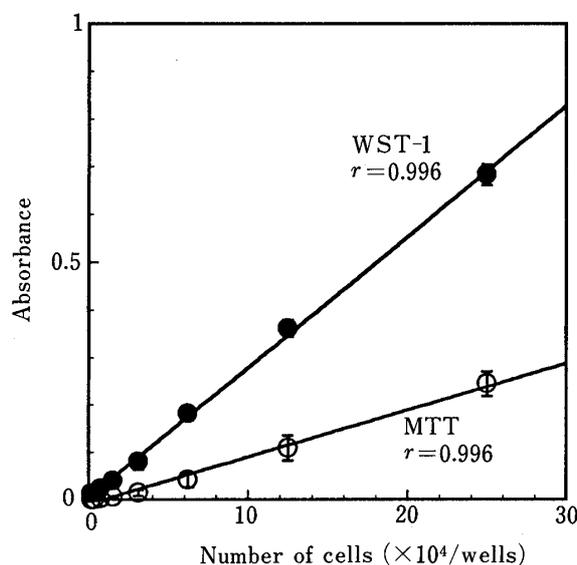


Fig. 22 Cell proliferation assay

WST-1 assay 0.1 ml of inoculate cell suspension (Hela cells, $0.2 \times 10^3 \sim 25 \times 10^3$ /well) was incubated at 37°C. To this suspension, 5 μ l of WST-1 solution (10 mM) and 5 μ l of 1-methoxy PMS (0.4 mM) were added and the mixture was incubated at 37°C for 2 h. The absorbance at 450 nm was measured (P388 cell, 100 μ M WST-1, 1.2 mM MTT, 20 μ M 1-Methoxy PMS). ●: WST-1 assay (430 nm); ○: MTT assay (570 nm)

る。Fig. 22に従来法との比較を示した。MTTを使用したものに比べ、WST-1は約2倍の感度を持つことが分かる。

6 今後の課題

6.1 酸化発色試薬

酸化発色系における諸問題の解決のために水素供与体

及びカプラーからの改善を行ってきた。更に今後検討すべき事項として、高感度化が挙げられる。これまでに開発されてきた試薬は数万のモル吸光係数を与えるものがほとんどであるが、数十万のモル吸光係数を持った色素を形成する発色剤を開発する必要がある。生体内の微量成分として、モノアミノオキシダーゼや胆汁酸等、正常値が数十 μM のものがあり、微量成分を正確に検出するとともに、測定項目の増加に伴うサンプル量の減少に対応するために必要である。

次に、試薬の液状化への対応ができる安定な酸化発色剤、又発色系が生体サンプル中の妨害物質の干渉を受けない酸化発色試薬の開発も必要である。現在、自動分析装置による生化学検査での問題点は、調製後の試薬の不安定性のために、試薬を用時調製しなければならないことである。自動分析機器も大型化して、現在では 35 項目を同時に分析できる装置も出現しており、項目ごとの試薬調製に時間と労力が費やされている。一方、発色剤が溶液状態で長期間安定であれば、試薬を調製する必要もなく、溶解の際の溶媒計量誤差がないため、安定した検査値が得られる。従って、試薬の液状化は臨床化学分析では重要な課題である。

又、ほとんどの酸化発色試薬は血清成分の影響を受けるが、各臨床検査薬メーカーの技術によって各種妨害物質を処理する手法が開発され、問題はある程度改善されているようである。しかし、酸化発色剤を用いる測定系は多く、回避できない場合がある。従ってその系に合わせた発色剤の開発も欠かせない。

6.2 還元発色酵素基質

還元発色試薬についても同様に高感度化が求められる。WST は、吸収極大波長が 430 nm 付近と短く、まだ生体サンプルに含まれる妨害物質の影響を受ける波長域にあるため、600 nm 以上に吸収を持つホルマザンを与える化合物の開発を目標として研究を行ってきたい。テトラゾリウム塩の開発に際し水溶性、波長に重点をおいて分子設計を行わなければならないが、酸化還元電位は置換基の影響を強く受けるため、化合物の電位に影響を及ぼさない位置への置換基導入を行う必要がある。又、これまでは分析機器のフィルターに合わせた波長特性を持つ化合物開発に重点を置いてきたが、今後は光源にレーザーを用いた自動分析機器や、キャピラリー電気泳動などの装置が普及してくると予想されるため、装置の特性に合った性質を持つ化合物も開発していかなければならない。更に発色基質だけではなく、蛍光や発光系で検出できる試薬の開発も進めていきたい。

文 献

- 1) 齊藤正行, 丹波正治, 伊藤 啓: “三訂 臨床化学”, p. 29 (1992), (講談社).
- 2) K. L. Cheng, K. Ueno, T. Imamura: “*Handbook of Organic Analytical Reagents*”, p. 267 (1982), (CRC Press, Inc., Boca Raton).
- 3) A. S. Keston: Abstracts of 129th Meeting Am. Chem. Soc., 31C (1956), Dallas.
- 4) J. D. Teller: Abstracts of 130th Meeting Am. Chem. Soc., 69C (1956), Atlantic City.
- 5) P. Trinder: *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24 (1969).
- 6) D. Barham, P. Trinder: *Analyst* (London), **97**, 142 (1972).
- 7) 玉奥克巳, 村尾優子, 前田正晴, 大倉洋甫: 日本薬学会第 101 年会講演要旨集, p. 148 (1981).
- 8) 玉奥克巳, 平嶋佳代子, 上野景石, 大倉洋甫: 日本薬学会第 101 年会講演要旨集, p. 148 (1981).
- 9) K. Tamaoku, Y. Murao, K. Akiura, Y. Ohkura: *Anal. Chim. Acta.*, **136**, 121 (1982).
- 10) K. Tamaoku, K. Ueno, K. Akiura, Y. Ohkura: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2492 (1982).
- 11) K. S. Johnson, C. M. Sakamoto-Arnold, S. W. Willason, C. L. Beehler: *Anal. Chim. Acta.*, **201**, 83 (1987).
- 12) B. C. Madsen, M. S. Kromis: *Anal. Chem.*, **56**, 2849 (1984).
- 13) M. Mizoguchi, M. Shiga, K. Sasamoto: *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 620 (1993).
- 14) M. Shiga, M. Saito, K. Kina: *Anal. Chim. Acta.*, **153**, 191 (1983).
- 15) R. D. Lillie: “*H. J. Conn's Biological Stains*”, p. 241 (1977), (The Williams & Wilkins Company, Baltimore).
- 16) 松本宏治郎, 溝口香代子, 菅野剛史: 臨床化学, **8**, 63 (1979).
- 17) 森下芳孝, 中根清司, 浅井正樹, 影山信雄, 園田信五, 青木哲雄, 高橋一郎, 毛利秀彦: 臨床化学, **11**, 88 (1982).
- 18) M. W. McGowan, J. D. Artiss, B. Zak: *Microchem. J.*, **27**, 564 (1982).
- 19) P. Fossati, L. Principe, G. Berti: *Clin. Chem.*, **26**, 227 (1980).
- 20) N. H. Chinh: *Clin. Chem.*, **20**, 499 (1974).
- 21) D. J. Capaldi, K. E. Taylor: *Anal. Biochem.*, **129**, 329 (1983).
- 22) R. Reljic, M. Ries, N. Anic, B. Ries: *Clin. Chem.*, **38**, 522 (1992).
- 23) N. Gochman, J. M. Schmitz: *Clin. Chem.*, **17**, 1154 (1971).
- 24) N. Gochman, J. M. Schmitz: *Clin. Chem.*, **18**, 943 (1972).
- 25) J. D. Artiss, R. J. Thibert, J. M. McIntosh, B. Zak: *Microchem. J.*, **26**, 487 (1981).
- 26) H. V. Pechmann: *Ber.*, **27**, 323 (1894).
- 27) R. Kuhn: *Ber.*, **74**, 941 (1941).
- 28) G. Lakon: *Ber. deut. bot. Gesell.*, **60**, 299 (1942).

- 29) W. Antopol: *Public Health Repts.*, **63**, 1231 (1948).
 30) R. M. Wood: *Science* (Washington, D. C.), **112**, 86 (1950).
 31) W. Ried: *Ann.*, **581**, 16 (1953).
 32) W. Ried: *Ann.*, **581**, 29 (1953).
 33) F. H. Atkinson: *Science* (Washington, D. C.), **112**, 385 (1950).
 34) M. M. Nachlas, S. I. Margulies, A. M. Seligman: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2739 (1960).
 35) T. C. Tsou, C. S. Cheng, M. M. Nachlas, A. M. Seligman: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6139 (1956).
 36) A. W. Sedar, C. G. Rosa, K. C. Tsou: *J. Histochem. Cytochem.*, **10**, 506 (1962).
 37) M. M. Nachlas, S. I. Margulies, J. D. Goldberg, A. M. Seligman: *Anal. Biochem.*, **1**, 317 (1960).
 38) 八木達彦: *ドージンニュース*, **14**, 1 (1979).
 39) S. Nakamura, K. Akimura, K. Osawa, T. Yagi: *Clin. Chim. Acta*, **101**, 321 (1980).
 40) K. D. Paull, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd, J. L. Parsons, P. A. Risbood, W. A. Barbera, M. N. Sharma, D. C. Baker, E. Hand, D. A. Scudiero, A. Monks, M. C. Alley: *J. Heterocycl. Chem.*, **25**, 911 (1988).
 41) N. W. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, A. L. Glasebrook: *J. Immunol. Methods*, **142**, 257 (1991).
 42) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi, P. G. He: *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118 (1993).
 43) M. Ishiyama, K. Sasamoto, M. Shiga, Y. Ohkura, K. Ueno: *Analyst* (London), **120**, 113 (1995).
 44) M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno, M. Watanabe: *In vitro Toxicol.*, **8**, 187 (1995).
 45) T. Mosmann: *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).

要 旨

生体試料中の諸成分の化学分析は、近年、一部を除いて、ほとんどが酵素反応を利用した測定法に変遷した。これらの方法は測定したい生体成分に対し極めて選択的である。酵素的測定法に用いられる酵素はほとんどが酸化酵素（オキシダーゼ）か還元酵素（デヒドロゲナーゼ）で、それぞれ、反応によって生じる過酸化水素、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）、あるいは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）を発色法によって検出する。検出には酸化あるいは還元発色試薬が用いられる。酸化発色試薬はこれまでアニリン誘導体であるトリンダー試薬が用いられてきた。又、還元発色試薬にはニトロテトラゾリウムブルー（NTB）などのテトラゾリウム塩が用いられている。これらの試薬に求められる性質は1) 発色波長が生体内物質の妨害を受けにくい波長領域にある。2) 発色反応が生体サンプルに含まれる干渉物質の影響を受けない。3) 溶液状態での長期間の保存に耐える。4) 安定な色素を与える。（退色しにくい。）5) 水溶性が高い、ことなどである。これまで用いられてきた発色剤は、すべてを満たすものではなく各臨床メーカーにおける試薬溶液調製のノウハウによって改善されてきた。今回、上記の問題点を解決するために、新規化合物を合成し、その特性を評価した。