

## 報 文

アセチルレゾルフィンとグルコースオキシダーゼからなる  
蛍光指示反応系を用いる血糖値測定

松浦 伸哉\*, 山内 雄二\*, 大森 秀信\*, 前田 初男®\*

Blood glucose determination with an acetyl resorufin-glucose oxidase  
system as a fluorometric indicator reaction

Shinya MATSU-URA, Yuji YAMAUCHI, Hidenobu OHMORI and Hatsuo MAEDA\*

\*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamada-Oka, Suita-shi, Osaka 565-0871

(Received 5 March 2001, Accepted 12 April 2001)

Recently, we found that the perhydrolysis of acetyl resorufin (ACR) to fluorescent resorufin can be used as a novel indicator reaction for a fluorometric analysis of glucose coupled with glucose oxidase (GOD). In the present study, the applicability of this indicator reaction in fluorometric determination of blood glucose was explored. A fluorometric method with GOD and ACR (GOD/ACR method) was successfully capitalized in a glucose determination of plasma subjected to a deproteinization procedure with  $\text{ZnSO}_4\text{-Ba(OH)}_2$ , provided that a GOD solution was prepared by a 10 mM phosphate buffer (pH 7.4). The use of the GOD solution worked well not only to prevent the formation of a precipitation during the enzymatic reaction of a deproteinized glucose solution in the presence of ACR, but also to improve the sensitivity of the present fluorometry. The GOD/ACR method afforded a calibration curve over the range of glucose concentration between 0 and 250 mg/100 ml, and allowed the determination of blood glucose with high repeatability, as shown by less than 2% ( $n = 5$ ) of the relative standard deviations. The obtained glucose levels for plasma were slightly higher than those measured by Trinder's method. The results concerning not only the assessment of effects of added ascorbic acid, but also the recovery tests suggest that the difference in the glucose levels determined by both methods comes from the low accuracy of Trinder's method in the presence of inhibitors, such as ascorbic acid. An excellent stability of ACR in  $\text{CH}_3\text{CN}$  as well as the above results lead to the expectation that the GOD/ACR method will offer a reliable and accurate tool for the clinical analysis of glucose.

**Keywords** : perhydrolysis of acetyl resorufin; indicator reaction; fluorometric analysis of glucose; blood glucose; glucose oxidase.

## 1 緒 言

現在、血糖値の比色分析は一般に酵素分析法により行われている<sup>1)</sup>。代表的なものとして、グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ (GOD/POD) 法<sup>2)~8)</sup>とヘキソキナーゼ/グルコース-6-リン酸脱水素酵素法<sup>9)10)</sup>がある。POD

共存下での過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) による色素の酸化的生成に基づく前者には、生体試料中に存在するアスコルビン酸などの還元性物質により指示反応が阻害されるという問題がある。酵素反応で生成する還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) に由来する、340 nm における吸光度変化量を測定する後者には、生体成分による影響は少ないと言われているが、その検出感度には改善の余地がある。両分析法に固有のこれらの問題点の克服は、臨床

\* 大阪大学大学院薬学研究科分子反応解析学分野: 565-0871  
大阪府吹田市山田丘 1-6

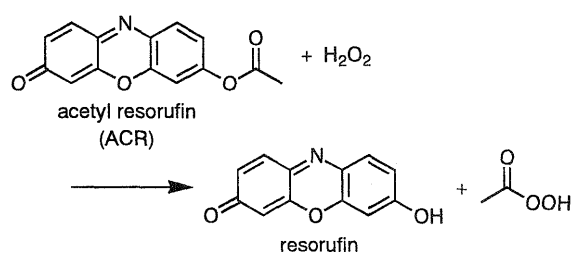


Fig. 1 Perhydrolysis of ACR as a fluorometric indicator reaction

化学的に非常に興味をもたれる。

GOD/POD 法における問題は、POD を用いることに大きく起因している。したがって、GOD のみを用いる系で発現する指示反応の開発が、GOD/POD 法における問題点の最も単純な解決策である。これまで、この考えに基づき、酵素反応により生成する  $\text{H}_2\text{O}_2$  が銅錯体<sup>11)</sup>、チタニウム錯体<sup>12)</sup>、バナジウム錯体<sup>13)</sup>又は鉄二核錯体<sup>14)</sup>と付加体を形成することに起因する、赤方偏移を利用するグルコースの比色分析法が開発されている。GOD 及びチタニウム錯体<sup>12)</sup>又はバナジウム錯体<sup>13)</sup>を指示反応系に用いる手法では、試料中に存在する還元性物質の影響をほとんど受けないことも示されている。しかし、分析法としての感度並びに精度を考慮すると、血糖値の比色分析における指示反応は、色素の吸収波長の変化よりも色素の発生に基づくべきであろう。最近、著者らは  $\text{H}_2\text{O}_2$  によるアセチルレゾルフィン (ACR) の蛍光性化合物レゾルフィンへの変換反応 (Fig. 1), つまりペルヒドロリシス<sup>15)16)</sup>を指示反応とすることにより、GOD のみを用いてグルコースを蛍光分析できること、並びに本分析法がアスコルビン酸等の還元性物質の妨害効果をほとんど受けないことを見いだした<sup>17)</sup>。本論文では、この ACR と GOD からなる蛍光指示反応系を用いる手法 (GOD/ACR 法) の、血糖値測定法としての実用性について評価した結果について述べる。

## 2 実 験

### 2.1 試 薬

100, 50 及び 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) は、それぞれリン酸水素ナトリウム (和光純薬製) 11.50, 5.75 又は 1.15 g, 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物 (和光純薬製) 2.96, 1.48 又は 0.30 g を脱塩蒸留水 1000 ml に溶解し、調製した。ACR 溶液 (0.2 mM) は、既報<sup>18)</sup>の方法により合成及び単離精製した ACR 5.1 mg を、HPLC 用アセトニトリル (和光純薬製) 100 ml に溶解して調製した。GOD 溶液 (0.25 mg/ml) は、GOD (EC 1.1.3.4, 和光純薬製, 238 U/mg, アスペルギルスニガー製) 12.5 mg をリン酸緩衝液 50 ml に溶解して調製した。グルコース標準

液、過酸化水素液 (4.4 mM), アスコルビン酸溶液 (3.0 mM) 及びヒト血清アルブミン (HSA) 溶液 (2.1% w/v) は、それぞれグルコース, 30% 過酸化水素液, アスコルビン酸 (以上, 和光純薬製) 及び HSA (シグマ製) を脱塩蒸留水で溶解又は希釈して調製した。硫酸亜鉛溶液 (62 mM) は、硫酸亜鉛七水和物 (和光純薬製) 1.78 g を脱塩蒸留水 100 ml に溶解して調製した。水酸化バリウム溶液 (30 mM) は、水酸化バリウム八水和物 (和光純薬製) 0.95 g を使用直前に、窒素気流下での煮沸処理を施した脱塩蒸留水 100 ml に溶解して調製した。トリンダー試液<sup>19)</sup>はリン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.0) 200 ml に GOD 17.7 mg, POD (EC 1.11.1.7, 100 U/mg 以上, わさび製) 3.0 mg, 4-アミノアンチピリン 31.3 mg, アジ化ナトリウム 19.5 mg 及びフェノール (以上, 和光純薬製) 207.1 mg を溶解して調製した。

### 2.2 血しょう (漿) 試料

使用目的を説明した上で同意を得た健康なボランティア 3 人から、血液を真空採血管 (テルモ製, ベノジェクト II) に採血し、4℃, 3000 rpm で 10 分間遠心分離することにより得た上澄みを、それぞれ血漿試料 A, B 及び C として用いた。

### 2.3 除タンパク処理

マイクロチューブ (1.0 ml) に脱塩蒸留水 0.1 ml, 血漿 0.1 ml, 硫酸亜鉛溶液 0.4 ml, 水酸化バリウム溶液 0.4 ml を加え、4℃, 10000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、その上澄みを測定用血漿試料とした。また、マイクロチューブ (1.0 ml) に脱塩蒸留水 0.1 ml, グルコース標準液 0.1 ml, 硫酸亜鉛溶液 0.4 ml, 水酸化バリウム溶液 0.4 ml を加え、同様に処理して得た上澄みを測定用グルコース標準試料とした。アスコルビン酸の影響は、上記操作における脱塩蒸留水の代わりに、アスコルビン酸溶液 0.1 ml を用いて同様な処理を施して得た上澄みを、測定用グルコース標準試料として用いて評価した。回収試験においてはグルコース標準液 0.1 ml, 血漿 0.1 ml, 硫酸亜鉛溶液 0.4 ml, 水酸化バリウム溶液 0.4 ml について同様な処理を施して得た上澄みを測定用試料として用いた。

### 2.4 GOD/ACR 法によるグルコースの測定

測定は、ペルチェ式恒温セルホルダー (日本分光製, ETC-272) を装着した分光蛍光光度計 (日本分光製, FP-750) を用いて、励起波長 568 nm, 検出波長 582 nm, かくはん速度 500 rpm, セル温度 25℃で行った。ACR 溶液と GOD 溶液はあらかじめ恒温槽内で 25℃に保った。測定セルに ACR 溶液 0.8 ml 及び GOD 溶液 2.0 ml をこの順に加え、15 秒後更に測定用試料 0.2 ml を加えた。全試液

混合後 30 秒経過時から測定を開始し, 300 秒後の蛍光強度を測定した. 過酸化水素の測定は, 測定セルに ACR 溶液 0.8 ml 及びリン酸緩衝液 (100, 50 又は 10 mM, pH 7.4) 2.0 ml をこの順に加え, 15 秒後更に過酸化水素溶液 0.2 ml を加えて得た混合液について, 同様に行った.

### 2.5 トリンダー法によるグルコースの測定

測定は分光吸光度計 (日立製, U-3210) を用いて行った. 測定セルにトリンダー試液 2.0 ml 及び測定用試料 0.2 ml を加え, 室温下 40 分間放置した後, 505 nm における吸光度を測定した.

### 2.6 アセトニトリル中での ACR の安定性の評価

調製直後の ACR 溶液を HPLC 用アセトニトリルを用いて 100 倍希釈し, その溶液について分光吸光度計 (U-3210) を用いて 300~600 nm の波長範囲で得た吸収スペクトルから, ACR 由来の 344 及び 435 nm における吸光度を測定した. 室温下放置した ACR 溶液について, 調整直後から 1 週間ごとに同様に得たスペクトルから, それらの波長における吸光度を測定した. これらの値と調製直後に観察された値とを比較することにより, アセトニトリル中での ACR の安定性を評価した.

## 3 結果と考察

### 3.1 除タンパク操作の必要性

GOD/ACR 法を用いて血糖値の測定を行うに当たり, 血液試料に対する除タンパク操作の必要性についてまず検討した. その評価は, HSA 共存下及び非共存下における ACR の単純加水分解の程度を, レゾルフィンに由来する蛍光強度変化を比較することにより行った. ACR 溶液をリン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) と混合すると, ACR が徐々に加水分解を受けたが, HSA 共存下ではその反応が 3 倍以上速くなった. したがって, GOD/ACR 法を血糖値測定に応用する場合, 除タンパク操作が必要であると考えられた. 硫酸亜鉛/水酸化バリウム法による除タンパク操作を施したグルコース標準液について, GOD (100 mM リン酸緩衝液を用いて調製)/ACR 法により蛍光分析を行ったところ, 酵素反応中に析出物が生成し再現性良い結果が得られなかった.

### 3.2 リン酸緩衝液の濃度の影響

上述の析出物の生成は, 10 mM リン酸緩衝液により調製した GOD 溶液を用いると全く観察されなかった. 更に興味深いことに, このような低い濃度のリン酸緩衝液を用いた場合,  $\text{H}_2\text{O}_2$  による ACR のペルヒドロリシスがより効果的に起こるとともに, 空試験溶液における ACR の単純加水分解がより抑制されること, つまり, ACR を指示試

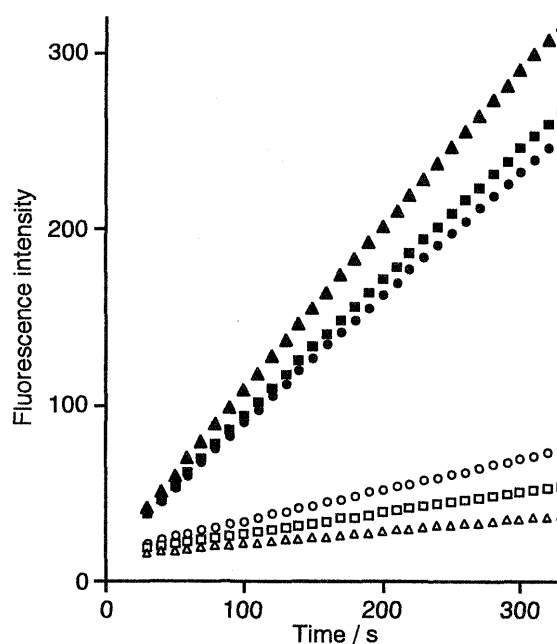


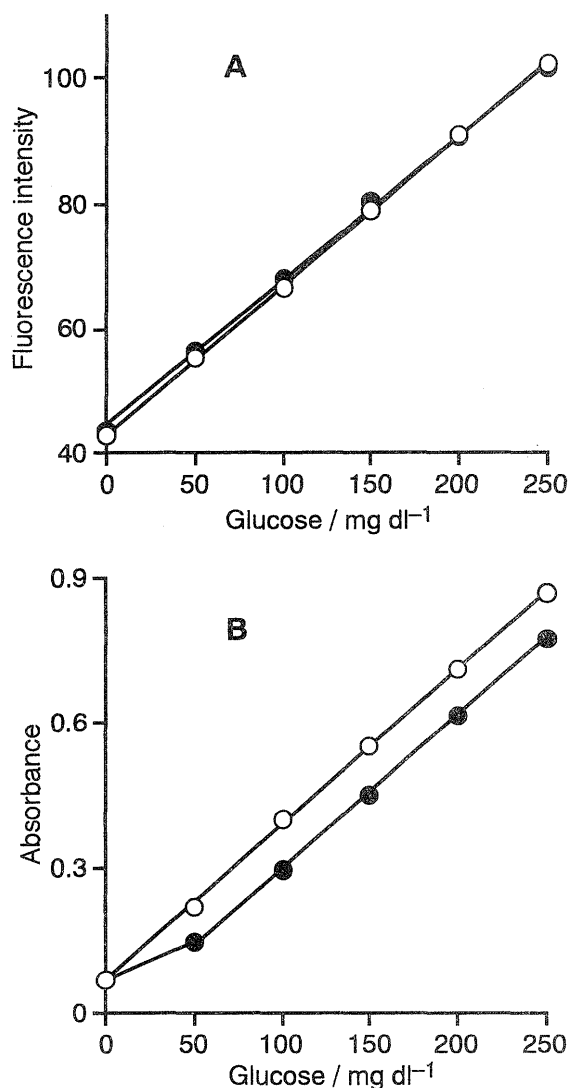
Fig. 2 Effects of concentrations of phosphate buffer on fluorometric traces for perhydrolysis (●, ■, ▲) and simple hydrolysis (○, □, △) of ACR at 25°C

A  $\text{CH}_3\text{CN}$  solution of ACR (0.2 mM, 0.8 ml) was mixed with phosphate buffer (pH 7.4, 2.0 ml) and a solution of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4.4 or 0 mM, 0.2 ml) in  $\text{H}_2\text{O}$ . Excitation and emission wavelengths were 568 and 582 nm, respectively. The concentrations of phosphate buffer were 100 (●, ○), 50 (■, □) and 10 (▲, △) mM.

薬として用いる  $\text{H}_2\text{O}_2$  の蛍光分析法の検出感度が向上することを見いだした (Fig. 2).

### 3.3 血糖値の測定

以上の知見に基づき, 10 mM リン酸緩衝液により調製した GOD 溶液を用いて, GOD/ACR 法の血糖値測定法としての可能性を評価した. 測定用グルコース標準液を用いて検量線を作成したところ, 0~250 mg/100 ml (dl) の濃度範囲で, グルコース濃度と蛍光強度の間に良好な直線関係 (相関係数  $r=1.000$ ) が得られた (Fig. 3, A を参照). 本法の定量及び検出限界を, 観察される蛍光強度の相対標準偏差 (RSD,  $n=4$ ) が 10% 及び 30% を超えないグルコース濃度として決定したところ, それぞれ 20 mg/dl (RSD = 4.6%) 及び 5 mg/dl (RSD = 26.7%) であった. GOD/ACR 法を血漿試料 A と B に適用し, 作製した検量線から血糖値を決定したところ, それぞれ 101.1 及び 104.0 mg/dl であった. また, これらの測定における RSD ( $n=5$ ) はそれぞれ 1.8% 及び 1.0% であり, GOD/ACR 法は優れた同時再現性を有することが示された. 一方, トリンダー法により決定した血糖値は, 血漿試料 A と B についてそれぞれ 94.5 及び 93.6 mg/dl であり, GOD/ACR



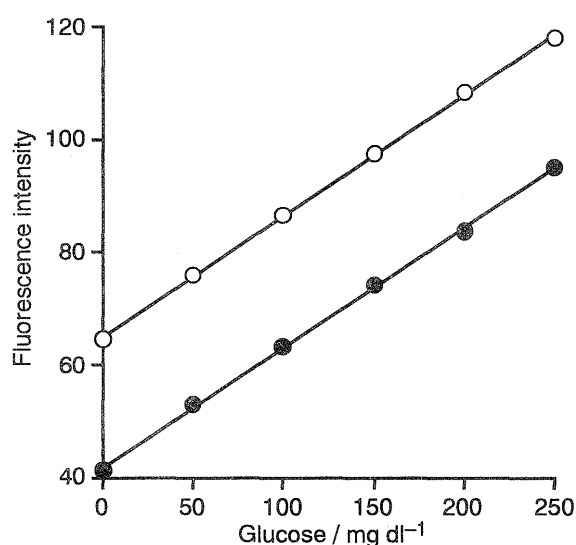
**Fig. 3** Effects of ascorbic acid on calibration curves obtained for glucose standard solutions by GOD/ACR (A) and Trinder's (B) methods

Obtained after aq. standard solutions of glucose (0.1 ml) were subjected to deproteinization procedure with aq. solutions of Ba(OH)<sub>2</sub> (30 mM, 0.4 ml), ZnSO<sub>4</sub> (62 mM, 0.4 ml) and ascorbic acid (3.0 mM: ●, 0 mM: ○, 0.1 ml).

法で得たものに比べて小さい値であった。

### 3.4 アスコルビン酸の影響

既に GOD/ACR 法によるグルコース測定はアスコルビン酸、尿酸及びビリルビンによる妨害を受けないことを報告している<sup>17)</sup>。したがって、GOD/ACR 法とトリンダー法により決定した血糖値における差は、トリンダー法の指示反応系が血漿試料中のアスコルビン酸等により阻害されたことに起因すると考えられた。そこで、血液試料中に最も高濃度で存在するため、妨害効果に対する寄与がより大きいと考えられるアスコルビン酸の両方法に対する影響を比



**Fig. 4** Recovery tests for GOD/ACR method

Obtained after aq. standard solutions of glucose (0.1 ml) with (○) or without (●) plasma (0.1 ml) were subjected to deproteinization procedure with aq. solutions of Ba(OH)<sub>2</sub> (30 mM, 0.4 ml) and ZnSO<sub>4</sub> (62 mM, 0.4 ml).

較した。アスコルビン酸溶液を非添加及び添加して調整した測定用グルコース標準液について、両方法により検量線を作製した。その結果、GOD/ACR 法ではアスコルビン酸の共存効果はほとんど観察されなかった (Fig. 3, A)。一方、トリンダー法においてはアスコルビン酸による効果は顕著に現われ、指示反応の阻害による応答の減少が観察された (Fig. 3, B)。したがって、トリンダー法により決定した血糖値が、GOD/ACR 法により決定したそれに比べて小さくなったのは、血漿試料中に存在する還元性物質、特にアスコルビン酸の妨害効果に起因することが示唆された。

### 3.5 回収試験

回収試験を GOD/ACR 法について血漿試料 C を用いて行った。その結果を Fig. 4 に示す。回収曲線と検量線が良好な平行関係にあり、検量線を用いて決定した血糖値 (107.0 mg/dl) と、それらの直線の x 軸切片の差から求めたそれ (106.6 mg/dl) は非常に良く一致した。したがって、GOD/ACR 法が確度の高い血糖値測定法であることが示された。

### 3.6 安定性

アセトニトリル中での ACR の安定性を評価したところ、室温下少なくとも 6 か月間分解することなく安定に存在することが明らかになった。

## 4 結 言

除タンパク操作を必要とするものの GOD/ACR 法が、トリンダー法に比べて、アスコルビン酸等による妨害を受けないより確度の高い血糖値測定法として利用できることが明らかになった。また、臨床検査試薬のすべてが液状化されつつあることを考慮すると、ACR の高い液状安定性も GOD/ACR 法の実用の可能性を期待させる。しかし、臨床分析への実用性をより高めるためには、ACR の水溶性向上を目指した分子設計が必要であると考えている。現在、この点を踏まえて更に研究を行っている。

最後に、本研究は公益信託三菱化学研究奨励基金及び文部科学省科学研究費補助金（萌芽的研究，12877353）の援助の下に行われたことを記して深謝する。

## 文 献

- 1) 佐々木慎一: 臨床検査 MOOK, **18**, 13 (1984).
- 2) D. Barham, P. Trinder: *Analyst* (London), **97**, 142 (1972).
- 3) P. Sharp, C. Riley, G. H. Cook, P. J. F. Pink: *Clin. Chim. Acta*, **36**, 93 (1972).
- 4) K. Tamaoku, K. Ueno, K. Akiura, Y. Ohkura: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2492 (1982).
- 5) R. Reljić, M. Ries, N. Anić, B. Ries: *Clin. Chem.*, **38**,

- 522 (1992).
- 6) 太田俊作, 畠山祥子, 青野千聡, 小池敏子, 谷水功, 平川博道: 薬学雑誌, **112**, 585 (1992).
- 7) 溝口 誠, 石山宗孝, 滋賀匡宣, 佐々本一美: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **45**, 111 (1996).
- 8) 青山典仁: 臨床検査, **41**, 1014 (1997).
- 9) W. E. Neely: *Clin. Chem.*, **18**, 509 (1972).
- 10) R. J. L. Bondar, D. C. Mead: *Clin. Chem.*, **20**, 586 (1974).
- 11) L. B. Warren: *J. Inst. Brew.*, **97**, 457 (1991).
- 12) C. Matsubara, K. Ishii, K. Takamura: *Microchem. J.*, **26**, 242 (1981).
- 13) C. Matsubara, K. Kudo, T. Kawashita, K. Takamura: *Anal. Chem.*, **57**, 1107 (1985).
- 14) D. Harms, J. Meyer, L. Westerheide, B. Krebs, U. Karst: *Anal. Chim. Acta*, **401**, 83 (1999).
- 15) B. C. Gilbert, R. G. G. Holmes, P. D. R. Marshall, R. O. C. Norman: *J. Chem. Res. (S)*, **1977**, 172.
- 16) D. M. Davies, M. E. Deary: *J. Chem. Res. (S)*, **1988**, 354.
- 17) H. Maeda, S. Matsu-ura, M. Nishida, T. Senba, Y. Yamauchi, H. Ohmori: *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 294 (2001).
- 18) H. Maeda, S. Matsu-ura, T. Senba, S. Yamasaki, H. Takai, Y. Yamauchi, H. Ohmori: *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 897 (2000).
- 19) G. Michael, H. Mollerring, J. Siedel: "Methods of Enzymatic Analysis," 3rd ed., Edited by H. U. Bergmeyer, Vol. 1, p. 178 (1983), (VCH Publishers, Weinheim).

## 要 旨

過酸化水素によるアセチルレゾルフィン (ACR) の蛍光性化合物レゾルフィンへの変換反応 (ペルヒドロリシス) を指示反応として用いることにより、グルコースオキシダーゼ (GOD) のみを用いてグルコース分析ができることを最近著者らは見いだした。本研究ではこの蛍光指示反応系の血糖値測定における有効性を評価した。本手法の血しょう試料への適用は、硫酸亜鉛/水酸化バリウムを用いる除タンパク操作並びに低濃度つまり 10 mM のリン酸緩衝液で調製した GOD 溶液を用いることにより可能であった。その GOD 溶液の使用により、ACR 共存下での除タンパク処理した試料の酵素反応中における析出物の生成が抑制されただけでなく、ACR のペルヒドロリシスを蛍光指示反応として用いる過酸化水素分析の感度が向上した。本法はグルコース濃度 0~250 mg/100 ml の範囲で良好な検量線 (相関係数, 1.000) を与えた。血漿試料のグルコース分析は相対標準偏差 2% 以下で行うことができ、本法が優れた同時再現性を有することが示された。本法で得た血糖値は、トリンダー法により決定した値に比べて多少大きい値であった。アスコルビン酸の添加効果の評価及び回収試験を行った結果から、両法で得た血糖値間の差はトリンダー法の確度の低さに由来することが示唆された。これらの結果並びにアセトニトリル中における ACR の優れた液状安定性を考慮すると、GOD/ACR 法が妨害物質の影響を受けにくい確度の高い血糖値測定法としての実用性を有していると考えられる。