

報 文

レサズリンの還元を蛍光指示反応として用いる血糖値測定

松浦 伸哉*, 山内 雄二*, 大森 秀信*, 前田 初男®*

Blood glucose determination with the reduction of resazurin as
a fluorometric indicator reaction

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

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6, Yamada-Oka, Suita-shi, Osaka 565-0871

(Received 12 July 2001, Accepted 31 July 2001)

The applicability of a resazurin/glucose dehydrogenase/ β -nicotinamide adenine dinucleotide/diaphorase system as a fluorometric indicator reaction for the determination of blood glucose was explored. This indicator reaction is based on the generation of fluorescent resorufin from resazurin through an enzymatic reaction initiated by the addition of glucose. A fluorometric method with the indicator reaction afforded a calibration curve over a glucose concentration of range between 10 and 5000 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, and was successfully capitalized in a glucose determination of a plasma without a deproteinization procedure, where the relative standard deviation ($n = 10$) was less than 2%. In addition, ascorbic acid, even in large excess, had almost no adverse effect on the indicator reaction. It was found that the fluorescence due to resorufin is quenched by resazurin, the extent of which depends on the concentration ratio between resorufin and resazurin: when the ratio was 1 : 20, the original fluorescence intensity was quenched by more than 90%. Thus, it is of great interest to give a warning that the initial concentration of resazurin is an important determinant of the sensitivity in fluorometry with the reduction of resazurin to resorufin as a general indicator reaction.

Keywords : reduction of resazurin; indicator reaction; fluorometric analysis of glucose; blood glucose; glucose dehydrogenase.

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¹⁾。代表的なものとして、指示酵素としてペルオキシダーゼ (POD) を用いるグルコースオキシダーゼ/POD 法^{2)~4)}と、デヒドロゲナーゼを用いるヘキソキナーゼ/グルコース-6-リン酸脱水素酵素法⁵⁾⁶⁾及びグルコースデヒドロゲナーゼ法⁷⁾⁸⁾がある。POD 共存下での過酸化水素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。酵素反応により β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD^+) から生成す

るその還元体 (NADH) に由来する 340 nm における吸光度の変化量を測定する後者は、生体成分による影響は少ないと言われている。しかし、溶血や乳びによる影響を受ける可能性がある検出波長並びに検出感度に改善の余地がある。後者のこの問題点の解決は、ジアホラーゼ共存下、 NADH による還元的色素生成を指示反応として組み込むことによりこれまで試みられ、既に様々なテトラゾリウム塩が優れた還元系色原体として開発されている。

一方、レサズリンがテトラゾリウム塩と同様に NADH /ジアホラーゼ系により蛍光色素レゾルフィンに還元されるため、レサズリン/デヒドロゲナーゼ/ NAD^+ /ジアホラーゼ系が様々な生体成分の蛍光指示反応として利用できることは既に報告されている⁹⁾¹⁰⁾。しかし、グルコースデヒドロゲナーゼ (GlcDH) が入手容易にもかかわらず、本指

* 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

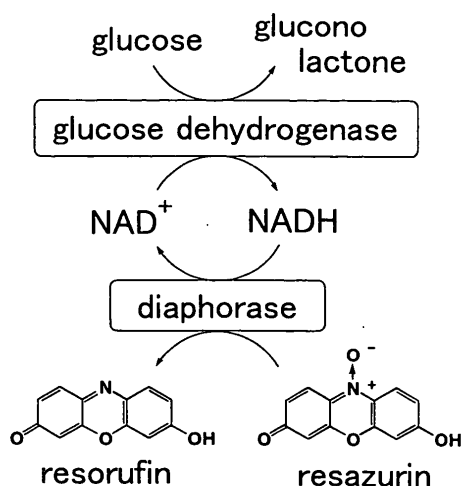


Fig. 1 Enzymatic reduction of resazurin to resorufin as a fluorometric indicator reaction

示反応系はグルコース分析には応用されていない。そこで著者らは、レゾルフィン及びその誘導体を用いる新規蛍光分析法の開発研究^{11)~14)}の一環として、レサズリン/GlcDH/ NAD^+ /ジアホラーゼ系の血糖値分析における指示反応としての可能性を評価した (Fig. 1)。その結果、本蛍光分析法が除タンパク操作を必要としない血糖値測定法となることを見いだした。また、分析条件を検討した際、レゾルフィンの蛍光がレゾルフィンに対してレサズリンが大過剰存在すると消光されること、つまりレサズリンのレゾルフィンへの還元を指示反応として用いる分析法の感度は、レサズリンの初期濃度によって左右される可能性があることを初めて明らかにした。今回、これらの結果について報告する。

2 実験

2.1 試薬

100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) は、リン酸水素二ナトリウム (和光純薬) 11.50 g 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物 (和光純薬) 2.96 g を脱塩蒸留水 1000 ml に溶解し調製した。レサズリン溶液 (20 μM) はレサズリンナトリウム (和光純薬) 5.02 mg をリン酸緩衝液 1000 ml に溶解して調製した。 NAD^+ 溶液 (2.0 mM) は NAD^+ (和光純薬) 132.7 mg をリン酸緩衝液 100 ml に溶解して調製した。GlcDH 溶液 (2.0 U/ml) は GlcDH (EC 1.1.1.47, 和光純薬, 76 U/mg, パチルス属製) 2.63 mg をリン酸緩衝液 100 ml に溶解して調製した。ジアホラーゼ溶液 (10 U/ml) はジアホラーゼ (EC 1.6.99.X, 和光純薬, 478 U/mg, クロストリジウムクルイベリ製) 2.09 mg をリン酸緩衝液 100 ml に溶解して調製した。グルコース標準液及びアスコルビン酸溶液は、グルコース及びアスコルビン酸 (以上, 和光純薬) を脱塩蒸留水で溶解又は希釈して調

製した。

2.2 血しょう試料

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 2 人から血液を真空採血管 (テルモ, ペノジェクト II) に採血し, 4°C, 3000 rpm で 10 分間遠心分離することにより得た上澄みを, 脱塩蒸留水により 100 倍希釈し, それぞれを血しょう試料 A 及び B として用いた。

2.3 グルコースの定量

測定はペルチェ式恒温セルホルダー (日本分光, ETC-272) を装着した分光蛍光光度計 (日本分光, FP-750) を用いて, 励起波長 568 nm, 検出波長 582 nm, 温度 25°C で行った。測定用セルにレサズリン溶液, GlcDH 溶液, ジアホラーゼ溶液, NAD^+ 溶液をそれぞれ 0.7 ml ずつ注入し, グルコース標準液又は血しょう試料を 0.2 ml 注入し, その 10 秒後から 5 分間蛍光強度を経時的に測定した。その 5 分間に観測された蛍光強度の増加量をグルコース由来の応答として用いた。4 アミノアンチピリン及びフェノールを用いるトリンダー法によるグルコースの定量は, 既報¹⁴⁾の方法に従い行った。

2.4 レゾルフィン由来の蛍光強度に対するレサズリン濃度の影響

レゾルフィン (10 nmol) 及びレサズリン (0, 2, 10, 20, 100, 200 nmol) を含むリン酸緩衝溶液 3.0 ml について 25°C における蛍光強度 (励起波長 568 nm, 検出波長 582 nm) を測定し, 消光現象を評価した。

2.5 アスコルビン酸の影響

脱塩蒸留水を用いて調製したグルコース (2.0 mg/100 ml) 及びアスコルビン酸 (0, 20, 100, 500 μM) を含む水溶液 0.2 ml について 2.3 と同様な測定を行い, アスコルビン酸の添加効果を評価した。

3 結果と考察

3.1 試液濃度の設定

本指示反応を最適化するためレサズリン, GlcDH, ジアホラーゼ及び NAD^+ の濃度の影響について, 5.0 mg/100 ml 又は 1.0 mg/100 ml グルコース標準液を用いて評価した。その結果を Fig. 2~5 に示す。得られたグルコース由来の応答は GlcDH 濃度が高いほどより大きくなったが, ジアホラーゼ及び NAD^+ の場合では, ある濃度以上では感度の増加は見られなかった。これらの結果よりグルコースの定量には 2.0 U/ml の GlcDH 溶液, 10 U/ml のジアホラーゼ溶液, 2.0 mM の NAD^+ 溶液を用いることにした。レサズリン濃度の影響については非常に興味深い結

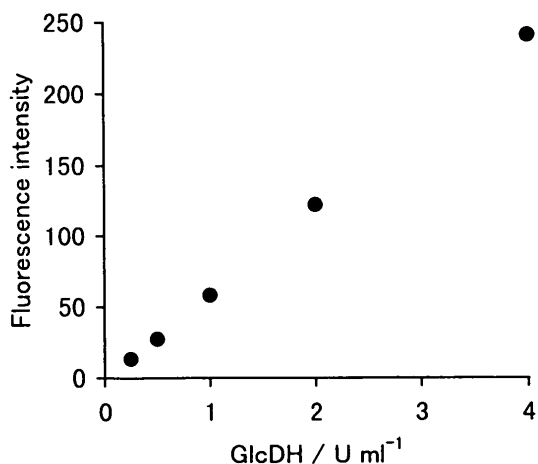


Fig. 2 Relationship between GlcDH concentration and increment in fluorescence intensity observed during the enzymatic reaction

A mixture of resazurin (20 μ M, 0.7 ml), GlcDH (0.7 ml), diaphorase (10 U/ml, 0.7 ml), NAD^+ (2.0 mM, 0.7 ml) and glucose (5.0 mg/100 ml, 0.2 ml) was incubated at 25°C for 5 min. Excitation and emission wavelengths were 568 and 582 nm, respectively.

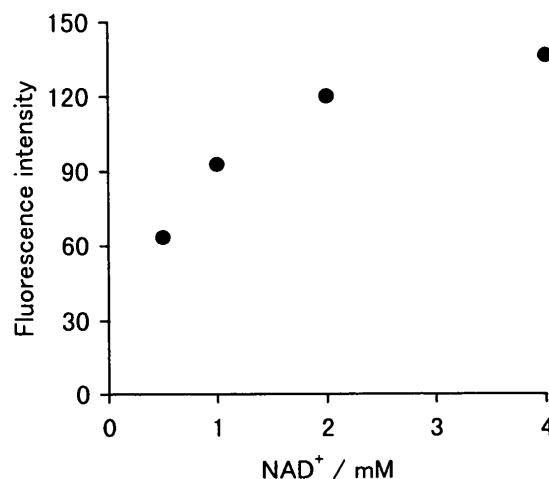


Fig. 4 Relationship between NAD^+ concentration and increment in fluorescence intensity observed during the enzymatic reaction

A mixture of resazurin (20 μ M, 0.7 ml), GlcDH (2.0 U/ml, 0.7 ml), diaphorase (10 U/ml, 0.7 ml), NAD^+ (0.7 ml) and glucose (5.0 mg/100 ml, 0.2 ml) was incubated at 25°C for 5 min. Excitation and emission wavelengths were 568 and 582 nm, respectively.

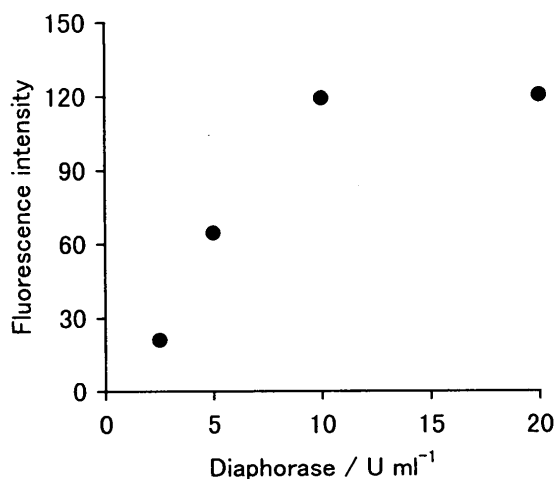


Fig. 3 Relationship between diaphorase concentration and increment in fluorescence intensity observed during the enzymatic reaction

A mixture of resazurin (20 μ M, 0.7 ml), GlcDH (2.0 U/ml, 0.7 ml), diaphorase (0.7 ml), NAD^+ (2.0 mM, 0.7 ml) and glucose (5.0 mg/100 ml, 0.2 ml) was incubated at 25°C for 5 min. Excitation and emission wavelengths were 568 and 582 nm, respectively.

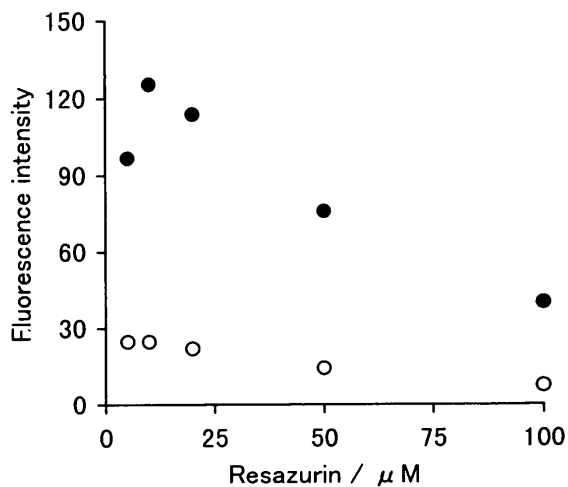


Fig. 5 Relationship between resazurin concentration and increment in fluorescence intensity observed during the enzymatic reaction

A mixture of resazurin (0.7 ml), GlcDH (2.0 U/ml, 0.7 ml), diaphorase (10 U/ml, 0.7 ml), NAD^+ (2.0 mM, 0.7 ml) and glucose (5.0 mg/100 ml, ●; 1.0 mg/100 ml, ◐; 0.2 ml) was incubated at 25°C for 5 min. Excitation and emission wavelengths were 568 and 582 nm, respectively.

果を得た。Fig. 5に示すように2種類の濃度のグルコース標準液のいずれを用いた場合にも、高濃度のレサズリン溶液を用いると蛍光応答の減少が観測された。これらの結果から、レサズリン溶液の濃度は10 μ Mが最適であると考えられた。しかし、より高濃度のレサズリン溶液を用いた場合、より高濃度のグルコース分析が本手法により可能に

なると期待された。したがって、わずかに感度は低下すると考えられるが、20 μ Mレサズリン溶液を本酵素分析法に用いることにした。

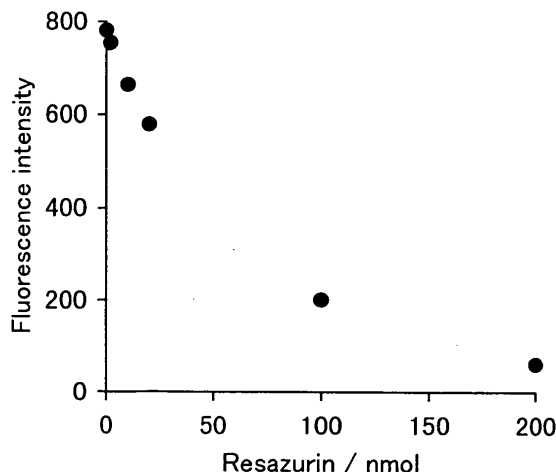


Fig. 6 Change in fluorescence intensity due to resorufin (10 nmol) in the presence of resazurin at various concentrations

Observed in 3.0 ml phosphate buffer. Excitation and emission wavelengths were 568 and 582 nm, respectively.

3・2 高濃度レサズリンによる蛍光消光現象

前述の結果は、レサズリンによってレゾルフィン由来の蛍光が消光されることを示唆している。そこでレゾルフィン由来の蛍光強度に対するレサズリンの添加効果を検討した。Fig. 6 に示すように、レゾルフィン由来の蛍光強度はレサズリンの添加濃度の増加とともに減少した。これまでレサズリンのレゾルフィンへの還元反応が、NADH 分析における指示反応としてしばしば利用されているが、このような消光現象は全く報告されていない。Fig. 5 と 6 の結果は、レサズリンのレゾルフィンへの変換を指示反応として利用する場合、レサズリン試液の濃度設定がその分析法の感度に多大に影響することを示すものであり、非常に興味をもたれる。なお、現在のところ観察された消光現象は、レサズリンとレゾルフィン間における π - π コンプレックスの形成に基づくものと推定しているが、その詳細は不明である。

3・3 血糖値の測定

本指示反応系によりグルコース標準溶液を用いて検量線を作成したところ、10～5000 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ の範囲で良好な直線関係（相関係数、0.9999）が得られた（Fig. 7）。本法を単に 100 倍に希釈しただけの血しょう試料 A 及び B に適用し、作成した検量線から血糖値を決定したところ、それぞれ 91.2 及び 80.9 $\text{mg}/100\text{ ml}$ であった。また、これらの血糖値測定における相対標準偏差、RSD ($n=10$) はそれぞれ 1.75 及び 2.87% であり、本法は優れた同時再現性を有することが示された。一方、フェノール及び 4-アミノアンチピリンを用いるトリンダー法により決定した血糖

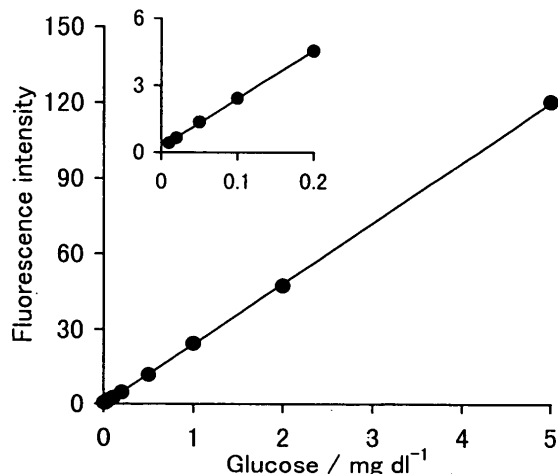


Fig. 7 Calibration curve using increment in fluorescence intensity observed during the enzymatic reaction

A mixture of resazurin (20 μM , 0.7 ml), GlcDH (2.0 U/ml, 0.7 ml), diaphorase (10 U/ml, 0.7 ml), NAD^+ (2.0 mM, 0.7 ml) and glucose (0.2 ml) was incubated at 25°C for 5 min. Excitation and emission wavelengths were 568 and 582 nm, respectively.

Table 1 Effects of ascorbic acid on increment of fluorescence intensity observed during a mixture of resazurin, GlcDH, diaphorase, NAD^+ and glucose was incubated at 25°C for 5 min^{a)}

Concentration added/ μM	Relative intensity, %
0	100.0
20	103.5
100	100.2
500	97.3

a) The conditions are the same to those in Fig. 7 except that glucose (2.0 $\text{mg}/100\text{ ml}$, 0.2 ml) was used.

値は、血しょう試料 A と B についてそれぞれ 98.4 及び 85.5 $\text{mg}/100\text{ ml}$ であった。これらの結果により、トリンダー法に比べて 6% 程度低い血糖値を与えたが、本蛍光分析法が満足すべき確度を有していることが示された。

3・4 アスコルビン酸の影響

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、アスコルビン酸の影響を検討した。アスコルビン酸を非添加又は添加したグルコース標準液（グルコース 2.0 $\text{mg}/100\text{ ml}$ ）を試料として用いて、同様に測定を行った。その結果を Table 1 に示す。0～500 μM の濃度範囲でアスコルビン酸が共存しても、蛍光強度変化にはほとんど影響はなかった。血液中の標準的なアスコルビン酸濃度が 0.1 mM 以下であること、並びに本分析法は 100 倍希釈の血しょう試料に適用できるこ

とを考慮すれば, 血糖値測定に適用する上でアスコルビン酸の妨害は本指示反応系に対してほとんどないと言える。

4 結 言

レサズリン, GlcDH, NAD^+ 及びジアホラーゼからなる指示反応系を用いる蛍光グルコース分析法が, 除タンパク操作を必要としない, 高感度な血糖測定法として利用できることを明らかにした。また, レサズリンからレゾルフィンへの変換反応は, NADH の検出に古くから用いられているが, レゾルフィン由来の蛍光強度はレサズリンの共存により消光されるため, この還元反応を指示反応として用いる場合, レサズリン試液の濃度に対して十分に注意を払うべきであることも明らかとなった。

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感謝する。

文 献

- 1) 佐々木 慎一: 臨床検査 MOOK, **18**, 13 (1984).
- 2) 青山 典仁: 臨床検査, **41**, 1014 (1997).
- 3) 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).

- 4) G. Michael, H. Mollering, J. Siedel: "Methods of Enzymatic Analysis," 3rd ed., Edited by H. U. Bergmeyer, Vol. 1, p. 178 (1983), (VCH Publishers, Weinheim).
- 5) W. L. Baker: *J. Inst. Brew.*, **97**, 457 (1991).
- 6) R. J. L. Bondar, D. C. Mead: *Clin. Chem.*, **20**, 586 (1974).
- 7) I. Liimatainen: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **41**, 319 (1981).
- 8) C. P. Price, K. Spencer: *Anal. Clin. Biochem.*, **16**, 100 (1979).
- 9) G. G. Guilbault, D. N. Kramer: *Anal. Chem.*, **37**, 1219 (1965).
- 10) G. G. Guilbault, S. H. Sadar, R. McQueen: *Anal. Chim. Acta*, **45**, 1 (1969).
- 11) H. Maeda, S. Matsu-ura, T. Senba, S. Yamasaki, H. Takai, Y. Yamauchi, H. Ohmori: *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 897 (2000).
- 12) H. Maeda, S. Matsu-ura, Y. Yamauchi, H. Ohmori: *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 622 (2001).
- 13) H. Maeda, S. Matsu-ura, M. Nishida, T. Senba, Y. Yamauchi, H. Ohmori: *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 294 (2001).
- 14) 松浦 伸哉, 山内 雄二, 大森 秀信, 前田 初男: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 475 (2001).

要 旨

レサズリン, グルコースデヒドロゲナーゼ, β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド及びジアホラーゼからなる指示反応系の血糖値測定における有効性を評価した。酵素反応によってレサズリンから生成するレゾルフィン由来の蛍光強度変化の測定に基づく本グルコース分析法は, グルコース濃度 10~5000 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ の範囲で良好な検量線 (相関係数, 0.9999) を与えた。本法を血しょう試料に適用したところ, 除タンパク操作することなく, 相対標準偏差 3% 以下で血糖値測定が可能であった。本指示反応系はアスコルビン酸の共存効果をほとんど受けなかった。また, レゾルフィン由来の蛍光が, レゾルフィンに対してレサズリンが大過剰存在すると消光されることを見いだした。消光はレゾルフィンとレサズリンの濃度比に依存し, 濃度比が 1:20 のときには蛍光強度は 90% 以上減少した。すなわち, レサズリンのレゾルフィンへの変換を指示反応として用いる蛍光分析法の感度に対して, レサズリンの初期濃度が非常に重要な決定因子であることを初めて明らかにした。