

ノ ー ト

電気化学検出-フローインジェクション分析によるアセチルコリン
エステラーゼ活性測定法の開発後藤 正志^{®*}, 小林 幹男*Development of a determination method for acetylcholinesterase activity
by FIA with electrochemical detection

Masashi GOTO and Mikio KOBAYASHI

*Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1,
Mitahora-Higashi, Gifu-shi, Gifu 502

(Received 2 December 1996, Accepted 25 December 1996)

A new method using flow-injection analysis (FIA) with electrochemical detection for determining acetylcholinesterase activity was developed by using micro-enzyme electrode. The micro-enzyme electrode was made by directly cross-linking choline oxidase using glutaraldehyde vapor on a micro-platinum disk (diameter 200 μm). The detection limit of acetylcholinesterase was 0.005 U/ml ($S/N=3$) and the relative standard deviation of its activity measurement at 0.1 U/ml level was $\pm 1.6\%$ ($n=6$). The present method was superior to the conventional methods with respect to the detection limit and precision.

Keywords : determination of acetylcholinesterase activity; FIA; micro-enzyme electrode; electrochemical detection.

1 緒 言

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は神経組織, 胸せん (腺), 筋肉及び赤血球などに存在する. 神経組織や筋肉における刺激伝達においてはアセチルコリン (ACh) が放出されるが, AChE はこれをコリン (Ch) と酢酸に分解し, 新たな刺激に対応する能力を再生させる. 一方, 血清, 肝臓, すい (膵) 臓に存在するコリンエステラーゼ (ChE) は種々のコリンエステルを加水分解し, Ch と有機酸を生じる. ChE は肝で合成され, たえず血中に遊離されている. 従って, 血清中の ChE の活性測定は日常の肝機能や手術前の検査, 有機リン (農薬) 中毒あるいはサリン中毒の判定に広く行われてい

る¹⁾.

従来の ChE 活性測定には, ACh を基質として用い生じた酢酸に起因する pH 変化を測定する方法²⁾, アセチルチオコリンを基質として用い生じたチオコリンを吸光度測定する方法³⁾⁴⁾, 及びベンゾイルコリンを基質として用い生じた Ch を吸光度測定する方法⁵⁾が主に採用されてきたが, その感度, 精度共に不十分であった. 本研究では, コリンオキシダーゼ (ChO) を白金上に固定化した微小酵素電極を試作し, 酵素反応により生じた過酸化水素を検出する電気化学検出-フローインジェクション分析 (ECD-FIA) による AChE 及び ChE 活性測定法の開発を試みた.

* 岐阜薬科大学薬品分析化学教室: 502 岐阜県岐阜市三田洞東 5-6-1

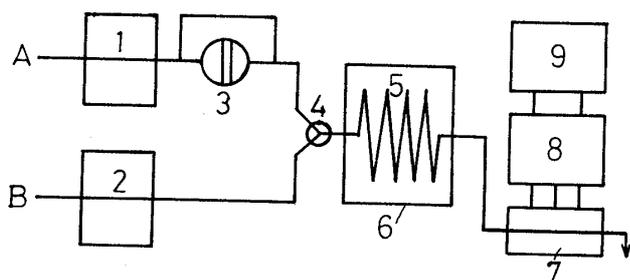


Fig. 1 Block diagram of flow-injection analysis system

1, 2: pumps ; 3: sample injector; 4: mixing joint; 5: reaction tube; 6: air bath; 7: electrolytic flow cell; 8: potentiostat ; 9: recorder; A: buffer solution; B: substrate solution

2 実 験

2.1 試 薬

AChE (EC 3.1.1.7, from Electric Eel), ChE (EC 3.1.1.8, from Horse serum), 及び ChO (EC 1.1.3.17, from *Alcaligenes* species) は Sigma 製を, 塩化 ACh 及び塩化 Ch はナカライテスク製をそのまま用いた. 緩衝液としては 0.2 M リン酸二水素カリウム水溶液と 0.2 M リン酸水素二カリウム水溶液を適当に混和し, pH 8.0 の緩衝液を調製して使用した.

2.2 微小酵素電極の作製

微小 ChO 電極は既報⁶⁾の直接法に従って作製した. すなわち, 直径 200 μm の白金円盤を基盤電極としてこの電極表面上に 250 U/ml の ChO 溶液を 1.0 μl 添加し, 室温で十分乾燥させた後, 飽和グルタルアルデヒド蒸気中で約 20 分間架橋し固定化を行った.

2.3 装置及び操作法

酵素活性測定に用いた FIA 装置の概略を Fig. 1 に示す. 本装置は 2 流路からなり, リン酸緩衝液の流れに試料を注入し, 基質水溶液の流れと合流させ, 反応管 (5) 中で酵素反応を起こさせて Ch を生成させる. この流れを微小 ChO 酵素電極を作用電極とする電解セル (7) 中に導き, 電極表面上で生成した過酸化水素に基づく酸化電流を測定することにより, AChE 又は ChE 活性を求める. 反応管には内径 0.5 mm, 長さ 2 m のテフロン管を用い, 37°C の恒温槽 (6) に設置した. 恒温槽には Sugai 製カラムヒーター U-620 型を用いた. 電解セルには, Fig. 2 に示すような wall-jet 型三電極方式電解フローセルを自作して用いた. 微小酵素電極は内径

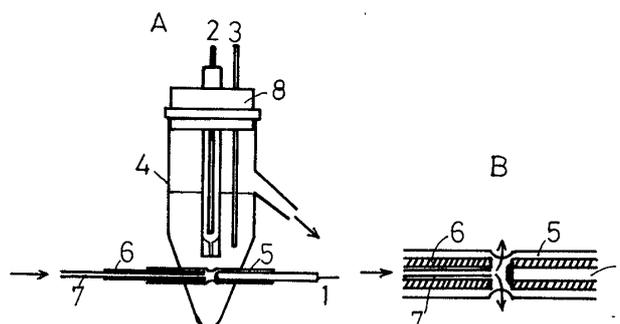


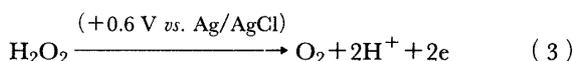
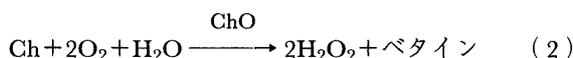
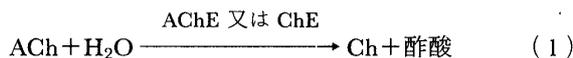
Fig. 2 Construction of electrolytic micro-flow cell with wall-jet type

(A): whole cell; (B): working electrode. 1: micro-enzyme electrode; 2: reference electrode (Ag/AgCl); 3: counter electrode (platinum wire); 4: polypropylene tube cell; 5: Teflon tube (250 μm i.d.); 6: fused-silica tube (250 μm i.d.); 7: fused-silica tube (100 μm i. d.); 8: rubber plug

250 μm のテフロン管中に挿入し, Fig. 2B に示すように試料溶液が電極の酵素膜に直接当たるようにした. Ag/AgCl 参照電極及び白金対極は試料溶液のテフロン管からの流出部分にできる限り接近させて設置した. 電流測定にはポテンショスタット (扶桑製, HECS-972) 及び t-Y レコーダー (理研電子製, F35) を用いた. 緩衝液及び基質水溶液の送液には送液ポンプ (島津製, LC-10AD 及び同 LC-9A) を使用した. 試料注入はサンプルインジェクター (Rheodyne 製, 7125; 20 μl) を用いた.

3 結果と考察

微小 ChO 電極による AChE 又は ChE 活性測定原理は式 (1) の酵素反応により基質である ACh を Ch に変換する. 次いで電極上で式 (2) の酵素反応により Ch を過酸化水素に変換し, 生成した過酸化水素を白金基盤電極で定電位電解する際に流れる酸化電流 {式 (3)} を測定し, 間接的に AChE 又は ChE 活性を求めることに基づく.



3.1 応答に及ぼす緩衝液・基質水溶液の流量の影響
緩衝液と基質水溶液の流量比を 1:1 と固定し,

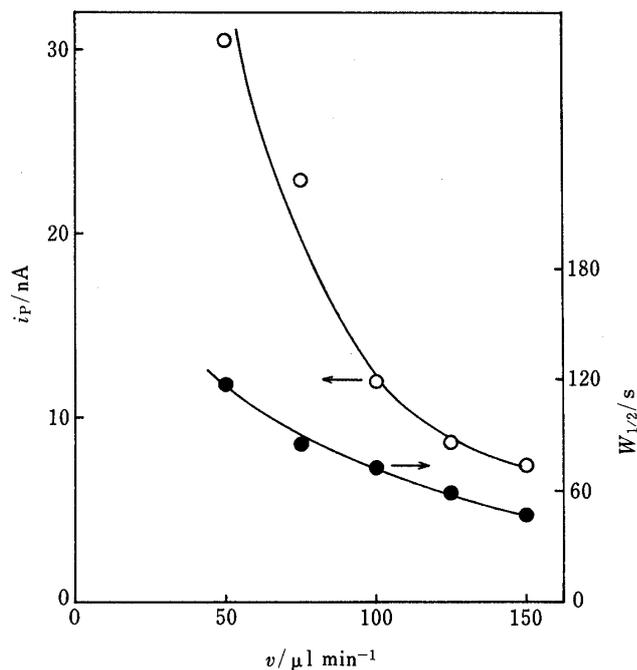


Fig. 3 Effect of each flow rate of buffer solution and substrate solution on response

○: peak current; ●: peak width at half-height; Sample injected: 20 μl of about 0.8 U/ml acetylcholinesterase; Applied potential: 0.60 V vs. Ag/AgCl; Substrate solution: 2.0 mM acetylcholine chloride aqueous solution

AChE を試料として応答に及ぼす各流量の影響を調べた結果を Fig. 3 に示す。ピークの半値幅（ピーク高の半分的位置でのピーク幅）は流量が小さくなるにつれて徐々に大きくなる傾向があったが、ピーク電流は流量が小さくなるにつれて極端に大きくなる傾向があった。これは流量が小さくなればなるほど式(1)の酵素反応時間が長くなり、Ch 発生量が多くなることに起因すると考えられる。しかし、流量が小さくなればそれだけ分析時間が長くなるので定量操作では両液の流量を各 75 $\mu\text{l}/\text{min}$ とすることにした。

3.2 応答に及ぼす基質水溶液中の基質濃度の影響

応答に及ぼす基質水溶液中の塩化 ACh 濃度の影響を Fig. 4 に示す。ピーク電流は基質濃度が増すにつれて大きくなり、約 0.5 U/ml の AChE 測定に対して約 0.5 mM 以上でほぼ一定の値を示した。定量操作では塩化 ACh 濃度を 2.0 mM とすることにした。

3.3 典型的な応答及び検量線

試料として 1.0 mM 塩化 Ch を注入した場合と 0.8

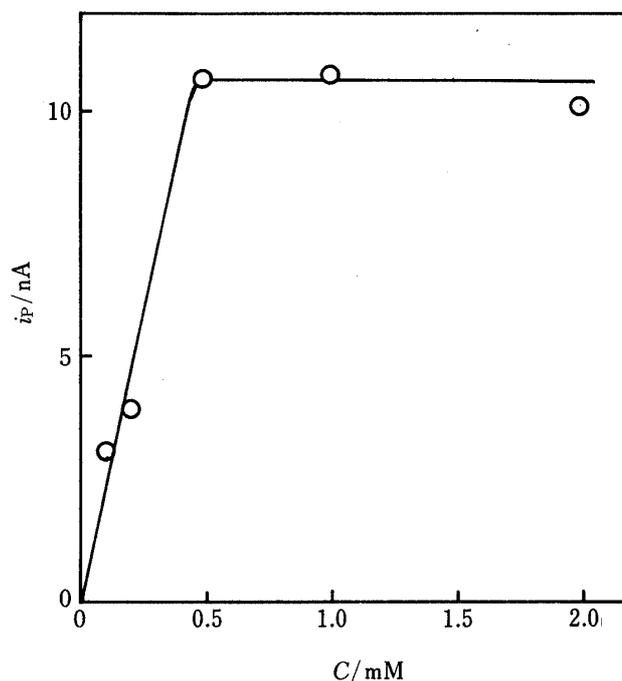


Fig. 4 Effect of acetylcholine chloride concentration in the substrate solution on peak current

Each flow rate of buffer solution and substrate solution: 75 $\mu\text{l}/\text{min}$; Sample injected: 20 μl of about 0.5 U/ml acetylcholinesterase

U/ml の AChE を注入した場合に得られた応答を比較して Fig. 5 に示す。後者の場合には前者の場合に比べてピーク形が左右非対称でややテイリングした。これは後者の場合には前者の場合に比べて、基質から Ch の発生反応が起こらなければならないことに起因していると考えられる。AChE の応答は試料注入後約 2.1 分から出始め、約 3.4 分後に最大になった。この場合 1 時間に約 10 試料の分析が可能であった。又、ピーク電流は 0.01~5.00 U/ml の濃度範囲で AChE 濃度と直線関係にあり、0.1 U/ml レベルの AChE 測定に対する相対標準偏差は $\pm 1.6\%$ ($n=6$) であった。本実験条件下での AChE の検出限界は $S/N=3$ で約 0.005 U/ml であった。

3.4 微小酵素電極の寿命及び妨害物質の影響

塩化 Ch を試料として電極の長期安定性を調べた結果、電極の酵素 (ChO) 活性は徐々に低下し、1 週間後には最初の活性値の約 56% になった。しかし、毎日 1 回検量線を作成すれば十分使用できることが分かった。実際試料中の AChE 活性測定に妨害を起こすものの代

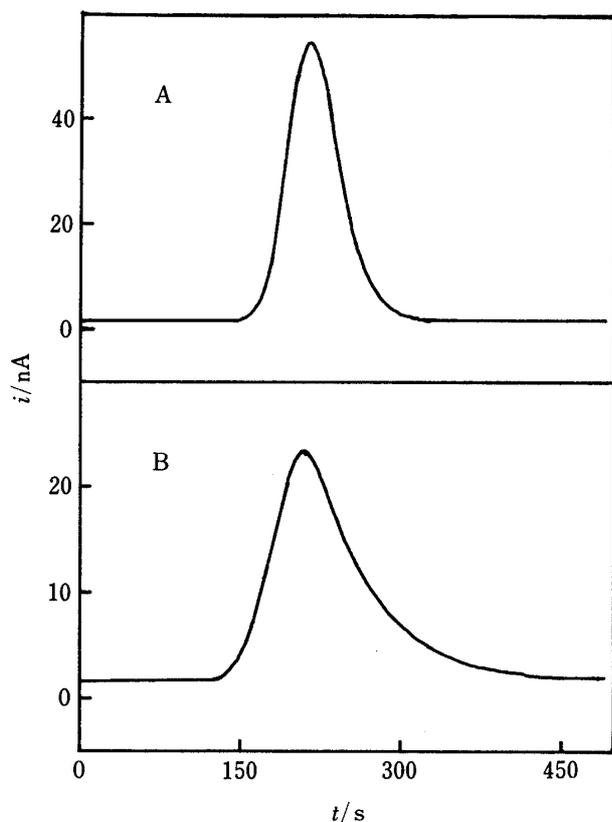


Fig. 5 Typical responses for choline chloride and acetylcholinesterase

(A): 1.0 mM choline chloride; (B): about 0.8 U/ml acetylcholinesterase. Experimental conditions are the same as in Fig. 3.

表例としてアスコルビン酸が考えられる。そこで酵素電極の表面にナフィオン膜を被覆することを試みた。その結果、ナフィオン膜を被覆するとアスコルビン酸の場合には被覆しない場合と比べて応答が約 1 割まで減少した。それに対して塩化 Ch の場合には約 5 割の応答を保持することが分かった。このように、陰イオン性のナフィオン膜を被覆することによって pH 8.0 で陰イオンであるアスコルビン酸の影響をかなり除去できることが明らかとなった。

(1994 年 10 月, 日本化学会第 68)
(秋季年会において一部発表)

文 献

- 1) 奥田 潤, 南原利夫編: “臨床化学”, p. 151 (1987), (南江堂).
- 2) 高橋 浩, 柴田 進: 医学と生物, **20**, 96 (1951).
- 3) G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr., R. M. Featherstone: *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88 (1961).
- 4) G. Szasy: *Clin. Chim. Acta*, **19**, 191 (1968).
- 5) H. Okabe, K. Sagesaka, N. Nakajima, A. Noma: *Clin. Chim. Acta*, **80**, 87 (1977).
- 6) 後藤正志, 森影一夫, 江坂幸宏, 宇野文二, 加納健司: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 403 (1994).