

酵素的サイクリング法による自動分析装置の開発

研究協力者 鈴木 義之

(東京大学医学部小児科)

加藤 尚彦

(東京大学医学部脳研究施設・生化学部門)

われわれは先天異常の中で、代謝障害による疾患のモニタリングのために、その正確な診断法の開発につとめてきた¹⁾²⁾。これまではそれぞれの検体を個別的に、用手法により分析してきたが、もし多数検体を扱うことになれば、特殊な装置の開発が必要となる。

先天性代謝異常の診断のためには、欠損酵素の同定、酵素反応の基質の蓄積の確認などがおこなわれるが、これらの生体内化合物の種類は多く、現行の自動分析装置で操作をおこなうには限界がある。そこで今回われわれは、高感度かつ特異的な化学定量法である酵素的サイクリング法を用いた自動分析装置の開発をはじめた。

酵素的サイクリング法の原理

これは、2つの酵素によるサイクル反応により、微量の補酵素を増幅定量するものである。その原理は、Lowry, 加藤らにより確立され、現在3種の反応サイクルが使用されている³⁾。すなわち NAD^+ - NADH , NADP^+ - NADPH , CoASH -アセチル CoA の系である。その1例として、 NAD サイクリング反応を示すと、図1のようになる。

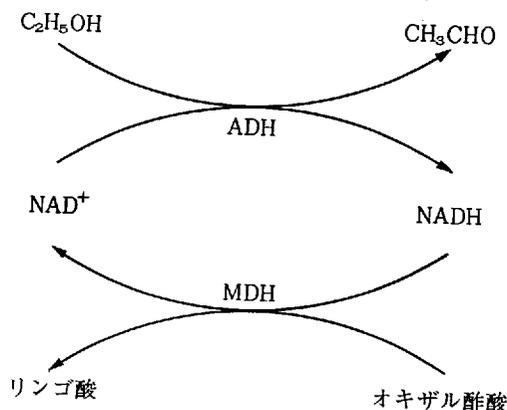


図1 NAD サイクリング反応

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: エタノール

CH_3CHO : アセトアルデヒド

ADH: アルコールデヒドロゲナーゼ

MDH: リンゴ酸デヒドロゲナーゼ

この反応系において、エタノール (C₂H₅OH) およびアルコール脱水素酵素 (ADH) が過剰に存在し、NAD⁺ の量が極微量であれば、瞬間的に反応がすすみ、NADH とアセトアルデヒド (CH₃CHO) を産生する。さらにそこにオキザル酢酸とリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) が過剰に存在すれば、NADH はすべて再び NAD⁺ となり、反応サイクルができる。1回のサイクルにより、NAD⁺ の量は不変であるが、アセトアルデヒド、リンゴ酸は等モルだけ産生され、結局何らかの方法で反応を停止させない限り、サイクル反応がつづくことになる。その結果、その回数に等しい倍数のリンゴ酸ができる。リンゴ酸は MDH の逆反応により、等モルの NADH として定量可能であり、最終的には1分子の NAD⁺ または NADH が、サイクル反応の回数倍のリンゴ酸、ひいては NADH に変換されることになる。

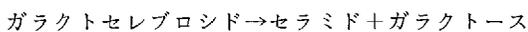
このサイクリング反応は、何らかの形で、上記の3種類の補酵素に変換できる物質であれば、原理的にはすべて測定可能である。具体的には炭水化物およびその代謝物質、アミノ酸および関連物質、脂質および関連物質、ヌクレオチド関連物質、ならびにこれらの代謝過程に関与する酵素などであり、その応用範囲はきわめて広い。

サイクリング反応の診断への応用

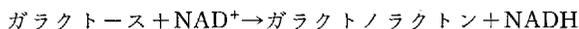
この反応は基礎的研究に応用されていたが、われわれは疾患の診断に応用することを考え、第1の物質としてガラクトースをとりあげた。われわれが扱ってきた代謝性疾患の中には、ガラクトース結合の分解酵素欠損症が多く、しかもその一部に特殊なラジオアイソトープ標識化合物を用いなければ、診断ができないからである。

具体的にはガラクトセレブロシダーゼを試みた。この測定には以下の4段階の反応を用いた。

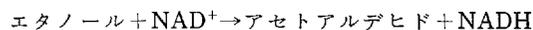
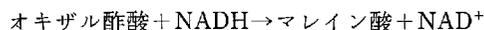
1) ガラクトセレブロシダーゼ



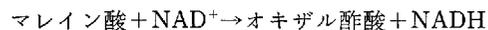
2) ガラクトースの NADH への変換



3) NADH の増幅 (サイクリング)



4) 指示反応



その具体的条件についてはすでに報告し、用手法によるデータも蓄積しつつある⁴⁾⁵⁾。その1例を図2に示す。Krabbe病はガラクトセレブロシダーゼ欠損症であり、ラジオアイソトープを用いた診断法はすでに確立されているが⁶⁾、酵素的サイクリング法を用いても、白血球、線維芽細胞、羊水細胞で酵素欠損を見出すことができた。患者の両親における白血球中ガラクトセレブロシダーゼ活性は、有意に低い値を示した。

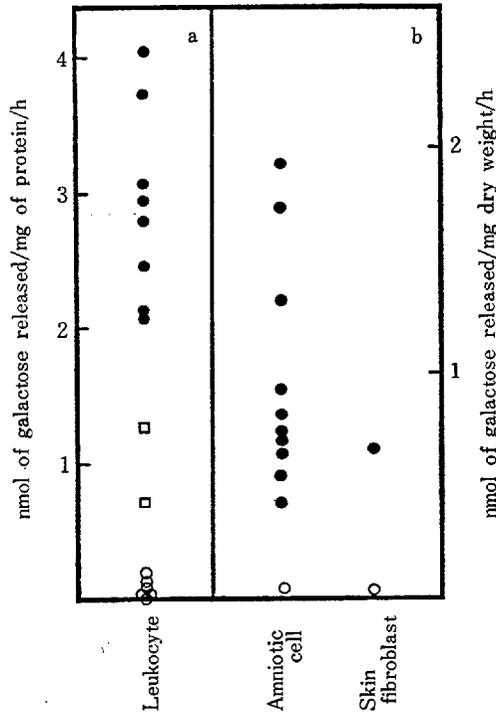


図2 酵素的サイクリング法によるガラクトセブロンダーゼ活性(文献5)
 ● 対照 □ Krabbe 病者の両親
 ○ Krabbe 病患者

自動分析装置の開発

ガラクトセブロンダーゼの測定において、第1および第2の反応は、この酵素およびその反応産物(ガラクトース)に特有であるが、一見サイクリング反応が開始されれば、それ以前の反応とかわりなく、定量測定が可能となる。そこで本研究では、第3、第4の反応を自動化することにし、汎用の分析装置の開発をめざした。

この装置の開発に最も問題となるのは、高度の時間的ならびに温度の制御である。図3に示したように、 -20°C より $+98^{\circ}\text{C}$ の間を短時間にコントロールすることは、これまでの分析装置では極めて困難であり、しかもこれらの反応を時間毎に制御してゆかねばならない。

ガラクトセブロンダーゼの測定の場合、この酵素の反応(反応1)およびガラクトースのNADH への変換(反応2)は、これまで通り手操作でおこなった。それを自動分析装置内のチューブに移し、 25°C 、1時間(図3、A)でNAD 増幅反応を終え、 98°C 、30分(B)加熱して、サイクリング酵素を熱変性させて反応をとめ、ただちに 38°C に試験管を冷やす。以後指示反応と蛍光測定を行う間、水槽の温度は 39°C に保つ(C、D)。

装置の構造設計見取図を図4に示す。反応槽(1)にターンテーブル(3)を入れ、ロータリーエンコーダ(5)で回転角を調節する。反応槽には不凍液を入れ、循環ポンプ(7)を介して加熱器(9)、冷

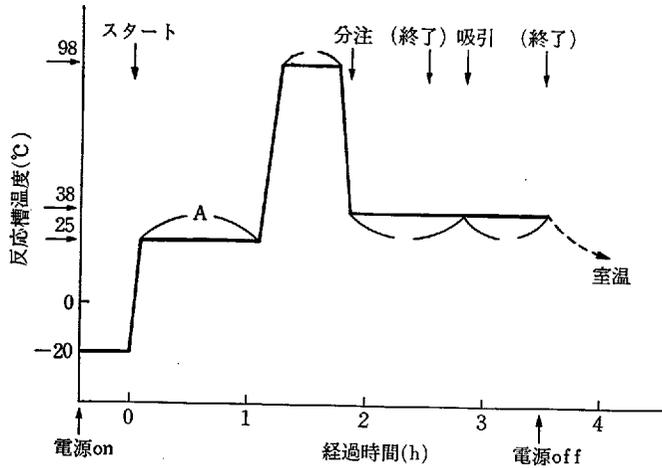


図3 サイクリング反応の温度制御

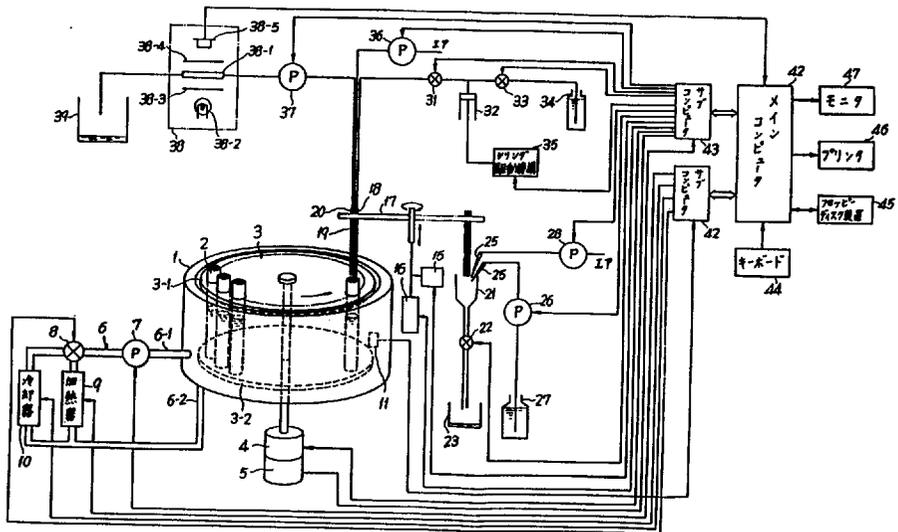


図4 サイクリング反応装置の構造設計見取図

却器(10)と接続する。温度は温度センサ(11)で検出され、制御される。反応槽の上には昇降可能なアーム(17)を設定し、3本のノズルを固定する。ノズル(18)は指示反応液(34)と連結し、駆動機構(35)により分注する。ノズル(19)はエアポンプ(36)に連結し、空気によるチューブ内反応液の攪拌をさせるようにした。他の方法での攪拌は、容量が小さいため、十分な混合が困難であった。ノズル(20)は蛍光光度計(38)に連結し、蛍光測定後、廃液タンクに捨てる反応液の吸引に用いられる。これらのノズルは、洗浄槽(21)で洗浄し、次のチューブ操作に用いられる。

これらの動きを制御するために、3つのコンピュータを用いることにした。2つのサブコンピュータは、温度制御、ターンテーブルの回転およびそれに連動した他の部分の動きの制御を



図5 自動分析装置試作器

おこなう。メインコンピュータはサブコンピュータに指令を与えると共に、蛍光測定の情報直接処理し、演算、物質の定量、その他の操作をおこなうことになる。

現在、このシステムは最終的には完成していないが、本体部分は一応ルーチン操作が可能な形に作成し、臨床診断への応用を開始している（図5）。ただし、コンピュータ部分との連絡、一体化はまだおこなわれておらず、今後さらに改良をかさねる予定である。

考察ならびに結論

酵素的サイクリング法は、その測定操作から明らかなように、特異性の高い定量法である。そして、増幅反応を工夫すれば、極めて高精度の測定が可能となる。最高の増幅率は NAD サイクリング60,000倍、NADH サイクリング20,000倍、CoA サイクリング37,500倍と計算されている。これらを用いると、もしサイクリング反応を1回だけおこなうと、 10^{-15} モル程度の物質の検出が可能であり、通常のラジオアイソトープ測定と同程度の感度となる。しかも本法は反応容量が極めて少なくすみ、この点から相対的に感度をあげることが可能となった。ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、高速液体クロマトグラフィーは、感度の点ではやや優るが、測定対象がかぎられること、特異性などの面で、サイクリング法が有利である。しかも目的によっては、同じまたは違ったサイクリング法をくり返しておこなう（2回サイクリング、3回サイクリング）ことにより、理論的には 10^{-18} ~ 10^{-24} モルまでも感度をあげることが可能である。ラジオアイソトープを用いる場合のように、環境汚染の問題もない。

われわれは最近臨床的に Krabbe 病がうたがわれ、本システムを用いてガラクトセレブロシダーゼ欠損を確認した症例を経験した。同時に従来のラジオアイソトープ法の測定もおこない、同じ結論を得た。従って、Krabbe 病診断に関するかぎり、技術的問題はないと言ってよい。

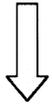
これまでのところ、この装置は、NAD サイクリング法のみについて開発されたものである

が、今後個別的に、それぞれの物質の測定条件を決める必要がある。同じ NAD サイクリングでも、 NAD^+ -NADH に変換するまでの化学反応操作についての具体的条件が提示されなければ、実際にこの装置を使いこなすことは困難である。このような理由で、これからは、診断、検査に有用な物質をえらび、それぞれの測定キットを開発しなければならないし、さらに NADP, CoA のサイクリング系への応用も考慮しなければならない。

なお、本装置は「自動サイクリング反応装置およびこれを用いる自動分析装置」として、東京大学より特許出願中である。

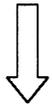
文 献

- 1) 柯 侑民, 福岡和子, 桜庭 均, 林 和代, 山中龍宏, 鈴木義之: 遺伝性リソゾーム病の生化学的診断—東大小児科における 39 年間の診断成績—。小児診療, **45**: 772~776, 1982.
- 2) Suzuki, Y.: Enzymatic diagnosis of lysosomal disease. An experience in a clinical laboratory during the period 1972~1980. Acta Paediat Jpn., **24**: 25~30, 1982.
- 3) 加藤尚彦: 酵素的サイクリング—酵素増幅反応による微量定量法—。医用電子と生体工学, **22**: 260~266, 1984.
- 4) Kato, K. and Suzuki, Y.: Enzymatic micro-determination method for galactocerebrosidase (EC 3, 2, 1, 46) in tissue samples. Proc. Japan Acad., **55B**: 69~74, 1979.
- 5) Tsutsumi, O., Sato, K., Sakamoto, S., Suzuki, Y. and Kato, T.: Application of a galactosylceramidase microassay method to early prenatal diagnosis of Krabbe's disease. Clin. Chim. Acta, **125**: 265~273, 1982.
- 6) Suzuki, Y. and Suzuki, K.: Krabbe's globoid cell leukodystrophy: Deficiency of galactocerebrosidase in serum, leukocytes and fibroblasts. Science, **171**: 73~75, 1971.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



われわれは先天異常の中で、代謝障害による疾患のモニタリングのために、その正確な診断法の開発につとめてきた 1)2)。これまではそれぞれの検体を個別的に、用手法により分析してきたが、もし多数検体を扱うことになれば、特殊な装置の開発が必要となる。

先天性代謝異常の診断のためには、欠損酵素の同定、酵素反応の基質の蓄積の確認などがおこなわれるが、これらの生体内化合物の種類は多く、現行の自動分析装置で操作をおこなうには限界がある。そこで今回われわれは、高感度かつ特異的な化学定量法である酵素的サイクリング法を用いた自動分析装置の開発をはじめた。