

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	多孔性ポリ塩化ビニル膜の医療計測への応用に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	廣瀬幸夫
Author(English)	sachio hirose
出典(和文)	学位:工学博士, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第1300号, 授与年月日:1983年12月31日, 学位の種別:論文博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第1300号, Conferred date:1983/12/31, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

多孔性ポリ塩化ビニル膜の

医療計測への応用に

関する研究

広瀬 幸夫

目 次

第 1 章	緒論	1
1.1	緒言	1
1.2	本研究に関する既往の知見	5
1.2.1	酵素固定化担体	5
1.2.2	体液成分の検査	7
1.3	本研究の目的と意義	10
第 2 章	多孔性ポリ塩化ビニル膜の性質と タンパク質固定化機構	14
2.1	緒言	14
2.2	実験方法	15
2.2.1	試薬	15
2.2.2	製膜方法	16
2.2.3	多孔性 PVC 膜の性能測定	16
2.2.4	多孔性 PVC 膜への吸着	19
2.2.5	拡散実験	20
2.2.6	電子顕微鏡観察	22
2.3	実験結果	22
2.3.1	製膜条件の検討	22
2.3.2	湿潤状 PVC 膜の性質と構造	27
2.3.3	湿潤状 PVC 膜の吸着性能	35
2.3.4	蛋白質の吸着機構	37
2.4	考察	41
2.5	結言	46

第 3 章	グルコースオキシダーゼ固定化ポリ塩化ビニル膜を用いるセンサーによるグルコースの計測	48
3.1	緒言	48
3.2	実験方法	49
3.2.1	試薬	49
3.2.2	グルコースオキシダーゼの固定化	50
3.2.3	酵素活性の測定	51
3.2.4	グルコースセンサーの組立	51
3.2.5	測定方法	51
3.3	実験結果	54
3.3.1	GODの湿潤状PVC膜への固定化	54
3.3.2	GOD固定化PVC膜の性質	59
3.3.3	酵素固定化PVC膜の酵素電極への適用	62
3.3.3.1	検量線	63
3.3.3.2	測定値の再現性	65
3.3.3.3	交雑物の影響	68
3.3.3.4	連続測定への応用	68
3.3.3.5	従来法との比較	68
3.4	考察	71
3.5	結言	72
第 4 章	β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜によるグルクロン酸抱合体の加水分解	73
4.1	緒言	73
4.2	実験方法	75
4.2.1	試薬	75
4.2.2	β -グルクロニダーゼの担体への固定化	75
4.2.3	膜性能の測定	77
4.2.4	酵素活性の測定方法	77

4.3	実験結果と考察	78
4.3.1	β-グルクロニダーゼの固定化	78
4.3.2	β-グルクロニダーゼの湿潤状PVC膜 への固定化	84
4.3.3	β-グルクロニダーゼ固定化PVC膜の 安定性	87
4.3.4	酵素固定化PVC膜を用いる ステロイドホルモン分析	90
4.4	結言	93
第5章	β-グルクロニダーゼ固定化PVC管 を用いるステロイドホルモンの連続測定	95
5.1	緒言	95
5.2	実験方法	96
5.2.1	試薬	96
5.2.2	尿の前処理	97
5.2.3	β-グルクロニダーゼ固定化PVC管 の調製法	97
5.2.4	酵素活性	98
5.2.5	反応器と実験方法	99
5.2.6	17-OHCSの分析法	99
5.3	実験結果と考察	101
5.3.1	可溶性酵素を用いた17-OHCS グルクロン酸抱合体の加水分解	101
5.3.2	循環方式による酵素管を用いる17- OHCS抱合体の加水分解反応	104
5.3.3	酵素管のみによる加水分解反応	108
5.3.4	連続的加水分解システムの特性	112
5.4	結言	113

第 6 章	ウレアーゼ固定化PVC試験管を用いる 尿素計測システム	118
6.1	緒言	118
6.2	実験方法	120
6.2.1	試薬	120
6.2.2	酵素活性	120
6.2.3	ウレアーゼ固定化PVC試験管の調製	121
6.2.4	装置	122
6.2.5	測定	122
6.3	実験結果と考察	125
6.3.1	水溶液中のアンモニアの測定	125
6.3.2	ウレアーゼ固定化とその反応条件	127
6.3.3	ウレアーゼ固定化PVC試験管のpH依存性	129
6.3.4	システムの応答性	129
6.3.5	システムの選択性	136
6.3.6	システムの再現性と安定性	139
6.3.7	従来法との相関	139
6.4	結言	140
第 7 章	結論	144
	参考文献	150
	謝辞	153

第 1 章 緒 論

1. 1 緒言

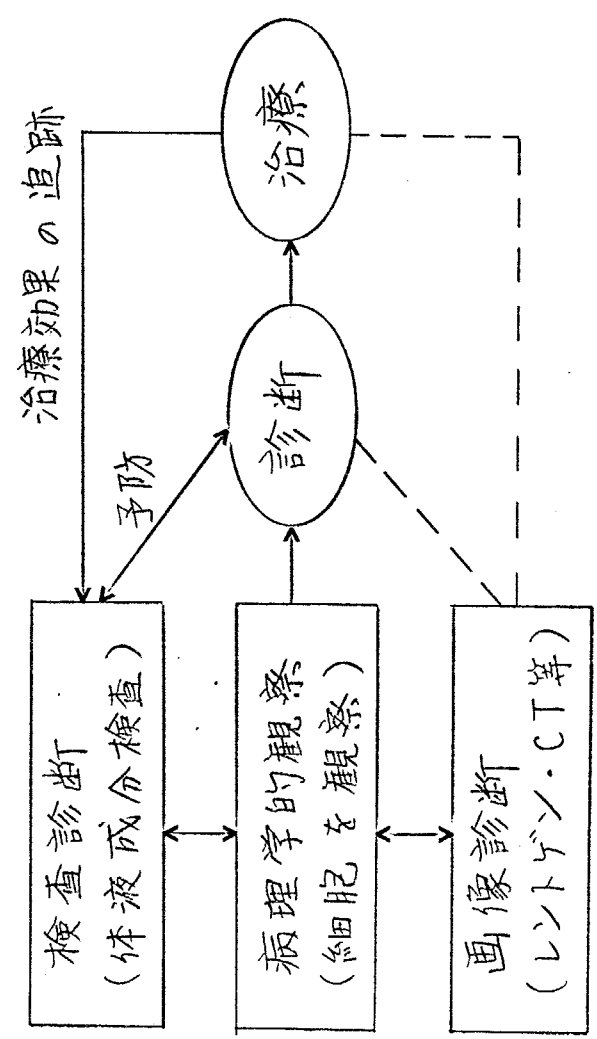
近年、医療分野における進歩は著しく、診断上、臨床検査データが不可欠となっている。^{1)~2)} 臨床診断には、病理学的診断、画像診断、そして、検査診断があり、病理学的診断は、主に、細胞の観察であるが、検査診断は、主に、体液成分の測定・検査である。

例えば、医師が診断する場合、表 1. 1 に示すように、異常細胞や組織を観察する以前に、簡単に採取可能な体液成分を分析し、各種項目の測定値から一次診断情報を得ることが出来る。更に、診断に基づく治療が実施されたとき、治療の経過を体液成分の測定によって追跡できる。このように、種々の体液成分を測定することにより、包括的、客観的な診断と治療が可能となる。また、臨床診断のみならず、予防医学の見地からも健常人の体液成分を定期的に検査する必要性があり、検査診断の重要性は増している。

体液成分の検査は、従来、化学的分析法により測定

表 1-1

臨床診断と体液成分検査の関係



されていたが、所望の成分とのみ特異的に反応する酵素を用いた生化学的分析法により、近年、測定されつつある。³⁾⁴⁾⁵⁾ この生化学的分析法には、以下の利点が掲げられる。 1) 体液成分の測定精度が向上する。 2) 体液の使用量が減少する。 3) 温和な条件で反応が進行する。 4) 設備・方法が簡便となる。 5) 一般に、測定時間が短縮でき、迅速な測定が可能となる。 しかしながら、この分析法の欠点は、1) 酵素が高価である。 2) 酵素の保存安定性が悪い。 3) 酵素標品によって活性が異なる。 4) 妨害物質（例えば、重金属など）の影響を受け易い、などの問題がある。

一方、近年、酵素を水不溶性の担体に固定化する技術が開発された。 酵素を固定化することにより、酵素を繰り返し使用できるようになった。 従って、この固定化酵素は検査に繰り返し利用できるため、1 検体当りの酵素コストを低減できることが期待でき、固定化酵素の医療計測への利用が注目されている。 固定化酵素を用いて測定装置をシステム化することによ

り、試薬使用量を低減させ、装置を小型化及び軽量化し、多検体を簡便に測定できるようになる。しかし、固定化酵素には、1)担体が高価である、2)固定化法が複雑である、などの問題もある。

著者は、汎用性高分子であるポリ塩化ビニルに着目して、酵素固定化用の多孔性ポリ塩化ビニル担体の開発研究を行なった。次いで、ある体液成分と特異的に反応する酵素を多孔性ポリ塩化ビニル上に固定化し、固定化酵素を用いた各種測定システムの開発を行なった。

開発された酵素固定化用多孔性ポリ塩化ビニル膜の特徴を要約すると、以下のようになる。

- 1) 多孔性ポリ塩化ビニル膜の見かけの膜構造は、湿潤状、筒状、網目状の3種類に分類される。
- 2) 湿潤状多孔性ポリ塩化ビニル膜は、蛋白質・酵素を良く吸着し、低分子を吸着しない。
- 3) この膜は、製膜性に優れ、適度な膜強度を有する。
- 4) この膜は、種々の形状の表面上に製膜でき、膜状・管状・試験管状の担体が得られる。

- 5) この膜は、酵素溶液と接触すると、酵素が容易に固定化される。
- 6) この膜上に固定化された酵素は脱離しにくい。
- 7) 一方、膜内に残存する基質・生成物は洗滌により容易に除去できる。

すなわち、湿潤状多孔性ポリ塩化ビニルが酵素固定化用担体として有用であり、とりわけ、体液成分を測定する医療計測に利用できることがわかった。

本論文は、以上に述べた酵素固定化用多孔性ポリ塩化ビニルを用いる臨床検査用体液成分分析システムの開発に関する研究成果をまとめたものである。

1. 2 本研究に関する既往の知見

1. 2. 1 酵素固定化用担体

酵素の固定化法は数多く開発され、固定化法として次のような方法が知られている。^{6)~9)}

1) 物理的吸着法 (担体に酵素を吸着させる方法) 2) イオン結合法 (担体に酵素をイオンの的に結合させる方法) 3) 共有

結合法 (担体に酵素を化学的に結合させる方法で、多官能性試薬で酵素同士及び担体と酵素を架橋させる方法を含む) 4) 包括法 (高分子マトリックス中に酵素を包括させる方法) など。

物理的吸着法では、担体としてシリカゲル・アルミナなどが用いられる。この方法は酵素固定化が容易で、初期酵素活性が高いが、担体からの酵素の脱離が起り易い。イオン結合法では、担体としてイオン交換樹脂を用いる。¹⁰⁾ この方法は担体が比較的安価で固定化は容易であるが、担体中のイオンを利用して酵素と結合しているため、反応場のイオンの影響を受け易い。共有結合法では、アミノ基やカルボニル基と反応する各種官能基を有する担体を用いられる。例えば、セファロース¹¹⁾ や多孔性ガラスビーズ表面¹²⁾ を化学的に処理し、これに酵素を固定化する。しかし、固定化操作が煩雑で、固定化の際に酵素の活性が著しく減少する場合がある。グルタルアルデヒド¹³⁾ やカルボジイミド¹⁴⁾ などの多官能性試薬を用いて担体と酵素とを架橋した場合にも同様、酵素は安定であるが、

初期酵素活性は低い。包括法では、担体としてポリ
 アクリルアミド¹⁵⁾、光架橋型ポリエチレングリコール
 樹脂¹⁶⁾のような合成高分子、コラーゲン^{17),18)}、カラギー
 ナン¹⁹⁾、多糖類²⁰⁾のような生体高分子が用いられる。
 比較的温和な条件下で酵素が固定化出来るので、固定
 化酵素の活性が高く酵素の安定性が良い。しかし、
 膜強度が低いため担体を薄膜(100 μ m以下)にして用
 いることが困難である。

従って、酵素固定化用担体としての必要条件をまと
 めると、次のようになる。 1) 酵素を大量に固定化で
 きる担体、 2) 酵素固定化が比較的簡単に出来る担体、
 3) 安価な担体、 4) 用途に適した形状になる担体、
 5) 固定化した酵素の脱離のない担体、 6) 担体中の物
 質移動が容易な担体、 7) 酵素反応場に添加剤を加え
 る必要のない担体、などである。

1. 2. 2 体液成分の検査

体液とは、血液、尿、汗、胃液、髄液、穿刺液など
 をさす。²⁵⁾ 通常、容易に採取可能な血液や尿を用い、

その中に含まれる各種体液成分が検査される。体液成分は表1・2に示す通り、10項目に大別される。

このうち、酵素が体液成分の測定に関与するものは、糖、非蛋白性窒素成分、脂質、酵素、ホルモンであり、本研究では、糖、非蛋白性窒素成分、ホルモンの測定を酵素を用いて行なった。

糖関連項目では、血中グルコースは糖尿病疾患の指標として最も重要であり、血中グルコース濃度は経時変化するため、採血後直ちに検査する必要がある。

非蛋白性窒素成分関連項目では、残余窒素、尿素、クレアチニン、クレアチン、尿酸、アミノ酸、アンモニアなどの測定値から、窒素化合物代謝異常が総合的に診断されている。両項目共に、体液、特に血液、成分の基本的かつ緊急的検査項目であり、簡便かつ迅速な測定が要求される。ホルモン関連項目では、種々のステロイドホルモンがグルクロン酸抱合体として、体液（特に尿）中に存在している。従って、通常、これらの測定に際し、先ず、グルクロン酸抱合体を酵素的に加水分解し、次に、ステロイドホルモンを比色

Table 1-2 Components of Body Fluid

Items	Enzymes	Measurement
1) Saccharides	glucose oxidase	enzyme sensor (O ₂)
2) N-component	---	SMCR system
ammonia	urease	SMCR system
urea	creatinine deiminase	SMCR system
creatinine/creatinine	uricase	enzyme sensor (O ₂)
uric acid	bilirubin oxidase	enzyme sensor (O ₂)
bilirubin		
3) Lipids		
neutral lipid	lipase	enzyme sensor (pH)
phospholipid	phospholipase	enzyme sensor (Pt)
triglyceride	glycerokinase/pyruvate oxi.	enzyme sensor (O ₂)
total cholesterol	cholesterol esterase & oxi.	enzyme sensor (O ₂)
bile acid	3 α -hydroxy steroid dehydrogenase	spectrometer
4) Enzymes		
GOT/GPT	pyruvate oxidase	enzyme sensor (O ₂)
amylase	α -glucosidase	enzyme sensor (O ₂)
LDH	pyruvate oxidase	enzyme sensor (O ₂)
LAP	(L-leucyl- β -naphthlamide)	spectrometer
5) Hormones		
17-OHCS, 17-KS	β -glucuronidase	spectrometer
6) Proteins	---	---
7) Electrolytes	---	---
8) Fe, Cu, Pigments, Collagenous tissues, etc.		---

分析法で測定する。この際、多量の酵素が消費される。従って、酵素使用量を軽減する前処理システムが望まれている。

本研究の対象とした測定項目は、血中グルコース測定では酸素電極を用いる酵素電極システムが、血清尿素測定ではマイクロ波を用いるアンモニア測定システムが、17β-ヒドロキシコルチコステロイド (17-OHCS) などのステロイドホルモンの測定では前処理システムがきわめて有効であることがわかる。

1.3 本研究の目的と意義

本研究は汎用性高分子のポリ塩化ビニルの機能化、多孔質化を図り、精密濾過材料、限外濾過材料を開発することを目的として発足した。^{26)~28)} その後、多孔性ポリ塩化ビニルの高機能化の一環として、酵素固定化用担体を開発することが課題となった。それ故、本研究の目的は、新規酵素固定化用担体を開発し、酵素を固定化し、これを用いて体液成分測定システムの開発をすることである。

新規な担体として得られた湿潤状ポリ塩化ビニル膜を用いることにより、種々の酵素の活性を維持させたまま酵素を固定化できた。また、この酵素固定化担体を種々の担体形状を有した酵素固定化ポリ塩化ビニルとし、体液成分の計測システムに適用した。ここで、湿潤状ポリ塩化ビニルとは、通常の間目状ポリ塩化ビニルと基本的に構造が異なり、蛋白質・酵素の分子径に相当する極めて微小な孔径を有し、蛋白質を安定に多量に吸着し、水を含んだ状態で一定の微細構造を保持する。

以下、章を追って本研究で開発したポリ塩化ビニル担体を用いた体液成分の医療計測システムの目的と意義を述べる。

第2章では、湿潤状ポリ塩化ビニル膜の性質とその形成機構、及び、蛋白質（酵素）の吸着機構と低分子の透過機構について述べる。ポリ塩化ビニル膜の性状と酵素固定化の機構を知ることは、種々の酵素を固定化する際に重要である。この章の結果から、この担体が臨床検査分野における体液成分の計測システム

へ適用できることが示唆された。

オ3章では、糖代謝に注目してグルコースオキシダーゼを湿潤状ポリ塩化ビニル膜に固定化し、これを用いるグルコースセンサーを開発し、血液中のグルコースの連続定量できることを述べた。

オ4章では、従来固定化された例のない β -グルクロニダーゼを湿潤状ポリ塩化ビニル担体に固定化した。この章では、グルクロン酸抱合体溶液のモデル液を用いて、固定化 β -グルクロニダーゼの性復を明らかにし、ステロイドホルモン検査用システムの担体形状を提案した。

オ5章では、前章で提案された β -グルクロニダーゼ固定化ポリ塩化ビニル管(酵素管)をステロイドホルモン検査に適用した。実際に、健常人尿中のステロイドホルモングルクロン酸抱合体、例えば、尿中17-ヒドロキシコルチコステロイド(17-OHCS)抱合体が固定化 β -グルクロニダーゼで加水分解されることを示し、至適反応条件を示し、酵素管によるステロイドホルモンの前処理システムを提案した。

第6章では、非蛋白性窒素成分を分析するため、血清尿素の連続測定法を創案した。即ち、ウレアーゼ固定化試験管中で血中尿素を酵素的に加水分解してアンモニアを発生させ、著者らが開発したマイクログ波を利用したアンモニア測定装置でこれを測定し、血清尿素の分析を行なった。

以上に述べた本研究の目的、および、意義から明らかかなように、本研究の成果は臨床化学分析における測定の精度向上、簡便化、迅速化、自動化に有用であり、臨床化学分析の効率化に寄与すると考えられる。

第 2 章

多孔性ポリ塩化ビニル膜の性質と

蛋白質の固定化構造

2.1 緒言

酵素固定化用担体は、用途に適した特性を有している必要がある。臨床化学分析分野へ固定化酵素を利用する際、イオン交換樹脂や高分子ゲル担体は利用できない。なぜならば、イオン結合法で固定化した場合、体液中に多量のイオン化合物が含まれているので、これらが担体にイオン結合した酵素を脱離させる。

高分子ゲルによる包括法で固定化した場合、酵素が膜内部に存在するため、膜内部への基質の拡散と膜外部への生成物の拡散が酵素反応の律速となり、微量な体液成分を迅速に、かつ、精度良く検出することはむずかしい。

従って、臨床化学分析分野で利用できる担体とその固定化法は担体表面に酵素が非イオンの的に結合し、かつ、担体への基質および生成物の拡散・透過が速いこ

とである。そこで、体液成分測定用の酵素固定担体の開発を試みた。

汎用性素材である安価なポリ塩化ビニルを多孔質化し、得られた湿潤状ポリ塩化ビニル膜の基本特性と蛋白吸着性能について検討した。次いで、基質と生成物のモデルである低分子化合物の膜中拡散挙動を検討した。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 試薬

ポリ塩化ビニル（以下、PVCと略； M_w 48,400，鐘淵化学社製），ジメチルホルムアミド（DMF）及びメタノール（MeOH）（和光純薬社製），各種蛋白質，酵素，及び，テトラヒドロコルチゾン（シグマ社製），アセチルコリンアイオダイト（AchI，イーストマン・コダック社製）はいずれも市販の試薬を用いた。実験には，蒸留・イオン交換水を用いた。

2. 2. 2 製膜方法²⁶⁾

所定濃度 (PVC ; 6~10 wt%) の PVC-DMF 溶液をガラス板 (10 x 7 cm²) 上に, 約 400 μm の膜厚で塗布し, その後, 直ちにガラス板ごと水, 又は, メタノールに浸漬し, PVC 溶液を固化し, 十分に, DMF と水 (メタノール) を置換し, 多孔性 PVC 膜を得た。メタノールのような有機溶媒に浸漬した場合には, 更に, 有機溶媒を水と置換した。得られた多孔性 PVC 膜は膜厚約 180 μm であり, 水中 4℃ で保存した。

2. 2. 3 多孔性 PVC 膜の性能測定

2. 2. 3. 1 含水率

多孔性 PVC 膜の含水率 (ϕ) は, 70℃ 真空下で乾燥後, 膜中の水重量減少量を秤量し, 次式より求めた。

$$\phi = \frac{W_1 - W_0}{AL\rho_w}$$

ここで, W_1 は湿潤状態の多孔性 PVC 膜 (25℃)

の重量 (g) , W_0 は多孔性 P V C 膜の乾燥時の重量 (g) , A は有効膜面積 (cm^2) , L は膜厚 (cm) , ρ_w は水の密度 (g/cm^3 , 25°C) である。

2. 2. 3. 2 透水量²⁸⁾

透水量 (F) は差圧 0.5 気圧 , 温度 25°C で膜を透過する水の量を示した。

2. 2. 3. 3 膜強度

オートグラフ (島津製作所製 , Model IS - 5000) により , 膜の破断点強度を求めた。 図 2 - 1 に示すように , ポンチの速度 $1\text{ mm}/\text{分}$, ポンチの外径 15 mm , 多孔性 P V C 膜の直径 43 mm の条件下で測定した。

l は多孔性 P V C 膜が垂直方向に伸び得る距離を示し , 膜の伸びを表わす指標となる。

2. 2. 3. 4 蛋白質の阻止率特性 (分子量分画)

東洋濾紙社製限外濾過装置 (Model UHP - 43) を用いて , 多孔性 P V C 膜の蛋白質阻止率を求めた。

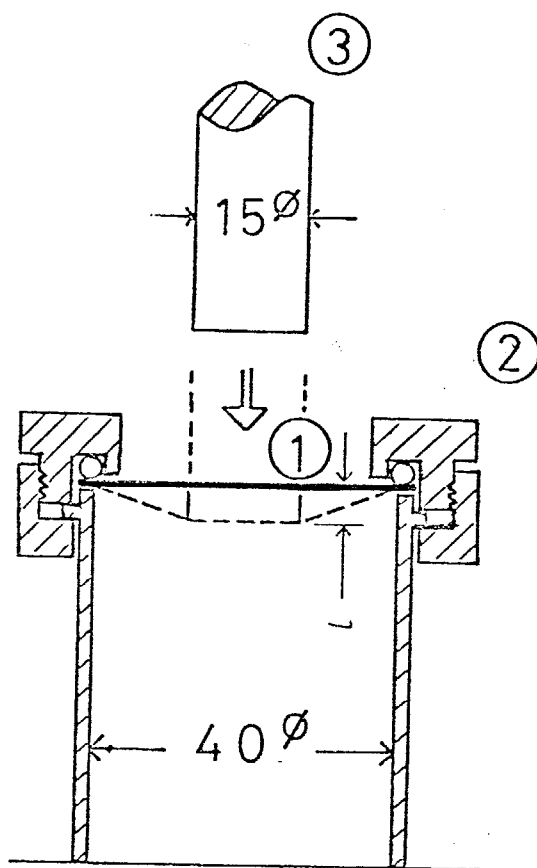


Fig. 2-1

Apparatus for measuring membrane strength:
1, wet PVC membrane (43 mm/diam.); 2, membrane holder; 3, load cell (15 mm/diam.).

0.1% 蛋白質溶液 50 ml を限外濾過装置 (膜直径 43 mm) のリガーバーに入れ, 差圧 2.0 気圧, 温度 30°C で初体積の半量 (25 ml) を限外濾過した。見かけの蛋白質阻止率 (E_{app}) は次式より算出した。

$$E_{app} = 1 - (S_f / S_0) \quad (2)$$

ここで, S_f は濾過液の蛋白質濃度, S_0 は原液の蛋白質濃度 (初濃度) である。溶液中の蛋白質濃度は牛血清アルブミンを標準試薬として, ローリー法で測定した。³⁰⁾

2. 2. 4 多孔性 PVC 膜への吸着

多孔性 PVC 膜 (直径 2.8 cm) を 5 ml の酵素溶液又は, 試料溶液 (1 mg/ml) 中に浸漬させ, 25°C, 24 時間浸漬した。得られた膜を大過剰の水, 又は, 緩衝溶液で洗滌した後, ミクロケルダール法³¹⁾ で膜中に吸着した酵素量, 又は, N-化合物量を測定した。

膜中のグルコース, 及び, テトラヒドロコルチゾン量は元素分析より算出した。AchI 量は, ヨウ素電極により測定した。

2. 2. 5 拡散実験

湿潤状 P V C 膜中での拡散定数を求めるため、以下の実験をアセチルコリンアイオダイド (AChI) を用いて行なった。ここで、用いた装置を図 2-2 に示す。

所定濃度の AChI 溶液 ($10^{-6} \sim 10^{-1}$ mol/l) と 0.05 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0, 以下 PB と略) を流速 (q) 18 ml/分にて拡散セル中へ送り込んだ。このとき、有効膜面積 (A) は 10.17 cm^2 , 拡散セルの 2 次側 (透過側) のセル体積 (V) は 18.0 ml である。次に, PB 溶液 (透過側) を一定時間毎に採取し, ヨウ素選択性電極を取付けたデジタル pH メーター (ベックマン社製, Model 4500) にて採取溶液中に含まれる AChI 濃度を定量した。これにより, 時間 t 秒後に膜を通過した AChI の全量 (Q_t) は, 次式で求まる。

$$Q_t = \int_0^t J A dt = \int_0^t \left(V \frac{dx}{dt} + q x \right) dt \quad (3)$$

ここで, J は単位膜面積を単位時間当りに透過した AChI のモル数, x は採取溶液中の AChI 濃度 (mol/l)。

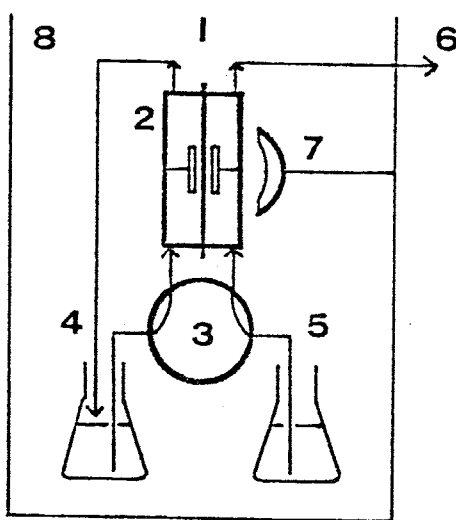


Fig. 2-2

Apparatus for measuring diffusivity of AchI:
1, wet PVC membrane (36 mm/diam.); 2, diffusion cell;
3, masterflex pump; 4, recycled AchI solution; 5, Na
phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0); 6, sample solution
including AchI; 7, magnet; 8, water bath (25 °C).

(3) 式より得られる Q_t と時間 t との関係から, 遅れ時間 (Time lag; θ) が図より求まり, 湿润状 PVC 膜中での AChI の拡散定数 (D) は次式により求められる。³²⁾

$$D = L^2 / 6\theta \quad (4)$$

ここで, L は湿润状 PVC 膜の膜厚。

2. 2. 6 電子顕微鏡観察

多孔性 PVC 膜をド-タイト塗料 (藤原化学社製) でサンプル板上に固定し, PVC 膜断面を走査型電子顕微鏡 (島津製作所製・EMX-SM型) で観察した。このとき, 操作電圧 25 kV であった。

2. 3 実験結果

2. 3. 1 製膜条件の検討

キャストイング法で得られる多孔性 PVC 膜の製膜条件と膜構造との関係を, 表 2. 1 に示す。No. 1, 及び, No. 2 は放置時間を 5 分とし, 抽出溶媒の膜構造に及ぼす影響を調べた。メタノール抽出後に得られ

Table 2-1

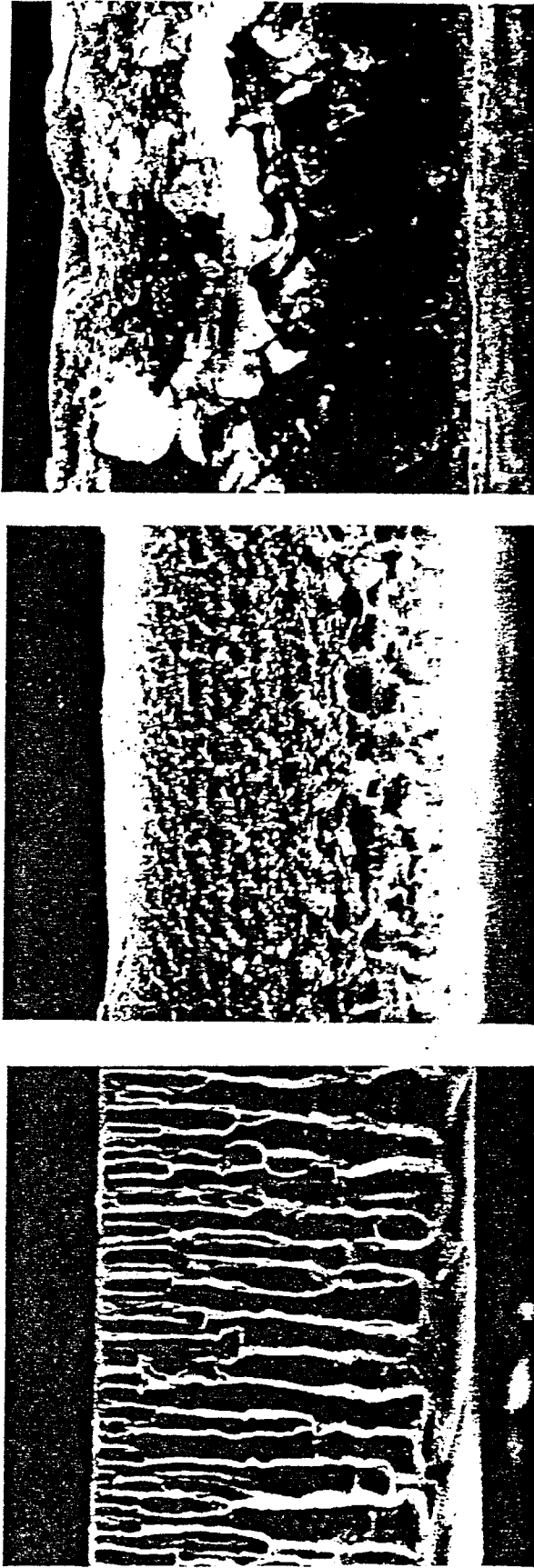
Typical relationship between membrane formation processes and membrane structure.

No.	Membrane formation process ^{a)}		Membrane structure
	Evaporation time	Before leaching medium	
1	5	transparent methanol	wet
2	5	transparent water	finger-like
3	60	cloudy methanol	network
4	60	cloudy water	network

a) PVC membranes were prepared from 10 wt% PVC concentration under the evaporation conditions: 50 % relative humidity and 25 °C.

るPVC膜は“湿潤状”構造を示した。ここで、この膜は湿潤状態でのみ微細構造が維持され、一度乾燥すると湿潤状態に戻らない特異な構造を有するため、“湿潤状”PVC膜と称した。この湿潤状PVC膜を本研究では用いた。また、水抽出後に得られるPVC膜はDMF溶媒の抽出方向に沿って筒状構造を示した。No.3、及び、No.4は放置時間を60分としたときの例である。ガラス板上のPVC-DMF溶液は空気中の水分を吸収して白色化し、メタノール又は水抽出後に得られる多孔性PVC膜は共に網目状構造を有した。図2-3に、湿潤状、筒状、網目状の3種の構造を有する多孔性PVC膜の走査型電子顕微鏡写真を示す。

次に、湿潤状PVC膜を得るための条件について詳細に検討し、その結果を表2-2にまとめる。抽出溶媒はPVCに対し貧溶媒、DMFに対し良溶媒となる水、アルコール、エーテル、グリコール、n-パラフィンを選択した。その結果、アルコール類やジエチレングリコールモノメチルエーテル中にPVC溶液



(a)

(b)

(c)

Fig. 2-3 Electron micrographs of the PVC membrane cross section. (scale; --- 10 μm) Membrane having a finger-like structure(a), a network structure(b) and a wet structure(c).

Sample for electron microscopy examination were fixed with Dotite paint (Fujikura Chemicals Co., Ltd.) and the wet membranes(c) were dried in a freeze-dry apparatus. Thin sections were observed in a EMX-SM scanning electron microscope (Shimadzu Seisakusho Ltd.) operated at 25 kv.

Table 2-2 Porous PVC membranes obtained by using various organic solvents as leaching media

Leaching ¹⁾ Medium	Membrane Structure	Filtration ²⁾ Rate (ml/min/cm ²)	Molecular ³⁾ Cut-off
methanol	wet	0.14	85,000
ethanol	wet	0.07	130,000
n-propanol	wet	0.055	60,000
iso-propanol	wet	0.055	80,000
n-butanol	wet	0.024	40,000
t-butanol	wet	0.050	85,000
DGME ⁴⁾	wet	0.14	180,000
glycerol	not obtained	-	-
n-dodecane	not obtained	-	-
methanol/water (9/1)	finger-like	0.40	>480,000
methanol/acetone (8/2)	wet	0.30	140,000

1. The experiments were carried out under the conditions as follow ; PVC concentration (10wt%), evaporation time(5 min), 50 %RH and 25°C.
2. Differential pressure was 2 Kg/cm².
3. When protein rejection of 50% was observed.
4. Diethylene glycol monomethyl ether.

を浸漬させると、湿潤状PVC膜が得られた。グリセロールやn-ドデカンはPVC・DMF溶液に対し、貧溶媒としての効果が不十分なため、PVCが固化せず、膜が得られなかった。メタノール・水(9:1)混合溶媒では筒状PVC膜となり、メタノール・アセトン(8:2)混合溶媒では湿潤状PVC膜が得られた。同時に、透水量や蛋白質の分画分子量の結果から、湿潤状PVC膜の微細構造は抽出溶媒により著しく異なることが明らかとなった。分画分子量が比較的低く、即ち、微細構造が均一かつ緻密で、透水性能が高い湿潤状PVC膜は抽出溶媒としてメタノールを用いた場合に得られることが判明した。以下の実験では、抽出溶媒としてメタノールを用いて得られる湿潤状PVC膜を用いることにした。

2.3.2 湿潤状PVC膜の性質と構造

溶液中のPVC濃度が湿潤状PVC膜の透水量、及び、含水率に及ぼす影響について検討した(図2-4)。透水量、含水率はPVC濃度の増加と共に減少した。

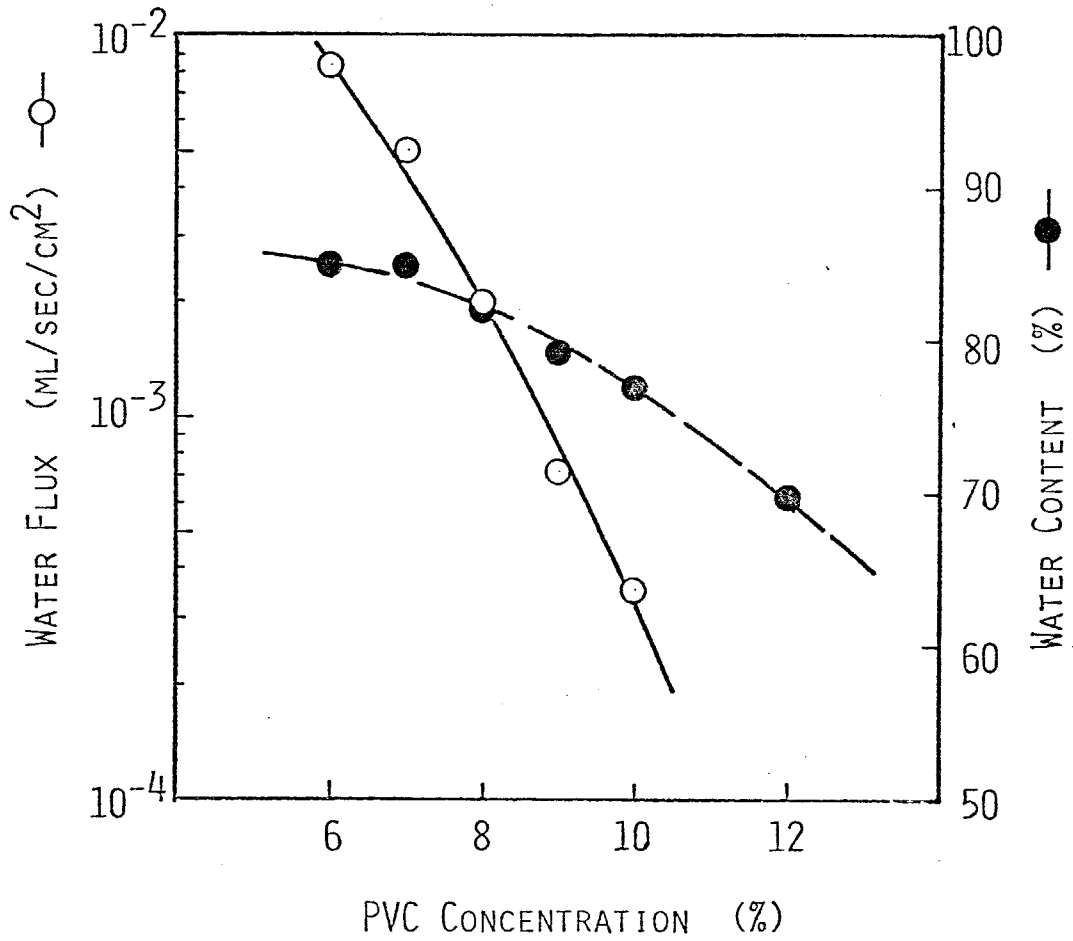


Fig. 2-4

Water flux and water content vs. PVC concentration of the casting solution from which the wet PVC membrane was made: (O) water flux; (●) water content.

PVC濃度が増加すると、得られる湿潤状PVC膜の内部構造が緻密となり、透水量と含水率が低下したと考えられる。

湿潤状PVC膜の微細構造で、孔径が均一で、かつ、孔形が円筒・直行の形状であると仮定すると、ハーゲン・ポアゼイユの法則により³³⁾、微孔の半径($r; \text{cm}^2$)と単位面積当りの微孔の数($n; \text{cm}^{-2}$)は、

$$r = \left(\frac{8\eta L}{\Delta p} \cdot \frac{F}{\phi} \right)^{0.5} \quad (5)$$

$$n = \frac{\phi}{\pi r^2} \quad (6)$$

となる。ここで、 η , L , Δp , F , ϕ は、それぞれ、水の粘度 (poise), 膜厚 (cm), 差圧 (dyn/cm^2), 透水量 ($\text{cm}^3/\text{sec}/\text{cm}^2$), 含水率である。

湿潤状PVC膜のみかけの孔径と孔密度を算出し、表2-3にまとめ示す。製膜時のPVC濃度によって、得られる湿潤状PVC膜の孔径と孔密度は著しく変化した。

Table 2-3 Apparent Pore Dimensions of Wet PVC Membranes

PVC Conc. 1)	wt-%	6	8	10
F	cm ³ /sec/cm ²	8.33×10^{-3}	2.00×10^{-3}	3.50×10^{-4}
ϕ		0.85	0.82	0.77
r 2)	cm	0.51×10^{-5}	0.25×10^{-5}	0.11×10^{-5}
n 2)	/cm ²	1.1×10^{10}	4.1×10^{10}	20.6×10^{10}

1) PVC concentration in the casting solution

2) r and n were calculated from hydrodynamic permeability, using the following values.

$$\eta = 0.00895 \text{ poise, } L = 0.018 \text{ cm, } \Delta P = 4.9 \times 10^5 \text{ dyne/cm}^2$$

次に、湿潤状PVC膜の破断点強度と伸び(%)を表2-4に示す。製膜時のPVC濃度が高い程、得られる湿潤状PVC膜は緻密な構造となり、膜強度、及び、伸びが増加した。

各種PVC濃度で調製された湿潤状PVC膜の蛋白復阻止特性を図2-5に示す。湿潤状PVC膜は分子量10万前後の蛋白復を阻止し、高PVC濃度条件下で得られた湿潤状PVC膜になればなるほど、分画分子量は低下した。図2-6に、蛋白復阻止特性に及ぼす膜厚の影響を示す。湿潤状PVC膜の膜厚が厚い程、分画分子量は低下した。これは湿潤状PVC膜全体が蛋白復の透過阻止に寄与し、膜中を通過する蛋白復が膜の多孔質構造中に蓄積して、蛋白復が分画されたと考えられる。更に、ヘモグロビンを用いた透過実験では、湿潤状PVC膜内部は赤く着色し、蛋白復の透過阻止は膜表面のみでなく膜内部も寄与していることを観察した。蛋白復阻止特性の実験から、湿潤状PVC膜が蛋白復を吸着する性質を有することが示唆された。この点について、次項で詳細に検討

Table 2-4 Mechanical Properties of wet PVC Membranes

PVC Conc.	Membrane Thickness	wt%	μm	Fracture Point Strength ¹⁾	Elongation ²⁾
				$\text{kg}/\text{cm}^2/\text{cm}$	cm
8	35			0.396	0.43
10	32			0.716	0.58
12	34			0.912	0.68
10	143			0.617	0.69

- 1) Observed stress/contact area of the load cell/membrane thickness
- 2) Capable distance of the load cell in the vertical direction
(l shown in Figure 2-1).

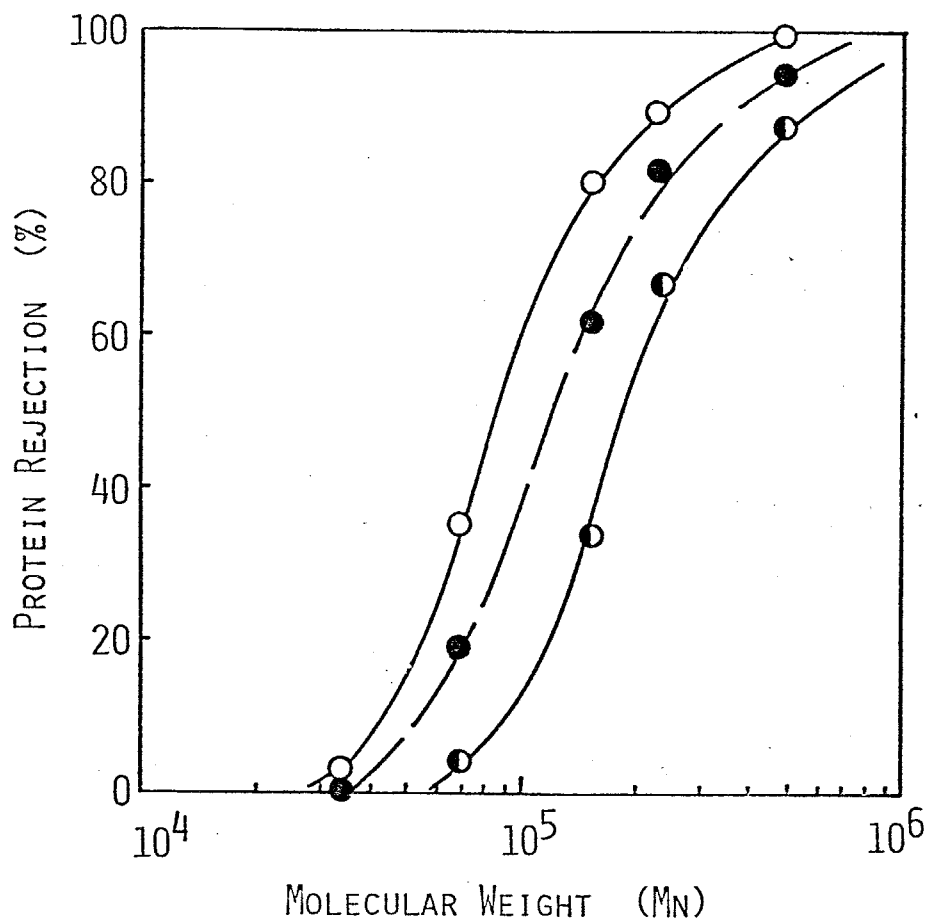


Fig. 2-5

Protein rejection curves by using the wet PVC membrane prepared from the various PVC concentrations: (○) 6 wt%; (●) 8 wt%; (○) 10 wt%.

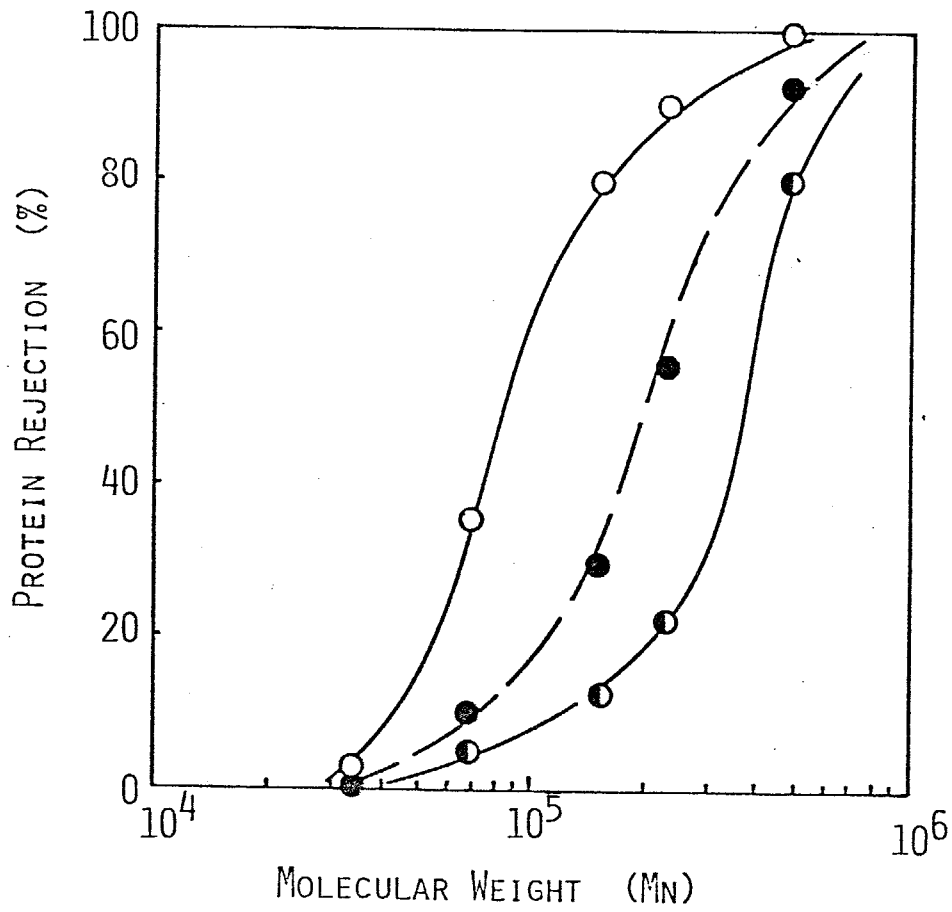


Fig. 2-6

Protein rejection curves by using the various membrane thicknesses: (○) 40 μm; (●) 80 μm; (○) 180 μm.

する。

2.3.3 湿润状PVC膜の吸着性能

各種低分子，及び，高分子物質の湿润状PVC膜への吸着性能を調べ，その結果を表2-5にまとめる。低分子量化合物は湿润状PVC膜に吸着されなかった。ここで，低分子量化合物とは，グリシン，グリシルグリシルグリシン，アセチルコリンアイオグアイドのような体内成分として重要，かつ，典型的な窒素化合物，尿酸，グルコース，尿素のようなウリカーゼ，グルコースオキシダーゼ，ウレアーゼなどの基質，テトラハイドロコルチゾンのような β -グルクロニダーゼによる加水分解反応のモデル化合物である。

一方，分子量45,000以上の高分子量化合物，例えば，蛋白質，酵素は湿润状PVC膜に容易に，かつ，安定に吸着した。凝集性の高いアルブミン，ヘモグロビン，グロブリン，フィブリノーゲンなどは分子量の増加にともない吸着量が増加した。ウリカーゼ，グルコースオキシダーゼ， β -グルクロニダーゼ，ウ

Table 2-5 Adsorption of Various Substrates into a Wet PVC Membrane

Substrates	M	Solvent	pH(solvent)	N-content (%)	Amount Sorbed ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Assay Method
Urea	60	H ₂ O	7.0	46.7	0	a)
Glycine	75	"	"	18.7	0	a)
Uric Acid	168	"	"	33.3	0	a)
Glucose	180	"	"	-	0	c)
Gly-gly-glycine	189	"	"	21.7	0	a)
Acetylcholine iodide	273	"	"	-	0	b)
Tetrahydrocortisone	364	"	"	-	0	d)
Albumin	45000	"	"	15.6	64.5	a)
Hemoglobin	68000	"	"	14.6	101	a)
γ -globulin	156000	"	"	14.7	122	a)
Fibrinogen	400000	"	"	10.6	198	a)
Uricase	120000	borate	8.5	14.6	75.7	a)
Glucose Oxidase	186000	phosphate	5.6	13.0	69.9	a)
β -glucuronidase	280000	acetate	7.0	14.4	80.9	a)
Urease	480000	phosphate	7.0	12.7	88.6	a)

a) - micro-Kjeldahl method

b) - ion-electrode method described in this paper

c) and d) - refer to Sec. 3 and 5, respectively.

レアーゼのような酵素はそれらの分子量に関係なく、吸着量は一定であった。

2.3.4 蛋白質の吸着機構

前述の実験条件下で、 β -グルクロニダーゼを湿润状PVC膜に吸着させた後、所定濃度の尿素溶液中に2時間浸漬させ、酵素の脱離を調べた。この結果を図2-7に示す。尿素濃度2 mol/l以下では湿润状PVC膜から β -グルクロニダーゼは脱離しないが、高濃度の尿素溶液中(> 4 mol/l)に浸漬させると酵素は脱離した。尿素の代わりに塩化ナトリウムを用い、飽和塩化ナトリウム溶液中に β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜を浸漬させても酵素は脱離しなかった。しかしながら、界面活性剤であるトリトンX-100、あるいは、ポリエテングリコールの0.1%溶液中に酵素固定化PVC膜を浸漬させると、酵素は脱離した。

次に、アセチルコリン化合物の湿润状PVC膜中の拡散挙動を検討した。図2-8, 9にAchIの拡散定数と湿润状PVC膜の膜厚、及び、溶液中のAchI

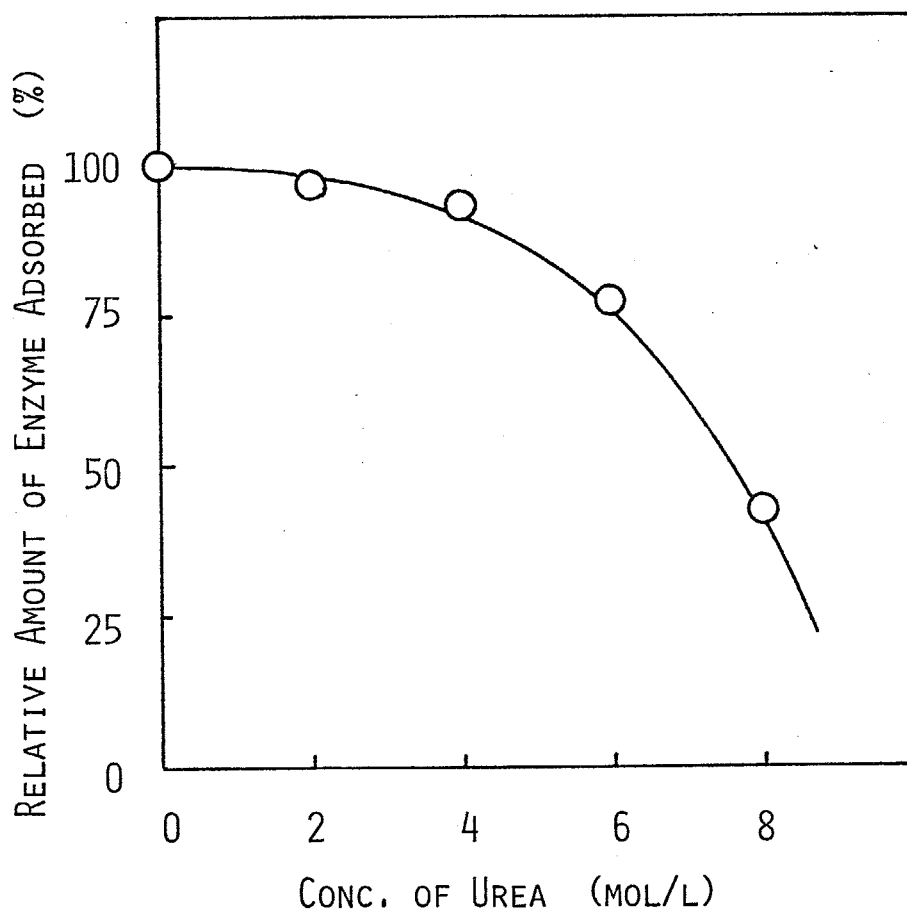


Fig. 2-7

Stability of the β -glucuronidase-PVC membrane to urea. The β -glucuronidase-PVC membrane was incubated in 4 ml of various urea solutions (pH 4.5, 0.1 M acetate buffer) for 2 hr at 25 °C. The amount of the enzyme-PVC membrane was determined by the method of micro-Kjeldahl.

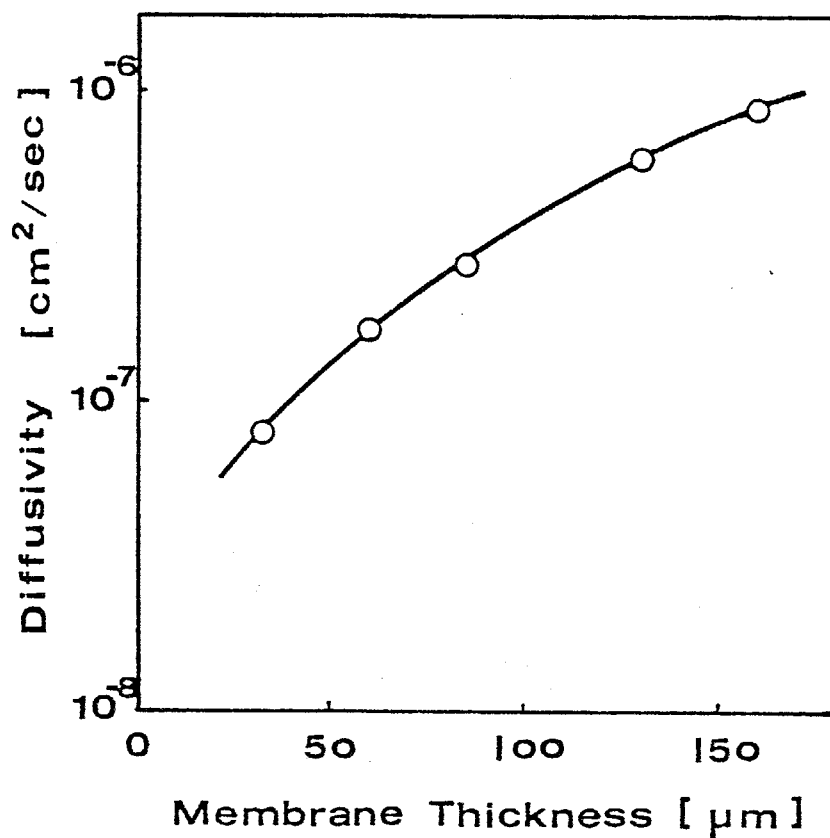


Fig. 2-8

Relation between wet PVC membrane thickness and diffusivity.

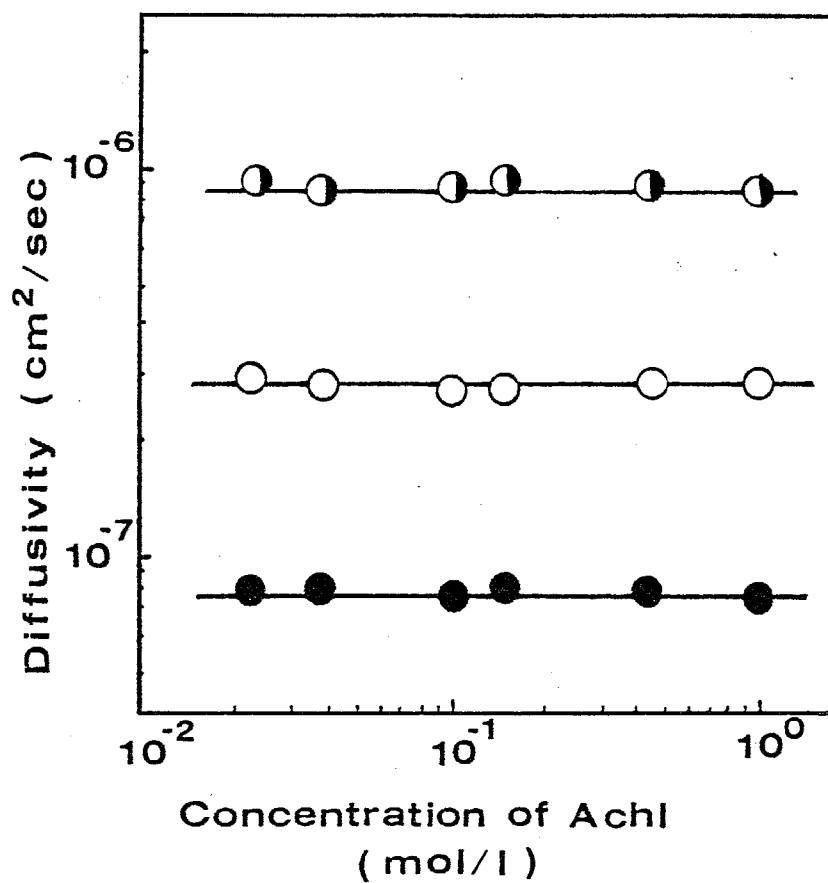


Fig. 2-9

Effect of AchI concentrations on diffusivities using wet PVC membranes: membrane thickness (●) 32 μm, (○) 84 μm, (◐) 160 μm.

濃度との関係をそれぞれ示す。図2-8より、拡散定数は膜厚の増加と共に顕著に増加した。これは、湿潤状PVC膜が膜厚によって異なる微細構造を有することを示唆している。了種の異なる膜厚を有する湿潤状PVC膜の拡散定数はAChI濃度 0.02 mol/l から 1.0 mol/l までの範囲で一定であった。図2-10にAChIの湿潤状PVC膜中での拡散定数のアレニウスプロットを示す。この結果、AChIの活性化エネルギーは 2.6 kcal/mol であった。

2.4 考察

PVC-DMF溶液から調製される多孔性PVC膜は製膜条件によって了種の異なる構造、即ち、湿潤状、筒状、網目状構造を示すことを見出した。これはDMFが吸湿性溶媒のため空気中の水分を容易に吸収し、ガラス板上に塗布したPVC溶液はPVC-DMF-水の成分に基づくPVCの相分離が発生し、相分離したPVC粒子が凝集し、PVCの網目状構造へと発達すると考えられる。一方、このPVCの相分離

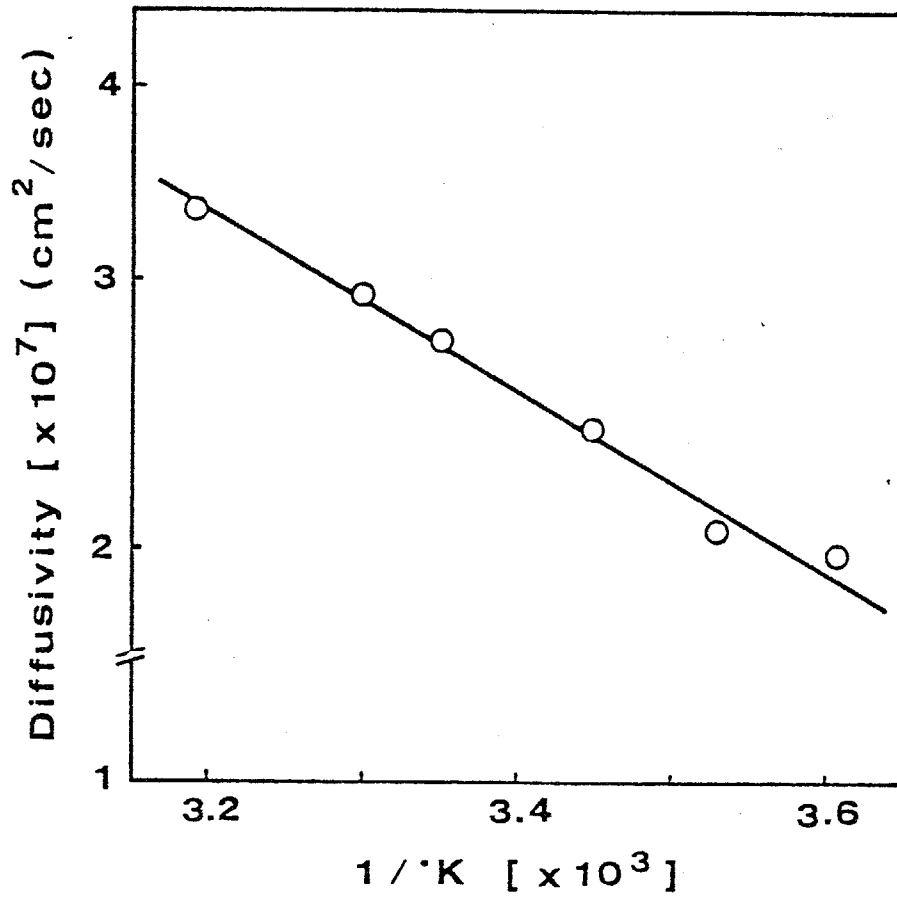


Fig. 2-10

Arrhenius plot for diffusivity versus $1/T$.

が十分に発達する以前に（塗布後直ちに）、メタノール中に浸漬すると、PVC-DMF-メタノール系成分に基づく相分離が抽出時に発生する。図2-11に示すように、両者の成分白濁点曲線は著しく異なり、メタノールによるPVCの相分離が水によるそれと比較して極めてゆっくりと発生するため、微孔構造の緻密な多孔性PVC膜が形成され、微小孔径（ $0.01 \mu\text{m}$ オ-ダー）を有する湿潤状PVC膜が得られる。水中に浸漬すると、PVC-DMF-水系成分系に基づくPVCの相分離が急激に進行し、PVCは抽出方向に沿って沈澱し、筒状PVC膜となる。

更に、本章では湿潤状PVC膜の性質について検討した。透水量と含水率から算出される湿潤状PVC膜の膜孔径は $0.01 \mu\text{m}$ オ-ダーであり、蛋白質溶液中の50%の蛋白質を除去するに相当する分子量が 10^5 オ-ダーであり、これを分子径に換算すると $0.01 \mu\text{m}$ オ-ダーとなり、両者の結果は良く一致する。

同時に、湿潤状PVC膜は酵素を良く吸着する性質を有することを見出した。湿潤状PVC膜上の酵素

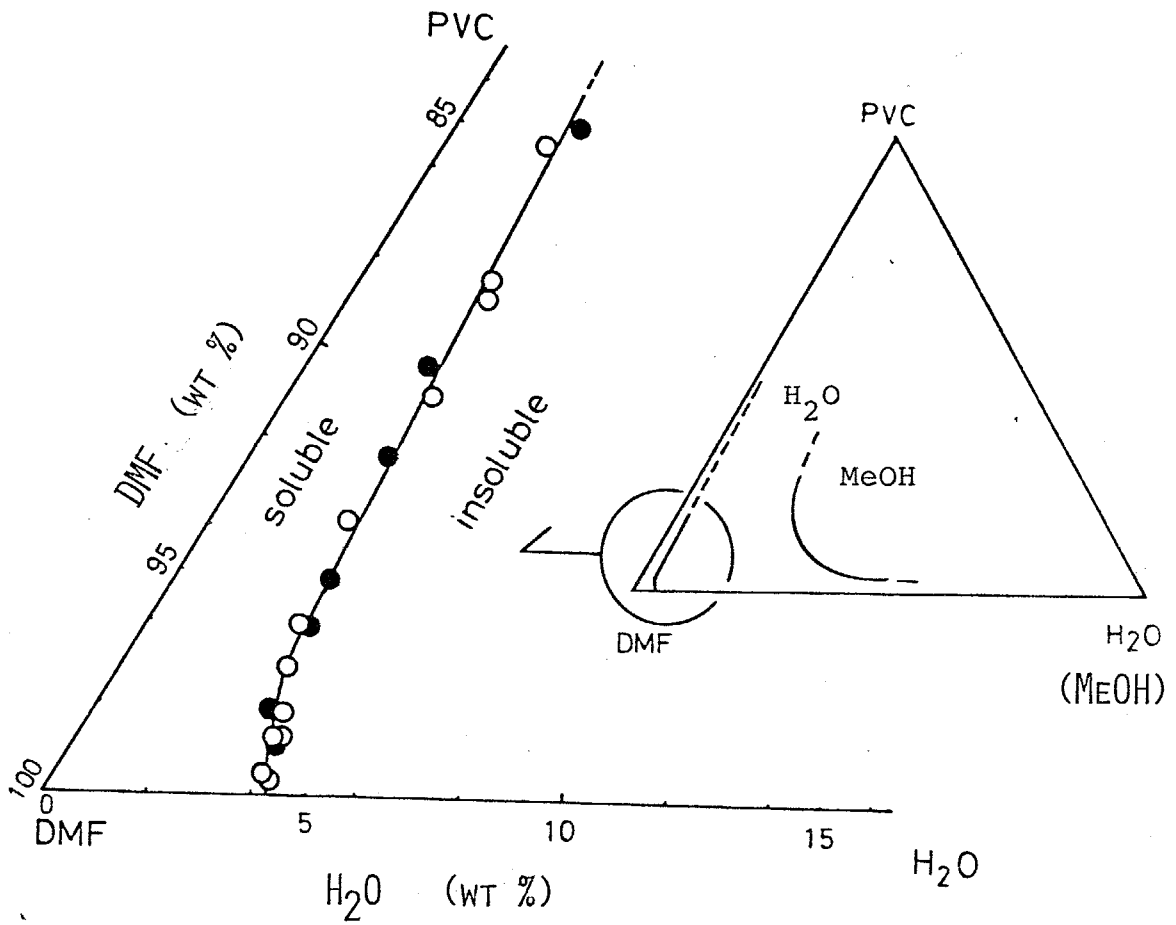


Fig. 2-11

Cloud point curves at 25 °C for PVC/DMF/H₂O and PVC/DMF/MeOH. PVC Mn: (●) 26900, (○) 48400.

はイオンの影響を受けず尿素によって脱離する。低分子化合物の膜中における拡散定数の活性化エネルギーが 2.6 kcal/mol と低いことから、酵素は湿潤状 PVC 膜に非イオンの的に結合し、膜が酵素の分子径に相当する微孔を有しているため、蛋白質や酵素がさらに脱離しにくい場を提供していると考えられる。

更に、拡散定数が Ach I 濃度に対し一定であることから、低分子化合物と膜の親和力は低分子化合物の濃度に関係なく一定である。生体高分子、例えば、コラーゲンで観察される二種の吸着座位（高親和力を有する吸着座位と低親和力を有する吸着座位）を有する担体³⁴⁾と、一種の吸着座位を有する湿潤状 PVC 膜担体との吸着機構は異なっていると考えられる。一般に、体液成分の化学分析では、体液中の交雑物や酵素反応で生じる生成物などが担体に吸着し、体液成分の連続的な測定を困難にしている。しかしながら、湿潤状 PVC 膜は一種の吸着座位で、かつ、低分子の拡散が速いことから、簡単な洗滌方法によって容易にこの膜から生成物質が洗滌でき、連続的な体液成分の分

析が可能となると期待できる。

従って、湿潤状PVC膜は膜表面上に酵素を安定に、かつ、非イオンの的に固定化し、膜中への基質と生成物の拡散と透過が速く、適度な膜強度を有することが明らかとなり、酵素固定化担体として有用であることが判明した。

2.5 結言

本章で得られた知見を要約すると、次のようになる。

- 1) 湿潤状PVC膜はPVC-DMF溶液をガラス板上に塗布後、直ちに有機溶媒、例えば、メタノール中へ浸漬し、更に、水中に浸漬することによって得られた。
- 2) PVCの相分離現象から、多孔性PVC膜の製膜機構を考察した。
- 3) 湿潤状PVC膜の特性、例えば、透水量、含水率、膜強度、蛋白質阻止特性を把握した。
- 4) 湿潤状PVC膜は低分子量物質を容易に透過し本膜に低分子量物質は吸着しなかった。

- 5) 湿润状PVC膜は高分子量物質(蛋白質, 酵素)と疎水的に結合した。

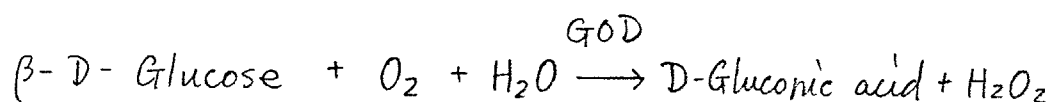
以上の結果から, 湿润状PVC膜が従来の担体と異なり, 臨床検査分野で利用できる酵素固定化用担体としての性能を有することが判明した。

オ 3 章

グルコースオキシダーゼ固定化ポリ塩化ビニル膜を用いるセンサーによるグルコースの計測

3.1 緒言

血糖値の測定は、血液成分検査において重要である。最近、固定化酵素と電気化学的デバイスを組合わせたバイオセンサー^{35,36)}が開発され、これで迅速、かつ、簡便に血糖を測定出来るようになった。グルコースはグルコースオキシダーゼ(GOD)の作用で酸化され、下式のように、グルクロン酸と過酸化水素を生成する。



この反応で、酸素が消費され、これは酸素電極で電流値として測定できる。すなわち、電流値の変化からグルコース濃度を測定できる。

しかしながら、グルコースオキシダーゼ固定化膜の活性が一般に低く、寿命も短かいため、固定化酵素膜を頻繁に交換しなければならない。しかも、固定化

酵素膜は高価なため、固定化酵素を用いたセンサーによる検査コストは可溶性酵素を用いた通常のコストと大差がなかった。従って、1) より安価な酵素固定化担体、2) より簡便な方法による酵素の固定化方法、3) 活性が高く、寿命が長い固定化酵素膜の調製法、などの開発が要望されている。

そこで、前章で得られた湿潤状PVC膜がグルコースオキシダーゼ(GOD)を簡便かつ、安全に吸着し、基質や生成物を容易に膜中に拡散させる性質に着目し、GODを湿潤状PVC膜に固定化し、これを用いるバイオセンサーを開発することにした。 β -D-グルコース溶液、コントロール血清、及び、正常人血清を用いて、これらの試料中のグルコースをGOD固定化PVC膜を装着したセンサーで測定し、GOD固定化PVC膜の有用性を明らかにする。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬

グルコースオキシダーゼ(GODと略) [β -D-

glucose ; O_2 oxidoreductase E. C. 1. 1. 3. 4. , 100 units \cdot mg⁻¹] はシグマ社のものをそのまま使用した。その他の試薬は市販品を使用した。

3. 2. 2 グルコースオキシダーゼの固定化

GODの固定化は吸着法で実施した。すなわち、GOD溶液 (50 mg \cdot dl⁻¹ , pH 5.6 , 0.066 M リン酸緩衝溶液 (PB と略)) 4 ml に湿潤状 PVC 膜約 40 mg (直径 2.8 cm 相当) を加え、25 °C で 4 時間浸漬して反応させた。反応後、膜を大過剰のリン酸緩衝溶液 (PB) で洗滌し、GOD 固定化 PVC 膜を得た。湿潤状 PVC 膜上に固定化された酵素量はミフロケルダール法³¹⁾ で測定した。

また、GODの固定化は包括法でも実施した。すなわち、GOD (1.64 mg) を 8 wt% PVC - DMF 溶液 1.0 g 中に添加し、良く攪拌した。その溶液をガラス板上に塗布し、メチルセロソルブ溶媒中へ、20 分間、0 °C で浸漬した。得られた膜を大過剰のリン酸緩衝溶液 (PB , pH 5.6) で洗滌し、リン酸緩

衝溶液 (PB, 0.066 M, pH 5.6) 中で保存した。

3.2.3 酵素活性の測定

O-ジアニンジン $1 \mu\text{mol}$ を 25°C で1分間酸化するのに必要な酵素量を 1 unit と定義し, GOD の活性を Bentley の方法³⁷⁾ に準じて測定した。

3.2.4 グルコースセンサーの組立

グルコースセンサーを図3-1に示す。センサーは GOD 固定化 PVC 膜, 酸素透過性テフロン膜 ($40 \mu\text{m}$), アルカリ電解液 (KOH 30%), 白金陰極, 鉛陽極から成っている。上記二枚の膜は O-リングを用いて白金陰極に直接しっかりと固定し, ナイロン網を GOD 固定化 PVC 膜の支持材として使用した。血糖値の連続測定には, 上記デバイスをシステム化して製作したグルコースセンサーを用いた (図3-2)。

3.2.5 測定方法

0.066 M リン酸緩衝溶液 (PB, pH 5.6) 6 ml を

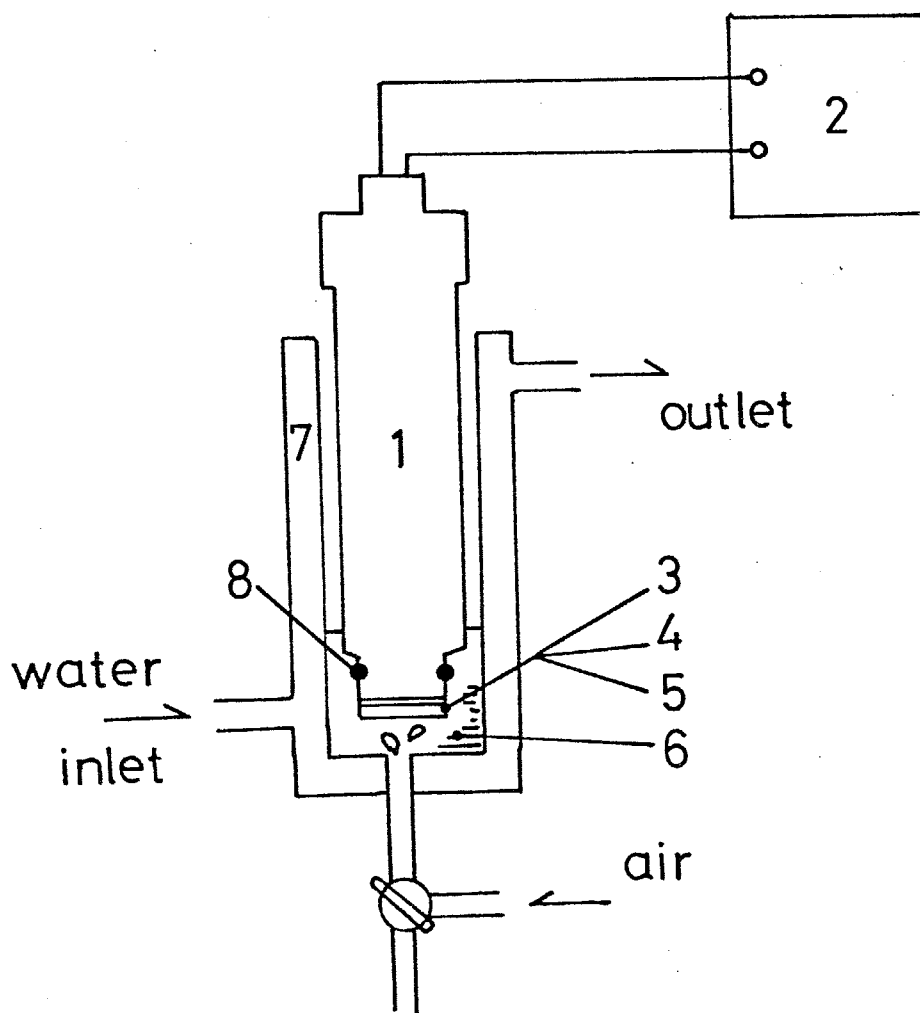


Fig. 3-1

Schematic diagram of the enzyme electrode for the determination of glucose: 1, Oxygen electrode; 2, recorder; 3, Teflon membrane; 4, glucose oxidase-polyvinylchloride membrane (40 μm); 5, nylon net; 6, sample solution; 7, water jacket; 8, O-ring.

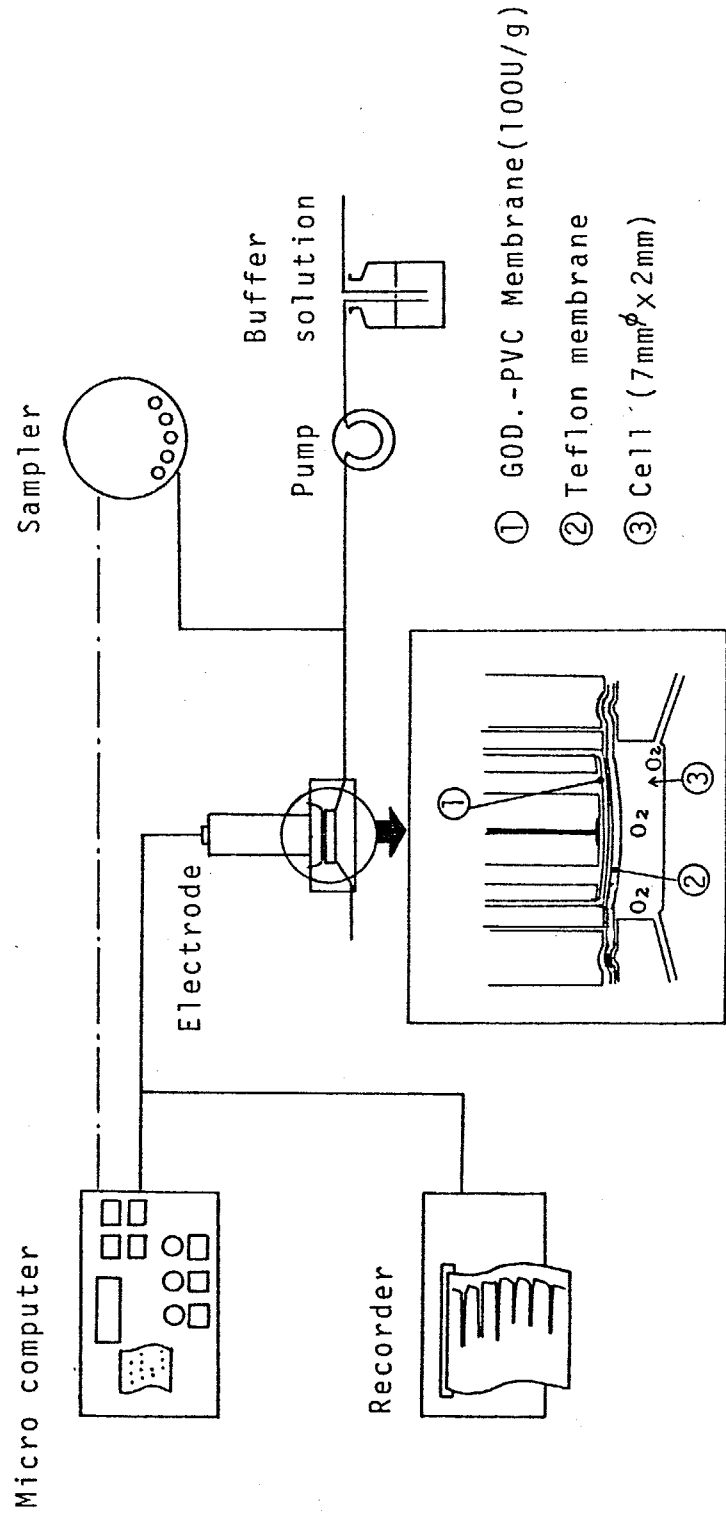


Fig. 3-2 Diagram of the glucose analyzer

反応容器（図3-1）中に入れ，この溶液中に空気をポンプで送り込み，酸素濃度を飽和状態にした。電流値が定常となったのち，各種濃度の β -D-グルコース溶液0.5 mlを添加し，電流値の変化を記録計（東亜電波社製 model EPR-200A）で記録した。初めの電流値と定常電流値の差と β -D-グルコース濃度の関係から検量線を求めた。

3.3 実験結果

3.3.1 GODの湿潤状PVC膜への固定化

グルコースオキシダーゼを湿潤状PVC膜に固定化する場合の反応条件について検討した。酵素固定化量及び固定化酵素活性に及ぼす湿潤状PVC膜の酵素溶液中への浸漬時間の影響を図3-2'に示す。浸漬時間が増加すると共に，酵素固定化量は増加し，4時間後に定常値に達した。このとき，湿潤状PVC膜1gに約20mgのGODが吸着した。一方，GOD固定化PVC膜の活性は浸漬時間15分後には定常となった。

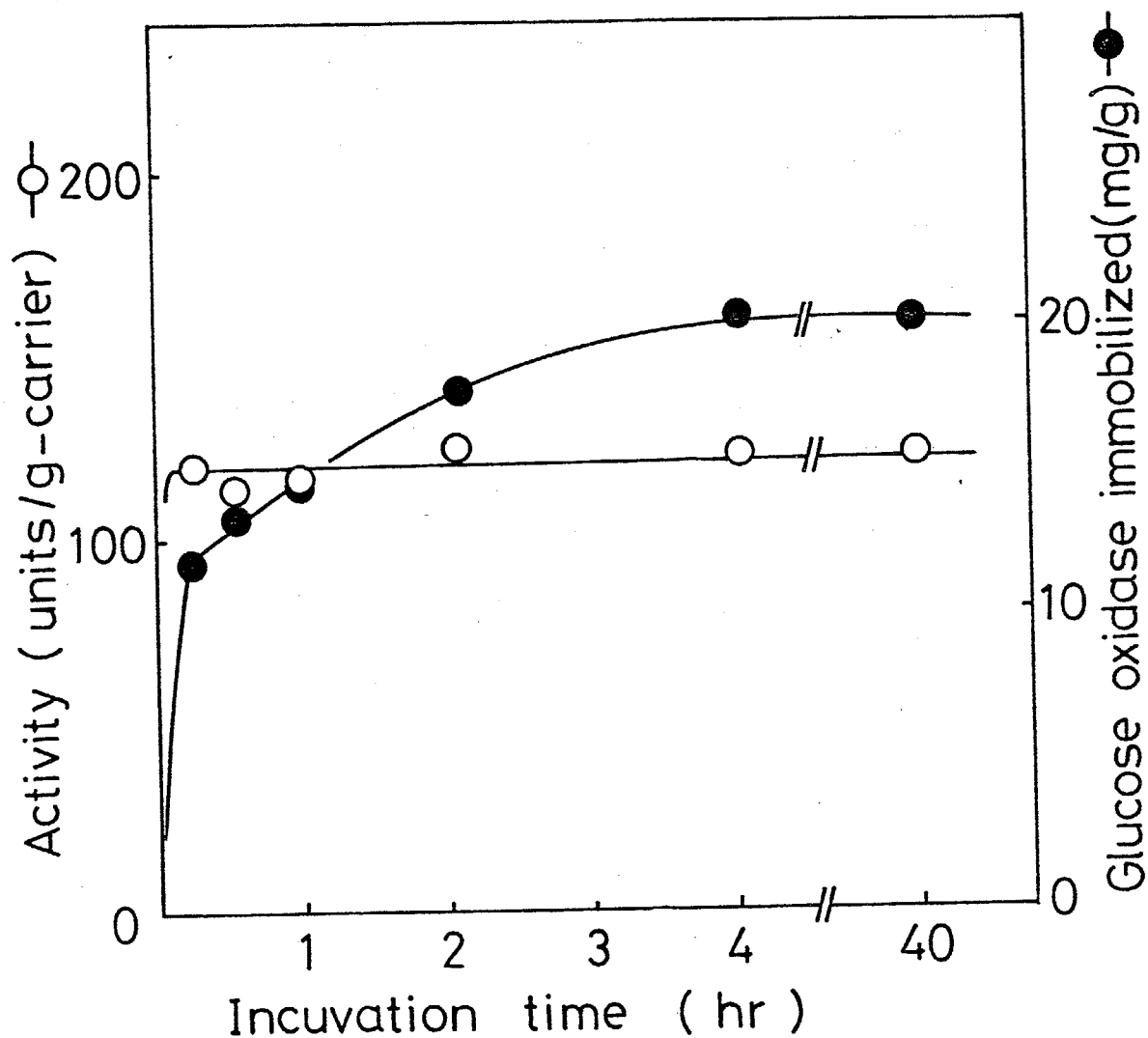


Fig. 3-2'

Effect of incubation time of the wet PVC membrane on the activity and the amount of the enzyme immobilized. The immobilization of glucose oxidase was carried out under standard conditions except for the glucose oxidase concentration (10 mg/dl) employed.

また、酵素溶液中の酵素濃度が固定化量、及び、活性に及ぼす影響を図3-3に示す。GOD固定化PVC膜の活性は溶液中の酵素濃度 $5 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ 以上で定常となり、酵素濃度の増加と共に、酵素の固定化量は増加した。一方、湿潤状PVC膜からのGODの脱離は実験時間内（24時間）では観察されなかった。これらの結果から、膜内部に固定化された酵素は活性の発現にはあまり関与せず、主に、膜表面に吸着した酵素のみが活性に関与しており、固定化量が増加したにもかかわらず、活性は定常値になったと考えられた。他方、市販のポリ塩化ビニルフィルムと精密濾過用PVC膜（ミリポア社製、平均孔径 $0.45 \mu\text{m}$ ）を用いて同様の実験をしたが、酵素はほとんど吸着しなかった。したがって、湿潤状PVC膜の構造が酵素の吸着に重要な役割を演じていると考えられた。

包括法によるGODの固定化を行なった結果を表3-1に示す。包括法で得られた固定化酵素の活性は吸着法で得られたそれより低かった。包括法によって固定化した場合、酵素が湿潤状PVC膜内部にある

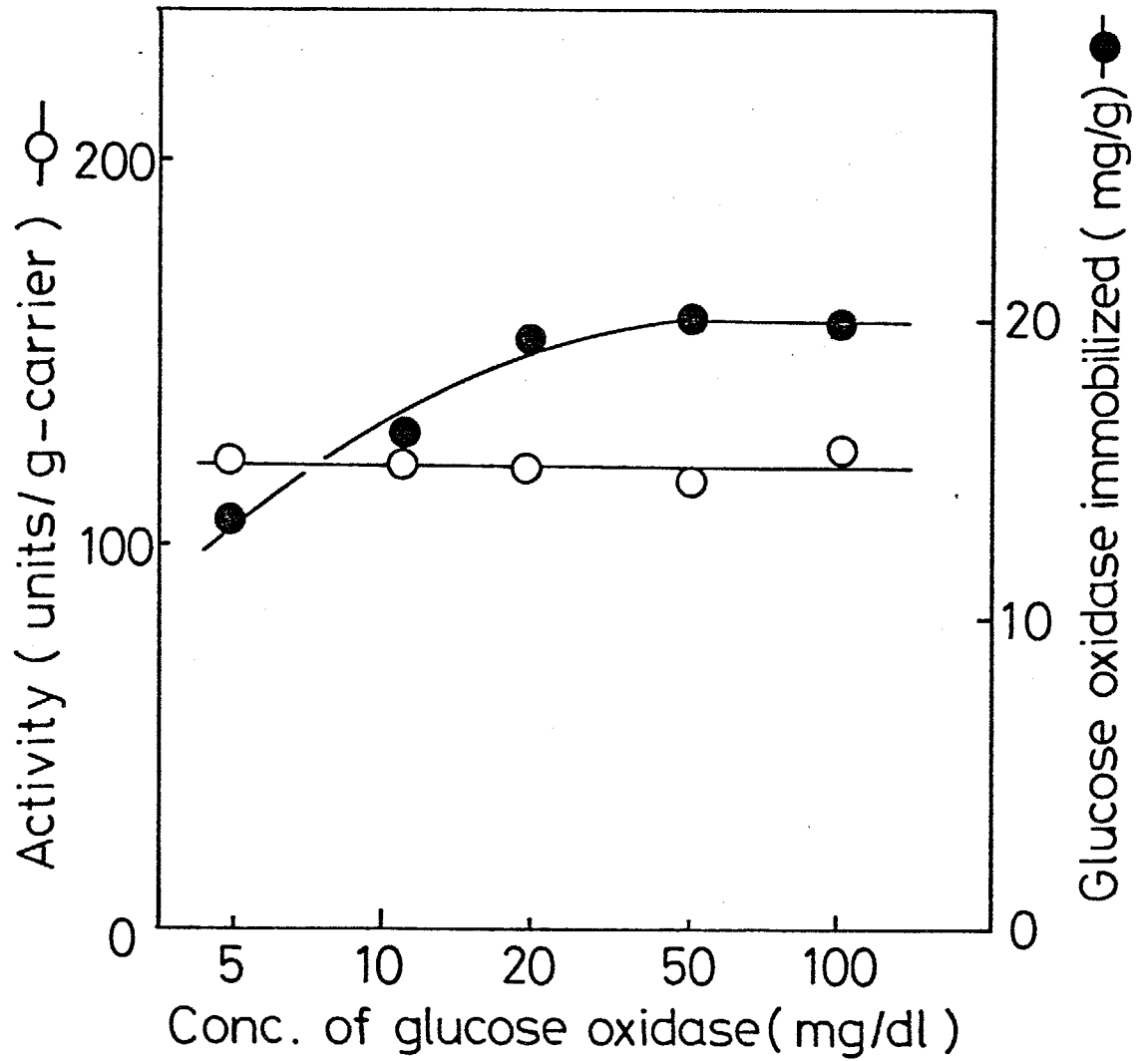


Fig. 3-3

Effect of the glucose oxidase concentration on the activity and the amount of glucose oxidase immobilized. The immobilization of glucose oxidase was carried out under standard conditions except for the various glucose oxidase concentrations employed.

Table 3-1

Activities of the immobilized glucose oxidase prepared by the adsorption and entrapping methods.

Method	Membrane thickness (μm)	Amount of enz. imm. (mg/g carrier)	Activity of enz. imm. (unit/g carrier)	Yield of activity (%)
Adsorption	50	20	110	5.5
Entrapment	40	4.5	26	5.7
	107	4.4	16	3.6

ため、反応に関与しにくく、見かけ上、活性が低下したと考えられた。なお、本実験では、GODがメタノール溶媒中で容易に失活するため、代わりにメチルセロソルブを使用した。以上の結果より、GODの固定化法として吸着法を採用し、酵素固定化の標準条件として反応時間4時間、浸漬する酵素溶液のGOD濃度を $50 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ とした。

3.3.2 GOD固定化PVC膜の性質

GOD固定化PVC膜のpH安定性について検討した(図3-4)。固定化酵素と可溶性酵素はpH 5.6 ~ 6.0の範囲では安定であった。しかしながら、固定化酵素は酸性側・アルカリ性側でもとの酵素より不安定であった。その理由は現在のところ不明である。

次に、固定化酵素ともとの酵素の熱安定性について検討した結果を図3-5に示す。固定化酵素は高温側でもとの酵素より安定であり、もとの酵素が完全に失活した 60°C においても、固定化酵素活性は初期活性の20%が残存していた。

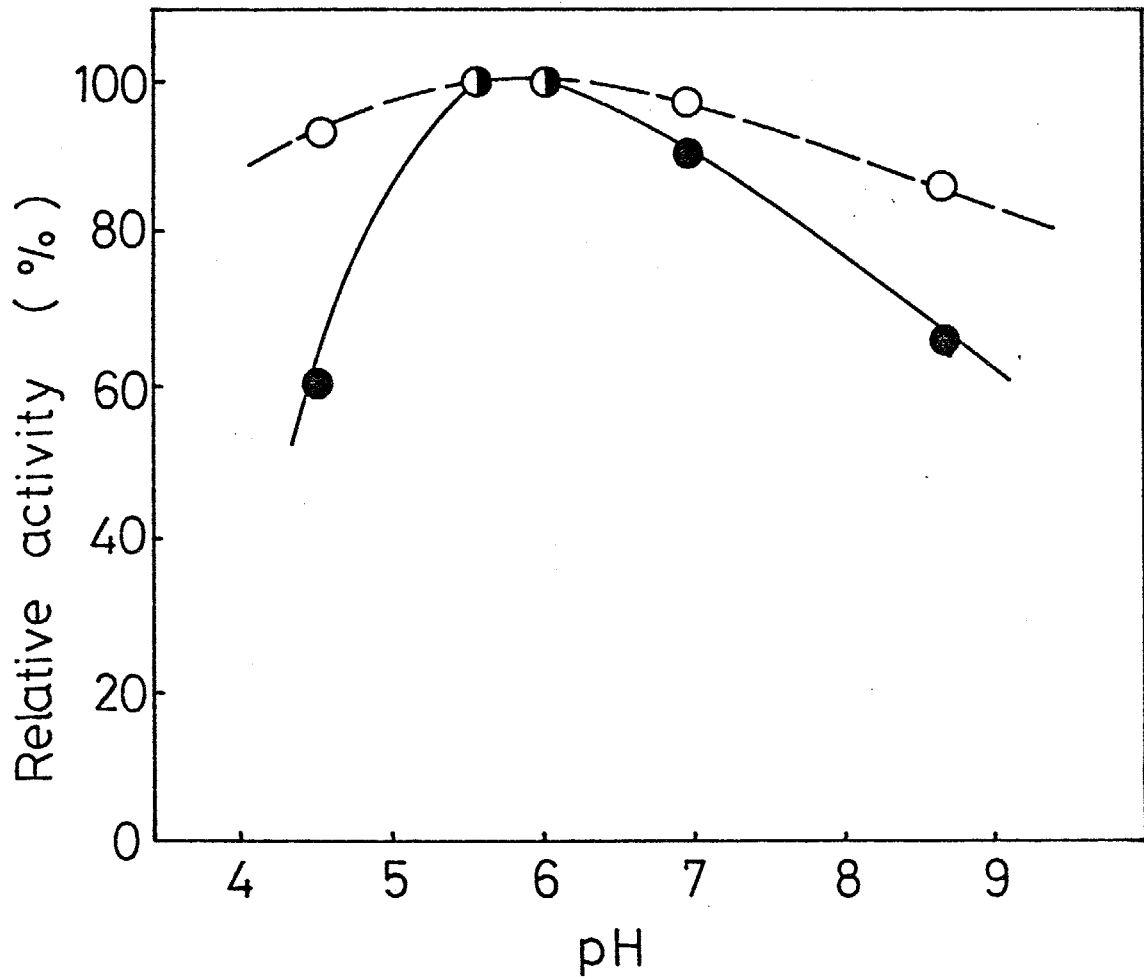


Fig. 3-4

pH Stability of the glucose oxidase-PVC membrane (●) and native glucose oxidase (○). The immobilization of glucose oxidase was carried out under standard conditions. The GOD-PVC membrane (dia. 6 mm) was incubated in 10 ml of various buffer solutions (pH: 4.5, 5.5, 6.0, 6.9 and 8.7; 0.066M phosphate buffer) for 24 hr at 25 °C.

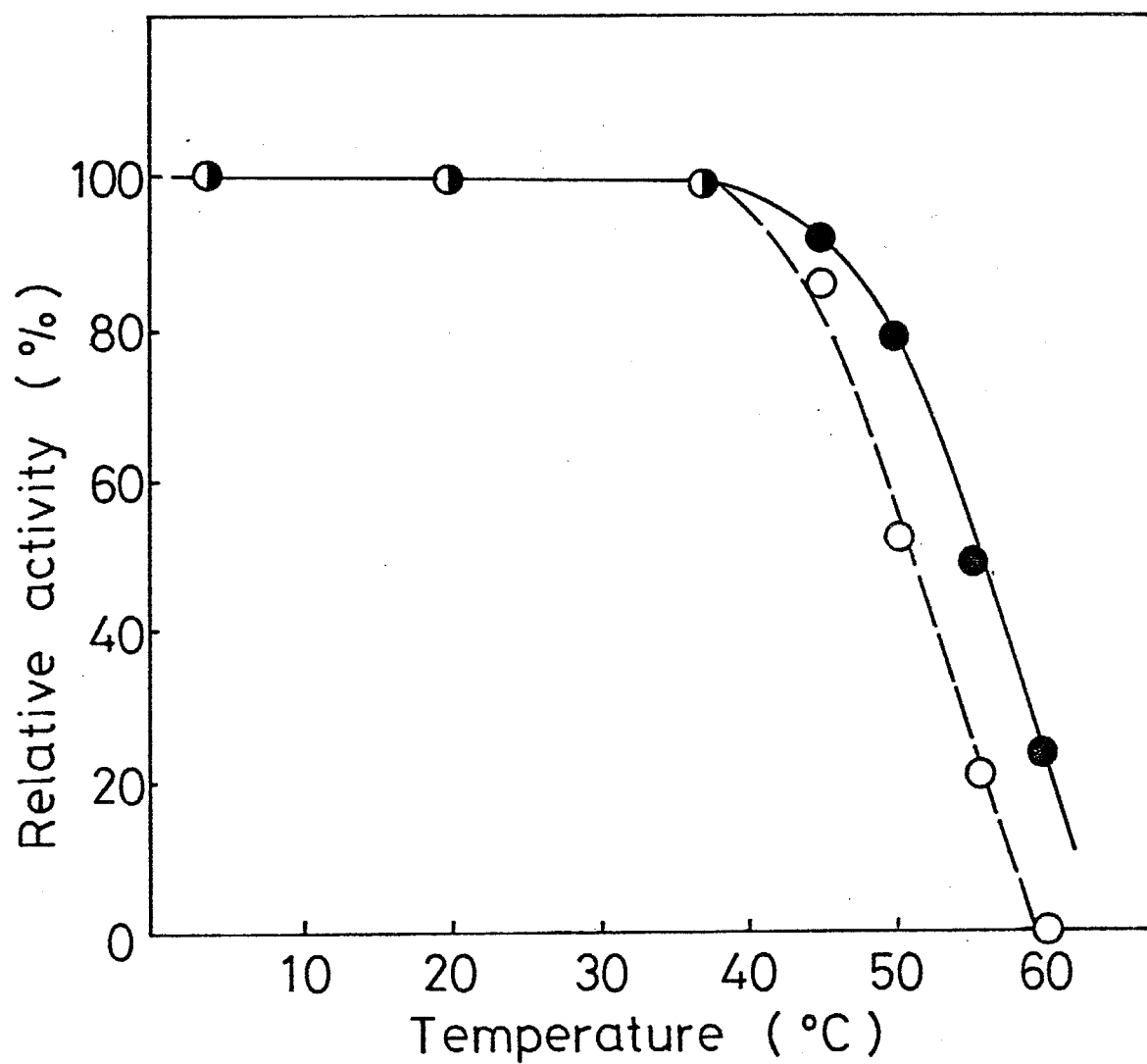


Fig. 3-5

Thermal stability of the GOD-PVC membrane(●) and native glucose oxidase(O). The experimental conditions were the same as those in Fig. 3-4 except for the temperature and pH of the buffer solution (pH 5.6) employed.

イオン強度の固定化酵素活性に及ぼす影響を検討するため、各種濃度の塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝溶液 (PB) に固定化酵素膜、及び、もとの酵素を添加し、 25°C で 4 時間反応させた。この結果を図 3-6 に示す。高イオン強度 $4.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ でも固定化酵素の活性はもとの酵素のそれより高かった。

GOD 固定化 PVC 膜の保存安定性を表 3-2 に示す。約 40 mg の GOD 固定化 PVC 膜を 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 5.6) 中、 4°C 又は 25°C で保存した。

4°C では 6 ヶ月間、 25°C では 2 ヶ月間保存したが、酵素活性は初期の 80% を保持していた。一方、もとの酵素は 3 日後に完全に失活した。

3.3.3 酵素固定化 PVC 膜の酵素電極への適用

前節で、安価な担体を利用した固定化酵素を調製することができるようになった。そこで、GOD 固定化 PVC 膜を血糖測定用酵素電極へ適用し、その特性について検討した。

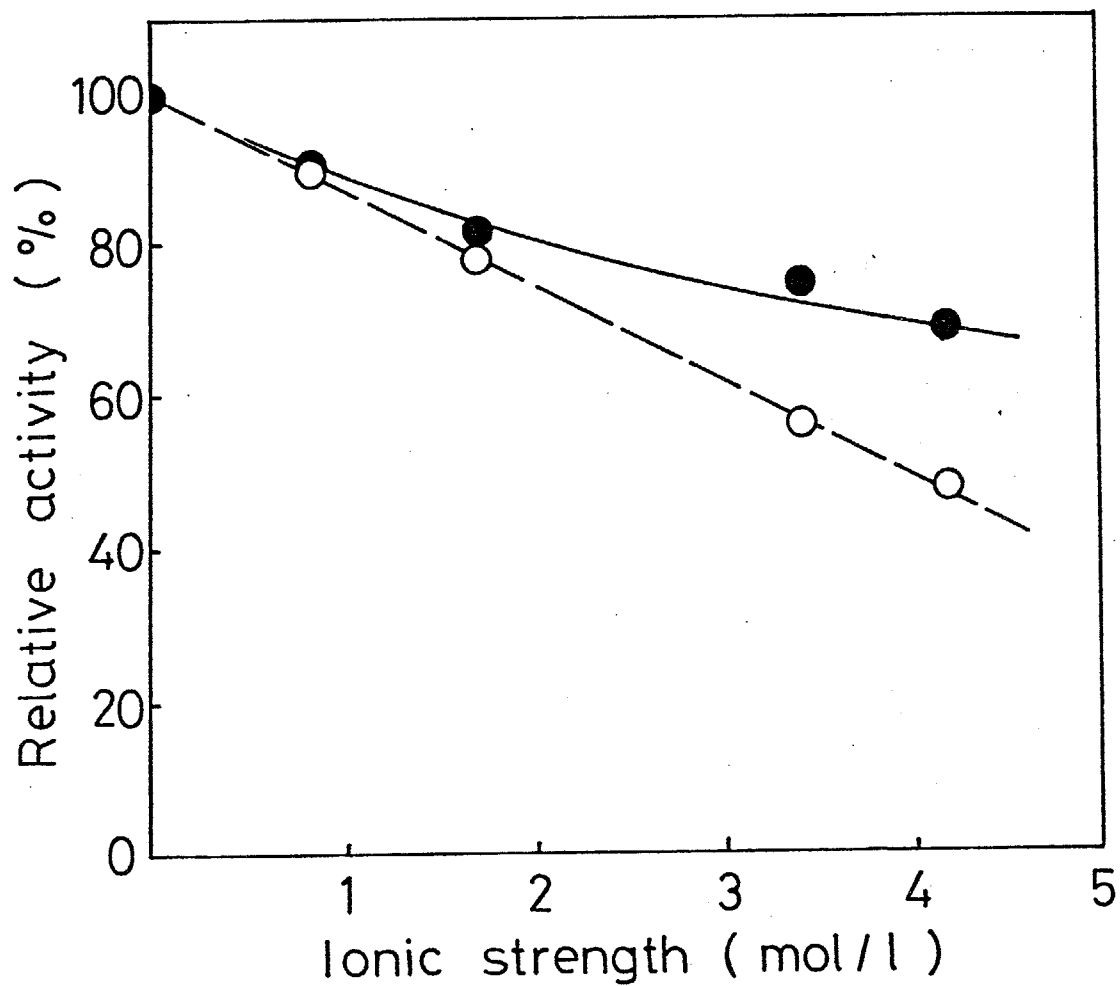


Fig. 3-6

Stability of the GOD-PVC membrane(●) and native glucose oxidase(O) to sodium chloride. The experimental conditions were the same as those in Fig. 3-5 except for the temperature (25 °C) employed.

TABLE 3-2
Storage stability of the GOD-PVC membrane

Storage period (week)	Activity of the membrane	
	4°C* (unit/g)	25°C* (unit/g)
1	116	116
2	130	125
4	110	110
8	138	136

*The membrane were stored in 0.066M phosphate buffer(pH5.6).

3.3.3.1 検量線

種々の濃度の β -D-グルコース溶液 100 μ l をセル中に注入すると、電流値は減少し、30秒後に定常電流値が得られた。初期の電流値と得られた定常電流値との差と、グルコース濃度との相関係を図3-7に示す。図3-7から、グルコース濃度 $400 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ 以下で濃度と電流減少値の間に直線関係が認められた。正常人血糖値は約 $80 \sim 100 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ 、高血糖値では約 $200 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ であるので、本システムで血糖が迅速に測定できることがわかった。

3.3.3.2 測定値の再現性

グルコース標準溶液、コントロール血清、正常ヒト血清、空腹時の正常ヒト血清を用いて、測定を10回繰り返して、測定値の再現性を検討した(表3-3)。表3-3より、それぞれのCV値は2.0%以下で、再現性よくグルコースを測定できることがわかった。

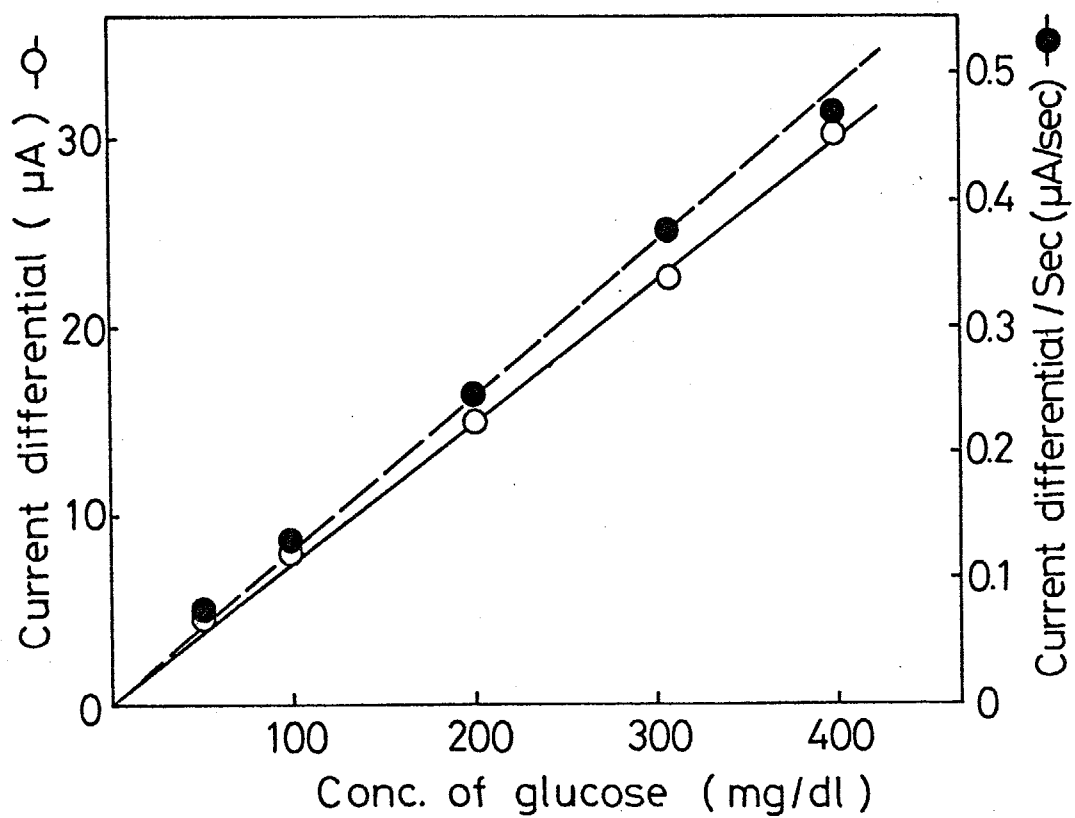


Fig. 3-7

Calibration curves of the enzyme electrode.

Preparation of the GOD-PVC membrane and the determination were performed under standard conditions.

TABLE 3-3
Reproducibility of glucose in the various samples

Sample	Standard solution*		Control serum		Human serum	
	100mg/dl	200mg/dl	CS.I	CS. II	Fasting I	Fasting II
Mean value (mg/dl)	107	199	119	204	101	84
SD. (mg/dl)	2.0	1.8	1.1	3.5	2.0	1.6
CV. (%)	1.9	0.9	1.9	1.7	2.0	1.9
N. (point)	15	20	10	10	10	10

* β -D-Glucose

A GOD-PVC membrane (100U/g) was attached to a glucose sensor. The experiments were carried out under the conditions of 2.5 ml/min of flow rate, 100 μ l of sample volume and at 30°C.

3.3.3.3 夾雑物の影響

血中に存在し，固定化酵素膜に吸着したり，測定値に誤差を与える可能性のあるゼリルビン，アスコルビン酸，ヘモグロビンをコントロール血清に添加し，これらの物質が血糖値の測定に及ぼす影響を検討した（図3-8）。図3-8から，真の血糖値に対し，ゼリルビン（血清中 $11 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ 相当添加）は約12%の正誤差，アスコルビン酸（血清中 $45 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ 相当添加）は約3%の負誤差，ヘモグロビン（血清中 $800 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ 相当添加）は約2%の負誤差を生じることが示された。

3.3.3.4 連続測定への応用

この酵素電極は，2週間以上，1000検体以上のグルコースの測定に利用できた。

3.3.3.5 従来法との比較

最も精度の高いといわれている血糖測定法³⁾（HK-G6PDH法）と本法との相関性について検討し，その結果を図3-9に示す。HK-G6PDH法によ

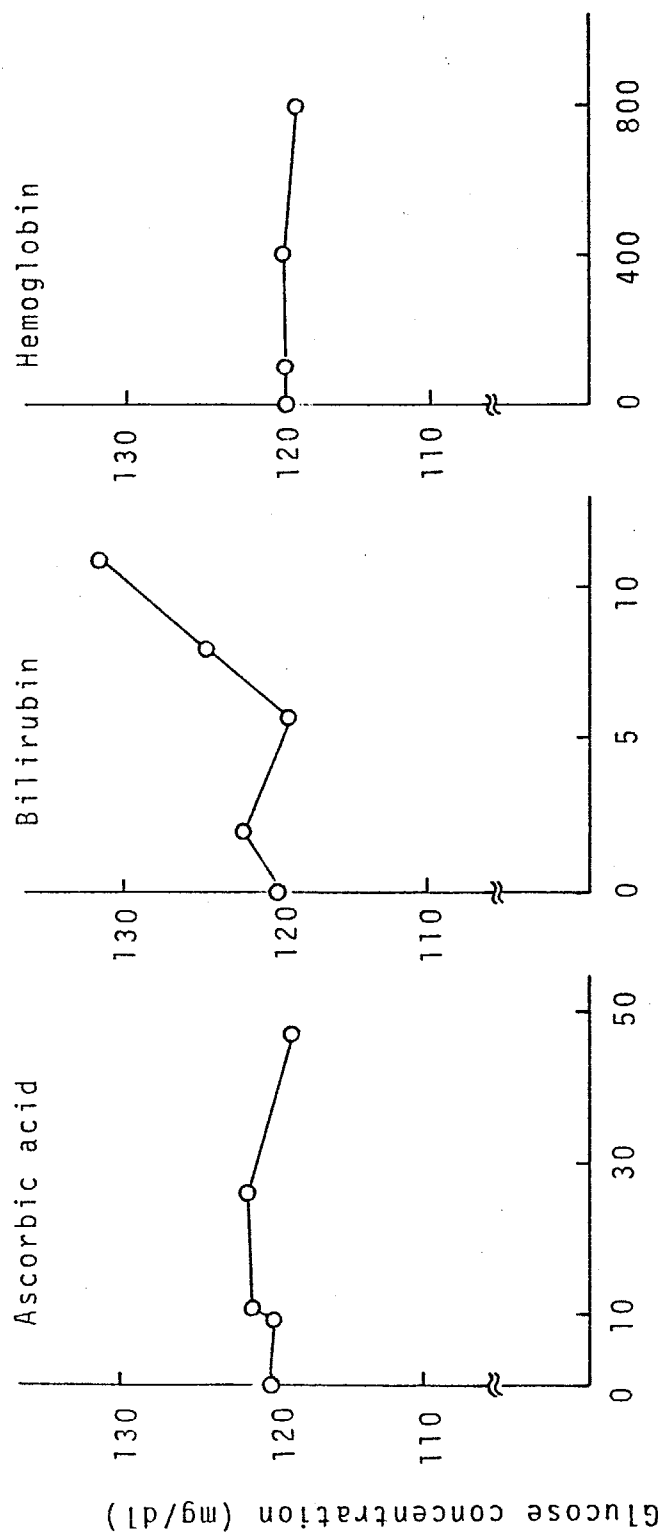


Fig. 3-8 Effect of various interference substances on the glucose concentrations determined.

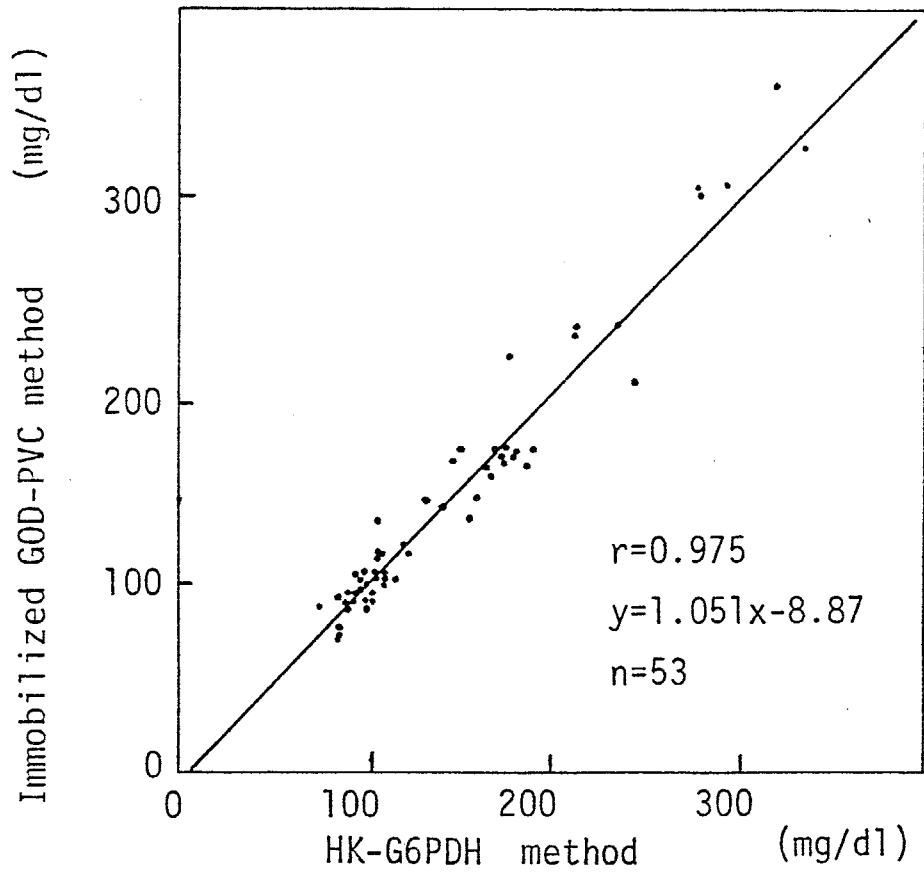


Fig. 3-9

Correlation between HK-G6PDH method and the immobilized GOD-PVC method:
HK-G6PDH method/Abbott VP, Immobilized GOD-PVC method/Enzyme electrode.

る血糖測定にはアボット社VP型オートアナライザーを用いた。図3-9から、測定53検体で相関係数0.975が得られた。

3.4 考察

GODを固定化した湿潤状PVC膜は、もとの酵素に比し、熱安定性やイオン強度に対する安定性が増し、酵素の寿命は長くなることが明らかとなった。従って、この酵素固定化PVC膜を酵素電極に適用し、血糖の測定に適用した。この酵素固定化PVC膜を用いる酵素電極で精度良く血糖を測定出来ることが示された。測定時間と洗滌に要する時間を合わせて30秒以内で測定が迅速に終了し、連続的グルコースの測定に使用できることを見出した。

この湿潤状PVC膜は他の各種酸化還元酵素に適用でき、臨床検査分野に適用できる極めて安価な固定化酵素用担体であることがわかった。例えば、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼなどがすでにこの担体を用いて固定化されて

いる。

3.5 結言

本章で得られた知見を要約すると、次のようになる。

- 1) 吸着法で湿潤状PVC膜にGODを固定化した。GOD固定化PVC膜は、包括法で固定化したそれに比べると、活性と活性収率の点で優れていた。
- 2) GOD固定化PVC膜の諸性質を明らかにした。特に、保存安定性は、もとの酵素より優れていた。
- 3) GOD固定化PVC膜を血糖測定用酵素電極に適用し、これの応答特性、測定の再現性、夾雑物の影響などの諸特性を明らかにした。

本研究で、湿潤状PVC膜がGOD固定化用担体として優れており、GOD固定化PVC膜は血糖測定用酵素電極に実際に適用できることを明らかにした。

第 4 章

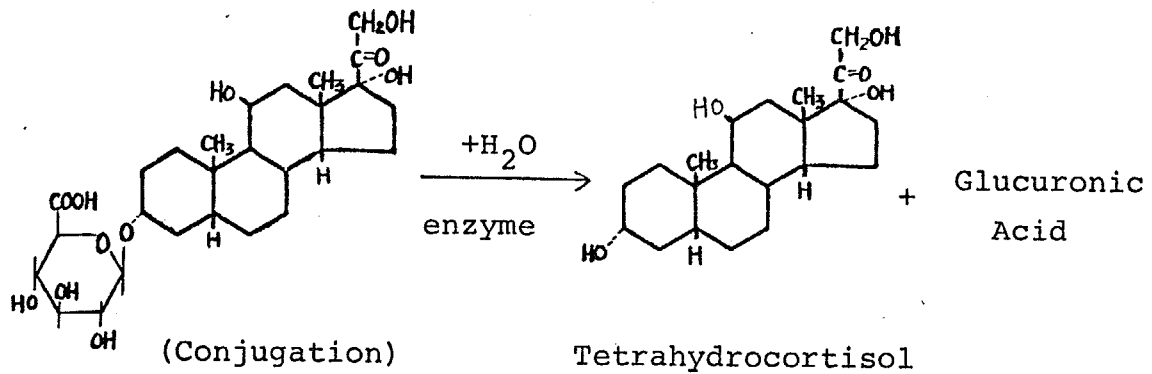
β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜による グルクロン酸抱合体の加水分解

4.1 緒言

前章では、湿潤状PVC膜にGODを固定化し、これを電気化学的デバイスと組合わせて、グルコースセンサーを構成し、これを用いて血糖値が測定できることを示した。一方、光学的検出法、即ち、紫外・可視・赤外分光光度計による測定法が血液、又は、尿成分の分析には一般的に用いられている。例えば、ステロイドホルモン分析³⁸⁾では、各種のステロイド誘導体を分光学的分析で精度良く測定できる。

β -グルクロニダーゼは、17-ヒドロキシコルチコステロイド(17-OHCS)のようなステロイドホルモンの分析に利用されている酵素である。ステロイドホルモンは尿中で溶解性があるようにグルクロン酸や硫酸の抱合体として存在する。従って、ステロイドホルモンを分光学的に分析するためには、先ず、次

式に示すようにグルクロン酸抱合体を β -グルクロニダーゼによって加水分解してステロイドを得る必要がある。



しかしながら、グルクロン酸抱合体を加水分解するには長時間を要する。また、酵素は加水分解反応中に失活するため、17-OHCSの分析には大過剰の β -グルクロニダーゼを用いなければならない。そこで、 β -グルクロニダーゼを固定化し、これをグルクロン酸抱合体の分析に用いようと考えに至った。

本章では、 β -グルクロニダーゼを種々の担体に固定化する条件を検討する。更に、得られた固定化 β -グルクロニダーゼの性質を明らかにし、17-OHCS分析システムへの適用を予備的に検討する。ここでは、グルクロン酸抱合体のモデルとして、フェノールフ

γレイングルクロナイドを基質として用いた。

4.2 実験方法

4.2.1 試薬

β-グルクロニダーゼ [21.5 units · g⁻¹ 酵素, EC 3.2.1.31] は P. L. Biochemical 社製, フェノール
 γタレイングルクロナイド (PG) はシグマ社製, シ
 リカゲル (メッシュ 40~60) は和光純薬社製, 各種
 セファデックス, 及び, セファローズはファルマシア
 社製を用いた。実験には, イオン交換・蒸留水を用
 いた。

4.2.2 β-グルクロニダーゼの担体への 固定化

酵素 100 mg を 100 ml の酢酸ナトリウム緩衝溶液 (0.1
 M, pH 4.5) に溶解させた。この酵素溶液 4 ml 中
 に, 第2章で調製した湿潤状 PVC 膜 (直径 33 mm)
 を 1 時間浸漬させた。浸漬後, 未吸着の β-グルク
 ロニダーゼを除去するため, 大過剰の酢酸ナトリウム

緩衝溶液 (0.1 M, pH 4.5) で数回 P V C 膜を洗滌した。同様に, ポリスチレンチューブ (直径 7 mm, 栄研器材社製) 酵素溶液 4 ml を入れ, 1 時間浸漬後, 未吸着の β -グルクロニダーゼを除去した。

シリカゲル 1.0 g を酵素溶液 4 ml 中に浸漬させ, 1 時間室温で反応させた。次に, シリカゲルを大過剰の酢酸ナトリウム緩衝溶液 (0.1 M, pH 4.5) で洗滌し, 未吸着の β -グルクロニダーゼを除去した。

DEAE-セファデックス, 又は, SP-セファデックス (膨潤時) 1.0 g を上記酵素溶液 4 ml 中に加え, 室温にて 1 時間浸漬して反応させた。得られたゲルは大過剰の上記緩衝溶液 (0.1 M, pH 4.5) で洗滌して, 固定化酵素ゲルを得た。

CNBr 活性化セファロースへの β -グルクロニダーゼの固定化は次のように行なった。膨潤ゲル 0.3 g を $50 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ の酵素溶液 (0.1 M リン酸, 0.5 M 塩化ナトリウム; pH 8.0) 30 ml に添加し, 2 時間, 25°C で反応させた。得られたゲルは大過剰の 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝溶液で洗滌した。

以上，すべての β -グルクロニダーゼ固定化物は4℃で保存した。

4.2.3 膜性能の測定

膜表面積は N_2 ガス吸着に基づくBET法で測定した。含水率・透水量は第2章の方法に準じて測定した。

4.2.4 酵素活性の測定方法³⁹⁾

共栓付試験管に0.8 mlの0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝溶液(pH 4.5)と0.1 mlのフェニールフタレイニングルフロナイドを添加し，これに0.1 mlの β -グルクロニダーゼ溶液(20 μ g 含有)を添加し，酵素反応を開始させた。37℃で60分間反応させた後，酵素反応を停止させるため2.5 ml アルカリ・グリシン溶液(0.22 M グリシン，0.22 M 水酸化ナトリウムを含む)と蒸留水1.5 mlを添加して反応溶液のpHを10.2~10.4にした。反応終了後，生成したフェニールフタレイン量を分光光度計(日立製，124型)で比色定量(540 nm)

し、酵素活性を求めた。ここで、 β -グルクロニダーゼ活性 1 単位とは 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のフェノールフタレインを生成する酵素とした。

4.3 実験結果と考察

4.3.1 β -グルクロニダーゼの固定化

β -グルクロニダーゼを種々の担体に固定化した。

このときの β -グルクロニダーゼ固定化物の活性をまとめて、表 4-1 に示す。第 2 章で示した吸着固定化法で調製した β -グルクロニダーゼ固定化 PVC 膜が最も高い活性を示した。この場合、数回洗滌しても酵素の脱離は認められなかった。

シリカゲルに酵素を吸着固定化した場合にも比較的高い活性が得られたが、洗滌による酵素活性の低下が著しかった。 β -グルクロニダーゼは免疫グロブリンを吸着するために用いられるポリスチレンチューブには吸着しなかった。 β -グルクロニダーゼを SP セファデックスにイオン結合で固定化すると活性が認められたが、DEAE セファデックスを用いた場合に

Table 4-1

Activities of various immobilized β -glucuronidase.

Carrier	Binding	Specific activity	
		mU/cm ²	mU/g wet car.
Wet PVC membrane	Adsorbed	1.1	300
Silica gel	Adsorbed	-	27
Polystyrene tube	Adsorbed	-	0
SP-Sephadex	Ionic	-	16
DEAE-Sephadex	Ionic	-	0
Collagen	Entrapment	0.1	10
Carrageenan	Entrapment	-	-
CNBr-activated Sephadex	Covalent	-	120

は活性はほとんどなかった。このような活性のちがいは、セファデックスのイオン結合部位の官能基のちがいによるものと考えられた。

また、 β -グルクロニダーゼを包括法でコラーゲンとカラギーナン膜中に固定化した。⁴⁰⁾ β -グルクロニダーゼ固定化コラーゲン膜は若干の酵素活性を示したが、グルクロン酸抱合体の分析に用いるのには低かった。カラギーナンの場合には、反応条件下で β -グルクロニダーゼ固定化カラギーナン膜が可溶化し、酵素活性の測定が出来なかった。

β -グルクロニダーゼをCNBr活性化セファロースに共有結合で固定化すると、比較的高い活性をもつビーズ状の固定化物が得られた。しかしながら、CNBr活性化セファロースは担体それ自身が高価なこと、ビーズ状のためカラム型反応装置となり、反応後の洗浄が困難なこと、などのためステロイドホルモン分析用固定化物として不適当と考えられた。従って、最も活性が高く、膜状固定化物である湿润状PVC膜が β -グルクロニダーゼの固定化には最適であった。

次に、PVC膜の構造と吸着法で得られた酵素固定化PVC膜の活性との関係をまとめて表4-2に示す。表4-2から、湿潤状PVC膜を用いた場合に酵素活性が最も高くなり、収率は30~50%であった。緻密状・筒状・網目状構造を有するPVC膜では、表面積の増加と共に、見かけ上の活性は増大したが、酵素の脱離が顕著であった。湿潤状PVC膜は湿潤状態のためBET法による表面積は測定出来なかったが、この膜は含水率70~85%の多孔質膜であり、酵素の吸着可能な表面積は十分大きいと考えられた。

表4-3に異なるPVC濃度から調製された湿潤状PVC膜と得られた酵素固定化PVC膜の活性との関係を示す。PVC濃度が8wt%のとき、活性が最も高かった。すなわち、PVC濃度8wt%を用いて調製される湿潤状PVC膜が β -グルクロニダーゼの吸着固定化に適した孔径や表面積を有していると考えられた。

以後の実験では、 β -グルクロニダーゼの固定化用担体として、PVC-DMF溶液(PVC 8wt%)

Table 4-2 Activity Yields and
Surface Areas of PVC membranes

Membrane Structure	Thickness (μm)	Surface Area (m^2/g)	Specific Activity (mU/cm^2)	Activity Yield (%)
Dense	80	0.001	0	—
Finger- like	80	< 1*	0.02	—
Network	80	16*	0.39	30-50
Wet	40	—	1.1	30-50

* BET Method

Table 4-3 Effect of PVC Content on the Water Content, Water Flux, and Activity of β -Glucuronidase-PVC Membrane

Polyvinylchloride Content (%)	Water Content (%)	Water Flux (cm/min)	Specific Activity (mU/cm ²)
6	82	0.51	0.41
8	77	0.13	1.1
10	71	0.021	0.34
12	63	0.003	0.17

から得られる湿潤状PVC膜を用いることにした。

4.3.2 β -グルコロニダーゼの湿潤状

PVC膜への固定化

湿潤状PVC膜（直径33mm, 約40mg）を酵素溶液（ $100\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$, 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝溶液 pH 4.5）中に, 1時間浸漬させて β -グルコロニダーゼ固定化PVC膜を調製する方法について検討した。

図4-1は酵素溶液中へのPVC膜の浸漬時間と活性との関係を示す。活性は浸漬時間の増加と共に増加し, 浸漬時間1時間以上で定常値（比活性 $1.1\text{ mU}\cdot\text{cm}^{-2}$ ）に到達した。図4-2は浸漬溶液中の酵素濃度と活性との関係を示す。活性は酵素濃度の増加と共に増大した。酵素濃度 $100\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ 以上では, β -グルコロニダーゼの一部は 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝溶液（pH 4.5）に溶けなかった。

以後の実験では, β -グルコロニダーゼ固定化PVC膜の調製方法として, 浸漬時間1時間, 酵素濃度 $100\text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ とした。

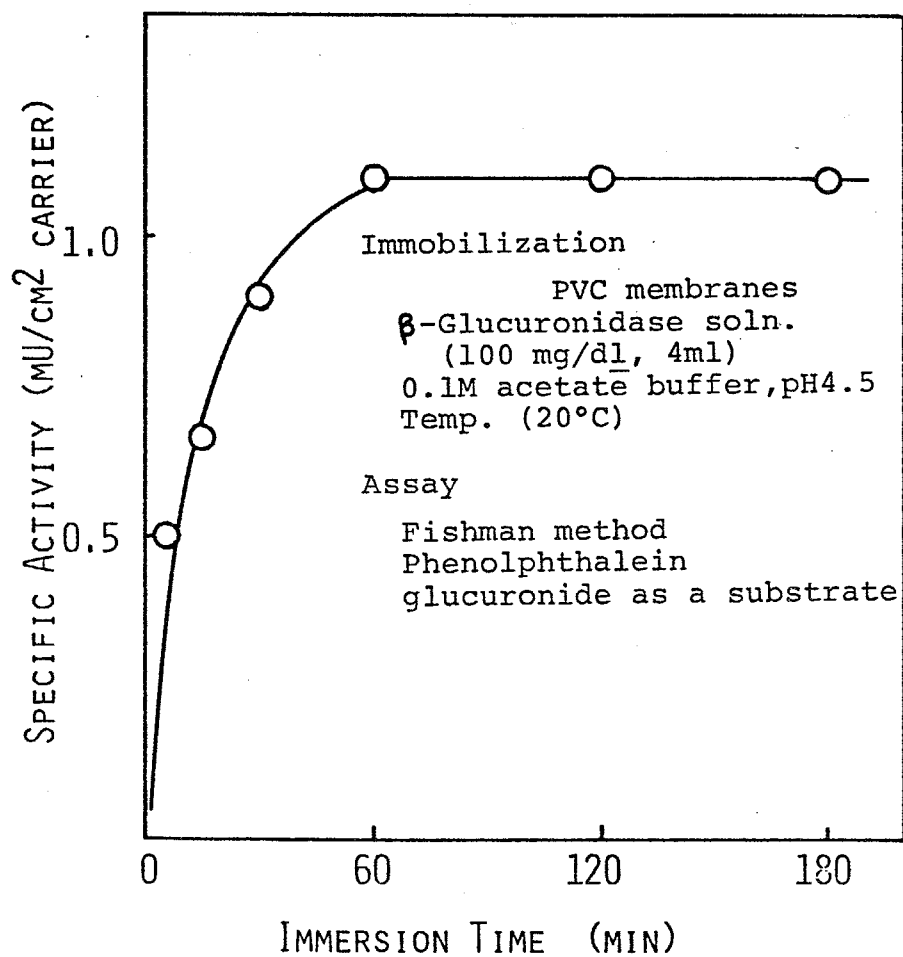


Fig. 4-1 Effect of immersion time on the specific activity of immobilized β -glucuronidase.

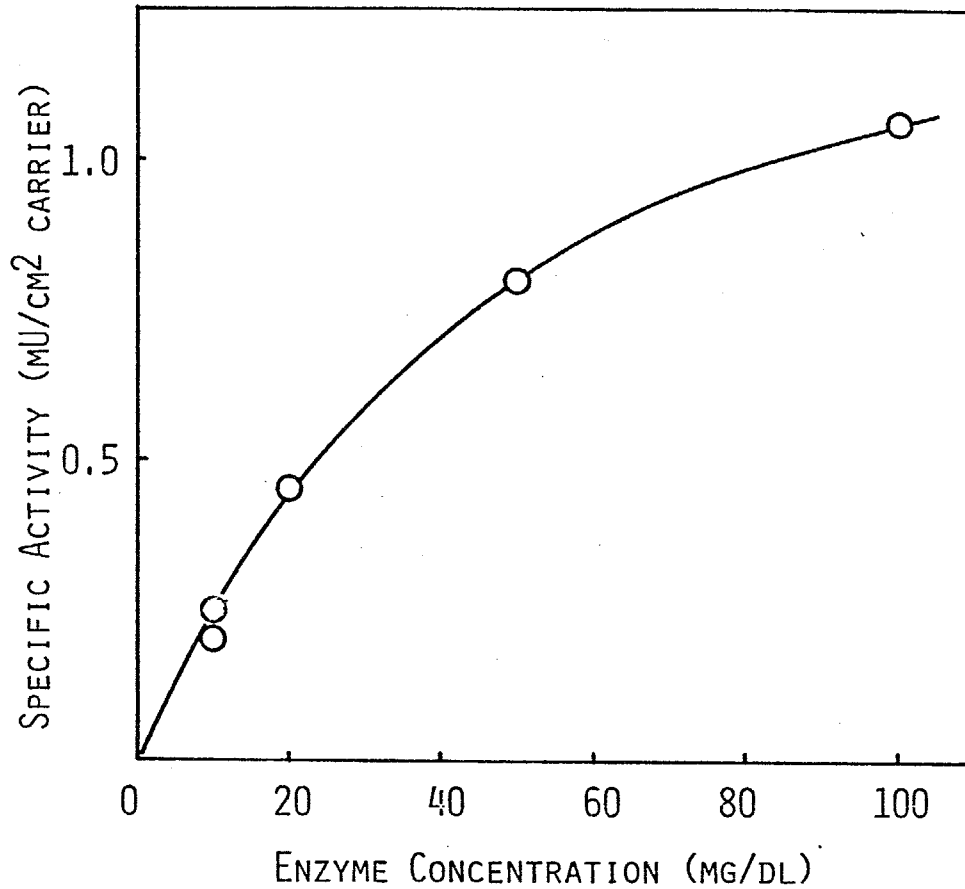


Fig. 4-2 Effects of β -glucuronidase concentration in an immersing solution on the specific activity.

Immobilization; PVC membrane (29mm diameter)
0.1M acetate buffer (pH 4.5), immersion time 1 h,
immersion temp. 20°C, Assay; Fishman method using
phenolphthalein glucuronide as a substrate.

4.3.3 β -グルクロニダーゼ固定化

PVC膜の安定性

β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜ともとの酵素のpH安定性, 及び, 熱安定性について検討した結果を図4-3, 及び, 4に示す。図4-3から, 両者のpH安定性にはほとんど差は認められなかった。図4-4から, 両者共に63℃以上で完全に失活した。尿などの体液中には多くのイオン物質が含まれているため, イオン強度(塩化ナトリウム)の活性に及ぼす影響について検討した。この結果, イオン強度の影響はほとんど認められなかった。

β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜は5℃で保存した場合約10日間初期酵素活性を保持していたが, 室温に放置した場合に1週間で活性が初期の50%以下(30~50%)に低下した。もとの酵素の場合, 室温では2~3日後に初期の50%が失活した。

従って, β -グルクロニダーゼは固定化によって, 保存安定性が著しく改良された。一方, pH・熱・イオン強度に対する安定性などは固定化酵素ともとの

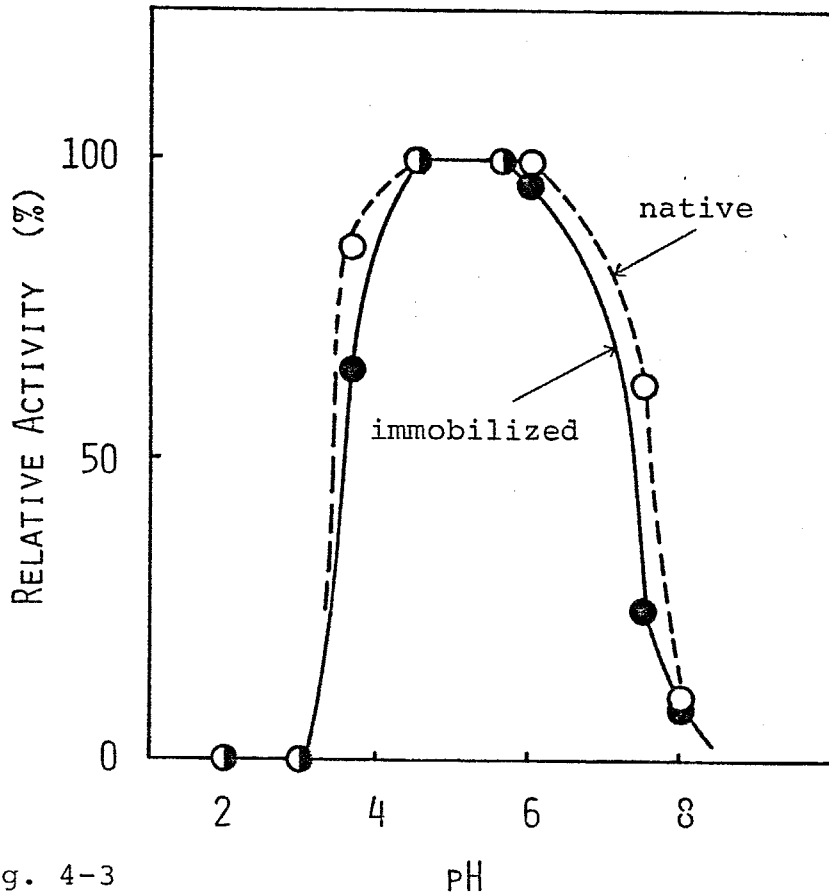


Fig. 4-3
pH stabilities of the β -glucuronidase-PVC membrane and native β -glucuronidase. The immobilized β -glucuronidase (diameter: 0.565 cm^2 , 1.3 mg , 1.1 mU/cm^2) and 2.0 mg of native β -glucuronidase in 10 ml of various pH buffer solutions (pH 2-3, 0.1 M glycine buffer pH 3.7-6.0, 0.1 M acetate buffer, pH 7.4-7.9, 0.1 M phosphate buffer) were incubated for 5 hr at 25°C .

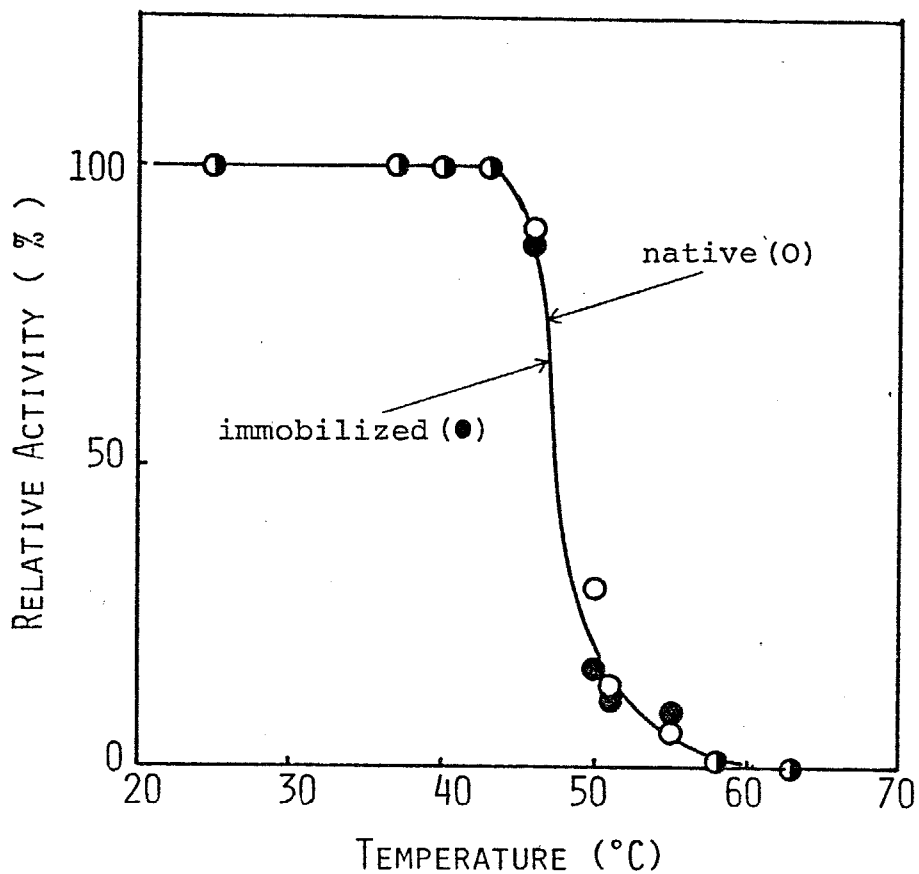


Fig. 4-4

Thermostabilities of the β -glucuronidase-PVC membrane and native β -glucuronidase. The β -glucuronidase-PVC membrane (diameter: 0.565 cm^2 , 1.3 mg , 1.1 mU/cm^2) and native β -glucuronidase (20 mg/dl) were incubated for 4 hr at various temperatures.

酵素で同等であることから，固定化酵素を用いても，もとの酵素の加水分解反応条件でステロイドホルモン分析用の加水分解反応を行なわせることができると考えられた。

4. 3. 4 酵素固定化PVC膜を用いる

ステロイドホルモン分析

尿中17-OHCSの分析では，尿(10 ml)に可溶性酵素260 mUを添加し，37°Cで16時間反応させて，ステロイドのグルクロン酸抱合体を加水分解している。従って，ステロイドホルモン分析には可溶性酵素260 mUに相当する活性を維持し，繰り返し測定に使用可能な β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜が必要である。

高活性で長期間安定な酵素固定化PVC膜を得るため，各種固定化方法を実施した。この結果をまとめて表4-4に示す。No.1は前節までに得られた結果で，活性は $1.1 \text{ mU} \cdot \text{cm}^{-2}$ であった。No.2は東京臓器社製 β -グルクロニダーゼ溶液を用いて固定化した例

Table 4-4 Activities of enzyme-tubes.

Enzyme tube	Immobilization method	Origine	Initial activity mU/cm ²	Residual activity %
1	Adsorption	Bacteria	1.1	30-50
2	Adsorption	Bovine liver	3.5-4.7	40-45
3	Adsorption followed by glutaraldehyde treatment	Bovine liver	2.8-3.2	70-75
4	Adsorption with albumin followed by glutaraldehyde treatment	Bovine liver	2.5-3.0	70-75
5	Adsorption, glutaraldehyde treatment and re-adsorption	Bovine liver	4.5-5.0	80-90

a) after 1 month at 4 °C.

である。供給源を変えることによって、 β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜の活性は大巾に向上させることができた。しかしながら、吸着法では β -グルクロニダーゼ固定化物の活性は1ヶ月でもとの40~45%しかなかった。No.3ではNo.2で得られた膜を0.5%グルタルアルデヒド溶液中に1時間浸漬させ、酵素を架橋化させ、酵素の安定化を図った結果である。この場合には、1ヶ月後の活性は初期の70~75%の活性が保持されていたが、初期活性は低下した。 β -グルクロニダーゼ同士がグルタルアルデヒドで互に架橋化され、一部失活したためと考えられた。No.4は、効果的な架橋を行なうため、No.2で得られた膜をアルブミン溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 中に1時間浸漬させ、No.3と同様の条件下でグルタルアルデヒド溶液処理をして、 β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜を得た。この結果、No.3と同様、残存する活性は増大したが、初期活性は低下した。No.5はNo.3で得られた膜を、再び、酵素溶液中にNo.2と同一条件下で浸漬させ、 β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜を得た。この方法で得

られた膜は初期活性が No.1 と比べ約 4 倍高く，残存活性は 80～90% 以上であった。グルタルアルデヒドで架橋化された酵素は安定化したと同時に，未反応のグルタルアルデヒドが更に酵素溶液中に浸漬されている間に酵素と反応し，より多くの酵素を固定化したため初期活性が向上したと考えられた。No.5 の方法で得られた固定化酵素で尿中グルクロン酸抱合体を加水分解すると，計算上 1 検査当り， 52 cm^2 の β -グルクロニダーゼ固定化 PVC 膜が必要であった。

従って，ステロイドホルモンを分析するための加水分解装置として，反応生成物の残存が少なく，容易に検体と生成物を洗滌できる湿潤状 PVC 膜内側に酵素を固定化した β -グルクロニダーゼ固定化 PVC 管が最も適していると考えられた。

4.4 結言

本章で得られた知見を要約すると，次のようになる。

- 1) β -グルクロニダーゼの固定化には，湿潤状 PVC 膜を担体とし，酵素を吸着して固定化する方

法が容易であることが見い出された。

- 2) β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜はもとの酵素に比較すると、保存安定性が優れていた。
- 3) β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜の活性はグルタルアルデヒド処理と β -グルクロニダーゼ再吸着処理を向上した。
- 4) 3) で得られた活性から、1検査に必要な上記膜面積は 52 cm^2 であり、ホルモン分析には酵素固定化PVC管が提案された。

本研究によって、グルクロン酸抱合体の加水分解反応に本膜が利用できることをモデル反応を用いて示すことができた。

オ 5 章

β -グルクロニダーゼ固定化PVC管を用いるステロイドホルモンの連続測定

5.1 緒言

尿中のステロイドホルモン分析³⁸⁾は副腎皮質異常や性器異常を知る上で、きわめて重要である。例えば、甲状腺機能を診断する上で有効な指標とされている17-ヒドロキシコルチコステロイド(17-OHCS)は、通常、17-OHCSグルクロン酸抱合体を β -グルクロニダーゼで加水分解すると生成し、これは比色分析されている^{41)~43)}。したがって、17-OHCSを生成させるためには、可溶性の酵素が多量に消費される。

すでに、前章で β -グルクロニダーゼ固定化PVC膜が17-OHCSの分析に有用であることを標準液を用いて示した。即ち、1検体の分析に上記膜を52cm²必要とする。酵素固定化PVC膜を用いる反応器として、①平膜状、②管状、③スパイラル状の反応器⁴⁴⁾⁴⁵⁾が考えられるが、反応生成物が反応器内に残存しにく

い、反応器の洗滌が容易であるなどのことから、管状反応器が好ましいと考えられる。

本章では、前章で得られた酵素の固定化条件で、酵素固定化PVC管を調製し、これを用いて標準尿（実液）中の17-OHCS抱合体の加水分解反応最適化について検討する。また、17-OHCS分析を固定化酵素法と従来法で行ない、この結果を比較した。さらに、酵素固定化PVC管による自動連続測定システムを試作した。

5.2 実験方法

5.2.1 試薬

臓器由来の β -グルクロニダーゼ（E.C. 3.2.2.21, $1290 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $29 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白質）溶液は東京臓器（株）製、標準ステロイドのテトラヒドロコルチゾン（シグマ社製）、ポリ塩化ビニル（PVC, M_w ; 48400）は鐘淵化学社製、ジメチルホルムアミド（DMF）は和光純薬社製、病院用塩ビ管（タイゴンチューブ；内径 1.6 mm, 2.4 mm, 3.2 mm）は今村ゴム社

製をそれぞれ用いた。

5. 2. 2 尿の前処理

採取した尿は β -グルクロニダーゼで加水分解する前に、前処理をする必要がある。即ち、トルエン10 ml を入れたプラスチックボトルに正常人男性の尿を1日分採取した。尿中の蛋白質を除去するため、採取尿を限外濾過膜（アミコン社製，PM-30）で濾過した。除蛋白尿を10%酢酸で pH 5.0 に調整し、 -15°C の冷凍庫中に保存した。尿中の17-OHCS濃度は生酵素（酵素溶液）を用いて、従来法⁴³⁾で測定した。得られた標準尿の17-OHCS濃度は $4.26 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。

5. 2. 3 β -グルクロニダーゼ固定化PVC管の調製法

病院用塩ビ管内面に湿潤状PVC膜を固着させ、これに β -グルクロニダーゼを前章の方法に基づいて固定化した。即ち、PVC/DMF溶液（8 wt%）を

塩ビ管内に通液し，次いで，メタノールを通液し，塩ビ管内面に湿潤状PVC膜を形成させた。更に，市販β-グルクロニダーゼ溶液（1290 mU）を0.1 M酢酸緩衝溶液（pH 5.0）で10倍に希釈し，この希釈酵素溶液を上記塩ビ管（1 m）内に4℃で4時間循環させた。未吸着の酵素を大過剰の0.1 M酢酸緩衝溶液で洗滌した後，この管内に0.5%グルタルアルデヒド溶液を25℃で1時間通液し，β-グルクロニダーゼを架橋処理した。更に，上記と同様の希釈酵素溶液を4℃で4時間循環させ，未吸着の酵素を緩衝溶液で洗滌し，β-グルクロニダーゼ固定化PVC管（酵素管）を得た。

5.2.4 酵素活性

β-グルクロニダーゼの活性は，第4章と同様にフェニールフタレイニングルクロナイドを基質として，Fishman らの方法³⁸⁾で測定した。β-グルクロニダーゼ1単位とは，フェニールフタレイニングルクロナイドから，標準条件下で単位時間（分）に1 μmoleのフ

エ) -ルフトレインを生成することと定義した。 β -
 -グルクロニダーゼ固定化PVC管の活性は単位チューブ
 内面積当りの活性, 又は, 単位チューブ長(1m)
 当りの活性として表示した。

5.2.5 反応器と実験方法

図5-1に17-OHCSグルクロン酸抱合体の加水
 分解反応システムを示す。尿(10ml)をペリスタ
 ポンプで β -グルクロニダーゼ固定化PVC管に移送
 し, 一定時間循環させた。加水分解後, 生成した17
 -OHCSを比色分析法で測定した。 β -グルクロ
 ニダーゼ固定化PVC管中の尿の滞留時間は次式で示
 される。

$$\text{滞留時間} = \text{反応時間} \times \frac{\text{酵素管内の体積}}{\text{尿の体積}}$$

5.2.6 17-OHCSの分析法(従来法)

尿中17-OHCSは西風と古屋の方法^{41), 42)}に準じて
 測定した。

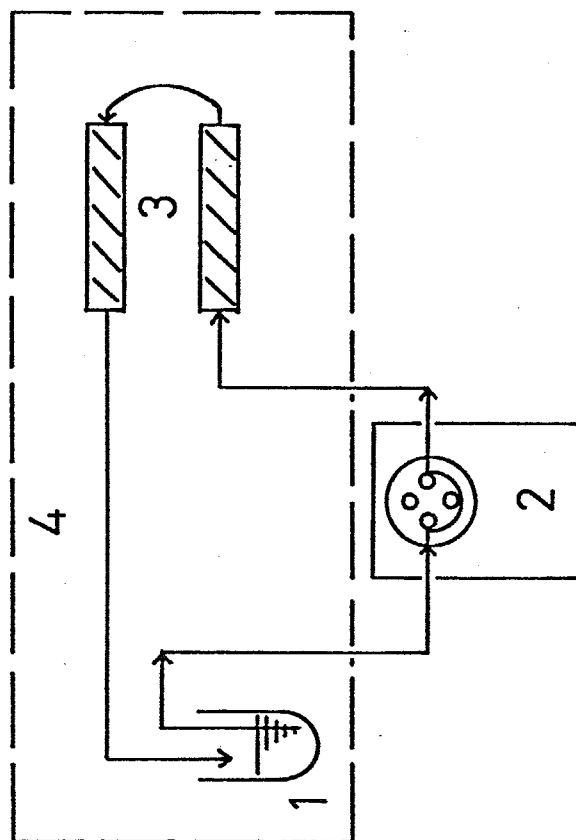


Fig. 5-1

Diagrammatic representation of the system for hydrolysis of urinary 17-OHCS glucuronides: 1) Urine reservoir (50 ml test tube); 2) peristaltic pump; 3) enzyme-tube reactor; 4) water bath.

5.3 実験結果と考察

5.3.1 可溶性酵素を用いた17-OHCS

グルクロン酸抱合体の加水分解

β -グルクロニダーゼ活性が尿中の17-OHCS抱合体の加水分解反応に及ぼす影響を図5-2に示す。

尿(17-OHCS値: $4.26 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) 10 ml に 0.02 ml から 0.2 ml までの酵素溶液 ($1290 \text{ mU} \cdot \text{ml}^{-1}$) を添加し、各時間当りの17-OHCS生成量を求めた。図5-2から、17-OHCS抱合体を完全に加水分解するためには、酵素活性 260 mU 、反応時間8時間以上を要することがわかった。

17-OHCS抱合体濃度の異なる尿中に 260 mU の酵素を添加したとき、加水分解反応の経時変化を図5-3に示す。図5-3から、反応時間16時間で生成する17-OHCS値が定常となった。以上の実験から、高価な酵素を1検査当り 260 mU ずつ使用しなければならぬことがわかった。したがって、17-OHCS抱合体の加水分解に、固定化 β -グルクロニダーゼを用いる利点が認められた。

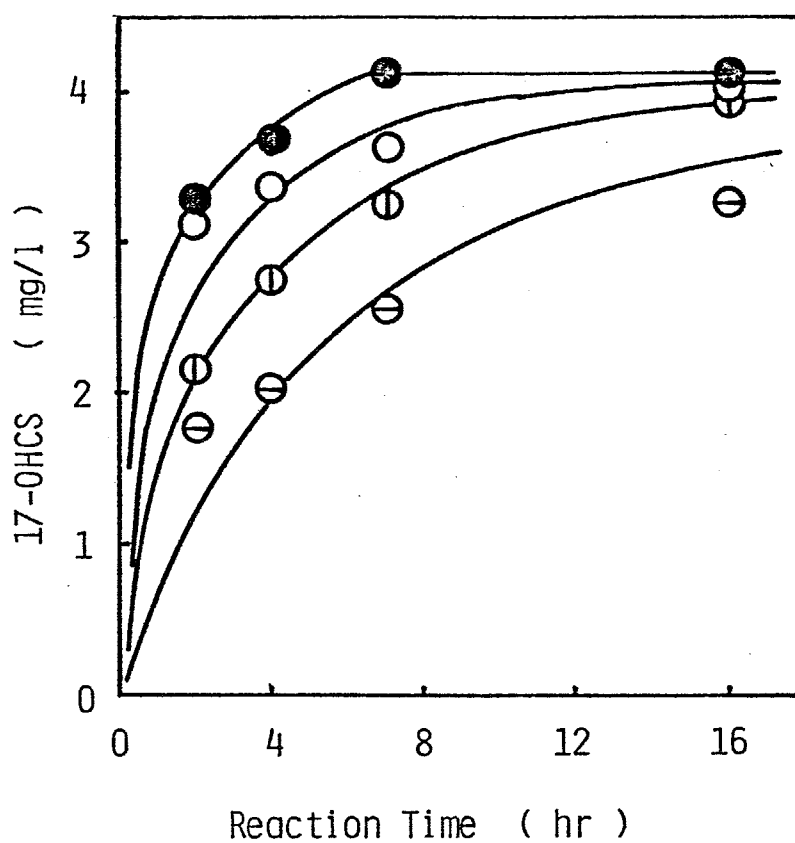


Fig. 5-2

Effect of β -glucuronidase activity on the time course of 17-OHCS glucuronide hydrolysis. 26($\omin�$), 52($\omin�$), 130(O) and 260(\bullet) mU of β -glucuronidase were used and the reaction mixtures were incubated at 37 °C.

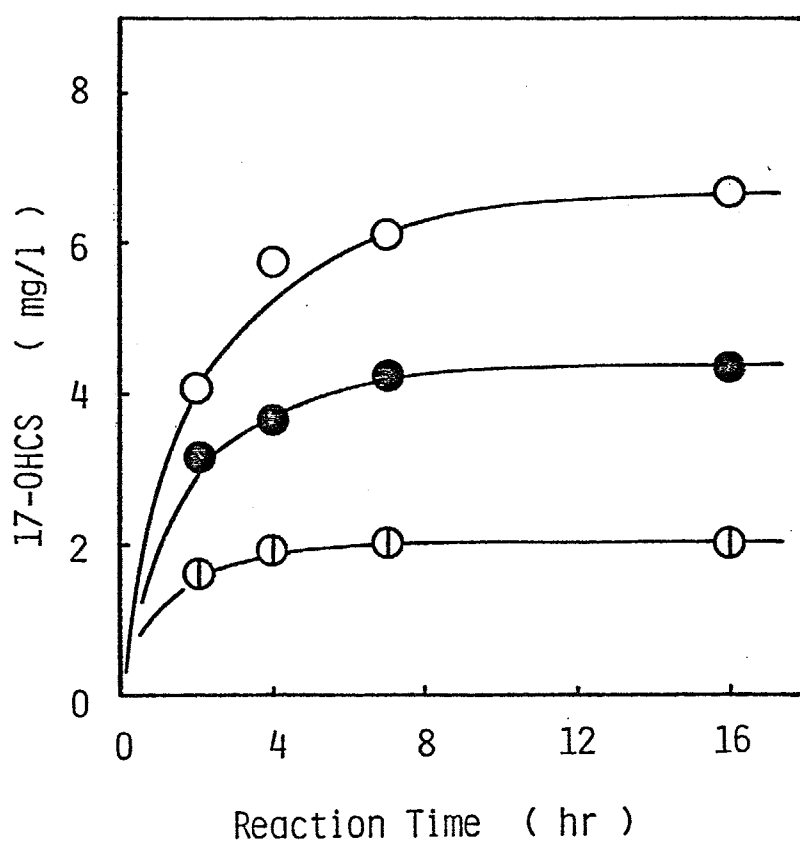


Fig. 5-3

Time courses of hydrolysis at various initial 17-OHCS glucuronide concentrations.

β -Glucuronidase (260 mU) was added to urine treated as described in the text and incubated at 37 °C.

The concentrations of 17-OHCS resulting from complete hydrolysis by β -glucuronidase are: 2.10(⊖); 4.26(●) and 6.10(○) mg/liter.

5.3.2 循環方式による酵素管を用いる

17-OHCS 抱合体の加水分解反応

異なる管径を有する酵素管 (β -グルクロニダーゼ固定化 PVC 管) を調製し, 酵素管1本当りの酵素活性が同一になるようにした (表5-1)。以下, これらの酵素管を用いて, 尿中17-OHCS 抱合体の加水分解反応を行なわせた (図5-4)。尿 (17-OHCS 値 $4.26 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) 10 ml を反応温度 37°C で流速 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で循環させた。図5-4から明らかのように, 酵素管の内径が減少すると共に, 17-OHCS 抱合体の加水分解反応速度が増加した。すなわち, 内径が小さい程, 尿は移送により攪拌され, 効果的に酵素反応が進行したためと考えられた。以後の実験では, 内径 1.2 mm を有する酵素管を用いることにした。

酵素管内を通過する尿の流速が17-OHCS 抱合体の加水分解に及ぼす影響を図5-5に示す。尿の流速以外は上記図5-4と同様の実験条件下で行なった。尿の最適流速は $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。以後の実験

Table 5-1 Characteristics of Enzyme Tubes

No.	PVC tube		Enzyme tube		Activity	
	O.D.* (mm)	I.D.** (mm)	I.D.* (mm)	length (cm)	(mU/cm ²)	(mU/tube)
11	3.6	1.6	1.2	100	4.5	170
12	4.4	2.4	1.85	65	4.5	170
13	5.0	3.0	2.4	50	4.5	170

* Outer diameter

** Inner diameter

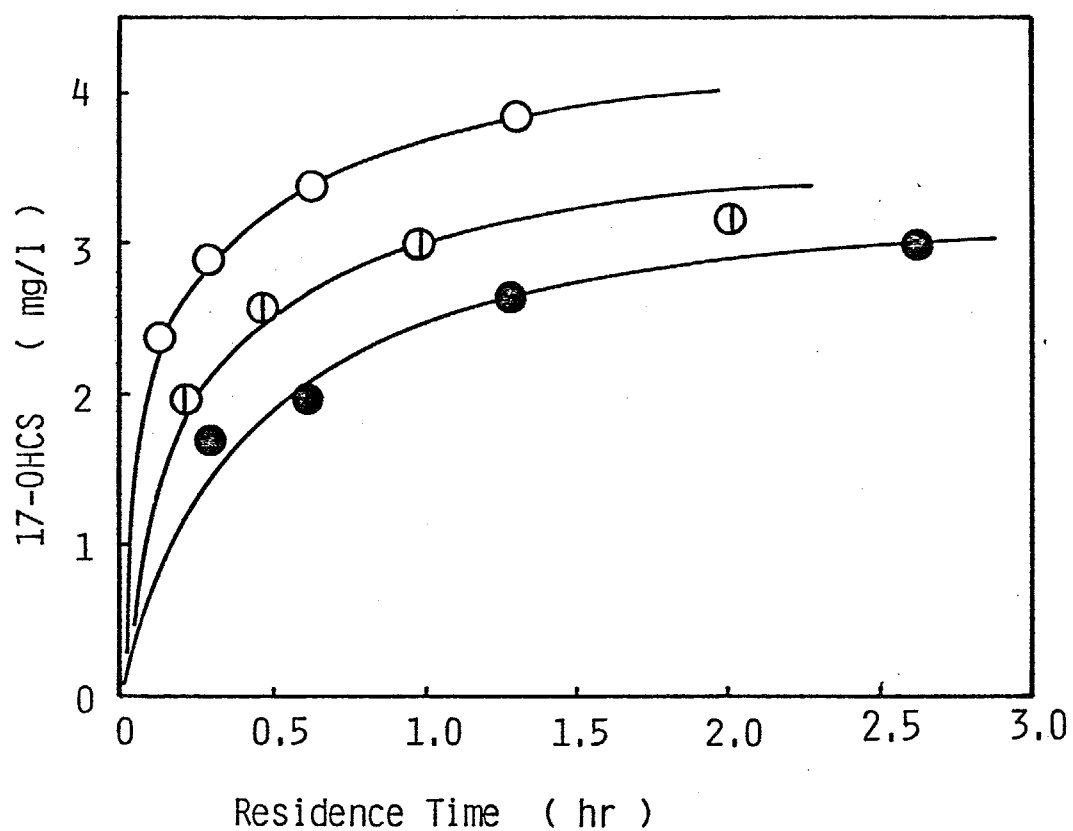


Fig. 5-4

Effect of enzyme-tube inner diameter on the time course of 17-OHCS glucuronide hydrolysis.

Hydrolysis was performed with an immobilized enzyme activity of 170 mU/tube at 37 °C. Tube diameter: 1.2 (O); 1.85 (⊙) and 2.4 mm (●).

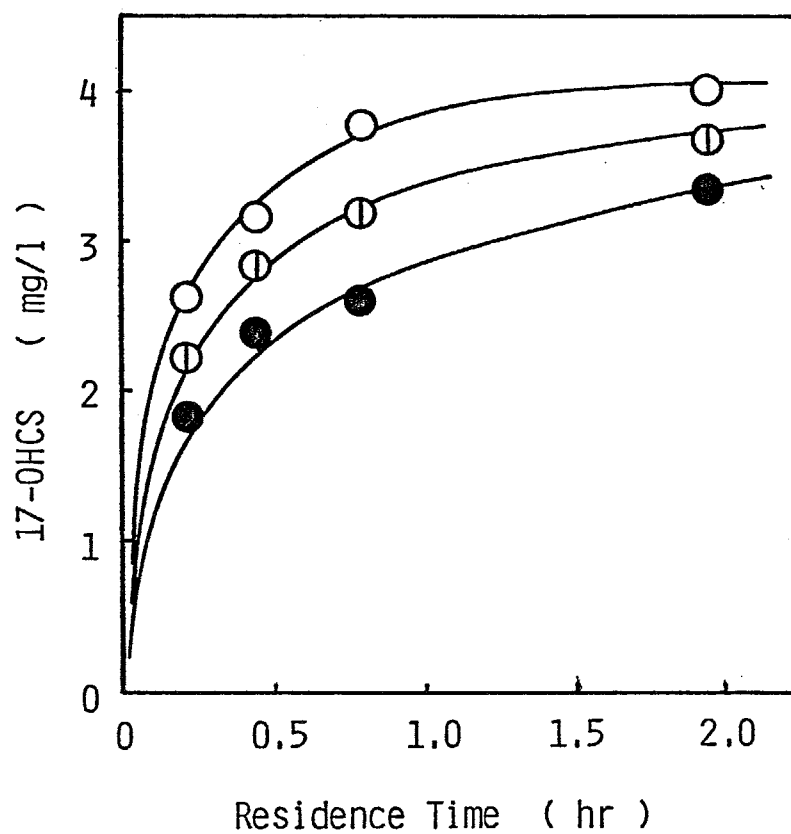


Fig. 5-5

Effect of urine flow rate on the time course of 17-OHCS glucuronide hydrolysis.

Hydrolysis was carried out under the standard conditions described in Fig. 5-4 except for the flow rates employed: 0.50 (○); 1.0 (◐) and 3.0 ml/min (●).

では，流速を $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ とした。尿 (17-OHCS 値 $4.26 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) の反応容量が 17-OHCS 抱合体の加水分解反応に及ぼす影響を図 5-6 に示す。酵素管内で単位滞留時間当りに生成される 17-OHCS 量は尿量に関係ないことがわかった。この結果は，可溶性酵素 (260 mU) を用いる加水分解反応の結果と良く一致した。

5.3.3 酵素管のみによる加水分解反応

前節の循環方式では，尿 10 ml が酵素管内にある割合は約 $10 (\text{V}/\text{V})\%$ であり，尿の酵素管内における滞留時間は実際の反応時間に比して短い。このため，長酵素管内を通液し，実際に要する反応時間を短縮することを目的として，以下の実験を行った。

先ず， 1 m の酵素管を連結し， 30 m の長酵素管 ($4250 \text{ mU} \cdot \text{反応器}^{-1}$) を調製した。尚，酵素管が 30 m 以上の場合，通液負荷が大きくなり，一連の酵素管反応として実験することは困難であった。次に，尿を長酵素管内にポンプで注入し，通管後，生成した 17-O

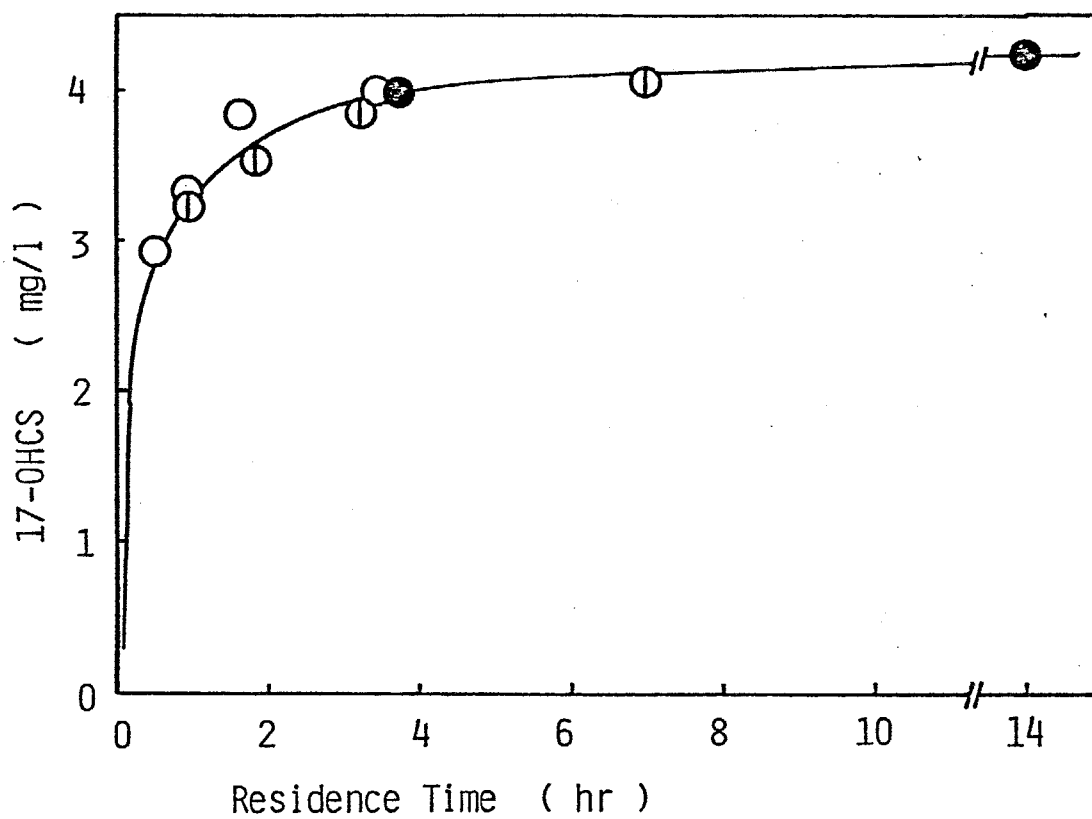


Fig. 5-6

Effect of urine volume on the time course of 17-OHCS glucuronide hydrolysis. Hydrolysis was carried out under the standard conditions described in Fig. 5-4 except for the volume of urine employed: 10(O); 5(⊙) and 2.5 ml(●).

HCS量を比色分析法で測定した。この結果をまとめて図5-7に示す。

尿10 mlを長酵素管に通液させた場合、17-OHCS抱合体の加水分解率は約55%であった。この場合、長酵素管(30 m)を通過するのに要する時間(加水分解反応時間)は約30分間であった。一方、図5-6から、滞留時間30分間のとき、その加水分解率は70%であり、これに比して上記加水分解率は低かった。長酵素管内を尿が通過するとき、管壁表面での攪拌が十分に行なわれないうえと考えられた。

そこで、尿を少量ずつ空気泡で分割注入し、長酵素管内での尿の攪拌を増加させ、加水分解反応を行なわせた。図5-7から、尿量を10 μ lに分割注入すると加水分解率は90%まで向上した。長酵素管を使用した場合、尿を分割注入すると長酵素管内での尿の攪拌を促進させ、加水分解反応が効果的に進むと考えられた。

しかし、17-OHCS抱合体を連続的に加水分解するには、1検体毎に長酵素管内を洗滌しなければなら

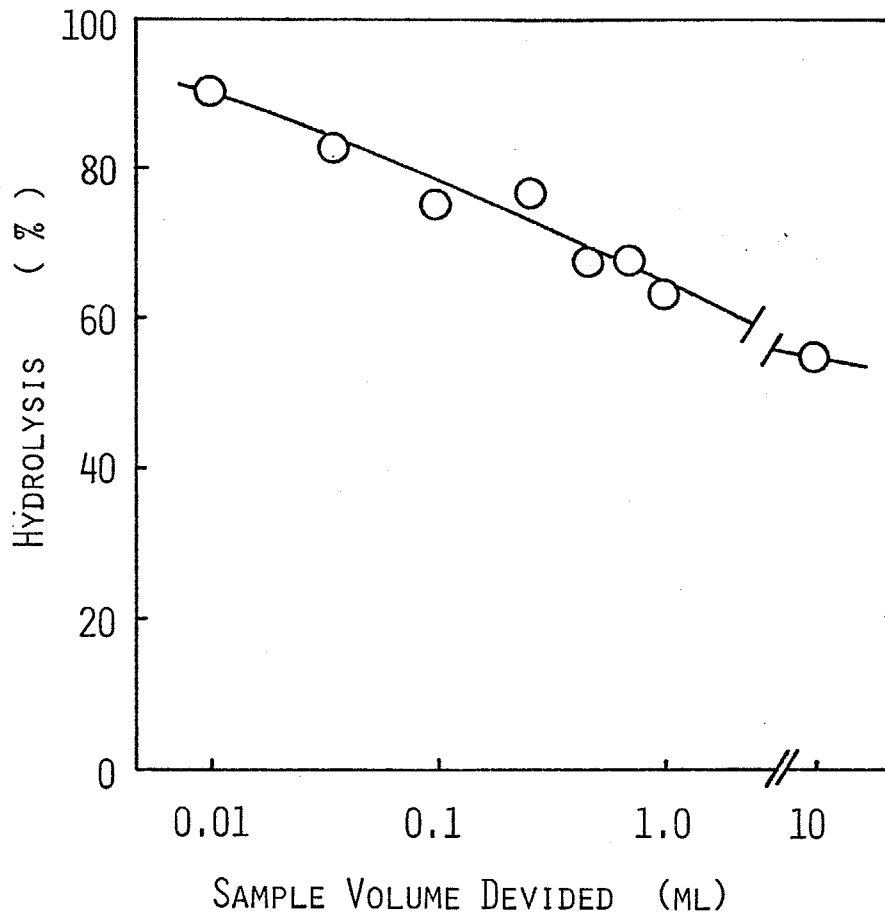


Fig. 5-7

Effect of sample volume devided on hydrolysis of 17-OHCS glucuronide by a enzyme tube:
Enzyme tube (30 m x 1.2 mm ϕ) 4520 mU/tube,
flow rate 1.0 ml/min, total urine 20 ml.

ない。長酵素管を用いた場合には，管内の残存尿，及び，残存生成物（17-OHCS）を緩衝溶液で完全に洗滌することは困難であった。従って，17-OHCS 抱合体の連続加水分解には，洗滌の容易で，かつ，酵素管を用いる循環方式を採用した。

5.3.4 連続的加水分解システムの特性

前節で得られた循環方式による17-OHCS抱合体の連続的加水分解システムの特性について検討した。加水分解反応の標準条件は，酵素管（管長 1 m，管内径 1.2 mm）の酵素活性 170 mU，尿の流速 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ，尿の反応容量 10 ml，滞留時間 1.8 時間，反応温度 37°C ，尿は除蛋白標準尿（17-OHCS 値 $4.26 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ）を用いた。

酵素管を用いる加水分解反応で得られる 17-OHCS の測定値の再現性は 20 検体当り $\pm 4\%$ 以内であった。酵素活性は，実験条件下で 45 日間保持され， 4°C で保存した場合には 2 ヶ月以上安定であった。

また，尿中の蛋白量が酵素管の再使用性や安定性に

影響を与えることが考えられる。そこで、尿中蛋白質が $17-OHCS$ 抱合体の加水分解反応に及ぼす影響について検討した(図5-8)。ここで、蛋白含有尿は標準尿10ml中にヒトアルブミンの500mgを添加して調製した。蛋白含有尿を加水分解した場合には、7回目以降 $17-OHCS$ の生成量は急激に低下した。これは、酵素管壁の湿潤状PVC膜に蛋白質が吸着したため、膜表面における反応が妨害されたためと考えられた。そこで、実験には除蛋白尿を用いた。

異なる $17-OHCS$ 抱合体濃度の除蛋白尿を用いて、酵素管による加水分解(酵素管 $170\text{ ml}\cdot\text{管}^{-1}$ 、滞留時間1.8時間)と従来法によるそれ(可溶性酵素 260 ml 検体 $^{-1}$ 、反応時間16時間)とを比較した(図5-9)。

この結果、相関係数は0.998であった。

5.4 結言

本章で得られた知見を要約すると、以下のようになる。

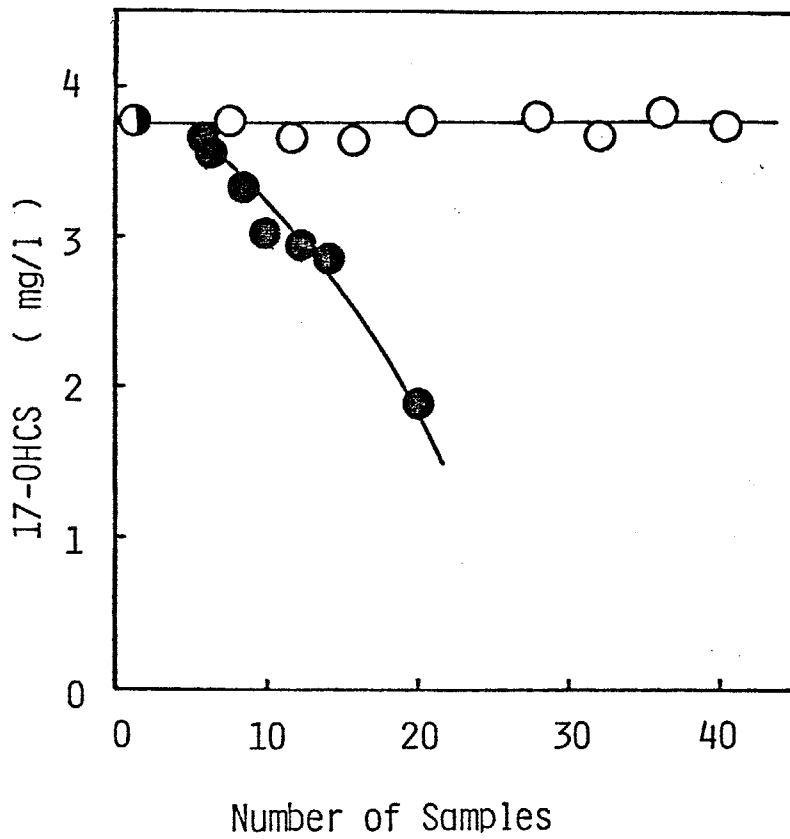


Fig. 5-8

Effect of protein in urine on the measurement of urinary 17-OHCS. Hydrolysis was carried out under the standard conditions described in Fig. 5-4. (O) Deproteinized urine; (●) urine containing proteins.

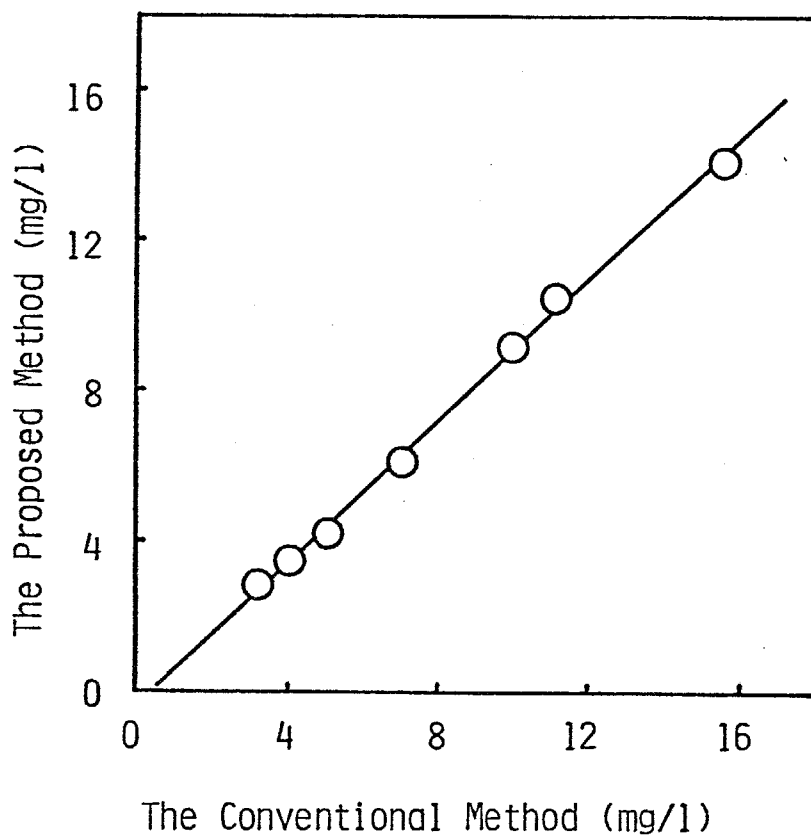


Fig. 5-9

Comparison studies of the proposed method and the conventional method for 17-OHCS determination. Hydrolysis using the enzyme-tube procedure was carried out under the standard conditions described in Fig. 5-4.

- 1) 可溶性酵素を用いて尿中の17-OHCSグルクロン酸抱合体を加水分解するためには、 β -グルクロニダーゼ $260 \text{ mU} \cdot 10 \text{ ml}^{-1}$ 尿、反応温度 37°C 、反応時間16時間以上を必要とした。
- 2) β -グルクロニダーゼ固定化PVC管(酵素管)を調製し、これを用いて17-OHCSグルクロン酸抱合体の加水分解反応を行なわせたところ、酵素管の内径 1.2 mm 、管長 1 m 、管の活性 170 mU 、尿の流速 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。この条件下での加水分解反応は尿の反応容量に関係なく、滞留時間と17-OHCS生成量の間には相関関係が認められた。
- 3) 酵素管のみを用いる加水分解反応では、尿を分割注入することにより、加水分解速度が向上した。
- 4) 酵素管システムの特性を解明し、酵素管による加水分解法を確立した。

以上の結果から、 β -グルクロニダーゼ固定化PVC管は、17-OHCSグルクロン酸抱合体の加水分解

反応に有用であることが判明し、17-OHCS分析の
自動化装置のための基礎資料が得られた。

オ 6 章

ウレアーゼ固定化PVC試験管を
用いる尿素計測システム

6. 1 緒言

体液中の尿素濃度は、窒素代謝秩序を知る上できわめて重要であり、その測定には正確さと迅速さが要求される。尿素は通常ウレアーゼを用いて加水分解し、この反応で生成するアンモニア量から尿素量を測定する。

水溶液中のアンモニア定量する数多くの方法が知られているが、アンモニアとフェノールを反応させてインドフェノールを生成させ、これを比色分析³⁾する方法が最も一般的に用いられている。また、測定精度の良い方法として、グルタメイトデヒドロゲナーゼを用い、アンモニウムイオンとNADHを反応させる酵素分析法が知られている⁴⁵⁾。

この方法には多量の試薬と複雑な操作を必要とし、しかも、尿素を連続的に測定することは困難である。一方、アンモニアを簡便に、かつ、連続的に測定する微生物センサーが開発されている⁴⁶⁾。このセンサーは窒素固定菌と酸素電極から構成されている。しかしながら、微生物を使用しているため、センサーの長期安定性に問題がある。

そこで、著者らは水溶液中のアンモニアをマイクロ波を用いて検出する方法を開発した。この方法は水溶液中のアンモニアを強アルカリ性でガス化し、このアンモニアをシュタルク現象を利用して精度良く、簡便に、連続的に測定できる。

本章では、酵素固定化PVC試験管と上記マイクロ波によるアンモニア検出デバイスを組み合わせて、体液中の尿素の計測システムを開発する。このシステムは酵素反応で生成するアンモニアを定量するので、他の体液中の成分の測定にも適用できる。

6.2 実験方法

6.2.1 試薬

ウレアーゼ (E.C. 3.5.1.5; jack bean由来) としてはシグマ社製をそのまま使用した。ポリスチレン製試験管は栄研器材社製, シュタルク式アンモニア計⁴⁸⁾ (SMCRと略, SMA-3型) は三菱油化エンジニアリング社製, ペリスタポンプ及び透析器はテクニコン社製を用いた。管理血清としては, 日本トラベール社製を用い, 管理血清を蒸留水で適宜希釈して, 所定の尿素濃度を有する血清を得た。アンモニア標準溶液としては硫酸アンモニウム溶液を用いた。

6.2.2 酵素活性⁴⁹⁾

ウレアーゼ溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 0.02 M リン酸緩衝溶液 pH 7.0) 1 ml を栓付試験管に入れ, 25°C に保持した。次に, 3%尿素溶液 (0.75 M リン酸緩衝溶液, pH 7.0) 1 ml をウレアーゼ溶液に加え, 25°C で5分間浸漬した。この反応で生成するアンモニアを 630 nm で比色定量 (インドフェール法) した。

ここで、1単位とは、 25°C で1分間に $1\ \mu\text{mol}$ のアンモニアを生成する活性と定義した。ウレアーゼ固定化PVC試験管の活性は、3%尿素溶液 $0.5\ \text{ml}$ を試験管中に添加し、生成したアンモニアをインドフェノール法で定量して求めた。

6.2.3 ウレアーゼ固定化PVC試験管の調製

PVC・DMF溶液(PVC; 6 wt%)を試験管(直径 $8\ \text{mm}$ 、管長 $70\ \text{mm}$)に注ぎ、試験管内壁にPVC溶液を均等に塗布した。次いで、メタノール中に試験管を浸漬させ、4時間室温で放置した。その後、大過剰の蒸留水を用いて、メタノールと水とを置換した。この試験管に、濃度 $1.0\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ のウレアーゼ溶液($0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝溶液, $\text{pH}\ 7.0$) $2.5\ \text{ml}$ を添加し、 25°C で24時間放置した。未吸着のウレアーゼを大過剰の $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝溶液($\text{pH}\ 7.0$)で洗滌して除き、ウレアーゼ固定化PVC試験管を調製した。この試験管の酵素活性は $3.0\ \text{U}\cdot\text{管}^{-1}$ であった。ウレアーゼ固定化PVC試験管内にリン酸緩衝溶液を入れ、 4°C で

保存した。ウレアーゼ固定化PVC試験管からのウレアーゼの脱離は認められなかった。

6.2.4 装置⁴⁸⁾

S M C R 装置の概略図を図6-1に示す。測定は下記の条件で行なった。共振周波数 23,875 MHz, 直流電圧 220 V, 交流電圧 150 V, 時定数 10秒, 吸収セル中のサンプル気圧 4 Torr, 温度 37.5°C.

尿素の測定システムを図6-2に示す。本系は酵素固定化PVC試験管, ポンプ, テフロン膜(住友電気社製孔径 1 μm) を有する透析器, S M C R, 及び, 記録計(横河電機社製, 3066型)より成り立っている。

6.2.5 測定方法

ウレアーゼ固定化PVC試験管に血清 0.05 ml と 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) 0.45 ml を加え, この混合物を 30°C で 10分間反応させた。反応後, この反応液を蒸留水 2.0 ml で希釈し, 全量を 2.5 ml とした。この希釈液 ($0.32 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) を 6 N 水酸化ナトリウム溶

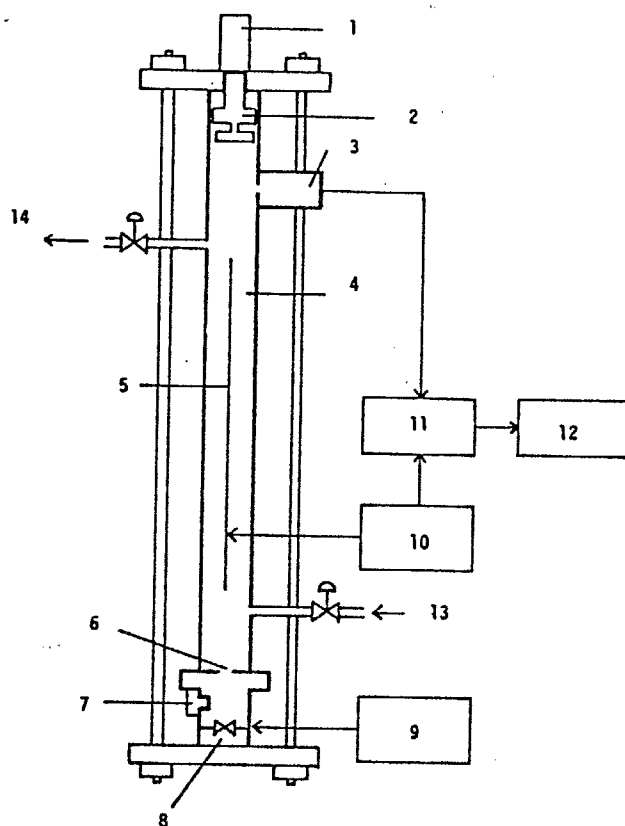


Fig. 6-1

Block diagram of the Stark cavity ammonia detector:
 1) micrometer; 2) movable short; 3) crystal detector;
 4) Stark cavity cell; 5) Stark electrode; 6) coupling
 iris; 7) tuning screw; 8) Gunn oscillator; 9) Gunn
 power supply; 10) Stark voltage supply; 11) lock-in
 amp; 12) recorder; 13) inlet; 14) outlet.

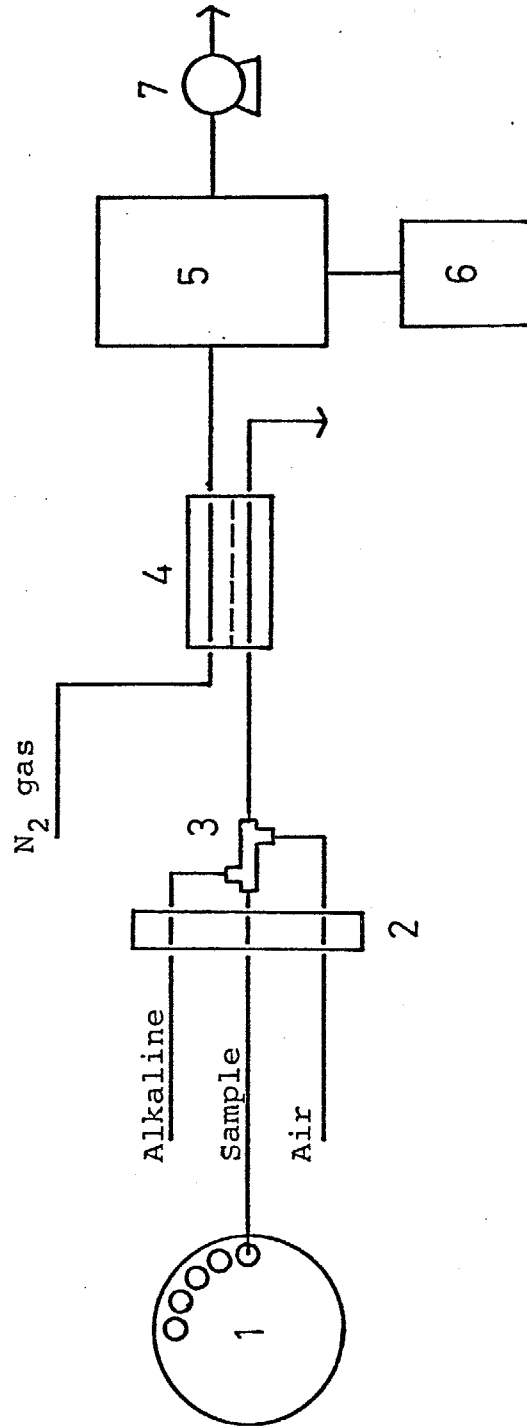


Fig. 6-2

Schematic diagram of a liquid ammonia monitor:

- 1) sample solution and turntable;
- 2) proportioning pump;
- 3) sample mixer;
- 4) dialyzer
- 5) Stark cavity ammonia detector;
- 6) recorder;
- 7) vacuum pump.

液 ($0.16 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) と空気 ($0.42 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) と共に、ポンプで透析器に移送した。即ち、酵素反応で生成するアンモニアは強アルカリによって気化し、透析器内の透析膜 (テフロン膜) を透過する。更に、透過したアンモニアガスは窒素ガスによってSMCRに送られ、電圧の変化として記録される。電圧の変化量とアンモニア濃度の間の相関から、血清中の尿素濃度を算出する。電圧変化量とアンモニア濃度との関係 (検量線) は、アンモニア標準物質の硫酸アンモニウムを用いて求めた。

6.3 実験結果と考察

6.3.1 水溶液中のアンモニア測定

6N水酸化ナトリウム溶液を透析器の一方側へ、窒素ガスをその他方側へ移送した時、得られた初期出力は定常であった。次いで、アンモニア $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を含む硫酸アンモニウム標準溶液を6N水酸化ナトリウム溶液と共に透析器に移送した。得られた電圧の変化を図6-3に示す。図6-3より、出力電圧は急

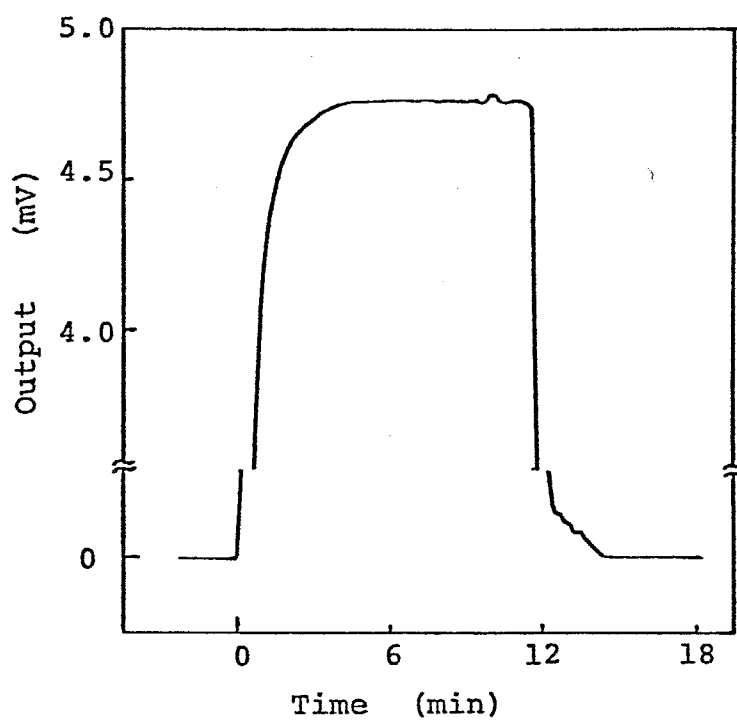


Fig. 6-3

Typical response curve of the system.
The experiments were carried out under standard conditions: 1) ammonia sulfate solution (ammonia 10.0 mg/L; flow rate 0.32 mL/min); 2) 6N NaOH (0.16 mL/min); 3) air (0.42 mL/min).

激に増加し，5分間以内で定常状態に達した。更に，各種アンモニア濃度を有する標準溶液の出力電圧はアンモニア濃度と良い相関を示した。従って，本装置でアンモニアを，少ない試薬で迅速，かつ，連続的に測定可能ななどの利点を有するため，臨床分析への応用が期待できる。以下，ウレアーゼ固定化PVC試験管と本装置とから成る血清尿素計測システムの性能を検討した。

6.3.2 ウレアーゼ固定化とその反応条件

ウレアーゼを固定化するため，まず，PVC-DMF溶液を用いて試験管内壁に湿潤状PVC膜を形成させ，ウレアーゼを吸着固定化した。PVC濃度6wt%を用いた試験管がウレアーゼの固定化に最も適していた。以下，この酵素固定化PVC試験管をシステムに適用した。

次に，試験管内の反応液容量が活性に及ぼす影響を図6-4に示す。3%尿素溶液（0.75Mリン酸緩衝溶液，pH7.0）を酵素固定化PVC試験管に添加し，25℃で

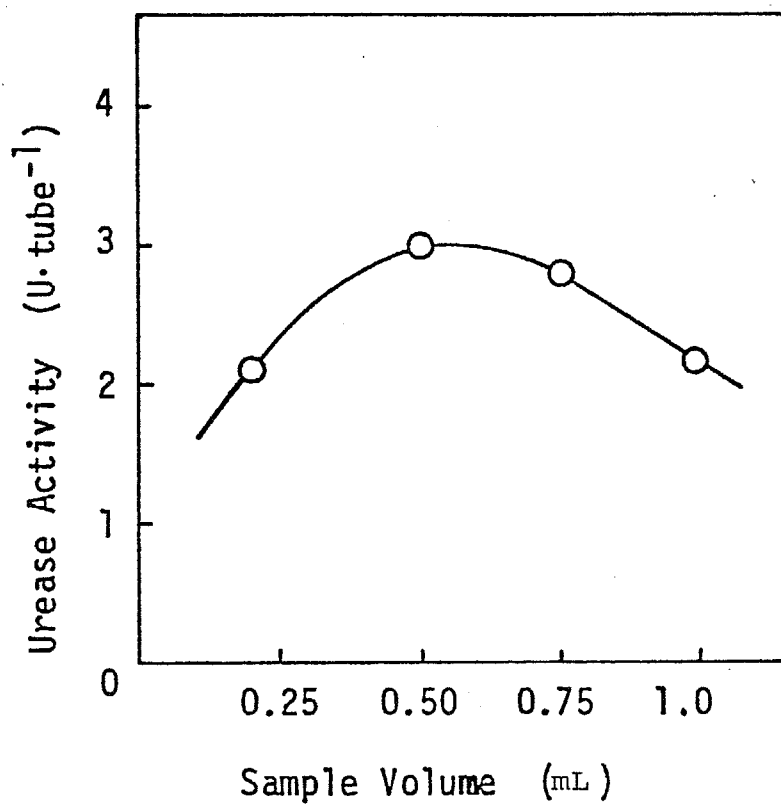


Fig. 6-4

Effect of the sample volume on urease activity. Reactions were carried out under standard conditions described in experimental section except for the sample volume employed.

5分間放置した。反応液容量が0.5mlのとき、最も高い活性が得られた。

6.3.3 ウレアーゼ固定化PVC試験管のpH依存性

反応溶液 pH の酵素反応に及ぼす影響について調べた(図6-5)。もとの酵素の最適 pH は 7.3 であったが、固定化ウレアーゼの最適 pH 領域は広がった(pH 4.3~7.0)。固定化後、酵素の最適 pH が酸性側に移動し、最適 pH 領域に広がることは通常の現象で、すでに、Goldstein⁴⁹⁾によって説明されている。

図6-6にウレアーゼ固定化PVC試験管ともとの酵素のpH安定性を示す。酵素固定化PVC試験管はpH 6.0~7.0の間できわめて安定であった。以下の実験では、反応溶液のpHを7.0とした。

6.3.4 システムの応答性

本システムにおいて、水酸化ナトリウム溶液の濃度と流速、及び、試料(反応)液の流速がシステムの出カ応答値に及ぼす影響について検討し、これらの結果

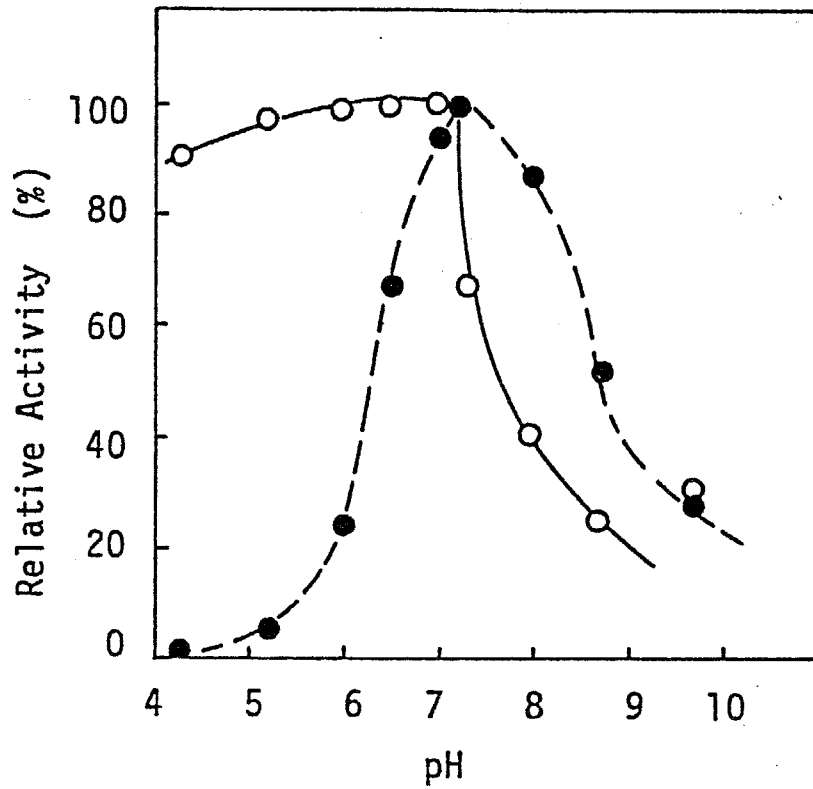


Fig. 6-5

pH Activity profiles of the urease-test tube (O) and native enzyme (●). Other conditions than pH of the reaction mixture were the same as Fig. 6-3.

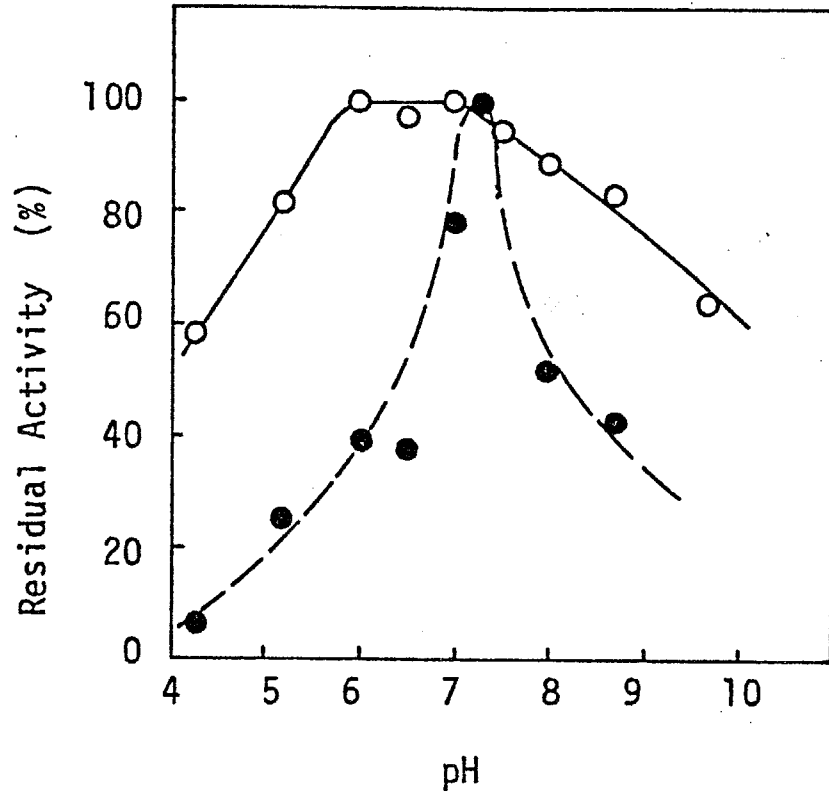


Fig. 6-6

pH Stability of the urease-test tubes(O) and native enzyme(●). The experiments were performed for 4 h at 37 °C. The assay conditions were the same as Fig. 6-3.

をそれぞれ図6-7, 8, 9に示す。

図6-7から, 水酸化ナトリウム溶液の濃度の増加と共に, システムの出力応答値は増加した。以下では, 6N水酸化ナトリウム溶液を用いた。図6-8から, 6N水酸化ナトリウム溶液の流速が $0.08 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ のとき, 最も高い出力応答値が得られた。しかしながら, このとき, 出力応答値を得るのに12分間を要した。従って, 6N水酸化ナトリウム溶液の流速を迅速な測定が可能な $0.16 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ とした。図6-9から, 反応液流速が $0.32 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上のとき, 出力応答値は定常値に到達した。反応液流速が $0.32 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上では, チューブ内で反応液とアルカリ溶液が十分に混合されるため, 発生するアンモニア量は定常となった。以後, 反応液の流速を $0.32 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ とした。

以上の諸条件下で, システムの出力応答値は6分間以内で最大値に到達し, 更に, 2分間以内で初期値へ復帰した。血清中の尿素の計測には, 酵素反応時間10分間と併せて, 計18分間を要した。血清尿素の連続計測には, オートサンプラーを用い, 10分間隔で測

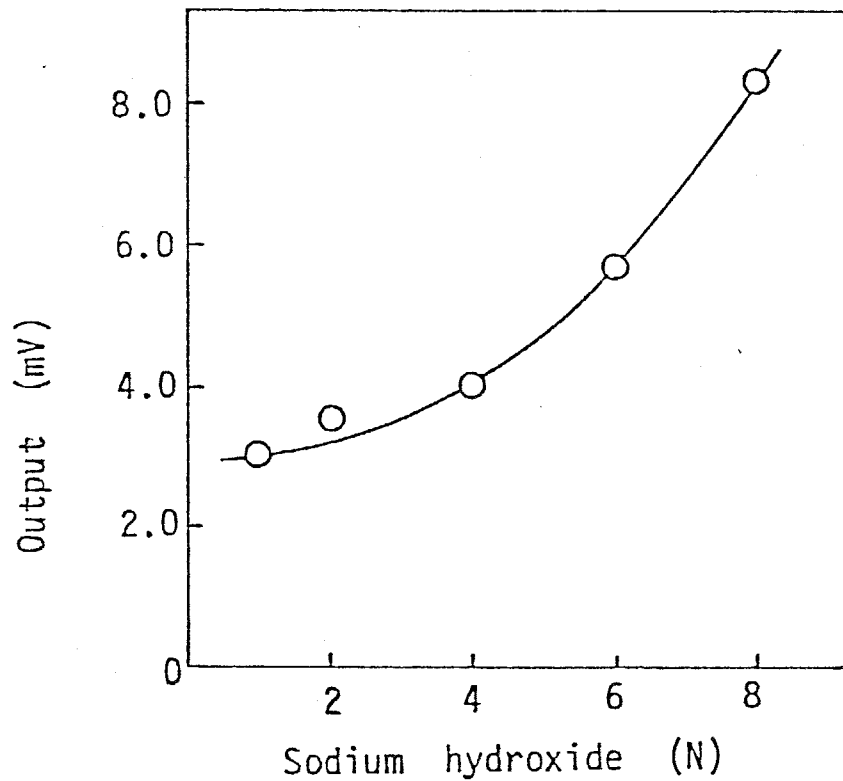


Figure 6-7 Effect of concentration of sodium hydroxide on the output of the system.

A sample solution was prepared as follows :

The enzymatic reaction solution containing 0.05 mL of control serum (500 mg L^{-1} : urea nitrogen) and 0.45 mL of the buffer in the urease-test tube was allowed to stand for 10 min at 37° . After reaction, the sample solution was diluted with 2 mL of the buffer solution. Other conditions than alkaline concentration were the same as Fig. 6-3

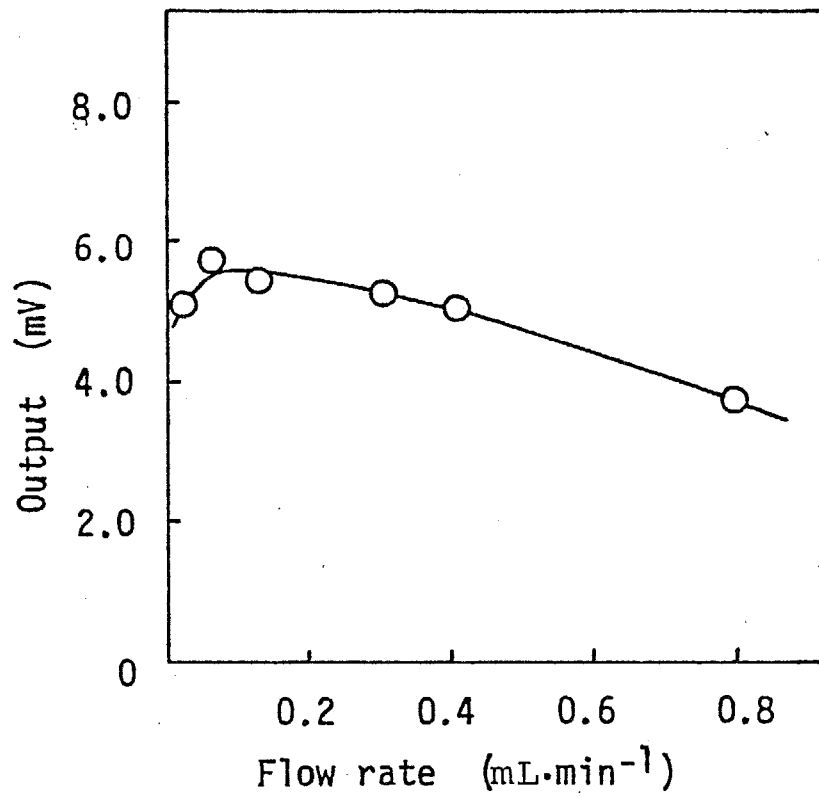


Fig. 6-8

Effect of flow rates of 6N sodium hydroxide on the output of the system. The conditions than the flow rate of the alkaline solution were the same as Fig. 6-3.

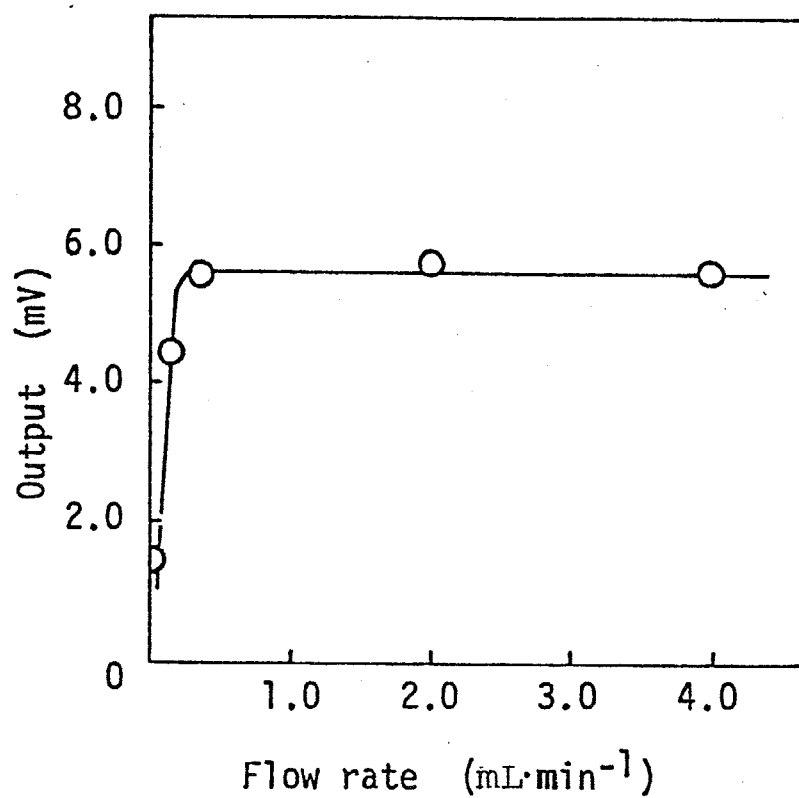


Fig. 6-9

Effect of flow rates of the sample solution on the output of the system. Other conditions than the flow rate of the sample solutions were the same as Fig. 6-3. The sample solution used was the same as described in Fig. 6-7.

定を実施した。本システムによる血清尿素の検出限界は $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。

6.3.5 システムの選択性

本システムの選択性について検討するため、硫酸アンモニウム ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$: アンモニア窒素) 溶液にアルコール類, アミン類, アミノ化合物を添加し, システムの出力応答値に及ぼす影響を調べた。この結果を表 6-1 に示す。硫酸アンモニウムの濃度と同等, あるいは, 10 倍濃度の各物質を添加したが, アンモニアの出力応答値の変化は認められなかった。但し, アセトアミドの場合, インドフェノール法でアンモニア窒素 $10.07 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であったが, 本システムでは $12.86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と若干高い値になった。

次に, 血液中に存在するアミノ酸, 蛋白質, その他窒素化合物がウレアゼ固定化 PVC 試験管を含む本システムの選択性に及ぼす影響を検討した (表 6-2)。

アラニン, アスコルビン酸, グルタミン, ヘモグロビン, ビリルビンなどを血清中に一定量添加しても,

Table 6-1 Effect of Interference Substances
to the Output of the System.

Interference Substances	Content (mg/L)	Ammonia-N Concentration (mg/L)	ref. ¹⁾
None ²⁾	0	10.00	10.00
Urea	100	9.72	
Methyl Alcohol	10	9.90	
sec-Butyl Alcohol	10	9.90	
iso-Butyl Alcohol	10	9.83	
n-Butyl Amine	10	10.10	
sec-Butyl Amine	10	9.88	
iso-Butyl Amine	10	9.88	
ter-Butyl Amine	100	9.82	
Hydroxyl Amine-HCl	10	9.90	
Dimethyl Amine	100	10.25	
Diethyl Amine	100	9.75	
Triethyl Amine	100	9.90	
Triethanol Amine	100	9.96	
Aniline	100	10.03	
Hydrazine Hydrate	100	10.09	
Acetamide	100	12.86	10.07
Benzamide	100	10.15	

1) The conventional method (Indophenol method)

2) A standard solution containing ammonia^N(10 mg/L)

Table 6-2 Effect of Interference Substances

Interference Substances	Concentration of Ammonia-N Enzymatically Produced ³⁾	
	Proposed Method mg L ⁻¹	Indophenol Method mg L ⁻¹
Control ¹⁾	10.0	10.0
Alanine	9.9	-
Ascorbic Acid	9.9	-
Glutamine	10.7	10.5
Glutathione	9.9	-
Creatine	9.8	-
Creatinine	10.4	10.6
Hemoglobin	9.8	-
Bilirubin	10.2	-

- 1) The enzymatic reaction was carried out with 0.05 mL control serum (500 mg·L⁻¹ urea nitrogen) and 0.45 mL of the buffer for 10 min and then, 2.0 mL of deionized water was added to the reaction mixture.
- 2) One hundred mg of interference substances per liter was added in the sample solution described in 1).
- 3) Reactions were performed at 37°C.

システムの出カ応答値の変化は認められなかった。
グルタミンやクレアチニンを添加した場合、本法及び
インドフェノール法共にアンモニア値は高くなった。
これは両物質中に含まれるアンモニア不純物の影響と
考えられる。本システムはアンモニアの選択性が優
れていることがわかった。

6.3.6 システムの再現性と安定性

血清中の尿素測定_の再現性について検討した。本
システムを用いて管理血清 20 検体中の尿素測定を行
なった結果、相対誤差は±5%であり、このウレアゼ固
定化PVC試験管は20回以上再使用できた。

ウレアゼ固定化PVC試験管は4℃で2ヶ月間以上その
活性を保持しており、室温でも2週間以上活性を保持
していた。尚、もとの酵素の活性は室温では3日後
に失活した。

6.3.7 従来法との比較

尿素濃度の異なる11種の血清を用いて、本システム

法と従来法（インドフェノール法）との相関性について検討した（図6-10）。本法では，血清尿素をウレアゼ固定化PVC試験管（ $3.0 \text{ U} \cdot \text{管}^{-1}$ ）で加水分解し，シュタルク式アンモニア計でアンモニアを計測した。一方，従来法では血清中の尿素をもとの酵素（ $5.0 \text{ U} \cdot \text{管}^{-1}$ ）で加水分解し，吸光度法でアンモニアを定量した。両方法の相関係数は 0.995 であった。ウレアゼ固定化PVC試験管を使用した本システムは血清尿素の連続計測に適用できることがわかった。

併せて，非タンパク性窒素成分のうち，アミノ酸，尿酸を除く，アンモニア，尿素，クレアチニンは最終生成物のアンモニアを測定して定量されることから，本章の酵素固定化PVC試験管とシュタルク式アンモニア計（SMCR）とから構成される計測システムがこれらの測定に原理的に適用出来ると考えられた。

6.4 結言

本章において得られた知見を要約すると，次のようになる。

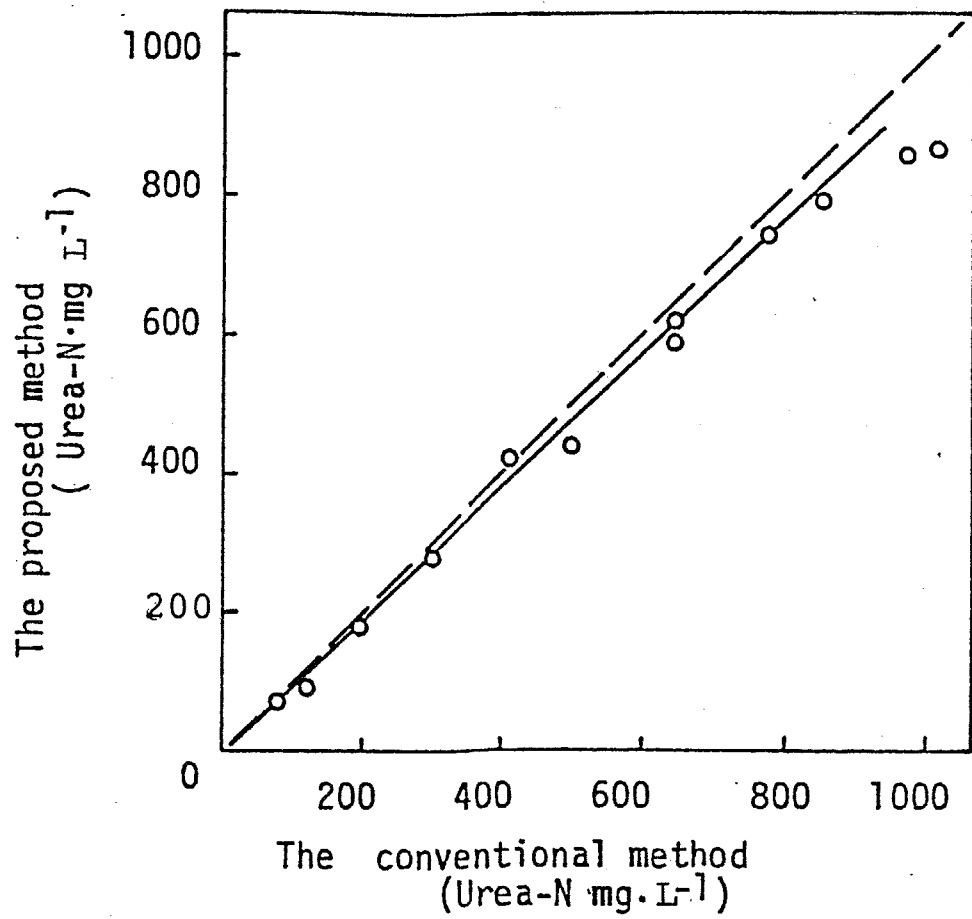


Fig. 6-10

Relation between urea-nitrogen concentrations determined both by the proposed and by the conventional methods.

- 1) 血清中の尿素の計測システムをウレアゼ固定化PVC試験管，透析器，及び，シユタルク式アンモニア計を用いて構成した。
- 2) ウレアゼ固定化PVC試験管（30）は湿潤状PVC膜を試験管内表面に塗布し，更に，ウレアゼをその表面上に固定化して調製した。
- 3) 固定化ウレアゼのpH依存性，pH安定性，保存性などの特性を明らかにした。
- 4) 酵素反応で生成したアンモニアは透析器とシユタルク式アンモニア計から成るシステムにより8分間で測定された。
- 5) 血清尿素の全測定時間は18分間であった。
- 6) 尿素窒素濃度（ $10 \sim 750 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ）とシステムの出カ応答値の間には相関係が認められた。
- 7) システム出カ応答値の相対誤差は $\pm 5\%$ であった。

以上の結果から，この計測システムで簡便，かつ，迅速に精度良く血清尿素を測定できることが分った。

なお、この計測システムは、血中アンモニア、クレアチニンの測定にも適用出来ることから、本システムが血液の緊急検査システムとして有用であると考えられた。

オ　　ク　　章

結　　論

湿潤状PVC膜は、安価な担体で、簡便に酵素を固定化でき、種々の形状に成形可能である。しかも、酵素を吸着させて調製した酵素固定化PVC膜は、高い酵素活性を有していた。酵素が種々の化学物質を選択的に識別することに着目して、いろいろな化学物質の分析定量ができる。

本研究では、臨床検査用の各種酵素固定化PVC膜を用いて、各分析項目に適した担体形状にこれを成形し（例えば、酵素膜、酵素管、酵素試験管）、これら固定化酵素と各種のトランスジューサーを組み合わせたトータルシステムを開発し、これを臨床検査分野で実際に応用しうることを明らかにしたものである。

以下に本研究で得られた成果を要約する。

- 1) 酵素を固定化するのに必要となる固定化用担体を開発した。即ち、汎用性ポリマーであるポリ

塩化ビニルをジメチルホルムアミドに溶解させ、この溶液をガラス板上に塗布し、一定の製膜条件下で膜を形成させ、湿潤状ポリ塩化ビニル膜を得た。この膜は酵素を極めて効果的に、かつ、安定に吸着し、同時に、酵素反応に関与する低分子の基質や生成物はあまり吸着しないので、臨床分析用酵素固定化担体として適用できることを明らかにした。

- 2) 各種多孔性ポリ塩化ビニル膜の膜形成機構をポリ塩化ビニル-良溶媒(ジメチルホルムアミド)-貧溶媒(水又はメタノール)3成分の相分離現象から解析した。
- 3) 湿潤状ポリ塩化ビニル膜は十分な表面積を有しており、酵素の分子径に対応する膜孔径を有することを示した。
- 4) 湿潤状ポリ塩化ビニル(PVC)膜にグルコー

スオキシダーゼ (GOD) を吸着固定化して GOD 固定化 PVC 膜 (酵素膜) を調製し, 酸素電極と組み合わせて血中グルコース測定用のグルコースセンサーを製作し, これを用いる血液中のグルコースの測定条件を明らかにした。更に, これを臨床検査に適用し, GOD 固定化 PVC 膜を用いるセンサーが実用に供しえることを明らかにした。

- 5) ステロイドホルモン検査に広く利用されている β -グルクロニダーゼを湿潤状 PVC 膜に固定化し, この諸性質をフェノールフタレイングルコナイドを基質として用いて明らかにした。特に, ステロイドホルモンの一種である 17-ヒドロキシコルテコステロイド (17-OHCS) の検査項目への適用を目指して, 酵素固定化 PVC 管 (酵素管) を提案した。

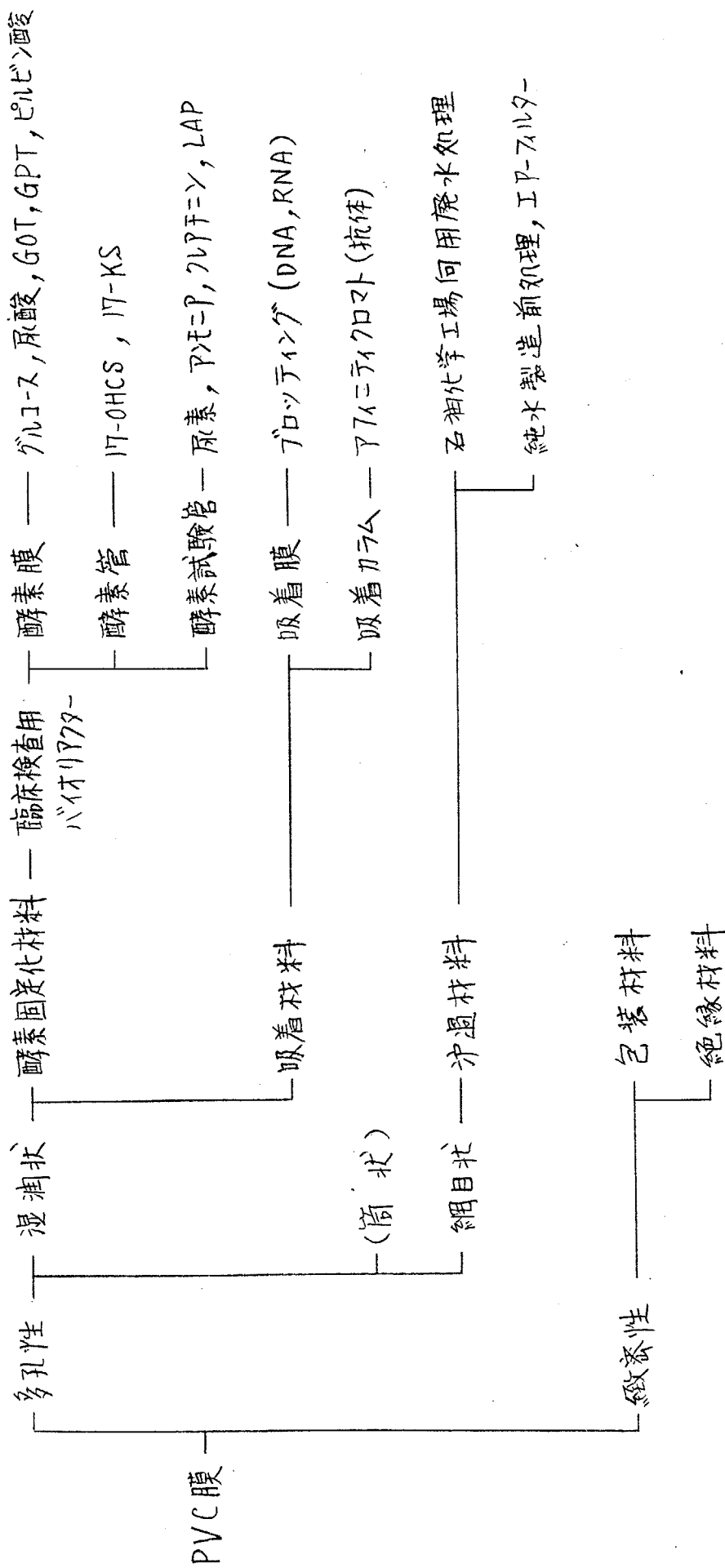
6) 上記5) で得られた結果から, 17-OHCS 検査に適する酵素固定化PVC管(酵素管)を調製し, これを用いて尿中17-OHCSの測定システムを確立し, 測定条件, 本システム法と従来法との相関性について明らかにし, 本法の有用性を示した。

7) ウレアーゼを固定化したウレアーゼ固定化PVC(試験管(酵素試験管))を調製し, これを血清中の尿素を加水分解し, 生成したアンモニアをシュタルク式アンモニア計で選択的, かつ, 高感度に測定する血清尿素計測システムを提案した。このシステムを用いて, 血清尿素が迅速, 簡便, 連続的に計測できることを示した。

以上に述べた多孔性ポリ塩化ビニル膜の応用範囲を図7-7に示す。すでにGOD固定化PVC膜は血中グルコース検査に実際に使用され, 臨床検査の作業能率の向上に貢献している。

以上，本研究は湿潤状PVC膜が酵素固定化担体として優れていることを示し，これに臨床検査用酵素を固定化して分析システムに適用したもので，医用工学上きわめて重要な知見を提供したものと信じている。

図 7-1 多孔性ポリ塩化ビニル膜の応用範囲



(参考文献)

- 1) "CRC Handbook of Clinical Laboratory Data", CRC Press, Cleveland, Ohio, 356 (1968).
- 2) 阿部裕, "臨床検査技術総論", 医学書院 (1973)
林康之, "一般臨床検査", 医学書院 (1973) など.
- 3) 北村元仕, 高阪彰, 村地孝, "臨床検査" 22, 11月号 (1978).
- 4) H.U.Bergmeyer, "Methods of Enzymatic Analysis", 2nd eds., Academic Press, New York (1974).
- 5) 村地孝, "臨床病理", 26, 1034 (1978).
- 6) 福井三郎, 干畑一郎, 鈴木周一, "酵素工学" 東京化学同人 (1981).
- 7) 干畑一郎, "固定化酵素", 講談社サイエンティフイフ (1975).
- 8) H.H.Weetall, "Immobilized Enzymes, Antigens and Peptides" Merrell Decker, New York (1975).
- 9) W.R.Vieth, K.Venkatasubramanian, Chemtech, 677 (Nov. 1973)
- 10) T.Tosa, T.Mori, N.Fuse and I.Chibata, Enzymologia, 31, 214 (1966).
- 11) R.Axen, J.Porath and S.Ernback, Nature, 214, 1302 (1967).
- 12) J.Endo, M.Tabata, S.Okada and T.Murachi, Clin.Chim.Acta, 95, 411 (1979).
- 13) F.A.Quiocho, F.M.Richards, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 52, 833 (1964).
- 14) V.E.Gulaya, J.Turkova, V.Jirku, A.Frydrychova, J.Coupek and S.N.Ananchenko, Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol., 8, 43 (1979).
- 15) P.Bernfeld and J.Wan, Science, 142, 678 (1963).
- 16) S.Fukui, A.Tanaka, T.Iida and E.Hasegawa, FEBS Lett., 66, 179 (1976).

- 17) I.Karube and S.Suzuki, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 47, 51(1972).
- 18) K.Venkatasubramanian, W.R.Vieth and S.S.Wang, *J.Ferment. Technol.*, 50,600(1972).
- 19) T.Tosa, T.Sato, T.Mori, K.Yamamoto, I.Takata, Y.Nishida and I.Chibata, *Biotechnol.Bioeng.*, 21,1697(1979).
- 20) T.Tosa, T.Sato, T.Mori, Y.Matsuo and I.Chibata, *Biotechnol. Bioeng.*, 15,69(1973).
- 21) I.Chibata, T.Tosa and T.Sato, *Appl.Microbiol.*, 27,878 (1974).
- 22) I.Karube, T.Matsunaga, S.Mitsuda and S.Suzuki, *Biotechnol. Bioeng.*, 19,1535(1977).
- 23) I.Karube, T.Matsunaga and S.Suzuki, *J.Solid-Phase Biochem.*, 2,97(1977).
- 24) I.Karube, S.Mitsuda, M.Matsunaga and S.Suzuki, *J.Ferment. Technol.*, 55,243(1977).
- 25) 尾形稔, "臨床化学入門", 医学書院 (1974).
- 26) S.Hirose, A.Shimizu and T.Nose, *J.Appl.Polym.Sci.*, 23, 3193(1979).
- 27) 広瀬幸夫, 清水晃, 高分子論文集, 35, 435 (1978).
- 28) 広瀬幸夫, 清水晃, 梶内俊夫, 水処理技術, 19, 31 (1978).
- 29) 三菱油化(株), 特開昭 53-64677, 昭 54-35282, 昭 55-39719, 昭 55-144880, 昭 56-1881 など
- 30) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randall, *J.Biol.Chem.*, 193,265(1951).
- 31) A.I.Steyermark, *Anal.Chem.*, 23,523(1951).
- 32) A.Soddu and W.R.Vieth, *J.Mol.Catal.*, 7,491(1980).
- 33) Y.Mizutani and M.Nishimura, *J.Appl.Polym.Sci.*, 14,1847 (1970).

- 34) 梶部征夫, 鈴木周一, 有機合成化学, 40, 227 (1982).
- 35) 梶部征夫, 化学工業, No.6, 491 (1982).
- 36) R.Bently, in "Methods in Enzymology", S.P.Colowick and N.O.Kaplan (eds.), Vol.9, Academic Press, New York, 340 (1955).
- 37) M.H.Briggs, "Steroid biochemistry and Pharmacology" Vol.1, Academic Press, New York, 419(1970).
- 38) W.H.Fishman, in "Methods in Enzymology", S.P.Colowick and N.O.Kaplan (eds.), Vol.1, Academic Press, New York, 262(1955).
- 39) S.Hirose, W.R.Vieth and C.F.Chen, J.Memb.Sci., in print.
- 40) E.Furuya, Clin.Chem., 23,982(1977).
- 41) O.Nishikaze and T.Kobayashi, Clin.Chem., 23,2332(1977).
- 42) E.Furuya, V.Graef and O.Nishikaze, Anal.Biochem., 90, 644(1978).
- 43) 橋本光一, 萩原文二, 膜による分離法, 講談社サイエンスライフ (1975).
- 44) B.Atkinson, Biochemical Reactors, Pion Ltd., London(1974).
- 45) B.L.Albelt, F.D.Terry and A.Milton, J.Appl.Environ. Microbiol., 38,212(1979).
- 46) I.Karube, T.Okada and S.Suzuki, Anal.Chem., 53,1852(1981).
- 47) M.Hikuma, T.Kubo, T.Yasuda, I.Karube and S.Suzuki, Anal. Chem., 52,1020(1980).
- 48) H.Uehara, Y.Ijyuin, Y.Morino, T.Kamidate, A.Nakamura and H.Imai, Rev.Sci.Instrum., 51,334(1980).
- 49) J.B.Sumner, in "Methods in Enzymology", S.P.Colowick and N.O.Kaplan (eds.), Vol.2, Academic Press, New York, 378 (1955).
- 50) L.Goldstein, Y.Levin and E.Katchalski, Biochemistry,3, 1913(1964).

謝辞

本研究を行なうにあたり，御指導御鞭撻を賜りました東京工業大学資源化学研究所 教授鈴木周一先生，同助教授軽部征夫先生に心から御礼申し上げます。同時に，東京工業大学工学部高分子工学科助教授野瀬卓平先生，ラトガス大学生物化学工学科 W.R. Vietk 教授，香川大学化学科教授高尾将臣先生に感謝致します。

さらに，本研究を行なう機会と適切な助言を頂きました三菱油化(株)取締役 中央研究所長 山中俊夫氏，同室長 内山正夫博士，技術開発研究所長 干成睦夫氏，また，本研究に着手した当時から貴重なる助言御指導を頂きました元取締役 研究部長 篠原弘之氏 (現・中央理化 KK)，元室長 荒牧輝夫氏 (現・日本精工 KK)，室長 清水晃氏 ならびに，多くの方々に感謝致します。

また本研究に御協力頂きました田村紀義博士，上館民夫博士，金井晃氏，林光洋氏，宇川栄起氏始め高分子研究室，応用生化学研究室，分析研究室の皆々様に感謝致します。

併せて、検体の提供、実用性能試験を快諾して頂いた(株)三菱油化メディカルサイエンス、東京クリニカル(株)の方々に感謝致します。

本研究に関する印刷論文

- 1) Wet Poly(vinyl chloride) Membrane. J. Appl. Polym. Sci.,
26,1039 (1981). (才2章)
- 2) Wet Poly(vinyl chloride) Membrane as a Support. J. Membrane
Sci., 11,177 (1982). (才2章)
- 3) Sorption and Transport of Acetylcholine in Reconstituted
Biomembrane structures. J. Molec. Catal., 18,11 (1983). (才2章)
- 4) Poly(vinyl chloride) Membrane for a Glucose Sensor.
J. Molec. Catal., 6,251 (1979). (才3章)
- 5) Preparation and Properties of β -Glucuronidase immobilized
on a Poly(vinyl chloride) Membrane. J. Molec. Catal.,
9,115 (1980). (才4章)
- 6) Determination of Steroids in Urine. J. Appl. Biochem.,
2,45 (1980). (才5章)
- 7) Determination of Ammonia with a Stark Microwave Cavity
Resonator. Anal. Chem., 54,1960 (1982). (才6章)
- 8) Determination of Serum Urea with Urease Test-tube Reactor.
Anal. Chim. Acta. in print. (才6章)

その他の印刷論文

- 9) 膜分離における流速速度の低下, 水処理技術, 19,631(1978)
- 10) ポリ塩化ビニル微孔膜の構造と性能, 高分子論文集,
35, 435 (1978).
- 11) Preparation and Structures of the Poly(vinyl chloride)
Porous Membranes. J. Appl. Polym. Sci., 23, 3193 (1979).
- 12) Combined Transport and Penetrant Immobilization in a
Membrane Laminate Model of the Neuromuscular Junction.
J. Membrane Sci., in print.