

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3875366号

(P3875366)

(45) 発行日 平成19年1月31日(2007.1.31)

(24) 登録日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(51) Int. Cl.

C12Q 1/26 (2006.01)

F1

C12Q 1/26

請求項の数 12 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平9-238340	(73) 特許権者	000141897
(22) 出願日	平成9年9月3日(1997.9.3)		アークレイ株式会社
(65) 公開番号	特開平11-75894		京都府京都市南区東九条西明田町57番地
(43) 公開日	平成11年3月23日(1999.3.23)	(74) 代理人	100095555
審査請求日	平成16年7月23日(2004.7.23)		弁理士 池内 寛幸
特許法第30条第1項適用	平成9年3月5日 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌1997年度大会講演要旨集71巻臨時増刊号」に発表	(74) 代理人	100076576
			弁理士 佐藤 公博
		(74) 代理人	100106127
			弁理士 松本 直己
		(72) 発明者	千田 貢
			京都府京都市左京区上高野北田町15番地5号
		審査官	斎藤 真由美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート(NADPH)の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも作用極および対極の2つの電極を用いて還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート(NADPH)の濃度を電気化学的に測定する方法であって、前記作用極に対しNADHまたはNADPHの電解が起こらない電位範囲で一定電位を印加し、その後、前記作用極に対しNADHまたはNADPHの電解が起こる電位範囲でパルス電位を印加し、このパルス電位を印加してから10~1000ミリ秒後に前記作用極と前記対極との間に通ずる電流を測定するNADHまたはNADPHの測定方法。

【請求項2】

請求項1に記載の測定方法における一連の操作を1サイクルとし、この操作を2サイクル以上繰り返し、各サイクルで測定した電流の平均値を算出してNADH濃度またはNADPH濃度に換算する測定方法。

【請求項3】

2サイクル以上の一連の操作を時間的に連続して行う請求項2に記載の測定方法。

【請求項4】

NADHまたはNADPHの電解が起こらない範囲で一定電位を印加する時間が、電極が安定するのに必要な時間である請求項1~3のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項5】

NADHまたはNADPHの電解が起こらない範囲での一定電位が-500~200mV

10

20

(v s . A g / A g C l) である請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 6】

N A D H または N A D P H の電解が起こらない範囲で一定電位を印加する時間が、1 秒 ~ 1 2 0 秒の範囲である請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 7】

N A D H または N A D P H の電解が起こらない範囲で一定電位を印加する時間が、2 秒 ~ 1 0 秒の範囲である請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 8】

パルス電位が 1 0 0 ~ 1 0 0 0 m V (v s . A g / A g C l) である請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の測定方法。

10

【請求項 9】

作用極が、プラスチックフォームドカーボン電極である請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 10】

作用極が、妨害除去膜により被覆されている請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の測定方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法を用いて N A D H 濃度または N A D P H 濃度を測定することにより、N A D H または N A D P H を補酵素とする酵素の活性を測定する酵素活性の測定方法。

20

【請求項 12】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法を用いて N A D H 濃度または N A D P H 濃度を測定することにより、N A D H または N A D P H を補酵素とする酵素の基質濃度を測定する酵素基質濃度の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多くの酵素の補酵素として働く還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下「N A D H」という）または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドフォスフェート（以下「N A D P H」という）の測定方法および N A D H または N A D P H を補酵素とする酵素の活性の測定方法並びに酵素基質濃度の測定方法に関する。

30

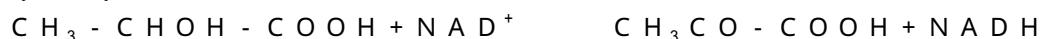
【0002】

【従来の技術】

N A D H または N A D P H は、各種酵素反応において補酵素として働くことが知られている。例えば、N A D H 等は、ある種の脱水素酵素が触媒するヒドロキシ酸から対応するケトン酸への酸化の際に、補酵素として働く。この具体例の一つとして、下記の反応式（化 1）で表される乳酸のピルビン酸への酸化をあげることができる。

【0003】

（化 1）



40

【0004】

また、N A D H は、G L D H（グルタメート・デヒドロゲナーゼ）の存在下におけるアンモニウム塩による 2 - オキソグルタレートの L - グルタメートへの変換において補酵素として作用する。

【0005】

このような N A D H 等の補酵素としての性質を利用し、酵素活性や酵素基質濃度を調べるために、N A D H 等の濃度測定が臨床検査の分野において広く行われている。たとえば、前記 G L D H の場合では、残留 N A D H を測定すれば、反応媒体中のアンモニアを定量することができる。すなわち、基質が N A D⁺（または N A D P⁺）の存在下酵素反応によって酸化される場合は、N A D H（または N A D P H）が生成する。また、基質が N A D

50

H (またはNADPH) の存在下酵素反応によって還元される場合は、 NAD^+ (または NADP^+) が生成する。したがって、前者の場合であればNADH (またはNADPH) の増加量を、後者の場合であればNADH (またはNADPH) の減少量を測定することにより、酵素基質濃度の変動やNADH等を補酵素とする酵素の活性を測定することができる。

【0006】

NADHまたはNADPHの測定方法は、光学的手法と電気化学的手法の2種類に大別できる。

【0007】

光学的手法としては、NADHまたはNADPH自体の紫外部の光吸収(極大吸収波長: 340nm)を直接測定する方法、NADHまたはNADPH自体の蛍光を直接測定する方法、触媒の存在下でNADHまたはNADPHとレゾルフィンの反応によって生成するレゾルフィンの蛍光を測定する方法などが知られている。

10

【0008】

電気化学的手法としては、作用極と対極の2つの電極を用い、前記作用極に印加してNADHまたはNADPHを電解酸化し、その際に前記作用極と該対極との間に通ずる電流を測定する方法が知られている。この電気化学的手法は、光学的手法に対して比較的簡易で安価な測定装置を用いて迅速に測定が可能であるという長所を備えているが、光学的手法に比べて感度が低いという欠点を有する。したがって、従来から、NADHまたはNADPHの電気化学的な測定方法において、感度の向上を目的とした様々な試みが行われている。

20

【0009】

例えば、特公昭58-16694号公報には、NADHが電極表面に直接化学結合で固定化された酵素電極が開示されている。この技術は、電極表面上で直接酸化されるべきNADHを、化学結合で電極表面上に固定することにより、NADHと電極表面とを常に近接させて酸化効率を向上させることで、感度の向上を図るものである。

【0010】

また、特開昭56-35050号公報には、NADHを直接電解酸化するのではなく、メルドラブルーをメディエータとして用い、前記メディエータの還元型を電解酸化する際の電流値から間接的にNADHを測定する技術が開示されている。この技術では、メディエータの酸化還元サイクルを利用することで感度の向上を図っている。

30

【0011】

そして、特表平1-503409号公報には、活性炭素粒子または活性化グラファイト粒子を天然樹脂または合成樹脂等の結合剤で結合した多孔質かつ不均質の樹脂結合層からなる活性炭素電極を使用したNADHの電気化学的測定方法が開示されている。この技術における感度の向上の原因は明瞭ではないが、活性炭素または活性化グラファイトの多孔質で不均質な構造が、電極の実効面積を増大させていることが原因と推察される。さらに、活性炭素または活性化グラファイトがNADHとの適合性に優れ、他の材質の電極に比べて速やかにNADHを酸化できることも感度向上の一因と推察される。

【0012】

40

【発明が解決しようとする課題】

これらのNADHまたはNADPHの測定方法のなかで、光学的手法は、電気化学的手法に比べ、複雑で高価な測定装置を必要とする。また、前記光学的手法のなかで、NADH等の紫外部の光吸収を測定する方法では、光の波長領域が紫外部であるために、光源および検出器ともに、安価で耐久性に優れたものを得難いという問題がある。また、前記NADH等自体の蛍光を測定する方法若しくはNADH等との反応で生成したレゾルフィンの蛍光を測定する方法では、例えば尿を測定対象とする場合、共存物質として含まれるタンパク質やビリルビン等の蛍光物質の影響を避け難いという問題がある。

【0013】

前記電気化学的手法は、先に述べたように、簡易で安価な測定装置を使用して、簡便に測

50

定を行うことができるという利点がある。しかし、前記各種の試みによって感度の向上が図られてはいるものの、依然、検出下限濃度は、 $0.1 \sim 1 \text{ mmol/L}$ 程度と充分でなく、感度の面で光学的手法には及ばない。酵素活性測定のためのNADHまたはNADPHの検出下限濃度としては $10 \mu\text{mol/L}$ 程度が望まれるが、感度が低い従来の電気化学的な測定方法では、酵素活性や酵素基質濃度の測定を行うことは、実質的に困難である。

【0014】

そこで、本発明の目的は、高い感度でNADHまたはNADPHの濃度を測定することが可能なNADHまたはNADPHの電気化学的測定方法を提供することである。

【0015】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明のNADHまたはNADPHの測定方法は、少なくとも作用極および対極の2つの電極を用いてNADHまたはNADPHの濃度を電気化学的に測定する方法であって、前記作用極に対しNADHまたはNADPHの電解が起こらない電位範囲で一定電位を印加し、その後、前記作用極にNADHまたはNADPHの電解が起こる電位範囲でパルス電位を印加し、このパルス電位を印加してから $10 \sim 1000$ ミリ秒後に前記作用極と前記対極との間に通ずる電流を測定する方法である。

【0016】

本発明の測定方法において、前記測定方法における一連の操作を1サイクルとし、この操作を2サイクル以上繰り返し、各サイクルで測定した電流の平均値を算出することが好ましい。

【0017】

この際、2サイクル以上の操作の繰り返しの時間を連続して行うことが好ましい。これにより、一つのサイクルの終点とつぎのサイクル始点において、NADH等の電解が起こる電位範囲のパルス電位からNADH等の電解が起こらない電位範囲の一定電位へ実質的に瞬間に電位が変動して前記一定電位に保持されることとなり、これによって電極が安定化されるからである。

【0018】

すなわち、図2において、 T が1サイクルの時間、 T_p がパルス電位印加時間、 $(T - T_p)$ が前記一定電位印加時間となる。上記のように、パルス電位から一定電位へ実質的に瞬間に電位を変動させることで電極が安定化されることがあるので、時間的に連続してサイクルを繰り返し、測定した電流の平均値を算出して濃度に換算する場合は、 $(T - T_p)$ は電極が安定化するのに必要な時間とするのが望ましい。なお、図2において、 E_i は前記一定電位を示し、 E_p はパルス電位と一定電位の差を示し、 I は作用極と対極との間に流れる電流を示す。

【0019】

前記一定電位は、 $-500 \sim -200 \text{ mV (vs. Ag/AgCl)}$ であるのが望ましく、前記一定電位の印加時間は、電極が安定する時間が好ましく、具体的には $1 \sim 120$ 秒の範囲が好ましく、特に好ましくは $2 \sim 10$ 秒である。また、前記パルス電位は、 $100 \sim 1000 \text{ mV (vs. Ag/AgCl)}$ であるのが望ましい。前記一定電位、前記一定電位印加時間および前記パルス電位は、測定試料の温度、pH、使用する電極の材質と種類などによって好適な値が変動するから、必要な感度、S/N比などから最適な組み合わせを選ぶことが好ましい。パルス電位を印加してから作用極と対極の間を通ずる電流を測定するまでの時間は、前記所定の範囲の時間であるが、この時間も、測定試料の温度、pH、使用する電極の材質と種類などによって好適な値が変動するから、必要な感度、S/N比などから最適な値を選ぶことが好ましい。また、前記作用極の材質は特に限定されるものではなく、必要に応じて、プラスチックフォームドカーボン、グラッシーカーボン、金、白金、銀など従来公知の材質の電極を使用することができる。このなかで、プラスチックフォームドカーボンが好ましい。前記作用極の形態についても同様であって、プローブ型の固体電極であっても良いし、印刷技術を用いた電極であってもよく、カーボンペ

10

20

30

40

50

ースト電極のようなペースト電極であっても良い。一方、対極についても、特に制限するものではなく、従来公知のものを使用することができ、例えば、白金電極、グラッシーカーボン、金、銀、印刷カーボン、カーボンペースト等が使用できる。また、本発明において、参照電極を使用することが好ましく、例えば、銀/塩化銀 (Ag/AgCl) 電極などを使用できる。

【0020】

また、様々な妨害物質の影響を回避したい場合には、前記作用極を妨害除去膜によって被覆することが好ましい。前記妨害除去膜とは、電極の汚染、NADHまたはNADPH以外の電気化学活性種などの影響を低減させるための膜であって、例えば、血液、尿、随液などの体液を測定試料として使用する場合に電極表面へタンパク質が吸着するのを防ぐための透析膜、セルロースアセテート膜、ナフィオン膜等があげられる。

10

【0021】

本発明の測定方法のNADHまたはNADPHの電気化学的な濃度測定では、検出下限 $10 \mu\text{mol/L}$ の実現が可能である。したがって、本発明の測定方法によりNADHまたはNADPHを測定することにより、NADHまたはNADPHを補酵素とする酵素の活性測定や酵素基質濃度測定が可能となる。

【0022】

【発明の実施の形態】

本発明の実施形態を実施例により比較例と併せて説明する。

【0023】

なお、以下の実施例および比較例における測定条件は、以下のとおりである。まず、電極は、通常の3電極系(プローブ型固体電極)を用いた。作用極としては、プラスチックフォームドカーボン(PFC)電極(3mm:ビー・イー・エス株式会社製)を用い、対極としては、白金電極(1mm:市村金属株式会社製)を、参照電極としては、銀/塩化銀(Ag/AgCl)電極(ビー・イー・エス社製)をそれぞれ用いた。作用極表面は、タンパクなどの妨害除去のため、透析膜(Seamless Cellulose Tubing、輸入販売元:三光純薬社)で被覆した。測定溶液は、 0.1 mol/L リン酸緩衝液をベース溶液として、NADH濃度が $5 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ となるように調整したものをを用いた。測定溶液の温度は、測定中 25°C で一定となるように調整した。

20

【0024】

(実施例1)

上記の条件の下、パルス電位を用いたNADHの測定を行った。パルス電位印加前に作用極へ印加しておく初期電位は、 -250 mV (vs. Ag/AgCl)とした。パルス電位は、初期電位からNADHを酸化し得る電位へと印加電位をパルスの(実質的に瞬間に)引き上げる際の電位であるが、本実施例においては 500 mV (vs. Ag/AgCl)とした。そして、パルス電位印加後40ミリ秒後の電流値を測定した。パルス電位を印加する時間幅は40ミリ秒とした。そして、これらの操作を1サイクルとし、この1サイクルの時間を3秒として(すなわち前記一定電位印加時間を $3000 - 40 = 2960$ ミリ秒として)10サイクルの操作を時間的に連続して行い、10回の測定の電流の平均値を算出した。この電流の平均値とNADH濃度との関係を、図1のグラフに示す。

30

40

【0025】

前記結果から、この実施例では、NADH濃度 1.0 mmol/L までの良好な直線性(相関係数: $r = 0.999$)が得られた。そして、計算によってNADHの検出下限濃度を求めたところ、 $10 \mu\text{mol/L}$ であった。なお、検出下限濃度の計算は、検量線(電流濃度プロットの回帰直線)上で、下記の式(数1)を与えるXの値(NADH濃度)とした。

【0026】

(数1)

$$Y = b + 3 S y / x$$

X: NADH濃度

50

Y : 電流値

b : 検量線の切片

Sy/x : 統計量 $Sy/x = \{ (y_i - y_a)^2 / n - 2 \}^2$

y_i : i番目の測定値 (電流値)

y_a : y_i の平均値

n : 測定ポイント数 (y_i の数)

【0027】

(比較例1)

以下に示すように、パルス電位を用いずに一定電位を用いて定常電流を測定する方法でNADH濃度を測定した。

10

【0028】

作用極に650mV (vs. Ag/AgCl)の一定電位を印加して、NADH濃度を測定し、NADH濃度と電流の関係を調べた。印加電位以外の条件は、パルス電位を用いた実施例1と同一とした。この結果を図3のグラフに示す。同図に示すように、1.0mmol/Lまでの良好な直線性(相関係数: $r = 0.999$)を得られたものの、実施例1と同様の方法で算出したNADHの検出下限濃度は、 $37.7 \mu\text{mol/L}$ であった。

【0029】

これら実施例1および比較例1の結果から、パルス電位を用いた本発明の測定法によれば、検出下限濃度で比較して、一定電位を用いた定常電流測定に対して、約4倍の感度向上が得られたといえる。

20

【0030】

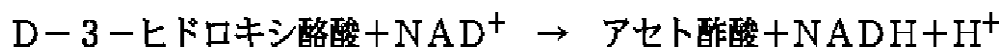
(実施例2)

D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素(HBDH)を用いたD-3-ヒドロキシ酪酸の測定を行った。この酵素反応は、下記の式(化2)で表される。この式から分かるとおり、NADHの生成量を測定することにより、D-3-ヒドロキシ酪酸濃度(基質濃度)を定量することができる。

【0031】

(化2)

HBDH



30

【0032】

実施例1と同様の条件の下、パルス電位印加後の電流値の測定し、測定した電流値とD-3-ヒドロキシ酪酸(基質)濃度との関係を調べた。その結果を図4のグラフに示す。同図のグラフから分かるように、 $70 \mu\text{mol/L}$ までの良好な直線性(相関係数: $r = 0.990$)が得られた。また、実施例1と同様の方法で算出された基質濃度の検出下限は、 $9.23 \mu\text{mol/L}$ であった。

【0033】

【発明の効果】

40

以上のように、本発明の測定方法は、迅速かつ簡便な電気化学的な測定方法であり、かつNADHまたはNADPHを検出限界下限濃度 $10 \mu\text{mol/L}$ 以下の高い感度で測定できる方法である。すなわち、本発明の測定方法の適用により、微量のNADH等を迅速かつ簡便に測定できるとともに、NADH等を補酵素とする酵素の活性やその基質濃度の迅速かつ簡便な測定も可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例における電流とNADH濃度との関係を示すグラフである。

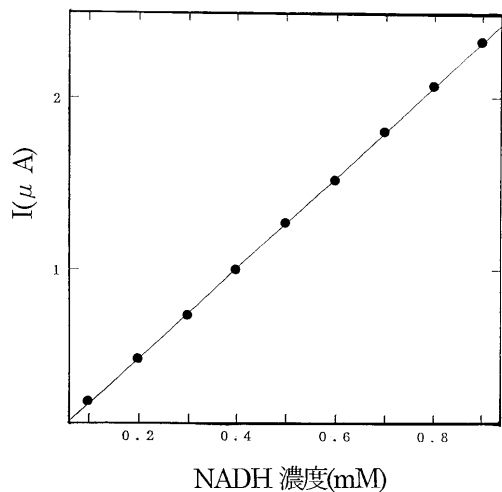
【図2】本発明の測定方法の一例の説明図である。

【図3】比較例における電流とNADH濃度との関係を示すグラフである。

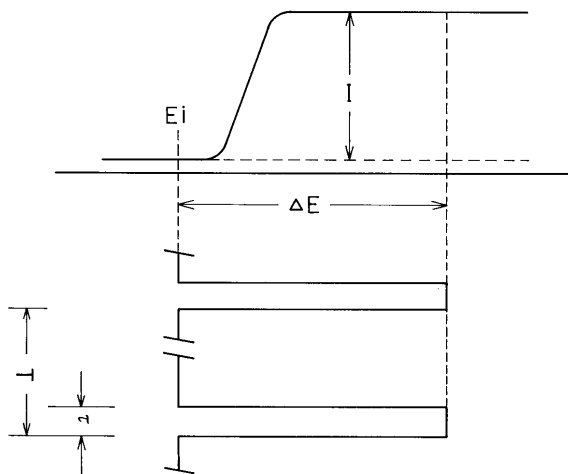
【図4】本発明のその他の実施例における電流と基質濃度との関係を示すグラフである。

50

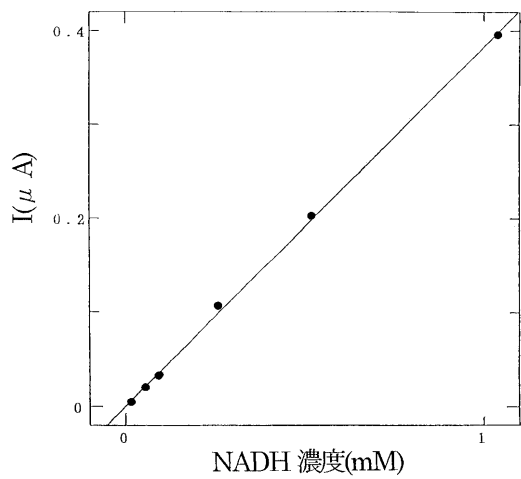
【 図 1 】



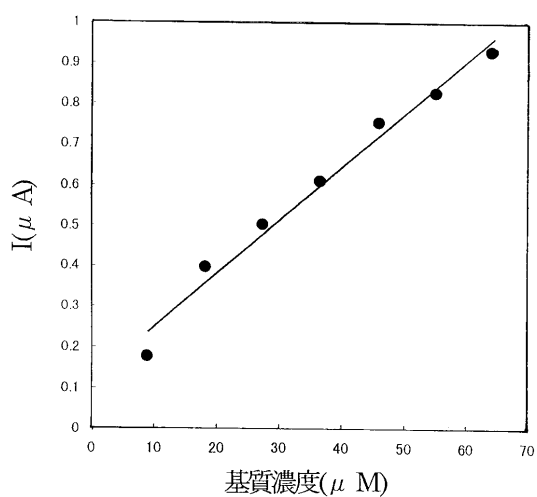
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/00-70

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed