



Studies on a polarographic determination method of serum cholesterol

亀野, 靖郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-11-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0912

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000912>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	かめ 亀 野 靖 郎 （兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第807号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和58年11月16日
学位論文題目	STUDIES ON A POLAROGRAPHIC DETERMINATION METHOD OF SERUM CHOLESTEROL (酸素電極法による血清コレステロール測定に関する研究)

審査委員	主査 教授 馬 場 茂 明
	教授 山 口 延 男 教授 西 塚 泰 美

論 文 内 容 の 要 旨

研究目的

臨床化学分析における血清コレステロールの定量は、他の脂質成分と同様に、抽出、精製、呈色反応の過程による化学的測定法によるものであった。とくにコレステロールにおいては、呈色反応である Leibermann - Burchart 反応と、Killiani 反応が特異性に欠けるため正確なコレステロール定量ができず、臨床検査としても、また、食品衛生（食品中コレステロール含有量）上、特異性の高いコレステロール定量法が望まれていた。

本研究は、1973年 Uwajima らによって精製されたコレステロールに対する酸化酵素を用いた新しい測定法の開発と、その問題点である2次反応の欠点を改良するための電極法による測定法と、リボタンパクの構造に起因する酵素反応について検討した。

方 法

1. 原理：血清中のコレステロールおよびコレステロールエステルはリボタンパクとして存在し、臨床検査ではこれを分画測定する必要がある。Cholesteroloxidase はコレステロールを酸化し1分子のコレステノンと H_2O_2 を生成する。Allain, 本研究者らは生成物である H_2O_2 の呈色反応によりコレステロールを測定し、さらに Cholesteroesterase によってコレステロールエステルを水解する反応を共役させ総コレステロール定量を可能とした。そこでこの H_2O_2 の呈色反応の欠点を見出し、さらに特異性を高めるため、Cholesteroloxidase 反応で消費される酵素の減少を測定する電極法を採用し、上記原理にもとづく測定法を開発した。

2. 機器の試作：本実験のために機器を試作した。即ち酸素電極はクラークタイプのものを用い、セルはテフロンを加工し、内容積 0.7～1.0 ml のものを用い、周囲は 35℃ に温度を制御するため金属ブロックで囲んだ。酵素反応による酸素消費の反応経過を電流として取り出し、これを増幅する回路、さらに微分回路を通すことによって酸素消費によるセル内の酸素量の減少と、Cholesterol-oxidase 反応の反応速度を同時に 2 ペンレコーダーに出力させた。

3. 操作法：基本的な操作法は、Cholesteroloxidase を含むリン酸緩衝液 0.7 ml をセル内に入れ、大気中の酸素分圧と平衡にする。最初のステップで血清 10 μ l を注入すると酸素消費が起り、コレステロールがすべて酸化され終ると酸素消費が終了する。ここでコレステロールエステラーゼ 10 μ l を添加するとコレステロールエステルから水解生成されたコレステロールを基質とするオキシダーゼ反応が起り再び酸素消費が始まる。定量法としては、それぞれ反応終了時における酸素消費量からコレステロール値を算出するか（エンドポイント法）、同時に出力された反応速度からも基質量を算出することもできる（初速度法）。

結 果

エンドポイント法では、遊離型、エステル型の分別定量も良好な精度で測定できることを認めた。この方法の難点としては、密閉式のセルを必要とし大気と遮断しなければならないこと、また、反応時間終了までに 2～3 分を要することなどがあげられる。しかし、比色定量法と比べて有利な点も多く、混濁血清による測定値への影響もなく、反応液は回復して使用できるなどの長所も認められた。

この方法による酸素消費は酵素反応（オキシダーゼ反応）の主反応であるため、他の反応にまつわる種々の影響を受けることもなく、精度、特異性も高く比色定量法に比べて有利な点が多い。

さらに、エンドポイント法の欠点を避けるために、初速度法について検討した。酸素電極法で反応初速度を測定するには電極の応答速度が重要なポイントとなる。これは、電極の陰極を扱うメンブランの性状と、極との距離に依存する。従来よく用いられていたテフロン膜に対して、ポリプロピレン膜（厚さ 20 μ ）が最も応答がよいことも確認した。

初速度法では化学反応上 2 つの問題点を認めた。1 つは、酸素消費の反応速度が、基質（コレステロール）濃度と正しい比例関係がないこと、そのため、 K_m 値を大きくするために拮抗阻害剤を用いるか、基質濃度を小さくする必要がある。第 2 に、コレステロールは測定前に水解のため、リポプロテインリパーゼによる前処理が必要である。そこで、予備加温なしに、Cholesteroloxidase, Cholesterol-esterase 反応を同時に行う総コレステロールの初速度測定を試みたが現段階では完全に測定できるには至らなかった。すなわち、それを可能にするための条件として Cholesteroloxidase 反応よりも、十分速くなければならないことを確認した。これらの実験成績は、血清中リポタンパクの構造に起因するものと考えた。

考 察

本法は臨床化学分析に有用な方法であり、かつ簡便迅速法と言えるそのものと考えられる。一般に酵素を用いて血中基質を定量する場合、試料中の基質の存在様式と用いる酵素の特性を十分に考慮することが大切である。血中のコレステロールは他の脂質成分と同様リポタンパクの型で存在し、その

基本構造はアポタンパクやリン脂質のような極性基を持つ分子を外殻とし、トリグリセライドやコレステロールエステルのような非極性脂質を内部に持った球状ミセルであると考えられている。すなわち、トリグリセライドとコレステロールエステルを中心にリン脂質で結ばれたアポタンパクが外殻を形成し、その間にコレステロールが位置するような関係が想像される。このような基質に対する酵素反応はまずリポタンパクの破壊により脂質成分の結合を解くことによって、より酵素との接触が容易となるものと考えられる。

リポプロテイン粒子の破壊はまず α キモトリプシンによるアポタンパクの分離と、ホスホリパーゼCによるリン脂質の切断がある。また比較的 Cholesteroloxidase と親和性の高い遊離型コレステロールを酸化すれば、コレステロール・エステルに対する esterase の親和性も高まることも確認した。

そして、Pseudomonas 属産生リパーゼは、他のリパーゼ、エステラーゼとは異なり、リポタンパク粒子のまゝでトリグリセライド、コレステロールエステルを水解するエステラーゼ作用を示すことも認めた。detergent としての Triton X-100 をはじめとする界面活性剤もリポタンパク粒子中の基質との親和性に効果的であり、とくにコレステロールに対するオキシダーゼ反応に不可欠である。

以上のごとき、血中コレステロールの特性を利用したが、本装置と原理によって直接 oxidase 反応を検出できる利点があり、コレステロールエステルに対する各種エステラーゼの水解反応の特性の差などをも確認することができた。

以上のごとく本法はこの種の反応検出手段として有用性の高いものであること、また、脂質の酵素的測定法の基本であるリポタンパクに対する酵素の使い方を考える上で大きな指針となるものと考ええる。

論文審査の結果の要旨

1972 年 Richmond はコレステロールに対する酸化酵素を Nocardia erythropolis から抽出精製して以来、酵素を用いた血清コレステロールの定量が開発され、実用化されてきた。

本酵素の特性については、界面活性剤の存在下で $3-\beta$ 位の水酸基を脱水素し、コレステノンと 1 分子の H_2O_2 を生成し、この反応時に溶存酸素 (O_2) を 1 分子消費する。Allain らは生成した H_2O_2 をペルオキシダーゼの触媒で 4-アミノアンチピリンとフェノールを酸化的に縮合させる比色法を完成させ、さらに、コレステロールエステルに対する水解酵素を用い、総コレステロールの比色定量法として実用化した。

本研究者は、コレステロールオキシダーゼ反応時における酸素消費を酸素電極で測定し、溶存酸素の減少から基質コレステロール量を測定することも十分可能であり、しかも本反応がきわめて定量性の高い点に注目して、酸素電極による機器を試作し、その定量法の開発を目的とした。

実験測定機器の基本構造は、温度制御されたセル部、反応液中の酸素量を測定するための酸素電極部、電極からの信号を受ける電気回路の 3 つのブロックからなる。測定用反応液は、コレステロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、界面活性剤を含む、リン酸緩衝液とサ

ンプルである。

1. 酸素電極による血清コレステロールの定量には基本的に2つの方法が考えられる。1つは反応終了時の酸素消費量を測定する endpoint 法と、この反応経過を微分回路を介して反応初速度を検出する reaction rate (初速度) 法である。

この2方法について検討した結果、endpoint 法では遊り型、エステル型コレステロールの分別定量も良好な精度で測定できることを認めた。

この方法の難点は、密閉式のセルを必要とし、大気と遮断しなければならないこと、反応終了まで2～3分を要することがあげられる。しかし、比色法に比べて混濁血清、黄疸血清でも干渉を受けることなく正確な測定が可能であること、反応液は反復して使用できる利点も認められた。しかも、この方法は酵素の一次反応であるため精度、特異性も高く比色法に比し有利な点が明らかとなった。

2. 次に、end point 法の欠点を避けるため初速度法について検討した。初速度法では、酸素消費の反応速度が高濃度のコレステロールと比例関係が認められなかった。従って、コレステロールオキシダーゼの K_m 値を大きくして、反応速度と基質濃度が比例する範囲を大きくする必要があり、拮抗阻害剤としてコレステノンを追加することによってこの問題を解決した。さらに、コレステロールエステルには、コレステロール・エステラーゼによる前処理が必要であり、各種のエステラーゼについてその特性を検討した。その結果、*P. fluorescens* 由来のエステラーゼが長鎖脂肪酸エステルに高い活性を示すことを見出し、至適条件を決定した。

3. 以上の結果、酸素電極を用いる血清コレステロール測定法が開発されたので、従来の比色法である Zurkowski 法と比較した。相関係数 0.974, $y = 1.05x - 10.57$ であり、総コレステロールの CV は 0.45% で臨床的に有用であることを確認した。

以上の研究は、酸素電極を用いる総コレステロール定量法として世界で最初のものであり、この手法は臨床検査法への導入として大きく貢献した。また、本研究中に検討された初発酵素の選択としてのコレステロールエステラーゼの研究は *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter*, ウシ臍臓, *Schizophyllum commune* などの夫々の酵素特性の差異を明確にしたほか、血中リポタンパクの存在様式や、水解過程の研究に利用できることを発見した。この研究成果は別論文 1, 2, 3 に示した通りである。

以上、本研究は酸素電極を用いる血清コレステロール測定法を開発したこと、さらにその基本法である end point 法と rate assay 法との夫々の優劣を吟味し、臨床検査法としての特性を明らかにしたばかりでなく、血中リポタンパクの存在様式の解析に対しても示唆に富むシステムを示したことは、臨床化学への貢献は大きく評価できる。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると判定した。