

赤血球内 Hexokinase 測定法の検討

川崎医療短期大学 臨床検査科

土 井 和 子

高知医科大学 検査部

佐々木 匡 秀

(昭和58年9月19日受理)

A Study of Measurement of Erythrocyte Hexokinase

Kazuko DOI*, Masahide SASAKI*

*Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Profession

Kurashiki 701-01, Japan

**Department of Laboratory Medicine, Kouchi Medical College

(Received on Sep. 19, 1983)

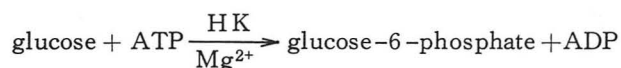
Key words : 赤血球内酵素 Hexokinase 至適条件の検討

I 概 要

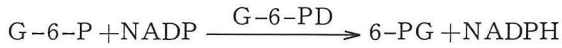
赤血球内の解糖系には Embden-Meyerhof 経路, pentose-phosphate 経路等が存在し, その反応系を媒介する酵素類の活性値測定が近年さかんに行われ始めた。¹⁾²⁾³⁾しかしこれらの分析方法に関しては, 研究者によってそれぞれ反応術式が異なり, しかも, 必ずしも各酵素の至適条件下で測定が行われているとは言い難い個所が随所に見受けられる。そこで赤血球内酵素測定上の至適基質濃度, 至適pH, およびその他の影響因子等を再吟味し, さらに, 酵素活性値測定を日常検査として導入するために, 用手法に加えてアボット社製 ABA-100 システムを使用して能率的に分析する自動測定法の二つの術式を組み立てた。ここではこれら赤血球内酵素のうちの Hexokinase (HK) 活性値測定法に関し, 測定にまつわる諸条件を追加吟味した結果を中心に, 日常検査法としての術式を紹介する。

II 測定原理

Hexokinase (HK, 2. 7. 1. 1.) は次の反応を媒介する酵素である。



したがって一般には、本酵素活性値の測定には glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) および NADP を反応系に加えて、上記の反応で生じた glucose-6-phosphate (G-6-P) を下記のごとく NADPH に変え、340 nm で測定する方法を利用している。



私たちが、この測定原理にもとづいたHK活性値測定法を組み立てようと実験を試みた。特にどのような検査室でも容易に測定が可能となるように留意し、反応液量が取り扱い易いようにと終末液量が 3.0ml になるように各試薬濃度および反応溶液量を調整した。更に反応に関しては、37°C に 10 分間保温後溶血液を 200 μ l 加え、5 分後より NADPH の変化を 340 nm で追跡し、10 分間の吸光度変化から活性値を算出する方法をとった。

Ⅲ 実験方法

1 試薬

Adenosin-5'-Triphosphate (ATP), β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) および Heparine は Sigma 社の製品を使用した。また塩酸トリエタノールアミンは半井化学の特級製品を、その他の薬品は和光純薬の特級製品を用い、反応の再現性を期した。

2 試料の採取方法

かつて私たちは赤血球のみを一定量採取するため、キャピラリー・サンプリングシステムを考案し、サンプリングの迅速化と精度の向上が期待出来ることを報告した⁴⁾。ここでも、この方法を用いることにした。すなわち、ヘパリン・リチウムで抗凝固した血液をポリエチレンキャピラリーに採用し、12000rpm で 10 分間遠心沈澱後、一定の長さにキャピラリーごと赤血球層を切断して試験管に移す。このキャピラリー赤血球層に溶血剤 (ジギトニン溶液) を加え、混和溶出し、溶血試料 (25 倍希釈液) とする方法である。

3 酵素活性値測定用機器

用手測定法の開発には Olympus 社, "Quick Rate" を使用した。本装置は 10 個のインキュベーターを、常に 37°C に加温出来るように工夫されており、340 nm の波長が選択可能な、光源とフィルターに加え、光路 1 cm 幅のキュベットが挿入できる吸光度測定室等を備えている比色計である。

自動分析法には、ABBOTT 社製、ABA-100 システムを用いた。本装置は希釈分注機構、インキュベーター (37°C)、および 2 波長分析システム (UV 域、340/380 nm で NADH のフィルタファクター 4.77) 等を備えている。更に、32 検体が連続的に測定出来るカローセル、マルチキュベットがそなえられており、ファクター設定、分析時間設定、および Rate 測定切り替え等も可能な機構を有する装置である。

IV 結果および考察

1 測定にまつわる諸条件の検討

1) 基質としての glucose 濃度の検討

文献によれば, Beutler¹⁾は 2mM を, Feilek ら²⁾は 3mM を, 三輪³⁾は 3.7mM を使用している。私たちは glucose を終末濃度として 0.5~5.0 mM 範囲の各反応溶液を作製し, HK による酵素反応を行ったところ, 2.0mM から 5.0mM にかけて最高活性値を得た。したがって, 基質としての glucose 濃度は 3.0mM が終末濃度となるよう調製することにした。

2) ATP および $MgCl_2$ の至適濃度の吟味

O'sullivan⁵⁾らによると ATP は pH 8.0 の溶液中では ATP^{4-} として存在し, Mg^{2+} が存在すると $Mg \cdot ATP^{2-}$ -complex となり, はじめて基質として作用するという。しかもその固定定数は約 70,000 を示すと報告している。このことから推察すると, ATP と $MgCl_2$ が共存する溶液中ではその大多数が $Mg \cdot ATP^{2-}$ -complex として存在し, Mg^{2+} , ATP^{4-} のどちらか過剰な方が遊離 (free) の状態で存在することになる。したがって HK の基質として ATP の至適濃度を検討する場合は $Mg \cdot ATP^{2-}$ -complex 濃度だけでなく free ATP^{4-} または free Mg^{2+} による HK 活性の変動もあわせて吟味する必要があると考えた。そこで ATP と $MgCl_2$ をそれぞれ等量ずつを混じて濃度を変えて反応溶液を作製し, HK 活性を試みたところ, $Mg \cdot ATP^{2-}$ -complex が 5~10 mM であれば HK は最高の酵素反応を示した (図 1 の A, B の実線)。この $Mg \cdot ATP^{2-}$ -complex 濃度変化による HK 活性曲線を基準に free ATP^{4-} および free Mg^{2+} がそれぞれ 1 または 5 mM 過剰になるように反応溶液を濃度変化させて HK 酵素反応を行ったところ, 図 1 の波線のような変動がみられた。これらの実験から free ATP^{4-} が HK の反応に対して阻害作用を示すことが理解出来るが, 更に ATP^{4-} の $Mg \cdot ATP^{2-}$ -complex に

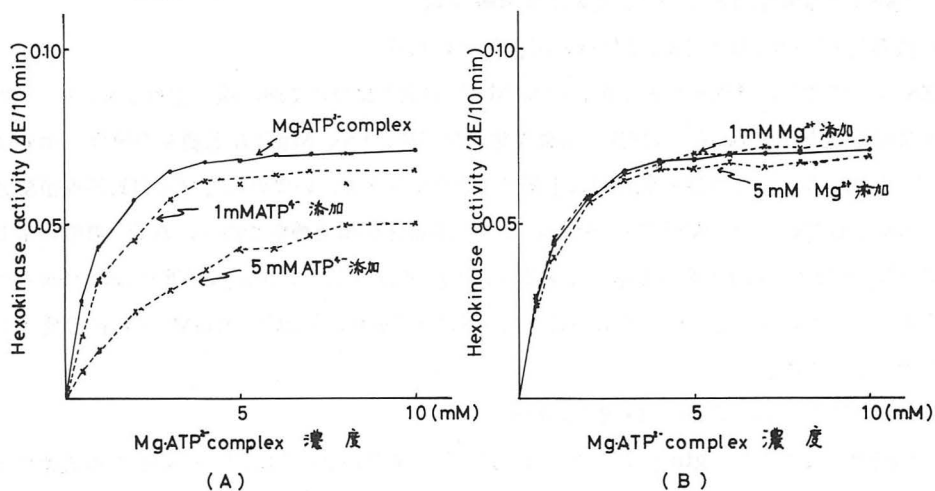


図1 $Mg \cdot ATP^{2-}$ -complex に Mg^{2+} または ATP^{4-} を添加した場合の HK 活性値の変動

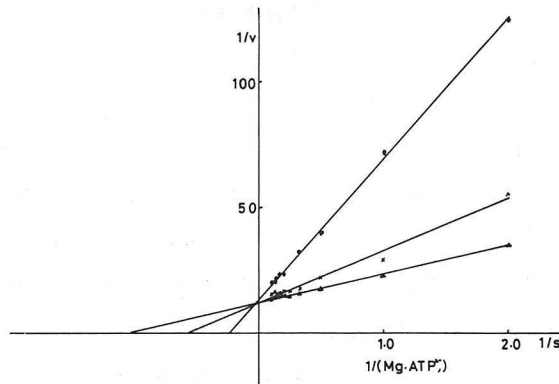


図2 HK 反応における $Mg \cdot ATP^{2-}$ complex の Lineweaver Burk plot 解析図

対する影響を明白にするために、Lineweaver Burk plot 解析をおこない図2を得た。この結果より、HK 酵素反応においては、free ATP^{4-} は $Mg \cdot ATP^{2-}$ complex に対して競争阻害作用を示すことが判明した。したがってHK 活性値を測定する場合は free ATP^{4-} 濃度を出来るかぎり低く保つことが重要な要素である。free Mg^{2+} のHK 反応に対する影響に関しては、図1-Bのごとく free Mg^{2+} が1mM 過剰な場合はやや活性値は上昇し、5mM 過剰では逆に低下がみられた。そこで $Mg \cdot ATP^{2-}$ complex を一定濃度に定め、free Mg^{2+} 濃度を1~20mM 過剰に加えて実験した結果を図3に示す。図3より free Mg^{2+} が低濃度(1~3mM)であれば free Mg^{2+} はむしろ

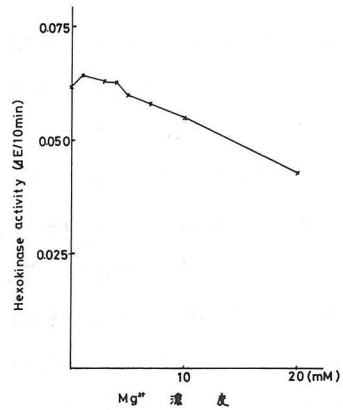


図3 HK 反応に及ぼす Mg イオンの影響

HK 反応に対し、活性化に働くが、free Mg^{2+} が増すにつれて逆に阻害作用を示した。このような現象は Rijksen ら⁶⁾の報告と同様な傾向を認め、free Mg^{2+} が低濃度の場合、free ATP^{4-} を減少させるためHK 活性値は上昇するように見える。いずれにしてもHK 活性値測定用の基質としての $Mg \cdot ATP^{2-}$ complex は5~10mM が至適濃度であり、ATP 濃度に対し、 $MgCl_2$ 濃度を常に1~3mM 過剰にするとほとんどのATP は $Mg \cdot ATP^{2-}$ complex を生じるものと思われる。したがって本術式ではATP 6.7mM, $MgCl_2$ 8mM を基質濃度として使用することにした。

3) NADP および G-6-PD 濃度の吟味

上記の結果により、glucose を3mM, ATP を6.7mM, $MgCl_2$ 8mM を基質濃度としてNADP および G-6-PD 濃度とHK 活性値の関係を調べたところ、NADP は0.2mM, G-6-PD は0.3~0.4u/ml が必要であった。

4) 至適pHの検討

50mM Triethanol amine Buffer (TEA Buffer) を用い, 上記試薬濃度で反応の至適pHを検討したところ, HK活性はpH 7.0 付近では低く, pH 7.5より急激な酵素反応がみられ, pH 7.7からpH 8.2にかけて最高活性を示して以後急に活性は低下する。したがって試薬調整用緩衝液はpH 8.0に調整することにした。

2 測定法の組み立て

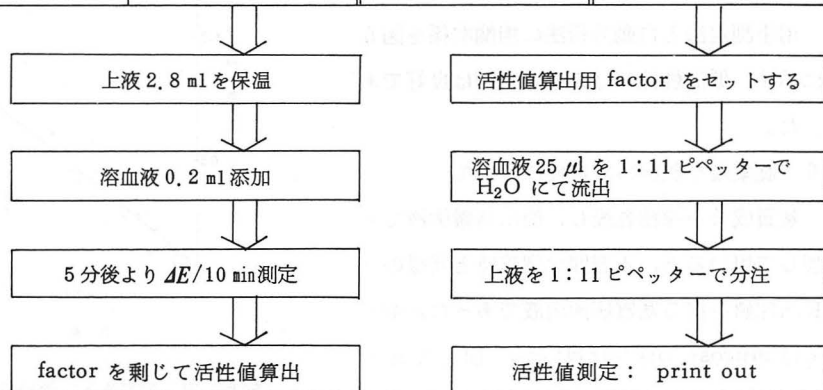
以上の諸実験の成績より, 赤血球内HK活性値の測定法を組み立てた。すなわち用手測定法では終末液量が3.0 mlになるように反応溶液を組成し, 37°Cで予備加熱後, 溶血液を200 μ l添加する。5分後より $\Delta E/10$ minを測定する。得られた値に係数を剰じて活性値を算出する方法とした(表1参照)。またアボット自動分析装置(ABA-100システム)で測定する場合は機械の構造上, 溶血液を洗い出す必要がある。そこで用いる反応溶液は用手測定法の2倍濃度に処方して分注し, 溶血試料を洗い出すH₂Oの量で希釈する術式とした(表1参照)。装置は自動的に $\Delta E/5$ minを測定し, 係数を剰じて活性値として表現出来る。

3 活性値の算出

赤血球 1 ml が基質を 1 μ mole 変化させた場合を 1 u/ml packed cell として酵素活性値を表

表1 Hexokinase 測定法のまとめ

基質緩衝液	用手測定法 (10例分)	終末濃度	自動分析法 (ABA-100 30例分)
300 mM glucose	0.3 (ml)	3.0 (mM)	0.15 (ml)
100 mM ATP(pH8.0)	2.0	6.7	1.0
15 mM NADP	0.2	0.2	0.1
50 u/ml G-6-PD	0.2	0.3 u/ml	0.1
buffer	10.0	50 mM TEA 8 mM MgCl ₂	5.0
H ₂ O	15.3		0.8



現する。したがって次式によりHK活性値を算出する。

用手測定法用係数

HK u/ml packed cell

$$= \frac{\Delta E / 10 \text{ min} \times \text{終末液量} (3) \times \text{希釈倍率} (25)}{10 \times \text{溶血液量} (0.2) \times 6.22}$$

$$= \Delta E / 10 \text{ min} \times 6.03$$

自動分析機 (ABA-100 システム) 用係数

HK u/ml packed cell

$$= \frac{\Delta E / 5 \text{ min} \times \text{終末液量} (0.525) \times 25 \times \text{ABA 係数} (0.5)}{5 \times \text{溶血液量} (0.025) \times 4.77}$$

$$= \Delta E / 5 \text{ min} \times 11.00$$

4 溶血液量及び反応時間と活性値

用手測定法を用いて反応時間に関し、5分間隔で5~30分間HK反応を行ったところ、図4のごとき反応曲線を得た。反応は直線的に上昇し、その間の340nmでのO.D.は1.516~1.717であり測定可能な領域内にあった。溶血液をさらに希釈して反応を行うと、図4に示すように低活性値では反応時間を延長して測定すれば測定可能なことが理解できた。

5 正常値と相関関係

正常人20名を用手測定法で測定すると $\bar{x} \pm 2SD$ の値が 0.43 ± 0.15 u/ml packed cell となった。自動分析法にて61名測定すると、 0.42 ± 0.13 u/ml packed cell となり用手測定法とほぼ近い値を得た。

用手測定法と自動分析法の相関関係を図5に示す。低活性値ではあるが相関は良好であった。

6 試薬及び試料の安定性について

基質成分を凍結乾燥し、使用時緩衝液で溶解して用いると、4週間は調整時と同様のHK活性値を得る基質緩衝液であった。 -40°C ではglucoseの保存は良いが、加えてあるG-6-PD活性値が低下するため基質緩衝液

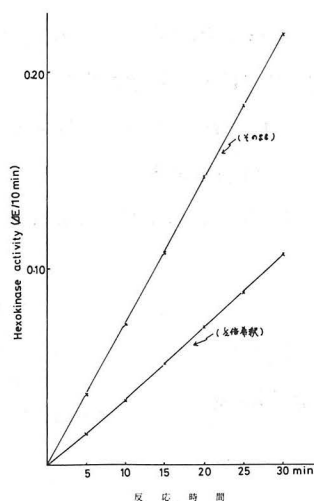


図4 溶血液と反応時間

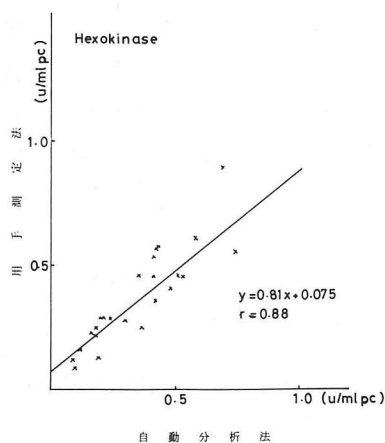


図5 用手測定法と自動分析法の相関関係図

液としての保存性は良くなかった。また4°C では4週間は調整時と同様のHK活性値が得られた。

試料の保存性を確かめるため、抗凝固血液をキャピラリーに入れ、12000 rpmで10分間遠心沈澱後一定容量をカットし、-40°Cに保存すると3日間は活性値に変化はみられなかった。血液の4°C保存では、6時間は採血時と較べて大差ないが、24時間後では-6%~-26%と変化が著しく、活性値測定には不適當であり、室温保存ではさらに著しく21%~47%もの低下がみられた。また溶血液で4°Cに保存すると24時間は変化が少ない⁷⁾ことを考慮に入れると、HKは溶血状態の方が全血液の状態よりも安定性が保たれる。

V ま と め

赤血球内の Hexokinase は解糖系の最初の酵素であり、系の重要な酵素である。しかしその活性値は非常に低いため安定した酵素活性測定を行うことは困難な点が多い。今回検討した条件で活性値を測定し、試薬および試料の保存をすると簡便にHK活性値測定が出来る。また本測定法にて同一試料を20回測定するとCV=4.39%となり良好な結果を得た。このような結果は、HK活性値の日常的測定法として十分な精度であると信じる。

文 献

- 1) Beutler, E : red cell metabolism, A manual of biochemical methods, 2nd ed. New York : Grune & Stratton, 1975. p. 38~40
- 2) Feilek, S., Mohrenweiser, H.W. : Erythrocyte enzyme deficiency assessed with a miniature centrifugal analyzer. clin. chem. 25 (3) : 384 ~ 388, 1979.
- 3) 三輪史郎 臨床検査技術全書 3. 血液検査. 東京 : 医学書院, 1978.
- 4) 佐々木匡秀, 柴田進 : 赤血球内物質分析用 Capillary Sampling System の開発. 臨床病理, 22 (補冊) : 197, 1974.
- 5) O'sullivan, W. J. and Perrin, D.D. : The stability constants of metal adenine nucleotide complex. Biochemistry, 3 : 18 ~ 26, 1964.
- 6) Rijksen, G., Staal, G. E. J. : Kinetics of human erythrocyte hexokinase : influence of temperature, ATP⁴⁻ and Mg.²⁺ Acta biol. med. germ., Band 36 : 477 ~ 480, 1970.
- 7) 佐々木匡秀, 他 : 赤血球内化学成分の日常検査分析技術. 臨床病理, 26 : 385~396, 1978.

