# Urea amidolyase を用いた血清中 $K^+$ の酵素的測定法の開発

大阪大学病院臨床検査部

木村 茂樹, 井山 茂, 山口 賀久, 林 貞夫

大阪大学歯学部病院検査部

伏見 了

大阪大学臨床検査診断学

網野 信行

## I. はじめに

生体内の電解質は，相対的組成によって浸透圧や酸塩基平衡の調節，また，筋の興奮や神経の伝達などに重要な役割をしている。その電解質の1つであるカリウムイオン（$K^+$）は，臨床的に人工透析，術後，腎移植後，周期性四肢麻痺，原発性アルドステロン症などのよい指標として用いられている[1]。その血清中 $K^+$ 測定は従来，炎光光度法，ISE 法により測定されているが，測定原理が他の生化学項目に用いられている比色法と異なり，専用の分析装置，分析ユニットを必要とする問題点がある。近年，これらの問題点を解決する方法として酵素的測定法が開発された[2,3]。今回我々は，Urea amidolyase（UAL EC 3.5.1.45）[4,5] が $K^+$ により活性化されることを利用し，血清中 $K^+$ の酵素的測定法を開発し，日立-7070 形自動分析装置を用いて基礎的検討を行ったので報告する。

## II. 方 法

1) 使用機器

本法の基礎的検討には，日立-7070 形自動分析装置を用い，また，対照法である ISE 法として EA 05（A&T）を用いた。

2) 試 薬

血清中 $K^+$ 測定における本法の試薬組成を以下に示す。

第一試薬：2-オキソグルタル酸（14.4 mmol/L），NADPH（0.53 mmol/L），尿素（4.47 mmol/L），炭酸水素ナトリウム（51.4 mmol/L），グリコールエーテルジアミン四酢酸（GEDTA 0.5 mmol/L），酢酸マグネシウム（7.2 mmol/L），UAL（230.4 U/L），グルタミン酸脱水素酵素（GLDH EC 1.4.1.4, 43.2 U/L），ウシ血清アルブミン（BSA 3 g/L）をイミダゾール緩衝液（200 mmol/L, pH 7.0 at 37℃）を用いて調製し第一試薬とした。

第二試薬：ATP（9.72 mmol/L），尿素（4.47 mmol/L），炭酸水素ナトリウム（51.4 mmol/L），GEDTA（0.5 mmol/L），酢酸マグネシウム（7.2 mmol/L），BSA（3 g/L）をイミダゾール緩衝液（200 mmol/L, pH 7.0 at 37℃）を用いて調製し第二試薬とした。

3) 測定原理

UAL は，$K^+$ や $NH_4^+$ により活性化され，$Ca^{2+}$ は UAL 活性を阻害する。まず，内因性 $NH_4^+$ は 2-オキソグルタル酸と NADPH の存在下で GLDH の作用により除去した。また，$Ca^{2+}$ は試薬中に GEDTA を添加し $Ca^{2+}$ を除去した。試料中の $K^+$ により活性化した UAL は尿素，ATP，$Mg^{2+}$，$HCO_3^-$ の存在下で $NH_4^+$ を生成する。生成した $NH_4^+$ は，GLDH の酵素反応を利用して 340 nm における NADPH の吸光度の減少を測定し，標準液との相対分析により $K^+$ 度を求める。

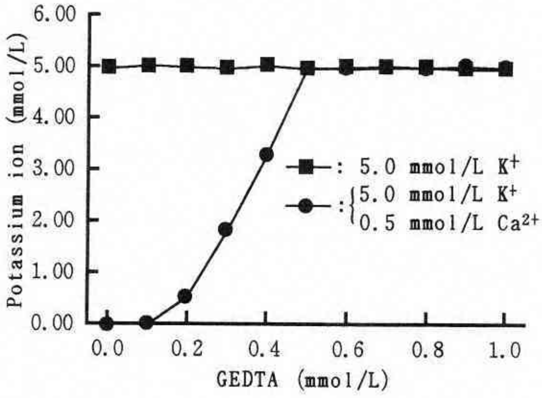


図1　GEDTA と $Ca^{2+}$ の影響

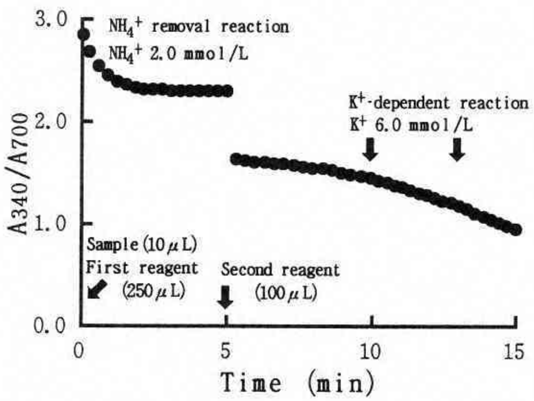


図2　時間反応曲線

$$\text{urea} + \text{ATP} + \text{HCO}_3^- + 4\,\text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{Mg}^{2+},\,\text{K}^+]{\text{UAL}} \text{ADP} + \text{Pi} + 2\,\text{HCO}_3^- + 2\,\text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$$

$$\text{NH}_4^+ + 2\text{-oxoglutarate} + \text{NADPH} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{glutamate} + \text{NADP}^+$$

4)　測定方法

標準液または血清試料 10 $\mu$L と第一試薬 250 $\mu$L を混和し 37℃にて5分間インキュベーションする。そして5分後に第二試薬 100 $\mu$L を加え，その5分後から3分間の吸光度変化量を測定し，標準液との相対分析により血清中 $K^+$ 濃度を求める。

表1　再現性

| Precision | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 |
|---|---|---|---|
| Within-assay (n = 10) | | | |
| Mean, mmol/L | 3.32 | 4.31 | 6.18 |
| SD, mmol/L | 0.033 | 0.067 | 0.076 |
| CV, % | 0.99 | 1.55 | 1.23 |
| Day-to-day (n = 10) | | | |
| Mean, mmol/L | 3.33 | 4.43 | 6.31 |
| SD, mmol/L | 0.082 | 0.090 | 0.094 |
| CV, % | 2.46 | 2.03 | 1.49 |

## Ⅲ．実験結果

1)　$K^+$ 測定の至適条件

イミダゾール緩衝液を用いて，pH 7.0〜8.0 まで変化させ，UAL の $K^+$ に対する反応性を検討した。その結果，pH 7.0 では $K^+$ に対する Km は $5.5 \times 10^{-3}$ であり，また，pH 7.5〜8.0 では $2.63 \times 10^{-2}$ であった。血清中 $K^+$ を低濃度まで精度よく測定するために，$K^+$ に特異性の高い pH 7.0 を採用した。また，UAL に対する各基質濃度は，Lineweaver-Burk プロットにより得られた Km の 10 倍量とした。

$K^+$ 測定における UAL の至適活性を検討したところ，本測定系において，$K^+$ に対し最も定量性を示したのは 160 U/L であった。

UAL 活性における $Ca^{2+}$ の影響を除去するために，試料として 5.0 mmol/L の $K^+$ 水溶液と 0.5 mmol/L の $Ca^{2+}$ を含む 5.0 mmol/L の $K^+$ 水溶液を試料として GEDTA 濃度を変化させて検討を行い，その結果を図1に示した。GEDTA 濃度 0.5 mmol/L の濃度で $Ca^{2+}$ の影響を除去することができたことから，試薬中の GEDTA 濃度は 0.5 mmol/L とした。

$K^+$ 測定における GLDH の至適活性は，試料として 2.0 mml/L の $NH_4^+$ 水溶液を用いて，GLDH 酵素溶液を段階希釈して検討した。その結果，GLDH 活性 30 kU/L のとき約2分で反応が終了した。この GLDH 活性は，5分間の第1反応で内因性の $NH_4^+$ を除去し，さらに第2反応で $K^+$ 濃度に依存する $NH_4^+$ を定量するために充分であった。また，GLDH 活性 30 kU/L 以下のときは，内因性の $NH_4^+$ は5分間で除去できたが，第

表2　添加回収試験

| | Potassium, mmol/L | | Recovery, % |
|---|---|---|---|
| | Added | Measured[a] | |
| Serum 1 | 0 | 2.68 | |
| | 0.5 | 3.16 | 96 |
| | 1.0 | 3.67 | 99 |
| | 1.5 | 4.12 | 96 |
| Serum 2 | 0 | 3.40 | |
| | 0.5 | 3.94 | 108 |
| | 1.0 | 4.44 | 104 |
| | 1.5 | 4.95 | 103 |
| Serum 3 | 0 | 3.97 | |
| | 0.5 | 4.46 | 98 |
| | 1.0 | 5.03 | 106 |
| | 1.5 | 5.54 | 105 |
| Serum 4 | 0 | 4.33 | |
| | 0.5 | 4.83 | 100 |
| | 1.0 | 5.31 | 98 |
| | 1.5 | 5.87 | 103 |

[a] Values are the means of triplicates

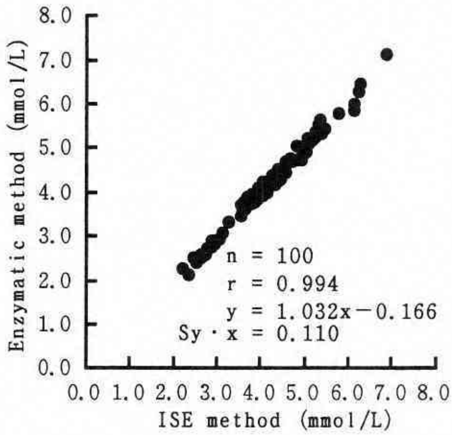


図3　相関性

表3　干渉物質の影響

| | |
|---|---|
| Sodium ion | 200.0 mmol/L |
| Ammonium ion | 2.0 mmol/L |
| Lithium ion | 3.0 mmol/L |
| Phosphate ion | 10.0 mmol/L |
| Calcium ion | 10.0 mmol/L |
| Zinc ion | 100.0 μmol/L |
| Manganese ion | 50.0 μmol/L |
| Copper ion | 100.0 μmol/L |
| Bilirubin | 219.0 mg/L |
| Hemoglobin | 5.0 g/L |

2反応で$K^+$濃度に依存する$NH_4^+$を定量するために充分のGLDH活性ではなかった。従って，$K^+$測定におけるGLDH活性は，30kU/Lとした。

以上の検討結果より$K^+$測定の至適条件を決定し，$K^+$測定における時間反応曲線を，2.0mmol/Lの$NH_4^+$を含む6.0mmol/L $K^+$水溶液を試料として用いて図2に示した。

2)　直線性

$K^+$水溶液を段階希釈し検討したところ，$K^+$濃度8.0mmol/Lまで原点を通る直線性を示した。

3)　再現性

試料として，3種類の人プール血清を用いて同時再現性と日差再現性を検討した。その結果を表1に示した。同時再現性（n=10）では平均値3.32〜6.18mmol/Lのとき変動係数（CV%）は0.99〜1.55%であり，また，日差再現性（n=10）では，平均値3.33〜6.31mmol/Lのとき変動係数（CV%）は1.49〜2.46%であった。

4)　最小検出感度

試料として0濃度の$K^+$水溶液を用い10回連続測定し，その平均値+3SDを最小検出感度とした。その結果，本法における最小検出感度は0.41mmol/Lであった。

5)　添加回収試験

試料として4種類の人プール血清と$K^+$水溶液を，それぞれ9対1の割合で混和し検討を行い，その結果を表2に示した。4種類の人プール血清の回収率は96〜108%であり，また，平均回収率は101.3%であった。

6)　干渉物質の影響

試料として2種類の人プール血清と干渉物質を，それぞれ9対1の割合で混和し検討を行い，その結果を表3に示した。干渉物質$Na^+$，$NH_4^+$，$Li^+$，$HPO_4^{2-}$，$Ca^{2+}$，$Zn^{2+}$，$Mn^{2+}$，$Cu^{2+}$，ビリルビン，ヘモグロビンはそれぞれ表3に示した濃度まで影響は認められなかった。

7)　他法との相関性

各種疾患を含む100例の患者血清を用いて，ISE法を対照法として相関性の検討を行った。x軸にISE法，y軸に本法による$K^+$濃度を示し，その結果を図3に示した。これより相関性はn=100，r=0.994，y=1.032x−0.166，Sy・x=0.110

であった。

## Ⅳ. まとめ

本法は$K^+$により活性化されるUALの性質を利用した方法であり，$NH_4^+$，$Ca^{2+}$の干渉を除去することにより$K^+$に対するUALの特異性を高めている。$Ca^{2+}$の干渉を除去するためのキレート試薬としては，GEDTA以外にEDTAなどが上げられるが，本測定系ではUAL活性に$Mg^{2+}$が必須であり，EDTAは$Mg^{2+}$，$Ca^{2+}$に対して同等のキレート作用を示すため，本測定系では使用できなかった。それに対しGEDTAは，これらのイオンが共存しても特異的，選択的に$Ca^{2+}$とキレート作用を示すことから，キレート試薬としてGEDTAを用いた。また，第一試薬，第二試薬にそれぞれ，BSAを添加したがこれは酵素および補酵素の安定化のために添加した。その結果，試薬の安定性は4℃で3日間は安定であった。

本法は，測定精度，直線性，添加回収試験，干渉物質の影響，他法との相関性などの検討の結果，良好な結果が得られた。また，専用の分析装置あるいは分析ユニットを必要としないことからも，血清中$K^+$の酵素的測定法として有用であると考えられる。

## 文　献

1) 玄番昭夫：カリウム. 日本臨床 43(秋季臨時増刊号)：445-448, 1985.

2) Berry MN, Mazzachi RD, Pejakovic M, et al : Enzymatic determination of potassium in serum. Clin Chem 35 : 817-820, 1989.

3) Kimuma S, Asari S, Hayashi S, et al : New enzymatic method with tryptophanase for determining potassium in serum. Clin Chem 38 : 44-47, 1992.

4) Roon RJ, Levenderg B. : Urea amidolyase : I. Properties of the enzyme from candida utilis. J Biol Chem 247 : 4107-4113, 1972.

5) Roon RJ, Hampshire J, Levenberg B. Urea amidolyase : The involvement of biotin in urea cleavage. J Biol Chem 247 : 7539-7545, 1972.