



A spectrophotometric method for the determination of glycolate in urine and plasma with glycolate oxidase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 前多, 英子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1594

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 317号	学位授与年月日	平成12年 2月14日
氏名	前多英子		
論文題目	<p>A spectrophotometric method for the determination of glycolate in urine and plasma with glycolate oxidase (グリコール酸酸化酵素を用い分光光度測定法により行う尿中及び血漿中のグリコール酸定量法)</p>		

博士(医学) 前多英子

論文題目

A spectrophotometric method for the determination of glycolate in urine and plasma with glycolate oxidase
(グリコール酸酸化酵素を用い分光光度測定法により行う尿中及び血漿中のグリコール酸定量法)

論文の内容の要旨

[はじめに]

尿路結石の原因となる蓚酸は主として肝臓で生産されること、主な前駆体はグリコール酸およびその酸化によって生じるグリオキシル酸であることが明らかにされている。グリコール酸は植物の光呼吸の中間体であり、ヒトおよび草食動物では食物にも由来するが、体内でもキシリトール等から生産される。

肝臓におけるグリオキシル酸の主な代謝経路は、(1)アラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素 (AGT) によるグリシンへの転換、(2)グリオキシル酸還元酵素によるグリコール酸への還元、(3)乳酸脱水素酵素による蓚酸への酸化、の3つであり、(2)と(3)の産物のグリコール酸と蓚酸は健常人でも常時尿へ排泄されている。グリオキシル酸代謝の主要経路は(1)グリシンへのアミノ基転移であり、この反応を触媒するAGTの機能的欠損症である致死性遺伝疾患の原発性高蓚酸尿症Ⅰ型では蓚酸とグリコール酸の尿中排泄が著しく増大する。このようにグリコール酸の測定は高蓚酸尿症の診断のためにもグリコール酸やグリオキシル酸の代謝動態を理解するためにも必要である。本研究では精度が高く且つこの研究室でも実施可能な分光光度測定法によるグリコール酸定量法の開発を試みた。

[材料ならびに方法]

1. グリオキシル酸の測定。グリオキシル酸をフェニルヒドラジンと反応させてフェニルヒドラゾンとした後フェリシアン化カリで酸化し、生じた1,5-ジフェニルホルマザンの515-520nmの吸光度を分光光度計あるいはマイクロプレートリーダーにより測定した。
2. グリコール酸の測定。グリコール酸酸化酵素によりグリオキシル酸に変えてから1,5-ジフェニルホルマザン法により測定した。
3. 試料調製。塩酸酸性で蓄尿するか1/100量の6N塩酸を加えた尿の遠心上清を中和し、5mMフェニルヒドラジンとインキュベートした後、活性炭処理によりフェニルヒドラジン、内在するケト酸、アルデヒドのヒドラゾンをその他の妨害物質と共に除去した。血漿は朝食前にヘパリン採血した静脈血から調製し、過塩素酸除蛋白液をKOHにより中和した後上清液を活性炭にて処理した。

[結果]

1,5-ジフェニルホルマザンの520nmの極大吸収の ϵ mMは非常に高く、40-41であった。また、グリオキシル酸フェニルヒドラゾンからのその生成は早く、フェリシアン化カリ添加後2.5-5分で吸光度は最大に達した。

グリコール酸酸化酵素はグリコール酸の他にグリオキシル酸とL-乳酸を基質にするので、120-170mM トリス-塩酸(pH8.3)を緩衝液として反応を行い、グリコール酸から生じたグリオキシル酸をトリスとの付加物として捕捉した。乳酸から生じたピルビン酸はアラニンアミノ転移酵素-グルタミン酸脱水素酵素-グルコース6-リン酸脱水素酵素系でほぼ定量的にアラニンに変換することで除去した。幸いグリ

オキシル酸-トリス付加物はグリコール酸酸化酵素、アラニンアミノ転移酵素の基質とならなかったため、これにより測定の特異性を確立できた。

尿サンプルを6回、血漿サンプルを4回、それぞれ別の日にduplicateに測定した時の平均±S.D.とC.V.は尿では $353 \pm 27 \mu\text{M}$ と7.6%、血漿では $10.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$ と9.3%であった。結石の既往症のない本学附属病院入院患者12名の24時間尿中のグリコール酸量は $248 \pm 127 \mu\text{mol}/1.73\text{m}^2$ 体表面で、グリコール酸/クレアチニン比は 0.036 ± 0.012 であった。また、11名の健常人の血漿グリコール酸濃度は $7.9 \pm 1.7 \mu\text{M}$ と測定された。

[考察]

本グリコール酸定量法は、1,5-ジフェニルホルマザンの520nmの高い吸収のために高感度であり、グリコール酸酸化酵素の基質特異性に払った十分な考慮のためにグリコール酸に特異的である。健常人血漿のグリコール酸濃度は、既存の方法の中で最も信頼度が高いと考えられるグリコール酸酸化酵素-HPLC法で $7.9 \pm 2.4 \mu\text{M}$ と測定されている。今回これとほぼ同じ値が得られたので、本法の信頼度は高いと思っている。

[結論]

グリコール酸がグリコール酸酸化酵素によりグリオキシル酸に酸化されることと、グリオキシル酸フェニルヒドラゾンの酸化により生じる1,5-ジフェニルホルマザンが高い吸収を持つことを組み合わせ、分光光度測定法によるグリコール酸の高感度定量を可能にした。

論文審査の結果の要旨

尿路結石の原因となる蓚酸は主として肝臓で生産されること、主な前駆体はグリコール酸およびその酸化によって生じるグリオキシル酸であることが明らかにされている。また、肝臓におけるグリオキシル酸の主な代謝経路は、(1)アラニン:グリオキシル酸アミノ基転移酵素(AGT)によるグリシンへの転換、(2)グリオキシル酸還元酵素によるグリコール酸への還元、(3)乳酸脱水素酵素による蓚酸への酸化、の3つが知られているが、主な経路は、グリシンへのアミノ基転移であり、この反応を触媒するAGTの機能的欠損症である原発性高蓚酸尿症I型では蓚酸とグリコール酸の尿中排泄が著しく増大する。申請者らは、グリコール酸の測定は高蓚酸尿症の診断のためにも、グリコール酸やグリオキシル酸の代謝動態を理解するためにも必要であることから、精度が高く、且つどこの研究室でも実施可能な分光的グリコール酸測定法の開発を本研究で行った。

反応は酵素的測定法で、グリコール酸をグリコール酸酸化酵素によりグリオキシル酸に変えてから、フェニルヒドラジンと反応させフェニルヒドラゾンとした後、フェリシアン化カリで酸化し、生じた1,5-ジフェニルホルマザンの515-520nmの吸光度を分光光度的に測定する2段階法である。

この場合に、内在するグリオキシル酸は、試料の前処理時点でヒドラゾン生成と活性炭処理で除去し、グリコール酸酸化酵素の基質となる乳酸は、アラニンアミノ基転移酵素-グルタミン酸脱水素酵素を共役させ、さらにNADPH産生系としてグルコース6-リン酸脱水素酵素を共役させて、定量的に除去する系を利用し、共存物質の干渉を除外した。

しかし、定量法としては、さらに慎重を期し、精製グリコール酸を3濃度添加し反応態度が標準品と

平行になるか否かで干渉を考慮した測定法として正確度の確認を行っている。再現性も生体試料で10%以内であり、正確性と精密性の両者から満足すべき測定法と考えられた。

そこで、著者らは、この確立された系を用い尿中、血中などの生体試料の分析を行った。その結果、結石の既往症のない本学附属病院入院患者12名の24時間尿中のグリコール酸量は $248 \pm 127 \mu\text{mol}/1.73\text{m}^2$ 体表面積であり、グリコール酸/クレアチニン比は 0.036 ± 0.012 と測定された。また、11名の健常人の血漿グリコール酸濃度は $7.9 \pm 1.7 \mu\text{mol}/\text{l}$ と測定された。

これまでの測定法は、グリオキシル酸を別途に測定して除去する方法とか、煩雑な測定法が多いこと、干渉のために正誤差を含むなど、問題点が多かったが、この測定法は、正確度、再現性に優れているので、今回求めた値が実際の尿中、血漿中の濃度であると考えられた。

以上の報告に引きつづき、審査委員会では関連する問題として

- 1) 反応緩衝液としてのトリス緩衝液の役割
- 2) 前処理法としての活性炭処理の効果
- 3) グリコール酸酸化酵素の基質特異性
- 4) 酸化酵素を利用しているが、なぜ過酸化水素測定系を利用しなかったのか
- 5) 乳酸除去での共役酵素系とNADPH生産システムの効果
- 6) その他の測定法との関連
- 7) HPLC法を利用する場合の前処理系の問題

などの問題について質問を行ったが、申請者の解答は実験に基づき的確で適切であり、本論文に関連する問題点などを十分把握していると考えられた。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として適切であると審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 菅野剛史

副査 堀内健太郎 副査 上里忠良