

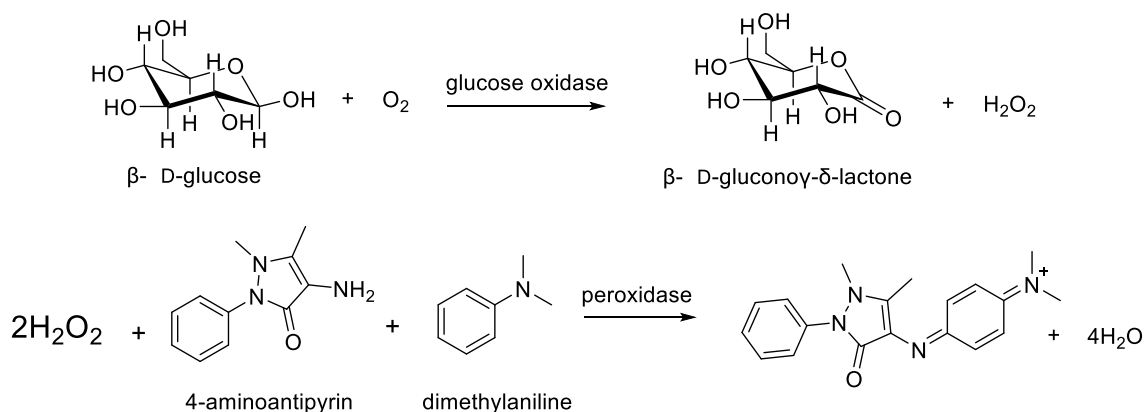
酵素を利用した生体成分の測定に関する実験

～「ラボアッセイ™ グルコース」を用いた グルコースの測定～

糖質すなわち炭水化物は、元来 $C_n(H_2O)_m$ の一般式をもつ化合物に与えられた名称であったが、今日では、ポリアルコールのアルデヒド、ケトン、酸やそれらの誘導体、縮合体なども含めて糖質として総称されている。生体内には、エネルギー源及びその貯蔵物質として、あるいは生体の構成や機能に重要な役割を果たす物質として、多種の糖質が存在する。これらの中で、グルコース（ブドウ糖）は血液中の糖の 99%以上を占め、生体のエネルギー源として重要な役割を果たしている。グルコースの血中濃度（血糖値）は腸管からの糖の吸収、肝における糖新生とグリコーゲンの合成、分解、末梢組織の糖利用、腎からの排泄などの諸因子によって左右され、その調節には自律神経と各種のホルモンが密接に関係している。そのため、糖質代謝異常あるいはそれに関連した疾患時には、血糖値が最も多く測定される。特に糖尿病の診断では血糖値が重要であり、糖尿病のコントロールの適否のチェックにも繁用されている。

血糖値を測定する方法を大別すると、①グルコースの C_1 のアルデヒド基の還元性に基づく反応（還元法）、②グルコースの酸性下における縮合反応（縮合法）、③グルコースの酵素反応（酵素法）、を利用した 3 つの測定法に分類することができる。本実習では、グルコースの酵素反応（酵素法）によるグルコースの測定操作を行い、測定原理等の知識を深めるとともに技能の習得に努める。

【反応式】



【測定原理】

今回行う検出法は、 α -D-グルコースを β 型に転移させるムタロターゼと、 β -D-グルコースのみに作用するグルコースオキシダーゼを組み合わせた酵素法試薬である。溶液中では一定の比率で α -D-グルコースと β -D-グルコースとが存在しているが、検体に発色試薬を作用させると検体中の α 型グルコースはムタロターゼの作用により β 型へ速やかに変換される。 β -D-グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) の作用を受けて酸化されると同時に過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素は、共存するペルオキシダーゼ (POD) の作用により発色試薬中のフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成させる。この赤色色素を測定することにより検体中のグルコース濃度を求める。

※以下、学生実験用に用いやすいよう、「ラボアッセイ™ グルコース」の取扱説明書とは記載が異なる部分があります。

【溶液組成】

<発色剤>

・りん酸緩衝液 (pH7.1)	: 60 mmol/L
・フェノール	: 5.3 mmol/L
・ムタロターゼ	: 0.13 units/mL
・グルコースオキシダーゼ (GOD)	: 9.0 units/mL
・ペルオキシダーゼ (POD)	: 0.65 units/mL
・4-アミノアンチピリン	: 0.50 mmol/L
・アスコルビン酸オキシダーゼ (AOD)	: 2.7 units/mL

<標準液>

- ・標準液 I ブドウ糖 200 mg/dL
- ・標準液 II ブドウ糖 500 mg/dL

【必要な器具・器材】

- ・96 ウェルの透明マイクロプレート
- ・マイクロピペット
- ・マイクロプレートリーダー
- ・振とう機 (プレートミキサー)

【試薬の調製方法（検量線作成用）】

表 1 に従い標準液と精製水を混合し、試薬を調製する。

表 1 試薬の調整表

Sample No.	試薬の調製			備考	
	標準液 I	標準液 II	精製水	使用量	濃度
1	50 μ L	—	150 μ L	2 μ L	50 mg/dL
2	100 μ L	—	100 μ L	2 μ L	100 mg/dL
3	原液	—	—	2 μ L	200 mg/dL
4	—	150 μ L	100 μ L	2 μ L	300 mg/dL
5	—	200 μ L	50 μ L	2 μ L	400 mg/dL
6	—	原液	—	2 μ L	500 mg/dL

【標準操作法】

- ① 表 2 に従い、各検体をマイクロプレートに添加する（各 2 ウェルずつ）。
- ② 検体を添加したウェルに、発色試薬を 300 μ L 添加する。
- ③ 振とう機等でよく混合し、室温で 15 分間静置する。
※呈色は室温温度で 1 時間以内はほとんど変化がありません。
- ④ マイクロプレートリーダーを用い、ブランクを対照として吸光度を測定する。
（主波長 505 nm / 副波長 600 nm）

表 2 検体、および発色試薬の添加量

検体種類	検体	精製水	発色試薬
未知検体 X	2 μ L	—	各 300 μ L
未知検体 Y	2 μ L	—	
Sample 1	2 μ L	—	
Sample 2	2 μ L	—	
Sample 3	2 μ L	—	
Sample 4	2 μ L	—	
Sample 5	2 μ L	—	
Sample 6	2 μ L	—	
ブランク	—	2 μ L	

【結果】

測定結果（吸光度）を記入する。

ブランク : n=1 _____ , n=2 _____
 ブランク平均 : _____

測定波長	ブランク	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	未知試料 X	未知試料 Y
505 nm	n=1								
	n=2								
600 nm	n=1								
	n=2								
505-600 nm	n=1								
	n=2								
ブランク	n=1	—							
補正*	n=2	—							

※ブランク平均値を用いて補正する。

【データ解析】

- ① ブランク、Sample 1～6 の吸光度を基に検量線のグラフを作成する（図 1）。
 （横軸：グルコース濃度、縦軸：吸光度）
- ② 検量線の回帰式から未知検体 X,Y のグルコース濃度を算出する。

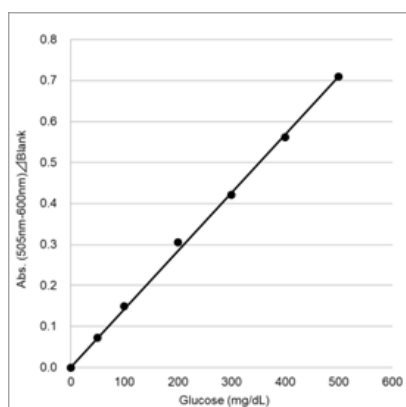


図 1 グルコースの検量線（一例）

回帰直線の式：

相 関 係 数 ： _____ (小数点以下 4 桁で記載)

未知検体濃度（血清）：X= _____ mg/dL (小数点以下 1 桁で記載)

未知検体濃度（血清）：Y= _____ mg/dL (小数点以下 1 桁で記載)

<付録>

Glucose (グルコース)

グルコースは人の代謝系において最も大量に存在する炭水化物であり、細胞内の主要なエネルギー源（ラクテートを参照）としての役割を果たしている。グルコースは主に食物由来の炭水化物から得られますが、（主に肝臓と腎臓により）糖新生の同化作用を通して、また、グリコーゲン分解からも産生される。この内生的に産生されるグルコースは、食間、絶食中など、食物由来のグルコースが得られない場合に、血中グルコース濃度を正常な範囲内に維持するのに寄与する。

グルコース基準範囲（成人）－例： 3.6～5.3 mmol/L (65～95 mg/dL)

グルコースの生理学的意義と血中グルコースの調整

人体は細胞内でのみグルコースを利用することができる。細胞内ではグルコースが主要なエネルギーの供給源である。生体内の各細胞では、解糖系とクエン酸回路という二つの連続した代謝経路で、グルコースが酸化され二酸化炭素と水に分解されることによりエネルギーが放出される。

なぜ血中グルコースを測定するのか？

循環血液中のグルコース濃度を測定する主要な理由は糖尿病の診断とモニターである。糖尿病は、膵臓ホルモンであるインスリンの絶対的または相対的欠乏に起因する血中グルコース濃度の上昇（高血糖症）で特徴付けられる、非常に一般的な慢性の代謝性疾患である。

いつグルコースを測定すべきか？

低血糖の兆候や症状、糖尿病（高血糖）の疑いや重症患者でストレスによる高血糖がみられる場合に適宜測定すべきある。

高血糖の原因：外傷、脳卒中・心筋梗塞、外科手術、糖尿病、急性膵炎、内分泌機能亢進、ヘモクロマトーシス、グルコース耐性の低下、薬物

低血糖の原因：糖尿病治療、インスリノーマ、肝臓病、胃切除後、インスリン誤用