

## 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™ コレステロール」を用いた 血清脂質（総コレステロール）の測定～

血清脂質の主な成分はコレステロール、トリグリセリド（中性脂肪）、リン脂質、及び遊離脂肪酸である。遊離脂肪酸はアルブミンと結合しているが、その他の脂質はアポタンパクとともに脂質-タンパク複合体（リポタンパク）を形成し、血中を循環している。

コレステロールは、リン脂質とともに細胞膜の構造脂質として重要な物質である。また、ステロイドホルモン産生の原料、あるいは胆汁酸を合成する材料としても重要な物質である。血清のコレステロール値は食物からの摂取、体内（肝臓）での生合成、胆汁酸や中性ステロールとして体外への排出という三者のバランスにより保たれている。そのため、血清コレステロール値の測定は、肝臓での合成・分泌の状態、胆管閉塞、腸管での吸収や栄養状態の一つの指標となる。また、後述する種々の血清脂質は表1のように、脂質異常症の診断基準として用いられている。これらの数値を運動療法、食事療法および薬剤などでコントロールすることで脂質異常症に起因する重篤な疾患（脳血管障害、循環器障害など）の回避を目指す。そのため、薬剤師としてもこれら血清脂質の特徴や検査値の診断基準のみならず、その代表的な測定方法や原理を理解し、技術的にも習得しておく必要がある。

表1 脂質異常症診断基準（厚生労働省 生活習慣病予防のための健康情報サイトより抜粋）

LDL コレステロール	140 mg/dL 以上	高 LDL コレステロール血症
	120～139 mg/dL	境界域高 LDL コレステロール血症
HDL コレステロール	40 mg/dL 未満	低 HDL コレステロール血症
トリグリセライド	150 mg/dL 以上（空腹時採血）	高トリグリセライド血症
	175mg/dL 以上（随時採血）	
Non-HDL コレステロール	170mg/dL 以上	高 non-HDL コレステロール血症
	150～169mg/dL	境界域高 non-HDL コレステロール血症

このように臨床検査値として重要な役割を持つコレステロールは、血中においてリポタンパクに含まれる形で存在している。リポタンパクは組成により比重が変化し、カイロミクロン、超低比重リポタンパク（VLDL）、中間比重リポタンパク（IDL）、低比重リポタンパク（LDL）、高比重リポタンパク（HDL）の5種類に大別される。このうち、LDLとHDLはコレステロールを運搬するという共通の役割を持ち、HDLによって運ばれるコレステロールをHDL-コレステロール、LDLによって運ばれるコレステロールをLDL-コレステロールと呼ぶ。肝臓で合成されたコレステロールは、LDLにより他の組織へ運ばれ、逆に組織で余ったコレステロールはHDLにより肝臓に戻される。LDLは酸化されやすく、また、動脈壁内に透過しやすいため、血中濃度が高い場合は動脈硬化性疾患（心筋梗塞など）の危険が増す。

血清総コレステロールの測定法には、①化学的な反応を利用した比色法、②酵素的な反応を利用した比色法がある。本実習では②の方法を用いて総コレステロールの測定を行う。本実習では、血清コレステロールの測定操作を行い、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。

### 【概要】

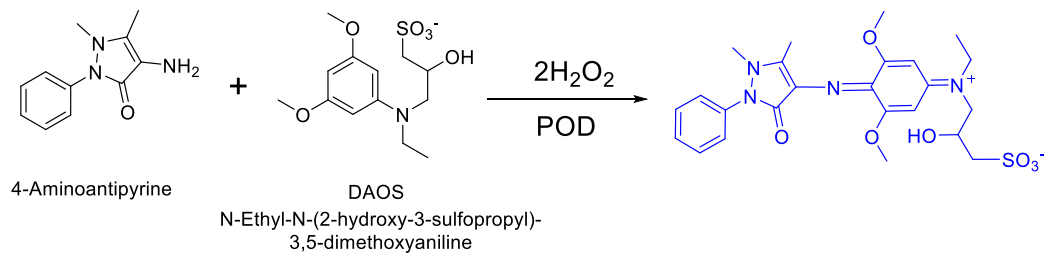
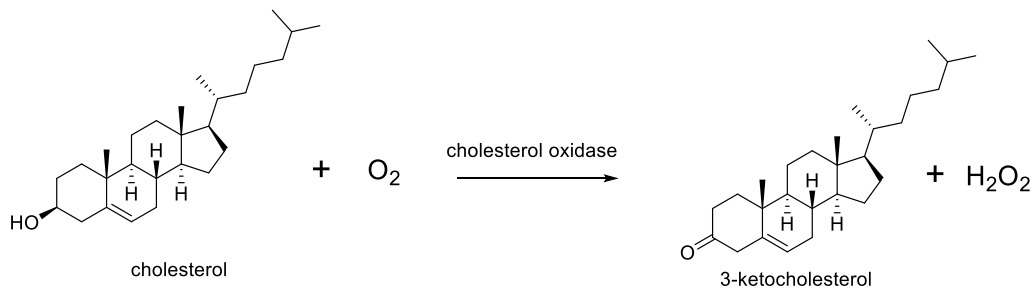
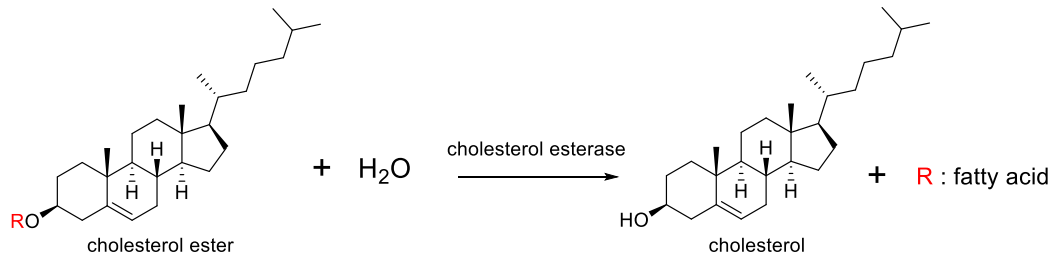
血液中の総コレステロール値は重要な臨床項目であり、臨床現場において酵素法による測定キットが頻用されている。最終的な検出法にはバリエーションがあるが、酵素法の基本はコレステロールオキシダーゼによるコレステロールの3位の酸化(コレステノンの生成)により生じた過酸化水素をペルオキシダーゼやカタラーゼで定量するというものである。ペルオキシダーゼなどによる過酸化水素定量法として、1) ホモバリニン酸が酸化されることにより蛍光物質を生成、2) p-ヒドロキシフェニル酢酸が酸化されることにより蛍光物質を生成、3) 4-アミノアンチピリンに代表されるカップラーと水素供与体が酸化縮合することによって生成するキノン色素などがある。3) のキノン色素は呈色測定で定量し、その感度はコレステロール量として1 nmol である。1) および2) では生成産物を蛍光定量する。その感度はキノン色素定量に比べ優れており50 pmol である。

コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼを併用することで、それらの合算量(総コレステロール値)を求めることができる。血漿リポタンパク質ではコレステロールエステルの比率が高いため(約75%はエステル型)、コレステロールエステルの存在は無視できない。本法の注意事項としてコレステロールオキシダーゼがコレステロール以外のステロール(コレスタノール、シトステロールなど)も酸化してしまい、結果的にコレステロール値が高く検出されることがあることである。これはコレステロールオキシダーゼの基質特異性に由来するものである。また、ペルオキシダーゼは試料中の還元性物質(アスコルビン酸、尿素、SH保護試薬など)の影響を受ける。生体試料(血清)などを測定する場合、アスコルビン酸オキシダーゼを併用する手法が用いられている。酵素法以外のコレステロール定量法としてGC、GC-MS、HPLCを用いた機器分析がある。

### 【測定原理】

今回行う検出法は、N-エチル-N(-2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウム(DAOS)を利用した青色発色系の酵素法である。検体に酵素を含む発色試薬を作用させると、検体中のコレステロールエステル類は、コレステロールエステラーゼによりコレステロールと脂肪酸に分解される。生成したコレステロールは、検体中の遊離型コレステロールと共にコレステロールオキシダーゼにより酸化され、同時に過酸化水素を生じる。生成した過酸化水素は、ペルオキシダーゼ(POD)の作用によりDAOSと4-アミノアンチピリンを定量的に酸化縮合させ、青色色素を生じさせる。この青色色素の吸光度を測定することにより、検体中の総コレステロール濃度を求める。

## 【反応式】



※以下、学生実験用のため、「ラボアッセイ™ コレステロール」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 >

- ・ MES 緩衝液 : 50mmol/L
- ・ コレステロールエステラーゼ : 1.6units/mL
- ・ コレステロールオキシダーゼ : 0.31units/mL
- ・ ペルオキシダーゼ (POD) : 5.2units/mL
- ・ DAOS : 0.95mmol/L
- ・ 4-アミノアンチピリン : 0.19mmol/L
- ・ アスコルビン酸オキシダーゼ : 4.4units/mL

### < 標準液 >

- ・ コレステロール 200 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
- ・インキュベーター (37°C)
- ・マイクロプレートリーダー

### 【試薬の調製方法 (検量線作成用)】

表2 に従い標準液と精製水を混合し、試薬を調製する。

表2 試薬の調整表

Sample No.	試薬の調製		備考	
	標準液	精製水	使用量	濃度
1	5 $\mu$ L	15 $\mu$ L	4 $\mu$ L	50 mg/dL
2	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	4 $\mu$ L	100 mg/dL
3	標準液	—	4 $\mu$ L	200 mg/dL
4	標準液	—	8 $\mu$ L	392 mg/dL <sup>※</sup>

※ 測定時液量が増加するため、数値を補正しています。

### 【標準操作法】

- ① 表3 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 200  $\mu$ L 添加する。
- ③ 振とう機等でよく混合し、37°Cで5 分間静置する。
- 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 600 nm / 副波長 700 nm)

表3 検体、および発色試薬の添加量

検体種類	検体	発色試薬
未知検体 X	4 $\mu$ L	各 200 $\mu$ L
未知検体 Y	4 $\mu$ L	
Sample 1	4 $\mu$ L	
Sample 2	4 $\mu$ L	
Sample 3	4 $\mu$ L	
Sample 4	8 $\mu$ L	
ブランク	4 $\mu$ 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	未知試料 X	未知試料 Y
600nm	n=1							
	n=2							
700nm	n=1							
	n=2							
600-700 nm	n=1							
	n=2							
ブランク 補正	n=1	—						
	n=2	—						

※ブランク平均値を用いて補正する。

**【データ解析】**

- ① Sample 1~4 の吸光度を基に検量線のグラフを作成する（図 1）。  
（横軸：コレステロール濃度、縦軸：吸光度）
- ② 検量線の回帰式から未知検体 X,Y のコレステロール濃度を算出する。

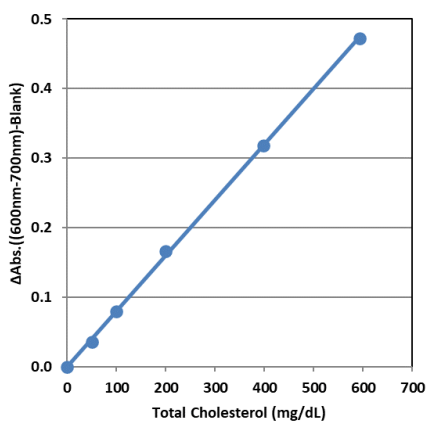


図 1 総コレステロールの検量線（一例）

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/mL (小数点以下 1 桁で記載)

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