



〈特集：招待講演（第33回年次学術集会より）〉

検査技術の【過去から現在、そして今後の展開】 —試薬開発の変遷—

石山 宗孝

Diagnostic techniques: from the past to the present, and future - Changes in reagent development

Munetaka Ishiyama

Summary Most clinical examinations are performed by methods using specific enzymatic reactions, except for the few inorganic, protein and other analysis methods. Oxidases or dehydrogenases are typically used as the enzymes in these assays, and the enzymatic reactions are detected spectrophotometrically by measuring the formation of redox chromogenic dyes. These dyes must be highly water-soluble to avoid erroneous measurements. This review reports on the development of new Trinder's reagents and tetrazolium salts (WST dyes) that produce water-soluble formazan; both dyes are used in clinical laboratories. In addition, I introduce our recently developed highly-sensitive immunoassay system and electronic mediators for Self-Monitoring of Blood Glucose (SMBG) and Continuous Glucose Monitoring (CGM).

Key words: Oxidase, Dehydrogenase, Trinder's reagent, Water-soluble formazan, WST

I. はじめに

生体試料成分を分析する生化学検査には、化学法、免疫法、酵素法があり試料の性質によって使い分けられている (Fig. 1)。化学法は、試料中に比較的存在量が多く低分子のカルシウムイオンや鉄イオンのような無機質の分析に用いられ、OCPC、Bathophenanthroline、Nitroso-PSAP等が発色試薬として使われている。一方、免疫法は、ホルモンや抗体など試料中にわずかに存在する高分子のタンパク質が対象となり、化学

発光のような高感度分析法が採用されている。化学法と免疫法の間位置するのが酵素法で、試料中の有機成分が測定対象となり、酵素の特異的反応を利用し有機発色色素による検出へと導かれる。酵素としては主に酸化酵素（オキシダーゼ）または脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）が、検出には酸化還元発色色素が用いられる。酵素法は基質特異性が高くかつ多種多様な酵素が入手可能であるため、現在臨床分析法の主流となっている。

本稿では、まず酵素法で用いられる酸化還元

株式会社 同仁化学研究所
取締役CTO
〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原2025-5

Chief Technology Officer
Dojindo Laboratories, 2025-5 Tabaru, Mashiki-machi,
Kamimashiki-gun, Kumamoto 861-2202, Japan

連絡先：石山 宗孝
Tel: +81-96-286-1515
E-mail: ishi@dojindo.co.jp

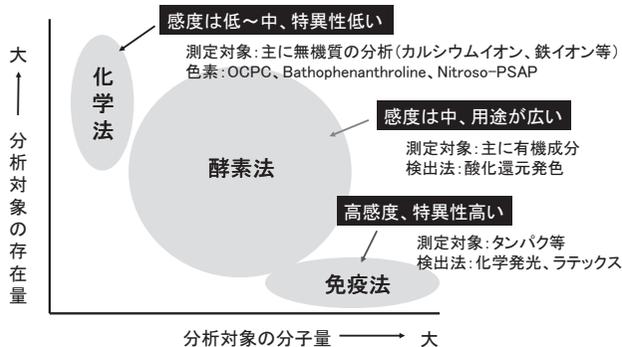


Fig.1 生体成分の分析法

発色色素の開発について、続いて免疫分析用試薬について紹介していく。

酸化還元発色色素の開発は一言でいうと「色素の水溶化」との戦いであった。測定対象が体液(水)であるため、水系での測定となる。オキシダーゼの発色基質であるフェノールおよびアニリンや、デヒドロゲナーゼの発色基質であるテトラゾリウム塩から生成されるホルマザンは水に難溶で沈殿するため、測定セルやチューブ等の汚染が大きな問題となっていた。当社ではこれらの色素の水溶化にいち早く取り組み、水溶性の酸化還元発色色素(新トリンダー試薬およびWST色素)を開発してきた。開発した色素は、いずれも高水溶性で測定セルやチューブ等の汚染を回避できた。還元発色色素であるWSTは、臨床診断薬用試薬のみならず細胞増殖・毒性試験用試薬、細菌の薬剤感受性測定用試薬、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様活性測定用試薬、細胞内代謝活性測定用試薬等適用の幅を広げてきた。現在もさらなる用途の拡大を目指した開発を進めている。

これからは、「より特異的な」、「より迅速な」、「より高感度な」検査技術の開発がますます要求されると推測する。現在、当社で取り組んでいる免疫分析の高感度検出法およびSelf-Monitoring of Blood Glucose (SMBG) やContinuous Glucose Monitoring (CGM) への応用を目指した電子メディエータの開発についても紹介する。

II. 酸化還元酵素反応の原理

酸化還元酵素は、試料中の特定の分子と反応

し過酸化水素または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)を産生する(Fig. 2)。具体的には、オキシダーゼにより基質が酸化され過酸化水素を生成し、生成した過酸化水素はペルオキシダーゼ(POD)存在下、酸化発色色素(無色)を共存させると、酸化反応により有色の色素を生成する。一方、デヒドロゲナーゼに補酵素の酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)を共存させ、測定対象物質と反応させると、NADHを生成する。NADHはジアホラーゼまたは1-methoxy PMSに代表される電子メディエータ存在下、テトラゾリウム塩色素(無色)を還元し有色のホルマザン色素を生成する。いずれの場合も生成した色素の量を分光光度計で測定することで、測定対象分子の量(濃度)を推し量ることができる。特異性が高く簡便に測定できることが汎用されている所以である。

III. 酸化発色試薬の開発

1. 酸化発色試薬開発の黎明期

オキシダーゼによる酸化発色の系は、グルコースオキシダーゼを使ったグルコース測定に

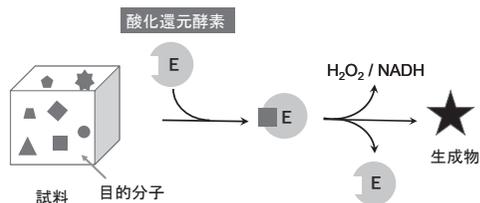


Fig. 2 酸化還元酵素反応の原理

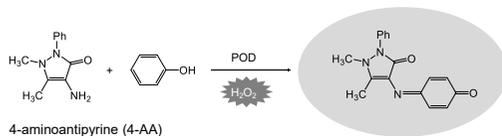


Fig. 3 4-aminoantipyrineとphenolの酸化的カップリング反応
Ph: フェニル基

端を發した。ベンジジン誘導体のo-tolidineやo-dianisidineを發色色素として用いたが^{11,12)}、色素が發がん物質であること、安定性が悪いことおよび水溶性に乏しいなどの問題があったため、汎用までには至らなかった。1969年、Trinderは、フェノールと4-aminoantipyrine (4-AA)などのカップラーとの酸化的カップリング反応を利用して、グルコースを測定した (Fig. 3)³⁾。フェノールおよび4-AAは、非發がん性でありかつ空気および光に対する安定性が向上し、先のベンジジン化合物を大きく改良することができた。フェノール/4-AAを用いた測定試薬はトリンダー試薬と呼ばれるようになり、Allain⁹⁾、Pesce⁹⁾らはコレステロール、Kabasakalian⁶⁾、Fossati⁷⁾らは尿酸、水野⁸⁾らは脂肪酸の測定へと測定項目を広げた。

Trinder試薬は、フェノール以外にアニリン化合物も試されるようになり、GochmanらはN,N-ジメチルアニリンによる尿酸の測定を報告した⁹⁾。カップラーとしては4-AAの代わりに3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone (MBTH)を用い、高感度/長波長測定を実現した。しかしMBTHは、水溶液中では不安定で試薬ブランクの上昇を引き起こすため、MBTHより感度は低く測定波長

は短波長であるが、安定性のよい4-AAがカップラーとして使用されるようになった¹⁰⁾。

2. 新トリンダー試薬の誕生

フェノールまたはアニリンと4-AAとの酸化發色体の極大吸収波長は500–550 nmである。この波長領域は、血液検体の溶血によるヘモグロビンや乳びの吸収と重なり測定値に正誤差を与える。またフェノール、アニリンおよび生成した酸化發色体は水溶性が乏しく、界面活性剤等の溶解剤を試薬溶液に加えておく必要がある。

玉奥らは、アルキルスルホン酸やヒドロキシルスルホン酸をアニリンの窒素に導入し、水溶性の向上を試みた^{11,12)}。さらに芳香環の特定の位置にメチル基やメトキシ基を導入することで、4-AAとの酸化發色体の長波長化を実現した。スルホン酸を導入したことにより、フェノールやアニリンより水溶性は格段に向上し取り扱いやすくなった。また置換基の種類および導入位置を最適化することで、MAOSのように4-AAとの酸化發色体の極大吸収波長が600 nm以上を達成することができた。これらのアニリン化合物は、新トリンダー試薬として種々の生化学検査項目に採用されている。表1に新トリンダー試薬の構造、4-AAとの酸化縮合体の極大吸収波長およびモル吸光係数を示す。

3. ロイコ型酸化發色試薬

新トリンダー試薬は、トリンダー試薬の性能を大きく向上したが、溶血や乳びの影響を完全に排除するにはさらなる長波長化が必要であることと、測定項目によっては感度が足りない

Table 1 4-AA/新トリンダー試薬の呈色

略名	X	R ¹	R ²	R ³	λ _{max}	ε × 10 ⁴ *
ADOS	OH	H	OCH ₃	C ₂ H ₅	542 nm	2.72
ADPS	H	H	OCH ₃	C ₂ H ₅	540 nm	2.79
ALPS	H	H	H	C ₂ H ₅	561 nm	4.13
DAOS	OH	OCH ₃	OCH ₃	C ₂ H ₅	593 nm	1.75
HDAOS	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	583 nm	1.73
MAOS	OH	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	630 nm	2.25
TOOS	OH	H	CH ₃	C ₂ H ₅	555 nm	3.92
TOPS	H	H	CH ₃	C ₂ H ₅	550 nm	3.74

* ベルオキシダーゼ存在下、4-AAと酸化反応した時の値

いう課題があった。これらを解消するためにDA-67が開発された。DA-67は、1. メチレンブルーを母核とした自己酸化発色型色素のため4-AAのようなカップラーを必要としない、2. 過酸化水素1分子により酸化発色体が得られるため、2分子の過酸化水素が必要なカップラーを使う系の2倍の感度(過酸化水素換算)が得られる、3. 酸化発色体であるメチレンブルーの極大吸収波長は666 nmと長波長であるため生体成分の吸収を排除できる、4. モル吸光係数が大きい(モル吸光係数; DA-67: 95,000、DAOS: 17,500 (4-AAとのカップリング)、TOOS: 39,200 (4-AAとのカップリング))という特長があるが、一方で光に対する安定性が低いという課題があった。

野口らはDA-67の誘導体 (KN-301、KN-302) を合成し、光安定性の向上を図った¹³⁾。KN-301およびKN-302を用いて尿酸の定量性を検討したところ、いずれもDA-67と同等の感度が得られかつ試薬ブランクは低く、光安定性の向上が図られた (Fig. 4)。DA-67の代替として期待される。

IV. 還元発色試薬の開発

1. 染色試薬としてのテトラゾリウム塩

還元系発色色素としては古くよりテトラゾリウム塩が使われてきた。テトラゾリウム塩は19世紀末、Pechmannにより最初の報告がされた¹⁴⁾。1942年にLakonは、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

(TTC, Fig. 6)を用い、植物の種子の発芽力とTTCによる胚の染色が相関することを報告した¹⁵⁾。TTCはさらに大腸菌や乳酸菌等、細菌の活性測定へと応用された^{16,17)}。時を置いて1983年、Mosmannは、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)を用い哺乳類培養細胞の増殖能を測定するMTT assayを開発した¹⁸⁾。いずれも、テトラゾリウム塩が生体中のデヒドロゲナーゼと補酵素を介して還元され、有色のホルマゼン色素を生成する反応を利用したものであった (Fig. 5)。

1950年代になると、ホルマゼン色素の不溶性・沈着性を利用し、組織染色のためのテトラゾリウム塩の開発が進められた。Fig. 6に示すINT¹⁹⁾、NTB²⁰⁾、TNTB²¹⁾が組織学分野で使用されるようになった。

2. 臨床診断薬への利用—NTBからWSTへ

1960年代に入ると、テトラゾリウム塩は用途を臨床検査の分野へと広げた。Nachlas^{22,23)}らやBabson²⁴⁾らは、INT、NTBを用いてコハク酸脱水素酵素および乳酸脱水素酵素活性の測定を行った。反応スキームをFig. 5に示すが、NAD⁺を補酵素、phenazine methosulfate (PMS)をメディエータとして採用した。テトラゾリウム塩の水溶液は、中性領域では無色から微黄色である。微黄色のテトラゾリウム塩が還元され濃色のホルマゼンを生じることから、試薬ブランクを考慮することなく測定できる。また反応に酸素を必要としないことから、オキシダーゼでの分析

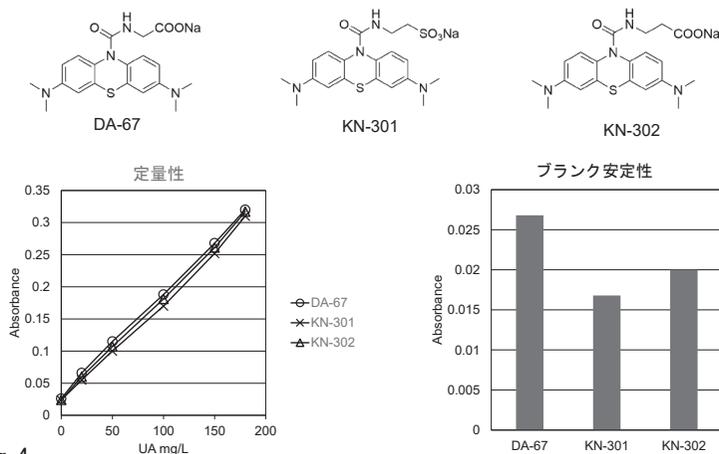


Fig. 4

Fig. 4 KN-301、KN-302による尿酸の測定

のように酸素欠乏による高濃度のサンプル領域で検量線が頭打ちすることがなく、かつ生体内マトリックスの影響を受けにくいといわれている。しかし、現在、検査はオキシダーゼを使う分析が主流である。一つにはオキシダーゼがデヒドロゲナーゼより安価で容易に入手できることが考えられる。さらにホルマザンが不溶性の沈殿物として析出し、分析装置のセルやチューブへの沈着による汚染が起こるからである。界

面活性剤等の分散剤を添加する工夫がされているが、それでも汚染は完全に解決されていない。そのためオキシダーゼでの測定が困難なLDH、中性脂肪および胆汁酸等の測定に利用されているに過ぎない。

ホルマザンに水溶性を保持させるため、石山らは水溶性基としてスルホン酸を導入したWST (Water-Soluble Tetrazolium salt)色素を開発した²⁵⁻²⁸⁾。WST色素の構造をFig. 7に、WSTホル

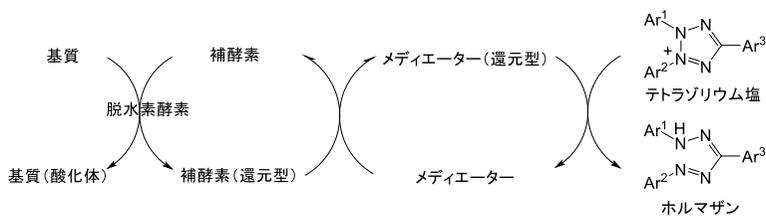


Fig. 5 脱水素酵素によるテトラゾリウム塩の還元反応
Ar: アリール基

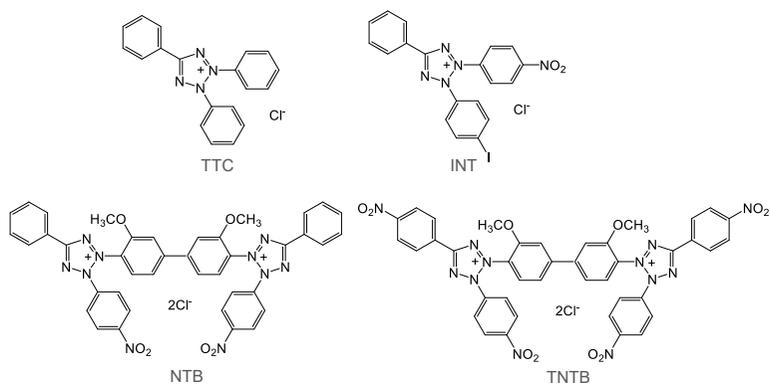


Fig. 6 テトラゾリウム塩化合物

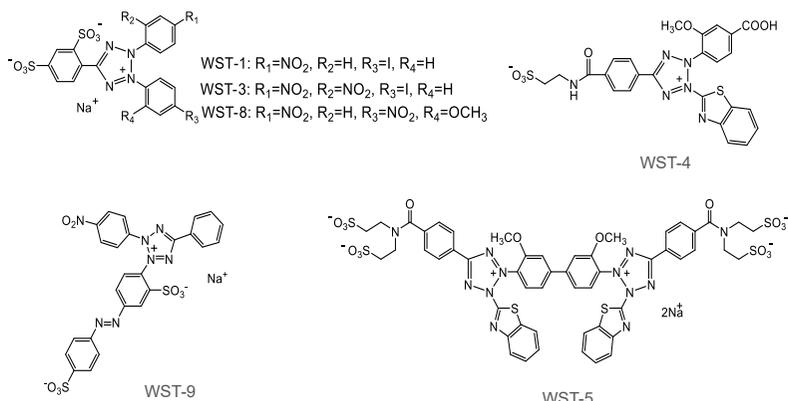


Fig. 7 WST色素

マザンの特性をTable 2に示す。いずれのWST、そのホルマザンとも高水溶性を保持し、測定中にホルマザンの沈殿を生じることはなく、INTやNTBが抱えていたホルマザンの不溶性という問題を解決した。

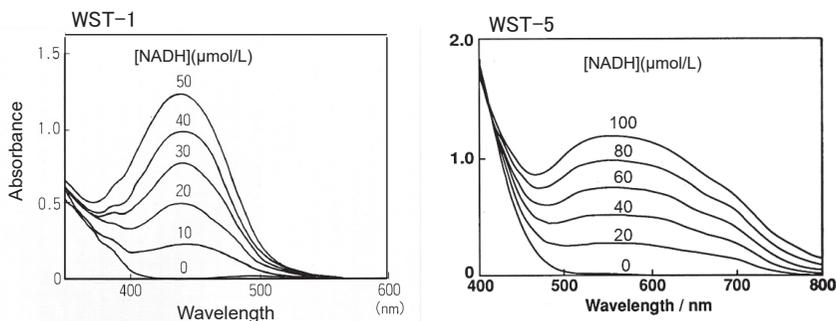
Fig. 8に、WST-1およびWST-5のNADHによる還元反応の結果生じたホルマザンの吸収スペクトルを示す。添加するNADH量の増加に伴って生成するホルマザン量も増加し、これら間には良好な相関が得られた。

次にNTBを比較対象とし、乳酸の定量分析を行った (Fig. 9)。WST-1、WST-3、WST-8すべ

てで乳酸濃度と吸光度との間に良好な直線関係が得られたが、NTBは乳酸が高濃度の領域で頭打ちの傾向が見られた。生成する不溶性のNTBホルマザンを分散させるためにTriton X-100を添加したが、それでも分散が十分でなかったために起こったものと推測される。NTBホルマザンの吸光度測定後のセルは薄赤紫色に染色されていたが、WSTは全く染色されなかった。高水溶性を保持するWSTはホルマザンの測定系への汚染がないことから、現在一部の検査項目で採用されている。

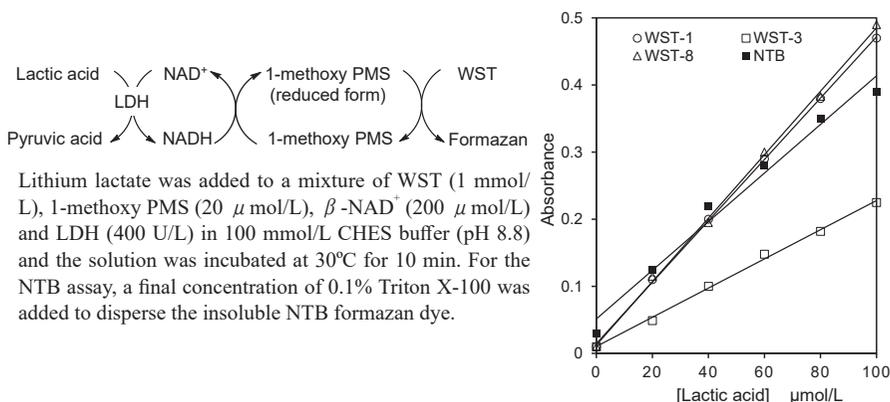
Table 2 WSTホルマザンの特性

	WST-1	WST-3	WST-4	WST-5	WST-8	WST-9
λ_{\max}	438 nm	433 nm	550 nm	550 nm	460 nm	490 nm
ϵ	37,000	31,000	13,000	27,000	31,000	27,000
Water-solubility	> 100 mM	20 mM	10 mM	20 mM	50 mM	50 mM



NADH was added to a mixture of WST (0.1 mmol/L) and 1-methoxy PMS (5 μmol/L) in 50 mmol/L Tris buffer (pH 8.0) and the solution was incubated at 22°C for 5 min.

Fig. 8 WST-1およびWST-5とNADHとの還元反応



Lithium lactate was added to a mixture of WST (1 mmol/L), 1-methoxy PMS (20 μmol/L), β-NAD⁺ (200 μmol/L) and LDH (400 U/L) in 100 mmol/L CHES buffer (pH 8.8) and the solution was incubated at 30°C for 10 min. For the NTB assay, a final concentration of 0.1% Triton X-100 was added to disperse the insoluble NTB formazan dye.

Fig. 9 WSTによる乳酸の測定

3. WSTの研究用試薬への適用

MTT、NTBおよびINTは研究分野でも汎用されてきた。これらは上述のように、テトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマザンは水に不溶性な沈殿物として析出するため、組織染色や寒天ゲルを使った微生物の染色実験には効力を発揮した。一方で分光光度計やマイクロプレートリーダーのような分光器による定量実験で

は、沈殿したホルマザンを界面活性剤または有機溶媒により溶解する操作が必要であった。この溶解操作が非常に煩雑であること、さらには不均一な溶解により測定値にバラツキを生じるという課題があった。一方、WSTホルマザンは高水溶性であるため、上記の問題を生じない。以上のことからWSTは、MTT、NTBおよびINTの代替として使われるようになった。

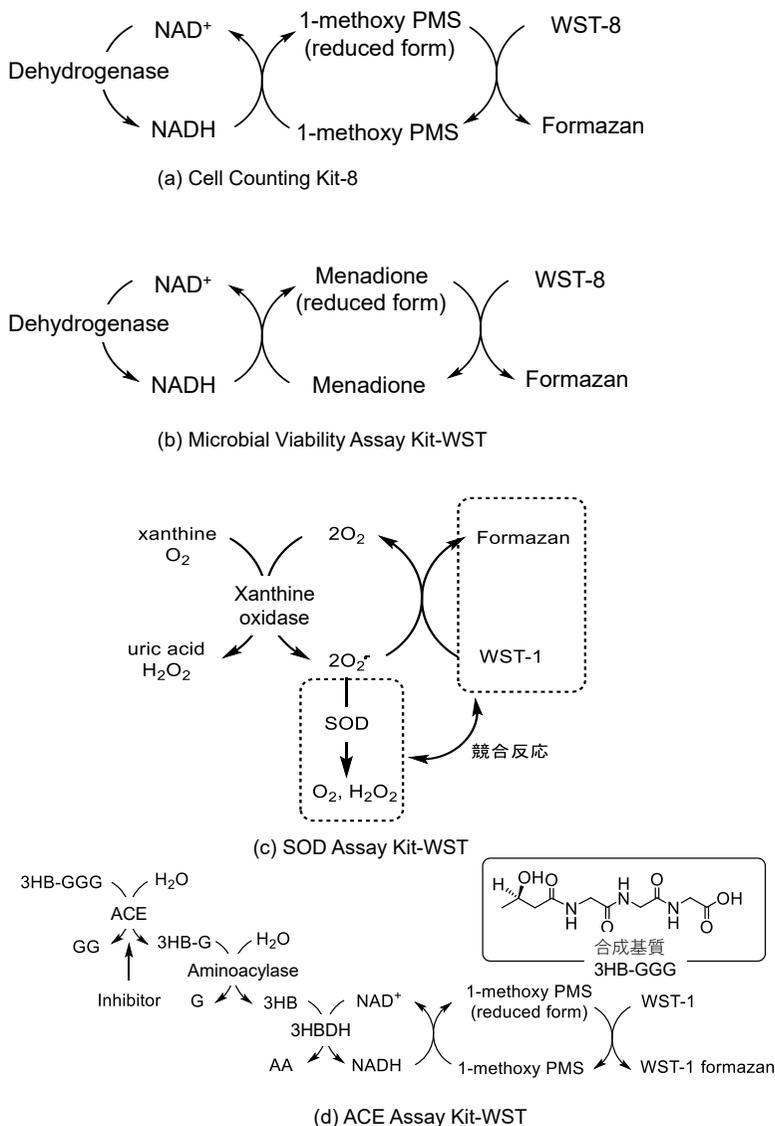


Fig. 10 WSTの研究用試薬としての応用例
 (d) 3HB-GGG: 3-hydroxybutyrylglycyl-glycyl-glycine、3HB-G: 3-hydroxybutyrylglycine、G: glycine、GG: glycylglycine、3HBDH: 3-hydroxybutyrate dehydrogenase、3HB: 3-hydroxybutyric acid、AA: acetoacetic acid

培養細胞を用いた細胞増殖および薬剤感受性試験用に開発されたMTTアッセイ¹⁸⁾は、生成するホルマザンを溶解するために、HCl/isopropanolまたはDMSOを使用する。しかし不均一な溶解により得られるデータにバラツキを生じることが課題であった。石山らは、WST-8をMTTの代替として用いたCell Counting Kit-8を開発した (Fig. 10 (a))^{28,29)}。Cell Counting Kit-8は、ホルマザンの溶解操作が不要なため、簡便でデータのバラツキが少ないアッセイを可能にした。さらにWST-8は、細菌の増殖能および薬剤感受性試験用途にまで拡大し、Microbial Viability Assay Kit-WSTの開発へとつながった (Fig. 10 (b))^{30,31)}。

抗酸化能測定としてNTBによるSOD様活性測定が知られている。スーパーオキシドによるNTBの還元を被験物質がどのくらい阻害するかを測定することで、その抗酸化能を測ることができ、特に機能性食品分析の分野で汎用されてきた。しかしNTBホルマザンの沈殿による測定系の汚染やそれによる測定値のばらつき、さらにスーパーオキシドの発生に用いるキサンチンオキシダーゼの還元体が、一部NTBと反応しホルマザンを生成するため、被験物質によるNTBの100%阻害が測定できないという課題があった。これらの課題はWST-1を用いることですべて解決することができた (Fig. 10 (c))³²⁾。

2000年代に入ると、食品業界では特定保健用食品 (通称：トクホ) の探索が活発になり、日

本中トクホブームで沸き上がった。中でも高血圧、高血糖、高脂血症に対する機能性食品は探索のターゲットとなり、食品会社はこぞってトクホ商品を製品化した。抗高血圧用機能性食品として、血圧上昇因子であるアンジオテンシンI変換酵素 (ACE) の阻害活性を有する成分の探索が進められた。これまでACE阻害活性はCushman法³³⁾により測定されていたが、測定に使用する塩酸や酢酸エチルの分析者への暴露が問題であった。さらには試験管を用いたアッセイ法のため多検体分析が困難であった。Lamらは、WST-1を用い96-wellマイクロプレートに対応した測定法を開発した (Fig. 10 (d))^{34,35)}。この測定法は、酸や有機溶媒を使用せずかつ多検体分析が可能であり、Cushman法を大きく改善した。

V. 免疫分析用試薬の開発

免疫染色やELISAは、抗原-抗体反応後、比色または発光により定量される。抗体に酵素または色素を標識できるように、酵素または色素を加工する。例えば抗体のアミノ基に酵素を標識する場合は、過ヨウ素酸法またはグルタルアルデヒド法により酵素表面にホルミル基を形成させた後、抗体と反応させるのが一般的な方法である。反応が数ステップあること、さらに精製工程に透析を使うことから、目的の標識体を得るのに2日程度を必要とする。

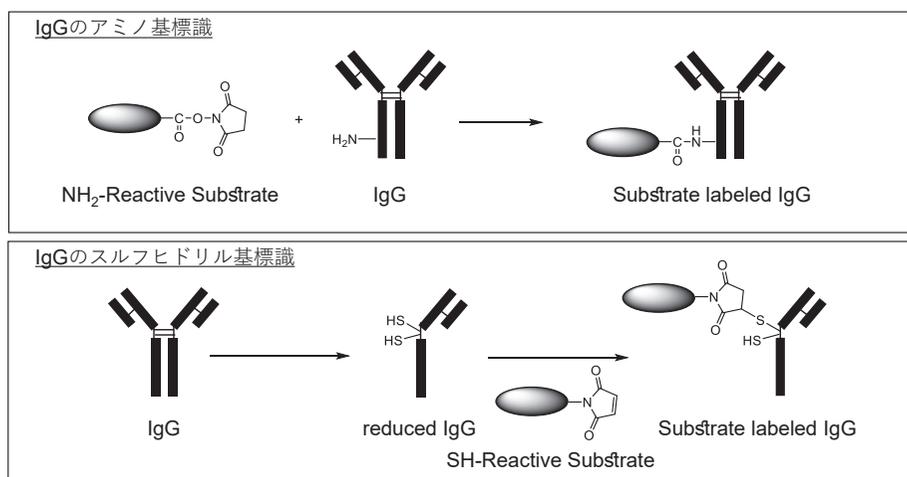


Fig. 11 当社製品を使ったIgGのアミノ基およびスルフヒドリル基への標識

当社は、短時間でかつ簡便に抗体に標識するシステムを開発し製品化した。当社の製品では、POD、アルカリホスファターゼ (ALP) または蛍光色素に抗体のアミノ基またはスルフィドリル基 (-SH基) と反応する官能基が導入されているため、目的の抗体と混ぜるだけで抗体に酵素や蛍光色素を標識することができる (Fig. 11)。標識反応から精製までを限外ろ過膜を装着したチューブ内で行うことにより、約2時間で酵素および蛍光色素標識抗体を作製することが可能となった。高感度アッセイを達成するために二次抗体法を採用するのが一般的であるが、このシステムは一次抗体に直接酵素や蛍光色素を標識する一次抗体法である。そのためアッセイ時間を短縮することができ、加えて二次抗体法と同等の感度での検出が達成できた。当社では、POD、ALP、ピオチンおよび蛍光色素を抗体に標識する製品を取り揃えている。

VI. 試薬開発の今後

今後臨床分析は、微量成分を迅速に安定的に測定する技術開発が求められるであろう。微量成分を短時間で分析するために、測定の高感度化や酸化還元による電子の移動を電気化学的方法で検出する研究が進められている。本項では、現在当社で進めている、高感度免疫分析法の開発およびSMBG、CGMを見据えた電子メディエータの開発についてその一部を紹介する。

1. 高感度免疫分析法の開発

近年、がんの早期発見や治療のために、がん細

胞や免疫細胞などの細胞表面抗原を利用する研究が注目され活発化している。表面抗原の検出、すなわち細胞表面タンパクの特異的検出には、蛍光標識抗体を用いた方法が広く利用されているが、発現量の少ない表面抗原に対しては感度が足りず検出が困難となる。

野口らは、酵素リサイクリング反応により蛍光シグナルを増幅することで、高感度な検出を可能とするCLAMP (quinone methide-based catalyzed labeling for signal amplification) 法を開発した³⁶⁾。具体的には細胞表面タンパクに対する一次抗体、 β -ガラクトシダーゼ標識二次抗体および β -ガラクトシダーゼの蛍光基質 (4-methyl-8-fluoromethylumbelliferyl β -D-galactopyranoside: MUGF) を使用する (Fig. 12)。MUGFはガラクトース結合クマリン誘導体で細胞膜非透過性であり、 β -ガラクトシダーゼと反応し細胞膜透過性のキノンメチドに変換される。細胞膜を透過したキノンメチドは、細胞内に存在するタンパクのアミノ基やスルフィドリル基と結合することで細胞内に固定化され、青色蛍光を発する。MUGFと β -ガラクトシダーゼの連続的な反応により、生成したクマリン色素が細胞内に蓄積するため、高感度に抗原を検出することが可能となった。一例として、HepG2細胞を用い、 $\text{INF-}\gamma$ によって発現したprogrammed cell death ligand 1 (PD-L1)をCLAMP法とAlexa 405標識二次抗体法により染色した。結果をFig. 13に示す。PD-L1の発現量がわずかであるため、二次抗体法では感度不足によりPD-L1の発現が観察されなかったが、CLAMP法では観察された。このように、酵素リサイクリング反応による蛍光増幅により二次抗体法では不可能であった検出を可能にした。CLAMP法は微量の細胞表面抗原を検出する

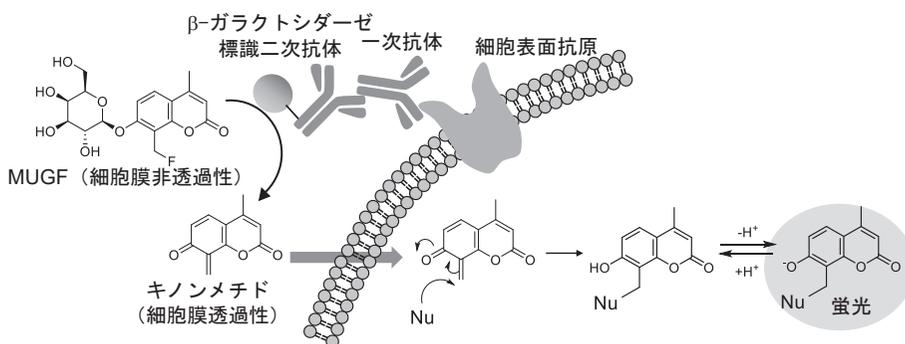
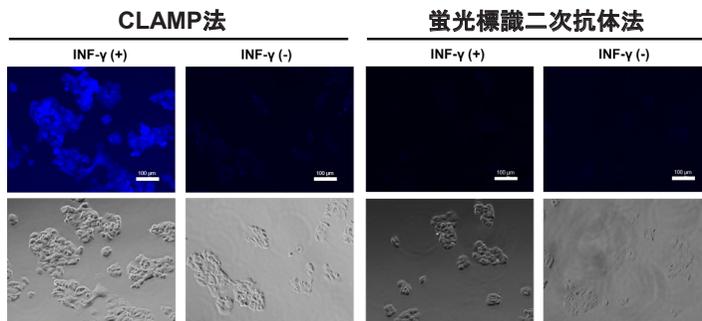


Fig. 12 CLAMP法の原理
MUGF: 4-methyl-8-fluoromethylumbelliferyl β -D-galactopyranoside, Nu: nucleophile



CLAMP法

一次抗体: 抗PD-L1抗体(ウサギ)
 二次抗体: β -gal標識-抗ウサギ抗体
 蛍光基質: galactose結合MUGF
 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X700
 DAPIフィルター (励起 360 nm(中心波長)/40 nm(バンド幅)、蛍光 460 nm(中心波長)/50 nm(バンド幅))

蛍光標識二次抗体法

一次抗体: 抗PD-L1抗体(ウサギ)
 二次抗体: Alexa405標識-抗ウサギ抗体

Fig. 13 CLAMP法と二次抗体法との比較

手法として、免疫染色やフローサイトメトリーでの使用が期待される。

2. 電子メディエータの開発

電子メディエータは、酸化還元反応で生じる電子の移動を仲介する物質で、IV項で説明したNADH-テトラゾリウム塩による比色検出や酵素-電極による検出等に採用されている。特に近年、SMBGやCGMといった血糖自己測定において、高性能な電子メディエータの開発が望まれている。特に現在の血糖値自己測定の主流であるSMBGは、色素法から電極を使う電気化学法へと進化

しており、 $1 \mu\text{L}$ の血液から数秒でグルコース濃度を検出することが可能となった。

電子メディエータとしてはジアホラーゼ、phenazine methosulfate (PMS)誘導体および金属錯体が汎用されている。当社では、PMSの光安定性を向上した1-methoxyphenazine methosulfate (1-methoxy PMS)を古くより販売してきた。しかし、1-methoxy PMSは中性-弱アルカリ性の溶液中では安定性が極端に低下することから、用事もしくは中性以下の溶液での調整が必要であった。

近年当社で開発した1-methoxyphenazine

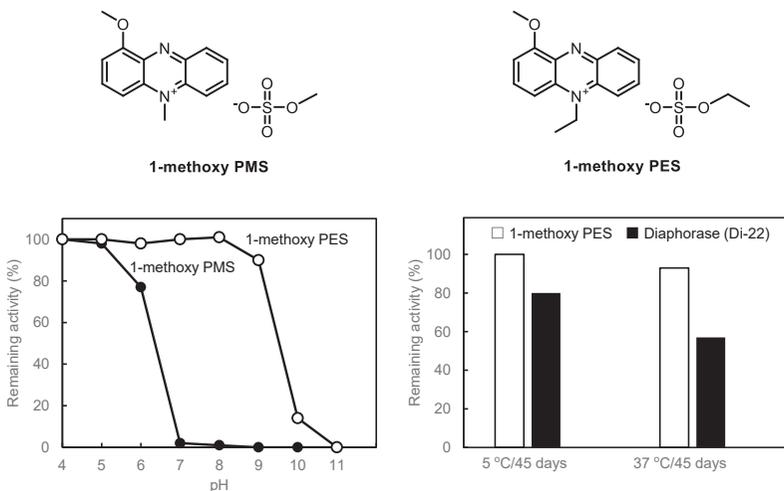


Fig. 14 1-methoxy PESの安定性

ethosulfate (1-methoxy PES)は、pH 9まで安定であり、pH 7のHEPES緩衝液中、37 °Cでの長期保存では、ジアホラーゼより安定であった (Fig. 14)。さらに酵素のアミノ基への標識を目的に、1-methoxy PESにスクシンイミジルエステル基を導入したAmine-reactive PESを開発した (Fig. 15)。畑田^{37,38)}、平賀³⁹⁾らはこの化合物を使ってメディエータ標識酸化還元酵素を作製し、グルコース、HbA1cおよび乳酸を電気化学法により測定した。電子メディエータを酵素に直接結合することで電子の授受をスムーズにすることができ、電極反応の効率を向上させた。今後、安定性の高い1-methoxy PESを使ったSMBG、CGM用バイオセンサーの開発が期待される。

VII. おわりに

昨今のAIやロボット技術の進歩は、私たちの生活様式を大きく変えようとしている。これまで人の手でやっていたことを、AIやロボットが代わりにしかも人より正確に行うようになると、そのうち人間にとって代わる可能性も十分に考えられる。医療・検査の分野でもロボットが手術をしたりAIが画像診断をするという話題が聞かれるようになってきた。

臨床検査の分野でも、同様に、検査室のロボット化やAI化への取り組みが始まっている。1970年代に生化学自動分析装置が開発され検査業務が効率化されてきたが、今後さらにロボットやAIを活用した検査の省力化および効率化が図

られると推測する。そのような中、検査技術(装置)の進歩に合わせて試薬も進化させていかなければならない。ハードである検査技術(装置)、システムとソフトである試薬がともに手を取り合い、互いにwin-winの関係になることで、臨床検査業界がさらに発展すると確信している。試薬は「縁の下の力持ち」で地味な存在であるが、検査の結果を大きく左右する重要な素材である。そのことを自覚した試薬開発を続けていきたい。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

文献

- 1) Keston AS: Abstracts of 129th Meeting Am. Chem. Soc., 31C, Dallas, 1956.
- 2) Teller JD: Abstracts of 130th Meeting Am. Chem. Soc., 69C, Atlantic City, 1956.
- 3) Trinder P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, 6: 24-27, 1969.
- 4) Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W and Fu PC: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 20: 470-475, 1974.
- 5) Pesce MA and Bodourian SH: Interference with the enzymatic measurement of cholesterol in serum by use of five reagent kits. *Clin. Chem.*, 23: 757-760, 1977.
- 6) Kabasakalian P, Kalliney S and Westcott A: Determination of uric acid in serum, with use of uricase and a

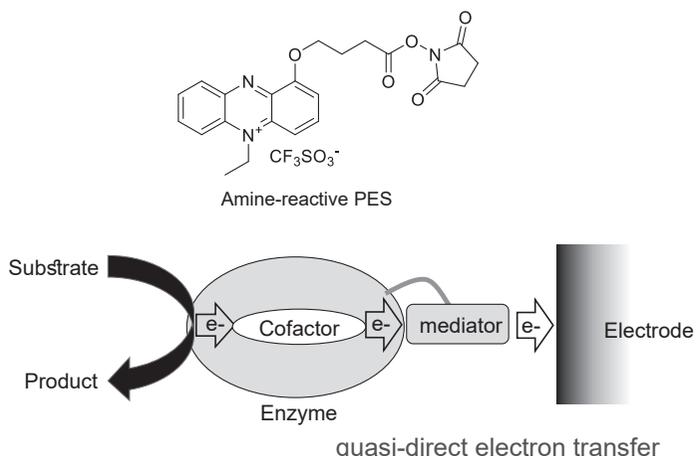


Fig. 15 Amine-reactive PES標識酵素による疑似的直接電子移動

- tribromophenol-aminoantipyrine chromogen. *Clin. Chem.*, 19: 522-524, 1973.
- 7) Fossati P, Prencipe L and Berti G: Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymatic assay of uric acid in serum and urine. *Clin. Chem.*, 26: 227-231, 1980.
 - 8) Mizuno K, Toyosato M, Yabumoto S, Tanimizu I and Hirakawa H: A new enzymatic method for colorimetric determination of free fatty acids. *Anal. Biochem.*, 108: 6-10, 1980.
 - 9) Gochman N and Schmitz JM: Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. *Clin. Chem.*, 17: 1154-1159, 1971.
 - 10) Rautela G and Liedtke RJ: Automated enzymatic measurement of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.*, 24: 108-114, 1978.
 - 11) Tamaoku K, Murao Y and Akiura K: New water-soluble hydrogen donors for the enzymatic spectrophotometric determination of hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta*, 136: 121-127, 1982.
 - 12) Tamaoku K, Ueno K, Akiura K and Ohkura Y: New water-soluble hydrogen donors for the enzymatic photometric determination of hydrogen peroxide. II. *N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)aniline derivatives.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 30: 2492-2497, 1982.
 - 13) 野口克也、渡辺栄治、石山宗孝: 臨床化学, 50: Supp. 1, 131, 2021.
 - 14) Pechmann HV and Runge P: Oxydation der formazylverbindungen. *Berichte*, 27: 323-324, 1894.
 - 15) Lakon G: Topographischer nachweis der keimfahigkeit der getreidefruchte durch tetrazolium salze. *Berichte*, 60: 299-305, 1942.
 - 16) Lederberg J: Detection of fermentative variants with tetrazolium. *J. Bacteriol.*, 56: 695., 1948.
 - 17) Laxminarayana H and Iya KK: Studies on the reduction of tetrazolium by lactic acid bacteria. I. Dye reducing activities of different species. *Indian J. Daily Sci.*, 6: 75-91, 1953.
 - 18) Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods*, 65: 55-63, 1983.
 - 19) Atkinson E, Melvin S and Fox SW: Some properties of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and several iodo derivatives. *Science*, 111: 385-387, 1950.
 - 20) Tsou KC, Cheng CS, Nachlas MM and Seligman AM: Syntheses of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.*, 78: 6139-6144, 1956.
 - 21) Sedar AW, Rosa CG and Tsou KC: Tetranitro-blue tetrazolium and the electron histochemistry of succinic dehydrogenase. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 506-508, 1962.
 - 22) Nachlas MM, Margulies SI and Seligman AM: Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinoxidase system. *J. Biol. Chem.*, 235: 2739-2743, 1960.
 - 23) Nachlas MM, Margulies SI, Goldberg JD and Seligman AM : The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.*, 1: 317-326, 1960.
 - 24) Babson AL and Phillips GE: A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta*, 12: 210-215, 1965.
 - 25) Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M and He PG: A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem. Pharm. Bull.*, 41: 1118-1122, 1993.
 - 26) Ishiyama M, Sasamoto K, Shiga M, Ohkura Y and Ueno K: Novel disulfonated tetrazolium salt that can be reduced to a water-soluble formazan and its application to the assay of lactate dehydrogenase. *Analyst*, 120: 113-116, 1995.
 - 27) Ishiyama M, Miyazono Y, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y and Ueno K: Benzothiazole-containing tetrazolium salts that produce water-soluble formazan dyes absorbing at a long wavelength upon NADH reduction. *Anal. Sci.*, 12: 515-519, 1996.
 - 28) Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y and Ueno K: A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44: 1299-1305, 1997.
 - 29) Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K and Watanabe M: A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.*, 36: 47-50, 1999.
 - 30) Tsukatani T, Suenaga H, Higuchi T, Akao T, Ishiyama M, Ezoe K and Matsumoto K: Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *J. Microbiol. Methods*, 75: 109-116, 2008.
 - 31) Tsukatani T, Higuchi T, Suenaga H, Akao T, Ishiyama M, Ezoe T and Matsumoto K: Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Anal. Biochem.*, 393: 117-125, 2009.
 - 32) Ukeda H, Kawana D, Maeda S and Sawamura M:

- Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 485-488, 1999.
- 33) Cushman DW and Cheung HS: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, 20: 1637-1648, 1971.
- 34) Lam LH, Shimamura T, Sakaguchi K, Noguchi K, Ishiyama M, Fujimura Y and Ukeda H: Assay of angiotensin I-converting enzyme-inhibiting activity based on the detection of 3-hydroxybutyric acid. *Anal. Biochem.*, 364: 104-111, 2007.
- 35) Lam LH, Shimamura T, Manabe S, Ishiyama M and Ukeda H: Assay of angiotensin I-converting enzyme-inhibiting activity based on the detection of 3-hydroxybutyrate with water-soluble tetrazolium salt. *Anal. Sci.*, 24: 1057-1060, 2008.
- 36) Noguchi K, Shimomura T, Ohuchi Y, Ishiyama M, Shiga M, Mori T, Katayama Y and Ueno Y: β Galactosidase-Catalyzed Fluorescent Reporter Labeling of Living Cells for Sensitive Detection of Cell Surface Antigens. *Bioconjugate Chem.*, 31: 1740-1744, 2020.
- 37) Hatada M, Loew N, Takahashi YI, Shimazaki JO, Tsugawa W, Mulchandani A and Sode K: Development of a glucose sensor employing quick and easy modification method with mediator for altering electron acceptor preference. *Bioelectrochemistry*, 121: 185-190, 2018.
- 38) Hatada M, Saito S, Yonehara S, Tsugawa W, Asano R, Ikebukuro K and Sode K: Development of glycosylated peptide enzyme sensor based flow injection analysis system for haemoglobin A1c monitoring using quasi-direct electron transfer type engineered fructosyl peptide oxidase. *Biosens. Bioelectron.*, 177: 112984, 2021.
- 39) Hiraka K, Kojima K, Tsugawa W, Asano R, Ikebukuro K and Sode K: Rational engineering of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase for the mediator modification to achieve quasi-direct electron transfer type lactate sensor. *Biosens. Bioelectron.*, 151: 111974, 2020.