

産業用酵素の展開

－糖尿病マーカーの測定に用いる酵素法について－

Development of Industrial Enzymes

－ Various Kinds of Enzymatic Measurement Methods for Diabetic Markers －

白兼 孝雄

Shirokane Yoshio

産業用酵素は、食品工業、化学工業、医療分野などで広範囲にわたって利用されている。近年、酵素の特異性を活用して簡便迅速で精度の高い有用成分の分析法が多数開発されているが、臨床検査の分野でも、生活習慣病のひとつである糖尿病を診断するマーカーの測定に酵素法が採用されている。

Industrial enzymes have been made extensive use in the food industry, the chemical industry, the medical fields and so forth. Nowadays a lot of simple, rapid and accurate methods utilizing the specific enzymes have been developed for the measurement of useful components, and the enzymatic methods are smoothly applied to the measurement of markers of diabetes which is one of lifestyle related diseases in the field of clinical examination.

キーワード：産業用酵素，糖尿病マーカー，酵素法，生活習慣病，血糖，HbA_{1c}

1 はじめに

酵素とは、生命の維持や活動に不可欠な触媒機能を持った蛋白質の一種である。多種多様な酵素は、国際生化学分子生物学連合の酵素委員会によって、反応特異性と基質特異性の違いにより系統的に分類され、酵素の名前（系統名と常用名）も同時に命名されて、EC 番号（酵素番号, Enzyme Commission numbers）(EC X.X.X.X) が以下のように与えられている（Xは数字）。

- EC 1.X.X.X - 酸化還元酵素(oxidoreductase)
- EC 2.X.X.X - 転移酵素(transferase)
- EC 3.X.X.X - 加水分解酵素(hydrolase)
- EC 4.X.X.X - 脱離酵素(lyase)
- EC 5.X.X.X - 異性化酵素(isomerase)
- EC 6.X.X.X - リガーゼ（合成酵素）(ligase)

一方、産業界で使用される酵素¹⁾は、表1（引

用文献1より作成）に示すように用途別に分類することができる。これらの産業用酵素は、食品工業、醸造工業、化学工業、製薬工業、日用品・医療分野などで広範囲にわたって利用されている。

例えば、デンプン分解酵素と糖質関連酵素を組み合わせてブドウ糖果糖液糖を製造する工程が開発されているし、アミノ酸関連酵素を利用して光学分割によるL-アミノ酸の製造もできる。核酸関連化合物に関する酵素は、遺伝子工学関連試薬として用いられている。また、酵素の特異性を活用して簡便迅速で精度の高い有用成分の分析法が多数開発されているが、その中でも臨床検査の分野²⁾では、種々の疾患を簡便迅速に診断する臨床検査薬が市販されている。

2008年4月より新しく導入された特定健康診査及び特定保健指導（いわゆるメタボ健診）は、糖尿病や脂質異常症、高血圧症などの生活習慣病

表1 産業用酵素の用途別分類

酵素の用途別分類	代表的な用途
デンプン分解酵素	水飴・マルトース・グルコースの製造、糊抜き、消化剤
糖質関連酵素	ブドウ糖果糖液糖・機能性オリゴ糖・甘味料の製造、トレハロース・サイクロデキストリンの製造
タンパク質関連酵素	調味料・チーズの製造、食肉軟化剤、洗剤、血栓溶解剤、甘味料・ペプチドの合成、タンパク質の架橋
アミノ酸関連酵素	L-アミノの製造、L-アスパラギン酸・L-アラニンの製造、医薬品原料・L-システイン・D-アミノ酸の合成
核酸関連化合物に関する酵素	5'-イノシン酸・5'-グアニル酸の製造、医薬品原料の合成、遺伝子工学関連試薬
脂質関連酵素	油脂・乳製品の加工、消化剤、洗剤、エステル交換反応、臨床分析
セルラーゼ	バイオマスの活用、洗剤、繊維生地の改良
臨床分析（診断）用酵素	コレステロール・グルコース・尿酸・中性脂肪・クレアチニン・ポリアミン・シアル酸の定量
抗生物質の生産に使用される酵素	抗生物質の原料（6-アミノペニシラン酸、7-アミノセファロsporin酸）の製造
有用化学品の合成に使用される酵素	アクリルアミド・ニコチン酸アミド・D-バントテン酸中間体の製造
その他の酵素	過酸化水素の除去、フィチン酸のリン酸の脱離、尿素の分解

の発症や重症化を予防することを目的として行われているが、本稿では、特に関心が高い糖尿病に着目し、主要な糖尿病マーカーの酵素学的測定技術について解説する。

2 主要な糖尿病マーカー

特定健康診査では、空腹時血糖 (GLU)、尿糖 (U-GLU) およびグリコヘモグロビン (HbA_{1c}) が糖尿病の検査項目になっているが、その他の主要な糖尿病マーカーとして、尿中ミオイノシトール (MI)、1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (1,5-AG) およびグリコアルブミン (GA) が挙げられる(表 2)(著者作成)。これらの糖尿病マーカーは、血糖コントロール反映時期が異なるため、糖尿病患者の現時点から約 2 カ月前の血糖コントロールの指標として有用である。

表 2 主要な糖尿病マーカーの血糖コントロール反映時期

糖尿病マーカー	検体	血糖コントロール反映時期	基準範囲
血糖 (GLU)	血液	—	70~109 mg/dl
尿糖 (U-GLU)	尿	—	陰性 (定性検査)
尿中ミオイノシトール (MI)	尿	現時点	10 mg/g・Cr 未満
1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (1,5-AG)	血液	直近数日間の平均	14 μg/ml 以上
グリコアルブミン (GA)	血液	過去 2~3 週間の平均	11~16 %
グリコヘモグロビン (HbA _{1c})	血液	過去 1~2 カ月間の平均	4.6~6.2 % (*)

(*) 国際標準値 (NGSP 値)

臨床検査の分野では、以前より化学法や各種クロマトグラフィーなどによる分離分析法が実施されてきたが、近年は、簡便性、迅速性、正確性および多数検体の測定を目的として、酵素法および免疫法が汎用されている。表 2 に示す糖尿病マーカーの測定では、酵素の特異性を活用した簡便迅速で精度の高い酵素法がそれぞれ開発されている。

3 糖尿病マーカー測定の酵素法

3.1 血糖 (GLU) 測定の酵素法

GLU は、高血糖の疾患である糖尿病の有無、その治療や管理のマーカーとして欠かせないことから、患者用の SMBG (Self-Monitoring of Blood Glucose, 血糖自己測定) 機器、ベッドサイド

検査用の POCT (Point of Care Testing) 機器および臨床検査室用の自動分析装置が用途別に開発されている³⁾。

医療機関などの検査室で日常検査に用いられている測定法は、日本では大部分が静脈血漿を測定試料とした自動分析法 (ヘキソキナーゼ [HK]-グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ [G6PD] 法) であるが、SMBG 機器では、表 3 (著者作成) に示すように 3 通りの方法 (酵素電極法) が使用されている³⁾。

従来のグルコースオキシダーゼ (GOD) 法では、グルコース特異性は高いが、血液中の酸素分圧が高いほど血糖値が低く測定されるという問題点があった。この酸素分圧の影響を回避するために、PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQ-GDH) 法が開発されたが、PQQ-GDH はグルコース特異性が低く、輸液に用いられるマルトースに反応するため血糖値が実際よりも高く測定される問題点が残った。それぞれの問題点を解決するために、血液中の酸素分圧の影響を受けないという特性およびマルトースに反応しないという基質特異性を併せ持つ糸状菌が産生する酸素を電子受容体としないフラビン酵素が見いだされ、FAD 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (FAD-GDH) 法が開発された⁴⁾。

血液中の酸素分圧の影響を受けない特性、基質特異性および酵素安定性などに優れた FAD-GDH 法が、今後の SMBG 機器の主流になるものと思われる。

3.2 尿中ミオイノシトール (MI) 測定の酵素法

MI は、D-グルコースと類似の構造を持つ糖アルコールであり、食後あるいは糖負荷後の高血糖状態を反映し尿中に排出されるが、糖負荷後の尿中 MI を測定することにより、耐糖能異常 (前糖尿病)、すなわち空腹時血糖だけでは分からない「かくれ糖尿病」を検出することができる⁵⁾。

表 3 SMBG 機器に使用されている酵素電極法およびその特徴

酵素電極法	測定原理	特徴
グルコースオキシダーゼ (GOD) 法	GOD D-グルコース + 2[Fe(CN) ₆] ³⁻ → D-グルコノラクトン + 2[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 2[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ → 2[Fe(CN) ₆] ³⁻ + 2e ⁻	グルコース特異性が高い 酸素分圧の影響あり
PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQ-GDH) 法	GDH D-グルコース + 2[Fe(CN) ₆] ³⁻ → D-グルコノラクトン + 2[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 2[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ → 2[Fe(CN) ₆] ³⁻ + 2e ⁻	グルコース特異性が低い 酸素分圧の影響なし
FAD 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (FAD-GDH) 法		グルコース特異性が高い 酸素分圧の影響なし

従来、MI 測定には、GC/MS などの煩雑な装置が必要であったが、図 1 に示すように、MI に対する特異性の高いミオイノシトールデヒドロゲナーゼ (MIDH) を用いる酵素サイクリング法⁵⁾が開発され、一般的な生化学自動分析装置に適用可能となった。

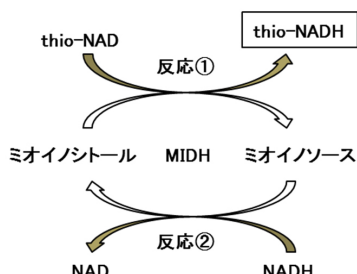


図 1 MIDH によるミオイノシトールのサイクリング反応⁵⁾

反応①と反応②を MIDH の働きを利用してサイクリングさせることにより生成する thio-NADH の増加速度は、MI 濃度に依存することから、thio-NADH の特異的な波長 405 nm の吸光度変化を測定し、MI 濃度を定量する。なお、検体中のグルコースはヘキソキナーゼによりあらかじめ消去される。

3.3 1,5- アンヒドロ-D- グルシトール (1,5-AG) 測定の酵素法

1,5-AG は、D- グルコースとは 1 位の水酸基の有無だけが異なる環状ポリオールであり、糖尿病の発症により D- グルコースが尿中に排泄されるようになると、1,5-AG は著しく体内から失われて、血液中の濃度が低下することが明らかになっている。従って、1,5-AG の経時的測定により直近数日間の血糖コントロール状態が明確に示されるため、治療効果や患者の状態の迅速な把握にきわめて有用な検査項目である⁶⁾。

1,5-AG の測定法として、GC 法、HPLC 法および酵素法があるが、近年はほとんどの施設において 2 通りの酵素法が採用されている(表 4)(著者作成)。

ピラノースオキシダーゼ (PROD) 法では、検体中のグルコースをグルコキナーゼによりあらかじめ消去し、1,5-AG を特異的に測定する。一方、1,5- アンヒドログルシトール-6- リン酸デヒドロゲナーゼ (AG6PDH) 法は、1,5-AG に

特異的な ADP 依存性ヘキソキナーゼ(ADP-HK) および AG6PDH を使用する方法である。

表 4 1,5- アンヒドロ-D- グルシトール (1,5-AG) の測定法

測定法	測定原理
ピラノースオキシダーゼ (PROD) 法	$1,5-AG + O_2 \xrightarrow{PROD} 2\text{-dehydro-}1,5-AG + H_2O_2$ $H_2O_2 + 4\text{-AAP} + \text{TOOS} \xrightarrow{POD} \text{COLOR}$
1,5- アンヒドログルシトール-6- リン酸デヒドロゲナーゼ (AG6PDH) 法	$1,5-AG + ADP \xrightarrow{ADP\text{-}HK} 1,5-AG\text{-}6\text{-}P + AMP$ $1,5-AG\text{-}6\text{-}P + NADP^+ \xrightarrow{AG6PDH} C_6H_{11}O_6P + NADPH + H^+$ $NADPH + \text{WST-1} \xrightarrow{DIP} NADP^+ + \text{Hormazan dye}$

(略号) PROD : Pyranose oxidase POD : Peroxidase
 ADP-HK : ADP-dependent hexokinase
 AG6PDH : 1,5-Anhydroglucitol-6-phosphate dehydrogenase
 DIP : Diaphorase
 (PROD 法) ラナ®1,5AG オート リキッド 添付文書より
 (AG6PDH 法) デタミネー L 1,5-AG 添付文書より

3.4 グリコアルブミン (GA) 測定の酵素法

GA は、血清アルブミンの糖化産物であり、アルブミン分子内の 4 カ所のリジン残基が主にグリケーションを受ける。GA レベルは、過去約 2 ~3 週間の血糖コントロール状態を知るための指標として利用されている⁷⁾。

GA の測定法としては、HPLC 法、免疫法および酵素法があるが、現在本邦の臨床検査で用いられているのはほぼ総て酵素法⁷⁾(図 2)であり、3 段階の測定系よりなっている。

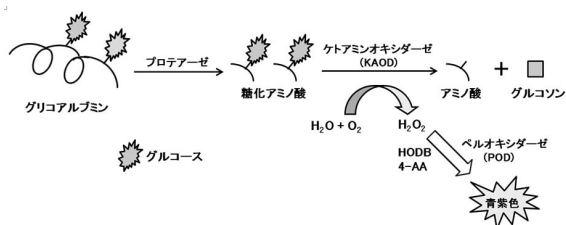


図 2 GA 酵素法の反応原理⁷⁾

まず GA をプロテアーゼで分解し、糖化アミノ酸を得る。この糖化アミノ酸をケトアミノオキシダーゼ (KAOD) で酸化すると、アミノ酸とグルコソニンに分解される。この際に発生した糖化アミノ酸と当モルの過酸化水素を測定し、GA 濃度を求める。なお、検体中の糖化アミノ酸は KAOD によりあらかじめ消去される。同一検体の総アルブミンを同時に測定し、GA / 総アルブミン × 100 で GA 値 (%) を表示する。

3.5 グリコヘモグロビン (HbA_{1c}) 測定の酵素法

HbA_{1c} は、赤血球中のヘモグロビン (Hb)

($\alpha_2\beta_2$ の四量体構造) のうち、 β 鎖の N 末端に位置するバリン残基が糖化されたものである。HbA_{1c} レベルは、糖尿病の管理における過去 1~2 カ月間の血糖コントロールを反映するきわめて有用な指標である。

HbA_{1c} の測定法としては、臨床検査センターを中心に HPLC を用いない方法が普及しており、免疫法あるいは酵素法⁸⁾(図 3) が利用されている。

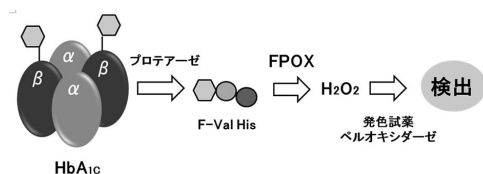


図 3 FPOX を用いた HbA_{1c} 測定概略図⁸⁾

HbA_{1c} 測定の酵素法は、GA 酵素法と同様に 3 段階の測定系よりなっている。まず HbA_{1c} をプロテアーゼで分解し、Hb β 鎖の N 末端から遊離した糖化ジペプチド (F-ValHis) は、糸状菌由来の新規酵素であるフルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX) の作用によって、ジペプチドとグルコソンに分解される。この際に発生した糖化ジペプチドと当モルの過酸化水素を測定し HbA_{1c} 濃度を求める。同一検体の総ヘモグロビンを同時に測定し、HbA_{1c} / 総ヘモグロビン \times 100 で HbA_{1c} 値 (%) を表示する。

4 おわりに

臨床検査分野における糖尿病マーカーの酵素学的測定技術について解説したが、これらの酵素法には、以下のような技術的な特徴がある。

(1) GLU の測定では、SMBG 機器用の新規な FAD-GDH 法が開発され、高精度の測定結果が得られるようになって自己管理が容易になった。

(2) 尿中 MI の測定では、酵素の特異性を活かした高感度の酵素サイクリング法が開発された。また、1,5-AG の測定では、1,5-AG に特異的な酵素を利用することにより、正確な測定が可能になった。

(3) GA や HbA_{1c} の測定では、特異的なプロテアーゼ及びオキシダーゼの組み合わせにより、新規な酵素法が構築された。

糖尿病の血糖コントロールの評価において、HbA_{1c} がゴールドスタンダード (平均血糖値を

推定する有用な臨床検査指標) として用いられているが、GA や 1,5-AG といった検査項目も、血糖変動の推移をより精密に評価し、質の高い糖尿病診療の実現に寄与している⁹⁾。

なお、FAD-GDH および FPOX の実用化に対して、それぞれ農芸化学技術賞⁴⁾ および生物工芸技術賞⁸⁾ が授与されている。今後も、新規酵素と新規技術の開発とが相俟って、産業用酵素の用途が多方面に広がることを切望する。

<引用文献>

- 1) 中森茂：技術の系統化調査報告 第 14 集、酵素の生産と利用技術の系統化 3, pp.139-184, 国立科学博物館 産業技術史資料情報センター, 2009
- 2) 高木正道監修/池田友久編集代表：新バイオの扉—未来を拓く生物工学の世界—, pp.35-42, 裳華房, 2013
- 3) 桑克彦：SMBG と POCT, 月刊糖尿病, 4 (13), pp.78-87, 2012
- 4) 中南貴裕ほか：FAD グルコース脱水素酵素の発見と、それを応用した新規血糖値センサの開発, 日本農芸化学会 2011 年度受賞講演要旨集, pp.14-16, 2011
- 5) 山縣文夫ほか：新しい耐糖能異常 (前糖尿病) 検出マーカー：尿中ミオイノシトールの有用性, モダンメディア, 54 (9), pp.259-265, 2008
- 6) 藪内正彦ほか：新しい糖尿病マーカー—1,5-アンヒドログルシトール—, ファルマシア, 26 (3), pp.221-225, 1990
- 7) 島健二：グリコアルブミン, 月刊糖尿病, 1 (2), pp.145-153, 2009
- 8) 五味恵子ほか：新規フルクトシルペプチドオキシダーゼの開発とそれを用いた糖尿病診断法の構築, 生物工学会誌, 92 (2), pp.62-68, 2014
- 9) 目黒周：HbA_{1c}, グリコアルブミン, 1,5-AG の使い分け, 月刊糖尿病, 4 (13), pp.43-50, 2012

<参考文献>

- 10) 金井正光監修：臨床検査法提要 (改訂第 33 版), 第 6 章 臨床化学検査, pp.440-452, 2010

白兼 孝雄 (しろかね よしお)
技術士 (生物工学部門)

白兼技術士事務所 代表
博士 (工学)
e-mail : shiny4@y4.dion.ne.jp

