

●原 著

グルコースオキシダーゼ法による血糖測定値に及ぼす
酸素分圧の影響

野原 敦* 湯佐 祚子*** 砂川 昌秀*

高気圧酸素治療中には、糖尿病患者において血糖の低下がみられるとの報告がされている。我々は、グルコースオキシダーゼ法 (GOD) を用いた際の血糖値に対する酸素分圧の干渉の可能性を酸素分圧の干渉を受けないヘキソキナーゼ法 (HK) を基準として比較検討した。

In vitro における実験では、高気圧下と大気圧下で酸素によりトノメートした2種のグルコース溶液 (120と220mg/dl) を GOD 法と HK 法で測定し、同時に酸素分圧の測定を行った。In vivo における実験では、高気圧酸素療法下と一般的麻酔下における患者の動静脈血を用いて in vitro の際と同様の測定を行った。

In vitro の実験の結果として、高気圧酸素療法2.0ATA 下におけるグルコース溶液の測定では GOD 法では HK 法よりも有意な低値 ($P < 0.001$) を示した。In vivo の実験では、GOD 法と HK 法の血糖値の差は、酸素分圧の上昇に伴い指数関数的に増加した。

これらの結果、GOD 法による血糖測定値に及ぼす酸素分圧の影響が示唆された。高い酸素分圧の血液検体における GOD 法による血糖値測定には十分な注意が必要である。

キーワード：酸素分圧，血糖値，高気圧酸素，グルコースオキシダーゼ法，ヘキソキナーゼ法

Effect of PO₂ on blood glucose values measured by glucose-oxidase method

Atsushi Nohara*, Toshiko Yusa***, Masahide Sunagawa*

Department of Hyperbaric Medicine* and Anesthesiology**, University of the Ryukyus, Faculty of medicine

There are conflicting reports concerning effects of hyperbaric oxygen (HBO) on blood glucose concentration. We examined the possibility of interference of PO₂ with blood glucose (BG) value associated with glucose-oxidase method (GOD), comparing with hexokinase method (HK). In vitro, two glucose solutions (120 and 220 mg/dl) were tonometered with oxygen at atmospheric and hyperbaric pressure, and measured glucose concentrations by GOD and HK along with PO₂ measurement. In vivo, glucose concen-

trations were measured on arterial and venous blood obtained from patients under HBO therapy and general anesthesia, as same as in vitro. At 2.0 ATA of HBO, BG values of glucose solution measured by GOD were lower than those by HK, significantly ($p < 0.001$). The differences of BG values between HK and GOD obtained from patients were increased exponentially as a function of PO₂. These results indicate that BG values measured by GOD on blood samples with high PO₂ are underestimated, because of the effect of PO₂ on BG measurement by GOD.

Keywords :

Oxygen partial pressure
Blood glucose concentration
Hyperbaric oxygen
Glucose oxydase method
Hexokinase method

*琉球大学医学部附属病院高気圧治療部

**琉球大学医学部麻酔科学教室

はじめに

高気圧環境下では血糖の変動がみられ、又、糖尿病患者では高気圧酸素治療中に、血糖に低下がみられると報告されている¹⁾²⁾。現在、多くの施設で血糖の測定法として、グルコースオキシダーゼ法 (GOD 法) とヘキソキナーゼ法 (HK 法) が、一般的な検査機器また、簡易的測定法に利用されている。この内、グルコースオキシダーゼ法は、検体の溶存酸素により影響を受けるとの報告がある³⁾⁻⁵⁾。従って我々は、検体中の酸素分圧が、GOD 法でのグルコース測定値に与える影響を酸素分圧の干渉を受けない HK 法を基準として比較検討を行ったので報告する。

方 法

血糖測定に使用した機種は、汎用大型機種として GOD 法では BECKMAN 社の ASTRA8, HK 法としては、DUPONT 社の acaV を用いた。簡易的測定法としては、GOD 法では京都第一科学のトーエコー、GT1610を用い、HK 法としては ames 社の TIDE を使用した。酸素分圧測定には Radimeter 社の ABL300 を使用した。

1) in vitro 実験：燐酸緩衝液 (pH7.3~7.4) に溶かした様々の濃度のグルコース液を用いて、大気圧下で汎用大型機種及び簡易的機種の測定値の比較を行った。その後、大気圧下及び高気圧下において、120と220mg/dl のグルコース溶液に酸素で毎分7ℓで10分間バブリングを行い、酸素分圧によるグルコース濃度の変化を GOD 法及び HK 法で測定し比較した。統計的検討は student's t-test で行った。

2) in vivo 実験：高気圧酸素治療時及び、手術中患者の動静脈血を使用し、酸素分圧測定とグルコース濃度を簡易的測定により測定し、酸素分圧に対するグルコース濃度の関係を GOD 法と HK 法で検討した。

結 果

1) 大気圧下において、比較する機種同士の測定値の関係を求めた結果、汎用大型機種の BECKMAN と DUPONT では値はほぼ一致しており、 $r=0.99$ と高い相関が得られた (図 1 a)。同様に、簡易的測定法でも値はほぼ一致しており、 $r=0.99$

と高い相関が得られた (図 1 b)。

2) 大気圧下において、低濃度と高濃度に調整したグルコース液に、バブリングを行った後の、HK 法と GOD 法の比較では、①汎用大型機種での HK 法では酸素分圧による影響は殆どみられないが (図 2 a), GOD 法では酸素分圧の上昇と共に測定値が緩やかに低下していく傾向がみられた。酸素分圧が約700mmHg 付近では低濃度グルコース液で約11%、高濃度グルコース液で約6%の低値を示した (図 2 b)。

②簡易的測定による比較では HK 法では汎用大型機種と同様に酸素分圧による影響はみられなかったが (図 3 a), GOD 固定化酵素電極法では先の比較と同様に酸素分圧の上昇と共に値の低下がみられた。この場合は、酸素分圧が約700mmHg 付近で、低濃度の液で約12%、高濃度の液で約46%の低値を示した (図 3 b)。

③2気圧下で酸素のバブリングを同様にを行い、同一サンプルで GOD 法と HK 法を比較した結果、低濃度グルコース溶液 (120mg/dl) では HK 法では平均129mg/dl, GOD 法では平均78mg/dl で、GOD 法が有意な低下を示した ($P<0.001$) (図 4)。高濃度グルコース溶液でも同様に HK 法で平均230mg/dl, GOD 法では平均209mg/dl で、有意な低下 ($P<0.001$) を示した (図 5)。

手術中の患者の動静脈血及び高気圧酸素治療時の患者の静脈血 (全血) を、簡易法で測定したグルコース値と Po_2 の関係を図 6 に示した。横軸に酸素分圧をとり、縦軸に HK 法と GOD 法の差をとったものであるが、酸素分圧がほぼ静脈血と等しい30から40mmHg の範囲では、その差は0に近いが、酸素分圧が高くなるほど GOD 法と HK 法との値の差は指数関数的に上昇した (HK 法と GOD 法の差 = $35.54 \log Po_2 - 49.50$)。最大で40 mg/dl の差があった。

考 察

酸素電極を用いて GOD の存在下で、溶存する酸素の消費率よりグルコースの量を少量の検体で迅速に測定することが可能となり⁶⁾、以来臨床応用されている。しかし、この方法の問題点として、サンプル中の溶存酸素の量によってグルコース値が著しく変化する事があげられる。

酵素反応で消費される酸素を測定する方法は、

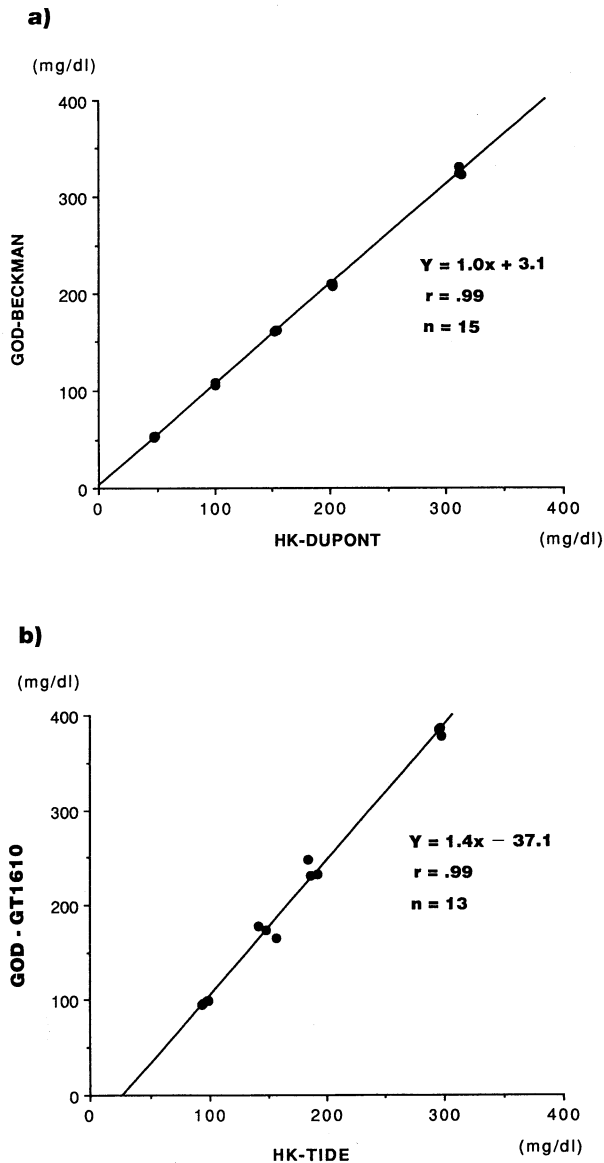


図1 グルコース測定機種間の相関

a : 汎用大型機, b : 簡易型測定器

反応開始から終了までの消費量を測定する方法と反応の初速度を酸素消費率で測定する方法があり、この際に発生する過酸化水素からの二次的な酸素の生成を防ぐための工夫がなされている⁷⁾。即ち、牧野らは、Catalaseと酸素化したヘモグロビンの影響を阻止するため、シアンカリとフェリシアンカリを添加して、GODによりブドウ糖を酸

化し、酸素電極を利用し溶存酸素の減少から血中ブドウ糖濃度を測定している⁸⁾。梶原らは酸素電極を用いて、Catalaseを添加し、グルコース濃度と酸素消費量をみている⁹⁾。八島らは、BeckmanのGlucose Analyzerについて、Glucose Analyzer法では酸素の消費を測定するため、過酸化物が酸素を発生しないように、Catalaseと沃素、モ

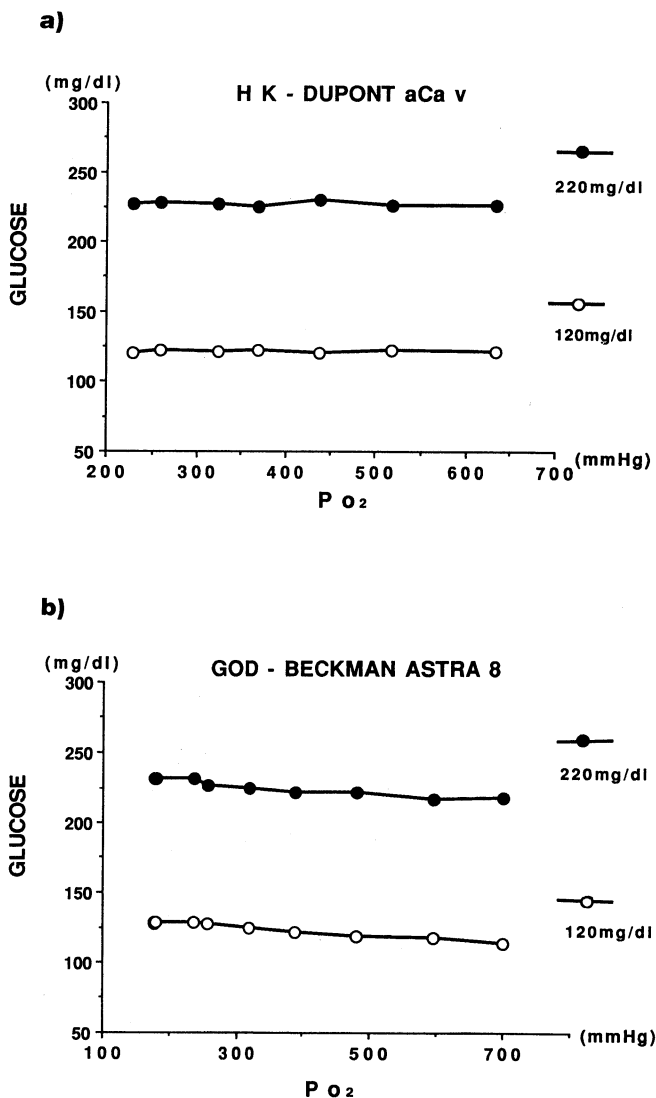


図2 グルコース測定値に対する酸素分圧の影響 (汎用大型機種)
a : HK 法, b : GOD 法

リブデン酸塩の添加による酸素発生を阻止と過酸化水の分解を報告している¹⁰⁾。このように GOD 法は開発当時から酸素の影響という問題を抱えている。この他に GOD 反応によって生成した過酸化水素を白金と銀を利用した過酸化水素電極により定量する方法もある⁷⁾。しかし、高速液体クロマトグラフィーで使用される電気化学的検出においても、電極での酸化還元反応の際、移動相中或いはサンプル中の溶存酸素はバックグラウンド電流

及び直接測定値に対して大きな影響を及ぼすため、溶存酸素の除去法等も考えられている¹¹⁾。

GOD 法において高分圧酸素下で血糖の測定値に低下がみられた原因として、ASTRA8 に用いられている方法では、酸素電極により溶存する酸素の消費率からグルコース測定値をだしているためと考えられた。

我々が使用した簡易法である GT1610 による測定法は、GOD 固定化酵素電極法だが測定値低下に

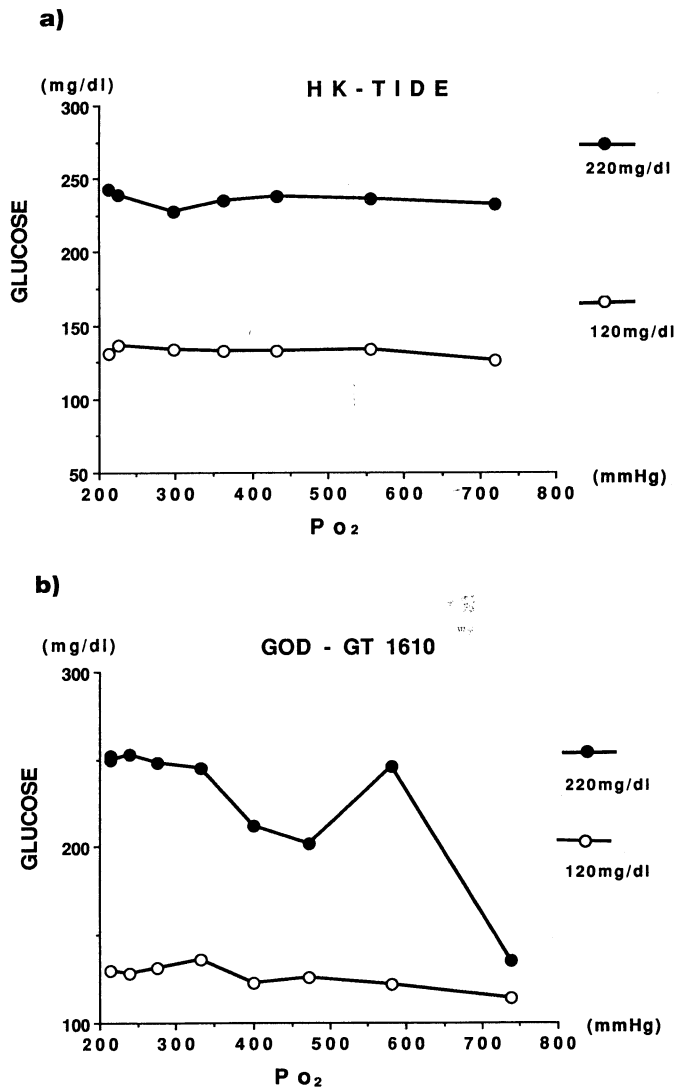


図3 グルコース測定値に対する酸素分圧の影響 (簡易小型測定器)
a : HK 法, b : GOD 法

は2つの原因が考えられる。第一にメディエーターとしてフェリシアン化カリウムが加えられているが、GOD反応時に溶存する酸素が多い場合、過酸化水素生成反応が起きやすくなること、第二に、検量線が酸素分圧の低い静脈血に設定されていることが原因として推測される。児玉らの行った固定化酵素電極法の評価においても、酸素分圧が高いと推測された検体で測定値が低値を示し、その原因として原理的に酸素分圧が高いほど感度が抑

制される特性があるとしている³⁾。したがって、グルコースオキシダーゼ電極法においては、溶存する酸素のため、高い変化を示すのは重要な問題である⁴⁾。

幸野らはGOD法の簡易測定法においてヘパリンを加えた静脈全血に酸素を通気して時間ごとに測定を行った結果、酸素分圧が、60mmHgから200mmHgの間で最大で38%程の低下を示したと報告している⁵⁾。彼らは同様にHK法の簡易的血

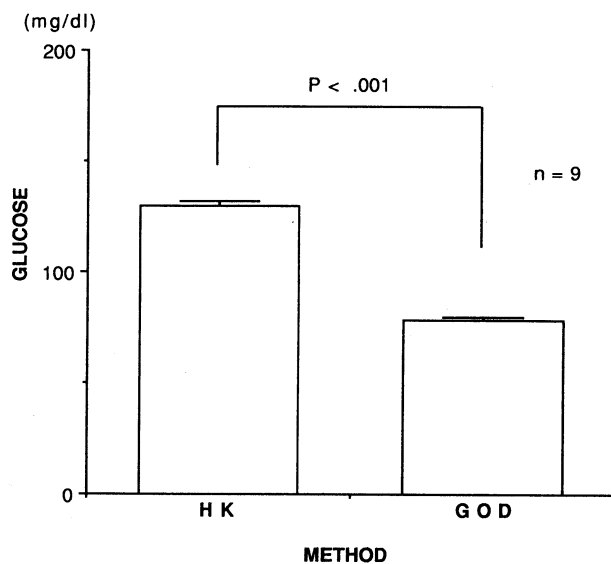


図4 グルコース測定値に及ぼす高気圧(2.0絶対気圧)下、高分圧酸素の影響
低濃度(120mg/dl)グルコース液使用時のHK法とGOD法の比較。

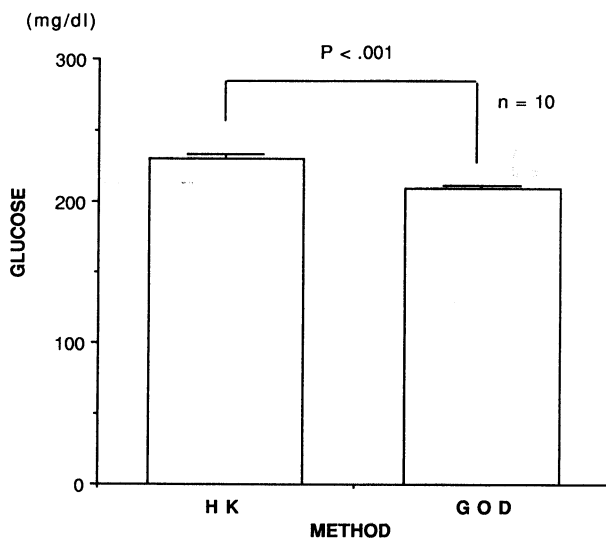


図5 グルコース測定値に及ぼす高気圧(2.0絶対気圧)下、高分圧酸素の影響
高濃度(220mg/dl)グルコース液使用時のHK法とGOD法の比較。

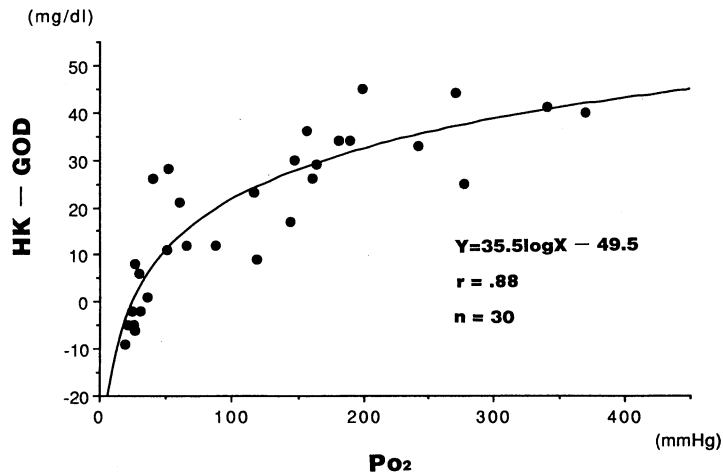


図6 酸素分圧とHK法及びGOD法によるグルコース測定値の差の関係 (in vivoでの測定)

糖測定器についての検討も行っており、その結果では同様の分圧間でも酸素分圧によって変化はみられなかったとしている¹²⁾。この結果は今回の我々の結果と一致するものである。Shaferらも、高気圧環境下での低血糖反応を検査法の視点から観察し、finger stickタイプの4つの機種でグルコースを測定し、大気圧下と2.4絶対気圧下で低濃度と高濃度の液の比較を行い、その結果、end point法よりも反応率をみた方法が良好であったとしている¹³⁾。

高気圧酸素治療時の静脈血酸素分圧は200 mmHgをはるかに超える。我々は今回、in vitroで700 mmHg、in vivo静脈血で約400 mmHgまでの酸素分圧での測定を行ったが、高気圧酸素環境下動脈血ではそれを上回る分圧となるため、測定値に与える影響はさらに大きくなると推測された。

高気圧酸素療法の適応疾患には、原疾患として糖尿病を持つ患者に合併するものが多く、糖尿病に対する高分圧酸素の影響の解明は临床上重要である²⁾。押田らは、糖尿病患者では高気圧酸素環境下において、有意な血糖の低下がみられると報告している。即ち高気圧治療中 chamber内で血糖値連続測定装置により血糖を測定し、時間の経過とともに測定値の減少がみられている。しかし、HBO終了後、インシュリンや経口剤の減量が必

要になった例はなく、この現象は高気圧酸素環境下のみ限定されると推定し、各種ホルモンの変動では説明が困難であるとしており、健常者との血糖変動の相違について、ブドウ糖代謝と産生の両面からの検討の必要性があるとしている¹⁴⁾。

この際の血糖測定法はGOD法を用いており、今回の我々の結果より、高気圧酸素環境下のみでの血糖値の低下は、測定法による影響を示唆するものではないかと考える。

測定法以外に糖尿病に対する高気圧酸素の影響として榊原は、糖尿病患者の高気圧酸素療法後の数日間にインシュリン必要量の減少する例の多いことを報告している²⁾。また、Kindwallは、糖尿病患者の高気圧酸素療法中の痙攣は低血糖による可能性があるため、glucometer testを行うことをすすめているが¹⁵⁾、高気圧酸素がinsulinに及ぼす影響は分泌及び代謝の面から解明されていない¹⁶⁾。

高気圧酸素下でのグルコース利用についてはBassettらは、ラット摘出肺の灌流実験において5 ATAで55%のグルコース利用率の増加を報告しており¹⁷⁾、Bland等も重症小児患者での高気圧酸素環境下での低血糖は低酸素症で抑制されていたグルコース利用が高酸素分圧による低酸素症改善によるグルコース利用率の増加の為であるとしている¹⁸⁾。しかし、家兎での血漿遊離アミノ酸変動の

研究では間接的ではあるがグルコース代謝の抑制が推察された¹⁹⁾。

以上のように、高分圧酸素下でのグルコース代謝の研究が動物及び臨床でなされているが、臨床上、高気圧酸素治療中でのグルコースの産生、代謝に加え、インシュリン、グルカゴン等の内分泌及び代謝の面での影響については不明な点が多いため更に解明が必要である。しかし、研究結果の基礎となる測定法自体が溶存する酸素の影響を大きく受ける場合の考慮が必要であると考える。

結 論

今回の結果より *in vivo*, *in vitro* とも、GOD 法では検体の酸素分圧がグルコース測定値に影響を及ぼしたが、HK 法では影響はみられなかった。高気圧酸素治療時及び酸素投与時における GOD 法による血糖測定には十分な注意が必要であることが示唆された。

【参 考 文 献】

- 1) 高橋英世, 小林繁夫, 早瀬弘之, 西山博司, 伊藤宏之, 末永庸子, 加藤千春, 土屋秀子, 榊原欣作: 糖尿病患者血糖値の変動に及ぼす高気圧酸素環境の影響. 日高圧医誌 20: 101, 1985
- 2) 榊原欣作: 高気圧酸素療法の副作用, 合併症および事故と, その対策. 日高圧医誌 28: 243-270, 1993
- 3) 児玉公二, 安部英恵, 大谷敏嘉, 平田幸正: バイオセンサー (固定化酵素電極法) を用いた簡易血糖測定器 (グルコカード) の評価. 新薬と臨床 40: 245-251, 1991
- 4) Romette JL, Froment B, Thomas D: Glucose-oxydase electrode. Measurements of glucose in samples exhibiting high variability in oxygen content. Clinica Chimica Acta 95: 249-253, 1979
- 5) 幸野良一, 遠藤麻子, 水野かおる, 高橋澄江, 笹川佳子, 渡辺雅子, 清野弘明, 堀 三郎, 菊池宏明, 阿部隆三: 自己管理血糖測定器 (グルテスト E) の基礎的・臨床的検討. 機器・試薬 16: 653-660, 1993
- 6) Kadish AH, Little RL, Srenberg JC: A new and rapid method for the determination of glucose by measurement of rate of oxygen consumption. Clin Chem, 14: 116-131, 1968
- 7) 中 甫: 糖類. 齊藤正行, 丹羽正治, 改訂 臨床化学, 東京, 講談社, 1984, 59-72
- 8) 牧野義彰, 紺野邦夫: 酸素電極による血中ブドウ糖の測定法. 臨床病理 15: 391-394, 1967
- 9) 梶原利政, 荻原文二: 酸素電極及び Glucose-oxydase 使用による血清 Glucose 測定法. 臨床病理 14: 322-327, 1966
- 10) 八島弘昌, 竹久元彬, 富浦茂基, 河野静子, 村上郁子, 小川保一: Glucose Analyzer による血糖測定について. 臨床病理 20: 359-362, 1972
- 11) 今井一洋, 沢田嗣郎, 渡辺訓行, 渡辺秀夫: 超高度液体クロマトグラフィー. 東京, 学会出版センター, 1990
- 12) 幸野良一, 遠藤麻子, 水野かおる, 高橋澄江, 笹川佳子, 渡辺雅子, 清野弘明, 堀 三郎, 菊池宏明, 阿部隆三: 自己管理血糖測定器 (タイド/タイデックス) の基礎的・臨床的検討. 医学と薬学 30: 117-125, 1993
- 13) Shafer MR: The effect of increased atmospheric pressure on glucose reagent strip accuracy. Military Med 157: 162-165, 1992
- 14) 押田芳治, 佐藤祐造, 井口昭久, 植村和正, 岡田節朗, 坂本信夫, 高橋英世, 榊原欣作: 高気圧酸素環境下における糖尿病患者の内分泌・代謝変動に関する研究. 糖尿病 31: 109-115, 1988
- 15) Kindwall EP: Management of complications in hyperbaric treatment. In Kindwall EP (ed.): Hyperbaric medicine practice, Arizona, Best Publishing Company, 1995, p291
- 16) Kindwall EP: The use of drug under pressure. In Kindwall EP (ed.): Hyperbaric medicine practice, Arizona, Best Publishing Company, 1995, p256
- 17) Bassett DJP, Fisher AB: Glucose metabolism in rat lung during exposure to hyperbaric O₂. J Appl Physiol 45: 943-949, 1979
- 18) Bland DK, Klooster MJ: Hypoglycemia related to hyperbaric oxygen in hemophilus influenzae purpura fulminans. J Hyperbaric Med 3: 65-71, 1988
- 19) Yusa T, Inoue N, Akamatsu T: Effect of hyperbaric oxygen on the fluctuation of plasma free amino acids. In Smith G (ed): Proceedings of the sixth international congress on HBO medicine Scotland, Abdeen University press, 1979, p146-153