

学 位 論 文

数種の血中酵素活性に関連する  
成分の臨床分析化学的研究

2002年3月

熊本大学大学院自然科学研究科

近浦 靖

# 目 次

	頁
第1章 序 論	1
1.1 本研究の意義	1
1.2 本研究に関する背景並びに経緯	1
1.2.1 定量分析項目（濃度項目）と酵素活性項目	1
1.2.2 臨床分析の標準化に関する経緯と現状	2
1.2.3 遺伝子診断の標準化の基礎 — より簡便な遺伝子診断法の開発	5
1.3 本研究で対象とする臨床分析の範囲と内容	6
参考文献	9
第2章 定量分析項目における臨床化学検査測定法の検証	11
2.1 緒言	11
2.2 実験	13
2.2.1 定量分析項目の測定法の検証	13
1) 尿酸測定 of 勧告法	13
2) クレアチニン測定 of 勧告法	14
2.3 結果と考察	15
2.3.1 定量分析項目の測定法の検証	15
1) 尿酸測定 of 勧告法	15
2) クレアチニン測定 of 勧告法	19
2.4 結言	20
参考文献	21
第3章 酵素活性項目における臨床化学検査測定法の検証	23
3.1 緒言	23

	頁
3.2 実験	24
3.2.1 酵素活性項目の測定法の検証	24
1) アミノトランスフェラーゼ活性測定の勧告法	24
2) クレアチンキナーゼ活性測定の勧告法	26
3.3 結果と考察	27
3.3.1 酵素活性項目の測定法の検証	27
1) アミノトランスフェラーゼ活性測定の勧告法	27
2) クレアチンキナーゼ活性測定の勧告法	34
3.4 結言	39
参考文献	39
第4章 コミュニタビリティの評価	41
4.1 緒言	41
4.2 実験	42
4.2.1 市販管理血清は日常分析値の方法間較差是正にどの程度役立つか	42
4.2.2 酵素標準物質としての評価	46
4.2.3 リファレンスシステム	49
4.3 結果と考察	52
4.3.1 市販管理血清は日常分析値の方法間較差是正にどの程度役立つか	52
1) アミノトランスフェラーゼ(AST, ALT)	52
2) 乳酸デヒドロゲナーゼ(LD)	54
3) クレアチンキナーゼ(CK)	57
4) アルカリホスファターゼ(ALP)	59
5) $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)	61
4.3.2 酵素標準物質としての評価	64
1) 骨肉腫株化細胞由来のアルカリホスファターゼ	64
2) 遺伝子組換え ALT	66
4.3.3 リファレンスシステム	67
1) ALP を例にしたリファレンスシステムの検証	67
4.4 結言	71
参考文献	73

	頁
第5章 遺伝子検出に基づく新規臨床分析法	75
5.1 緒言	75
5.2 実験	79
5.2.1 DNA修飾ナノスフェアの凝集を利用した新規遺伝子検出法	79
5.3 結果と考察	83
5.3.1 DNA修飾ナノスフェアの凝集を利用した新規遺伝子検出法	83
1) オリゴヌクレオチドの合成と精製	83
2) スフェア表面へのODNの修飾	85
3) スフェアの凝集挙動の塩濃度依存性	88
4) スフェア溶液の蛍光顕微鏡による観察	88
5) スフェア溶液の発光スペクトル観察	89
5.4 結言	92
参考文献	93
第6章 総括	95
参考文献	99
謝辞	102
付録	103
測定装置および器具等の検定とその正確さ	103
略語一覧	109
臨床化学分析専門用語	110

## 第1章 序 論

### 1.1 本研究の意義

ここ半世紀の医学の急速な進歩により、わが国では平均寿命が 60 歳から 80 歳へと飛躍的に延びた。この陰には生化学や分子生物学、細菌、免疫学などのめざましい発展がある。臨床化学は生化学や検査医学また分析化学の一つの領域として成長した分野で、その主たる目的はヒト体液（血液、尿など）や組織中の化学物質を分析して疾患の予防、診断、治療のための情報を提供することにある。すなわち、生体は数多くの無機および有機化合物によって構成されており、これらの物質が生化学的に絶えず代謝され、時々刻々と変化して各種の生理活性と機能を発現している。一方、各種疾患によっては正常な場合に比べて生体内の化学組織が質的、量的に変化するので、臨床化学検査ではそれらを分析することによって健康状態の判定あるいは疾患の診断や治療指針への重要な情報を提供し、化学分析値を通じて医療に貢献している。医学の真の目的は診断ではなく治癒にあるが、このためには精度の高く正確な検査データを提供することは非常に重要である。20 世紀後半から測定装置の発明およびその改良や測定方法の開発がかなりのスピードで進み、現在では信頼度の高い測定データが提供できるようになり、多くの病める人々がその恩恵を受けている。

### 1.2 本研究に関する背景並びに経緯

#### 1.2.1 定量分析項目（濃度項目）と酵素活性項目

臨床化学検査の測定対象は主に患者の血液や尿で、分析項目を大きく二つに分けることができる。一つはグルコース、総タンパク質、尿素、クレアチニン、コレステロールなど物質濃度（モル濃度）で表現できる化合物群であり、これらは疾患の原因というよりはむしろ酵素などの作用によって血中に誘導される物質であり、血液 1 リットル当たり 0.1mmol 以上存在するので比較的簡単に精度よく測定が可能であり、最近では自動分析装置の開発が進んだため 1 日に何千もの検体を迅速に定量できるようになった。もう一つの化合物群は、前述の生体成分濃度の変動に直接関与する酵素で

ある。酵素活性は、緩衝液の種類、pH や反応温度などの諸条件によって大きく変動する。条件の中でも測定温度による影響は極めて大きく、1℃異なっただけで酵素活性は約 10%も変動するうえにアイソザイムによってその反応性が異なることも多い。加えて、国際生化学会は酵素の Unit 量を“至適条件下で反応時間 1 分あたりに基質を 1  $\mu$ mol 変化させる量”という定義にとどめており、これらすべてが酵素検査データの標準化の障害となっている。

### 1.2.2 臨床分析の標準化に関する経緯と現状

検査が“迅速、高感度、高選択的かつ安価であること”など多くの制約を受けながらより良い測定原理が次々に応用され、その結果として複数の測定法が乱立するようになり臨床医学に混乱が生じてきた。このような状況のもと患者が別の医療機関で診療を受ける必要が生じた場合、今まで診療を受けていた機関で行った検査データを活用する方法がなければ再検査を要し、これによる身体的および経済的負担に加えて診療の遅れによるリスクを負わざるを得ないことになる<sup>1)</sup>。1980 年当初、日本消化器病学会をはじめとするいくつかの医学関連学会より検査データの比較を可能にするよう要望があり、これを契機に医療施設間の測定値の差をなくす、いわゆる検査値の標準化のために日本臨床化学会 (JSCC: Japan Society of Clinical Chemistry) が中心となって、表 1.1 に示すように 1989 年のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: Aspartate Aminotransferase)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: Alanine Aminotransferase) の酵素 2 項目を皮切りに勧告法を提示してきた<sup>2~12)</sup>。以降、この JSCC 勧告法に準拠した市販試薬が年々普及してきた。さらに、1996 年の JSCC 標準化対応法 (JSCC 常用基準法と互換性が保証される方法) と酵素標準物質の規格の設定<sup>13)</sup> が契機となってから 10 余年経った現在、検査値の標準化はかなりの水準まで進んできた。そして最終的には検査データの互換性が確立され、基準法で表現した基準範囲 (いわゆる正常値) が設定できれば、各個人の検査結果を複数の医療施設間で継続利用することが可能となり、あわせて臨床医間で共通利用できる診断並びに治療に関する基準の提案が可能となる<sup>14)</sup>。

日本医師会は 1967 年以来、精度管理事業を実施してきており、臨床検査の標準化並びに質の向

表 1.1 臨床検査の標準化に関する年表

1989年	JSCC 勧告法の設定 (AST, ALT)
1990年	JSCC 勧告法の設定 (LD, CK, ALP)
1991年	JSCC 勧告法の設定 (グルコース)
1993年	JSCC 勧告法の設定 (尿酸, 電解質)
1994年	JSCC 勧告法の設定 (クレアチニン)
1995年	JSCC 勧告法の設定 (GGT)
1996年	JSCC 勧告法の設定 (中性脂肪) 常用酵素標準物質の規格の設定 JSCC 標準化対応法の規格の設定
1997年	日本認証酵素標準物質の供給
1999年	JSCC 勧告法の見直し

上に大きく寄与してきた。この精度管理事業とは、数種類の臨床検査測定用サンプルを参加施設に一斉に配布しその報告値の解析をする事業である。日本医師会の指導のもと、精度管理事業に参加する医療施設は現在も増加傾向にあり、平成 12 年度の参加施設は平成 11 年度よりさらに 191 施設増加して 2713 施設が参加するまでに至った。また、検査項目は前年よりさらに HBs 抗原および HCV 抗体のウイルス肝炎関連マーカーが加わって 47 項目になった<sup>15)</sup>。

先に述べたように、臨床化学の検査項目は定量成分項目（酵素以外のタンパク質と低分子生体成分）と酵素活性項目に大別される。まず、主要な定量成分項目の報告値について施設間差の状況をみてみよう。ブドウ糖（血糖）の各種測定法の使用率は、JSCC 勧告法であるヘキサキナーゼ・UV 法<sup>7)</sup>が 48.7%、酸化酵素電極法が 35.8%とこの二法で全体の約 9 割を占めており、全参加施設の報告値の変動係数 (CV, %) は 2%にまで収束してきた。標準法が日本臨床化学会より提唱され、さらには、日本臨床検査標準協議会 (JCCLS: Japanese Committee for Clinical Laboratory Standard)、福祉・医療技術振興会 (HECTEF: Health Care Technology Foundation)、国際臨床化学連合 (IFCC: International Federation of Clinical Chemistry)、国際標準技術研究所 (NIST: National Institute of Standards and Technology) 並びにヨーロッパコミッション共同研究センター (IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements) から標準品が供給されていることから<sup>16,17)</sup>、基準法による分析値の正確さを施設間で確認することが今後の課題であると考えられている。尿酸の測定法別の使用率はウリカーゼ・ペルオキシダーゼ法が 95%とほとんどを占め、全参加施設の報告値の CV は 4%であり

満足できる精度である。クレアチニンの各種測定法の使用率はヤッフエ・レイト法が 21%と大幅減少に対して、酵素法（クレアチナーゼを用いる方法）が 72%に増加した。酵素法を使用している施設からの報告値の CV は 3%と良好ではあるが、全参加施設の報告値の CV が 3.4～ 8.0%と格差が見られる。JSCC 勧告法では尿酸の分析と同様に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でを用いることから<sup>8)10)</sup>、今後、トレーサビリティの確認（基準法の持つ正確さを日常分析法で確認する、遡行性）が最重要課題であると指摘されている<sup>15)</sup>。

JSCC 勧告法が設定されている酵素活性項目においては、1998 年度より日本認証酵素標準物質（JCERM: Japanese Certified Enzyme Reference Material）を測定体系の上位標準物質と位置づけることにより、正確さの伝達が可能となっただけでなく精密度も著しく向上した。さらに、標準化対応法の概念が定着したことで JCERM の表示値を継承できている状況で、AST、ALT 両項目の報告値の CV は約 2%、乳酸脱水素酵素（LD: Lactate Dehydrogenase）と  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ（GGT:  $\gamma$ -Glutamyltransferase）は約 3%、アルカリホスファターゼ（ALP: Alkaline Phosphatase）とクレアチンキナーゼ（CK: Creatine Kinase）は約 4%といずれも施設間較差は著しく減少し、基準範囲を共有化できる準備ができあがったと考えられる。表 1.2 に、酵素項目別に簡単にまとめた<sup>15)</sup>。

熊本県下の標準化活動の歴史は長い、JSCC の動向に併せ 1995 年より本格的に施設間較差の是正に向けた標準化モデルの検討が活発に行われてきた。2ヶ月に 1 回のサーベイ（標準化事業）を繰り返してきた結果は施設間較差が大きく、最重要課題であった酵素項目における参加施設の報告

**表 1.2 日本医師会主催精度管理調査結果の状況(主要酵素項目)**

AST、ALT	JSCC 標準化対応法の普及率は 92%にも昇り、ほぼ施設間較差が解消したと考えられている。
GGT	JSCC 法の普及率は 72%にも及び報告値の CV は 3%まで収束している。
LD	JSCC 法の普及率は 1996 年当初 15%にも満たなかったが、2000 年には現在 40%と毎年増加している。報告値の CV は 3%と良好である。
CK	JSCC 勧告法は IFCC 勧告法とほぼ同様であり国際的に安心して利用できる。普及率は後者を含めて 86%にも及んでおり、報告値の CV は 3.5%まで収束している。
ALP	JSCC 法の普及率は著しく 70%にも及び、報告値の CV は 3.5%まで収束している。しかし、国際的には AMP 緩衝液使用の IFCC 法が 80%を占めており、JSCC 使用の EAE 緩衝液とコミュニティが保証されていない問題を抱えている <sup>18)</sup> 。

値のCVは5%以内にまで収束し、共通のものさしである標準物質を用いることにより施設間較差を大幅に改善できてきた<sup>14)</sup>。この標準化活動の締めくくりとして、臨床検査値の統一化事業が熊本県のほかに千葉県<sup>19)</sup>、三重県、徳島県、兵庫県、広島県、福岡県<sup>20)</sup>等、各県単位で進行中である。

### 1.2.3 遺伝子診断の標準化の基礎 — より簡便な遺伝子診断法の開発

これまで述べてきたように、1980年来の目標であった臨床化学検査の標準化がほぼ達成されつつある一方で、新たな検査対象として遺伝子が注目されていることから、本研究ではより簡便なDNAの検出法の確立を目標としているが、まずその着想に至った経緯を述べたい。

遺伝子の持つ情報はmRNAに転写され、この情報に従って酵素などの全てのタンパク質が合成される(セントラルドグマ)。酵素の働きによって低分子生体成分の体内濃度が調節されている。すなわち、遺伝情報は、これまで述べてきた全ての検査対象の源流とすることができる。特定のタンパク質をコードする構造遺伝子に変異があれば、そのタンパク質の活性が損なわれ得る。これが次世代に受け継がれれば遺伝病となるわけだが、遺伝子診断によりその変異の有無、あるいは種類を知ることにより、治療方針の決定、予後の推定、発症の可能性の予測等が可能になる。例えば、ガンに関して言えば、細胞中のガン抑制遺伝子の変異に様々な外因が絡んで発ガンに至ると考えられており、遺伝子診断によって発ガンの可能性が高いと判断された人は普段からその外的リスクを遠ざける事ができる。発症後においても、ガン細胞の悪性度、特定の薬剤への感受性、副作用の危険度など遺伝子診断は多くの正確な情報を我々に提供してくれる。従来の臨床化学検査において、例えば、ある酵素の血中濃度が高値を示した場合には、アイソザイム分析等の検査が追加され、その結果によって疾患臓器を推定する。すなわち、その時点での生体成分の血中濃度によって診断を行っているわけで、当然、発症後あるいは発症初期段階での診断が中心となる。一方、遺伝子を対象とする検査では、発症前にその可能性を予め知ることができるのである。従来の臨床化学検査と遺伝子診断の提供する情報は相補的であり、近い将来、遺伝子検査も臨床化学検査の主要な項目の一つとして採用されることが予想される。既に、病原微生物の同定およびその定量、白血病、悪性リンパ腫な

どの血液腫瘍診断検査は、一部の機関で保険診療として検査が行われている<sup>21)</sup>。

### 1.3 本研究で対象とする臨床分析の範囲と内容

前節で述べたとおり臨床分析の標準化は、濃度測定項目、酵素活性項目について標準化が要請され、90年代に本論文で述べる筆者の貢献を含めて達成されてきたが、将来は遺伝子診断の標準化が要請されることは疑う余地もない。この流れは、生化学的に起こっている順序、すなわち遺伝子により蛋白質である酵素が作られ、その酵素の作用によって濃度項目の物質が作られる流れとは逆であるが、これは標準化の困難な順序でもある。すなわち、濃度項目の標準化は共存成分の影響あるいは妨害の少ない高選択的で目的成分の定量に十分な感度を備えた方法を確立できれば比較的容易である。酵素活性項目において測定対象となるのは、酵素の濃度そのものではなく反応速度を測定するために種々の要因の影響が考えられ、標準化は濃度項目よりさらに困難である。さらに、酵素活性の評価においては測定法そのものを標準化する方法を求めることも重要であるが、現在使用されている酵素活性測定法で得られた膨大なデータを相互換算できるある統一的なものさしを探索して確立することはさらに重要である。遺伝子診断においては濃度や反応速度などの物質量を測定するのではなく核酸塩基の配列様式を決定することが目的となり、従来の臨床分析と概念の異なる全く新しい分析法であり、まだ端緒についたばかりである。放射能や変位原性が取りざたされている蛍光検出試薬の必要とする電気泳動を使用しない、より簡便で感度の高い新規配列検出法の開発が急務である。以上の観点から本研究では以下の順に検討を行った。

まず、標準化が上記3分類の項目の中で最も容易と思われる定量分析項目の標準化に関する検討から開始した。すなわち、JSCC 勧告法が設定されている定量分析項目である血清中の尿酸とクレアチニンについて、勧告法と多くの医療機関で採用されている日常法について標準化を検討した。まず、尿酸の分析においてはHPLC法とウリカーゼ-UV法について検討し、クレアチニンについては多くの検査機関で用いられているペルオキシダーゼ酸化縮合法について標準化を検討した。その

結果、両成分の分析法の標準化に関して多くの有用な知見を加えることができ、この内容については第2章で述べる。また、本章で述べた成果については臨床病理 39 巻 9 号 pp.981～993(1991)などで公表した。

第2章で述べるように、本研究では定量分析項目への標準化についての道標となる手法を確立できたので他の定量分析項目の標準化へと拡大する方法をとらず、続いて、標準化が困難な酵素活性項目の標準化に取り組んだ。すなわち、JSCC 勧告法が設定されている酵素項目からアミノトランスフェラーゼ (AST, ALT) と CK について、基質濃度, pH などの影響を詳細に検討した。また、CK については共役酵素の活性測定が取り入れられていない点に着目し、CK 活性勧告法に沿った G6PD および HK 活性測定法の考案に関する検討、さらに JSCC 常用基準法の自動分析化に関する検討なども行った。以上の検討の結果、常用基準法を日常検査の標準化に用いることが可能であるとの有用な知見が得られた。また、酵素活性項目の分析においては勧告法の変革を行うよりは自動分析化を図り、各方法で測定された酵素活性値を共通のものさしを用いて換算する方法の開発が極めて重要であるとの見解を得るに至った。これらの内容については第3章で述べる。また、本章で述べた成果については Clinical Chemistry Vol.38, No.9, pp. 1917～1918 (1992), 同 Vol.39, No.9, pp. 1920～1921 (1993) などで公表済みである。

第3章で述べるように、測定方法や条件の異なる各施設間で得られた分析値を勧告法による値に換算可能な標準酵素を求めることは、既存のデータを標準化する観点から極めて重要である。この目的を遂行するために市販管理血清がどの程度役立つかを AST, ALT, LD, CK, ALP, GGT の6項目について検討した。ヒト由来血清, 動物由来血清など数種の管理血清について検討し、従来より共通のものさしの作製が困難と予想されていたにもかかわらず、異なる方法, 異なる施設間で得られた結果を統一的尺度で換算可能である条件などを明らかにすることが ALP を除く項目で可能であった。この成果はこれまで蓄積されている酵素活性データの施設間相互利用を可能とするものであり、特に社会的意義が大きく、本研究の主軸を成す成果ともいえるので、特に詳細に第4章で述べ

る。本章で述べた成果については医学検査、第46巻6号 pp. 955 ~ 961 (1997), *Clinical Chemistry* Vol.41, No.6, pp. 872 ~ 880 (1996), 同 Vol.41, No.6, pp. 881 ~ 891 (1996), 同 Vol.41, No.12, pp. 2008 ~ 2014 (1997) などで公表した。なお、第2章から第4章では特に日本語としての確に表し難い言葉については敢えて専門用語を使用した。

第3章、第4章で述べた酵素活性項目の源流は遺伝子に由来する。従って、遺伝子レベルでの情報と酵素活性値の異常などの相関性が究明できれば、発症してから治療するのではなく発症を予防することが可能となる。遺伝子診断はまだ端緒にすぎたばかりで、遺伝子診断に要する時間や費用にはまだ改善の余地がある。近い将来遺伝子診断の標準化への要請も高まると予想されるが、筆者は簡便な遺伝子検出法の開発が前提となると考え、新規のDNA配列決定法に関する検討を行った。これについては、既存の分析法、試薬などを用いた標準化に関する検討とは異なった側面を有するので、本研究で検討した手法を考案するに至った経緯も含めて説明しておきたい。

1953年、Watson と Crick によってDNAの二重らせん構造が明らかにされた。そのとき科学者を魅了したのは、あまねく自然界の生命を司るにふさわしいその構造的な美しさだけでなく、むしろその構造を支えている非常に単純なルールであった。すなわち、アデニンとチミン、グアニンとシトシンの相補的な塩基対形成がそれである。単純さは同時に応用範囲の広さを意味し、この基本ルールさえ守れば遺伝子の特定部分に結合する機能性分子を自在に合成できるのである。従来から遺伝子検出に用いられている、いわゆるDNAプローブは全てこの相補的塩基対形成（ハイブリダイゼーション）の基本ルールを利用している。また、医薬の分野で関心が高まってきているアンチセンス<sup>22)</sup> やアンチジーン療法<sup>23)</sup> もこの特異的なハイブリダイゼーションを利用している。

この数年、この核酸同士のハイブリダイゼーションを利用して様々な超構造の構築を目的とした工学的立場（いわゆるナノテクノロジー）からの研究が行われている。DNAをその構造単位の一部として用いれば、予定した構造を自発的に形成する構造単位を設計することができる。これまでに、DNA自身<sup>24~26)</sup>、DNAコンジュゲート<sup>27~30)</sup>、DNA固定化超微粒子<sup>31~39)</sup>などを構造単位として構

造体を構築する興味深い報告がある。

本研究においては、ナノスフェアを用いて自発的な相補的塩基対形成に基づく高次構造形成を遺伝子診断に利用する試みを行った。高次構造単位を形成するため、構造単位として DNA を固定化したポリスチレン系ナノスフェアを利用した。それぞれ互いに異なる塩基配列の DNA が表面に固定化されたナノスフェアのプールに 検体としての DNA 試料(一本鎖検体遺伝子)を加えると、DNA 試料に相補的な DNA が修飾されたスフェアのみが選択的に橋かけされて凝集するものと期待できる。ナノスフェアには様々な色素が含浸されているため、DNA の検出、すなわち遺伝情報を溶液あるいは凝集体の色の変化として観察できることになる。検体には発癌、アポトーシス、DNA 修復、転写調節、細胞間のシグナル伝達、細胞周期など様々な細胞内イベントに関与することで注目を集めている *p53* 遺伝子<sup>40~42)</sup>に関する、その既知のホットスポットにおける変異の検出を試みることは興味深い。

## 参考文献

- 1) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定 of 勧告法総論、*臨床化学*, 18, 211 (1989)
- 2) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定 of 勧告法 (AST), *臨床化学*, 18, 226 (1989)
- 3) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定 of 勧告法 (ALT), *臨床化学*, 18, 250 (1989)
- 4) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定 of 勧告法 (LD), *臨床化学*, 19, 228 (1990)
- 5) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定 of 勧告法 (CK), *臨床化学*, 19, 184 (1990)
- 6) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定 of 勧告法 (ALP), *臨床化学*, 19, 209 (1990)
- 7) 日本臨床化学会、血清グルコース測定勧告法, *臨床化学*, 20, 247 (1991)
- 8) 日本臨床化学会、HPLC を用いる血清尿酸測定 of 勧告法, *臨床化学*, 22, 300 (1993)
- 9) 日本臨床化学会、血清中の酵素活性測定標準化の推進に関する指針, *臨床化学*, 23, 335 (1994)
- 10) 日本臨床化学会、HPLC を用いる血清クレアチニンの測定勧告法, *臨床化学*, 23, 326 (1994)
- 11) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定 of 勧告法 (GGT), *臨床化学*, 24, 106 (1995)
- 12) 日本臨床化学会、血清中の中性脂肪濃度測定 of 勧告法, *臨床化学*, 25, 39 (1996)
- 13) 日本臨床化学会、常用酵素標準物質の規格 (1996-02-15), *臨床化学*, 25, 135 (1996)
- 14) 熊本県医師会精度管理専門委員会、熊本県臨床化学検査値『標準化マニュアル』, 熊本 (2000)
- 15) 日本医師会、第34回臨床検査精度管理調査結果報告書, 東京 (2000)
- 16) 河合 忠、標準物質についての国際的動向と今後の展望, *臨床検査*, 41, 1603 (1997)
- 17) 桑 克彦、検量用酵素標準物質の使いかた, *検査と技術*, 26, 635 (1998)
- 18) 菅野 剛史、日本臨床化学会勧告法の背景と臨床評価, *臨床検査*, 37, 468 (1993)
- 19) (社)千葉県臨床衛生検査技師会、千葉県臨床検査値統一化マニュアル, 千葉 (1999)
- 20) 福岡県医師会、臨床検査精度管理調査『検査値統一化マニュアル』, 福岡 (1999)
- 21) 河合 忠、遺伝子診断の現状, *臨床検査*, 40, 69 (1996)

- 22) 横山 一成, *細胞工学*, **13**, 225 (1994)
- 23) C. Helene, *Anticancer Drug. Des.*, **6**, 569 (1991)
- 24) C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N.C. Seeman, A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA, *Nature*, **397**, 144 (1999)
- 25) R. Sha, F. Liu, D.P. Millar, N.C. Seeman, Atomic force microscopy of parallel DNA branched junction arrays, *Chem. Biol.*, **7**, 743 (2000)
- 26) T.H. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F. Liu, E. Winfree, J.H. Reif, N.C. Seeman, Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 1848 (2000)
- 27) C.M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. Chi, Supramolecular nanocircles consisting of streptavidin and DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3056 (2000)
- 28) T. Mori, D. Umeno, M. Maeda, Sequence-specific affinity precipitation of oligonucleotide using poly(N-isopropylacrylamide)-oligonucleotide conjugate, *Biotech. Bioeng.*, **72**, 261 (2001)
- 29) M.S. Shchepinov, K.U. Mir, J.K. Elder, M.D. Frank-Kamenetskii, E.M. Southern, Oligonucleotide dendrimers : stable nano-structures, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3035 (1999)
- 30) A.M. Cassell, W.A. Scrivens, J.M. Tour, Assembly of DNA/Fullerene hybrid materials, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1528 (1998)
- 31) T. Ihara, K. Kurohara, A. Jyo, Aggregation of DNA-modified nanospheres depending on added polynucleotides, *Chem. Lett.*, 1041 (1999)
- 32) C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, J.J. Storhoff, A DNA -based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature*, **382**, 607 (1996)
- 33) R. Elghanian, J.J. Storhoff, R.C. Mucic, R. Letsinger, C.A. Mirkin, Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science*, **277**, 1078 (1997)
- 34) S.J. Park, A.A. Lazarides, C.C. Mirkin, P.W. Brazis, C.R. Kannewurf, R.L. Letsinger, The electrical properties of gold nanoparticle assemblies linked by DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3845 (2000)
- 35) T.A. Taton, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes, *Science*, **289**, 1757 (2000)
- 36) C.J. Loweth, W.B. Caldwell, X. Peng, Alivisatos A. P., Schultz P. G., DNA-based assembly of gold nanocrystals, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1808 (1999)
- 37) J.J. Storhoff, R. Elghanian, R.C. Mucic, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, One-pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998)
- 38) C.J. Loweth, W.B. Caldwell, X. Peng, A.P. Alivisatos, P.G. Schultz, DNA-Based Assembly of Gold Nanocrystals, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **12**, 1808 (1999)
- 39) T.A. Taton, G. Lu, C.A. Mirkin, Two-color Labeling of Oligonucleotide Arrays via Size-Selective Scattering of Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 21, 5164 (2001)
- 40) A.J. Levine, J. Momand, C.A. Finlay, The p53 tumour suppressor gene, *Nature*, **351**, 453 (1991)
- 41) Y. Kishimoto, Y. Murakami, M. Shiraiishi, K. Hayashi, T. Sekiya, Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung, *Cancer Res.*, **52**, 4799 (1992)
- 42) L. Wiesmuller, The tumor suppressor p53 in the center of a strategy aimed at the alleviation of side effects in cancer therapies, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1768 (2000)

## 第2章 定量分析項目における臨床化学検査測定法の検証

### 2.1 緒言

臨床検査の数値または観察結果そのものは医学的に何の意味も持たない。それらはある物差し(基準)と比較してはじめて医学的に意味を持つ。例えば、血糖値について 150 mg/dL という数値そのものは医学的意味を持っていないが、健常者の基準値と比較して高いかどうかを知り初めて高血糖状態であるかどうかを判断することが可能となる。高血糖状態であると判断されると、その背景にある病態が何であるか、糖尿病を持っているかどうかを診断できることになる。

1980年当初、日本消化器病学会をはじめとするいくつかの医学関連学会より、相互の検査データの比較を可能にするよう要望があり、これを契機に医療施設間の測定値の差をなくす、いわゆる検査値の標準化がクローズアップされた。標準化とは標準を設定してこれを活用する組織的行為であり、この“標準”とは関係する人々の間で利便が公正に得られるように統一化、単純化を図る目的で、性能・手順・方法・手続き・概念等について設定された取り決めのことである<sup>1)</sup>。これを臨床検査データに当てはめれば、患者－医療機関－医師－検査室の間で最も利便が図られるようにすることである。他分野の分析に携わる側からみれば不思議に思われるであろうが、臨床検査データには施設間較差が明確に存在し、このことが日常診療上の混乱を招いて患者へのデメリットを引き起こし、結果として社会的な大きな損失をもたらしている。施設間較差を起こす因子には、1) 測定法の原理および測定条件、2) 検量の方法、3) 単位、4) 測定装置の性能、5) 施設固有のファクターが挙げられる。このうち、1) は酵素活性や免疫測定上の宿命的内容で、測定原理が異なれば同じ結果を表すことに限界がある。2) は定量分析の基本であり、検量試料および検量方法の選択として用いる検査法が測定試料のマトリックスの影響を受ける場合には実試料標準が必須となる。3) は特に慣用単位についての取り扱いであり、現状では少なくとも国際単位を用いていくことで收拾される。4) はメーカーの仕様をそのまま単純に受け入れると、特に正確さについて混乱を招くこと

になり、性能を熟知してその限界を知ったうえで使用することが重要である。5) は施設固有の値を歴史的に維持しようとしている場合である<sup>2~4)</sup>。

日本臨床化学会 (JSCC) は標準化のための第一歩として基準法の設定に力を注ぎ、1989 年より勧告法を提示してきた<sup>5~15)</sup>。さらに重要なことは、この基準法による測定値の臨床的評価を明らかにすることで、基準法が広く臨床分析に利用されることにあり、臨床病理学会、消化器病学会をはじめとする多くの関連学会に追認を依頼した<sup>3)</sup>。

標準化により施設間差を解消させるには測定法を統一する、すなわち、各施設が基準法またはその準拠法で測定することができれば簡単であるが、科学的に問題のない方法までも排除されることにもなり、これからの測定法の進歩の妨げになり兼ねない。そこで、基準法の正確さを橋渡しできる標準物質の活用が有効な手段であることが広く認識されるようになった。日常分析法にとってヒト血清中における測定対象物質の反応性が基準法のそれと同様であること、さらにその反応性を持ち備え、基準法により厳密に値付けされた標準物質が存在すれば、標準物質によりキャリブレーションすることで標準化は可能になると考えられている。

血清尿酸の測定は痛風、Lesch-Nyhan 症候群をはじめ種々の疾患で重要視されている<sup>16)</sup>。1990 年当初、ウリカーゼを用いた酵素法の登場によって臨床検査値の施設間差は縮められたが、さらなる測定精度の向上が望まれた。標準化を意図した実用基準法として、米国臨床化学会 (AACC: American Association of Clinical Chemistry) のウリカーゼ・UV 法<sup>17)</sup>、ブリン・ピリミジン代謝学会からのウリカーゼ・カタラーゼ法<sup>18)</sup> また、分画と定量が同時に可能で正確度の高い HPLC 法等が提唱された。JSCC は精密度、正確度の両方の点で問題が少ない HPLC・UV 法を取り上げ、前処理の除蛋白に過塩素酸を採用して、実用基準法としての測定条件を設定し、問題点の指摘を行いながら検討を重ねた結果、1993 年に HPLC を用いる血清尿酸測定の勧告法<sup>19)</sup> を設定した。勧告法が設定される以前の 1990 年においては HPLC 法とウリカーゼ・UV 法の二法が尿酸測定勧告法の候補として検討されていたが、本研究では市販の尿酸標準液、管理血清およびヒト生血清をこの二法

について同時に定量した結果を詳細に比較し検討を行った。

クレアチンの生合成は肝で行われ、そのほとんどが筋肉内に存在する。クレアチンキナーゼ (CK) によって精製されるリン酸化合物は筋収縮のエネルギーの供給源として重要である。このクレアチンリン酸が非酵素的に脱水閉環したものがクレアチニンであり、腎でろ過された後は尿中に排泄される<sup>16)</sup>。CDC (Center for Disease Control) からの報告により、諸外国の血清クレアチニンの基準法がイオン交換クロマトグラフィーとヤッフエ (Jaffe) 反応を組み合わせた方法<sup>19)</sup>であることを受けたが、日本臨床化学会はこの方法では十分な精度が得られないと判断し検討を重ねた結果、1994年にトリクロル酢酸で除蛋白した試料による強酸性陽イオン交換樹脂を用いた HPLC 法を血清クレアチニン測定<sup>13)</sup>の勧告法として設定した。血清クレアチニンの測定に関する日本医師会精度管理事業の課題であった JSCC 勧告法 (HPLC 法) とのトレーサビリティ (遡行性) の確認を目的として、現在多くの検査室で使用されている血清クレアチニン測定用酵素法試薬について検討を行った。

分析値の正確さは測定法によって決まり、誤差はその過程から生じる。定量分析項目の測定対象物質の構造は明確であり、現在高純度の標準物質の入手が可能であり、臨床的意思決定の観点から要求される精度を兼ね備えた基準法が望まれている。正確な測定を行ううえでの重要事項として、試薬調製に係る天秤、pH メータおよびガラス体積計、測定装置である分光光度計等の正確さや性能検定などの内容は、付録として巻末の記述した。

## 2.2 実験

### 2.2.1 定量分析項目の測定法の検証

#### 1) 尿酸測定の勧告法

##### 1-1) 試薬

試薬の規格は HPLC 勧告法<sup>11)</sup> およびウリカーゼ-UV 法<sup>17)</sup> に準じ、尿酸の標準物質として NIST SRM-913 および和光純薬の特級試薬を用いた。リン酸一水素二ナトリウムはメルク社、ウリカーゼ

(酵母由来) はオリエンタル酵母社、メタノールは和光純薬の HPLC 用試薬を用いた。

## 1-2) HPLC 法

HPLC 勧告法<sup>11)</sup> は過塩素酸で血清を除蛋白後、ODS 系カラムを用いる逆相クロマトグラフィーにより測定波長 284nm における吸光度測定により検出する方法である。島津製作所製 model LC-3A に ODS カラム (6.0 x 150 mm) を接続し、カラム温度を 40°C に設定してクロマトグラムのピーク面積より尿酸濃度を算出した。さらに、尿酸標準溶液 (25.2 mg/dL) を用いて尿酸ピークを完全に消去するのに必要なウリカーゼの最適量を検討した。

## 1-3) ウリカーゼ-UV 法

ウリカーゼ-UV 法<sup>17)</sup> は尿酸を特異的に分解するウリカーゼを作用させた後、尿酸の紫外部吸収を利用した測定法である。尿酸の吸収域においてウリカーゼによる分解産物アラントインの吸収帯は存在しないため、ウリカーゼ作用の有無による吸光度差から尿酸量を求めた。

## 1-4) 尿酸標準液およびその安定性

10 mM 炭酸リチウム溶液を用いて 84.3 mg/dL 尿酸溶液を調製して、約 3mL ずつガラス製小試験管に分注後密閉して -20°C で保存した。使用時に室温にて自然解凍後、蒸留水にて 10 倍希釈して両方法の標準液として使用した。標準液の安定性試験には、10 倍希釈標準液をさらに 10 倍希釈した溶液を用いて 1) 20 μL を直接カラムに注入して、尿酸ピーク面積を測定する HPLC 法、2) 紫外部吸収スペクトルを 261, 292, 340nm の 3 波長で測定する UV 法にて検討した。

## 2) クレアチニン測定の勧告法

### 2-1) 試料

HPLC 勧告法の再現性の検討には、精度管理用血清ネスコール (アズウェル社) および EXA リキッド (三光純薬) を用いた。測定試料として (財) 化学及血清療法研究所臨床検査センターより分与されたヒト血清 55 検体を用いた。

### 2-2) HPLC 法

クレアチニン標準液は NIST SRM 914a を 45°C で恒量になるまで乾燥し、その 100 mg を 0.1 M 塩酸溶液で 100 mL とし、使用時に 0.1 M 塩酸溶液で 10 倍希釈して用いた。ヒューレットパッカ

ード社製 HPLC (HP1100) を用いて、流速 0.7 mL/min, サンプル量 20  $\mu$ L, 測定波長 234nm, カラム温度 40°C. 溶離液として 100 mM 硫酸ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液(pH 5.75) を測定条件とした。HPLC 勧告法<sup>11)</sup> は血清を 902 mM トリクロル酢酸で除蛋白後、その上清 200  $\mu$ L に酢酸エチル 400  $\mu$ L を加え、室温で 30 分放置後上層の酢酸エチル層を除去し、下層の水溶性部分を測定試料として用いた。

### 1-3) 酵素法

現在多くの検査室で使用されている血清クレアチニン測定用酵素法試薬 5 種を選択して使用した。これらの試薬はいずれもクレアチナーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびペルオキシダーゼを用い、最終産物であるキノン系色素の吸光度を測定するものである。測定は日立 7170 形自動分析装置を用い、それぞれ試薬添付文書に従って実施した。

### 1-4) HPLC 法再現性

市販されている 2 種類の管理血清をそれぞれ 10 回測定して同時再現性を調べた。また、6 日間、3 重測定して日差再現性を調べた。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 定量分析項目の測定法の検証

#### 1) 尿酸測定の勧告法

##### 1-1) 標準液の調製とその安定性

SRM 913 および和光純薬特級試薬より調製した同濃度溶液の一定量をカラムに注入したときの尿酸ピーク面積は 5%有意水準で有意差は認められなかった。また、紫外部吸収極大波長(284nm)におけるモル吸光係数 ( $\epsilon \pm \text{SD}, \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) は SRM 913 が  $1255 \pm 10$ , 和光純薬特級試薬が  $1259 \pm 19$ , 292 nm/261nm の吸光度比は SRM 913 が  $4.48 \pm 0.13$ , 和光純薬特級試薬が  $4.63 \pm 0.11$  と、両者間で有意差は認められなかった。

標準液の安定性を調製後月一回の割合で半年にわたって検討した結果、HPLC の尿酸ピーク面積の CV は 0.4%、吸光度比 (292nm/261nm) では 1.7%程度と安定であった。また、尿酸ピーク前

後に分解物も認められなかった。

#### 1-2) 直線性

標準液を用いて HPLC 法とウリカーゼ-UV の直線性を検討した結果、HPLC 法およびウリカーゼ-UV 法共に標準液の 1 mM ( 16.8 mg/dL) まで直線性が認められた (  $r > 0.9998$  )。

#### 1-3) 再現性

市販標準液 ( 10 mg/dL 相当, 和光 KQ 895) を用いて日差再現性を調べた結果、HPLC 法は CV が 1.9%(n=13) 、ウリカーゼ-UV は 1.6%(n=15)であった。いくつかの患者生血清を混合したヒトプール血清を用いて日差再現性を調べた結果は、両法ともに CV は 2.0%(n=4)であった。

#### 1-4) 添加回収試験

添加濃度 2 種類 (2.52 mg/dL, 8.40 mg/dL) 各々における回収率は HPLC 法が 99.0%、ウリカーゼ-UV 法が 102%であった。

#### 1-5) 両法の相関性

市販標準血清 (n=2)、管理血清 (n=17) およびヒト生血清 (n=21) の HPLC 法(y)とウリカーゼ-UV 法(x)による測定値の相関を図 2.1 に示す。回帰式は  $y = 0.99x + 0.01$ 、 $r = 0.9981$  であったが、以下に述べる二つの問題が提起された。第一の問題は、HPLC 法において尿酸ピークに重なるピークが在り得るため、ウリカーゼ処理による尿酸ピークの単一性の確認が必要と思われた (図 2.2)。第二の問題にはウリカーゼ-UV 法において蛋白以外の 280nm 付近に大きな吸収を示す物質が存在し、この物質はクロマトグラムにおいて約 1 時間後にかなり大きなピークとして溶離された (図 2.3)。なお、管理血清(1)中に含まれていた尿酸ピークに重なる物質は、トランスフェラーゼの補酵素として添加されているピリドキサル 5'-リン酸、また管理血清(2)中のクロマトグラムにおいて約 1 時間後にかなり大きなピークとして溶離された物質は、管理血清中のカリウムを高値にするために添加されているソルビン酸カリウムであることが判明した。さらに、HPLC 法の UV 検出器に替わって電気化学検出器 (ECD) を用いて上記の二つの管理血清(1)および(2)の測定をおこなったところ、図 2.3 の尿酸と重なるピリドキサル 5'-リン酸のピークと図 2.4 の保持時間が約 1 時間のソルビン酸カリウムのピークは検出されなかった。

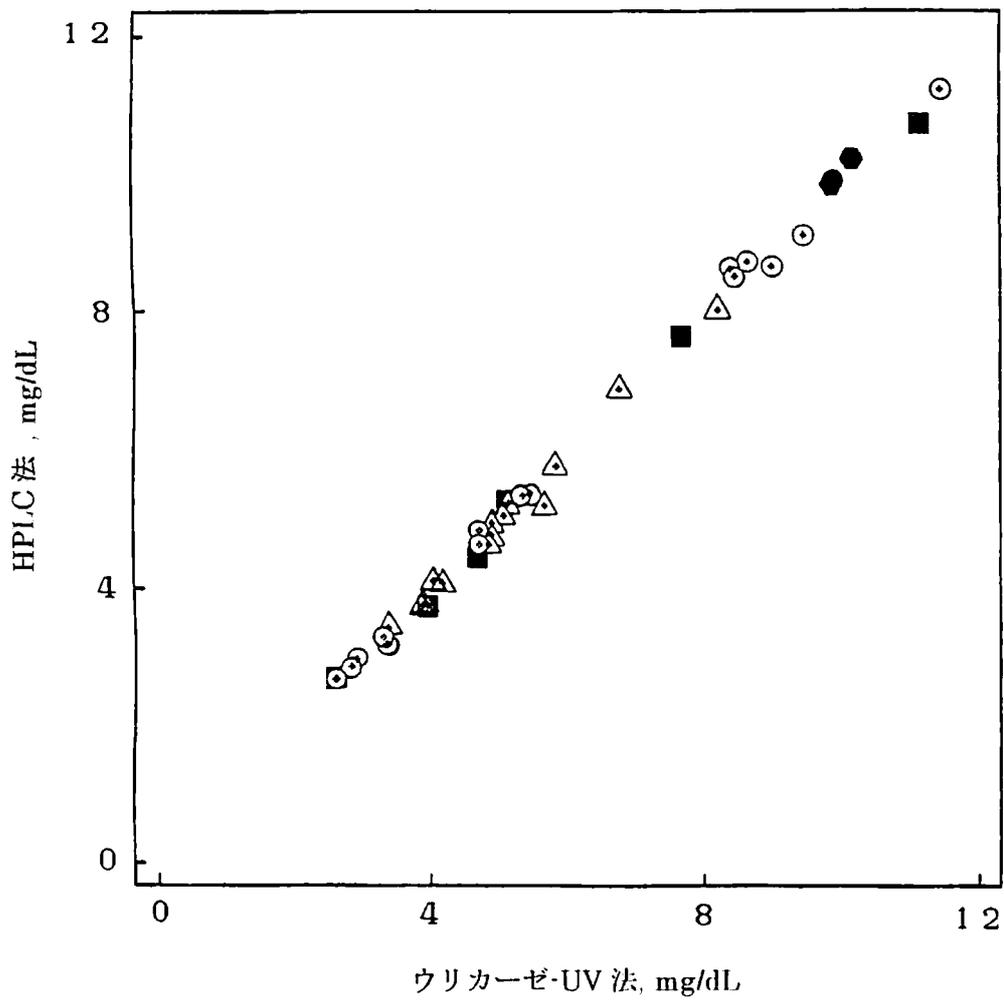


図 2.1 HPLC 法とウリカーゼ-UV 法との相関  
 ■ : 市販標準液    ○ : 管理血清    △ : 正常血清    ● : 異常血清

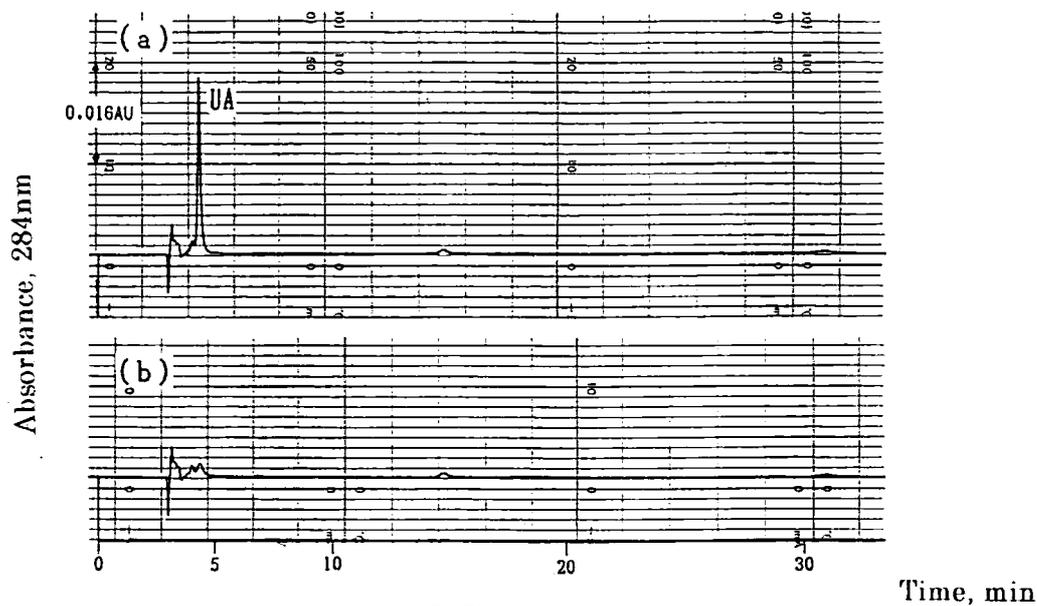


図 2.2 クロマトグラムに及ぼす影響(1)

尿酸値 2.65mg/dLの管理血清(1)とトリス緩衝液(pH8.5)を0.1mLずつ混合し、37°Cで30分間インキュベート後、HPLC 勧告法サンプル処理に従って処理した(a)。同管理血清(1)とウリカーゼ 1000U/L(Tris buffer, pH8.5)を0.1mLずつ混合し、37°Cで30分間インキュベート後、HPLC 勧告法サンプル処理に従って処理した(b)。

装置：島津 model LC-3A, UV 検出器 Shimadzu SPD-2A, shimpack(CLC-ODS, 6.0x150mm)

条件：溶離液 74mM リン酸緩衝液(pH2.2), 流速 1.0mL/min, カラム温度 40°C

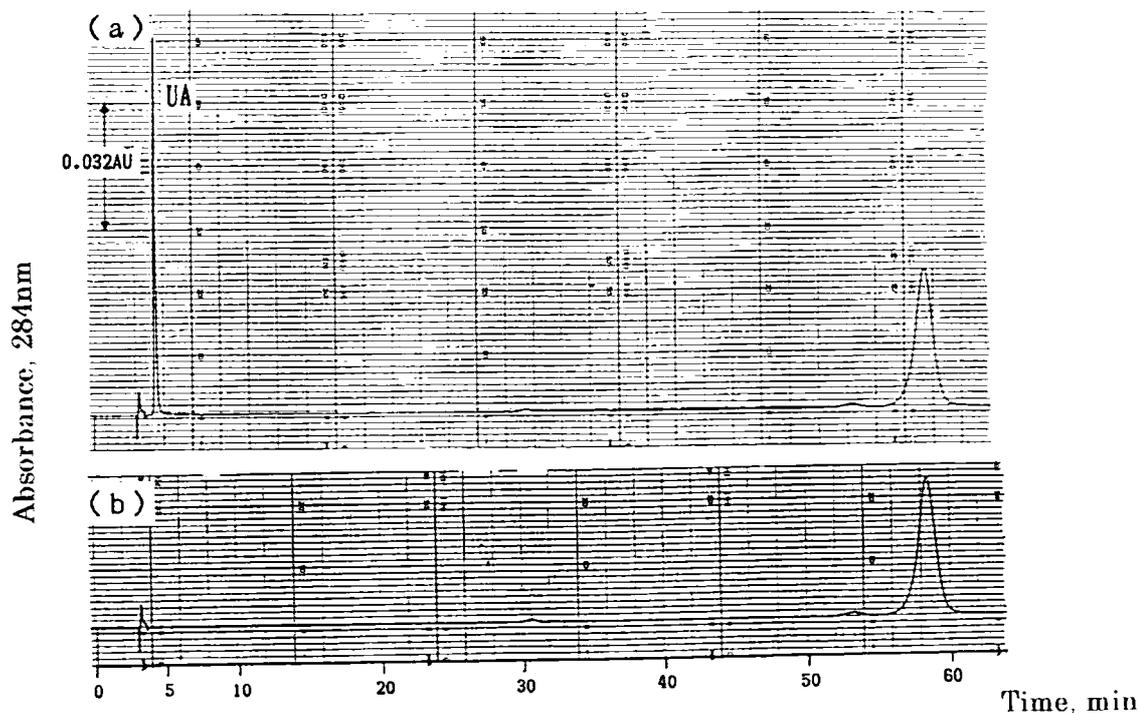


図 2.3 クロマトグラムに及ぼす影響(2)

管理血清(2)とトリス緩衝液(pH8.5)を0.1mLずつ混合し、37°Cで30分間インキュベート後、HPLC 勧告法サンプル処理に従って処理した(a)。同管理血清(2)とウリカーゼ 1000U/L(Tris buffer, pH8.5)を0.1mLずつ混合し、37°Cで30分間インキュベート後、HPLC 勧告法サンプル処理に従って処理した(b)。装置および測定条件は図 2.2 に同じ。

## 2) クレアチニン測定の方法

### 2-1) HPLC 法の再現性

低濃度市販管理血清（ネスコール）を用いて連続 10 回測定した結果の平均値は 1.09 mg/dL, CV は 2.39%、高濃度市販管理血清（EXA リキッド）の平均値は 3.98 mg/dL, CV は 0.83%であった。

日差再現性の結果は、ネスコールの CV が 5.66%, EXA リキッドの CV は 4.54%であった。

### 2-2) HPLC 法による酵素法標準液濃度の測定

酵素法試薬で用いられる標準液の測定を HPLC 法で実施した結果を表 2.1 に示す。表示値が 10mg/dL の 2 社の標準液では 9.87～ 9.88mg/dL となり、濃度比率は 98.7～ 98.8%であった。また、表示値が 5.0 mg/dL の 3 社の標準液では 4.94～ 4.99 mg/dL となり、濃度比率は 98.8～ 99.8%であった。大澤らは標準液の濃度比率は 95.0～ 102.8%と報告しており<sup>20)</sup>、これと比較して今回検討した 5 社の標準液の測定値は表示値とよく一致した。

### 2-3) HPLC 法と酵素法の測定値の比較

血清 55 検体について、HPLC 法と酵素法との測定値を比較した結果を表 2.2 に示す。HPLC 法における測定結果の範囲は 0.28～ 5.96 mg/dL であり、酵素法による測定値と比較して低濃度検体で 3.6～17.2%、高濃度検体で -0.2～ 2.1%の差がみられた。HPLC 法による測定値と酵素法による測定値の相関は、いずれも相関係数は 0.997 以上、回帰直線の勾配は 1.0、y 切片も 0 に近い値が得られた。

表 2.1 酵素法試薬の標準液の HPLC 法による測定結果

試薬会社	表示値(mg/dL)	測定値 <sup>1)</sup> (mg/dL)	濃度比率 <sup>2)</sup> (%)
A 社	10	9.9	99
B 社	10	9.9	99
C 社	5.0	4.9	99
D 社	5.0	4.9	98
E 社	5.0	5.0	100

1) 連続 10 回測定の平均値

2) 測定値の表示値に対する比率

表 2.2 HPLC 法と酵素法の測定値の比較

試薬メーカー	a	b	r
A 社	0.999	0.021	0.9970
B 社	0.990	0.015	0.9970
C 社	1.019	0.030	0.9970
D 社	1.013	0.040	0.9974
E 社	0.973	0.061	0.9971

$$y = ax + b \text{ (n=55) : HPLC 法(x), 酵素法(y)}$$

## 2.4 結言

血清中尿酸測定のための HPLC 法およびウリカーゼ-UV 法の 2 法による直線性、再現性についてほとんど差異は認められなかったため、両法で同一の標準液を用いて検体を測定した結果、一部の検体を除き良好な相関を示したが、次の問題が提起された。HPLC 法では標準液の分析の場合と異なりヒト血清や管理血清では尿酸ピークに重なるピークもあり得るため、ウリカーゼ処理による尿酸ピークの単一性の確認が必要である。また、ウリカーゼ-UV 法ではウリカーゼ反応前後の吸光度差を除く蛋白後測定するので、先の管理血清(2)のように蛋白以外で 280nm 付近に吸収を示す物質が含まれる検体では検体量を減らして再度測定せざるを得ず、感度の低下を招き測定誤差が懸念される。そこで、HPLC 法において ECD 検出器を用い測定したところ、図 2.3 の尿酸と重なるピークと図 2.4 の保持時間が約 1 時間の大きなピークは検出されなかったことから、ECD 検出器を使用することでより精度の高い結果が得られるであろう。

従来、血清クレアチニンの測定はアルカリ性ピクリン酸法 (Jaffe 法) で実施されてきた<sup>21)</sup>が、最近では酵素法が普及し、平成 9 年度の日本臨床衛生検査技師会精度管理調査結果では約 64% の施設が酵素法を採用していると報告されている。現在、酵素法の試薬として国内では 24 社 49 種が市販されており、これらの試薬の測定原理にはペルオキシダーゼ酸化縮合発色で検出するものと生成する NADH を測定波長 340nm で最終検出する 2 系統があり、検査施設では前者が多く用いられている<sup>22)</sup>。クレアチニン測定用試薬 14 社の標準液を HPLC 法により評価した大澤らの報告<sup>23)</sup>に対して、著者らは前者の原理に基づく 5 社の市販試薬について検討したが、測定値の施設間差の一要因となる試薬間差は認められなかった。

## 参考文献

- 1) 日本工業規格, 品質管理用語, JIS Z 8101 (1981)
- 2) 桑 克彦, 臨床検査の標準化, *医学検査*, 40, 131 (1991)
- 3) 菅野 剛史, 日本臨床化学会勧告法の背景と臨床評価, *臨床検査*, 37, 468 (1993)
- 4) 河合 忠, 臨床的意思決定での基準値の意味と使い方, *臨床検査*, 40, 1369 (1996)
- 5) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定勧告法 (AST), *臨床化学*, 18, 226 (1989)
- 6) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定勧告法 (ALT), *臨床化学*, 18, 250 (1989)
- 7) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定勧告法 (LD), *臨床化学*, 19, 228 (1990)
- 8) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定勧告法 (CK), *臨床化学*, 19, 184 (1990)
- 9) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定勧告法 (ALP), *臨床化学*, 19, 209 (1990)
- 10) 日本臨床化学会, 血清グルコース測定勧告法, *臨床化学*, 20, 247 (1991)
- 11) 日本臨床化学会, HPLC を用いる血清尿酸測定勧告法, *臨床化学*, 22, 300 (1993)
- 12) 日本臨床化学会, 血清中酵素活性測定標準化の推進に関する指針, *臨床化学*, 23, 335 (1994)
- 13) 日本臨床化学会, HPLC を用いる血清クレアチニンの測定勧告法, *臨床化学*, 23, 326 (1994)
- 14) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定勧告法 (GGT), *臨床化学*, 24, 106 (1995)
- 15) 日本臨床化学会, 血清中の中性脂肪濃度測定勧告法, *臨床化学*, 25, 39 (1996)
- 16) 斉藤 正行, 丹羽 正治, 伊藤 啓, *臨床化学*, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1992)
- 17) P.H. Duncan, N. Gochmann, T. Cooper, E. Smith, D.A. Bayse, A candidate reference method for uric acid in serum, *Clin Chem*, 28, 284 (1982)
- 18) 委員会報告, 血清尿酸正常値決定のための尿酸測定法, *尿酸現ブリンピリミジン代謝*, 11, 155 (1987)
- 19) N.D. Brown, H.C. Sing, W.E. Neeley, S.E. Koetitz, Determination of "true" serum creatinine by high-performance liquid chromatography combined with a continuous-flow microanalyzer, *Clin Chem*, 23, 1281 (1977)
- 20) 大澤 進, 真々田 賢司, 臨床検査の標準化 血清クレアチニンの勧告法の活用と効果, *医学検査*, 41, 1245 (1992)
- 21) 金井 泉, 金井 正光, *臨床検査法提要*, 金原出版, 509, 東京 (1998)
- 22) 大澤 進, これだけは知っておきたい最新臨床化学検査法 第1回クレアチニン, *Medical Technology*, 24, 389 東京 (1998)

### 第3章 酵素活性項目における臨床化学検査測定法の検証

#### 3.1 緒言

臨床化学検査項目のなかでも標準化が難しいとされている酵素項目は、酵素の触媒活性という反応速度の単位で報告されるにも拘わらず、測定法をはじめ測定温度などの活性値に直接影響を与える要因やその表現単位について統一された詳細な規定もなかったため、医療施設間でのデータの比較が著しく困難な状況にあった。このような状況は医療の様々な面で大きな障害になり兼ねなかったためにわが国をはじめ国際的に標準化作業が進められ、標準的測定法および酵素標準物質の確立による検査データの統一が強く要望されていた。さらに、日本臨床化学会（JSCC）勧告法が単に同学会だけに留まらず、国内で広く普及することが望まれた<sup>1)</sup>。

測定法を統一することなく標準化を実現するためには基準法の正確さを橋渡してきける標準酵素の活用が有効な手段であることが広く認識され、日常法においてヒト血清中測定対象酵素の反応性が基準法のそれと互換性があり、基準法により厳密に裏付けされた標準物質が存在すれば、キャリブレーション法による標準化が可能と考えられている。臨床分析にはこれまで動物由来酵素を添加した管理血清が使用されてきたが、JSCC 勧告法の設定と同時期にヒト培養細胞由来酵素をヒト血清ベースに添加して調整された管理血清（セラクリア-HE）が（財）化学及血清療法研究所から市販されるにあたり、筆者らは国際臨床化学連合（IFCC: International Federation of Clinical Chemistry）や JSCC などの勧告法<sup>2-7)</sup>に基づく標準化に関する基礎的検討を行う機会を得た。本章では、アミノトランスフェラーゼ活性並びにクレアチンキナーゼ活性測定法の標準化、さらには次章のテーマであるコンピュータビリティ評価法を確立するための基礎的知見を得ることを目的として、上記2項目の酵素活性測定における標準物質の選定を行うとともに、補酵素、検体ブランク、緩衝剤の pH、測定温度などの効果を検討し、明らかになったこと並びに新たに見出した改善すべき問題点について述べる。

## 3.2 実験

### 3.2.1 酵素活性項目の測定法の検証

#### 1) アミノトランスフェラーゼ活性測定の報告法

IFCCは1985年に、JSCCは1989年にそれぞれアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: Aspartate Aminotransferase) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: Alanine Aminotransferase) の酵素活性測定報告法を公表した<sup>1,3,8,9)</sup>。両報告法における活性測定の原理を以下に反応式で示す。ASTの測定はL-アスパラギン酸と2-オキソグルタル酸を基質に、リンゴ酸脱水素酵素 (MD: malate dehydrogenase) を共役酵素として用いる。ALTの測定はL-アラニンと2-オキソグルタル酸を基質に、乳酸脱水素酵素 (LD: Lactate Dehydrogenase) を共役酵素として用いる。ともに340nmにおけるNADHの減少速度を測定するレイトアッセイである。最適化された操作法および試薬終濃度の比較をASTについて表3.1, 表3.2に、ALTについて表3.3, 表3.4に示す。

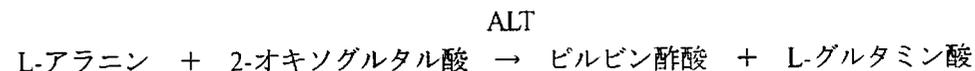
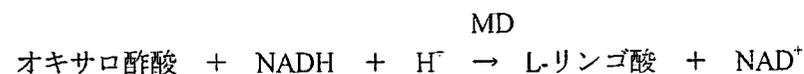
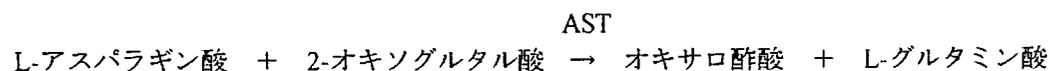


表 3.1 AST における本試験反応の分析操作法

		IFCC		JSCC		
添加液	容量, mL			容量, mL		
試液 I	2.000	Tris(pH 7.8)	80 mM	2.400	Tris(pH 7.8)	80 mM
		L-Asp	240 mM		L-Asp	200 mM
		NADH	0.18 mM		NADH	0.16 mM
		MD	420 U/L		MD	500 U/L
		LD	600 U/L		LD	500 U/L
		PP <sup>a)</sup>	0.10 mM			
検体	0.200			0.300		
混和後、吸光度が一定になるまで予備加温する。						
試液 II	0.200	2-OG <sup>b)</sup>	12 mM	0.300	2-OG <sup>b)</sup>	10 mM
	混和後、5 分間測定する。				混和後、1 分間放置後の 2 分間測定する。	

a) PP : ピリドキサーール 5'-リン酸

b) 2-OG : 2-オキシグルタル酸

表 3.2 AST 活性測定 of 構成

	試液 I	検体	IFCC	JSCC
(A) : 本試験	L-Aspartate を含む	血清	+	+
(B) : (A)反応の試薬ブランク	L-Aspartate を含む	精製水	+	+
(C) : 検体ブランク	L-Aspartate を含まない	血清	+	-
(D) : (C)反応の試薬ブランク	L-Aspartate を含まない	精製水	+	-

表中の+, -はそれぞれの測定を行う、行わないことを意味する。

表 3.3 ALT における本試験反応の分析操作法

		IFCC		JSCC		
添加液	容量, mL			容量, mL		
試液 I	2.000	Tris(pH 7.3)	100 mM	2.400	Tris(pH 7.5)	100 mM
		L-Ala	500 mM		L-Ala	500 mM
		NADH	0.18 mM		NADH	0.16 mM
		LD	1200 U/L		LD	1200 U/L
		PP <sup>a)</sup>	0.10 mM			
		検体	0.200			
混和後、吸光度が一定になるまで予備加温する。						
試液 II	0.200	2-OG <sup>b)</sup>	15 mM	0.300	2-OG <sup>b)</sup>	15 mM
	混和後、5 分間測定する。				混和後、1 分間放置後の 2 分間測定する。	

a) PP : ピリドキサーール 5'-リン酸

b) 2-OG : 2-オキシグルタル酸

表 3.4 ALT 活性測定構成

	試液 I	検体	IFCC	JSCC
(A) : 本試験	L-Alanine を含む	血清	+	+
(B) : (A)反応の試薬ブランク	L-Alanine を含む	精製水	+	+
(C) : 検体ブランク	D-Alanine を含む	血清	+	-
(D) : (C)反応の試薬ブランク	D-Alanine を含む	精製水	+	-

表中の+, -はそれぞれの測定を行う、行わないことを意味する。

IFCC 勧告法における ALT 活性測定には 4 つの反応が必要である。通常の試薬ブランクの他に L-アラニンに替わって D-アラニンを含む反応試液を用いて測定する検体ブランクを考慮し、総活性は (A-B) - (C-D) で計算される (表 3.4)。しかし、D-アラニンに混在する L-アラニンがブランク補正を大きくすることから、D-アラニンの有無の ALT 検体ブランク測定試液を用意して数種の検体を用いて ALT 検体ブランク活性と D-アラニンの影響をみた。

IFCC, JSCC 両勧告法の二つ目の相違点である試薬中のピリドキサル 5'-リン酸 (PP: Pyridoxal 5'-phosphate) の添加条件を考慮し、JSCC 勧告法の試液に IFCC 勧告法と同濃度の PP を添加した JSCC+PP 変法を別途に準備して各測定結果を比較し、PP によるホロ酵素化 (アポ酵素に補酵素が結合してホロ酵素となる) について考察した。

## 2) クレアチンキナーゼ活性測定の勧告法

クレアチンキナーゼ (CK) 活性測定の JSCC 勧告法<sup>10)</sup> は、IFCC 勧告法<sup>9)</sup> と同一の測定原理に基づく。CK による主反応 (I) とヘキソキナーゼ (HK) を共役酵素とする反応 (II) およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) による指示反応 (III) を組み合わせた酵素法である。操作法および試薬終濃度を表 3.5 に示す。

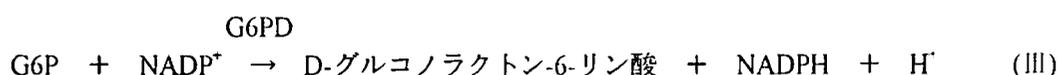
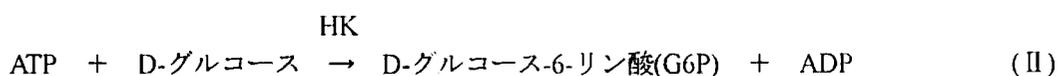


表 3.5 JSCC 勧告法の CK 活性測定操作法および試薬終濃度

添加液	容量,mL	反応液中の試薬終濃度	
試液 I	2.000	イミダゾール(pH 6.60)	100 mM
		EDTA	2 mM
		Mg <sup>2+</sup>	10 mM
		ADP	2 mM
		AMP	5 mM
		AP5A	10 μ M
		NAC	20 mM
		D-グルコース	20 mM
		NADP <sup>+</sup>	2 mM
		HK	3000 U/L, 30°C
		G6PD	1500 U/L, 30°C
検体	0.100		
混和後、少なくとも5分間吸光度が一定になるまで予備加温する。			
試液 II	0.200	クレアチンリン酸 30 mM	
混和後、30°Cで2分放置後 NADPH の増加速度を2分間測定する。			

JSCC 勧告法に準じて測定試薬を調製し、分光光度計 Shimadzu UV-260 および UV-240 を用いて JSCC 勧告法操作に従って測定した。まず、試液 I をホールピペットを用いて 2.0mL 採取し、検体を 0.1mL 添加し混和後 340nm における吸光度が一定になるまで予備加温する。次に試液 II を 0.2mL 添加し混和後 340nm における NADPH の増加速度を測定する方法である。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 酵素活性項目の測定法の検証

##### 1) アミノトランスフェラーゼ活性測定の勧告法

アミノトランスフェラーゼはアミノ化合物と 2-オキソ酸との間でアミノ基の転移反応を触媒する転移酵素の総称である。AST は心筋、肝、骨格筋に、ALT は肝および腎に多く存在し、組織が病状に陥り細胞膜が崩壊すると血中に逸脱して血中濃度が上昇するため、損傷臓器を推定する指標としている<sup>1)</sup>。

##### 1-1) 国際臨床化学連合勧告法との比較

JSCC は、1989 年に AST および ALT の酵素活性測定法の勧告法を公表した<sup>8,9)</sup>。一方、国際的レベルでのデータの互換性のために 1985 年に公表されている IFCC 勧告法<sup>2,3)</sup>との関係を明ら

かにしておく必要がある。IFCC 並びに JSCC の両勧告法における活性測定の原理は同様である。AST の両基質、脱水素酵素の補酵素である NAD、共役酵素 MD および LD の各濃度に若干差がみられるが、両勧告法の主な相違点は 1) IFCC では試薬中に PP を添加し血清中のアポ酵素をもホロ酵素化して測定する、2) IFCC では検体ブランクを採用している点にある。

#### 1-2) ALT 検体ブランク活性と D-アラニンの影響

IFCC 勧告法における ALT 活性測定には 4 つの反応が必要であり、通常の試薬ブランクの他に L-アラニンに替わって D-アラニンを含む反応試液を用いて測定する検体グランクを考慮し、総活性は  $(A-B) - (C-D)$  で計算される (表 3.4)。しかし、D-アラニン中に L-アラニンが混在していればブランク補正が大きいことは明らかで、同じ試薬メーカーのものでもロットによって (C) 活性が影響を受けることが判明した (表 3.6)。Okoradudu ら<sup>13)</sup> も IFCC 勧告法の検体グランク反応液から D-アラニンを削除するよう提案している。

#### 1-3) AST 検体ブランク反応の補正効果と温度依存性

IFCC 勧告法における AST 活性測定も ALT 同様 4 つの反応が必要であり、通常の試薬ブランクの他に検体グランクおよびその試薬ブランクを L-アスパラギン酸が含まない反応試液を別途調製し、総活性は  $(A-B) - (C-D)$  で計算される (表 3.2)。IFCC および JSCC 両勧告法の主な相違点の 1 つである検体ブランクの有無について追求している過程で、検体ブランクが通常より高いだけでなく異常な温度依存性を示す検体に遭遇した。IFCC 勧告法によるヒト血清の検体ブランク活性は高くても 3 U/L 程度である<sup>13,14)</sup> のに対して、この検体は 15 U/L とかなり高い値を示したことに加

表 3.6 IFCC 勧告法によって測定された ALT 活性に及ぼす D-アラニンの影響

	D-Ala. lot no.	Activity, U/L(30°C)			相対活性, %
		A-B	C-D	(A-B)-(C-D)	
Serum 1	None	13.3	1.14	12.2	100
	23886		1.71	11.6	95.1
	25545		2.48	10.9	89.3
Serum 2	None	140.8	0.95	140	100
	23886		1.71	139	99.5
	25545		15.1	126	89.9

えて 37°Cの活性が 6.0 U/L と低値を示した。そこで、検体ブランク反応の大部分がグルタミン酸脱水素酵素 (GLD) 活性に起因することに注目して、GLD の基質であるアンモニアを検体中から透析で除き、その前後で活性の比較をした (表 3.7)。アンモニアを透析で除き GLD 活性を消失させた試料の検体ブランクが 0.2 U/L と低値となったこと、ヒト血清 AST の活性化エネルギーと同等になったことより、この検体の AST 活性の真値は 79.2 U/L (30°C) と思われ、IFCC 勧告法の検体ブランク補正効果が疑問視された。また、本試験反応(A)にも同様に影響していることは明確であることから、JSCC 勧告法のように検体ブランクを採用しない場合、88.9 U/L と真値より 12%も高値に測定されることになる。

#### 1-4) ピリドキサーール 5'-リン酸によるホロ化

IFCC 並びに JSCC 両勧告法の二つ目の相違点である試薬中の PP の添加条件を考慮し、JSCC 勧告法の試液に IFCC 勧告法と同濃度の PP を添加した試薬による方法 (JSCC+PP 変法) を別途に準備して、各測定結果を比較した。

図 3.1 に IFCC, JSCC 両勧告法による測定値の相関を示す。アポ酵素をホロ酵素化して AST 総活性を測定対象とする IFCC 勧告法と JSCC+PP 変法の相関は、AST では  $y = 1.01x + 1.80$  ( $n = 11, r = 0.9967, S_{xx} = 2.83 \text{ U/L}$ )、ALT では  $y = 1.02x - 1.27$  ( $n = 13, r = 0.9980, S_{xx} = 2.80 \text{ U/L}$ ) と同等な測定値が得られた。さらに、PP を含まない JSCC 法の測定値との比較をすることで、ホロ酵素化されたアポ酵素が AST で 70%に及ぶ検体も存在し、全体的に AST でホロ酵素化率が高い傾向にあった。

表 3.7 IFCC 勧告法による AST 活性および活性化エネルギー

	T, °C	Activity, U/L			Activation energy*, kJ/mol	
		A-B	C - D	(A-B) - (C-D)	(A-B) - (C-D)	A-B
Serum 1						
透析前	25	64.5	16.7	47.8	62.2	46.0
	30	88.9	15.2	73.6		
	37	132.4	6.0	126.5		
透析後	25	57.3	0.4	56.9	48.0	47.6
	30	79.4	0.2	79.2		
	37	120.5	0.0	120.5		
Control sera(n=4)					48.3 ± 0.4	48.4 ± 0.7
Human sera(n=6)					45.3 ± 1.4	45.8 ± 1.5

\*) 活性化エネルギーは、25, 30, 37°Cの活性によるアレニウスの式から求めた。

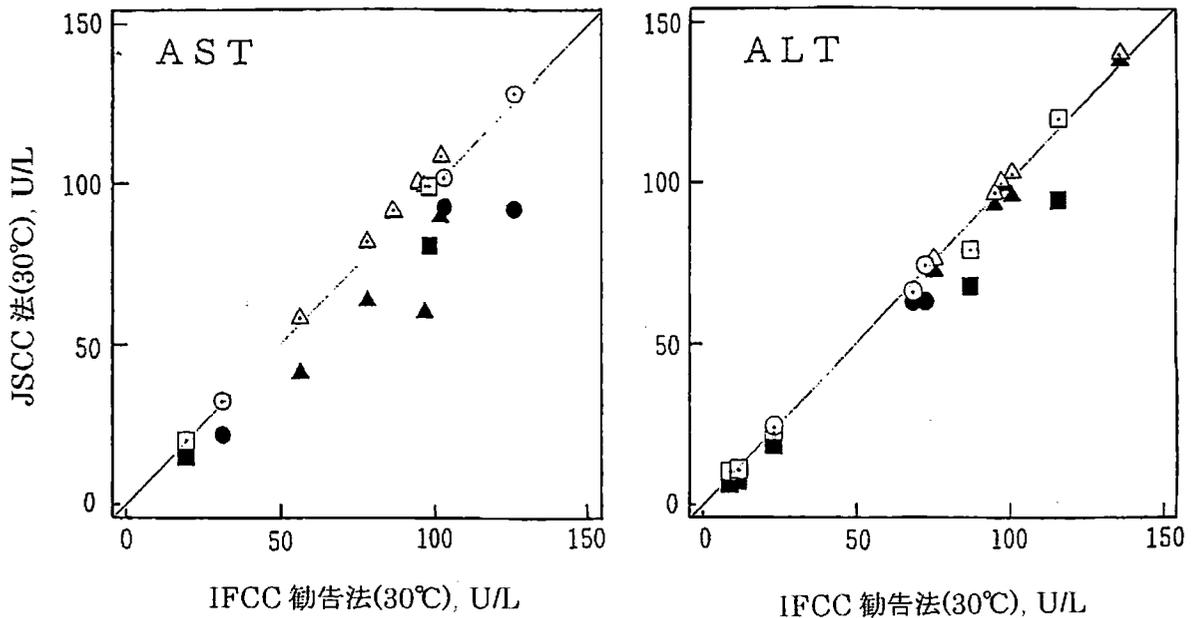


図 3.1 JSCC および IFCC 勧告法による測定値の相関

JSCC 勧告法: ● ヒト由来, ▲ 動物由来, ■ ヒト生血清  
 JSCC 変法+PP: ○ ヒト由来, △ 動物由来, □ ヒト生血清

#### 1-5) 勧告法と常用基準法

JSCC 勧告法の測定温度が 30°Cに設定されている理由は、温度保証の手段（ガリウム融点：29.77°C）が 30°C付近にあるからである。この勧告法から誘導された JSCC 常用基準法とは、JSCC 勧告法の測定温度のみを 30°Cから 37°Cに変更する以外はすべて勧告法どおり実施する方法である。測定温度だけの変更特別な名称が与えられたのは、常用基準法をわが国における酵素検査の標準化の基盤とし施設間の検査値の統一を図る<sup>15, 16)</sup>という明確な目的があったからである。酵素検査を 37°Cで行う施設が圧倒的に多い現在、測定データの表現温度と測定温度を一致させることが望ましいという考えは至極当然である。しかしながら、30°Cで最適化された JSCC 勧告法が先に設定され、37°C測定の最適条件を検討することなく勧告法試液を上記の目的で 37°Cの測定に使用することの是非が問われ、酵素標準化委員会で 37°Cにおける最適条件を把握することになり、筆者らが AST と ALT を担当することになった。

### 1-5-1) 基質濃度の検討

アミノトランスフェラーゼの関与する反応は基質が二つあるため、一方の基質を勧告法濃度に固定して他方の基質濃度変化させ、Lineweaver-Burk プロットの式より見掛けの  $K_m$  値を算出した。図 3. 2 および図 3. 3 に AST の 2 基質に対する S-V 曲線および  $K_m$  値算出のための Lineweaver-Burk プロットの例を示す。表 3. 8 に測定した  $K_m$  値の結果を要約した。AST の 2 基質に対する  $K_m$  値は両温度でほぼ変わらず、37°C でも勧告法同様最大活性 ( $V_{max}$ ) の 94% 程度で測定できている。ALT に関しては、両基質に対する  $K_m$  値は 37°C の方がいずれの検体の場合も小さいことより、30°C 測定よりも有利であることを示唆している。

#### Michaelis-Menten の式

$$v = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S])$$

ただし、 $v$  : 酵素反応速度, U/L

#### Lineweaver-Burk プロットの式

$$v^{-1} = (K_m / V_{max}) \cdot [S]^{-1} + 1 / V_{max}$$

$V_{max}$  : 最大反応速度, U/L

[S] : 基質濃度, mol/L

$K_m$  : ミカエリス定数, mol/L

### 1-5-2) pH-活性値曲線

pH 6.8 ~ 9.0 付近の反応試液において、37°C の pH は 30°C のそれに比較して約 0.16 低い値を示した。反応試液の pH と活性値の関係について 30°C と 37°C の測定結果を比較すると、37°C の関係は 30°C の挙動をそのまま左上方にスライドした形になっており、常用基準法の最適 pH は AST で約 7.6、ALT で 7.3 と数値が変化するだけで、勧告法で用いる試液をそのまま使用することについては問題ないと思われた。

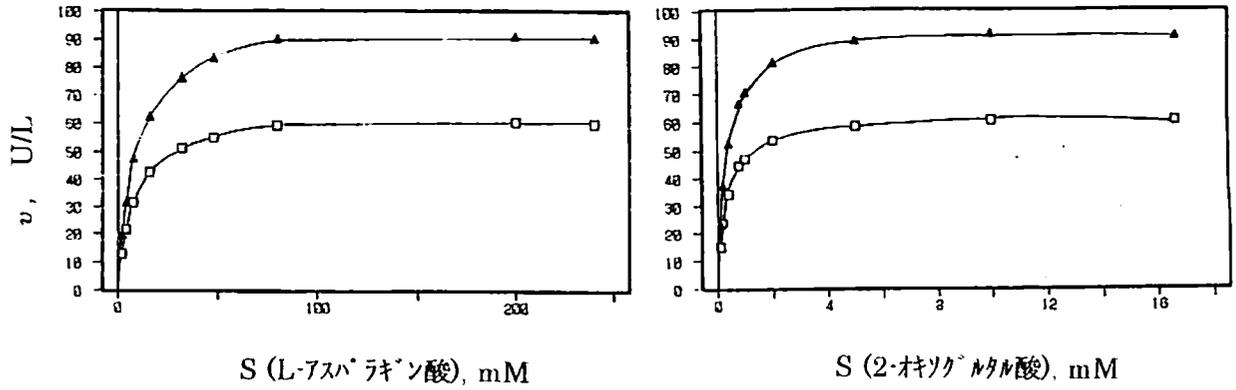


図 3.2 ASTのL-アスパラギン酸(2-OG; 10mM)および2-オキソグルタル酸(L-Asp.; 200mM)に対するS-V曲線：試料はヒトプール血清、30°C(□), 37°C(▲)

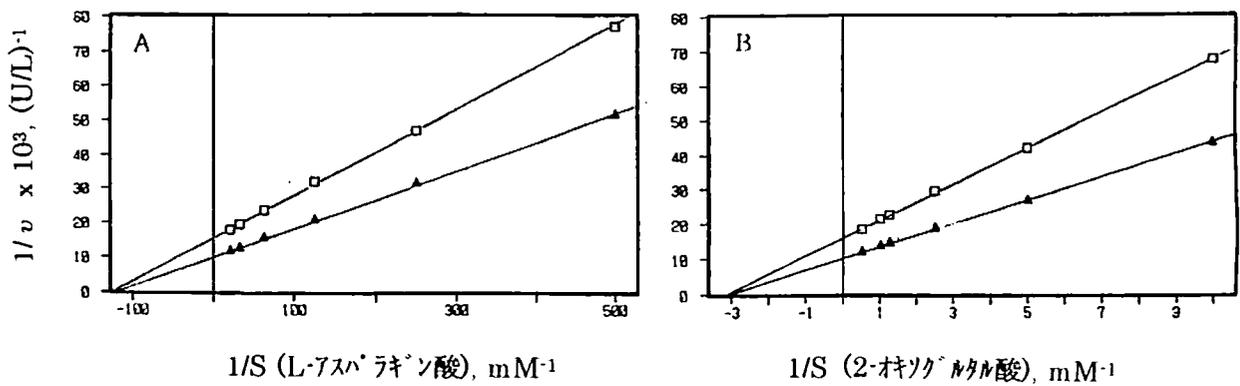


図 3.3 ASTのL-アスパラギン酸および2-オキソグルタル酸に対する $K_m$ 値算出のためのLineweaver-Burkプロット：試料はヒトプール血清、30°C(□), 37°C(▲)

表 3.8 見掛けの Km 値より算出した最大活性に対する測定値の割合

検体	t, °C	AST			ALT		
		Km, mM		%	Km, mM		%
		L-Asp	2-OG	R <sup>a)</sup>	L-Ala	2-OG	R <sup>a)</sup>
ヒト血清(n=6)	30	6.5	0.32	93.9	37	0.47	90.5
	37	7.4	0.30	93.7	21	0.34	93.9
	37/30	1.14	0.94		0.57	0.72	
管理血清 1	30	4.4	0.32	94.9	26	0.36	92.9
	37	4.6	0.32	94.8	21	0.33	94.0
	37/30	1.05	1.00		0.81	0.92	
管理血清 2	30	4.7	0.16	96.2	41	0.35	90.5
	37	5.0	0.16	96.1	27	0.31	93.1
	37/30	1.06	1.00		0.66	0.89	
管理血清 3	30	6.2	0.16	95.5	40	0.22	91.4
	37	7.0	0.17	95.1	25	0.17	94.2
	37/30	1.13	1.06		0.63	0.77	

a)  $R = (100 \cdot v / V_{\max})$

1-5-3) JSCC 勧告法と常用基準法との相関

JSCC 勧告法と常用基準法による活性値の相関を図 3.4 に示す。AST でヒト血清(n=18)に対して相関係数  $r=0.9999$ 、温度換算係数 1.522 となり、ヒト型酵素管理血清 セラクリア・HE および酵素リファレンス、NIST RM 8430 とともに乖離はみられなかった。同様に ALT ではヒト血清(n=16)に対して相関係数  $r=0.9998$ 、温度換算係数 1.422 であった。

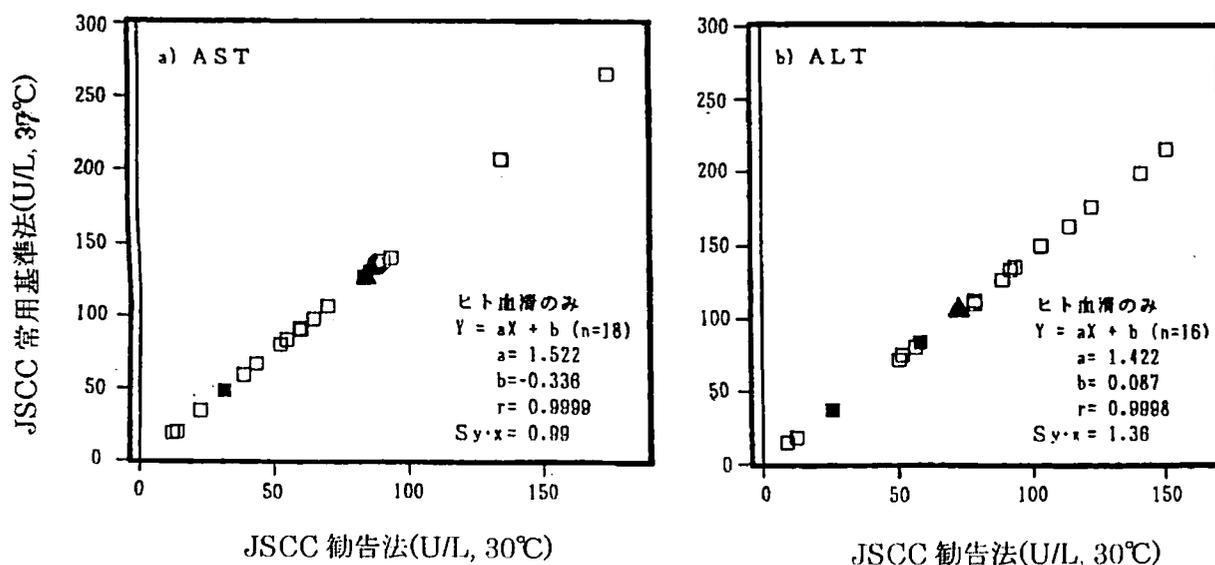


図 3.4 JSCC 勧告法と常用基準法による活性値の相関  
ヒト血清(□)、セラクア・HE(■)、酵素リファレンス(▲)、NIST RM 8430 (●)

## 2) クレアチンキナーゼ活性測定 of 勧告法

CK は筋肉の収縮弛緩に必要なエネルギーの補給の役割を果たし、主に骨格筋や心筋に含まれている。筋ジストロフィーをはじめとする筋疾患で特徴的に血中濃度が増加する酵素である<sup>11)</sup>。

ヒト血清中酵素活性測定 of JSCC 勧告法が 1990 年に公表された際に 3 年毎に見直しをすることになっていたが、今回はじめて JSCC プロジェクトとして取り上げられることになった。筆者らは、CK に関して取り纏めをする機会を得た。

CK of JSCC 勧告法<sup>10)</sup> は、IFCC 勧告法<sup>5, 17, 18)</sup> of 測定条件とほぼ同様で、実験誤差範囲内ではほぼ同一 of 活性値が得られることが確認されている。しかしながら、AST や ALT of 勧告法と同様に、共役酵素 of 活性測定法が定められていないので、1) CK に関しては HK と G6PD 活性測定法を確立し勧告法に追加する、2) JSCC 勧告法 of 自動化法への適応を試みる、3) CK of 活性化剤 of 再検討をすることが必要と考えた。

### 2-1) 共役酵素活性測定 of 提示

CK 活性測定条件下での共役酵素活性測定 of 操作法および試薬終濃度を表 3.9 に示す。まず、G6PD 活性測定は CK 測定用試液 I から HK および G6PD を除外しクレアチンリン酸を添加した溶液を試液 I とし、G6PD (原液から約 200U/L に希釈) をサンプルとして添加後、グルコース-6-リン酸 (G6P) を反応開始液とする。HK 活性測定 of 場合も同様に CK 測定用試液 I から HK を除外しクレアチンリン酸を添加した溶液を試液 I とし、HK (原液から約 200U/L に希釈) をサンプルとして添加後、アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) を反応開始液とする。測定結果より G6PD および HK 原液濃度を算出し、CK 活性測定用試液 I of 調製時に使用する。

表 3.9 共役酵素活性測定用試薬組成および試薬終濃度

添加液	容量, mL	反応液中の試薬終濃度	G6PD	HK
試液 I	2.000	イミダゾール(pH 6.60)	100 mM	
		EDTA	2 mM	
		Mg <sup>2+</sup>	10 mM	
		ADP	2 mM	
		AMP	5 mM	同左
		AP5A	10 μM	
		NAC	20 mM	
		D-グルコース	20 mM	
		NADP <sup>+</sup>	2 mM	
		クレアチンリン酸	30 mM	
		G6PD	—	1500 U/L, 30°C
検体	0.100		約 200 U/L	約 200 U/L
混和後、少なくとも5分間吸光度が一定になるまで予備加温する。				
試液 II	0.200	G6P	10 mM	
		ATP		10 mM
混和後、30°Cで NADPH の増加速度を測定する。				

## 2-2) JSCC 常用基準法の自動化法への適応

表 3. 10 に示すように JSCC 常用基準法の手技を自動分析装置に対応させる目的で、勧告法の試液の容量を全て 1/5 に設定した。自動化法によるヒト血清 9 種および管理血清 7 種の結果(y)と常用基準法による結果(x)との相関を図 3.5 に示す。回帰式は  $y = 0.996x - 1.53$  ( $r = 0.9988$ ,  $S_{yx} = 3.4$  U/L (37°C)) と、両方法による測定値はほぼ一致した。

表 3.10 JSCC 常用基準法の自動化法への適応

	JSCC 常用基準法	自動化検体
試液 I, μL	2000	400
検体, μL	100	20
試液 II, μL	200	40
総量 I, μL	2300	460
サンプル容量比	0.0435	0.0435
測定波長, nm	340	340

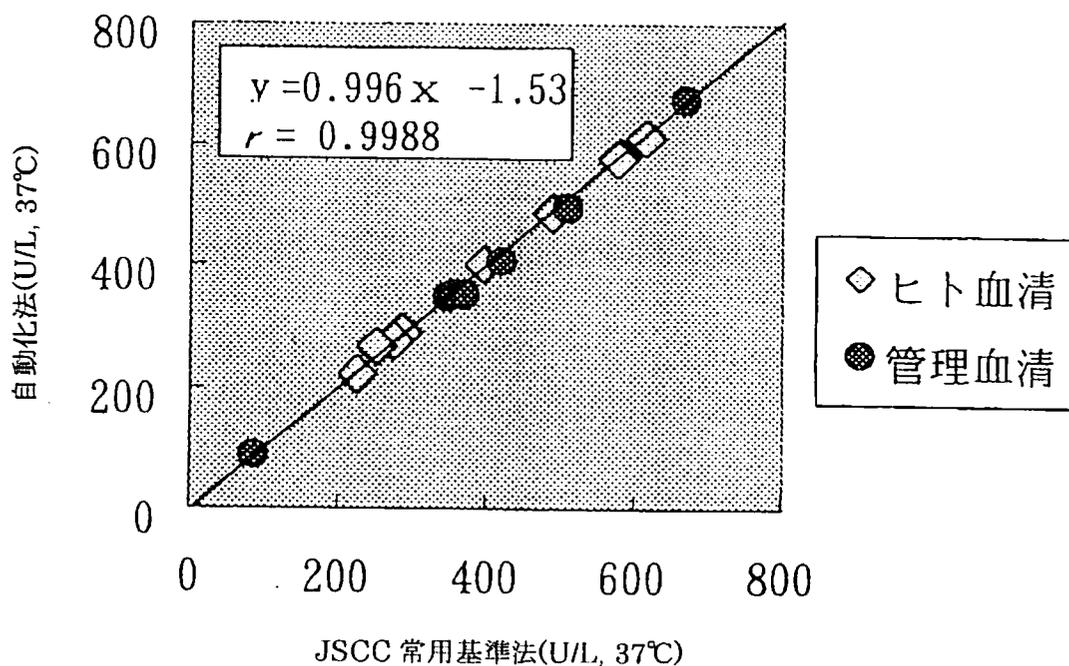


図 3.5 JSCC 常用基準法と自動化法との相関

### 2-3) 活性化剤の検討

血中の活性型 CK は約 20%で、その活性化剤であるチオールの役割は測定において重要である。JSCC は勧告法を設定する際、1) システインは不安定である、2) 2-メルカプトエタノールは高活性化能を有するが悪臭がある、3) チオグリセロールは活性化能が高く安定かつ低臭であるが、溶液状であるため凍結乾燥には適さないなどの理由から、比較的安価、無臭で取り扱い易い N-アセチルシステイン (NAC) を採用した<sup>10)</sup>。市販試薬が液状に移ってきている現在、CK の活性化剤として現勧告法で採用されている NAC に替わってチオグリセロールを採用すべきか否かを判断するために、CK 活性化能とその反応試液の安定性を比較した。

プール血清 2 種、管理血清、および筋疾患患者血清 (n=10) を対象にチオールの CK 活性化剤としての最適性を再検討した。常用基準法と自動化法の両法でヒト血清および管理血清を測定したところ両法による値は一致した。さらに、NAC およびチオグリセロール濃度と自動化法による CK 活性値の関係を図 3.6 に示す。NAC は 5 ~ 40 mM にかけてほぼ一定の値を示したが、チオグリセ

ロールは 40 mM 以上で安定した活性値を示し、NAC より僅かではあるが高い活性値が得られた。また、全検体( n=13)について JSCC 勧告法の 20 mM-NAC と 40 mM-チオグリセロールに替えた試薬で自動化法により測定した結果の相関を図 3.7 に示す。回帰式は  $y=1.03x - 0.03$  (  $r=1.0000$ ,  $S_{yx} = 20.7\text{U/L}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) と、NAC に比較してチオグリセロールによる活性化能の方が平均で約 3% であるが高値を示した。反応の直線性およびラグタイムに関して差は見られなかった。

さらに、CK 活性化剤としての至適濃度である 20 mM NAC および 40 mM チオグリセロール含有 CK 反応試液の調製後 冷蔵保存期間の安定性を図 3.8 に示す。試液 I 調製後冷蔵保存で 1 週間までは両チオールによる差がみられず、CK 活性測定能は約 3% 低下した。

活性化剤として NAC に関する検討結果は JSCC 勧告法策定時に得られたデータを裏付けるものであった。チオグリセロールの CK 活性化剤としての有用性に関しては団野ら<sup>19)</sup> による報告があるが、現勧告法の NAC を 40 mM チオグリセロールに替えても活性化能および試薬の安定性の面で両チオール化合物間に差はなく、CK 活性化剤として現勧告法の NAC をチオグリセロールに変更する必然性は低いと判断させる結果が得られた。

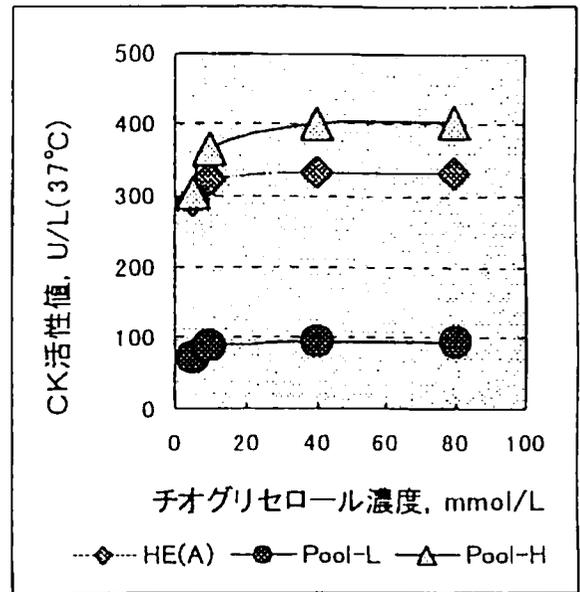
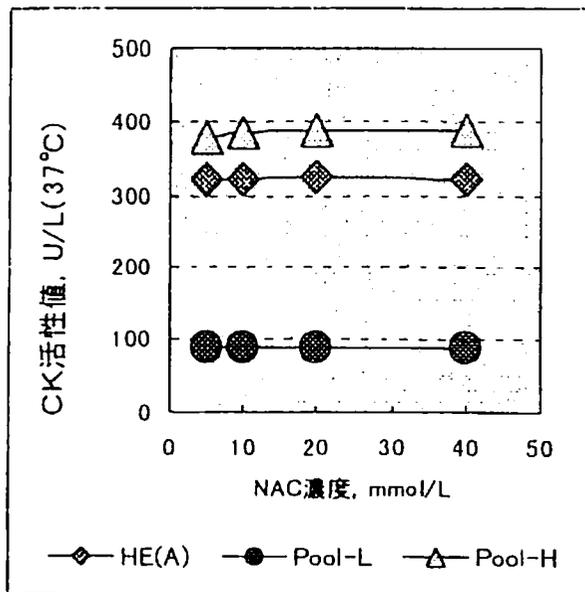


図 3.6 NACおよびチオグリセロールのCK活性値への影響

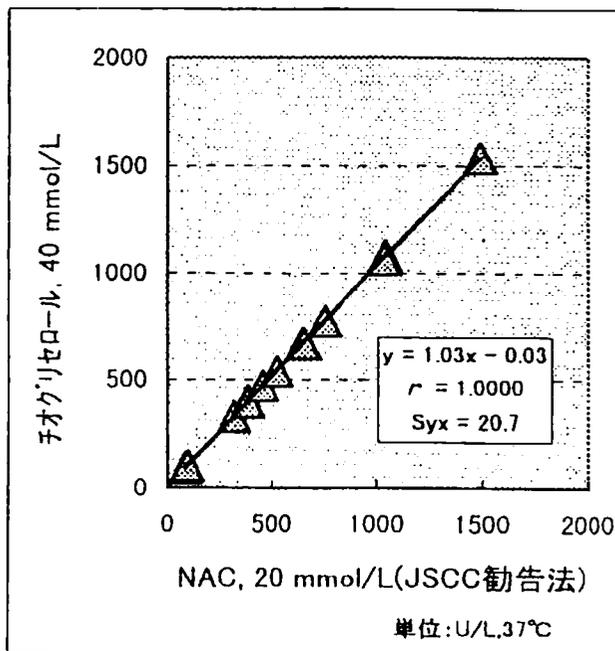


図 3.7 チオール化合物の違いによるCK活性化能の比較

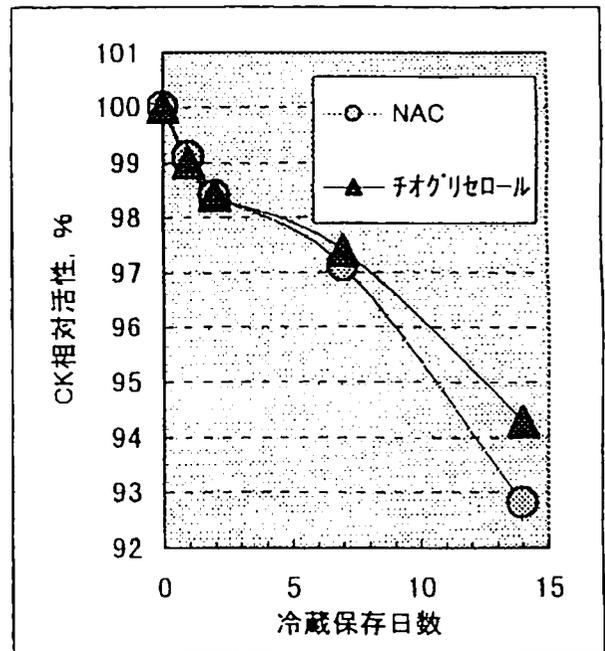


図 3.8 反応試液の安定性

### 3.4 結言

今まで測定した限りにおいてアミノトランスフェラーゼのヒト血清の検体ブランクは小さく、検体ブランク反応を補正しなくても問題はないと思われたが、勧告法は日常法と異なりヒト血清よりもむしろ標準物質の値付けなどの際に用いられることが多いことから、JSCC 勧告法においても検体ブランクを設定し、その値が低値であることの確認が必要であると思われる。

常用基準法の測定条件の妥当性を勧告法のそれと比較しながら検討した結果、基質濃度、pH と活性値の関係や測定精度などの面で、AST および ALT 両酵素ともに勧告法と同程度の条件で測定できることが示唆されたことで、常用基準法を日常検査の基準法として用いることに問題はないと思われた。

CK 活性測定試液中の共役酵素の活性測定がまだ勧告法に明記されていないことより、CK 測定勧告法の条件下での G6PD および HK の測定方法案を提示した。さらに、チオグリセロールと NAC を CK の活性化剤として比較したところ、活性能および反応試液の安定性の面で大差はなく、チオグリセロールに変更する必然性は低いと判断した。CK に限らず現勧告法のサンプル容量比を変えずに自動化が可能であれば、検量用酵素標準物質や JSCC 標準化対応法試薬の開発並びにその評価に利用され、多数の患者血清を測定することで反応性やコンピュータビリティの評価が容易になるものと期待される。さらに国際的ハーモナイゼーションの観点からも、長年の悲願であった酵素検査データの施設間差縮小への期待が高まっている現在、勧告法の見直しは必要最小限の変更に留めるべきであることを提案した。

### 参考文献

- 1) 菅野 剛史, 日本臨床化学会勧告法の背景と臨床評価, *臨床検査*, 37, 468 (1993)
- 2) H.U. Berneyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 2. IFCC Method for Aspartate Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24, 497 (1986)
- 3) H.U. Berneyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 3. IFCC Method for Alanine Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24, 481 (1986)

- 4) R. Bais, M. Philcox, Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **32**, 639 (1994)
- 5) M. Horder, R.C. Elser, W. Gerhardt, M. Mathieu, E.J. Sampson, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 7. IFCC Method for Creatine Kinase. IFCC Recommendation *JIFCC*, **1**, 130 (1989)
- 6) N.W. Tietz, A.D. Rinker, L.M. Shaw, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase, *Clinica. Chimica. Acta.*, **135**, 339F (1983)
- 7) L.M. Shaw, J.H. Stromme, J.L. London, L. Theodorsen, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 4. IFCC Method for  $\gamma$ -glutamyltransferase, *Clinica. Chimica. Acta.*, **135**, 315F (1983)
- 8) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定 の勧告法 (AST), *臨床化学*, **18**, 4, 226 (1989)
- 9) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定 の勧告法 (ALT), *臨床化学*, **18**, 4, 250 (1989)
- 10) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定 の勧告法 (CK), *臨床化学*, **19**, 184 (1990)
- 11) 齊藤 正行, 丹羽 正治, 伊藤 啓, *臨床化学*, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1992)
- 12) A.O. Okorodudu, P.R. Pelletier, A.A. Valcour, G.N.Jr Bowers, McComb RB, Evaluation of the IFCC reference method for alanine aminotransferase : spurious blank ALT activity due to contamination of D-alanine with L-alanine, and recommendations for a correction, *Clin. Chem.* **35**, 153 (1989)
- 13) J.C.M. Hafkenscheld, B.E.M. Kohler, Effects of temperature of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in commercial control sera, *Clin. Chem.* **32**, 184 (1986)
- 14) R. Rej, R.E. Vanderlinde, Effects of temperature on the steadystate kinetics and measurement of aspartate aminotransferases, *Clin. Chem.* **27**, 213 (1981)
- 15) 桑 克彦, 臨床検査の標準化, *医学検査*, **40**, 131 (1991)
- 16) 中山 年正, 島 幸夫, *HEM 研究会記録集*, 44 (1992)
- 17) M. Horder, R.C. Elser, W. Gerhardt, M. Mathieu, E.J. Sampson, Provisional Recommendation IFCC Method for Creatine Kinase, Appendix A(Stage 3, Draft 1, 1987-6)Description of pertinent factors in obtaining optimal conditions for measurements, *Ibid.*, **2**, 26 (1990)
- 18) M. Horder, R.C. Elser, W. Gerhardt, M. Mathieu, E.J. Sampson, Provisional Recommendation IFCC Method for Creatine Kinase, Appendix B(Stage 2, Draft 2, 1986-7)Reagent Specifications – Conditions for Measuring the Catalytic Concentration of Auxiliary and Indicator Enzymes and Their Contaminants, *Ibid.*, **2**, 80 (1990)
- 19) 団野 賢和, 花田 寿郎, 松浦 修治, 活性化剤としてチオグリセロールを用いた CK 活性測定試薬の有用性, *臨床化学*, **25**, 253 (1996)

## 第4章 コミュニタビリティの評価

### 4.1 緒言

検査データが一医療施設での利用に留まらず複数の施設で利用でき、さらに健康管理や予防医学の見地からデータが集積されることで多くの施設で共通の情報としてより有効に活用されるためには、検査データの施設間較差の是正が急務である。なかでも酵素項目は施設間でのデータの比較が著しく困難な状況にあったので酵素検査の標準化の必要性が認識され、各国の臨床化学会をはじめ国際臨床化学連合 (IFCC) より主要な臨床酵素の標準的測定法が定められた<sup>1-6)</sup>。さらに、臨床的評価を明確に提示することによって、勧告法が国内で広く普及することが望ましい。日本消化器病学会・肝機能研究班から“肝硬変等疾患ではアルカリホスファターゼ (ALP) の小腸型アイソザイム ALP<sub>3</sub>を重視し、Kind-King 法により臨床的評価を積み重ねてきた”ことを受けて、日本臨床化学会 (JSCC) が小腸型 ALP<sub>3</sub>を Kind-King 法と同程度に測定できるように意識的に緩衝液を検討したうえで勧告法を設定した。この例からわかるように、臨床的評価を明らかにすることで勧告法の真価が問われた<sup>7)</sup>。さらに、酵素標準物質 (ERM: Enzyme Reference Material) の活用が測定法を統一することなく酵素活性測定データを標準化できる有効な手段であることが広く認識されるに至り、JSCC は常用 ERM の規格を定め<sup>8)</sup>、その確立に向けて作業も展開されはじめた (図 4.1)。

臨床酵素データ統一のためのリファレンスシステムが確立するための手法のひとつとして、Bowers ら<sup>9,10)</sup>が提案している国際臨床酵素目盛 (ICES: the International Clinical Enzyme Scale) がある。本章では市販管理血清が日常分析値の方法間較差の是正にどの程度役立つかを次の手順で実証してみた。

- 1) 多数の患者血清と市販管理血清を基準法および数種の日常法で同時に測定する。
- 2) 日常法による患者血清データについて市販管理血清を仮の酵素標準として扱い、ICES 法により基準法による値に換算する。

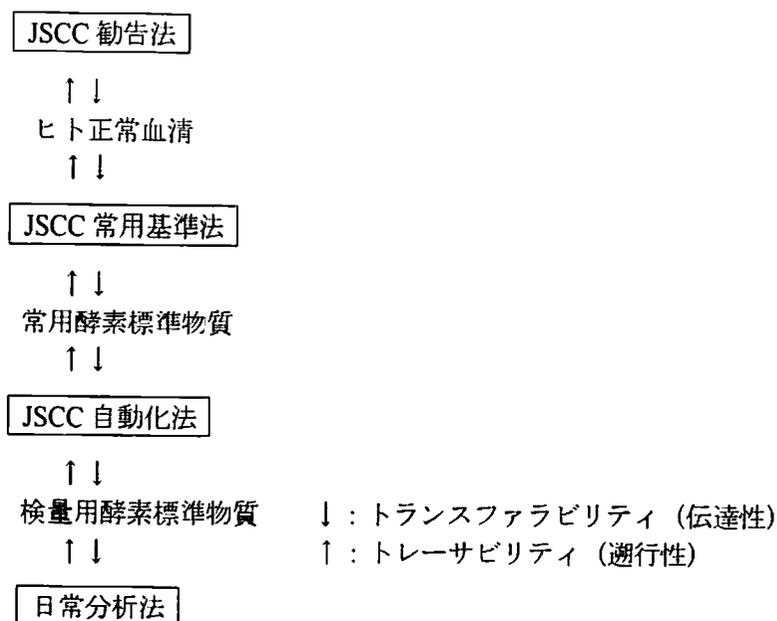


図 4.1 臨床検査データ統一のためのリファレンスシステム

3) 換算値の方法間変動係数 (CV.%) を算出し、市販管理血清による基準法への換算値の収束の程度を把握する。

4) 最後に、基準法と日常法間における換算物質 (市販管理血清) の方法間反応性 (コミュタビリティ<sup>11)</sup>) について、基準値への換算値の偏差 (%) であらわす ECCLS の評価法<sup>12-15)</sup> に準じて評価した。

なお、評価の対象とした酵素活性項目は多岐にわたるので、次節で順に述べる。

## 4.2 実験

### 4.2.1 市販管理血清は日常分析値の方法間差是正にどの程度役立つか

#### 1) アミノトランスフェラーゼ (AST, ALT)

酵素活性測定には日立自動分析装置 7050 形 (H-7050) を使用し、 $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  で実測 K ファクターを用いて行った。JSCC 勧告法<sup>1,2)</sup> に基づき自家調製した試薬による自動化法 (JSCC 法) を日常分析法の評価のための基準法とした。評価対象法として市販試薬から IFCC 法<sup>16,17)</sup>、ピリドキサール 5'-リン酸無添加の IFCC 法 (IFCC-PP)、ダブルケネティック IFCC 法 (IFTW-PP)、スキャンジナビ

表 4.1 各国学会勧告法における AST と ALT の最適測定条件

条件項目	AST				ALT			
	IFCC	JSCC	GSCC	SSCC	IFCC	JSCC	GSCC	SSCC
Buffer	Tris	Tris	リン酸	Tris	Tris	Tris	リン酸	Tris
mM	80	80	80	20	100	100	80	20
pH	7.8	7.8	7.4	7.7	7.3	7.5	7.4	7.4
L-Asp, mM	240	200	200	200	-	-	-	-
L-Ala, mM	-	-	-	-	500	500	800	400
2-OG, mM	12	10	12	12	15	15	18	12
PP, mM	0.10	-	-	-	0.10	-	-	-
NADH, mM	0.18	0.16	0.18	0.15	0.18	0.16	0.18	0.15
MD, U/L	420	500	600	600	-	-	-	-
LD, U/L	600	500	1200	200	1200	2000	1200	2000
Temp. °C	30	30	25	37	30	30	25	37
Sample volume fraction	0.08	0.10	0.12	0.12	0.08	0.10	0.12	0.12

ア臨床化学会勧告法 (SSCC) , ドイツ臨床化学会勧告法 (GSCC) , ポップ法 (POP) , カルメン法 (Karmen)<sup>18)</sup>、ライトマンフランケル法 (RF) の 8 種を選択した。学会勧告法の測定条件を表 4.1 に示す。

患者血清 60 検体、市販管理血清からヒト型酵素を含むセラクリア-HE (normal, abnormal) , 酵素リファレンス、動物由来酵素を含むプレチパス-E、キャリブレータ、モントロールを測定対象に、基準法と評価対象法の計 9 法で同時に測定した。

ICES<sup>9, 10)</sup>による換算値の算出法について、日常法 A による検体 X の実測値  $X_A$  を標準物質 S を用いて基準法 R による値  $X_{RA}$  に換算することを例に示す。

$$X_{RA} = X_A \times (S_R/S_A)$$

$X_A$  : 日常法 A による検体 X の実測値  
 $S_A$  : 日常法 A による標準物質 S の実測値  
 $S_R$  : 基準法 R による標準物質 S の表示値

さらに、基準法と日常法間における換算物質(市販管理血清)のコミュタビリティの評価については ECCLS の評価法<sup>12-15)</sup>に準じ、以下に示すように、基準値に対する換算値の偏差 (%) で評価した。つまり、患者検体 ( $X_i$ ) の日常法 A による測定値 ( $X_{iA}$ ) から換算物質を介した ICES 法による基準法への換算値 ( $X_{iRA}$ ) を求め、基準値 ( $X_{iR}$ ) に対する換算値の偏差を方法毎に多くの検体について計算し、その平均値(d)で評価する。

		基準法	方法 A	方法 B	方法 C	
検体 X <sub>i</sub>	測定値	X <sub>iR</sub>	X <sub>iA</sub>	X <sub>iB</sub>	X <sub>iC</sub>	.....
	換算値		X <sub>iRA</sub>	X <sub>iRB</sub>	X <sub>iRC</sub>	.....

A 法から基準法への換算値の平均偏差 (d) =  $1/n \times |\sum (換算値 / 基準値 - 1)| \times 100 (\%) < 5\%$   
 $= 1/n \times |\sum (X_{iRA} / X_{iR} - 1)| \times 100 (\%)$

### 2) 乳酸デヒドロゲナーゼ(LD)

H-7050 により患者血清と同時に換算物質として 1) ヒトプール血清、2) 数種のヒト由来 LD を含む管理血清、3) 動物由来 LD を含む管理血清、4) CRM 404 (BCR) および LD アイソザイム標品 (LD1, 2, 3, 5) を、学会勧告法準拠試薬 8 種 (うち JSCC 法<sup>3)</sup> 3 種, SFBC 法<sup>19)</sup> 2 種, GSCC 法, SSCC 法, IFCC 法<sup>20)</sup> を用いて 37°C で測定した。表 4.2 に各国学会勧告法の測定条件を示す。

### 3) クレアチンキナーゼ(CK)

H-7050 により患者血清と同時に換算物質として 1) ヒトプール血清、2) 数種のヒト由来酵素管理血清、3) 動物由来 CK を含む管理血清、4) CRM 299 (BCR, ヒト胎盤 BB) を、学会勧告法準拠試薬等 8 種 (うち JSCC 法<sup>4)</sup> として自家調製試薬, アズウェルのネスコート V7, 国際試薬の 3 種, GSCC 法として和光, メルクオート, BMY, 第一化学の 4 種, さらに勧告法以外からダイヤヤトロン) を用いて 37°C で測定した。CK の JSCC 勧告法<sup>4)</sup> は、IFCC 勧告法<sup>21)</sup> の測定条件とほぼ同様に、実験誤差範囲内でほぼ同一の活性値が得られることが確認されている。表 4.3 に各国学会勧告法の測定条件を示す。さらに、一部の患者血清並びに管理血清についてアガロースゲル電気泳動による

表 4.2 各国学会勧告法における LD の最適測定条件

条件項目	IFCC	JSCC	SFBC	GSCC	SSCC
Buffer	MEG	DEA	Tris	リッ酸	Tris
mM	150	300	80	50	50
pH	9.40	8.80	7.20	7.50	7.40
L-Lactate, mM	50	60	-	-	-
Pyruvate, mM	-	-	1.6	0.6	1.2
NAD <sup>+</sup> , mM	10	6	-	-	-
NADH, mM	-	-	0.20	0.18	0.17
Temp, °C	30	30	30	37	25

表 4.3 各国学会勧告法における CK の最適測定条件

条件項目	IFCC	JSCC	GSCC	SSCC
Buffer	イミダゾール			
mM	100			
pH	6.6	同	左	
Creatine-P, mM	30			
NAC, mM	20			
HK, U/L	3000	3000	2500	3500
G6PD, U/L	2000	1500	1500	2000
Temp. °C	30	30	25	37

アイソザイム分析を行った。

4) アルカリホスファターゼ(ALP)

H-7050 により患者血清と同時に換算物質として 1) ヒトブール血清、2) ヒト由来酵素管理血清、3) 動物由来 ALP を含む管理血清を、学会勧告法準拠試薬等 6 種 (IFCC 法<sup>23)</sup> および JSCC 法<sup>9)</sup> として自家調製試薬、GSCC 法として BMJ、その他三光純薬の MEG 法、和光純薬の K-K 法、和光純薬の B-L 法) を用いて 37°C で測定した。表 4.4 に検体の特性を、表 4.5 に学会勧告法の測定条件を示す。

表 4.4 検体の特性

検体	ベース	酵素由来
Pooled serum	-	-
1 E Reference	BSA	ヒト羊膜株化細胞
2 Seraclear-HE(N)	HAS	ヒト羊膜株化細胞
3 Seraclear-HE(A)	HAS	ヒト羊膜株化細胞
Precipath E	BSA	ヒト胎盤由来
4 Seraclear NA	HSA	ウシ腸由来

表 4.5 各国学会勧告法における ALP の最適測定条件

条件項目	IFCC	JSCC	GSCC	MEG	K-K	B-L
Buffer	AMP	EAE	DEA	MEG	炭酸	炭酸
mM	350	1000	1000	440	49	91
pH	10.40	9.90	9.80	9.80	10.20	9.80
4-NPP, mM	16	15	10	15		6.10
PP, mM					3.6	
Mg <sup>2+</sup> , mM	2.0	0.5	0.5	0.1		1.8
Wavelength, nm	405	405	405	405	500	405
Temp. °C	30	30	25			
Sample volume fraction	0.012	0.010	0.012	0.012	0.024	0.091

### 5) $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)

H-7050 により患者血清と同時に換算物質として 1) ヒトプール血清、2) 数種のヒト由来酵素管理血清、3) 動物由来 CK を含む管理血清、4) CRM 299 (BCR、ヒト胎盤 BB) を、学会勧告法準拠試薬等 8 種 (うち IFCC 法<sup>23)</sup> として自家調製試薬、SSCC 法としてネスコート V5 とイヤトロの 2 種、その他に BMY、和光純薬、三光純薬、国際試薬、オートセラ) を用いて 37°C で測定した。表 4.6 に検体の特性を、表 4.7 に各国学会勧告法の測定条件を示す。JSCC 勧告法<sup>6)</sup> は、IFCC 勧告法<sup>23)</sup> の測定条件とほぼ同様で、実験誤差範囲内ではほぼ同一の活性値が得られることが確認されている。

### 4.2.2 酵素標準物質としての評価

酵素検査値の標準化の役割を担う常用酵素標準物質 (ERM) の開発に向けて、アイソザイムの多様性が特に問題になっている ALP および安定供給の面で改良が必要な ALT について検討した。セラクリア-HE についてに添加されている羊膜株化細胞 (FL) 由来の ALP は ERM として満足な結果が得られなかったため、健常者の血清 ALP の主成分である肝・骨型に注目し、骨肉種株化細胞 (OS-1)

表 4.6 検体の特性

検体	酵素由来
Pooled serum	-
Seraclear-HE	マクロファージ細胞
E Reference	マクロファージ細胞
CRM319	ブタ腎由来
Precipath E	牛腎由来
Calibrator	牛腎由来
Moni-Trol	牛腎由来
ORTHO-LR	牛腎由来

表 4.7 各国学会勧告法における GGT の最適測定条件

条件項目	IFCC	JSCC	SSCC	ECCLS
Buffer	全てグリシルグリシン緩衝液			
mM	150	150	100	150
pH	7.9	7.9	7.6	7.7
供与体	G3C4NA	G3C4NA	G4NA	G3C4NA
mM	6.0	6.0	4.0	6.0
Temp. °C	30	30	37	37

G3C4NA: L- $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリン

G4NA: L- $\gamma$ -グルタミル-4-ニトロアニリン

由来 ALP の量産を達成した。また、肝株化細胞 (KN) 由来 ALT は安定供給の面で改良が必要であったので、遺伝子組換えにより得られた ALT (rh-ALT) についても同様に ERM としての評価を行った。

1) 骨肉腫株化細胞由来のアルカリホスファターゼ

H-7050 により患者血清と同時に換算物質として 1) ヒトプール血清、2) 数種のヒト酵素管理血清、3) 動物由来 ALP を含む管理血清、4) OS-1 試作品を、学会勧告法準拠試薬等 7 種 (JSCC 法<sup>5)</sup> : 自家調製試薬, JS-V7, JS-KL の 3 種、IFCC 法<sup>23)</sup> : IF-BM、SSCC 法 : SS-V2, SS-WL の 2 種、MEG 法 : MG-ST) を用いて 37°C で測定した。市販品および試作品検体の特性について表 4.8 に、使用した測定試薬一覧を表 4.9 に、各国学会勧告法の最適測定条件を表 4.10 に示す。

表 4.8 市販血清および試作品の特性

検体	ベース	酵素由来
CRM 371	BSA	ブタ腎
Referzyme	BSA	ブタ腎
Seraclea-HE	HS	ヒト羊膜株化細胞
E Reference	BSA	ヒト羊膜株化細胞
Precipath E	BSA	ヒト胎盤由来
ORTHO-LR	HS	牛腎
OS-1 関連 M-ERM-FD(凍結乾燥後)	HS	骨肉腫株化細胞由来
M-ERM (凍結乾燥前)	HS	骨肉腫株化細胞由来
OS-1A-HS	HS	骨肉腫株化細胞由来
OS-1A-BSA	BSA	骨肉腫株化細胞由来

表 4.9 日常法試薬(ALP)の一覧

略号	準拠	試薬名	メーカー
JSCC	JSCC	自家調製	-
JS-V7	JSCC	ネスコート ALP-V7	アズウェル
JS-KL	JSCC	ALP-L	国際試薬
IF-BM	IFCC	ALP-IFCC	BMY
SS-V2	SSCC	ネスコート ALP-V2	アズウェル
SS-WL	SSCC	L-タイプワコー	和光純薬
MG-ST	-	サンテスト ALP-N	三光純薬

表 4.10 各国学会勧告法における ALP の最適測定条件

条件項目	IFCC	JSCC	SSCC	GSCC	MEG
Buffer	AMP	EAE	DEA	DEA	MEG
mM	350	1000	1000	1000	440
pH	10.40	9.90	9.80	9.80	9.80
4-NPP, mM	16	15	10	10	15
Mg <sup>2+</sup> , mM	2.0	0.5	0.5	0.5	0.1
Wavelength, nm	405	405	405	405	405
Temp. °C	30	30	37	25	
Sample volume fraction	0.012	0.010	0.012	0.012	0.012

## 2) 遺伝子組換え ALT

H-7050 により患者血清と同時に換算物質として 1) ヒトプール血清、2) 数種のヒト由来酵素管理血清、3) 動物由来 ALT を含む管理血清、4) 遺伝子組換えにより得られたヒト ALT (rh-ALT) 試作品を、学会勧告法準拠試薬等 6 種 (JSCC 法<sup>2)</sup>：自家調製試薬 JS-V7、JS-KE の 3 種、IFCC 法<sup>17)</sup>：IF-ST、GSCC 法：GS-KA、SSCC 法：SS-V2) を用いて 37°C で測定した。遺伝子組換えにより得られたヒト ALT (rh-ALT) は脱脂ヒト血清ベース (HS) および 3% 牛血清アルブミン (BSA) に添加し、その凍結乾燥前 (rh-ALT-HS、rh-ALT-BSA) および後 (rh-ALT-HS-FD、rh-ALT-BSA-FD) について評価した。市販品検体の特性について表 4.11 に、使用した測定試薬一覧を表 4.12 に、各国学会勧告法の測定条件を表 4.13 に示す。

表 4.11 市販血清の特性

検 体	ベース	酵素由来
Seraclea-HE	HS	肝株化細胞
E Reference	BSA	肝株化細胞
ORTHO-LR	HS	ブタ心
Moni-Trol	HS	ブタ心

表 4.12 日常法試薬(ALT)の一覧

略号	準拠	試薬名	メーカー
JSCC	JSCC	自家調製	-
JS-V7	JSCC	ネスコート ALP-V7	アズウェル
JS-KE	JSCC	GPT-E	国際試薬
GS-KA	GSCC	GPT-A	国際試薬
SS-V2	SSCC	ネスコート ALP-V2	アズウェル
IF-ST	IFCC	サンテスト GPT-IF	三光純薬

表 4.13 各国学会勧告法における ALT の最適測定条件

条件項目	IFCC	JSCC	GSCC	SSCC
Buffer	Tris	Tris	リン酸	Tris
mM	100	100	80	20
pH	7.3	7.5	7.4	7.4
L-Ala, mM	500	500	800	400
2-OG, mM	15	15	18	12
PP, mM	0.10	-	-	-
NADH, mM	0.18	0.16	0.18	0.15
LD, U/L	1200	2000	1200	2000
Temp. °C	30	30	25	37
Sample volume fraction	0.083	0.100	-	0.120

#### 4.2.3 リファレンスシステム

我が国では酵素検査値の是正を目的として、1989年から日本臨床化学会（JSCC）より勧告法が公表され<sup>1-6)</sup>、その後1992年、測定温度を補うためにJSCC勧告法から誘導された常用基準法を標準化の基盤に置くことに合意が得られた。さらに1996年、常用基準法による認証値を表示した常用酵素標準物質(ERM)の規格<sup>6)</sup>を公表し、図4.1に示した測定体系による酵素検査値の標準化を提案している。さらに、日常検査法のうちで測定値が検量用ERMを介して基準法の値にトレーサブルな分析法をJSCC標準化対応法と定義した。

そこで、緩衝液によってアイソザイムの反応性が異なるアルカリホスファターゼ（ALP）活性測定を例に、市販の測定試薬を中心にそれらのJSCC標準化対応法としての評価、さらに、ヒト型酵素添加マルトコントロール血清の改良品についてJSCC標準化対応法間での共通の検量用ERMとしての評価をした。

##### 1) ALPを例にしたリファレンスシステムの検証

ALP活性測定の各国学会勧告法は全て4-ニトロフェニルリン酸（4-NPP）を基質とし、緩衝液の種類が違ふことで測定値が2～3倍も異なる。緩衝液にJSCC<sup>5)</sup>はエチルアミノエタノール（EAE）を、GSCCはN-メチルグルカミン（MEG）を、IFCC<sup>2,3)</sup>はアミノメチルプロパノール（AMP）を、SSCCはジエタノールアミン（DEA）を採用し、各々測定温度における最適な濃度およびpHにて

表 4.14 各国学会報告法における ALP の最適測定条件

条件項目	JSCC	GSCC	IFCC	SSCC	旧 GSCC
緩衝液	EAE	MEG	AMP	DEA	DEA
mM	1000	500	350	1000	1000
pH(30°C)	9.87	10.1	10.40	9.80	9.80
4-NPP, mM	15	20	16	10	10
Mg <sup>2+</sup> , mM	0.5	0.5	2.0	0.5	0.5
Zn <sup>2+</sup> , mM	—	—	1.0	—	—
普及率(%)	70	1	2	13	9

表 4.15 評価対象法試薬(ALP) 一覧

略号	試薬名	準拠	緩衝液	メーカー
JS-V7	ALP-V7	JSCC	EAE	アズウェル(株)
JS-IR	ALP 試薬 L <sup>29)</sup>	JSCC	EAE	国際試薬(株)
GS-A	自家調製	GSCC	MEG	—
GS-IR	ALP(M)試薬 L <sup>29)</sup>	GSCC	MEG	国際試薬(株)
MEG-ST	サテス ALP-N	—	MEG	三光純薬(株)
IF-BM	IFCC	IFCC	AMP	ロッシュ(株)
SS-V2	ALP-V2	SSCC	DEA	アズウェル(株)
SS-W	タイプ <sup>30)</sup>	SSCC	DEA	和光純薬(株)

設定されている。また、4-NPP, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> の濃度には若干の差が見られた。さらに、我が国の臨床ではここ数年 JSCC 準拠法市販試薬が急速に普及し、EAE 緩衝液系が 70%、旧 GSCC 準拠法を含む DEA 緩衝液系が 22%を占めている<sup>24)</sup>。

表 4.15 に今回使用した評価対象法の試薬を示す。EAE 緩衝液系からアズウェル(株)と国際試薬(株)の 2 試薬、MEG 緩衝液系から自家調製試薬、国際試薬(株)、三光純薬(株)の 3 試薬、AMP 緩衝液系からロッシュ(株)の試薬、DEA 緩衝液系からアズウェル(株)と和光純薬(株)の 2 試薬の計 8 試薬を用いた。

#### 1-1) 評価対象法の反応性

これらの市販の測定試薬を JSCC 標準化対応法として評価すること、さらに、市販管理血清等とその JSCC 標準化対応法間での共通の検量用 ERM としての評価および検討を以下に示す JSCC からの JSCC 標準化対応法としての酵素反応試験法<sup>31)</sup>の手順に従って行った。

### (1) 直線性検定

評価対象域内の異常低値、高値 2 濃度のヒト血清を用いて 4 種類以上の等間隔希釈調製試料を作成した各試料について、反応性評価法、すなわち基準法 (x) と評価対象法、すなわち伝達すべき測定法 (y) の両方で連続 5 回測定した。

### (2) 測定法の精密度

評価対象測定域内に値がほぼ均等に分布する n 個 (少なくとも 40 種類以上) の新鮮な患者検体を用意した。対照となる反応性評価法(x)と評価対象法 (y) とで、それらの検体をそれぞれランダムに 2 回測定した。また、ERM を両測定法で連続 5 回測定し、その平均値を  $X_R$ ,  $Y_R$  とした。n 個の患者検体 2 回の測定値に対し一元配置の分散分析を適応し、精密度の推定値を表す標準偏差  $SD_x$ ,  $SD_y$  を求めた。

### (3) 測定方法間における患者検体の反応性

反応性評価法による 1 回目の測定値を x 軸に、評価対象法による 1 回目の測定値を y 軸にとったときの回帰直線  $y = a + bx$  と残差標準偏差  $S_{y,x}$  を求めた。さらに、x の測定誤差による影響を除いたときの残差標準偏差  $S_{y,x}$  を求めた。 $S_{y,x}$  が  $SD_y$  の 3 倍を超えたとき、患者検体の酵素の反応性が両測定法で異なると判定した。

### (4) ERM と患者検体との間の酵素の反応性

反応性評価法と評価対象法の両測定法の評価対象域内における直線性、および、両測定法間において種々の患者検体の測定値に乖離が見られず一定の関係が見られること、の 2 点を確認できた測定法を ERM の評価法として取り扱うことができる。上記 (3) で求めた回帰直線のまわりの信頼区間を求め、ERM の連続 5 回測定の平均値  $X_R$ ,  $Y_R$  がその信頼区間を外れた場合は、優位水準  $\alpha$  で患者検体に対する反応の一致性が棄却される。

#### 1-2) ERM としての反応性の評価法の提示

ERM の反応性の評価を 1) JSCC 法と 2) ECCLS 法の二法で比較した。JSCC 法は、反応性評価法

(x)と JSCC 標準化対応法 (y) の 2 方法間の回帰直線の 95%信頼限界内に ERM 候補品の JSCC 標準化対応法による測定値が存在するかで判断される。ECCLS 法は患者検体の反応性評価法による測定値に対して、JSCC 標準化対応法による測定値から ERM 候補品を介した反応性評価法への換算値の相対残差を各検体について計算し、その平均値(d)で評価する。以上の内容のまとめを以下に示す。

ERM 候補品のコンピュータビリティの評価

JSCC 法：回帰直線のまわりの 95%信頼区間内 .....(1)

ECCLS 法：基準値に対する換算値の平均偏差(d) < 5% .....(2)

$$d = 1/n \times [ \sum ( \text{換算値} / \text{基準値} - 1 ) ] \times 100 \quad (\%)$$

### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 市販管理血清は日常分析値の方法間較差是正にどの程度役立つか

##### 1) アミノトランスフェラーゼ(AST, ALT)

##### 1-1) 基準法(JSCC 法)との相関性

表 4.16 に患者血清約 60 種データによる基準法に対する日常分析法の回帰分析結果を示す。基準法との相関性から ライトマンフランケル法 (RF) とピリドキサル 5'-リン酸 (PP) を試薬に含む IFCC 法の二法を除く 6 法を JSCC 標準化対応法とみなしてコンピュータビリティの評価対象法として使用した。

##### 1-2) ICES 法による基準法への換算効果

表 4.17 に市販管理血清による基準法 (JSCC 法) への換算値の収束効果を示す。AST の測定値の方法間 CV は 12.5%であった。これに比較してヒト型酵素を含む管理血清のセラクリア-HE およびその液状品 (HE-L) による基準法への換算値の方法間 CV は、血清標準と同程度の 2%にまで収束した。ALT ではヒト型酵素は動物由来酵素に比較して大幅に改善されたが、AST と比較して換算値の方法間 CV が若干高値を示した。

表 4.16 基準法(JSCC 法)に対する日常分析法の相関性

評価対象法	AST				ALT			
	a	b	r	S <sub>yx</sub>	a	b	r	S <sub>yx</sub>
IFCC	2.22	1.11	0.9929	8.39	0.25	1.24	0.9963	6.91
IFCC-PP	-0.32	1.01	1.0000	0.54	0.33	1.04	0.9999	0.99
IFTW-PP	-0.40	1.01	0.9988	1.28	0.02	0.98	0.9985	3.43
SSCC	0.16	1.01	0.9999	0.71	-0.50	0.98	0.9998	1.12
GSCC	-0.38	0.96	0.9999	0.66	0.17	0.99	0.9999	0.91
POP	0.36	0.77	0.9995	1.52	1.18	0.76	0.9989	2.30
Karmen	0.12	0.74	0.9994	1.55	0.13	0.57	0.9994	1.25
RF	6.22	0.24	0.9814	4.71	1.04	0.21	0.9836	2.99

$y = a + bx$  (n=60), x : JSCC 法, y : 評価対象法

表 4.17 市販管理血清による基準法(JSCC 法)への換算値の収束効果

換算物質	AST		ALT	
	mean, U/L	CV, %	mean, U/L	CV, %
None(raw)	101	12.5	113	18.0
Pooled serum(1)	105	1.3	129	2.2
Pooled serum(2)	108	1.3	127	2.2
SeraClear-HE				
Normal	113	2.4	124	2.7
Abnormal	108	1.3	127	2.5
HE-L	111	2.4	124	2.5
Enzyme Reference	106	3.3	127	8.4
Precipath E	109	3.0	121	11.8
Moni-Trol II	106	6.6	121	14.6

### 1-3) コミュータビリティの評価

患者血清の基準法による値への換算値の偏差(%)を用いて、基準法と日常法間における換算物質(市販管理血清)の方法間反応性を表 4.18 (AST) と表 4.19 (ALT) に示す。

ヒト型酵素は AST, ALT とともに各種学会勧告法以外に勧告法とは測定原理の全く異なる POP 法においても基準法とのコミュータビリティが優れていた。これに対して、動物由来酵素は POP や Karmen 法のみならず基準法と測定原理が同一である GSCC 法においてもコミュータビリティが得られず、ALT で高値を示す傾向がみられた。

表 4.18 コミュニタビリティの評価(AST) 単位：%

換算物質	JSCC	IFCC-PP	IFTW-PP	SSCC	GSCC	POP	Karmen
Pooled serum	0.0	0.5	1.2	0.9	0.2	1.5	2.2
Seraclear-HE							
Normal	0.0	-1.2	0.7	1.4	-3.1	0.9	0.4
Abnormal	0.0	-1.3	0.2	0.4	-0.1	0.3	-2.1
HE-L	0.0	1.2	0.4	0.2	2.6	0.3	6.4
Enzyme Reference	0.0	0.3	0.5	-1.1	-3.1	0.4	-7.2
Precipath E	0.0	0.1	-2.2	0.5	-5.2	-6.1	1.5
Calibrator	0.0	-1.2	0.0	0.3	-5.4	-7.3	-3.3
Moni-Trol II	0.0	0.1	-2.6	0.2	-2.5	-11.5	-15.4

表 4.19 コミュニタビリティの評価(ALT) 単位：%

換算物質	JSCC	IFCC-PP	IFTW-PP	SSCC	GSCC	POP	Karmen
Pooled serum	0.0	0.5	-3.1	-0.9	-0.2	1.5	0.3
Seraclear-HE							
Normal	0.0	-0.9	-2.7	-1.4	-2.0	-0.4	-0.4
Abnormal	0.0	2.0	2.0	-1.1	-0.2	0.4	1.4
HE-L	0.0	-0.1	-2.5	-1.1	0.5	0.7	3.3
Enzyme Reference	0.0	2.1	-1.7	0.1	0.7	3.4	23.1
Precipath E	0.0	6.9	-3.5	2.5	11.8	22.0	10.2
Calibrator	0.0	6.8	-2.7	0.7	12.0	22.1	9.3
Moni-Trol II	0.0	8.2	5.4	12.0	-1.7	10.4	29.5

2) 乳酸デヒドロゲナーゼ(LD)

2-1) アイソザイム分析

表 4.20 に酵素の由来とアガロースゲル電気泳動によるアイソザイム分析結果を示す。CRM 404

表 4.20 酵素の由来と LD アイソザイム分析結果 単位：%

検体	酵素由来	LD <sub>1</sub>	LD <sub>2</sub>	LD <sub>3</sub>	LD <sub>4</sub>	LD <sub>5</sub>
Pooled serum		35	40	19	3	3
CRM404	H-RBC	100	-	-	-	-
Seraclear-HE(A)	H-RBC	35	37	21	1	6
E-Reference	H-RBC	37	32	28	2	1
ORTHO-LR	hen heart	7	13	7	69	5
Moni-Trol	bird muscle	5	6	6	83	-
Precipath E	pig heart	100	-	-	-	-
Calibrator	pig heart	80	12	6	1	1

LD<sub>1</sub> : 心由来サブユニット(H) 4 量体, H<sub>4</sub>

LD<sub>2</sub> : H<sub>3</sub> M

LD<sub>3</sub> : H<sub>2</sub> M<sub>2</sub>

LD<sub>4</sub> : H M<sub>3</sub>

LD<sub>5</sub> : 筋由来サブユニット(M) 4 量体, M<sub>4</sub>

はヒト赤血球由来酵素を含有し、主要アイソザイムはLD<sub>1</sub>であった。セラクリア-HEはヒト血清と同様のアイソザイム構成を示した。オーソリキッドリファレンス、モノトロール、キャリブレータはヒト血清ベースに動物由来LDが、プレチパス EはBSA ベースに動物由来LDが添加されており、添加酵素の特徴が現れていた。

## 2-2) 基準法(IFCC 法)との相関性

表 4.21 に患者血清 98 検体のデータによる基準法に対する日常分析法の回帰分析結果を示す。基準法との相関性から 7 法全てを標準化対応法とみなして コミュータビリティの評価対象法として使用した。

## 2-3) ICES 法による基準法への換算効果

表 4.22 に市販管理血清による基準法 (JSCC 法) への換算値の収束効果を示す。患者血清 98 検体の測定値の 8 方法間 CV は 39%であったが、ヒト由来酵素を含む管理血清による換算結果はプール血清と同程度の 2%まで減少した。動物由来の LD を含む管理血清による換算結果が 5～ 7%程度に留まったのは、ピルビン酸を基質とする方法で換算性がヒト由来のものに比べて劣ることが原因であった。ヒト由来アイソザイムのなかでは LD<sub>2</sub> が最も方法間の互換性が高いと考えられる (表 4.23)。

表 4.21 基準法に対する日常分析法の相関性(LD)

評価対象法	a	b	r	S <sub>yx</sub>
JSCC-1	15.5	0.94	0.9990	2.3
JSCC-2	12.6	0.98	0.9972	3.8
JSCC-3	5.5	0.96	0.9984	3.0
SFBC-1	2.4	2.15	0.9993	2.0
SFBC-2	-3.7	2.19	0.9995	1.7
GSCC	-18.6	1.78	0.9950	5.5
SSCC	6.7	2.16	0.9975	3.7

$y = a + bx$  (n=98), x : IFCC 法, y : 評価対象法

表 4.22 市販管理血清によるの換算値の収束効果

換算物質	mean.U/L	CV.%
None(raw)	933	38.6
Pooled serum	627	2.6
Seraclear-HE		
Normal	627	2.6
Abnormal	621	2.6
E Reference	620	2.6
ORTHO-LR	579	5.8
Moni-Trol	569	7.5
Precipath E	598	6.9
Moni-Trol	608	5.0

表 4.23 ヒト由来酵素の収束効果

換算物質	mean.U/L	CV.%
None(raw)	633	39.1
Pooled serum	423	1.7
Seraclear-HE	418	2.1
E Reference	419	2.1
CRM404	406	4.9
LD1	400	4.5
LD2	414	2.3
LD3	411	3.8
LD5	419	11.6

## 2-4) コミュータビリティの評価

患者血清の基準法による値からの換算値の偏差 (%) を用いて、基準法と日常法間における換算物質 (市販管理血清) のコミュータビリティを表 4.24 に、さらにヒト由来酵素と各アイソザイムのコミュータビリティの結果を表 4.25 に示す。

表 4.24 コミュータビリティの評価 1 (LD)

単位: %

換算物質	IFCC	JSCC1	JSCC2	JSCC3	SFBC1	SFBC2	GSCC	SSCC
Pooled serum	0.0	-1.8	-0.8	-0.2	0.1	2.8	2.2	1.4
Seraclear-HE								
Normal	0.0	-0.8	2.2	2.6	-0.9	-1.1	-1.7	2.1
Abnormal	0.0	-0.1	1.1	0.6	-2.1	-2.0	-3.2	-0.3
E Reference	0.0	-1.6	0.9	1.8	-2.3	-2.2	-2.2	-0.8
ORTHO-LR	0.0	0.8	1.2	1.0	7.8	8.2	8.0	8.2
Precipath E	0.0	-0.7	1.9	-0.8	12.5	12.1	11.7	8.9
Calibrator	0.0	-1.3	1.2	1.5	7.9	8.5	7.5	6.2
Moni-Trol II	0.0	1.2	1.1	0.2	12.2	12.2	12.4	12.5

表 4.25 コミュータビリティの評価 2 (LD)

単位: %

換算物質	IFCC	JSCC1	JSCC2	JSCC3	SFBC1	SFBC2	GSCC	SSCC
Pooled serum	0.0	0.1	-0.2	-0.4	0.1	1.8	2.2	1.6
Seraclear-HE								
Abnormal	0.0	0.8	1.1	0.1	-1.9	-1.8	-3.8	-0.3
E Reference	0.0	-1.6	0.1	2.3	-2.7	-1.6	-1.8	-0.4
CRM404	0.0	2.3	0.1	7.6	5.6	-3.1	9.1	-4.4
LD1	0.0	0.8	0.3	1.7	8.2	5.3	8.1	6.3
LD2	0.0	0.2	1.2	3.8	-1.8	-0.6	-1.7	0.7
LD3	0.0	-6.3	-0.9	-3.4	-1.1	0.2	6.6	0.8
LD5	0.0	10.8	-0.1	10.5	1.2	-0.6	26.2	5.5

ビルビン酸基質の試薬系において動物由来 LD はコンピュータビリティが得られなかった。ヒト LD の各アイソザイムのなかでは分画比率の高い LD<sub>2</sub> の評価が最も良好であったが、健常ヒト血清のアイソザイム組成に近似するものが常用 ERM としてより適することが示唆された。

### 3) クレアチンキナーゼ(CK)

#### 3-1) アイソザイム分析

表 4. 26 に酵素の由来とアガロースゲル電気泳動によるアイソザイム分析結果を示す。患者血清は CK-MM がほとんどであった。ヒト酵素として CRM299 はヒト胎盤由来の CK-BB、オーソ-LR は CK-MM、Aalto Control II は CK-MM と BB が 90、10%、セラクリア-HE と酵素リファレンスは CK-MM と BB の構成であった。動物酵素としてプレチパス E とキャリブレータは CK-MM、モニターは CK-MB であった。

#### 3-2) 基準法 (JSCC 法) との相関性

表 4. 27 に患者血清 80 検体のデータによる基準法に対する日常分析法の回帰分析結果を示す。基準法との相関性より、7 法全てを標準化対応法とみなして コミュータビリティの評価対象法として使用した。

表 4. 26 酵素の由来と CK アイソザイム分析結果 単位：%

検体	酵素由来	BB	MB	MM	Band1
CRM299	H-placenta	94	1	4	-
Pooled serum		-	3	97	-
Seraclear-HE(A)	H-embryo kidney	19	2	79	-
E-Reference	H-embryo kidney	34	2	64	-
AaLTO	H-heart,muscle	-	11	89	-
ORTHO-LR	H-muscle	-	1	99	-
Moni-Trol	pig heart	-	90	6	4
Precipath E	pig serum	-	1	99	-
Calibrator	pig serum	6	2	92	-

表 4.27 基準法に対する日常分析法の相関性

評価対象法	a	b	r	S <sub>yx</sub>
JSCC2	-5.3	1.05	0.9991	2.2
JSCC3	-6.2	0.99	0.9993	1.8
GSCC1	-6.5	1.06	0.9990	2.2
GSCC2	-3.2	1.03	0.9994	1.8
GSCC3	-4.5	1.02	0.9992	2.0
GSCC4	-9.6	1.02	0.9984	2.9
DI	-5.3	1.05	0.9991	2.1

$y = a + bx$  (n=80), x : JSCC1, y : 評価対象法

### 3-3) ICES 法による基準法への換算効果

表 4.28 に市販管理血清による基準法 (JSCC 法) への換算値の収束効果を示す。CK は世界的規模で測定方法が統一化されているため患者血清 80 検体の測定値の 8 方法間 CV は 2.5% と良好であり、このことは表 4.27 の相関性からも理解できる。換算値の 8 方法間 CV は、ヒト由来 CK を含むものではアイソザイムの種類やその組成に関係なく血清標準とほぼ同程度の 2% であった。一方、動物由来 CK を含む管理血清による方法間 CV が測定値のそれより大きく、換算値による収束に期待できないものが存在した。なかでもブタ心筋由来 CK 添加のモニトロールによる換算値の方法間 CV は 7% にも及んだ。

### 3-4) コミュニタビリティの評価

患者血清の基準値に対する換算値の偏差(%)を用いて、基準法と日常法間における換算物質 (市販

表 4.28 市販管理血清によるの換算値の収束効果

換算物質	mean.U/L	CV, %
None(raw)	899	2.5
Pooled serum	905	2.0
CRM299	878	2.0
Scraclear-HE		
Normal	914	2.2
Abnormal	919	1.6
E Reference	911	1.7
AALTO	889	1.8
ORTHO-LR	936	1.8
Moni-Trol	906	7.3
Precipath E	954	2.6
Moni-Trol	932	2.5

表 4.29 コミュタビリティの評価 (CK)

単位：%

換算物質	JSCC1	JSCC2	JSCC3	GS-1	GS-2	GS-3	GS-4	DI
Pooled serum	0.0	4.7	0.6	3.1	2.5	1.8	1.0	3.2
CRM299	0.0	0.2	-0.5	-1.2	-3.0	-2.5	0.5	-3.1
Seraclear-HE								
Normal	0.0	4.5	3.5	5.6	4.8	5.0	1.3	3.5
Abnormal	0.0	3.1	2.2	3.7	3.2	3.0	2.6	3.4
Enzyme Reference	0.0	3.6	2.9	2.9	3.3	1.5	2.7	2.0
AaLTO	0.0	1.9	1.1	1.2	1.5	0.1	-2.3	1.9
ORTHO-LR	0.0	1.6	2.2	3.3	3.9	2.2	2.0	3.9
Precipath E	0.0	3.4	6.0	3.1	1.2	1.5	-0.7	5.1
Calibrator	0.0	2.8	6.9	3.3	2.1	2.2	0.6	6.2
Moni-Trol II	0.0	10.1	7.3	-1.2	-4.9	0.1	10.9	10.4

管理血清)の方法間反応性を表 4.29 に示す。CK は測定方法が統一化されているため換算前の方法間 CV が 2.5%と良好であり、反応性の異なる動物由来 CK で換算する必要はないと思われた。

#### 4) アルカリホスファターゼ(ALP)

##### 4-1) IFCC 並びに JSCC 法による反応特性

表 4.30 に IFCC および JSCC 法に基づくヒトプール血清とセラクリア-HE の反応特性を示す。セラクリア-HE が最大活性を示す緩衝液の pH は、ヒトプール血清のそれと比較して IFCC 並びに JSCC 両法で 30℃では多少異なり、37℃では一致した。見掛けの Km 値は、両方法で 37℃の値が 30℃の値より低く、また、セラクリア-HE の値はヒトプール血清の値に比較して、全て低い傾向を示した。

表 4.30 IFCC 並びに JSCC 法に基づく反応特性

準拠法		30℃				37℃			
		HE-N	HE-A	HPS1	HPS2	HE-N	HE-A	HPS1	HPS2
IFCC	pH	-	10.59	10.40	-	-	10.40	10.40	-
	Km	1.14	1.20	1.59	1.50	0.69	0.81	1.05	1.06
JSCC	pH	-	10.02	10.21	-	-	9.86	9.86	-
	Km	1.14	1.31	1.31	1.27	0.90	0.91	1.08	0.97

#### 4-2) IFCC 法と JSCC 法との相関性

H-7050 により IFCC 並びに JSCC の両法でヒト血清 (n=48 うち患者血清 n=16) を 37°C で測定した結果を図 4.3 に示す。相関係数  $r$  は 0.9939,  $S_{yx} = 82.8 \text{ U/L}$  (37°C) で 1 検体のみ大きく乖離した。この検体を除く相関係数  $r$  は 0.9997,  $S_{yx} = 18.8 \text{ U/L}$  (37°C) となった。IFCC 法に対する JSCC 法の活性比は、ヒト血清の  $2.97 \pm 0.23$  (n=48) に対して、セラクリア-HE は 3.52、酵素リファレンスは 2.29、セラクリア-NA (CC-26NA) は 2.06 であった。

#### 4-3) ICES 法による基準法への換算効果

表 4.31 に市販管理血清による基準法(IFCC法)への換算値の収束効果を示す。患者血清 (n=48) の測定値の 6 方法間 CV は 58% と大きく変動した。ICES 法による換算値の方法間 CV は、ウシ小腸由来酵素添加のセラクリア NA の 40% に比較してヒトプール血清による 9% とかなり改善され、次いで添加酵素の少ないセラクリア-HE(N)の 15% であった。

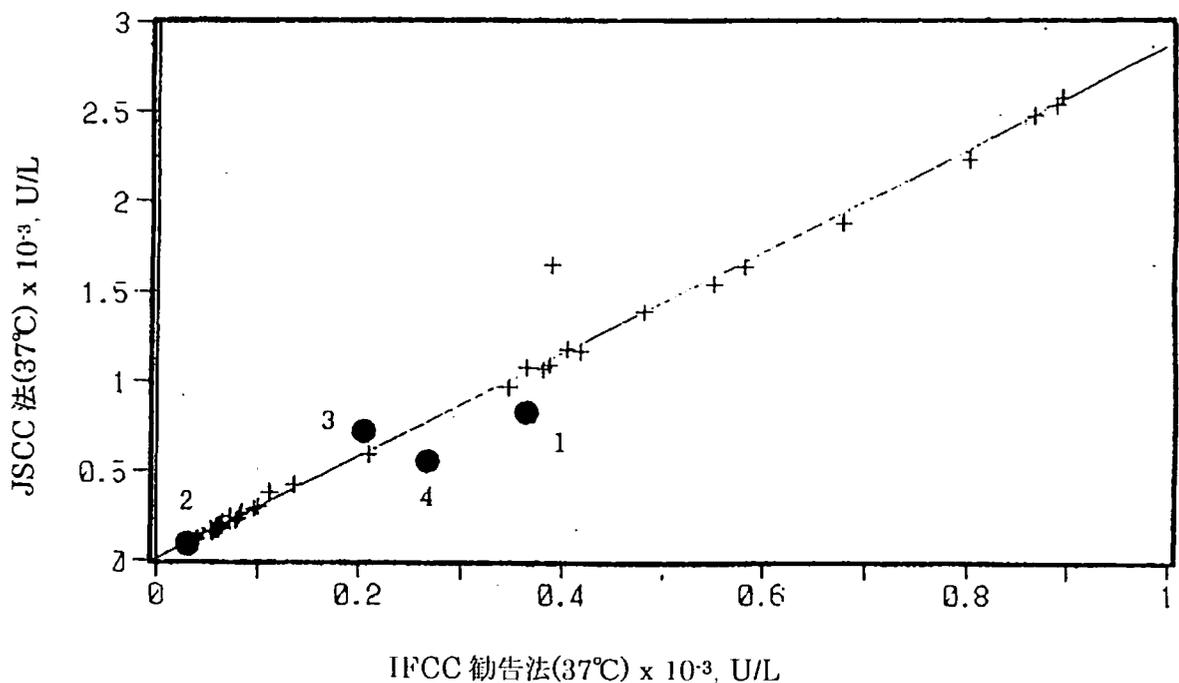


図 4.3 IFCC 法と JSCC 法との相関  
 + : ヒト血清(n=48) ● : 管理血清(番号は表 4.4 に同じ)

表 4.31 市販管理血清によるの換算値の収束効果

換算物質	mean.U/L	CV,%
None(raw)	899	58
Pooled serum	260	9
Seraclear-HE		
Normal	346	15
Abnormal	244	27
E Reference	363	17
Precipath E	305	17
Seraclear NA	217	40

4-4) コミュータビリティの評価

患者血清の基準値に対する換算値の偏差(%)を用いて、基準法と日常法間における換算物質(市販管理血清)の方法間互換性を表 4.32 に示す。ヒトプール血清はB-L法で高値に測定されているため、換算値は低値を示しているがそれ以外の方法で偏差はほぼ均一で、他と比較して偏差は低値であった。セラクリア-HE(A)の反応性は、セラクリア NAと同様の傾向が多少改善されたにすぎない。ヒト胎盤由来ALPを含むプレチパス E は MEG 法を除き酵素リファレンスに類似した反応性を示した。

5)  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)

5-1) IFCC 法に基づく見掛けの Km 値

換算物質としての市販管理血清および患者検体の IFCC 法に基づく見掛けの Km 値を表 4.33 に示す。Shaw<sup>25)</sup>らがヒト血清 GGT の Ping-pong bi-bi 機構に基づく L- $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質に対する Km 値は 0.65mM、グリシルグリシン基質に対する Km 値は 18mM

表 4.32 コミュータビリティの評価 (ALP) 単位: %

換算物質	IFCC	JSCC	GSCC	MEG	K-K	B-L
Pooled serum	0.0	-8.2	-7.3	-6.3	-6.6	-29
Seraclear-HE						
Normal	0.0	36	-2.2	31	32	3.5
Abnormal	0.0	15	-28	23	66	16
E Reference	0.0	-29	-32	-2.8	6.6	-18
Precipath E	0.0	-22	-29	17	-1.2	-8.6
Seraclear NA	0.0	-31	-46	2.3	87	31

表 4.33 IFCC 法に基づく見掛けの Km 値(mM)

検 体	Donor		Acceptor	
	30°C	37°C	30°C	37°C
Patients' sera(n=4)	0.83±0.17	0.82±0.12	14.7±3.3	23.9±2.2
Seraclear-HE(N)	0.94	0.68	16.3	25.0
Seraclear-HE(A)	0.95	0.92	23.1	28.5
E-REF	0.74	0.86	14.8	19.0
CRM319	1.45	1.09		
PRE-E	1.21	1.32	29.1	34.4
CALIB	1.03	1.19	16.8	19.7
Moni-Trol	2.99	1.52	23.8	26.4
ORTHO-LR	1.76	1.66	13.4	16.2

と報告されており、それらとよく符合した。

#### 5-2) 基準法 (IFCC 法) との相関性

表 4.34 に患者血清 44 検体のデータによる基準法に対する日常分析法の回帰分析結果を示す。基準法との相関性より、7 法全てを標準化対応法とみなして コミュータビリティの評価対象法として使用した。

#### 5-3) ICES 法による基準法への換算効果

表 4.35 に市販管理血清による基準法 (IFCC 法) への換算値の収束効果を示す。患者血清 44 検体の測定値の 8 方法間 CV は 20%にまで達した。換算値の 8 方法間 CV は、ヒトマクロファージ細胞由来 GGT を含むセラクリア-HE で血清標準とほぼ同程度に収束した。一方、ブタ腎由来の CRM 319 をはじめ動物由来 GGT を含む管理血清による方法間 CV は測定値自体のそれを大きく上回り、換算値による収束は期待できなかった。

#### 5-4) コミュータビリティの評価

患者血清の基準法値に対する換算値の偏差(%)を用いて、基準法と日常法間における換算物質 (市販管理血清) の方法間反応性を表 4.36 に示す。動物由来 GGT を添加したものは、測定法 SSCC-2, ST および IR における反応性がヒト血清と異なった。さらに、ヒトマクロファージ由来 GGT のセラクリア-HE および酵素リファレンスは、ヒトプール血清と同等の反応性を示した。

表 4.34 基準法に対する日常分析法の相関性

評価対象法	a	b	r
SSCC-1	-1.10	0.81	0.9997
SSCC-2	-1.71	0.59	0.9999
BM	-2.90	0.78	0.9999
WAKO	-1.43	0.61	0.9995
ST	-2.46	0.61	0.9999
IR	-1.82	0.76	0.9998
A-Sera	-0.98	0.66	0.9993

$y = a + bx$  (n = 44), x : IFCC, y : 評価対象法

表 4.35 市販管理血清によるの換算値の収束効果

換算物質	n = 8		n = 5 <sup>*)</sup>	
	mean. U/L	CV, %	mean. U/L	CV, %
None(raw)	225	20.0	177	23.0
Pooled serum	315	2.3	317	1.6
CRM319	383	33.9	305	4.7
Seraclear-HE(N)	307	5.3	312	4.2
Seraclear-HE(A)	310	3.3	314	2.0
E Reference	314	6.8	310	2.9
Precipath E	368	31.4	303	4.8
Calibrator	354	26.5	304	4.5
Moni-Trol	305	28.4	260	19.8
ORTHO-LR	303	25.8	262	18.4

\*) 4-ニトロアニリドおよび 3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質測定法 (n = 5)

表 4.36 コミュニタビリティの評価 (GGT)

単位 : %

換算物質	IFCC	SS-1	SS-2	BM	WAKO	ST	IR	A-Sera
Pooled serum	0.0	1.5	0.3	0.2	1.8	-1.8	-0.4	-1.9
CRM319	0.0	-2.2	-5.5	-0.2	3.5	78	102	18
Seraclear-HE								
Normal	0.0	5.1	-2.2	-5.6	-1.6	-1.7	-2.8	-12
Abnormal	0.0	2.5	-1.2	-1.3	-0.2	-1.4	-3.5	-6.6
E Reference	0.0	2.3	-3.8	-4.4	-2.3	-3.9	14	-7.4
Precipath E	0.0	-2.5	-6.1	0.2	3.5	57	96	11
Calibrator	0.0	-1.3	-8.3	-2.1	2.9	46	72	-2.3
Moni-Trol	0.0	2.4	-3.3	-3.1	-2.4	13	53	1.3
ORTHO-LR	0.0	1.5	-3.1	-3.0	-2.3	8.1	46	2.5

#### 4.3.2 酵素標準物質としての評価

##### 1) 骨肉腫株化細胞由来のアルカリホスファターゼ

###### 1-1) JSCC 法による反応特性

ヒト血清 ALP との反応特性の類似性の検討を目的に JSCC 法による ERM 候補品の  $K_m$  値を測定した結果を表 4.37 に示す。OS-1 由来 ALP の  $K_m$  値は FL 由来と同様ヒト血清 ALP の値に近似したが、動物由来 ALP は低値を示した。

電気泳動による ALP アイソザイム分析では、ノイラミニダーゼ処理後セラクリア-HE では変化がないのに対して、骨肉腫株化細胞由来 ALP 凍結乾燥品 (M-ERM-FD) ではバンドが陰極側へ移動した。さらに、56°C の熱処理によりほぼバンドが消失したことよりこの試作標品に含まれる ALP は骨由来であることが確認できた<sup>26)</sup>。

###### 1-2) 基準法との相関性

表 4.38 に患者血清 46 検体のデータによる基準法 (JSCC 法) に対する日常分析法の回帰分析結果を示す。基準法と同じ緩衝液である EAE を用いる JSCC 準拠法の JS-V7 と JS-KL の 2 法および MEG を用いる MG-ST 法は良好な相関性を示したが、AMP を用いる IF-BM 法および DEA を用いる SS-V2、SS-WL 法は相関性が得られず、各アイソザイムの反応性が緩衝液の種により異なることに起因しており<sup>7)</sup>、JSCC 標準化対応法と見なし得るか問題が残った。

表 4.37 JSCC 法による反応特性

検体	$K_m$ , mM	$V_{max}$ , U/L, 37°C
ヒト血清(n=12)	0.70 ± 0.02	935 ± 617
Seraclia-HE	0.69	699
E Reference	0.72	770
Precipath E	0.40	735
Referzyme	0.54	486
ORTHO-LR	0.55	544
OS-1 関連		
M-ERM-FD	0.66	539
M-ERM	0.69	601
OS-1A HS	0.66	770
OS-1A-BSA	0.69	570

表 4.38 基準法との相関性

評価対象法	a	b	r
JS-V7	-2.04	1.02	0.9999
JS-KL	9.32	0.97	0.9998
IF-BM	-7.59	0.37	0.9976
SS-V2	-16.6	0.79	0.9968
SS-WL	-16.6	0.73	0.9969
MG-ST	-2.05	0.41	0.9997

$y = a + bx$  (n = 46), x : JSCC, y : 評価対象法

### 1-3) ICES 法による基準法への換算効果

表 4.39 に換算物質による基準法(IFCC 法)への換算値の収束効果を示す。患者血清 46 検体の測定値の 4 方法間 CV は 35%と大きく変動した。ICES 法による換算値の方法間 CV は、牛腎由来 ALP を含むオーソ・リキッドリファレンスは血清標準と同等の収束効果を示した。従来のセラクリア-HE に添加されている FL 由来 ALP に比較して OS-1 は改善され、BSA ベースのものより HS ベースのものが収束効果を示した。

### 1-4) コミュータビリティの評価

平均偏差 (d %) による ECCLS 法<sup>12-15)</sup> のコミュータビリティの結果を表 4.40 に示す。OS-1 由来 ALP を含む試作品は HS ベースのものが BSA ベースのものより良好な結果を示し、凍結乾燥の影響も受けないと思われた。FL 由来 ALP では OS-1 に比べて MEG 緩衝液の MG-ST 法と DEA 緩衝液の SS-V2 法でコミュータビリティが得られず、これらの方法の検量用 ERM としては使用できない。ECCLS の許容基準である ±2.5%以内をすべての方法でクリアするものはないが、OS-1 と牛腎由来 ALP を含む オーソ・リキッドリファレンスは比較的良好な結果を示した。ヒト胎盤由来

表 4.39 換算値の収束効果

換算物質	基準値, U/L	CV, %	換算物質	基準値, U/L	CV, %
None(raw)	-	35.2			
Pooled serum	467	1.2	Precipath E	767	18.5
Scracllea-HE	659	6.4	OS-1 関連		
E Reference	748	5.3	M-ERM-FD	538	2.5
CRM 371	941	3.5	M-ERM	574	3.1
Referzyme	420	3.7	OS-1A-HS	546	3.2
ORTHO-LR	537	1.4	OS-1A-BSA	530	5.3

換算物質	JSCC	JS-V7	MG-ST	IF-BM	SS-V2
Pooled serum	0.0	-0.5	0.5	-0.8	-2.8
Seraclea-HE	0.0	-0.8	12.6	-2.5	35.9
E Reference	0.0	-0.7	10.6	3.2	57.9
CRM 371	0.0	-3.3	4.6	8.9	6.0
Referzyme	0.0	-3.4	7.6	-1.9	-0.6
ORTHO-LR	0.0	-1.2	-0.7	3.9	5.2
Precipath E	0.0	9.9	34.6	42.6	1.8
OS-I 関連					
M-ERM-FD	0.0	0.2	-4.4	-3.1	-3.0
M-ERM	0.0	-0.1	5.8	5.1	-4.8
OS-1A-HS	0.0	0.6	-4.7	0.4	-3.0
OS-1A-BSA	0.0	0.8	5.6	-3.5	6.7

ALP を含むプレチパス E は、MEG および AMP 緩衝液の試薬でコミュータビリティが極度に劣った。

## 2) 遺伝子組換え ALT

### 2-1) 日常分析法の評価基準法との相関性

表 4.41 に患者血清 98 検体のデータによる基準法 (JSCC 法) に対する日常分析法の回帰分析結果を示す。基準法との相関性より、全ての方法を JSCC 標準化対応法とみなすことに問題はないと思われた。

### 2-2) ICES 法による基準法への換算効果

表 4.42 に換算物質による基準法 (JSCC 法) への換算値の収束効果を示す。患者血清 98 検体の測定値の 6 方法間 CV は 4% であった。ICES 法による換算性は、動物由来 ALT を含むものによる

評価対象法	a	b	r
JS-V7	0.81	1.00	0.9999
JS-KE	0.96	0.99	0.9999
GS-KA	1.12	0.90	0.9999
SS-V2	-0.19	0.99	0.9999
IF-ST	0.93	1.00	0.9999

$y = a + bx$  (n = 98), x : JSCC, y : 評価対象法

表 4.42 換算値の収束効果

換算物質	基準値, U/L	CV, %
None(raw)	-	4.0
Pooled serum	180	2.1
Seraclea-HE	84.6	2.1
ORTHO-LR	168	5.2
Moni-Trol	195	7.4
rh-ALT 関連		
rh-ALT-HS	170	2.1
rh-ALT-HS-FD	158	2.0
rh-ALT-BSA	171	1.9
rh-ALT-BSA-FD	156	1.9

換算値が測定値以上に変動した。ヒト肝由来遺伝子組換え ALT (rh-ALT) の換算性はベースおよび凍結乾燥の影響も受けず、血清標準と同等のよい収束効果を示した。

### 2-3) コミュータビリティの評価

コミュータビリティの結果を表 4.43 に示す。ALT では ALP のように測定試薬間で活性値が何倍も異なることはなく、GS-KA 法で約 10%低値を示す程度にとどまっている。GS-KA 法において動物由来 ALT の換算値の平均偏差(d)が -9.1, -17.7%を示し、rh-ALT のコミュータビリティは、特に血清ベースでは凍結乾燥の影響も受けず ECCLS の許容範囲内であった。

表 4.43 コミュータビリティの評価 (ALT) 単位: %

換算物質	JSCC	JS-V7	GS-KA	IF-ST	SS-V2
Pooled serum	0.0	0.2	1.9	2.7	-1.4
Seraclea-HE	0.0	1.9	3.6	1.5	0.8
ORTHO-LR	0.0	-3.4	9.1	1.0	2.7
Moni-Trol	0.0	-2.2	17.7	-1.0	-0.5
rh-ALT 関連					
rh-ALT-HS	0.0	0.8	1.3	2.4	-2.1
rh-ALT-HS-FD	0.0	0.9	1.1	2.2	-1.9
rh-ALT-BSA	0.0	2.0	2.8	3.2	-0.3
rh-ALT-BSA-FD	0.0	2.4	3.4	1.4	0.3

### 4.3.3 リファレンスシステム

#### 1) ALP を例にしたリファレンスシステムの検証

1-1) 評価対象法の反応性

表 4.44 上段と下段に計 2 回の測定試薬毎の ALP 測定方法内精密密度および反応性評価法との反応性試験結果を示す。患者検体の 1 回目の測定値を x 軸に、ランダムライズ 2 回目の測定値を y 軸にとった結果は、いずれの方法も原点を通り傾きが 1 の回帰直線で表され、方法内精密密度を示す  $\sigma$  (SD<sub>y</sub>) は 5 U/L 以下と良好でした。

さらに、反応性評価法である JSCC 自動化法による測定値を x 軸に、評価対象法である日常検査法等による測定値を y 軸にとり、測定方法間の患者検体の酵素反応性を比較した。

AMP と DEA 緩衝液系の試薬では、小腸型 ALP の反応性が EAE 緩衝液系とは異なるため、IF-BM 法と SS-V2 法については JSCC 標準化対応法とは見なせないことは明らかであった。さらに、MEG 緩衝液系の GS-IR 法は、1 回目の結果は  $S_{y,x}$  が SD<sub>y</sub> の 1.8 倍であったが、2 回目の結果では 4.3 倍となり、結局 JSCC 標準化対応法とは見なせない結果となった。このことは 2 回目の方法内精密密度の結果が 1 回目より良好であったことに起因するもので、 $S_{y,x}$  が SD<sub>y</sub> の 3 倍を超えたとき、患者検体の酵素の反応性が両測定法で異なると判定する JSCC の判定基準には問題が提起された。

表 4.44 評価対象法の反応性

方法	n	$\sigma$ (SD <sub>y</sub> )	r	t	S	JSCC 判定 <sup>1)</sup>	D <sup>2)</sup>
JS-A(x)	45	4.9	—	—	—	—	—
	50	2.1	—	—	—	—	—
JS-V7	45	4.3	0.9999	0.9	1.02	0.0 ○	0.0 ○
	50	2.5	1.0000	0.3	1.03	0.8 ○	0.4 ○
GS-A	45	—	—	—	—	—	—
	50	1.5	0.9995	-2.9	0.44	3.2 ×	2.4 ○
GS-IR	45	1.2	0.9997	0.7	0.40	1.8 ○	1.0 ○
	50	0.7	0.9998	-1.2	0.42	4.3 ×	1.6 ○
MEG-ST	45	1.5	0.9992	0.7	0.41	3.1 ×	2.1 ○
	50	0.7	0.9996	-2.1	0.42	5.4 ×	2.1 ○
IF-BM	45	1.3	0.9869	-2.0	0.35	13.5 ×	9.7 ×
	50	0.7	0.9961	-6.1	0.37	16.3 ×	6.9 ×
SS-V2	45	3.8	0.9766	-3.4	0.76	14.1 ×	13.1 ×
	50	2.9	0.9931	-10.0	0.79	10.8 ×	9.2 ×

1) JSCC は  $S_{y,x}/SD_y \leq 3$  で判定する。

2)  $D = (S_{y,x}/m) \times 100, \%$  m = 測定値の平均値

そこで、 $S_{y,x}$  は測定値に依存するため、評価対象法による患者検体の全測定値の平均値 ( $\bar{y}$ ) に対する相対値  $D(S_{y,x}/\bar{y}) \times 100, \%$  で比較すると、明らかに JSCC 標準化対応法と見なせない DEA や AMP 緩衝液系の測定方法と区別することが可能となった。すなわち、EAE 緩衝液系のアズウェル、国際の 2 試薬と MEG 緩衝液系の自家調製、国際試薬、三光純薬の 3 試薬が JSCC 標準化対応法と判定できる結果となった。

#### 1-2) ERM としての反応性の評価法の提示

ERM の反応性の評価方法である 1) JSCC 法並びに 2) ECCLS 法による結果を比較した。JSCC 法は、反応性評価法 ( $x$ ) と JSCC 標準化対応法 ( $y$ ) の 2 方法間の回帰直線の 95%信頼限界内に換算物質の JSCC 標準化対応法による測定値が存在するかで判断される。ECCLS 法は患者検体の反応性評価法による測定値に対して JSCC 標準化対応法による測定値から換算物質を介した反応性評価法への換算値、すなわち基準値に対する換算値の相対残差を多くの検体について計算し、その平均値 (d) で評価するものである。

#### ERM 候補品のコンピュータビリティの評価

(1) JSCC 法：回帰直線のまわりの 95%信頼区間内

(2) ECCLS 法：基準値に対する換算値の平均偏差、 $d < 5\%$

$$d = 1/n \times [\sum(\text{換算値} / \text{基準値} - 1)] \times 100(\%)$$

#### 1-3) ERM 候補品の評価結果

市販管理血清等を ERM 候補品として扱い、患者検体との反応性の比較を JSCC 標準化対応法毎に先の 1) JSCC 法並びに 2) ECCLS 法による評価を表 4.45 に示した。

ヒト血清をベースにウシ腎由来 ALP 添加のオーソリキッドリファレンス (コード B) は各 JSCC 標準化対応法においてヒトプール血清 (コード A) と同等の良好な反応性を示した。そこで、牛腎由来の ALP を別途購入してヒト血清ベースに添加調製した。その試作品 (コード C) は、各測定法による

表 4.45 ERM 候補品の評価結果

コード	ERM 候補品			JS-V7		GS-IR		MEG-ST	
	ALP 由来	ベース	Form	JSCC	d.%	JSCC	d.%	JSCC	d.%
A	—	HSP	L	○	0.0	○	0.4	○	-0.7
B	b-kidney	HS	L	○	-0.9	○	-1.0	○	-0.7
C	b-kidney	HS-DL	L	○	1.4	×	-11.1	×	-8.4
D	p-kidney	BSA	FD	×	1.8	×	-8.4	×	-7.7
E	h-FL	HS-DL	L	×	-2.8	×	-19.8	×	-13.9
F	h-OS-1	HS-DL	FD	○	-0.1	○	-2.0	○	-2.3
G	rh-Liver	BSA	L	○	0.2	○	-3.2	○	5.9
H	rh-Liver	HS-DL	FD	○	0.0	○	5.0	○	5.6

B : ORTHO-LR, D : Referzymc, E : Seraclear-HE

反応性およびアイソザイム分析の結果にオーソリキッドリファレンスとの一致性が見られなかった。

CRM 371 と同様、BSA をベースにブタ腎由来 ALP 添加のリファザイム (コード D) は EAE 緩衝液系で  $d = 2\%$  の偏差にもかかわらず JSCC 法で患者検体と反応性が異なり ERM として対応できない結果となり、評価法によって異なる結果となった。

ヒト脱脂血清ベースに羊膜株化細胞(FL)由来 ALP 添加のセラクリア-HE (コード E) に比較して、骨肉腫株化細胞(OS)由来 ALP 添加の改良品は、添加ベースの種類によって反応性が異なるものの、ヒト脱脂血清ベースの凍結乾燥品 (コード F) は、EAE 緩衝液系だけでなく MEG 緩衝液系で患者検体と反応性がほぼ一致し ERM として対応できる結果となった。

ヒト肝および肝由来遺伝子組換え ALP (rh-ALP) は MEG 緩衝液系試薬との反応性が若干異なり改善の余地があり、また、ERM としての評価結果が評価法によって異なる結果となった。

#### 1-4) ERM 候補品による測定値の換算後のデータ収束状況

先の ERM としての評価を ECCLS による ERM 換算方法で処理し、その換算値の方法間平均値および変動係数を表 4.46 に示した。

基準法を含む 4 方法の患者検体 45 検体の測定値は大きく変動しその CV は 49%であった。ヒト脱脂血清ベースに羊膜株化細胞(FL)由来 ALP 添加のセラクリア-HE に対してヒト骨肉腫株化細胞由

表 4.46 換算後の収束状況(n=4 方法)

換算物質	基準値 <sup>*)</sup>	平均値 <sup>*)</sup>	CV,%
Pooled Serum	480	538	1.0
Seraclear-HE	634	490	10.2
OS-1(HS)	468	534	1.2
rh-Liver(BSA)	413	527	2.8
rh-Liver(HS)	248	552	3.2
Referzyme	412	517	3.3
ORTHO-LR	564	534	1.0
— 生データ	—	382	49.3

\*) JSCC 自動化法, U/L(37°C) n = 45

来 ALP (OS-HS) による換算の結果はヒトプール血清と同等で、全データ平均 CV で 1.2%にまで収束しただけでなく、平均値もほぼ同じ値を示した。

また、肝由来および肝由来遺伝子組換え ALP (rh-ALP) による換算結果は、MEG 緩衝液系のなかで換算可能な方法はあるものの互換性のとれない方法による結果を受けて、平均 CV で 3.2%であった。

動物由来の ALP として牛腎由来 ALP のオーソリキッドリファレンスは各測定試薬においてヒトプール血清と同等の良好な反応性を示した。ブタ腎由来の ALP のリファザイムは MEG 緩衝液系の方法による反応性にかなり差が見られた。

#### 4.4 結言

血清酵素活性測定の JSCC 勧告法<sup>1~6)</sup> が設定され、これに準拠する市販試薬を採用している医療施設は年々増加するなか、勧告法が管理血清の値付けやサーベイ結果の評価に活用されるなど、わが国における酵素検査データの標準化の機運は飛躍的に高まった。一方、この勧告法を様々な原理に基づく日常検査法に橋渡しできる常用 ERM は、施設間で測定方法や条件を厳密に統一することなく施設間格差を是正し得る有力な手段となることから、現在臨床施設で比較的多く利用されている市販管理血清が日常分析値の方法間較差是正にどの程度役立つかを以下項目別にまとめた。

#### 1) AST, ALT

セラクリア-HE はヒト血清ベースに赤血球由来の AST とヒト肝細胞由来の ALT が添加されており、全ての酵素がヒト由来である。そのため、 $K_m$ , pH 特性および温度特性など酵素化学的性状がヒト血清中のアミノトランスフェラーゼと近似しており、勧告法と全く原理の異なるポップ法やカルメン法に対してもコミュタビリティが得られ、勧告法の値を日常法に伝達し施設間較差を是正し得る酵素標準として適していることが判った。

#### 2) LD

動物由来 LD はピルビン酸基質の日常法による測定値を乳酸基質の基準値に換算するキャリブレーションとして使用できず、ヒト型酵素は優れたコミュタビリティを示した。ヒト LD アイソザイムのなかでは分画比率の高い LD<sub>2</sub> が最も反応性が良好と考えられたが、さらに健常ヒト血清のアイソザイム組成に近似するものが常用 ERM として適することが明らかになった。

#### 3) CK

世界的規模で測定方法が統一化されている項目であり換算を要せず、反応性の異なる動物由来 CK で換算する必要はないと思われた。

#### 4) ALP

ヒト型酵素管理血清による換算値は収束したものの、標準化の目的のためには不十分であった。ICES 法による方法間データの統一のための標準血清の開発は容易ではなさそうであるが、Bowers ら<sup>10)</sup> が、ヒトプール血清を用いれば 10%程度まで換算値の収束は可能であると報告しているように、ヒト血清ベースにヒト血清の主要アイソザイムに類似するものが細胞培養できれば、臨床的に有用な程度で検査値の統一は可能と推察している。

#### 5) GGT

コミュタビリティの評価では、管理物質のマトリックスや由来臓器の違いよりもヒトと動物の違いがより強く現れた。塚田ら<sup>27)</sup> は、基質を変えたときの GGT の反応性により、臓器の違いは明らか

かではないが、由来動物の差違は明らかであると本研究の結論を支持する結果を報告している。GGTにおけるERMはヒト由来の酵素が好ましく、今回の結果でもヒトマクロファージ由来のGGTは、ヒトプール血清ほどではないが、広範囲の測定方法に違いを超えてコミュニティを示した。

セラクリア-HEに添加されている羊膜株化細胞（FL）由来のALPはERMとして不適であったため、健常者ヒト血清ALPの主成分である肝・骨型に注目し骨肉種株化細胞由来ALPを量産しその有用性について検討したところ、安定性において若干問題が残るものの従来の羊膜株化細胞由来のものより有望であることが明らかになった。また、肝株化細胞由来ALTは安定供給の面で改良が必要であったので、遺伝子組換えにより得られたALTについても同様に評価を行った結果、ERMとして反応性の面で十分期待できた。

さらに、JSCCが常用酵素標準物質（ERM）の規格<sup>8)</sup>を公表し、測定体系による酵素検査値の標準化を提案したことで、緩衝液によってアイソザイムの反応性が異なるALP活性測定を例に、市販測定試薬のJSCC標準化対応法としての評価をするとともに、市販管理血清等をそのJSCC標準化対応法間での共通の検量用ERMとして評価した結果を以下に要約した。

- 1) JSCC標準化対応法としては、EAE緩衝液系の方法だけでなく、MEG緩衝液系の方法も十分に可能性がみられた。
- 2) ERM候補としては、遺伝子組換え体を含むヒト血清をベースとしたヒト肝由来ALTおよび骨由来ALPは、JSCC標準化対応法における共通のERMとして実用化が期待できた。

## 参考文献

- 1) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定の勧告法（AST）、*臨床化学*, 18, 226 (1989)
- 2) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定の勧告法（ALT）、*臨床化学*, 18, 250 (1989)
- 3) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定の勧告法（LD）、*臨床化学*, 19, 228 (1990)
- 4) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定の勧告法（CK）、*臨床化学*, 19, 184-208 (1990)
- 5) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定の勧告法（ALP）、*臨床化学*, 19, 209 (1990)
- 6) 日本臨床化学会、ヒト血清中酵素活性測定の勧告法（GGT）、*臨床化学*, 24, 106 (1995)

- 7) 菅野 剛史, 日本臨床化学会勧告法の背景と臨床評価, *臨床検査*, **37**, 468 (1993)
- 8) 日本臨床化学会, 常用酵素標準物質の規格(1996-02-15), *臨床化学*, **25**, 135 (1996)
- 9) G.N. Jr Bowwers, R.B. McComb, A unifying reference system for clinical enzymology : Aspartate Aminotransferase and the International Clinical Enzyme Scale, *Clin. Chem.*, **30**, 1128 (1984)
- 10) R.B. McComb, G.N.Jr Bowwers, Alkaline phosphatase and the International Clinical Enzyme Scale, *Am J Clin. Pathol*, **84**, 67 (1985)
- 11) C.F. Jr Fasce, R. Rej, H.W. Copeland, Vanderlinde RE, A discussion of enzyme reference materials : application and specifications. *Clin. Chem*, **19**, 5 (1973)
- 12) ECCLS DOCUMENT : Standard for enzyme calibration materials and control materials. Lund, *ECCLS*, ISSN 1011 - 6265, **5** (1988)
- 13) R. Rej, R.W. Jenny, J.P. Breaudiere, Quality control in clinical chemistry : characterization of reference materials, *Talanta*, **31**, 851 (1984)
- 14) J.P. Breaudiere, R. Rej, P. Drake, A. Vassault, M. Bailly, Suitability of control materials for determination of  $\alpha$ -amylase activity. *Clin. Chem*, **27**, 806 (1981)
- 15) R. Rej, J.P. Breaudiere, M. Horder, Interlaboratory comparability of enzyme measurements, *Prog. Clin. Enzymol.*, **2**, 25 (1983)
- 16) H.U. Bernmeyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 2. IFCC Method for Aspartate Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **24**, 497 (1986)
- 17) H.U. Bernmeyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 3. IFCC Method for Alanine Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **24**, 481 (1986)
- 18) A. Karmen, A none on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum, *J.Clin. Invest.*, **34**, 131 (1955)
- 19) M. Mathieu, A. Aubry, M. Bailly, J.P. Braun, J.P. Breaudiere, K. Hohuu, Recommendations for determining the catalytic concentration of lactate dehydrogenase in human serum at 30°C(document F), *Ann. Cbiol. Clin.*, **40**, 160 (1982)
- 20) R. Bais, M. Philcox, Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **32**, 639 (1994)
- 21) M. Horder, R.C. Elser, W. Gerhardt, M. Mathieu, E.J. Sampson, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 7. IFCC Method for Creatine Kinase, *IFCC Recommendation JIFCC*, **1**, 130 (1989)
- 22) N.W. Tietz, A.D. Rinker, L.M. Shaw, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase, *Clinica. Chimica. Acta.*, **135**, 339F (1983)
- 23) L.M. Shaw, J.H. Stromme, J.L. London, L. Theodorsen, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 4. IFCC Method for  $\gamma$ -glutamyltransferase, *Clinica. Chimica. Acta.*, **135**, 315F (1983)
- 24) 日本医師会, 第34回臨床検査精度管理調査結果報告書, 東京(2000)
- 25) F. Schiele, J. Muller, E. Colinet, G. Siest, Production and certification of an enzyme reference material for  $\gamma$ -glutamyltransferase(CRM319). Part 1 : Preparation and characterization, *Clin. Chem.*, **33**, 1971 (1987)
- 26) 杉田 収, 骨性ALPアイソザイムの解釈, *検査と技術*, **18**, 249 (1990)
- 27) T. Tsukada, T. Nakayama, M. Kitamura, K. Ikeda, The difference in substrate specificity of  $\gamma$ -glutamyltransferases in human and commercial control sera, *The 5th ISQC.*, 415 (1983)

## 第5章 遺伝子検出に基づく新規臨床分析法

### 5.1 緒言

前章までに述べたとおり、1980 年来の目標であった臨床化学検査の検査値の標準化がほぼ達成される一方で、新たな検査の対象として遺伝子が注目されている。遺伝情報は、これまで述べてきた全ての検査対象の源流とすることができる。特定のタンパク質をコードする構造遺伝子に変異があれば、そのタンパク質の活性が損なわれるからである。従来の臨床化学検査で、例えば、ある酵素の血中濃度が高値であった場合、アイソザイム分析等の検査が追加され、その結果より疾患臓器の推定をする。すなわち、その時点での生体成分の血中濃度によって診断が行われるわけで、当然、発症後あるいは発症初期段階での診断が中心となる。これに対して、遺伝子診断によりその変異の有無などを知ることにより、治療方針の決定、予後の推定、発症の予測等が可能になる。従来の臨床化学検査と遺伝子診断の提供する情報は相補的であり、既に病原微生物の同定や定量、白血病・悪性リンパ腫などの血液腫瘍診断検査が一部の機関で保険診療による検査が行われており<sup>1)</sup>、遺伝子検査が臨床化学検査の主要な項目の一つとして採用されるのは時間の問題と思われる。

この数年、この核酸同士のハイブリダイゼーションを利用して様々な超構造の構築を目的とした工学的立場（いわゆるナノテクノロジー）からの研究が行われている。DNA をその構造単位の一部として用いれば、予定した構造を自発的に形成する構造単位を設計することができる。これまでに、DNA 自身<sup>2~4)</sup>、DNA-タンパクコンジュゲート<sup>5~6)</sup>、DNA 固定化超微粒子<sup>9~17)</sup>などを構造単位として興味深い構造体の構築が報告されている。

一方、近年の界面科学、高分子化学の進歩によって、数十ナノメートルの均一なミクロスフェア（ナノスフェア）を作成することが可能となった。この粒子は水溶液中で完全に分散し透明な溶液となるが、その表面の性質と関係する様々な刺激を与えることで凝集が制御できる。このことに着目して、まず、ポリスチレン系のナノスフェアの表面に DNA を化学修飾して、この DNA の塩基と相

補的塩基対形成が可能な DNA とのハイブリダイゼーションによって特定粒子の選択的凝集によって特定遺伝子を識別することを考えた。それぞれ互いに異なる塩基配列の DNA が修飾されたナノスフェアの混合分散溶液に DNA 試料（一本鎖検体遺伝子）を加えると、それに相補的な DNA をもつスフェア同士が選択的にネットワークを形成して凝集するが、添加した DNA の塩基配列に変異があると凝集は起こらないものと推定できる（図 5.1）。このとき、ナノスフェアとして様々な色素を含浸させたものを使用すると、塩基の配列様式に関する遺伝情報を溶液あるいは凝集体の色の变化として観察できるものと期待できる（図 5.2）。本研究は発ガン、アポトーシス、DNA 修復、転写調節、細胞間のシグナル伝達、細胞周期など様々な細胞内イベントに関与する *p53* 遺伝子<sup>18~20</sup> の一つのホットスポットを含む変異の検出を目標として、遺伝子診断法の開発に関する基礎的検討を行った（図 5.3）。

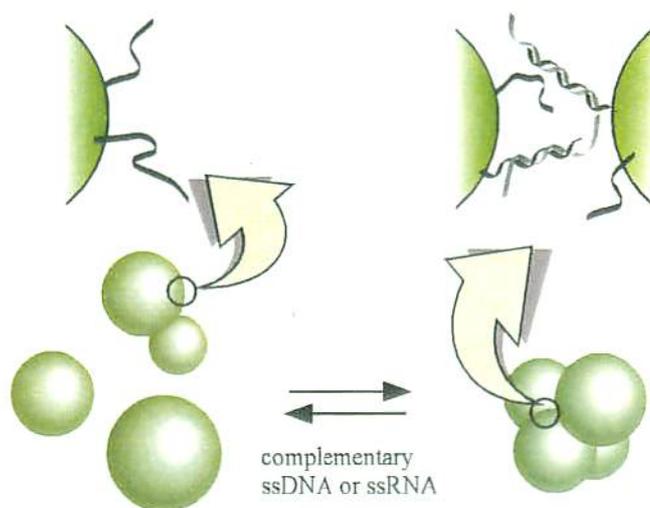


図 5.1 DNA 修飾ナノスフェアの選択的凝集

detecting mutation  
as the change of solution color  
as the color of aggregates

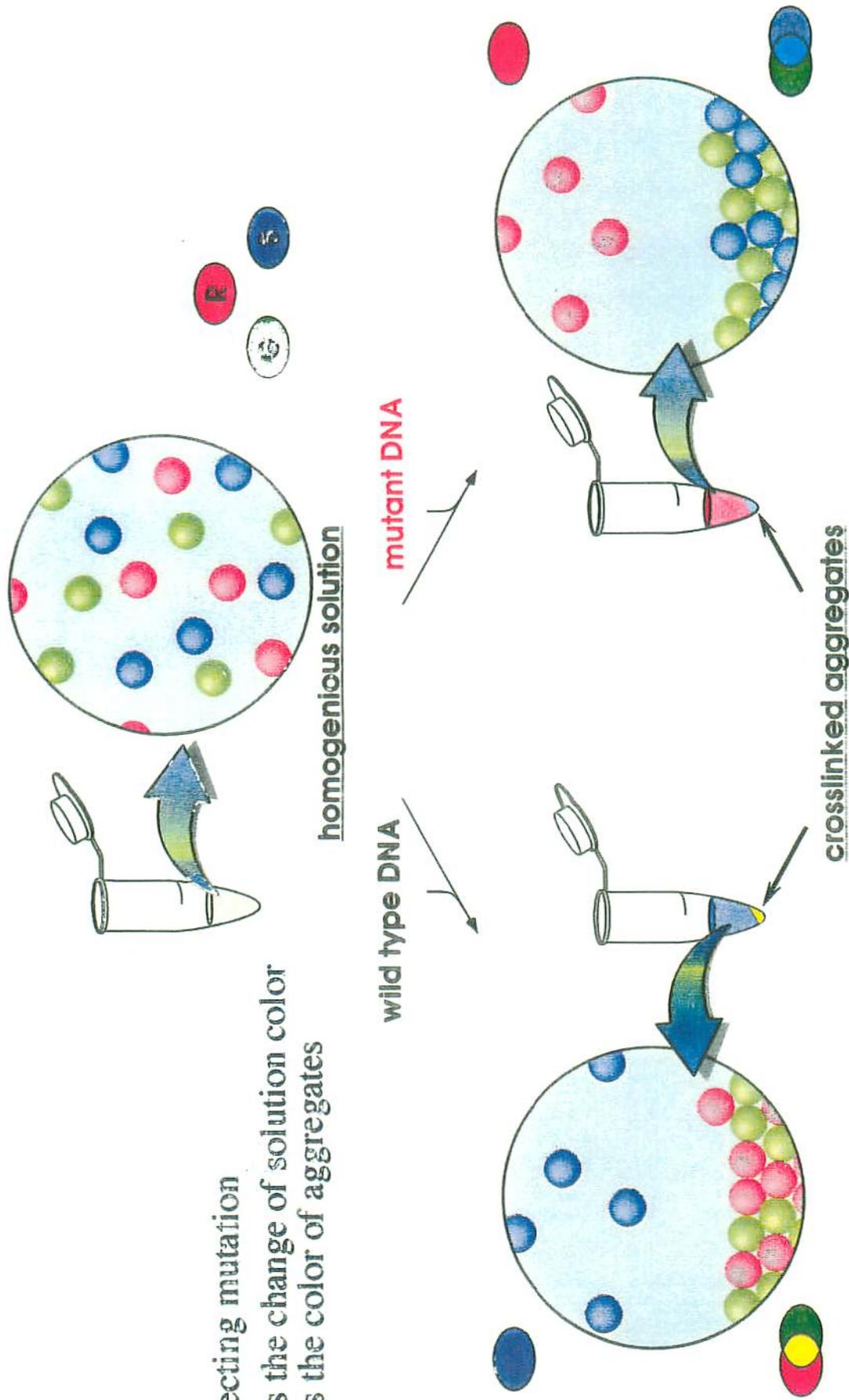
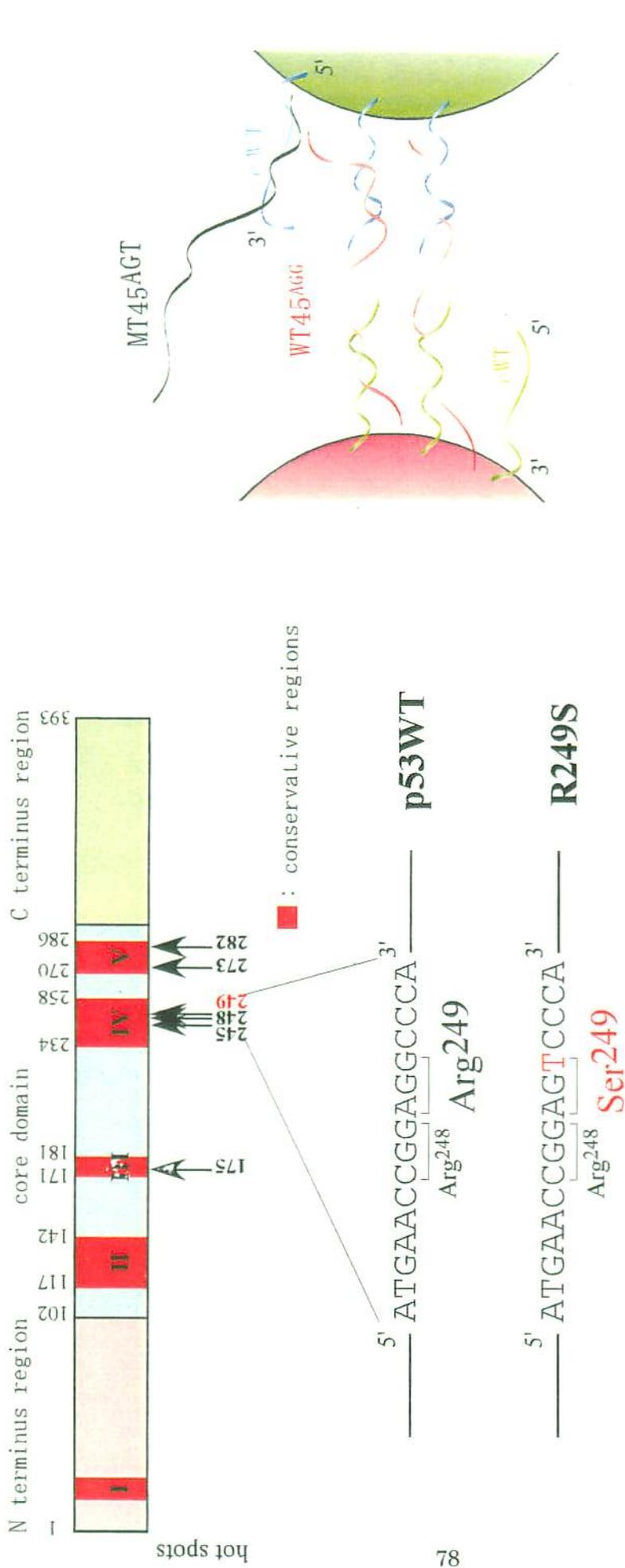


図 5.2 DNA 修飾ナノスフェア凝集による変色を利用した遺伝子の検出



**WT45AGG** : 5' ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG **AGG** CCC ATC<sup>3'</sup>

MT45AGT : 5' ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG **AGT** CCC ATC<sup>3'</sup>

図 5.3 p53 遺伝子とその検出システム

## 5.2 実験

### 5.2.1 DNA 修飾ナノスフェアの凝集を利用した新規遺伝子検出法

#### 1) オリゴヌクレオチドの合成と精製

オリゴヌクレオチド (ODN) の合成は DNA 合成装置 (Oligo 1000 M, BECK MAN) を用いて、ホスホロアミダイト法<sup>21)</sup> に従って行った。以下に合成した ODN のシーケンスを示す。

5'-amino ODN : 5'-amino-(T)<sub>10</sub> GAT GGG CCT CCG GTT-3'

3'-amino ODN : 5'-GGA ACT GTT ACA CAT(T)<sub>10</sub>-amino-3'

AGG45 : 5'-ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC-3'

AGT45 : 5'-ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGT CCC ATC-3'

クリベージキット試薬 (アンモニウム,メチルアミン試薬:AMA, 1000  $\mu$  L / 1000 nmol) を用いて、合成した ODN を固相担体 (カラム) から固定化部位を切断して溶出させた。ODN 溶液を遠心真空エバポレータで乾燥させアンモニアを除去後、0.1 M トリエチルアミン-酢酸緩衝液 (TEAA buffer) に溶解した。さらに、HPLC 分析を行い、合成 ODN の精製を行った。以下に HPLC の条件を示す。

SolutionA : 0.1 M TEAA buffer (pH 7.0)

SolutionB : acetonitrile

Gradient : 10 ~ 40 % acetonitrile / 30 min

Flow rate : 1.0 ml/min

HPLC で分取、精製した合成 ODN を遠心真空エバポレータで乾燥した後、80 % 酢酸を加えジメトキシトリチル (DMT) 基の脱保護を行った。合成 ODN 量を算出するため、ODN 溶液の 260 nm における吸光度を測定し、モル吸光係数 (計算値) より ODN の合成量を算出した<sup>22)</sup>。さらに、MALDI-TOFMS にて ODN の分子量測定を行った。

#### 2) スフェア表面への ODN の修飾

##### 2-1) スフェアの性質

使用したスフェアは、Molecular Probes 社製の直径が 44 nm のポリスチレンを基体とするラテックス粒子である。表面には多数のカルボキシル基が導入されており、これらの水和、静電反発効果により、凝集が抑制されている。粒子径が小さいために、その分散溶液は透明であり、内部には様々

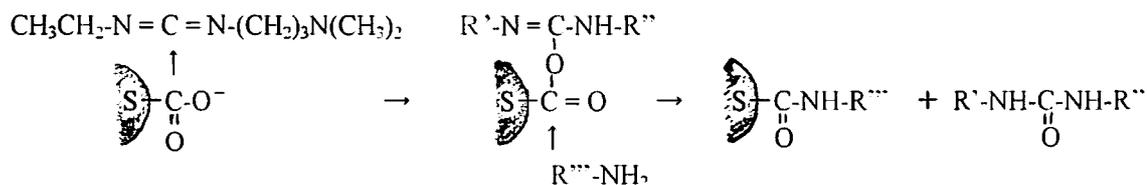
な蛍光色素が含まれている。ラテックス内は疎水環境にあるため、その蛍光強度はたいへん高く、表面のコンジュゲート、溶液の pH など外部環境の変化に影響を受けにくい。

3'-aminoODN および 5'-aminoODN の修飾には、赤および緑の蛍光色素を含浸したスフェアを用いた。以下に、これらのスフェアに関する性質を示す<sup>23)</sup>。

Microsphere "red"	直径	44nm±12.1%	"yellow-green"	同左
	電荷密度	9Å <sup>2</sup> /charge		同左
	溶液濃度	1.07 x 10 <sup>15</sup> particles/mL		同左
	吸収/発光極大	580/605 nm		505/515 nm

## 2-2) 水溶性カルボジイミド (WSC, EDAC)

ペプチド合成の縮合剤として用いられる水溶性カルボジイミド<sup>24)</sup>の主な利点は、反応終了後の過剰試薬および尿素体が容易に洗浄除去できることとある。



## 2-3) 修飾反応

以下に示す溶液等をエッペンチューブ内で混合し、室温にて 24 時間振とうした。その後、グリンを約 2 mg 加え修飾反応を終了した後、NAP<sup>TM</sup>-10 Column に通した。

試料調製 : 0.5M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaHCO <sub>3</sub> , pH=9.84	100 μ L
microsphere(red,yellow-green)	100 μ L( 12 μ mol)
EDAC	2.3mg( 12 μ mol)
DNA(3'- aminoDNA, 5'- aminoDNA)	82 μ L( 120nmol), 78 μ L( 120nmol)

## 2-4) ODN 修飾スフェアの精製

### 2-4-1) ゲルの充填

ゲルろ過法では、溶液中の分子はクロマトグラフィー担体、すなわちゲルの充填されたカラムを通ることにより、比較的小さい分子はまわりの溶液からゲルのマトリックス中へ入り込むことがで

きるため溶出に時間がかかり、比較的大きい分子は小さい分子とは同じようにゲルの中へ入り込むことができず早く溶出するため、様々な大きさの分子がその大きさの違いによって分離される。

今回使用したゲル (Sephadex G-200, Pharmacia Biotech) は、デキストランをエピクロロヒドリンで架橋したビーズ状のもので、乾燥ビーズサイズ 40~120  $\mu$ m, 膨潤定数 30~40 ml/g, 分画範囲は 5000 ~ 600000 球状タンパク質(Da), 1000 ~ 200000 デキストラン(Da)である<sup>25)</sup>。

ゲルを乾燥重量で約 800 mg 秤り、イオン交換水 50 mL を加え室温にて 72 時間膨潤させた後、カラムに充填した。

#### 2-4-2) ODN 修飾スフェア溶液の分画

スフェアに修飾された ODN と未反応 ODN とを分離するためにゲルろ過を行った。カラム上部に試料溶液を負荷し、イオン交換水を溶離液とした。スフェア(着色部分)の溶出前から溶離液をビュレットの目盛りを用いて 500  $\mu$ L ずつエッペンチューブに受け、それぞれの溶離液について紫外可視吸収スペクトルおよび吸光度 ( $\lambda = 260$  nm) を測定し、スフェアに修飾されずに流出した ODN 量を測定することで、スフェア表面への ODN 修飾率を算出した。さらに、スフェアの着色が確認された溶離液を一本にまとめ、ODN 修飾スフェアとして以下の実験に用いた。

#### 2-4-3) スフェア表面の電子顕微鏡による観察

ODN 未修飾スフェアと aminoODN 修飾スフェアの表面を透過型電子顕微鏡により観察した。染色剤には酢酸ウラニルを用いた。

#### 3) スフェアの凝集挙動の塩濃度依存性

スフェア量一定下、以下に示す 1) ODN の修飾に使用したスフェア溶液 (市販品)、2) ODN 修飾スフェア溶液、3) 標的核酸を各種量加えた ODN 修飾スフェア溶液について、塩溶液 (5 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) を一定量ずつ添加、攪拌毎に分光光度計による吸収スペクトルをとり、波長 400, 480, 505, 580 nm における吸光度を各々測定して、スフェアの凝集挙動における塩濃度依存性の実験を行った。なお、測定温度は 25°C 一定下、塩化ナトリウムの場合は 5M NaCl 溶液を 40  $\mu$ L ずつ 400

$\mu\text{L}$  (反応液終濃度で 1.5 M) まで、塩化マグネシウムの場合は 50 mM  $\text{MgCl}_2$  溶液を 20  $\mu\text{L}$  ずつ 300  $\mu\text{L}$  (反応液終濃度で 12.5 mM) まで加えて塩濃度依存性を観察した。

1) ODN の固定化に使用したスフェア溶液

スフェア溶液(red; $1.07 \times 10^{15}$ particles/mL)	5 $\mu\text{L}$ ( $5.4 \times 10^{12}$ particles)
スフェア溶液(yellow-green; $1.07 \times 10^{15}$ particles/mL)	5 $\mu\text{L}$ ( $5.4 \times 10^{12}$ particles)
100mM HEPES buffer, pH 7.0	400 $\mu\text{L}$
DW	522 $\mu\text{L}$

2) ODN を固定化したスフェア溶液

3'- aminoODN 修飾スフェア溶液(red; $2.14 \times 10^{13}$ particles/mL, DNA 9.4 $\mu\text{M}$ )	250 $\mu\text{L}$ (2.35 nmol)
5'- aminoODN 修飾スフェア溶液(yellow-green; $2.14 \times 10^{13}$ particles/mL, DNA 9.4 $\mu\text{M}$ )	250 $\mu\text{L}$ (2.35 nmol)
100mM HEPES buffer, pH 7.0	400 $\mu\text{L}$
DW	32 $\mu\text{L}$

3) 標的核酸を加えた ODN 修飾スフェア溶液

3'- aminoODN 修飾スフェア溶液(red; $2.14 \times 10^{13}$ particles/mL, DNA 9.4 $\mu\text{M}$ )	250 $\mu\text{L}$ (2.35 nmol)
5'- aminoODN 修飾スフェア溶液(yellow-green; $2.14 \times 10^{13}$ particles/mL, DNA 9.4 $\mu\text{M}$ )	250 $\mu\text{L}$ (2.35 nmol)
標的核酸(AGG45; 1510 $\mu\text{M}$ )	0~32 $\mu\text{L}$
→スフェア修飾 ODN 量の 0, 1/40, 1/20, 1/10, 1/5, 1 倍量になるように標的核酸を添加	
100mM HEPES buffer, pH 7.0	400 $\mu\text{L}$

4) スフェア溶液の蛍光顕微鏡による観察

表 5. 1 に顕微鏡用サンプルの調製を示す。A) 標的核酸 (AGG45) を含まない、B) 変異型核酸 (AGT45)、C) 標的核酸 (AGG45) を含む ODN 修飾スフェア混合溶液の 1  $\mu\text{L}$  をサンプルとしてスライドに塗布して、蛍光顕微鏡による観察を行った。

5) スフェア溶液の発光スペクトル観察

表 5. 2 に従って溶液を調製して、下記に示す測定条件にてその発光スペクトルの測定を行った。

なお、測定溶液中の緩衝液、塩濃度等の条件は、蛍光顕微鏡による観察時のサンプルと同様にした。

測定条件	励起波長( $E_x$ ): 470 nm
	蛍光開始終了波長: 490 ~ 700 nm
	励起および蛍光側スリット: 10 nm
	フィルター: Y50-FILTER 使用(500 nm 以下をカット)

	(A)	(B)	(C)
1) 5'- aminoODN 修飾スフェア溶液 <sup>a)</sup>	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L
2) 3'- aminoODN 修飾スフェア溶液 <sup>b)</sup>	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L
3) 標的核酸(AGG45) <sup>c)</sup>	—	—	1.6 $\mu$ L
4) 変異核酸(AGT45) <sup>d)</sup>	—	2.7 $\mu$ L	—
5) DW	2.7 $\mu$ L	—	—
6) 100mM HEPES buffer(pH 7.0)	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
7) 50mM MgCl <sub>2</sub>	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L

a) yellow-green spheres :  $2.14 \times 10^{13}$  particles / mL, 5'- aminoODN : 9.4  $\mu$  M

b) red spheres :  $2.14 \times 10^{13}$  particles / mL, 3'- aminoODN : 9.4  $\mu$  M

c) 標的核酸(AGG45) : 1.51mM

d) 変異核酸(AGT45) : 0.90mM

	(A <sub>1</sub> )	(A <sub>2</sub> )	(B)	(C)
1) ODN 修飾スフェア (緑) 溶液 <sup>a)</sup>	—	454 $\mu$ L	—	—
2) ODN 修飾スフェア (赤) 溶液 <sup>b)</sup>	454 $\mu$ L	454 $\mu$ L	—	—
3) 標的核酸(AGG45) <sup>c)</sup>	—	—	—	10 $\mu$ L
4) 変異核酸(AGT45) <sup>d)</sup>	—	—	10 $\mu$ L	—
5) 緩衝液 <sup>e)</sup>	1046 $\mu$ L	592 $\mu$ L	1490 $\mu$ L	1490 $\mu$ L

a) スフェア希釈溶液: yellow-green spheres ;  $1.07 \times 10^{11}$  particles / mL

b) スフェア希釈溶液: red spheres ;  $1.07 \times 10^{11}$  particles / mL

c) Table 5.1 溶液(C)

d) Table 5.1 溶液(B)

e) 36mM HEPES 緩衝液(pH= 7.0), 9.1mM MgCl<sub>2</sub>

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 DNA 修飾ナノスフェアの凝集を利用した新規遺伝子検出法

#### 1) オリゴヌクレオチドの合成と精製

クリベージキット試薬 (アンモニウム、メチルアミン試薬: AMA 1000 nmol / mL) を用いて、合成した ODN を固相担体 (カラム) から切り出した。ODN 溶液を遠心真空エバポレータで乾燥させアンモニアを除去後、0.1 M トリエチルアミン・酢酸緩衝液 (TEAA buffer) に溶解した。さらに、HPLC により、合成 ODN の精製を行った。HPLC で分取、精製した合成 ODN を遠心真空エバポレータで乾燥した後、80 %酢酸を加えジメトキシトリチル (DMT) 基の脱保護を行った。合成した ODN のクロマトグラムを図 5.4 に示す。

合成 ODN 量を算出するため、ODN 溶液の 260 nm における吸光度を測定し、モル吸光係数 (計

算値) より ODN の合成量を算出した<sup>22)</sup>。合成 ODN の希釈溶液の UV 測定結果および ODN のモル吸光係数、分子量から算出した合成 ODN 溶液の濃度は、以下に示す結果となった。さらに、MALDI-TOFMS にて ODN の分子量測定結果は、理論値とほぼ一致した結果が得られた。図 5.5 に合成 ODN (AGG45) を例に MALDI-TOFMS 分析による分子量測定結果を示す。

3'-amino-ODN ( $\epsilon = 230100 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $M_w = 7826.6$ ):  $295 \text{ nmol} / 200 \mu \text{ L} = 1475 \mu \text{ M}$   
 5'-amino-DNA ( $\epsilon = 216600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $M_w = 7820.6$ ):  $338 \text{ nmol} / 200 \mu \text{ L} = 1690 \mu \text{ M}$   
 AGG45-DNA ( $\epsilon = 422300 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $M_w = 13886.3$ ):  $302 \text{ nmol} / 200 \mu \text{ L} = 1510 \mu \text{ M}$   
 AGT45-DNA ( $\epsilon = 422100 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $M_w = 13861.3$ ):  $180 \text{ nmol} / 200 \mu \text{ L} = 900 \mu \text{ M}$

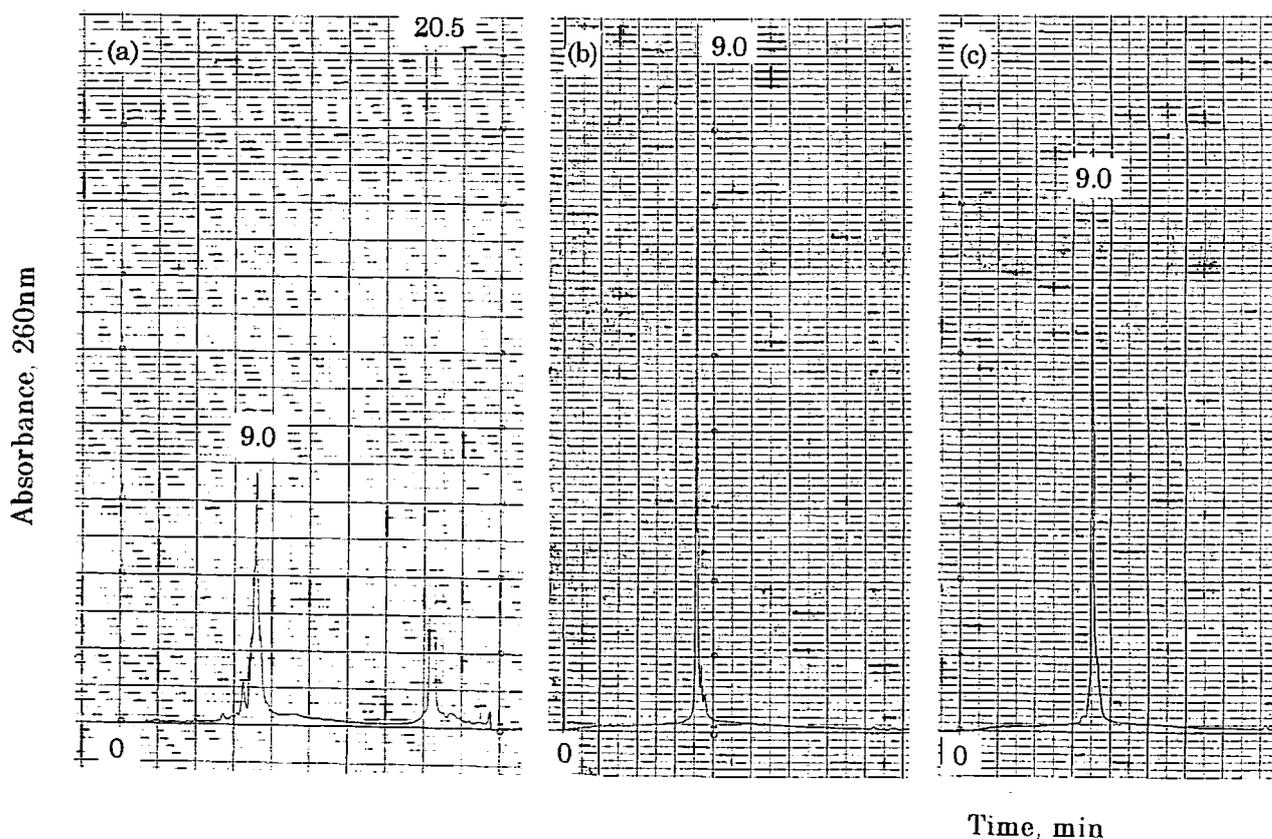


図 5.4 3'-amino オリゴヌクレオチドのクロマトグラム

DMT 基脱保護前クロマトグラム(a) の保持時間が 20.5 分のピーク時の溶出液を別途分取し、さらに DMT 基脱保護を行うことによって保持時間が 9 分に変化した(b)。なお、DMT 基脱保護前クロマトグラムにおける保持時間が 9 分のピークの溶出試料と DMT 基脱保護試料との同定を行った結果は単一のピークが得られた(c)。

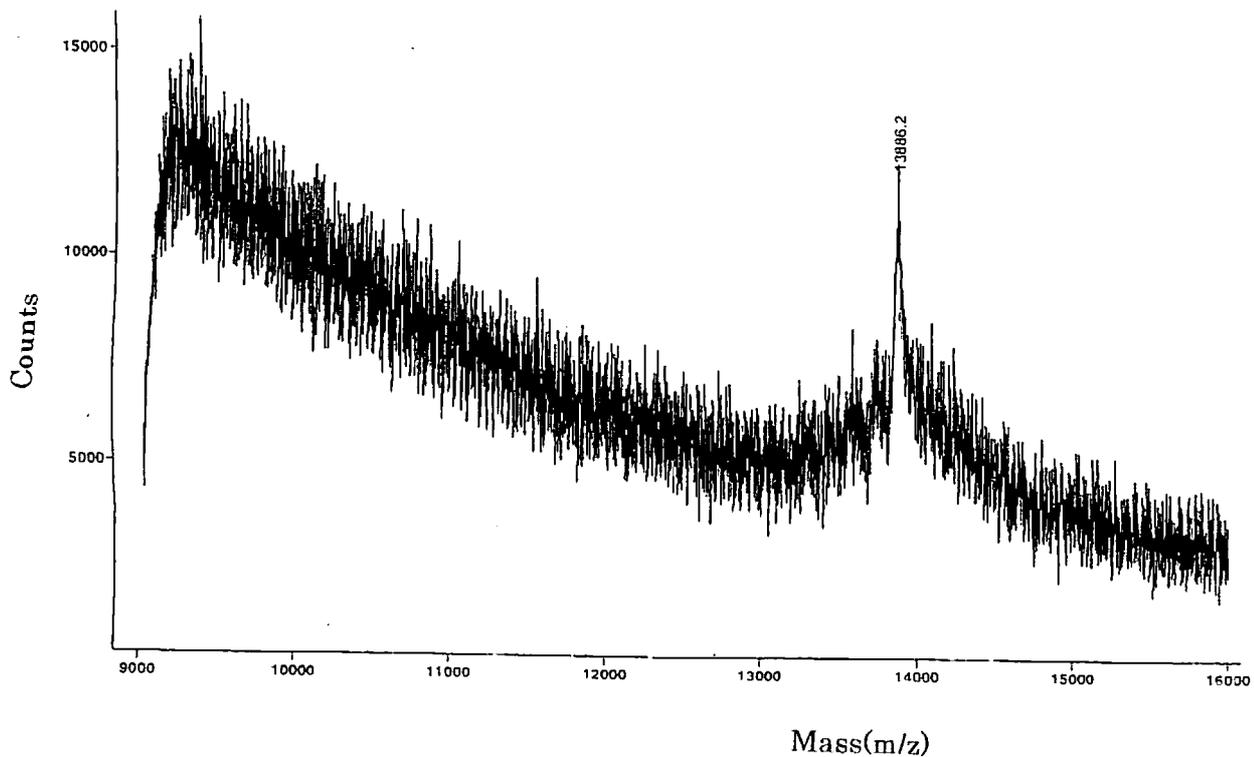


図 5.5 合成 ODN (AGG-45,  $M_w = 13886.3$ ) の MALDI-TOFMS 分析  
 Method: HCD1003, Mode: Linear, Laser sensitivity: 2900, Negative Ions: off

## 2) スフェア表面への ODN の修飾

ゲル (Sephadex G-200, Pharmacia Biotech)<sup>25)</sup> を乾燥重量で約 800 mg 秤り、イオン交換水 50 mL を加え室温にて 72 時間膨潤させた後、カラムに充填し、スフェアに修飾された ODN と未反応 ODN とを分離するためにゲルろ過を行った。カラム上部に試料溶液を負荷し、イオン交換水を溶離液とした。スフェア(着色部分)の溶出前から溶離液をビュレットの目盛りを用いて 500  $\mu$ L ずつエッペンチューブに分取し、はじめの 14 本 (7.0 mL) は肉眼で見てスフェアの色が確認された。それ以降の蛍光色素による着色のない溶出液 500  $\mu$ L 毎に吸光度 ( $\lambda = 260$  nm) の測定した結果を図 5.6 に示す。スフェアに修飾されずに流出した ODN 量を測定することで、スフェア表面への ODN 修飾率を算出した。さらに、スフェアの着色が確認された溶離液を一本にまとめ、ODN 修飾スフェアとして以降の実験に用いた。

蛍光色素による着色のない溶離液を一本にまとめて乾固後、一定量のイオン交換水で溶解し、そ

の溶液中の ODN 量を測定し、その結果よりスフェア表面に固定化された ODN 量およびその修飾率を算出した。その過程を以下に示す。

固定化に用いた 3'-amino-ODN 量 120 nmol  
修飾されずに溶離された 3'-amino-ODN 73 nmol

固定化に用いた 5'-amino-ODN 量 120 nmol  
修飾されずに溶離された 5'-amino-ODN 73 nmol

修飾された 3'-amino-ODN 量および 5'-amino-ODN 量はともに 47 nmol となった。固定化に用いたスフェア量が  $1.07 \times 10^{14}$  個なので、スフェア 1 個当たり 264 分子の ODN が修飾されたことになり、ODN 1 本当りあたりの修飾密度は  $2304 \text{ \AA}^2$  となった。つまり、一辺が  $48 \text{ \AA}$  の正方形、または、直径が  $54 \text{ \AA}$  の円に 1 分子の ODN が修飾された計算となる (図 5.7)。スフェア表面のカルボキシル基は  $9 \text{ \AA}^2$  当たり 1 個存在しており、全体のカルボキシル基のうち ODN と修飾反応に供されたものは 0.39% と算出された。なお、3'-amino-ODN および 5'-amino-ODN の固定化された両スフェア溶液は 5 mL まで濃縮し、以降の実験に使用した。(スフェア濃度:  $2.14 \times 10^{13}$  particles/mL, ODN 濃度: 9.4 nmol/mL)

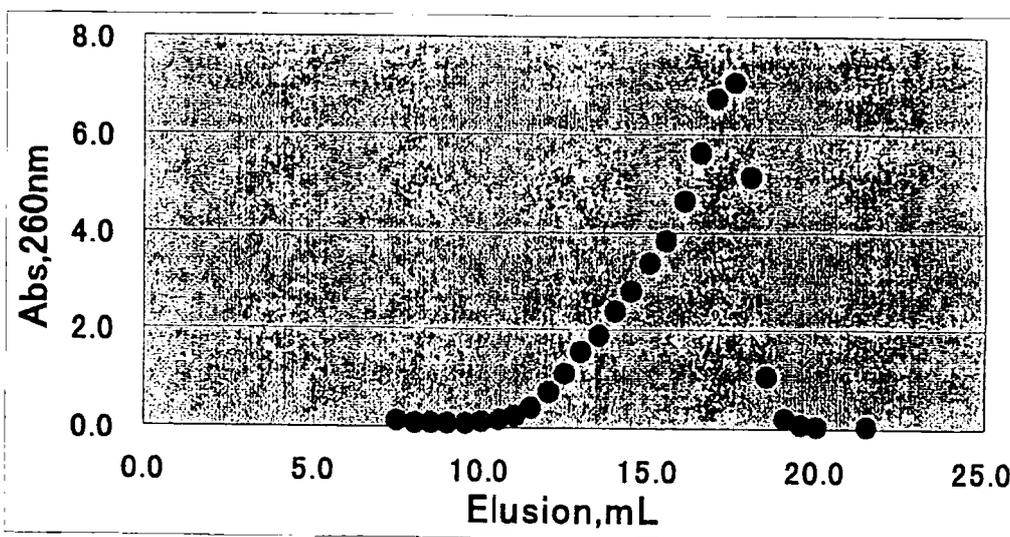


図 5.6 スフェア(赤) に修飾された 3'-aminoODN と未反応 3'-aminoODN との分画

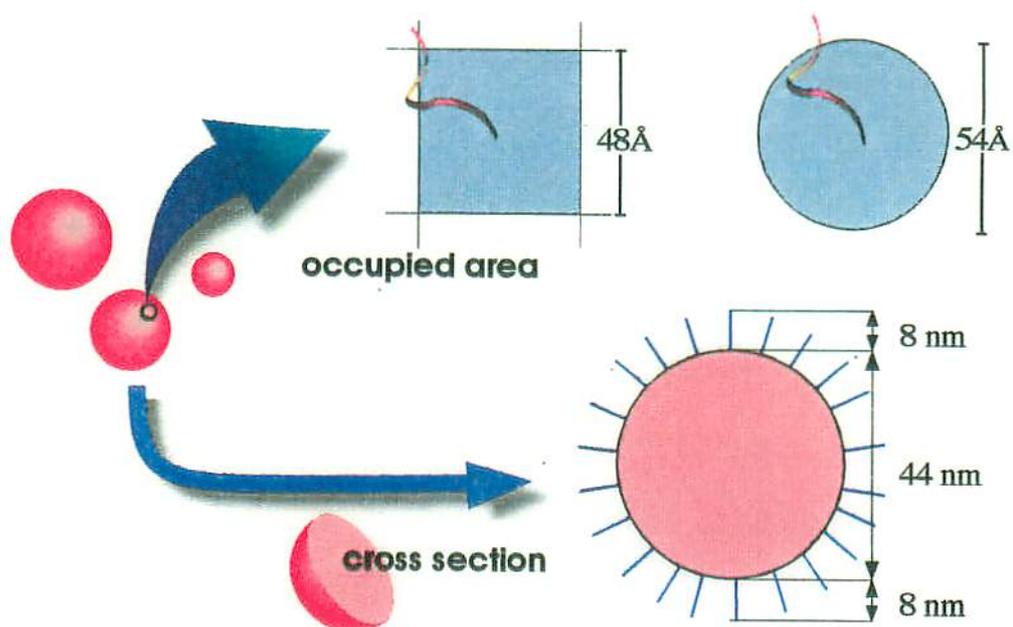


図 5.7 スフェア表面への ODN 修飾の様子

未修飾スフェアおよびODN修飾スフェア表面の透過型電子顕微鏡(TEM)による観察結果を図 5.8 に示す。ODN 修飾後もスフェアは球形を保っていることが観察された。さらに、スフェアの周辺部が黒く染まっており、スフェアに ODN が修飾されたことが確認された。ウラニルイオンのような硬い金属イオンはリン酸イオンと強く結合するので、染色剤に酢酸ウラニルを用いたことより ODN 骨格のリン酸部位と強く結合した結果と考える。

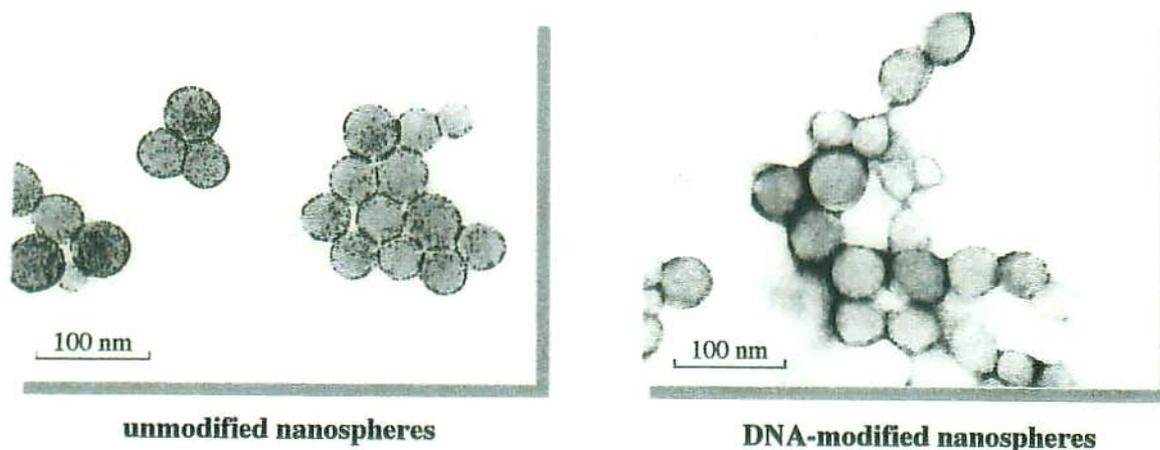


図 5.8 スフェア表面の電子顕微鏡による観察

### 3) スフェアの凝集挙動の塩濃度依存性

本研究にとって、ハイブリダイゼーションの効率は重要な要素である。DNA のハイブリダイゼーションはポリアニオン同士の相互作用であるため、静電反発を抑制する必要がある。加えて、検出系に使用するスフェア表面に残った多数のカルボキシル基を考慮するとその寄与はますます大きくなる。核酸のリン酸イオン部位は硬い塩基であるため、静電反発を効果的に抑制するにはハードな金属イオンが有効であると考えられる。しかし、同時にハードな金属はスフェアに結合して、余った配位座で DNA を非特異的に結合してしまうことも予想され、留意しなければならない。

そこで、Lu(III)、Al(III)、Zr(IV) を担持したメチレンホスホン型樹脂 DiaionCRP-200 と仔牛胸腺 DNA を用いて、金属イオン担持樹脂の核酸に対する吸着挙動のモデル実験を行った。コンディショニングした樹脂にジルコニウムイオンを吸着させた後、バッチ法による DNA の吸着結果は、Zr(IV) 担持量の約 10% も結合してしまい、Lu(III) や Al(III) についても同様であった。ハードな金属はスフェアに結合し、余った配位座で DNA を非特異的に結合してしまうことから、DNA の精製に有効ではあるが<sup>26, 27)</sup>、ハイブリダイゼーションの効率化のための静電反発抑制には使用できない。そこで、配位子交換の少ないと思われるマグネシウムを使用して実験を行うこととした。

スフェア量一定下、以下に示す 1) ODN の固定化に使用したスフェア溶液 (市販品)、2) ODN 修飾スフェア溶液、3) 標的核酸を各種量加えた ODN 修飾スフェア溶液について、測定温度は 25°C 一定下、50 mM MgCl<sub>2</sub> 溶液を 20 μL ずつ 300 μL (反応液終濃度で 12.5 mM) まで加えて塩濃度依存性を観察した。塩化マグネシウム溶液を添加毎に 400 nm における吸光度を測定した結果は、5 mM から徐々に上昇し 10 mM 付近から徐々に一定となった。

### 4) スフェア溶液の蛍光顕微鏡による観察

表 5.3 に顕微鏡用サンプルの調製を示す。A) 標的核酸 (AGG45) を含まない、B) 変異核酸 (AGT45)、C) 標的核酸 (AGG45) を含む ODN 修飾スフェア混合溶液の 1 μL をサンプルとしてスライドに塗布して、蛍光顕微鏡による観察を行った。

スフェアの分散溶液を蛍光顕微鏡で観察した結果を図 5.9 に示す。上段の左側に赤のスフェア、右側に緑のスフェア、さらに中央にそれらの合成写真を示す。赤のスフェアに若干凝集が見られるが、両スフェアは互いに独立してほぼ分散しており、それぞれのスフェアのブラウン運動が観察された (図 5.9 A)。この溶液に対して、適当なイオン強度下、サンプルを添加して同様の観察を行った。p53 遺伝子の変異核酸を添加するとスフェアの凝集が見られた。しかし、両スフェアの凝集分布はほとんど一致しておらず、このことは互いのスフェアがランダムに凝集していることを示唆している (図 5.9 B)。一方、標的核酸を添加すると両スフェアの凝集分布は完全に一致し、全ての凝集体は赤と緑の光の混合色である黄色の発光を示しており (図 5.9 C)、両スフェアは標的核酸によって特異的に架橋され、互いにネットワークを形成することで凝集したものと考えられる。この蛍光顕微鏡による観察にはスフェアの分散溶液が僅か 1  $\mu$ L、サンプルの量にして 数 100 fmol あれば十分であり、本法の実用化を考えると非常に有意な点である。

#### 5) スフェア溶液の発光スペクトル観察

蛍光顕微鏡では反応溶液の極一部の観察であり、溶液全体の現象であることを確かめるために発光スペクトルの観察を試みた。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) の効率はドナーとアクセプター間の距離に依存することはよく知られている<sup>28~31)</sup>。異種のスフェア間のネットワークが形成されるのであれば、エネルギー移動が起こると期待された。

表 5.2 に示した赤のスフェア希釈溶液(A<sub>1</sub>)、赤および緑のスフェア混合希釈溶液(A<sub>2</sub>)、変異核酸を含む ODN 修飾スフェア溶液(B)、標的核酸を含む ODN 修飾スフェア溶液(C)における発光スペクトルを図 5.10 に示す。ドナーである緑のスフェアのみが吸収できる波長 470 nm を励起波長とする発光スペクトルを観察した結果、凝集の起こらない両スフェアのみの混合系 (図 5.9 A, 図 5.10 中の緑線) では 600 nm 付近に何ら変化は観測されなかった。一方、変異核酸添加系 (図 5.9 B, 図 5.10 中の青線) に比較して、標的核酸共存系 (図 5.9 C, 図 5.10 中の赤線) では アクセプターである赤スフェアの発光が明らかに観測された。

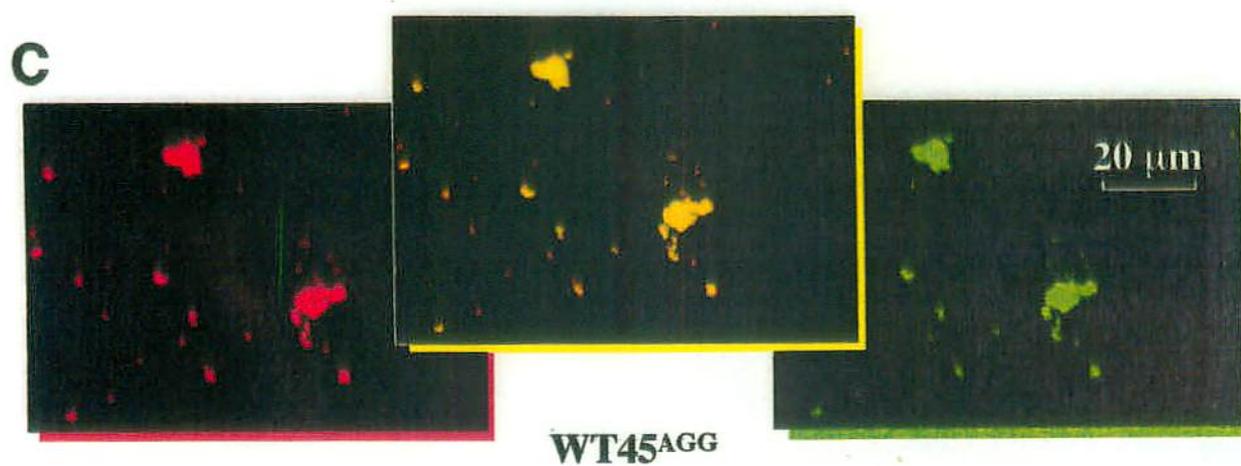
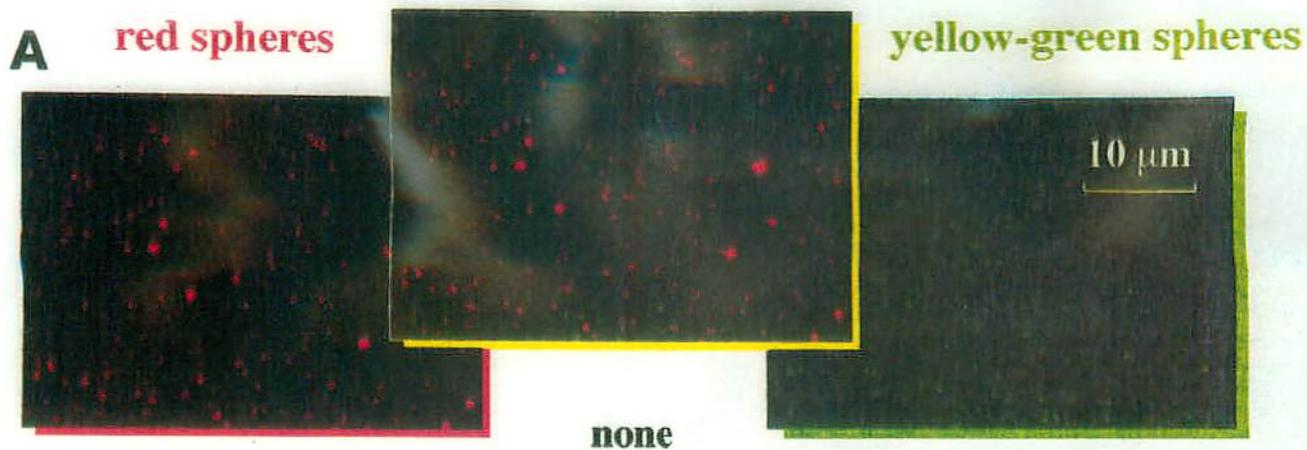


図 5.9 スフェア溶液の蛍光顕微鏡による観察

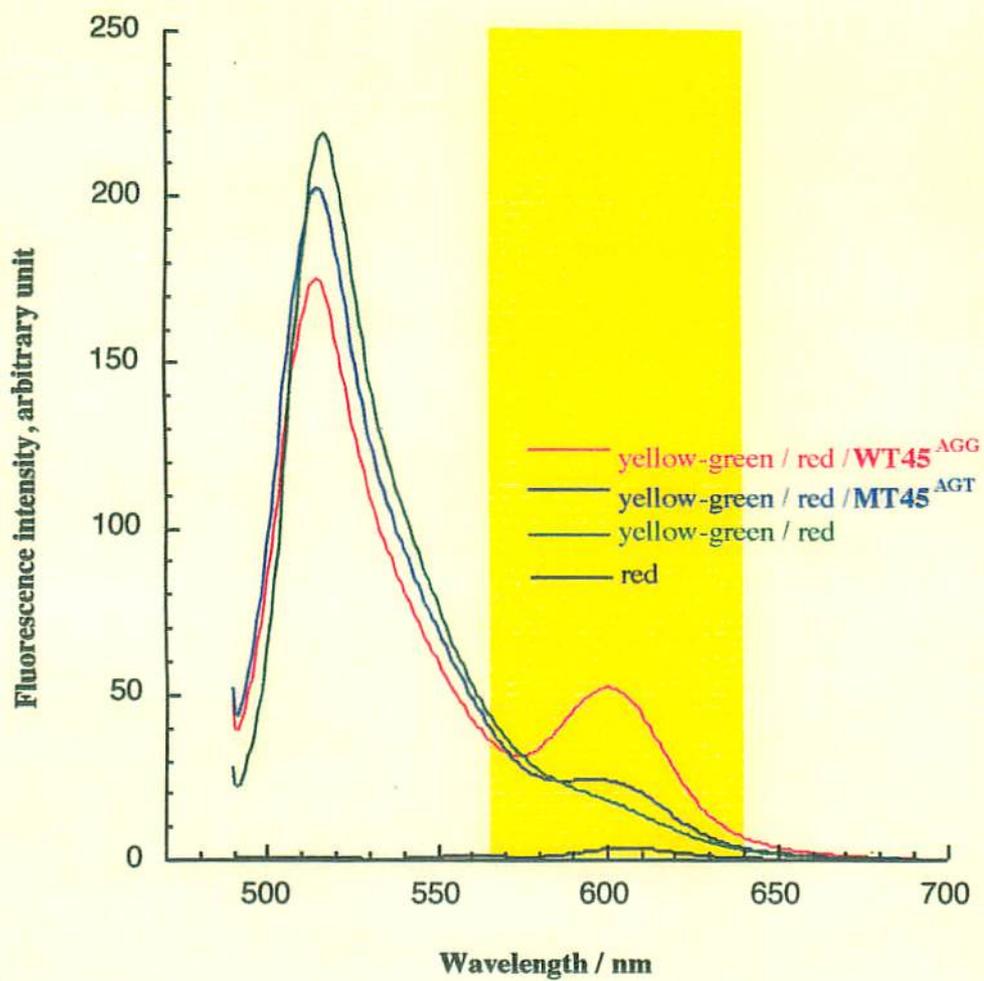
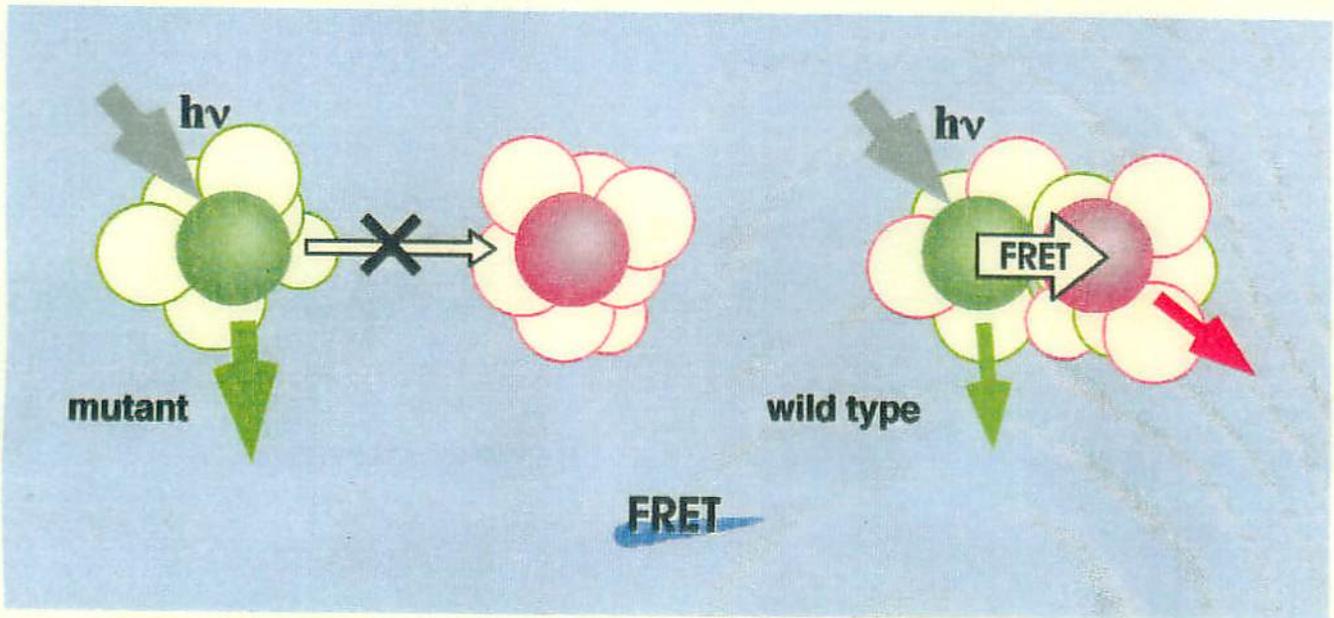


図 5.10 スフェア溶液の発光スペクトル観察

## 5.4 結言

*p53* 遺伝子<sup>18-20)</sup>の一つのホットスポットを含む野生型の 45 量体である標的核酸 (AGG45)、その一塩基変異型<sup>18)</sup>の変異核酸 (AGT45) および標的核酸の 5' 末端側 (両者に共通) および 3' 末端側の 15 塩基に相補的な塩基配列とスペーサから成る 3'-amino ODN と 5'-amino ODN の合成を、DNA 合成装置 (Oligo 1000 M BECK MAN) を用いて、ホスホロアミダイト法<sup>21)</sup>に従って行った。合成した 3'-amino ODN と 5'-amino ODN を赤と緑のそれぞれの蛍光スフェア表面に修飾させた結果、スフェア 1 個当たり 264 分子の ODN が修飾され、修飾密度は  $2304 \text{ \AA}^2$  となり、スフェア表面のカルボキシル基のうち ODN と修飾反応に供されたものは 0.39%と算出された。

未修飾スフェアおよび aminoODN 修飾スフェア表面の透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した結果、ODN 修飾後のスフェアは球形を保っていることが観察された。さらに、ODN 染色剤 (酢酸ウラニル) によるスフェアの周辺部の黒化が観察されたことで、スフェアに ODN が修飾されたことが確認された。

スフェアの分散溶液を蛍光顕微鏡で観察した結果、赤と緑の両スフェアは互いにランダムに分散しており、それぞれのスフェアのブラウン運動が観察された。さらに、*p53* 遺伝子の変異核酸を添加するとスフェアの凝集が見られたが、両スフェアの凝集分布はほとんど一致せず、互いのスフェアが独立して凝集した。一方、標的核酸を添加すると両スフェアの凝集分布は完全に一致し、全ての凝集体は赤と緑の光の混合色である黄色の発光を示した。

ドナーである緑のスフェアのみが吸収できる波長 470 nm を励起波長とする発光スペクトルを観察した結果より、赤と緑のスフェアのみの混合希釈溶液では 600 nm 付近に何ら変化は観測されなかったが、標的核酸の共存系ではアクセプターである赤の発光を観測することができた。この発光によって、標的核酸により互いのスフェア間が架橋されたネットワーク構造が形成されていることが示唆された。蛍光顕微鏡観察と発光スペクトル観察の結果は互いによく一致し、マイクロ、マクロの両面から選択的ネットワークの形成を確認できたことになる。

以上、本法は 45 量体の中の一塩基変異を見分けることができたことで、遺伝子の多型解析 (SNP: Single-Nucleotide Polymorphism) <sup>32)</sup> の新しい手法に発展する可能性を十分に持っており、さらに、本研究成果を基盤に臨床での応用に期待したい。

## 参考文献

- 1) 河合 忠, 遺伝子診断の現状, *臨床検査*, **40**, 69 (1996)
- 2) C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N.C. Seeman, A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA, *Nature*, **397**, 144 (1999)
- 3) R. Sha, F. Liu, D.P. Millar, N.C. Seeman, Atomic force microscopy of parallel DNA branched junction arrays, *Chem. Biol.*, **7**, 743 (2000)
- 4) T.H. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F. Liu, E. Winfree, J.H. Reif, N.C. Seeman, Construction, analysis, ligation, and self-assembly of DNA triple crossover complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 1848 (2000)
- 5) C.M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. Chi, Supramolecular nanocircles consisting of streptavidin and DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3056 (2000)
- 6) T. Mori, D. Umeno, M. Maeda, Sequence-specific affinity precipitation of oligonucleotide using poly(N-isopropylacrylamide)-oligonucleotide conjugate, *Biotech. Bioeng.*, **72**, 261 (2001)
- 7) M.S. Shchepinov, K.U. Mir, J.K. Elder, M.D. Frank-Kamenetskii, E.M. Southern, Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3035 (1999)
- 8) A.M. Cassell, W.A. Scrivens, J.M. Tour, Assembly of DNA/Fullerene hybrid materials, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1528 (1998)
- 9) T. Ihara, K. Kurohara, A. Jyo, Aggregation of DNA-modified nanospheres depending on added polynucleotides, *Chem. Lett.*, 1041 (1999)
- 10) C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, J.J. Storhoff, A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature*, **382**, 607 (1996)
- 11) R. Elghanian, J.J. Storhoff, R.C. Mucic, R. L. Letsinger, C.A. Mirkin, Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science*, **277**, 1078 (1997)
- 12) S.J. Park, A.A. Lazarides, C.C. Mirkin, P.W. Brazis, C.R. Kannewurf, R.L. Letsinger, The electrical properties of gold nanoparticle assemblies linked by DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3845 (2000)
- 13) T.A. Taton, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes, *Science*, **289**, 1757 (2000)
- 14) C.J. Loweth, W.B. Caldwell, X. Peng, A.P. Alivisatos, P.G. Schultz, DNA-based assembly of gold nanocrystals, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1808 (1999)
- 15) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R.C. Mucic, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, One-pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998)
- 16) C.J. Loweth, W.B. Caldwell, X. Peng, A.P. Alivisatos, P.G. Schultz, DNA-Based Assembly of Gold Nanocrystals, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **12**, 1808 (1999)
- 17) T. A. Taton, G. Lu, C.A. Mirkin, Two-color Labeling of Oligonucleotide Arrays via Size-Selective Scattering of Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 21, 5164 (2001)
- 18) A.J. Levine, J. Momand, C.A. Finlay, The p53 tumour suppressor gene, *Nature*, **351**, 453 (1991)
- 19) Y. Kishimoto, Y. Murakami, M. Shiraiishi, K. Hayashi, T. Sekiya, Aberrations of the p53 tumor suppressor

- gene in human non-small cell carcinomas of the lung, *Cancer Res.*, **52**, 4799 (1992)
- 20) L. Wiesmuller, The tumor suppressor p53 in the center of a strategy aimed at the alleviation of side effects in cancer therapies, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1768 (2000)
- 21) 大塚栄子, DNA 合成機を使った遺伝子断片の合成, *バイオテクノロジー*, 廣川書店, 12, 東京 (1988)
- 22) T. Ihara, Y. Maruo, S. Takenaka, M. Takagi, Ferrocene-oligonucleotide conjugate for electrochemical probing of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4273 (1996)
- 23) R.P. Haugland, *Handbook of Fluorescence probes and research chemicals*, Edn. 7, (Molecular Probes, Inc., OR, 1999)
- 24) Coupling Reagents, Formation of the Peptide Bond, 63(1992)
- 25) Gel Filtration "Principles and Methods", Pharmacia Biotech, 2(1993)
- 26) X. Zhu, A. Jyo, *Proceeding of the 12<sup>th</sup> International Conference on Chemistry for protection of the Environment*; Z. Cao, L. Pawlowski, Eds.; Nanjing University Press, Nanjing China., 219-229 (1999)
- 27) S. A. Wasay, Md. J. Haron, S. Tokunaga, *Water Environment Research*, **68**, 295-300 (1996)
- 28) 木下 一彦, 御橋 広真, 蛍光測定, (株)学会出版センター, 東京(1988)
- 29) 西川 泰治, 平木 敬三, 蛍光・りん光分析法, 共立出版(株), 東京(1993)
- 30) N. Ota, K. Hirano, M. Warashina, A. Andrus, B. Mullah, K. Hatanaka and K. Taira, Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer(FRET) : selection of target sites for functional nucleic acids, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3, 735 (1998)
- 31) C.R. Cantor, P.R. Schimmel, *Biophysical chemistry: Part II : Techniques for the study of biological structure and function* (W. H. Freeman and Company, NY, 1980)
- 32) W.E. Evans, M.V. Relling, Pharmacogenomics : Translating functional genomics into rational therapeutics, *Science*, **286**, 487 (1999)

## 第6章 総括

血中の定量分析項目、酵素活性項目の臨床分析法における標準化の重要性の説明には多言を要しない。モル濃度で評価が可能な定量分析項目ならびに反応速度で評価する酵素活性項目の標準化は今日なお容易とは言えない。本論文は、極めて重要であるにもかかわらず難問である臨床分析の標準化に取り組んだ成果を6章でまとめたものである。

第1章では、序論として、臨床分析の標準化の重要性、過去10数年の標準化に関する内外の動向、問題点などをレビューするとともに、本研究の背景、目的ならびに意義などを述べた。

臨床化学分析の標準化は、80年代後期から90年代初期にかけて臨床分析のなかでも標準化が比較的容易な血中の定量分析項目から開始された。本研究においても尿酸、クレアチニンなどの分析法の標準化に関する検討から開始した。血清中尿酸測定のためのHPLC法<sup>1)</sup>およびウリカーゼ-UV法<sup>2)</sup>の両法で同一の標準液を用いて検体を測定した結果は、一部の検体を除き良好な相関を示した。しかし、HPLC法ではヒト血清や管理血清中には尿酸ピークに重なるピークもあり得るため、ウリカーゼ処理による尿酸ピークの単一性の確認が必要であること、蛋白以外の280 nm付近に吸収を示す物質が含まれる場合にウリカーゼ-UV法では希釈分析による感度の低下を招き正確な測定が不可能であることが判明した。このため尿酸分析の標準化においては、作用極電位などを変えることにより特定成分の高選択的検出に適した電気化学的検出器を備えたHPLC法が最も信頼性の高い結果をあたえることを見出した。クレアチニン分析では従来実施されてきたアルカリ性ピクリン酸法(Jaffe法)<sup>3)</sup>に対して、最近では酵素法が普及してきたことから<sup>4)</sup> 勧告法であるHPLC法<sup>5)</sup>とペルオキシダーゼ酸化縮合発色を測定原理とする市販試薬について検討したが、測定値の施設間較差の一要因となる試薬間差は認められず標準化に最も適する方法であることなどを明らかにした。

第3章では、定量分析項目に続いて酵素活性項目に関する臨床化学的分析法の標準化に関する検討を行った結果を述べた。化学及血清療法研究所でヒト株化細胞の培養により酵素を得る方法が開

発されたことを契機にすすめた筆者らの研究は、国際臨床化学連合 (IFCC) の勧告法<sup>6-11)</sup>の精度、信頼性を検討した我が国における最初の例で、日本臨床化学会 (JSCC) が常用酵素標準物質 (ERM) の確立に関するプロジェクトを開始する糸口となり、1998 年には日本臨床検査標準協議会で ERM が認証されるに至った<sup>12)</sup>。今まで測定した限りにおいてアミノトランスフェラーゼのヒト血清の検体ブランクは小さく、検体ブランク反応を補正しなくても問題はないと思われたが<sup>13, 14)</sup>、勧告法は日常法と異なりヒト血清よりむしろ標準物質の値付けなどの際に用いられることが多いことから、JSCC 勧告法<sup>15, 16)</sup>においても検体ブランクを設定してその値が低値であることの確認が必要であると思われた。また、常用基準法の測定条件の妥当性を勧告法のそれと比較しながら検討した結果、基質濃度、pH と活性値の関係や測定精度などの面で AST および ALT 両酵素ともに勧告法と同程度の条件で測定できることが示唆されたことで、常用基準法を日常検査の標準化に用いることに問題はないと思われた。さらに、CK 活性測定試液中の共役酵素の活性測定が<sup>17)</sup>に明記されていないことより、CK 測定勧告法の条件下での G6PD および HK の測定方法案を提示した。また、チオグリセロールと N-アセチルシステインを CK の活性化剤として比較したところ<sup>18)</sup>、活性および反応試液の安定性の面で大差はなく、チオグリセロールに変更する必然性は低いと判断した。CK に限らず現勧告法のサンプル容量比を変えずに自動化が可能であれば、検量用 ERM や JSCC 標準化対応法試薬の開発や評価にこの自動化法が利用され、多数の患者血清を測定することで反応性やコンピュータビリティの評価が容易になるものと期待される。さらに、国際的ハーモナイゼーションの観点からも、長年の悲願であった酵素検査データの施設間格差縮小への期待が高まっている現在、勧告法の見直しは必要最小限の変更に留めるべきであることを提案した。

各医療機関における酵素活性項目の測定方法および条件は異なっている場合が多く、統一された標準分析法の開発も重要であるが、反面、施設間較差を是正するために、ある統一した尺度で校正する方法<sup>19, 20)</sup>、すなわちコンピュータビリティの評価法<sup>21-25)</sup>を確立することは現実的観点からさらに重要である。この目的を達成するためには、ルーチン分析用の ERM を探索または開発する必要

がある。第4章では、AST, ALT, LD, CK, ALP, GGT の酵素6項目<sup>15~17, 26~28)</sup>における各種ERM候補品について、コンピュータビリティ評価の可能性を検討した結果を述べた。

AST, ALTではヒト血清ベースに赤血球由来のASTとヒト肝細胞由来のALTが添加されたセラクリア-HEがKm, pH特性および温度特性など酵素化学的性状がヒト血清中のアミノトランスフェラーゼと近似しており、勧告法と全く原理の異なるポップ法やカルメン法<sup>29)</sup>に対してもコンピュータビリティが得られ、勧告法の値を日常法に伝達し施設間較差を是正し得る酵素標準として適していることが判った。LDでは動物由来LDがビルビン酸基質の日常法による測定値を乳酸基質の基準値に換算するキャリブレーションとして使用できず、ヒト型酵素は優れたコンピュータビリティを示した。ヒト由来アイソザイムのなかではLD<sub>2</sub>が最も方法間の互換性が高いと考えられるが、さらに健常ヒト血清のアイソザイム組成に近似するものが常用ERMとして適することが明らかになった。CKは世界的規模で測定方法が統一化されている項目であり換算を要せず、反応性の異なる動物由来CKで換算ことは論外であると思われた。ALPではヒト型酵素管理血清による換算値は収束したものの、標準化の目的のためには不十分であり、ICES法による方法間データの統一のための標準血清の開発は容易ではなさそうであるが、Bowersら<sup>30)</sup>がヒトプール血清を用いれば10%程度まで換算値の収束は可能であると報告しているように、ヒト血清ベースにヒト血清の主要アイソザイムに類似するものが細胞培養できれば、臨床的に有用な程度で検査値の統一は可能と推察した。GGTのコンピュータビリティの評価では、管理物質のマトリックスや由来臓器の違いよりもヒトと動物の違いがより強く現れた。塚田ら<sup>30)</sup>は、基質を変えたときのGGTの反応性により、臓器の違いは明らかではないが、由来動物の差違は明らかであると本研究の結論を支持する結果を報告しているが、ERMとしてはヒト由来の酵素が好ましく、今回の結果でもヒトマクロファージ由来のGGTは、ヒトプール血清ほどではないが広範囲の測定方法に違いを超えてコンピュータビリティを示した。さらに、セラクリア-HEに添加されている羊膜株化細胞(FL)由来のALPはERMとして不適であったため、健常者ヒト血清ALPの主成分である肝・骨型に注目し、骨肉種株化細胞由来ALPを量産してその有

用性について検討したところ、安定性において若干問題が残るものの従来の羊膜株化細胞由来のものより有望であることが明らかになった。また、肝株化細胞由来 ALT は安定供給の面で改良が必要であったので、遺伝子組換えにより得られた ALT についても同様に評価を行った結果、ERM として反応性の面で十分期待できる結果が得られた。

JSCC が常用 ERM の規格<sup>12)</sup>を公表して測定体系による酵素検査値の標準化を提案したことで、緩衝液によってアイソザイムの反応性が異なる ALP 活性測定を例に、市販の測定試薬を中心にそれらの JSCC 標準化対応法としての評価をするとともに、市販管理血清等をその JSCC 標準化対応法間での共通の検量用 ERM として評価した結果、JSCC 標準化対応法としては EAE 緩衝液系の方法だけでなく MEG 緩衝液系の方法も可能性がみられた。さらに、遺伝子組換えを含むヒト血清をベースとしたヒト肝由来 ALT および骨由来 ALP は、JSCC 標準化対応法における共通の ERM として実用化が期待できた。

第 4 章までに述べてきた定量分析項目、酵素活性項目におけるすべての分析対象成分の根源は遺伝子に由来する。遺伝子診断によりその変異の有無あるいは種類を知ることにより、治療方針の決定、予後の推定、発症の予測等が可能になり、従来の化学分析法と遺伝子診断の提供する情報を総合的に評価すると、臨床分析の信頼性、精度が格段に向上すると期待できる。遺伝子診断法、分析法には種々の方法が提案されているが、本研究ではオートラジオグラフィにおける放射能やエチジウムブロマイドのような変異原性物質を使わない簡便な方法の開発を目標として、ポリスチレン系のナノスフェア<sup>31)</sup>表面に DNA を化学修飾してハイブリダイゼーションを利用した粒子の特異的ないしは高選択的凝集によって遺伝子を識別する方法の開発を検討した。それぞれ互いに異なる塩基配列の DNA を修飾したいくつかのナノスフェアの混合分散溶液に DNA 試料（一本鎖検体遺伝子）を加えると、それに相補的な DNA をもつスフェア同士が選択的にネットワークを形成して凝集することが期待できる。本研究では *p53* 遺伝子<sup>32-34)</sup>の一つのホットスポットを含む野生型の 45 量体である標的核酸 (AGG45)、その一塩基変異型<sup>32)</sup>の変異核酸 (AGT45) および標的核酸の 5' 末端側

(両者に共通) および3' 末端側の 15 塩基に相補的な塩基配列とスベータから成る 3'-amino ODN と 5'-amino ODN を合成し<sup>35)</sup>、3'-amino ODN と 5'-amino ODN を赤と緑のそれぞれの蛍光スフェア表面に修飾させた結果、スフェア 1 個当たり 264 分子の ODN が修飾され修飾密度は  $2304 \text{ \AA}^2$  となり、スフェア表面のカルボキシル基のうち ODN と修飾反応に供されたものは 0.39%と算出された<sup>36)</sup>。また、未修飾スフェアおよび aminoODN 修飾スフェア表面の透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した結果、ODN 修飾後のスフェアは球形を保っていることが観察された。さらに、ODN 染色剤 (酢酸ウラニル) によるスフェアの周辺部の黒化が観察されたことで、スフェアに ODN が修飾されたことが確認された。スフェアの分散溶液を蛍光顕微鏡で観察した結果、赤と緑の両スフェアは互いにランダムに分散しており、それぞれのスフェアのブラウン運動が観察された。*p53* 遺伝子の変異核酸を添加するとスフェアの凝集が見られたが、両スフェアの凝集分布はほとんど一致せず、互いのスフェアが独立して凝集した。一方、標的核酸を添加すると両スフェアの凝集分布は完全に一致し、全ての凝集体は赤と緑の光の混合色である黄色の発光を示した。ドナーである緑のスフェアのみが吸収できる波長 470 nm を励起波長とする発光スペクトルを観察した結果より、赤と緑のスフェアのみの混合希釈溶液では 600 nm 付近に何ら変化は観測されなかったが、標的核酸の共存系ではアクセプターである赤の発光が明らかに観測することができた。この発光によって、標的核酸により互いのスフェア間が架橋されたネットワーク構造が形成されていることが示唆された。蛍光顕微鏡観察と発光スペクトル観察の結果は互いによく一致し、45 量体の中の一塩基変異を見分けることができたことで、遺伝子の多型解析 (SNP: *Single-Nucleotide Polymorphism*)<sup>37)</sup> の新しい手法に発展する可能性を十分に持っており、本研究成果を基盤に臨床での応用に期待したい。

## 参考文献

- 1) 日本臨床化学会, HPLC を用いる血清尿酸測定の方法, *臨床化学*, **22**, 300 (1993)
- 2) P.H. Duncan, N. Gochmann, T. Cooper, E. Smith, D.A. Bayse, A candidate reference method for uric acid in serum. *Clin Chem*, **28**, 284 (1982)
- 3) 金井 泉, 金井 正光, *臨床検査法提要*. 金原出版, 509, 東京 (1998)
- 4) 大澤 進, これだけは知っておきたい最新臨床化学検査法 第 1 回クレアチニン, *Medical*

- Technology, 24, 389 東京 (1998)
- 5) 日本臨床化学会, HPLC を用いる血清クレアチニンの測定勧告法, *臨床化学*, 23, 326 (1994)
  - 6) H.U. Berneyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 2. IFCC Method for Aspartate Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24, 497 (1986)
  - 7) H.U. Berneyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 3. IFCC Method for Alanine Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24, 481 (1986)
  - 8) R. Bais, M. Philcox, Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 32, 639 (1994)
  - 9) M. Horder, R.C. Elser, W. Gerhardt, M. Mathieu, E.J. Sampson, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 7. IFCC Method for Creatine Kinase, *IFCC Recommendation JIFCC*, 1, 130 (1989)
  - 10) N.W. Tietz, A.D. Rinker, L.M. Shaw, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase, *Clinica. Chimica. Acta.*, 135, 339F (1983)
  - 11) L.M. Shaw, J.H. Stromme, J.L. London, L. Theodorsen, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 4. IFCC Method for  $\gamma$ -glutamyltransferase, *Clinica. Chimica. Acta.*, 135, 315F (1983)
  - 12) 日本臨床化学会, 常用酵素標準物質の規格 (1996-02-15), *臨床化学* 25, 135 (1996)
  - 13) J.C.M. Hafkenscheid, B.E.M. Kohler, Effects of temperature of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in commercial control sera. *Clin. Chem.* 32, 184 (1986)
  - 14) R. Rej, R.E. Vanderlinde, Effects of temperature on the steadystate kinetics and measurement of aspartate aminotransferases, *Clin. Chem.* 27, 213 (1981)
  - 15) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 (AST), *臨床化学*, 18, 4, 226 (1989)
  - 16) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 (ALT), *臨床化学*, 18, 4, 250 (1989)
  - 17) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 (CK), *臨床化学*, 19, 184 (1990)
  - 18) 団野 賢和, 花田 寿郎, 松浦 修治, 活性化剤としてチオグリセロールを用いた CK 活性測定試薬の有用性, *臨床化学* 25, 253 (1996)
  - 19) G.N. Jr Bowwers, R.B. McComb, A unifying reference system for clinical enzymology : Aspartate Aminotransferase and the International Clinical Enzyme Scale, *Clin. Chem.* , 30, 1128 (1984)
  - 20) R.B. McComb, G.N.Jr Bowwers, Alkaline phosphatase and the International Clinical Enzyme Scale, *Am J Clin. Pathol* , 84, 67 (1985)
  - 21) C.F. Jr Fasce, R. Rej, H.W. Copeland, Vanderlinde RE, A discussion of enzyme reference materials : application and specifications, *Clin. Chem* , 19, 5 (1973)
  - 22) ECCLS DOCUMENT : Standard for enzyme calibration materials and control materials. Lund, *ECCLS*, ISSN 1011 - 6265, 5 (1988)
  - 23) R. Rej, R.W. Jenny, J.P. Breaudiere, Quality control in clinical chemistry : characterization of reference materials, *Talanta*, 31, 851 (1984)
  - 24) J.P. Breaudiere, R. Rej, P. Drake, A. Vassault, M. Bailly, Suitability of control materials for determination of  $\alpha$ -amylase activity, *Clin. Chem* , 27, 806 (1981)
  - 25) R. Rej, J.P. Breaudiere, M. Horder, Interlaboratory comparability of enzyme measurements, *Prog. Clin. Enzymol.*, 2, 25 (1983)
  - 26) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 (LD), *臨床化学*, 19, 228 (1990)
  - 27) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 (ALP), *臨床化学*, 19, 209 (1990)
  - 28) 日本臨床化学会, ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 (GGT), *臨床化学*, 24, 106 (1995)
  - 29) A. Karmen, A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood

- serum, *J.Clin. Invest.*, **34**, 131 (1955)
- 30) T. Tsukada, T. Nakayama, M. Kitamura, K. Ikeda, The difference in substrate specificity of  $\gamma$ -glutamyltransferases in human and commercial control sera, *The 5th ISQC.*, 415 (1983)
- 31) R.P. Haugland, *Handbook of Fluorescence probes and research chemicals*, Edn. 7, (Molecular Probes, Inc., OR, 1999)
- 32) A.J. Levine, J. Momand, C.A. Finlay, The p53 tumour suppressor gene, *Nature*, **351**, 453 (1991)
- 33) Y. Kishimoto, Y. Murakami, M. Shiraishi, K. Hayashi, T. Sekiya, Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung, *Cancer Res.*, **52**, 4799 (1992)
- 34) L. Wiesmuller, The tumor suppressor p53 in the center of a strategy aimed at the alleviation of side effects in cancer therapies, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1768 (2000)
- 35) 大塚栄子, DNA 合成機を使った遺伝子断片の合成, *バイオテクノロジー*, 廣川書店, 12, 東京 (1988)
- 36) T. Ihara, Y. Maruo, S. Takenaka, M. Takagi, Ferrocene-oligonucleotide conjugate for electrochemical probing of DNA, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4273 (1996)
- 37) W.E. Evans, M.V. Relling, Pharmacogenomics : Translating functional genomics into rational therapeutics, *Science*, **286**, 487 (1999)

## 謝 辞

本論文は昭和 60 年から平成 11 年までの 15 年間にわたる銀杏学園短期大学での研究成果と平成 12 年から平成 13 年までの熊本大学博士後期課程在籍中の研究成果に基づいて構成されたものである。本論文の作成にあたり、終始激励してご指導いただきました 城 昭典 教授に心から感謝申し上げます。

また、本論文の研究指導委員および論文審査委員としてご指導、ご助言を頂きました 野中 敬正 教授並びに 谷口 功 教授に厚く感謝申し上げます。

第 5 章および本論文全体をまとめるにあたり、特に第 2 章から第 4 章の内容は本学にお世話になる以前の研究内容であり、本論文全体のまとまりについて多大なご教示と暖かいご配慮を賜りました 井原 敏博 講師には感謝する言葉も見つかりません。深く感謝申し上げます。

また、熊本大学に在籍中終始お世話になりました 山部 和則 助手と第 5 章において終始熱意を持ってご協力を頂きました城研究室の 田中 正二郎 氏をはじめとする城研究室の学生諸氏に厚くお礼申し上げます。

第 2 章から第 4 章の内容は、銀杏学園短期大学の 中野 尚美 教授の指導のもと、江藤 晶 助教授との共同研究の成果をまとめたものであり、その業績をもって熊本大学に在籍できたと言っても過言ではありません。ここに深く感謝致します。最後になりましたが、熊本大学社会人入学を許可して頂いた銀杏学園短期大学 酒匂 光郎 学長に深く感謝申し上げます。

## 付 録

### 測定装置および器具等の検定とその正確さ

#### 1) 天秤

天秤の校正には、実際に秤量するオーダーの標準分銅を用いて行うことが肝要である。天秤は島津電子天秤（LIBROR AEL-160-11）を、標準分銅は JCSS0065 10 mg, 100 mg を使用した。秤量瓶を用いて標準分銅を測定し、この操作を 7 回繰り返した測定値の平均値、SD および正確さ(%)を求めた。

日本工業規格（JIS）では化学分析用天秤を秤量できる最大質量と感量に基づき分類し、信頼性と操作性の面で優れた電磁力平衡方式、質量による重力を抵抗ひずみ計の出力で表すロードセル式の種々の電子天秤が広く使用されている。感量 0.01～0.1 mg の定感量型直示化学天秤には自動感度校正機能が付いて多少の温度変化に対応できる。基準法に用いる試薬の調製および測容器の校正やチェックには感量 0.1 mg の精密天秤が必要である。JCSS 0065 10 mg と 100 mg の標準分銅を秤量瓶を用いて測定し、この操作を 7 回繰り返した測定値の平均値、SD および正確さ(%)を求めた結果、両標準分銅において精密度よくかつ表示どおりの質量を示した。

#### 2) サーミスタ温度計の校正

テクノ・セブン社製温度トレーサ（D641/100）とセンサ（MB 型、 $\phi 1.0 \times 500$  mm, 20-40°C）、温度の連続的記録は日立 056 型レコーダ、温度計の校正はガリウムセル（NBS SRM 1968, Cell No.0222, 基準温度 29.77°C）を用いて行った<sup>1)</sup>。ガリウムセルの中心にミネラルオイルを入れ、その中にサーミスタ測温体を挿入する。最初にセルを 16°C 付近に冷却し、徐々に加熱する。ガリウムの融点（29.772°C）近くまで上昇させ融点に達すると一定温度を示すので、サーミスタ温度計の補正値を求める。なお、温度計の基準は、IPTS-68（The International Practical Temperature Scale of 1968）<sup>2)</sup>に基づいている。IPTS-68 とは実用温度目盛に関して国際度量委員会で採択されたもので、定義定

より与えられた温度値から標準白金抵抗温度計を校正し温度目盛を作るものである。

所有のサーミスタ温度計の校正<sup>1)</sup>にはガリウムセルを用いて行った。結果は、誤差の大きいもので  $-0.03^{\circ}\text{C}$  を示した。分析時の溶液温度の測定は、分析終了後直ちに校正済みサーミスタ温度計を用い、測定温度の許容範囲内にあることを確認した。

### 3) ガラス体積計および微量ピペット

JIS K 0050<sup>3)</sup> に従ってメスフラスコおよびホールピペットを検定し、目盛りが公差 (JIS R 3505<sup>4)</sup>) 内にあるもののみを試薬調製および分析時のピペッティングに使用した。マイクロディスペンサについては、容量が  $50\ \mu\text{L}$  以下では色素法<sup>5)</sup>、それ以上では重量法により検定し<sup>6)</sup>、目盛りを調整して使用した。

### 4) pH メータとその校正

東亜電波工業 (株) 製 HM-20E 形と複合電極 GST-5211C を用いた。ジャケット付ビーカー (特製) および循環式恒温水槽 EYELA UNI COOL UC-55 (東京理科器械) を用いて、校正用 pH 標準液および被検液の温度をサーミスタ温度計で確認しながら pH の調整を行った。特に酵素活性測定試薬は  $30^{\circ}\text{C}$  で調整するため、pH メータの校正は (財) 化学品検査協会検査合格品の標準緩衝液である中性リン酸緩衝液 (pH 6.85,  $30^{\circ}\text{C}$ ) とフタル酸緩衝液 (pH 4.02,  $30^{\circ}\text{C}$ ) またはホウ酸緩衝液 (pH 9.14,  $30^{\circ}\text{C}$ ) を用いて 2 点校正を行い、試薬調製時の被検液の pH 調整に使用した。

### 5) 分光光度計

島津自記分光光度計 UV-260 形にペルチェ式恒温セルホルダ (TCC-260) を装着し、主に  $30^{\circ}\text{C}$  の測定に使用した。ほぼ同時に  $37^{\circ}\text{C}$  の測定用として、島津自記分光光度計 UV-240 形に恒温セルホルダを装着し恒温水循環装置 (Yamato Thermoelite Model BH-71) を接続して使用した。波長の正確さのチェックは重水素ランプの  $656.1\ \text{nm}$  および  $486.0\ \text{nm}$  の輝線を用いて行ったところ、両機種ともに  $\pm 0.1\ \text{nm}$  以内であった。また、 $405\ \text{nm}$  および  $340\ \text{nm}$  における迷光を「分光測定における迷光

試験法」<sup>7)</sup>に従い測定したところ、いずれの波長においてもスペクトルバンド幅 2 nm で 0.01%以下であった。分光光度計の直線性は重クロム酸カリウムの吸収極大波長 345 nm において吸光度 1.95 までの範囲で直線性が確認できた。なお、勧告法にある測定装置の性能規格は、波長の正確さが±0.5 nm 以下、迷光がいずれの波長においてもスペクトルバンド幅 2 nm 以下で 0.03%以下であり、いずれも許容範囲内であった。

#### 6) セルの光路長

島津製マッチングセル一対を含む標準角形石英セル（光路長 10 mm）9 個の光路長の測定を行った。セルに約 0.0088%重クロム酸ナトリウムの 0.001N HClO<sub>4</sub>溶液を入れて、350 nm（スペクトルバンド幅 2 nm）における精製水に対する透過率を測定した。光路長を三次元測定器（UMM850）で測定された検定セル（No.231 9.9871 mm）を用いて同様に透過率を測定し、これと各セルの測定値とを吸光度にて比較することで各セルの光路長を求めた。光路長が 10.00±0.01 mmの規格内に入ったセルを分析に用い、反応追跡終了後はセルをアルカリ性洗剤（Merck、Extran MA 03 の 2%溶液）で洗浄し、十分に水洗し、約 60°Cに設定した乾燥器中で 20～30 分放置して乾かした後、繰り返し使用した。

#### 7) モル吸光係数

##### 7-1) 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレイチド（NADH: nicotinamide adenin dinucleotides）

日本臨床化学会分析部会機器委員会の「340 nm 付近の NAD(P)H の見掛けのモル吸光係数の算出法試案」<sup>8)</sup>に従い、グルコース（NIST SRM 917a）標準溶液を、測定波長 339 nm、吸光度 0.6～1.7 の範囲で測定したところ、 $\epsilon$  は  $629.4 \pm 1.8 \text{ m}^2/\text{mol}$ （30°C）であった。この条件下で国際臨床化学連合（IFCC: International Federation of Clinical Chemistry）の文献値は  $630 \text{ m}^2/\text{mol}$  である<sup>9~12)</sup>。

##### 7-2) 4-ニトロフェノール（4NP: 4-nitrophenol）

アルカリホスファターゼ活性測定の反応追跡物質である 4-ニトロフェノールのモル吸光係数の

測定には NIST SRM 938 による標準溶液を用い、測定波長 405 nm、吸光度 0.3～1.9 の範囲で測定したところ、 $\epsilon$  は  $1848 \pm 3 \text{ m}^2/\text{mol}$  ( $30^\circ\text{C}$ ) であった。この条件下で IFCC の文献値は  $1845 \pm 20 \text{ m}^2/\text{mol}$  である<sup>13)</sup>。

### 7-3) 5-アミノ 2-ニトロ安息香酸 (5A2NB: 5-amino 2-nitro benzoic acid)

$\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性測定の反応追跡物質である 5-アミノ 2-ニトロ安息香酸 (東京化成、A 1048, Lot TBZO 1) を  $120 \sim 140^\circ\text{C}$  で約 5 時間乾燥後、標準溶液を調製して使用した。モル吸光係数の測定を測定波長 410 nm、吸光度 0.5～1.7 の範囲で測定したところ、 $\epsilon$  は  $790.1 \pm 2.7 \text{ m}^2/\text{mol}$  ( $30^\circ\text{C}$ ) であった。この条件下で IFCC の文献値は  $790.8 \pm 3.4 \text{ m}^2/\text{mol}$  である<sup>14)</sup>。

### 8) セル内反応液の温度

校正済みのサーミスタ温度計を用いて、分析終了毎に必ず反応液温度の測定を行い、分析時の溶液温度の確認を行った。

IFCC 勧告法の温度制御に関する正確度の規定では、酵素反応開始後の反応液温度を  $30.00 \pm 0.05^\circ\text{C}$  に保つよう、また、精密度に関しては、酵素反応を実際にモニターする時間内で反応液中心付近の温度を少なくとも 16 回記録して SD が  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  以内でなければならないと定められている。また、セルに添加する溶液の採取は、全てピペットの検定温度で行うことになっている。ピペットの検定を  $30^\circ\text{C}$  で行わない場合は、液体の膨張に対して補正を行うよう定められているのみで、反応開始液であっても予備加温して添加するようにはクレアチンキナーゼ活性測定勧告法を除いて明確には記載されていない<sup>15)</sup>。

そこで、反応開始液の予備加温の影響を検討するため、反応開始液を予備加温した場合としない場合を比較したところ、規定の温度に到達する時間が大幅に改善された。アラニンアミノトランスフェラーゼ活性の測定を例にセル内測光部の温度のモニターを図に示す。

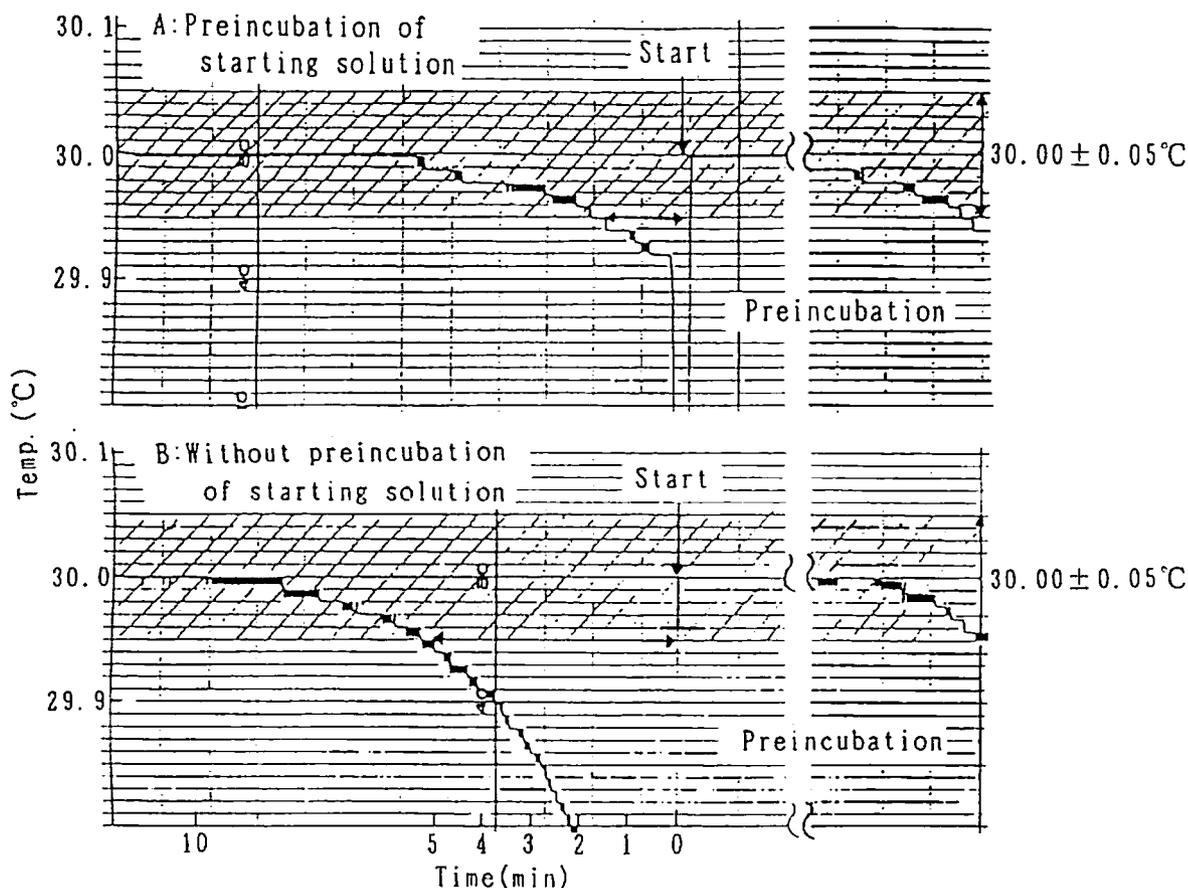


図 反応総液の温度に与える反応開始液の予備加温の影響

反応開始液を 30°C に予備加温して反応開始後 90 秒から 390 秒まで 20 秒間隔で 16 回測定した結果は  $30.01 \pm 0.03^\circ\text{C}$  と、予備加温しない場合の  $29.92 \pm 0.05^\circ\text{C}$  に比較して反応総液の温度およびバラツキともに大幅に改善された。

#### 参考文献

- 1) 日本臨床化学会分析部会機器委員会. サーミスタ温度計による測定温度の試験法. 第 8 回臨床化学ワークショップ参考資料集, 1 (1989)
- 2) The International Practical Temperature Scale of 1968. *Metrologia*, 5, 35 (1969)
- 3) 日本規格協会. 一般 JIS K 0050-化学分析法通則 (1983)
- 4) 日本規格協会. ガラス製化学用体積計(JIS R 3505)JIS ハンドブック, 31, 化学分析: 830(1997)
- 5) 日本臨床化学会分析部会機器委員会. 微量容量の試験法. 第 8 回臨床化学ワークショップ参考資料集, 53 (1989)
- 6) 日本規格協会. プッシュボタン式液体用微量体積計(JIS K 0970-1989)JIS ハンドブック, 31, 化学分析: 782(1997)
- 7) 日本臨床化学会分析部会機器委員会. 分光測定における迷光試験法. 第 8 回臨床化学ワークショップ参考資料集, 9 (1989)
- 8) 日本臨床化学会分析部会機器委員会. 340nm 付近の NAD(P)H の見かけのモル吸光係数の算出法. 第 8 回臨床化学ワークショップ参考資料集, 34 (1989)

- 9) H.U. Bermeyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 2. IFCC Method for Aspartate Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **24**, 497 (1986)
- 10) H.U. Bermeyer, M. Horder, R. Rej, Approved Recommendation(1985)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 3. IFCC Method for Alanine Aminotransferase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **24**, 481 (1986)
- 11) R. Bais, M. Philcox, Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase, *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **32**, 639 (1994)
- 12) M. Horder, R.C. Elser, W. Gerhardt, M. Mathieu, E.J. Sampson, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 7. IFCC Method for Creatine Kinase, *IFCC Recommendation JIFCC*, 130 (1989)
- 13) N.W. Tietz, A.D. Rinker, L.M. Shaw, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase, *Clinica. Chimica. Acta.*, **135**, 339F (1983)
- 14) L.M. Shaw, J.H. Stromme, J.L. London, L. Theodorsen, IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 4. IFCC Method for  $\gamma$ -glutamyltransferase, *Clinica. Chimica. Acta.*, **135**, 315F (1983)
- 15) G.N.Jr Bowers, Approved Recommendation(1978)on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes : Part 1. General considerations concerning the determination of the Catalytic Concentration of an Enzyme in the blood serum or plasma of man, *Clin. Chem. Acta.* **98**, 163F (1979)

## 略語一覧

AACC : American Association of Clinical Chemistry, 米国臨床化学会  
ADP : Adenosine-5'-diphosphate  
ALP : Alkaline Phosphatase, アルカリホスファターゼ  
ALT : Alanine Aminotransferase, アラニンアミノトランスフェラーゼ  
AMP : Adenosine-5'-monophosphate  
AMP : アミノメチルプロパノール  
AP5A : p1,p5-di(adenosine-5'-)pentaphosphate  
AST : Aspartate Aminotransferase, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ  
ATP : Adenosine-5'-triphosphate  
CDC : Center for Disease Control  
CK : Creatine Kinase, クレアチンキナーゼ  
DEA : ジエタノールアミン  
DMT : ジメトキシトリチル  
EAE : エチルアミノエタノール  
ECCLS : European Committee for Clinical Laboratory Standard, ヨーロッパ臨床検査標準協議会  
ECD : 電気化学検出器  
ERM : Enzyme Reference Material, 酵素標準物質  
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer, 蛍光共鳴エネルギー移動  
GGT :  $\gamma$ -glutamyltransferase,  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ  
G6PD : Glucose-6-phosphate dehydrogenase, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ  
GSCC : ドイツ臨床化学会  
HECTEF : Health Care Technology Foundation, 福祉・医療技術振興会  
HK : Hexokinase, ヘキソキナーゼ  
ICES : the International Clinical Enzyme Scale, 国際臨床酵素目盛  
IFCC : International Federation of Clinical Chemistry, 国際臨床化学連合  
IRMM : Institute for Reference Materials and Measurements, ヨーロッパコミッション共同研究センター  
JSCC : Japan Society of Clinical Chemistry, 日本臨床化学会  
JCCLS : Japanese Committee for Clinical Laboratory Standard, 日本臨床検査標準協議会  
JCERM : Japanese Certified Enzyme Reference Material, 日本認証酵素標準物質  
LD : Lactate Dehydrogenase, 乳酸脱水素酵素  
MD : Malate Dehydrogenase, リンゴ酸脱水素酵素  
MEG : N-メチルグルカミン  
NAC : N-アセチルシステイン  
NAD :  $\beta$ -nicotinamide-adenine dinucleotide  
NIST : National Institute of Standards and Technology, 国際標準技術研究所  
4-NPP : 4-nitro phenyl phosphate, 4-ニトロフェニルリン酸  
ODN : Oligo deoxiribonucleotide, オリゴヌクレオチド  
2-OG : 2-oxoglutaric acid, 2-オキソグルタル酸  
PP : Pyridoxal 5'-phosphate, ビリドキサール 5'-リン酸  
TEA : トリエチルアミン  
TEM : 透過型電子顕微鏡  
SFBC : フランス臨床化学会  
SNP : Single-Nucleotide Polymorphism, 遺伝子の一塩基変異多型解析  
SSCC : スカンジナビア臨床化学会  
WSC : water soluble carbodiimide, EDAC : 水溶性カルボジイミド

## 臨床化学分析専門用語

アポ酵素：酵素のタンパク質部分

ホロ酵素：補酵素（水溶性ビタミン誘導体）により活性化された酵素

アイソザイム：同じ酵素としての触媒能をするが、タンパク質としては異なる酵素間の関係

LD<sub>1</sub>：心由来サブユニット(H) 4 量体, H<sub>4</sub>

LD<sub>2</sub>：H<sub>3</sub> M

LD<sub>3</sub>：H<sub>2</sub> M<sub>2</sub>

LD<sub>4</sub>：H M<sub>3</sub>

LD<sub>5</sub>：筋由来サブユニット(M) 4 量体, M<sub>4</sub>

Lineweaver-Burk プロット：基質濃度と反応速度との逆数プロットの関係

共役酵素：酵素活性測定の実験の中に含まれ、間接的に働く別の酵素

Pooled serum：複数の血清を混合したもので、血清の代表として用いる

JSCC 常用基準法：JSCC 勧告法(酵素項目)の測定温度のみ 37°Cに変更する基準法

JSCC 自動化法：JSCC 常用基準法の自動化法

JSCC 標準化対応法：JSCC 常用基準法と互換性が保証される方法

酵素反応試験法：JSCC 標準化対応法として取り扱えるかを検討する方法

評価対象法：JSCC 標準化対応法として評価される方法

反応性評価法：JSCC 標準化対応法として評価する方法

精密度の推定値を表す標準偏差  $SD_x$ ,  $SD_y$

残差標準偏差  $S_{y,x}$

### 酵素標準物質の規格

検量用 ERM：日常法の測定値を基準法の値に換算できる物質

基準範囲：基準固体の測定値の中央を含む 平均値  $\pm 1.96SD$

トレーサビリティ（遡行性：基準法の持つ正確さを日常分析法で確認する）

トランスファビリティ（伝達性）

コミュニタビリティ：方法間互換性

サーベイ

同時再現性

日差再現性

### 添加回収試験

温度換算係数：30°Cにおける反応速度に対する 37°Cにおける反応速度の比