

開会の挨拶

平成17年度、日本臨床化学会関東支部例会を担当します三井記念病院の芳賀です。よろしくお願いいたします。

本日は、折角の土曜日午後のご多忙中のところ、多数の方のご参加を頂きまして、例会担当者として大変有り難く、感謝申し上げます。

今年の例会は臨床検査の標準化をテーマとしました。内外の医療に関する厳しい環境にあっても、最終的に医療の質が問題となりますが、少なくとも臨床検査の標準化が果たす役割は大きいものと考えております。その観点から始めに、渡辺先生に司会をお願いして、臨床検査の標準化内外の動向を筑波大学の桑先生に教育講演をしていただきます。ホットな話題が聞けるものと期待しております。

次に司会を美崎先生と関口先生をお願いして、日本臨床化学会酵素試薬専門委員会プロジェクトの中で関東支部関連のプロジェクト報告を企画しました。アルブミンは村本先生、アルカリフォスファターゼは山舘先生、刈米先生、アミラーゼは私が、膵アミラーゼは白井先生、リパーゼは飯塚先生の各先生方に口演をお願いしてあります。プロジェクト報告に関しては夏期セミナーでも発表されていますが参加されていない方もおられると思います。またその後の進捗状況などもお話いただけるものと期待しております。

尚、アルカリフォスファターゼに関しては関東支部の報告も兼ねています。これは分科会活動からプロジェクト制に移行しての第1号のプロジェクトです。現在関東支部のプロジェクトは1件のみの活動ですが、是非皆さんに新規プロジェクトへご応募して頂き関東支部の活性化に寄与していただきたいと思えます。

プロジェクト口演に対しては活発なご討議をして頂きたいと思えます。この例会が実りあるものになることをお願いするとともに、最後に本日会場を提供して頂いた島津製作所東京支社に御礼を申し上げまして、挨拶に代えさせていただきます。

第 24 回(平成 17 年度)日本臨床化学会関東支部例会プログラム

**平成 17 年度日本臨床化学会関東支部例会
プログラム**

《 テーマ：臨床検査の標準化 》

1. 例会長：芳賀利一(三井記念病院中央検査部)
2. 期 日：平成 17 年 10 月 29 日(土曜日)13 時～17 時
3. 場 所：(株)島津製作所東京支社 イベントホール
4. プログラム

【13:00～13:05】

開会の辞 例会長 芳賀利一 (三井記念病院中央検査部)
関東支部 新支部長挨拶 渡邊 卓 (杏林大学医学部臨床病理)

【13:05～14:05】

(1). 教育講演

司会：渡邊 卓 (杏林大学医学部臨床病理)
「国内外における標準化の流れ」
桑 克彦 (筑波大学臨床医学系)

【14:05～16:55】

(2). JSCC プロジェクト関東支部関係活動報告

司会：美崎 英生 (株カイノス)
関口 光夫 (日本大学医学部板橋病院臨床検査部)

- 1). 血清アルブミン測定の常用基準法の確立 (14:05～14:35)
村本 良三 (心臓血管研究所臨床検査部)
- 2). ALP の IFCC 勧告法と JSCC 法の反応性および疾患特異性の調査 (14:35～15:10)
 - (a) 山舘 周恒 (日本大学板橋病院臨床検査部)
 - (b) 刈米 和子 (都立荏原病院検査部)

《 15:10～15:25 … 休憩 》

- 3). 血清アミラーゼ測定の常用基準法の確立 (15:25～15:55)
芳賀 利一 (三井記念病院中央検査部)
- 4). 血清 P-アミラーゼ測定の常用基準法の確立 (15:55～16:25)
白井 秀明 (燕労災病院検査科)
- 5). 血清リパーゼ測定の常用基準法の確立 (16:25～16:55)
飯塚 儀明 (筑波大学付属病院検査部)

【16:55～17:00】

閉会の辞 美崎英生(日本臨床化学会酵素試薬専門委員会委員長)

国内外における標準化の流れ
筑波大学大学院人間総合科学研究科
桑 克彦

1. 国際ルールと国内の対応

国際的に進められている標準化作業の主な機関は、IFCC、CLSI、ISO/TC 212、JCTLM である。このうち重要なのが ISO/TC 212:「臨床検査と体外検査システム」での良い検査室の運営・管理(ISO 15189 など)、良い測定体系の確立(ISO 17511 など)と、さらに JCTLM での検査医学分野における国際的に整合性のとれた測定法や標準物質の選定などである。標準物質は測定値の互換性を確保するために必須である。そのために計量標準分野および標準物質分野において、「不確かさの評価・表現」の概念が国際的に広く導入されている。

このような国際的な作業の国内対応は JCCLS での作業に集約される。主な作業は学協団体からの提示による勧告法(JSCC 法など)などを JCCLS として最終的に承認すること、学協団体の協力を得て行うもの(ERM の設定など)および産学官が一体となって行う標準化作業(互換性確保とデータベースの構築)などである。

2. JCCLS における標準化の作業

柱1(基準測定操作法/標準物質の設定)、柱2(測定値の互換性の確保)、柱3(データベースの構築)について作業を開始した。このうち柱1は NMIJ((独)産業技術総合研究所計量標準総合センター)を中心に、学会(JSCC, JSLM, JAMT など)、協会(JACRI, JAIMA など)が参画する。特に標準物質は、純物質系と実試料系に分けて設定する。また、最上位の基準が、WHO 標準品である項目については、SI 単位系にトレーサブルとならないが、目的に合致していることから、計量学の領域でも同様に扱う。調査研究項目として尿中生化学成分、免疫成分、ホルモン、薬物、凝固因子、腫瘍マーカーなどについて、具体的な標準物質の作製プロトコルを作成する。

柱2はパッチワーク方式によるほか、既存の標準化作業グループとのネットワークを組む。すなわち、すでに設定されている標準を用いて、これにトレーサブルになるように各検査室間での測定値の互換性が確保できる。このようなことを実践している各グループでの成果は、IT ツール化されているものは吸い上げてネットワークにジョイントさせる。

3. 検査室に求められる不確かさ

信頼性を評価しかつ確保するための手段として不確かさを用いる。これはトレーサビリティをとっていることを計量学的に表現するものである。そのためには日常検査での測定結果について不確かさを求める。これに必要なやり方や計算ツールなどはすでに準備されている。また、参考になる事例も報告されている。検査室での不確かさ評価には、患者試料での不確かさ評価を実験によって求めるか、あるいは日常の精度管理試料の結果を用いて算出するかがある。また、IQC および EQA においては、不確かさ評価を導入し、トレーサビリティの確保と測定結果の信頼性を維持して行くことになる。

血清アルブミン常用基準法の確立 HPLC法は可能か？

村本 良三 財) 心臓血管研究所付属病院臨床検査部

【はじめに】

現在、血清アルブミンの日常検査に利用されている測定法はBCG法、BCP法、BCP改良法および電気泳動法の4法である。しかし、約9割の施設で利用されているBCG法においても、アルブミンのみならずグロブリンとも反応する問題点を抱えている。また、BCP法では酸化型と還元型で反応性が異なる点や透析患者との反応性に問題があり、電気泳動法でもセア膜の染色色素が蛋白を均等に染色できないなど、従来の日常検査法の正確さには問題が残されている。最近BCP法の問題点を解消し、アルブミンに対する特異性が高く、正確度が高い測定法としてBCP改良法試薬が市販されたが、普及率は現在5%程度である。これら4法の測定値には差が認められ、この差は臨床特に関心となる低アルブミン血症で顕著に認められる。また、BCG法における問題点や測定法間の測定値の違いから、施設間差が大きい項目の一つとなっている。

一方、臨床側では肝硬変における低アルブミン血症の判断基準が 3.5 g/dL 以下とされ、その治療薬として分岐鎖アミノ酸製剤を用い血清アルブミン濃度を上げる治療法が確立されている。このため、 0.1 g/dL のアルブミン変化を正しく評価することの重要性が示されている。しかし、先に示したように測定法によって測定値に差が生じ、しかも正確度の問題があることから、臨床側が混乱しているのが現状である。これらの点から、早急に血清アルブミン測定における正確度の改善および施設間差縮小への対策が望まれている。

現在、標準物質としては国際蛋白標準物質であるCRM470が提供され、この常用標準血清から測定キット検量物質への正確さの伝達への基盤は整っている。しかし血清アルブミン測定の基準法が我が国では確立されていないことから、正確さに基づく測定体系の確立が急務である。本プロジェクトは血清アルブミン測定の常用基準法および標準物質の設定を行うことを目的に発足した。

【常用基準法作成へのアプローチ】

血清アルブミン測定における常用基準法の候補としては、従来から標準的測定法とされてきた免疫学的測定法がある。しかし、免疫学的測定法は特異性にすぐれているものの、血清の前希釈率の高さから精密度には難がある。また抗体のロット差による測定値の違いもみられる。そのような背景から我々はHPLC法を候補として選択し、その可能性について現在検討中である。以下に、検討内容の一部を紹介するが、未だ確立できていないのが現状である。

【慶應大学病院における実施例】

[方法]

装置：ナノスペースS I-1 (資生堂)

カラム：Asahi Pak ES-502N (内径 7.5 mm、長さ 10 cm) ; イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム)

移動相：グリシン-NaOH : 50mM (pH9.0)
MgCl : 220mM

流量 : 1.0 ml/min

温度 : 45°C

注入量 : $5 \mu\text{L}$ (10 倍希釈血清) ; 検出系で異なる

[検出系]

次の3法について検討したが、以下に示したような問題点や指摘があった。

- ① UV法 : 280 nm で行ったが、本測定では尿酸のピークがアルブミンと若干重なる。また、 280 nm ではビリルビンなどの芳香族類の影響も懸念。
- ② 発色法 : 分離後の溶出液とBCG試薬が等量混合するようにミキシングコイルをセットし、発色強度を 628 nm で検出した。しかし、原理的に色素結合法のメカニズムが明らかではないことから基準法として疑問との指摘。
- ③ 蛍光法 : 励起波長 285 nm 、蛍光波長 340 nm で行った。免疫法と比較し、高ビリルビン検

体で低値を示すことが確認され、対策を検討中。

以上のように、未だ常用基準法が確立できる状況ではないが、関東支部例会では各検出系における免疫法との相関、アルブミン分画のSDS-PAGE(銀染色)による確認、各種疾患の患者血清における溶出パターンなどについて報告する予定。

【プロジェクト構成員】

村本良三:プロジェクト責任者

(心臓血管研究所臨床検査部)

大澤 進(九州大学医学部保健学科検査専攻学)

伊藤喜久(旭川医科大学臨床検査医学講座)

林富士夫(神戸大学附属病院検査部)

沢田威男(自治医科大学附属病院検査部)

安原正善(神戸掖済会病院臨床検査部)

藤田 孝(藤田保健衛生大学病院臨床検査研究部)

大竹和子(慶応大学医学部附属病院中央検査部)

上地史朗(株式会社カイノス)

斉藤憲祐(デイドベーリング株式会社)

安川恵子(旭化成株式会社)

ALP の IFCC 勧告法と JSCC 法の反応性および疾患特異性の比較調査

関東支部分科会プロジェクト/酵素・試薬専門委員会プロジェクト
日本大学医学部附属板橋病院臨床検査部 山館 周恒

1. はじめに

ヒト血清中アルカリ性フォスファターゼ (EC : 3.1.3.1、alkalinephosphatase : ALP) は、その測定試薬の緩衝液の種類によってアイソザイム間の反応性が異なることが古くから知られている。JSCC 法では各アイソザイムの反応性が比較的対等な 2-ethylaminoethanol (EAE) 緩衝液を採用したが、これまで IFCC では小腸由来 ALP に対する反応性が低い 2-amino-2-methylpropanol (AMP) 緩衝液を第一候補として SOP 試案が検討されてきた。本年 7 月 25 日に開催された IFCC の Committee Reference Systems for Enzymes (C-RSE) において緩衝液と反応性の問題から ALP の SOP 自体が白紙状態になったとの情報があるが、ここでは IFCC がこれまで SOP 候補として提示してきた AMP を使用した方法と JSCC 法について本プロジェクトが行ってきた比較検討について報告する。

2. 方法

1) 試薬 : JSCC 標準化対応試薬は第一化学薬品 (株) のピュアオート ALP を、IFCC 法試薬は、IFCC Document Stage 2, Draft 1 に沿った AMP 終濃度 350 mmol/L と 2003 年末に公表された SOP 試案 (37°C) の AMP 終濃度 750 mmol/L の二種類を自製した。肝・小腸・胎盤由来 ALP 試料は (株) 常光の ALP マーカーを、骨由来 ALP 試料はアイソザイム検査で骨型 90% の小児血清をそれぞれ用いた。

2) 測定装置 : H7170 形自動分析機 (日立) を用いた。

3) 検討事項 : 各アイソザイム試料を用いて IFCC SOP 試案について反応速度論的検討を行った。また、患者血清について JSCC 法と IFCC SOP 試案のコミュタビリティを調査した。さらに、JSCC 法で異常値を示した健診検体について IFCC 法で測定を行い比較した。

3. 結果

1) 反応速度 : AMP に対する S-v 曲線では、胎盤由来 ALP の顕著な阻害が観察された (図 1)。IFCC の SOP 試案 (37°C) の条件で肝由来 ALP の反応速度 (v) は V_{max} の約 93% であった。IFCC の SOP 試案で AMP 濃度を 350 mmol/L から 750 mmol/L に変更したことにより測定値が 6.3% 上昇した。

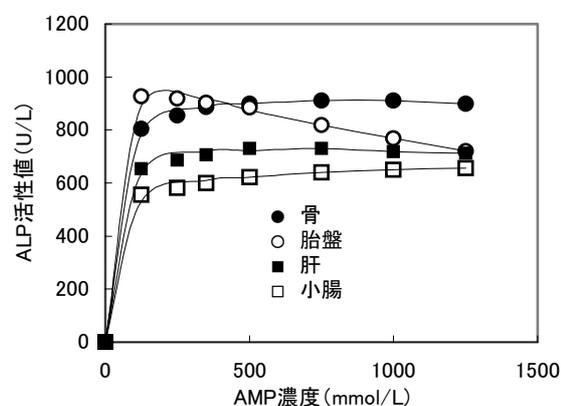


図1. AMPのS-v曲線

2) コミュタビリティ : JSCC 法と IFCC SOP 試案の相関図を図 2 に示す。IFCC SOP 試案に対して JSCC 法で高値域に乖離した検体は、血液型 O・B 型で他の検査項目に異常を認めなかった例と ALT 高値で肝疾患が疑われる例の 2 者が存在した。

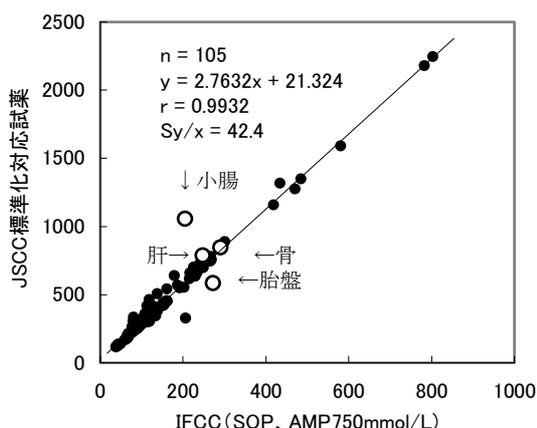


図2. IFCC SOP試案とJSCC法の相関図

3) 健診検体：460 件中 JSCC 法による ALP が 340 U/L 以上が 15 件で、その検体を Draft 1 の IFCC 法 (AMP 350mmol/L) で測定すると 8 件は基準値上限の 130 U/L 以下の値であった。

4. 考察

IFCC の SOP 試案が白紙に戻されたとの最新情報があることから、本プロジェクトのこれまでの活動も実務的な有益性が失われた感がある。今後は、IFCC の動向を踏まえて、機会があれば本プロジェクトのデータなどを積極的に IFCC に提示していきたい。

また、国内で 95%程度まで普及した JSCC 法については、小腸由来の ALP に起因する異常高値の問題など臨床的な再評価が求められているのも事実である、さらに、世界的なハーモナイゼーションに対する考え方も課題の一つである。

■文献

- 1) 山舘周恒:ALP の IFCC 勧告法と JSCC 法の反応性および疾患特異性の比較調査. 臨床化学, 33(Sup.2). 9b-13b. 2004.
- 2) 日本臨床化学会酵素専門委員会: ヒト血清中酵素活性測定の勧告法—アルカリフォスターゼ(ALP)—. 臨床化学, 19. 209-27 .1990.

●プロジェクトメンバー

- 代表者：山舘 周恒（日大板橋病院臨床検査部）
 副代表：五十嵐 富三雄（虎ノ門病院臨床化学科）
 副代表：野村 博（ロシュ株式会社）
 委員：新井 堅仁（(株) 関東化学）
 池田 千秋（虎ノ門病院）
 石田 浩二（慶應義塾大学病院）
 大久保 滋夫（東京大学病院）
 大脇 一郎（ロシュ・ダ・イグノスティクス（株））
 刈米 和子（都立駒込病院）
 金原 清子（虎ノ門病院）
 桑原 正英（第一化学薬品株式会社）
 小林 照明（東京通信病院）
 関口 光夫（日本大学板橋病院）
 高笠 信之（(株) 関東化学）
 高橋 修（(株) エスアールエル・ラボクリエート）
 永井 邦子（(株) エスアールエル）
 中島 正雄（シスメックス（株））
 永瀬 昌史（日本大学板橋病院）
 芳賀 利一（三井記念病院）
 早川 富夫（慶應義塾大学病院）
 茂木 秀明（和光純薬工業（株））
 柳澤 勉（青梅市立総合病院）
 山口 真理（ロシュ・ダ・イグノスティクス（株））
 山田広則（株式会社ダイアヤトロン）
 吉海 毅（ロシュ・ダ・イグノスティクス（株））
 熊木 充夫（青梅市立総合病院）

ALPのJSCC標準化対応法におけるグローバルハーモナイゼーションの可能性

都立荏原病院検査科 刈米 和子

[はじめに]

1989年、日本臨床化学会(JSCC)よりヒト血清アルカリホスファターゼ(ALP)活性測定報告法が報告され、その後温度条件のみを37°Cとした常用基準法をリファレンスとしたトレーサビリティ体系が確立された。しかしながら、国際的なハーモナイゼーションという観点から考えた場合、アイソザイムの反応性の違いのためJSCC常用基準法(報告法)はIFCC報告法とのトレーサビリティ確保が困難である。それらの問題を含め、JSCC常用基準法をIFCC報告法に変更すべきか否かについて検討、討議のため、2003年、本プロジェクトが立ち上げられた。

[IFCC報告法およびJSCC報告法の反応特性の違い]

酵素活性測定報告法におけるIFCC報告法とJSCC報告法との違いは、JSCC報告法には「各アイソザイムを均等にはかること」という要件が含まれている点にある。特にALPは使用する緩衝液の違いにより、小腸型アイソザイム(以下、小腸型)に対する反応性が異なるため、小腸型リッチな検体では乖離することになる。

[報告法変更のメリットとデメリット]

変更に伴うメリットとデメリットについて整理すると以下のようにまとめることができる。(メリット)

1. 国際的なハーモナイゼーションがはかれる
2. 臨床的症候と一致しないALP異常高値患者の

問題が解決する 3. 食事の影響を受けにくくなる 4. ABO式血液型でA, AB型群とB, O型群で基準範囲が異なる問題が解消される (デメリット)

1. IFCC報告法(37°C)(以下、IFCC法(37°C))はJSCC標準化対応法(以下、JSCC法)の約1/3に見積られるため、基準範囲等の大幅な変更が必要となる(図-1)
2. 国内におけるJSCC法の普及率は約95%であり、報告法の変更は臨床側、検査現場、患者に混乱をきたす恐れがある
3. IFCC法は小腸型アイソザイムが見えにくくなるため、肝細胞の線維化がとらえにくくなる

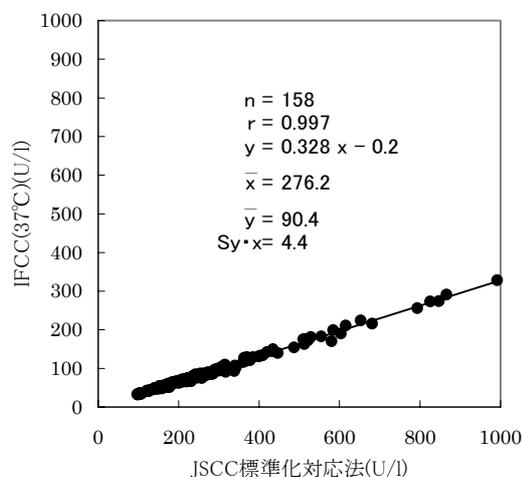


図-1: JSCC標準化対応法とIFCC法(37°C)との相関

[グローバルハーモナイゼーションの現状]

ヨーロッパ臨床検査標準協議会(ECCLS)がJSCC報告法と同様に小腸型を比較的感度よくとらえることのできるMEG緩衝液を選択していることは真の意味での国際的協調が容易では

ないことを示している(表-1)。

[ALPアイソザイムの存在様式]

血清ALPアイソザイムの存在様式はおおよそ次の通りである。

- ・成人の肝型：骨型=1：1，1才未満：骨型95%
- ・健全者に含まれる小腸型の割合：平均6.5% (最小0%，最大34.8%)
- ・健全A，AB型群に含まれる小腸型の割合：平均2.5% (最小0%，最大9.2%)
- ・健全B，O型群に含まれる小腸型の割合：平均10.3% (最小0%，最大34.8%)

胎盤型は妊婦や一部の悪性腫瘍の場合にのみ血中に現れるため、通常血清に含まれるアイソザイムは肝型、骨型、小腸型ということになる。

表-1:ALPの各報告法

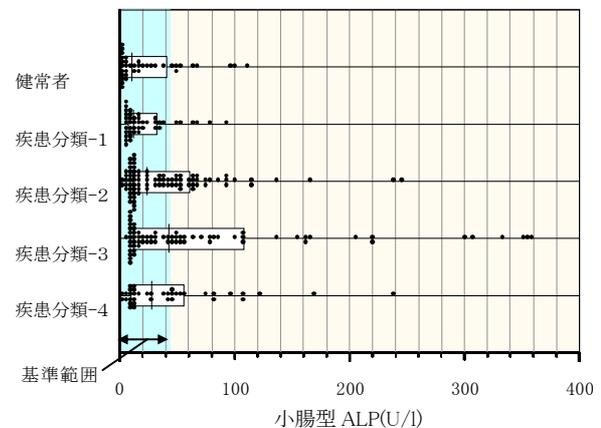
緩衝液	単位	JSCC	JSCC-SOP	IFCC	AACC	ECCLS	SSCC
		1989 EAE	2004 EAE	1983 AMP	1983 AMP	1992 MEG	1974 DEA
濃度	($\mu\text{mol/l}$)	1000	1000	350	350	500	1000
pH		9.9	9.9	10.4	10.4	10.1	9.8
4-硝ロフェニルン酸	(mmol/l)	15	15	16	16	20	10
酢酸マグネシウム	(mmol/l)	0.5	0.5	2	2	2	—
硫酸マグネシウム	(mmol/l)	—	—	—	—	—	—
NaCl	(mmol/l)	—	—	—	—	110	—
硫酸亜鉛	(mmol/l)	—	—	1	1	—	—
HEDTA	(mmol/l)	—	—	2	2	—	—
塩化マグネシウム	(mmol/l)	—	—	—	—	—	0.5
測定温度	($^{\circ}\text{C}$)	30	30	30	30	37	37
波長	(nm)	405	405	405	405	405	405
試薬1量	(ml)	2	2	2.5	2.5	0.5	1
試薬2量	(ml)	0.5	0.5	---	---	0.05	0.1
検体量	(ml)	0.025	0.012	0.05	0.05	0.01	0.01

EAE：2-エチルアミノエタノール MEG：N-メチル-D-グルカミン
AMP：2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール

[小腸型の臨床的意義]

従来、消化器病学会推奨法とされたKind-King法は小腸型を感度よくとらえる方法として知られ、肝炎から肝硬変に移行する際、小腸型の上昇に伴い、総活性が上昇することから、肝線維化マーカーとされていた。現在ではIV型コラーゲンやヒアルロン酸等が肝線維化マ

ーカーとして測定されている。しかし、それらの肝線維化マーカーも慢性肝炎の段階の初期の線維化をとらえることは困難である。小腸型を比較的よくとらえるとされるJSCC法も総ALP活性に占める小腸型の割合が小さいため、同様である。一方、小腸型は肝硬変移行前の肝炎の段階から上昇するため、初期の線維化をとらえるマーカーとしての意義も期待される(図-2)。



	健全者	疾患分類-1	疾患分類-2	疾患分類-3	疾患分類-4
健全者	*	-0.492 判定保留	-3.234 P<0.05	-4.783 P<0.001	-2.617 判定保留
疾患分類-1	0.492 判定保留	*	-2.814 P<0.05	-4.446 P<0.001	-2.219 判定保留
疾患分類-2	3.234 P<0.05	2.814 P<0.05	*	-2.044 判定保留	0.167 判定保留
疾患分類-3	4.783 P<0.001	4.446 P<0.001	2.044 判定保留	*	1.790 判定保留
疾患分類-4	2.617 判定保留	2.219 判定保留	-0.167 判定保留	-1.790 判定保留	*

*:検定なし

図-2 各肝疾患群における小腸型ALPの多重比較

ほとんど肝線維化の生じていないと考えられる症例を疾患分類1，慢性肝炎を疾患分類2，肝硬変（HCC《肝細胞癌》合併を含む）を疾患分類3，他の特殊な慢性肝疾患を疾患分類4とした

[IFCCとのコミュニタビリティーおよびトレーサビリティー]

JSCC法がIFCC法(37 $^{\circ}\text{C}$)とのコミュニタビリティーがはかれない最大の理由は小腸型の測りこみの程度の違いであり、そのためトレーサビリティー確保が困難になっている(図-3A)。つま

り、JSCC法から小腸型の分を差し引いた値はIFCC法(37°C)と比例互換性があり、適当な検量物質さえあればトレーサビリティの問題は解決できるのではないかと予想される。そこでIFCC法(37°C)と、選択的阻害法により得られた小腸型をJSCC法から差し引き、IFCC法(37°C)に校正した測定値との相関分析の結果、トレーサビリティ確保が可能であることが示された(図-3B)。

[まとめ]

IFCC勧告法およびJSCC勧告法は各アイソザイムに対する反応特性のコンセプトが異なっており、トレーサビリティの問題解決が困難であるのは、むしろ当然と見ることもできる。JSCC勧告法のコンセプトは必要に応じて測定後、電気泳動などにより、アイソザイム分析を行うことを想定している。しかし、電気泳動法は手間、時間、コスト等の理由により、日常検査として実用的とは言いがたく、あまり行われてはいない。それらの問題を解消できるアイソザイム分析法があれば、JSCC法における高値健康常者の問題も迅速に解決できると思われる。また肝細胞の線維化の指標としては総活性で見るよりも小腸型をとらえたほうが診断特異性が高い結果も示されている。今、JSCC勧告法の問題解決策が勧告法変更以外ないのであれば致し方ないが、可能な方策があるのであれば、あえて変更により生じるリスクを取る必要はないと考える。

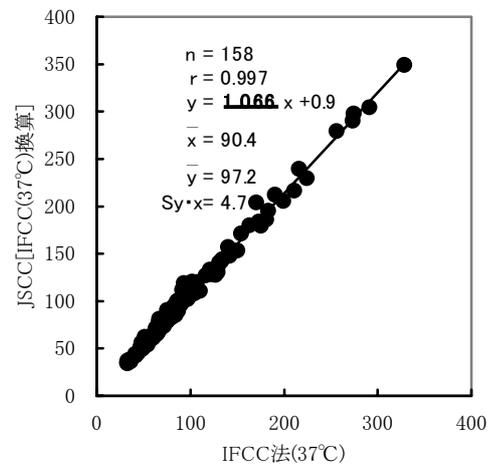


図-3A:IFCC(37°C)とJSCC標準化対応法の校正効果比較

リコンピナント肝由来ALPを共通キャリブレーターとし、検量実施

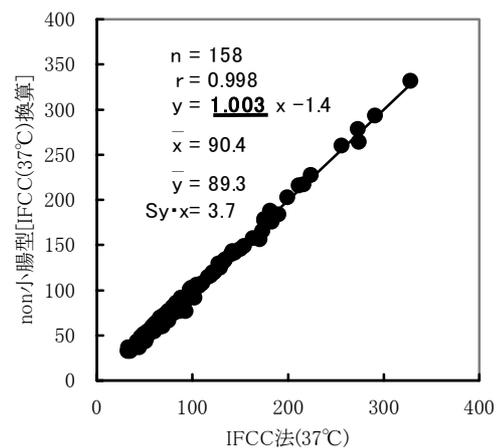


図-3B:IFCC(37°C)と[(JSCC標準化対応法)-(小腸型)]の校正効果比較

リコンピナント肝由来ALPを共通キャリブレーターとし、検量実施

血清アミラーゼ測定 of IFCC 勧告法、PRP の検証

プロジェクト代表者 芳賀利一 (三井記念病院中央検査部)

1 はじめに

IFCCアミラーゼ(AMY)勧告法¹⁾については、①基質であるENMの純度、②ENMの安定性、③指示物質である4-ニトロフェノール(4-NP)のpHの影響等の問題点があると指摘された。旧日本臨床化学会関東支部分析技術分科会は、2001年JSCC夏期セミナーにおいて、IFCCプロトコールに従って上記問題点についての検証実験を行い、IFCC勧告法の妥当性を報告²⁾した。その後、日常検査における標準化への対応など、現場からはAMY勧告法提示の要望は強く、今後国際的整合性を考えた場合既に公表されているIFCC勧告法が基軸になると思われ、IFCC勧告法を採用する方向で検討を開始すべく、新プロジェクトの発足となった。IFCC勧告法(原法)の測定温度は30℃であるが37℃で測定するSOP(Standard Operating Procedure)³⁾も提示されていることから、当プロジェクトでは主としてIFCC SOPに従って、普遍性の実験を行ない、同時に前回²⁾の基質に関する実験結果および指示物質⁴⁾の検証実験を含め、2004年夏期セミナーにおいて報告⁵⁾した。さらにIFCCから2004年5月にSOPの修正版としてPrimary Reference Procedures (PRP) draft⁶⁾が提示された。このPRPについても普遍性の追加実験をして妥当性の検証を実施、本年の夏期セミナーにおいて報告⁷⁾した。

2 検討内容

(1) ENMの純度、(2) ENMの安定性、(3)指示物質である4-ニトロフェノール(4-NP)のpHの影響、(4)pHメーター性能調査、(5) PRP普遍性

検証実験

3 実験参加施設

旭化成ファーマ(株)、エスアールエル(株)、関東化学(株)、協和メデックス(株)、慶応義塾大学病院、第一化学薬品(株)、東京大学病院、東京通信病院、虎の門病院、日本大学板橋病院、ロシュ・ダイアグノスティックス(株)。

4 材料および方法

試料、試薬、機器、実験方法等については文献²⁾、⁵⁾、⁶⁾、⁷⁾を参照。

5 結果

5.1 ENM(基質)の純度確認結果

純度の確認はHPLC法、FAB-MAS法およびNMR法で測定した。IFCC勧告法での純度の規格は、HPLC法で95%以上になっている。今回、HPLC法で9ロットの純度を測定した結果95.7~98.5%で規格を満たしていた。また、FAB-MAS法でENMが推定どおりの分子量を有していることを確認後、NMRで測定した2ロットの重量分画比は94.1%、96.7%でIFCC試薬の規格90%以上を満たしていた。

5.2 ENM(基質)の安定性実験結果

IFCC勧告法に従い試薬を調製後、基質液について405nmでの吸光度の経時変化を室温、冷蔵保存で調べた。IFCC勧告法に従い試薬を調製後、基質液の経時変化を調べた結果、IFCCの実験結果では5℃で2週間は安定であるとなっていたが、室温保存では2日間で12%の吸光度の上昇があり、冷蔵保存では2週間で11%の吸光度の上昇が認められた。

5.3 指示物質である4-ニトロフェノール(4-NP)のpHの影響実験結果

HEPES 緩衝液のpHは 5 種類(①7.00 ②7.05 ③7.10 ④7.15 ⑤7.20)を 30°Cで調製後、各 HEPES 緩衝液に対して次の4溶液を調製し、精製水を対照として405nmでの吸光度を測定した。(a)液 HEPES + 4-NP。(b)液 HEPES + 4-NP + α -Glucosidase。(c)液 HEPES + 4-NP + α -Glucosidase + ENM。(d)液 HEPES + ヒト血清 + α -Glucosidase + ENM。pH7.10での吸光度を100%として各溶液に対する相対%を計算した。pH7.05で-5.1%、pH7.15では+2.2%であった。(a)と(b)、(c)と(d)は同様な傾向を示していた。

5.4 pHメーター性能調査結果

pHメーターの性能調査結果を表1に示した。簡易型においては一部外れていたが、3桁表示精密型においては7.00±0.03の性能規格

表1 pHメーターの性能調査結果

pH小数以下表示桁数	施設名 (pH校正液)	AMY-Start Reagent		ラジオメータ 緩衝液		
		6.841-7.386	6.841-9.088	6.841-7.386	6.841-9.088	
精密型 3桁	B	6.998	7.004	6.976	6.986	
	D	6.999	7.000	6.972	6.965	
	I	6.992	7.012	6.966	6.987	
	J	7.000	6.998	6.974	6.972	
	mean	6.997	7.004	6.972	6.978	
	min	6.992	6.998	6.966	6.965	
	max	7.000	7.012	6.976	6.987	
	Range	0.008	0.014	0.010	0.022	
精密型 2桁	A	7.00	7.01	6.97	6.97	
	E	6.97	6.97	6.99	6.98	
	mean	6.99	6.99	6.98	6.98	
	min	6.97	6.97	6.97	6.97	
	max	7.00	7.01	6.99	6.98	
		Range	0.03	0.04	0.02	0.01

pH小数以下表示桁数	施設名 (pH校正液)	AMY-Start Reagent		ラジオメータ 緩衝液	
		***	6.84-9.09	***	6.84-9.09
簡易型 2桁	C	***	7.03	***	7.00
	F	***	6.97	***	7.01
	G	***	7.01	***	6.98
	H	***	6.80	***	6.99
	mean	***	6.95	***	7.00
	min	***	6.80	***	6.98
	max	***	7.03	***	7.01
	Range	***	0.23	***	0.03

を十分満たしていた。今回の結果から、37°CでのpHの調整に関してはIFCCの方法が可能であることがわかった。

5.5 AMY IFCC PRP普遍性検証実験結果

10施設での普遍性の結果を表2に示した。3試料とも施設内の精密度は2%以内と良好であった。一元配置の分散分析の結果でも施設間差は認められたが、全体のCVはP.S-Iで3.5%、P.S-IIで2.2%、P.S-IIIで2.6%であり、良好な結果であった。

表2. AMY IFCC PRPによる普遍性検証実験結果

施設名	P.S-I			P.S-II			P.S-III		
	x	SD	CV(%)	x	SD	CV(%)	x	SD	CV(%)
A	112.6	1.61	1.4	294.0	1.30	0.4	485.8	0.76	0.2
B	112.5	1.15	1.0	297.0	0.77	0.3	490.4	1.31	0.3
C	108.9	0.89	0.8	288.2	1.73	0.6	483.9	2.48	0.5
D	106.3	0.71	0.7	284.0	1.26	0.4	461.7	2.94	0.6
E	104.0	0.64	0.6	279.1	0.52	0.2	460.0	0.50	0.1
F	113.7	1.12	1.0	287.7	4.51	1.6	470.0	5.17	1.1
G	102.8	1.31	1.3	281.5	5.11	1.8	464.4	7.60	1.6
H	112.2	2.27	2.0	297.6	4.64	1.6	494.0	7.76	1.6
I	107.3	0.77	0.7	284.9	2.74	1.0	472.1	10.12	2.1
J	108.4	0.31	0.3	289.9	1.18	0.4	481.5	2.80	0.6
全体	108.9	3.81	3.5	288.4	6.31	2.2	476.4	12.30	2.6

6 まとめ

今回実施した、AMY IFCC PRP法での普遍性実験結果から、CVは3.5%以下であり、AMY酵素活性測定として十分満足の出来る結果と考えられる。2005年1月にPRP final draft⁸⁾が提示された。このdocumentsに一部試薬調製容量の変更と従来のJSCC勧告法との整合を図るために「ヒト血清中酵素活性測定の勧告法のための測定装置の性能規格」⁹⁾を追加し、JSCC勧告法としてJSCCに提示することとした。

文献

- 1) Klaus Lorentz. Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes Part9.

IFCC Method for α -Amylase(1,4- α -D-Glucan 4-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1). Clin Chem Lab Med 1998;36(3):185-203.

2) 芳賀利一,大久保滋夫,山舘周恒,他関東支部分析技術分科会会員:アミラーゼのIFCC勧告法に関する報告,臨床化学,30(suppl.1):151a-152a,2001.

3) Siekman L et al.(IFCC,WG-CCE). Standard Operating Procedure(SOP) for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes[α -Amylase:1,4- α -Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1]. Clin Chem Lab Med (in preparation).

4) Linsinger T, Schimmel H, Pauwels J, Siekman L et al.(2001).Catalytic concentration of α -amylase determined by IFCC method at 37°C (IRMM/IFCC-456),CEC Report EUR19927EN, ISBN 92-894-1980-6.

5) 芳賀利一,他:血清アミラーゼ測定のIFCC勧告法、SOPの検証,臨床化学,33(suppl.2):14b-18b,2004.

6) Siekman L et al.(IFCC,WG-CCE). IFCC Primary Reference Procedures (PRP) for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes[α -Amylase:1,4- α Glucanohydrolase, EC3.2.1.1]. Clin Chem Lab Med (in preparation).

7) 芳賀利一,他:血清アミラーゼ測定のIFCC勧告法、PRPの検証,臨床化学,34(suppl.1):8-10, 2004.

8) Schumann G et al.(IFCC,WG-CCE). IFCC Primary Reference Procedures (PRP) for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes[α -Amylase:1,4- α Glucanohydrolase, EC3.2.1.1]. Clin Chem Lab Med (in preparation).

9) 日本臨床化学会教育委員会,日本臨床化学会機器専門委員会編:臨床検査室における機器試験法マニュアル,リファレンス法の開発・検討用分光光度計の性能規格,p.32-37,ありい出版,大阪, 1993.

アミラーゼプロジェクトメンバー

代表者:芳賀利一 (三井記念病院)

委員:青木 亮治 (旭化成ファーマ(株))

新井 堅仁 (関東化学(株))

五十嵐 富三男 (虎ノ門病院分院)

池田 千秋 (虎ノ門病院)

石澤 天 (日本大学板橋病院)

石田 浩二 (慶応義塾大学病院)

伊藤 弘美 (関東化学(株))

大久保 滋夫 (東京大学病院)

大脇 一郎 (ロシュ・ダイアグノスティックス(株))

金原 清子 (虎ノ門病院)

久保野 勝男 (株エスアールエル)

小林 照明 (東京通信病院)

清水 憲一 (株エスアールエル)

白井 秀明 (燕労災病院)

鈴木 英明 (第一化学薬品(株))

関口 光夫 (日本大学板橋病院)

永井 邦子 (株エスアールエル)

野村 博 (ロシュ・ダイアグノスティックス(株))

細井 健二 (第一化学薬品(株))

山口 真理 (ロシュ・ダイアグノスティックス(株))

山下 由紀子 (第一化学薬品(株))

山舘 周恒 (日本大学板橋病院)

吉岡 真一 (協和メデックス(株))

吉海 毅 (ロシュ・ダイアグノスティックス(株))

オブザーバー:美崎 英生 (カイノス(株))

膝型アミラーゼ活性測定の常用基準法の設定（中間報告）

プロジェクト代表者 白井 秀明
(独)労働者健康福祉機構 燕労災病院

【はじめに】

1998年にIFCCからアミラーゼ活性測定の勧告法が公表された。国内においてもIFCC勧告法の検証プロジェクトが発足し、その検証作業が進められている。一方、膝疾患に対する診断特異性は、総アミラーゼ活性よりも膝型アミラーゼ活性の方が高いとされている。現在日常検査に用いられている膝型アミラーゼ測定法は、抗ヒトS抗体を用いたS型アミラーゼ阻害法が主流であるが、膝型アミラーゼ活性測定値は、測定に用いる基質の違いにより、その活性値は最大約2倍の差がある。

そこで、本プロジェクトでは、膝型アミラーゼ活性測定値における測定方法間の差を縮小し、データの互換性を維持するために常用基準法を設定することを目的とする。

【常用基準法設定の基本方針】

膝型アミラーゼ活性測定の常用基準法設定の基本方針は、抗ヒトS抗体を用いたS型アミラーゼ阻害法とし、アミラーゼ活性測定は、IFCC勧告法に準じた方法（JSCCアミラーゼプロジェクトで提示した方法）で行うことで合意した。

【実施計画】

膝型アミラーゼ活性測定の常用基準法設定の実施計画を以下に示した。

- 1) 抗ヒトS抗体について市販可能な製品を調査する。
- 2) 抗ヒトS抗体によるS型アミラーゼ阻害試験の手順を作成する。
- 3) 抗ヒトS抗体のアミラーゼ試薬への添加条件を設定する。
- 4) 常用基準法における測定値普遍性の確認試験。
- 5) 膝型アミラーゼ活性測定の自動化法作成およびERMおよび検量用ERMの酵素反応性試験の実施。

【調査結果】

抗ヒトS抗体とS型アミラーゼ阻害試験に用いるS、P型アミラーゼについて調査した。その結果、入手可能な抗ヒトS抗体は、Tu88E8 IgGとTu66C7 IgG（ロシュ社）の2種、およびMNHAMY-2とMNGAMY-3（アルフレックファーマ社）の2種であった。なお、市販キットでは両社とも2種の抗ヒトS抗体を混合して用いる。

また、S型アミラーゼ阻害試験に用いるS、P型アミラーゼ候補品は、それぞれ3種であり、S型の標品は全て人唾液由来であり、P型標品は全て人膝由来であった。

【今後の活動予定】

今後の活動は、以下の内容検討をする。

1. 抗ヒトS抗体阻害試験に用いるS、P型標品を候補品の中から選択する。
2. 抗ヒトS抗体阻害試験法（案）を作成し、各抗ヒトS抗体の阻害率を確認する。
3. 多施設による抗ヒトS抗体阻害試験法の普遍性の確認を行う。
4. 抗ヒトS抗体の選定および至適添加量を決定する。
5. 常用基準法および自動化法の測定条件を設定し、測定値の比較試験を行う。
6. 参考基準範囲の設定を行う。

加藤隆則（日製・日立健康管理センタ）
斉藤友幸（下館市民病院臨床検査科）
大貫経一（茨城東病院研究検査科）
鈴木英明（第一化学薬品株）
花田寿朗（和光純薬工業株）
足立 浩（アルフレッサファーマ株）
新井信夫（シスメックス株）

顧問 渡辺伸一郎（東京女子医科大学）

【まとめ】

P型アミラーゼの勧告法（常用基準法）は国際的にも例をみない。今回常用基準法作成に当たり考慮する点は、出来るだけシンプルな測定系を組み立てるために、S型アミラーゼ阻害法を用いることとした。アミラーゼ活性の測定系は、総アミラーゼ活性と互換性を持つために、現在作成中の勧告法を用いることとした。

【プロジェクトメンバー】

代 表 白井秀明（燕労災病院検査科）
副代表 桑 克彦（筑波大学臨床医学系）
関口光夫（日本大学板橋病院検査部）
委 員 大澤 進（九州大学医学部保健学科）
細萱茂美（山梨大学医学部附属病院）
飯塚儀明（筑波大学附属病院検査部）
芳賀利一（三井記念病院中央検査部）
野村 博（ロシュ・ダイアグノスティクス株）
吉海 毅（日本臨床検査薬協会）
谷 涉（中法 HECTEF SR センター）

リパーゼ活性測定の常用基準法の設定（中間報告）

プロジェクト代表者 飯塚儀明（筑波大学附属病院）

【目的】

リパーゼ(LIP)は、膵腺房細胞で合成される分子量約 48kDa の糖蛋白で、トリグリセライドの α 位の長鎖脂肪酸エステルを加水分解する酵素である。血清リパーゼの大部分は膵臓由来であり、膵臓に対する特異性が高い（診断感度 71%、診断特異度 84%）。

現在、日常検査に用いられている血清リパーゼ(LIP)活性測定法は、カラーレート法が主流であるが、その他に BALB-DTNB 法、比濁法、EIA などが市販されている。その活性値は最大で約 2 倍の差があり、測定キットにより、乖離検体が認められている。

そこで、本プロジェクトでは、LIP 活性測定値における施設間差を縮小し、データの共有化を行うために常用基準法を設定することを目的とする。

【実施計画】

具体的なプロジェクト推進計画は、次のとおりである。

- 1) 市販キットによる比較試験：市販キットを用いて、患者血清の反応性を相互に比較する。
- 2) 常用基準法として最適な方法の選択。
- 3) 膵リパーゼに対する特異性の検証。
- 4) 肝性リパーゼ、LPL などの非特異反応に影響のない測定系を選択する。
- 5) 測定条件、測定操作法の組み立て。

- 6) 常用基準法及び自動化法の組み立て。
- 7) 普遍性試験の実施。
- 8) 参考基準範囲の設定。

【常用基準法の条件（案）】

第 1 回リパーゼ・プロジェクト委員会で、常用基準法の条件を以下のとおりとすることを決めた。

- 1) 化学量論的に測定系が組み立てられること。
- 2) 試薬（基質を含む）が入手可能で、自製が可能であること。
- 3) 用手法（37°C）の測定系として組み立てができること。
- 4) 用手法を自動化法に組み換えできること。
- 5) 近似零次反応であること。
- 6) K_m 値、S-V 曲線などが求められること。
- 7) 実測 K ファクターが算出できること。
- 8) 再現性、普遍性が十分に確保できること。
- 9) 膵リパーゼ活性に特異性が高いこと（肝リパーゼ、LPL に反応しないこと）。

【基質の公募】

以下の理由により、数多くのリパーゼ製造各社に常用基準法設定の検討基質をエントリーしていただくため、臨薬協会を通じて臨薬協会各社に基質を公募した。

- 1) リパーゼの常用基準法の基質は、現在販売されている試薬の基質から選択する。

2) リパーゼの各種の基質は、難溶性のため検討実験を行うに際しメーカーの協力が必要である。

3) リパーゼの常用基準法設定のための基質を公募し、最適な常用基準法を選定したい。

【公募の結果】

応募があった基質は、a) 1,2-*o*-ジラウリル-*rac*-グリセロ-3-グルタル酸-(6-メチルレゾルフィン) エステル、b) 1,2-ジオレオイルグリセロールの2基質(2社)であった。応募試薬メーカーから説明を受けた結果、a)の基質に対しては試薬の自製が難しい、b)基質に対しては特異性試験を追加するなどの必要性が認められた。

【今後の作業】

応募のあった2基質について、実施計画に従って以下の検討を行う。

- 1) 基質濃度、活性化剤濃度および至適pHなどの試薬組成条件を確認する。
- 2) 試薬調製と安定性の確認を行う。
- 3) 臍リパーゼに対する特異性の確認を行う。
- 4) 測定可能範囲(測定下限、測定上限)の確認を行う。
- 5) 常用基準法と自動化法による測定値の比較実験を行う。
- 6) 多施設による普遍性の確認を行う。
- 7) 参考基準範囲の設定を行う。

【参考文献】

1) NW. Tiets, DF. Shuey. Lipase in serum the elusive enzyme : an overview. Clin Chem

39 : 746-756, 1993

2) 松井静代、渡辺伸一郎他;新しいリパーゼ測定試薬「リキテックリパーゼカラー」による血清リパーゼ測定の基礎的・臨床的検討. 医学と薬学 : 489-796, 1999

3) 白井秀明、桑 克彦他;リパーゼの評価. 日本臨床検査自動化学会誌 27 : 115-119, 2002

【プロジェクト構成員】

代表者 飯塚儀明(筑波大学附属病院)

副代表 桑 克彦(筑波大学臨床医学系)

関口光夫(日本大学板橋病院)

委員 大澤 進(九州大学医学部)

細萱茂美(山梨大学医学部附属病院)

野村 博(ロシュ・ダイアグノスティクス(株))

谷 渉((中法)HECTEF SRC)

吉海 毅(日本臨床検査薬協会)

加藤隆則(日製・日立健康管理センタ)

斎藤友幸(下館市民病院)

大貫経一(茨城東病院)

今村茂行(旭化成ファーマ(株))

酒瀬川信一(旭化成ファーマ(株))

足立 浩(アルフレッサファーマ(株))

黒谷 理((株)カノス)

大和 隆(協和メテックス(株))

山口真理(ロシュ・ダイアグノスティクス(株))

花田寿朗(和光純薬(株))

顧問 渡辺伸一郎(東京女子医科大学)