

臨床検査研究

G3-CNPを用いた血清アミラーゼ測定の基礎的検討

渡部 重子 松本 靖司 加藤 光宏
 伊藤 亮二 平沼 法義 屋敷 祥嗣
 坂本千賀子 平間 斉枝

はじめに

アミラーゼ活性の測定は膵疾患の鑑別と予後の診断の指標や各疾患のスクリーニング検査として日常検査あるいは緊急検査として頻繁に実施されている。

現在の α -アミラーゼ活性測定は、還元末端にオリゴ糖や発色基を結合させた合成基質、および還元末端と非還元末端両部位を修飾した合成基質、マルトペンタオース (G5) やマルトヘプタオース (G7) を用いた方法が広く普及している。しかし、これらの方法にはグルコシダーゼ等の共役酵素を必要とする。

今回、共役酵素を必要としない一次発色基質の2-クロロ-4-ニトロフェニル- α -D-マルトトリオース (G3-CNP) を用いた測定試薬について基礎的検討をしたので報告する。

原 理

血清アミラーゼは試薬中のチオシアン酸カリウムにより活性化され、基質のG3-CNPを水解し、CNP (2-クロロ-4-ニトロフェニル) を生成する。このCNPの生成速度を吸光度変化として測定し、アミラーゼ活性値を求める。

方 法

試 薬 : メルクリキッド AMY (関東化学)
 測定機器 : JCARX - 20型 (日本電子)
 試 料 : 患者プール血清・コントロール血清

結 果

1) 同時再現性 (表1)

試料として患者プール血清と、コントロール血清のモニター1X並びにモニター2X (国際試薬) を用いて、患者プール血清については50回、コントロール血清については各々20回連続測定しそのばらつきについて検討した。その結果、変動係数はそれぞれ0.99%、0.62%、1.49%、と良好であった。

2) 希釈直線性 (図1)

アミラーゼ活性低値のプール血清と高値の試料を用い、直線性を確認した。低値については5段階希釈、高値については10段階希釈して、それぞれ2重測定した結果、高値においては1300 IU/L

表1. 同時再現性

	ヒト血清	モニ1X	モニ2X
Mean	98.3	77.1	366.6
Max	102	79	370
Min	94	76	362
R	8	3	8
n	50	20	20
SD	1.462	0.768	2.269
CV	1.487	0.996	0.619

表2. 日差再現性

	ヒト血清	モニ1X	モニ2X
Mean	34.1	64.6	371.7
Max	34.7	65.5	375.4
Min	33.7	63.3	366
R	1	2.2	9.4
n	10	10	10
SD	0.38	0.67	3.24
CV	1.09	1.04	0.87

まで直線性を確認し、低値においては原点を通ることが確認できた。

3) 日差再現性 (表 2)

同時再現性と同様患者プール血清及び、コントロール血清を用い、各々 10 日間連続測定した結

果、変動係数については、それぞれ 1.09%、1.04%、0.87%、であった。

4) 共存物質の影響 (図 2)

干渉チェック A (国際試薬) を用い、共存物質の影響を検討した結果、抱合型ビリルビン (BiL.

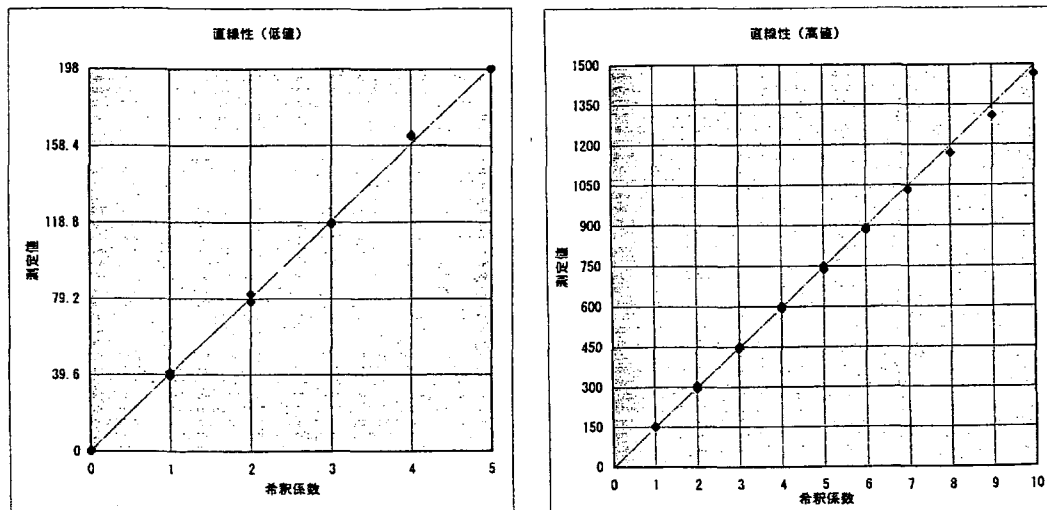


図 1. 希釈直線性

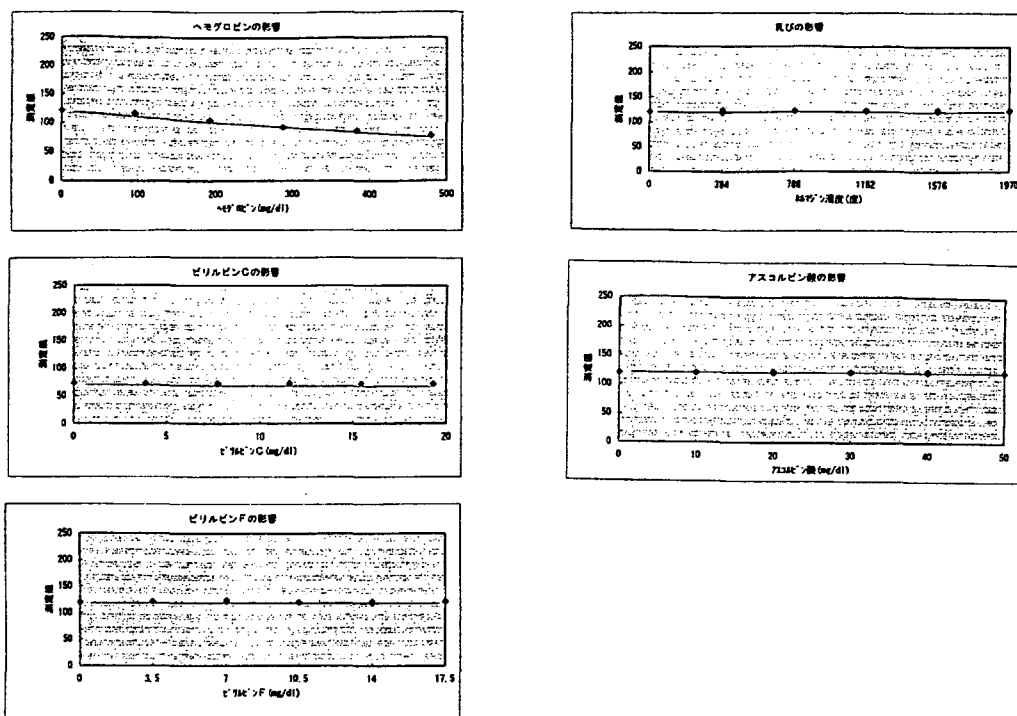


図 2. 共存物質の影響

C)、遊離型ビリルビン (BiL. F) は、約 18mg/dl までは影響を与えないことを認めた。ヘモグロピンは 200mg/dl から低値の傾向を認め、480mg/dl では原試料のアミラーゼ活性値の 33% まで低下した。また、乳ビでは、ホルマジン濁度約 2000 まで、アスコルビン酸では 50mg/dl まで影響を与えないことを確認した。

5) インターバルテスト (図 3)

JCA-RX20 型はチューブ分注方式のため、検査中断による試薬の安定性を調べた。

患者プール血清を用い、検査中断直後、1 時間後、2 時間後、4 時間後、翌日 (約 12 時間後) の 5 回、5 重測定した結果、1 時間後で若干のばらつきがみられたものの、12 時間後までほぼ測定値は安定し

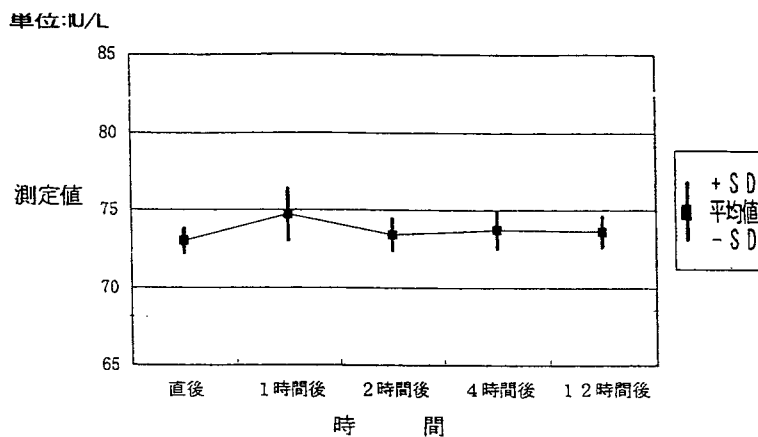


図 3. インターバルテスト

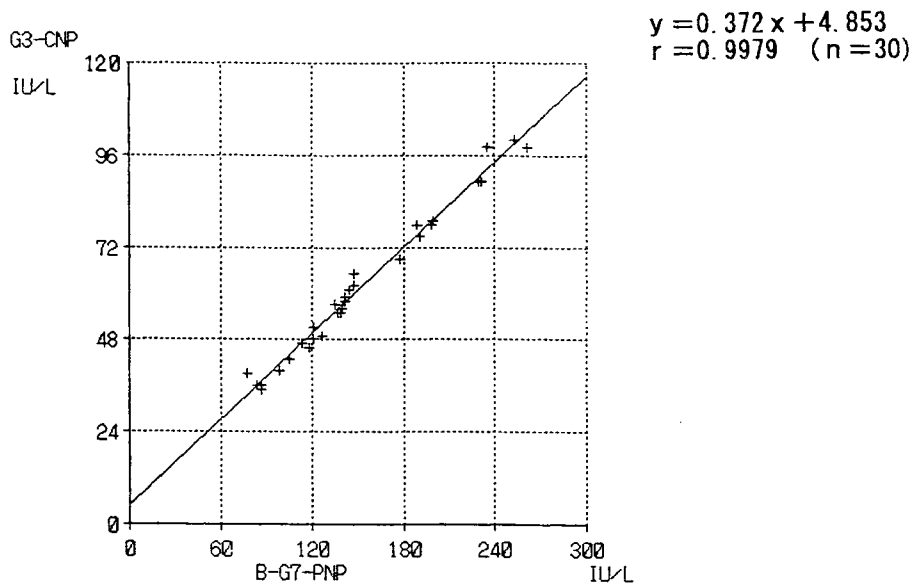


図 4. B-G7-PNP 法との相関

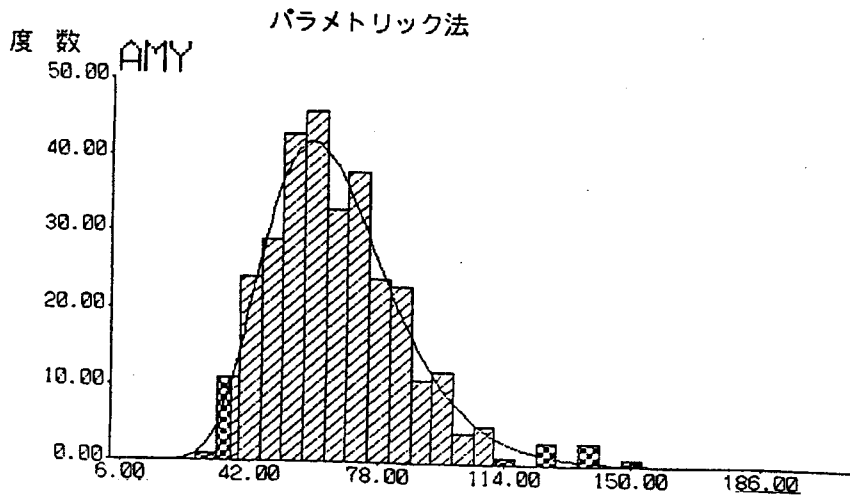


図5. 基準範囲の設定

ていた。

6) B-G7-PNP 法との相関 (図4)

30名の患者血清を用いてB-G7-PNP法との相関を求めた。回帰式は、 $Y=0.3724X + 4.853$ 相関係数は0.9979と良好であった。

7) 基準範囲の設定 (図5)

当院の職員を対象に基準範囲の設定を行った。年齢構成は20代から60代までの男女で総数320名である(68%を20-40代の女性でしめている)。結果、パラメトリック法で39.1~99.8IU/Lであった。

ま と め

G3-CNP基質法を検討した結果、ヘモグロビンの負誤差が認められるものの、その他の検討項目についてはおおむね良好であった。また共役酵素を必要としないことから試薬の安定性もよく、日常検査に有用であると思われた。今後アミラーゼ測定法の標準化の方向を視野に入れながらさらなる検討を続け、より充実させていきたい。

