

アルカリホスファターゼ測定用の 市販キット試薬の問題点

竹 内 章 子
野 本 昭 三
大 沢 安 子

松本医師会臨検センター

〔はじめに〕

アルカリホスファターゼ(以下 Al-P と略)の臨床検査法には、わが国の場合、日本消化器病学会肝機能研究班から Kind-King 法¹⁾が標準法として勧告され²⁾ 広く用いられてきたが、1967年、渡辺らによって報告された変法³⁾が、その操作の簡易性から急速に一般化し、国内の各試薬メーカーもこぞってこれをキット化した。一方、各地の臨床化学分析談話会、日本衛生検査技師会などが、主催して行なっている施設間の精度調査の結果を見ると^{4)~6)}、Al-P の精度は著しく悪く、例えば、精度管理に関する国際シンポジウム (ISQC) —東京(1973) の行事の一環として行なわれた精度調査の結果でも、Kind-King 法による Al-P は、平均13.3~15.6%のCVが示されている⁷⁾。この施設間のバラツキの原因としては、酵素反応時の pH、試薬の純度、標準液、などが、ひとつの因子として考えられるが、同一試薬キット(同一メーカー)を用いて行なった精度調査の場合でも、甚だしいものでは CV が22.3~27.1%に達している⁷⁾ ことから、上述のものが主たる因子とは考えられず、これ以外のものとして、反応温度(恒温槽の精度)、比色計の光純度などが、酵素測定におけるエラーの一般的事項として思い起こされるのであるが、これらは他の酵素へも同様の影響を現わすはずで、同一時に行なわれている他の酵素の誤差の程度から推し測ると、Al-P の場合、これ以外に何らかの誤差要因の存在を感じさせることになる。

さて、Al-P の酵素活性は、反応液中のマグネシウムイオン(以下 Mg⁺⁺ と略)濃度によって左右される性質があり、基質に Mg⁺⁺ が添加されていない試薬を用いる本法では、反応液中の Mg⁺⁺ は、理論的には、すべて血清由来と考えられ、原法(反応混液中で血清21倍希釈)と変法(反応混液中で血清41倍希釈)の間の Mg⁺⁺ 濃度の相違が、当然測定値の差となって現われることが予想され、更に、試薬、容器、器具からの Mg⁺⁺ の汚染が、測定結果を左右して変動係数を大きくする可能性が考えられる。これらのことから今回、入手容易な市販キット試薬を集めて、次の点について検討し、考察を加えた。

検討項目

1 各社キット基質液中のマグネシウム濃度の測定比較

- 2 各社キット基質液による血清 Al-P 活性値の測定比較
- 3 反応混液中のマグネシウム濃度と Al-P 活性値との関係
- 4 器具洗浄用水道水中のマグネシウム濃度及び各種検査室の酵素測定用試験管のマグネシウム汚染量の測定
- 5 基質用原料試薬（フェニルリン酸 2 ナトリウム塩）の純度と Al-P 活性値の比較

〔方法〕

・使用機器および試料試薬

比色分析には、日立100-10型分光光度計を、原子吸光分析には、日立518型デジタル原子吸光光度計を用いた。

器具の最終的洗浄及び試薬の調製はすべて、再蒸留水を用いた。

試験管、ピペット等のガラス器具は、クロム硫酸で30分間、処理した後、流水中に30分以上つけ、再蒸留水で3回以上ゆすいだものを使用した。

市販キット試薬は、ALP-KM-シノテスト (Lot No. 161624), K-ホス '栄研' (Lot No. NH006D と NY006E), アルカリ性ホスファ K-テストワコー (Lot No. IEK 9636), ALP 測定用試薬-国際試薬 (Lot No. 5051), アルカリ性ホスファターゼ測定用試薬 S-ヤトロソ (Lot No. 0576) の5社、6種を用いた。

実験1 各社キット基質液中のマグネシウム濃度の測定比較

標準として、第一化学の電解質用混合標準液（マグネシウム 1.5mM）を再留水で 250、500倍に希釈したものを用い、対象となった各社の基質液は、希釈せずにそのまま、原子吸光光度計に添加した。装置の設定条件は、波長2852Å, ホローカソードランプのプレート電流10mA, スリット巾は、 $E_n=2$, $E_x=2$, Scale はAbsorbance 0~1.0で行なった。

実験2 各社キット基質液による血清 Al-P 活性値の測定比較

試料は、相沢病院、松本市医師会臨床検査センターから供与をうけたもので、閉塞性黄疸2例、骨疾患1例、パラサイロイドーシス1例、妊婦1例、小児1例の計6種の血清を用いた。

表-1 測定操作法

	検 体	標 準	ブランク
基 質 液	2ml	2ml	2ml
37°Cの恒温水槽中で約5分間加温			
試 料	血清 0.05ml	標準液 0.05ml	再留水 0.05ml
37°Cの恒温水槽中で15分間インキュベート			
発 色 液	2ml	2ml	2ml
よく混和し、10分間放置後、分光光度計の波長500nmで、ブランクを対照として、吸光度を測定した。			

基質液は、前述の各社キットで、発色液は、各社のキット試薬を一括混合して使用した。操作手順は、表1に示すとおりで、すべての血清試料につき2重測定をし、その平均をとった。なお、各社キットの標準液についても、同様に操作

して発色させ、500nmにおける吸光度で比較した。

また、ここで用いた6種血清中のマグネシウム濃度も測定し、酵素活性測定時の反応混液中マグネシウム濃度算出の資料とした。その際の血清中マグネシウム測定法は、血清を再留水で250倍に希釈し、実験1と同様の原子吸光度計の設定条件及び標準液で行なった。

実験3 反応混液中のマグネシウム濃度と Al-P 活性値の関係

まず、プール血清を透析処理により脱マグネシウム化血清とし、これを、段階的にマグネシウムを添加した11種類の基質に作用させて、それぞれ Al-P 活性を測定し、マグネシウム濃度が Al-P の活性に及ぼす影響の程度を調べた。この際の血清の透析処理は、実験2で使用した血清の一部をプールし、その2mlをピスキングチューブに封入したものを、約1/50量の0.1Mリン酸緩衝液でpHを7.4に調製した0.14M塩化ナトリウム溶液3リットルの中に投入し、マグネチックスターラーでかきまぜながら、4°Cの冷蔵庫内に2晩、放置した。基質液へのマグネシウムの添加は、まず、200mM塩化マグネシウム溶液を作り、最もマグネシウム濃度の低かったA社の基質液（マグネシウム0.001mM）に適量ずつ添加して、マグネシウム濃度、0.001, 0.011, 0.021, 0.041, 0.101, 0.201, 0.501, 1.001, 2.001, 4.001, 10.001mMとし、これを使用した。発色液、操作手順は、実験2と同様に行なった。

実験4 洗浄用水道水中のマグネシウム濃度及び各種検査室の酵素測定用試験管のマグネシウム汚染量の測定

水道水は、再留水で50倍希釈したものを原子吸光分析の試料とし、試験管については各施設（相沢、飯田市立、飯山日赤、大町市立、国立松本、諏訪中央、北信総合、厚生連篠ノ井の各病院、松本医師会臨検センター、北信臨検センター、本学）より酵素測定用の試験管を、各4～5本ずつ集め、これに約2mM塩酸溶液2mlずつを加え、内壁を洗うようにサーモミキサーで十分振盪後、第一化学の混合標準液を上記塩酸溶液で500倍に希釈したものを標準液として、原子吸光度計（設置条件は実験1と同様）に添加し、マグネシウムを測定した。

実験5 基質用原料試薬（フェニルリン酸2ナトリウム塩）の純度と Al-P 活性値の比較

シノテストの精製前と精製後、和光の特級の3種のフェニルリン酸2ナトリウムを原料試薬として、各基質液を調製し、高活性の血清2種を試料として、Al-P活性を測定した。

基質液の調製は、各フェニルリン酸2ナトリウムの0.22gに、熱した再留水100mlを加えてとかし、30秒後に水道水で急冷し、0.1M、pH10.0の炭酸緩衝液100mlを加え、更に、4-アミノアンチピリン（和光特級）0.09gを溶解して、基質液とした。発色液、操作手順は、実験2と同様に行ない、比色は水を対照にして、試薬ブランクと本試験の各吸光度を測定した。

[結果]

1 各社キップ基質液中のマグネシウム濃度は、図1に示すとおりで、最高0.006mM、最低0.001mM、平均0.0023mMであった。

2 各社キップ基質液による血清Al-P活性値の比較は、図2に示すように、A社の吸光度を100としてあらわした場合、平均して、B社82(最低79~最高84)、C社92(88~95)、D社78(75~81)、E社88(86~91)で、最高と最低の差が22%であった。この差が、各社基質液中のマグネシウム濃度による可能性を考えて、その相関を図3に示したが、マグネシウム濃度との相関は、ほとんど見られなかった。

また、標準液の吸光度も、A社を100とした場合、B社107、C社91、D社87、E社89で、最高と最低の差が20%にも達した(図4)。

試料血清中のマグネシウム濃度は、最低0.79mM、最高0.9mM、平均0.82mMであった。

図1 各種市販キップの基質中マグネシウム濃度の比較

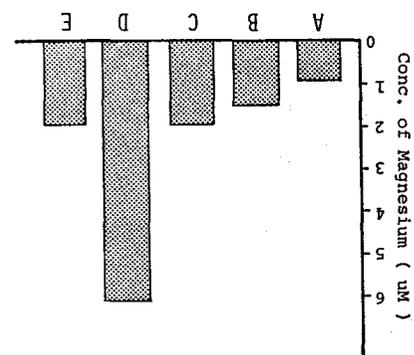


図3 各種キップ基質中マグネシウム濃度とAl-P活性値の相関性

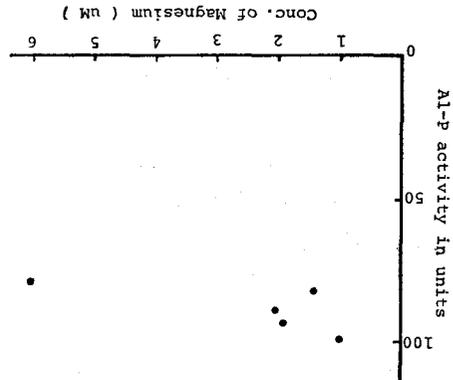


図2 各種市販キップにおけるAl-P活性値の比較

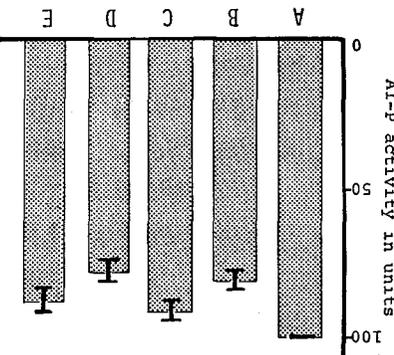
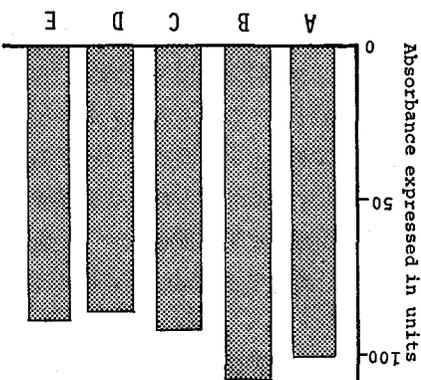


図4 Al-P用各種市販キップ中の標準液の比較



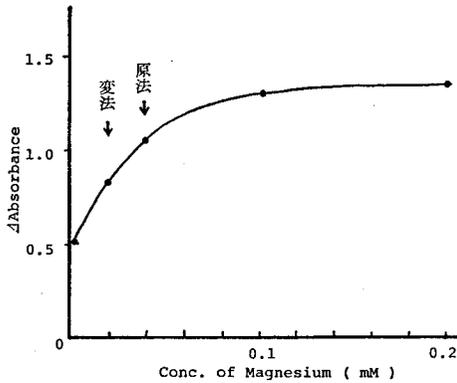


図5 基質へのマグネシウム添加量と Al-P 活性変化の関係

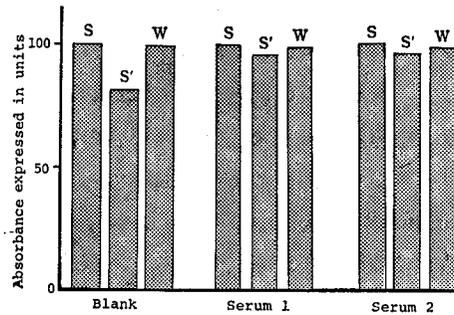


図6 基質試薬の純度と Al-P 活性の関係

3 反応混液中のマグネシウム濃度と Al-P 活性値の関係は、図5に示すように、マグネシウム添加量に応じて活性は上昇し、1 mMでほぼ plateau に達する。

4 洗浄用水道水中のマグネシウム濃度は0.14mMで、この水だけで試験管を洗いあげた場合のマグネシウム汚染量は、およそ0.004mMと考えられる。

また、11施設の酵素測定用試験管のマグネシウム汚染量は、最高0.0033mM、最低0.0001mM、平均0.0011mMであった。

5 基質用原料試薬の純度と Al-P 活性値の比較は、シノテストの精製後の基質を100として比較すると、図6に示すとおりで精製前は96、和光特級は99であった。また、これら基質の試薬ブランクの吸光度の比較は、100 : 82 : 100で、むしろ精製前の基質の方が小さい吸光度であった。

〔考 察〕

今回、筆者らがとりあげた問題は、Al-P 測定の精度調査の結果の変動係数が異常に大きく、特に誤差要因の分析をする必要を感じたことに始まる。その誤差要因のひとつとして浮かび上がったものは、現在広く各種検査室で用いられている Kind-King の渡辺らの変法においてその酵素反応時のマグネシウム濃度が原法の1/2に減少しているという点であった。従って、このマグネシウム濃度の変化が、どう影響しているかを見るための実験を行なったのであるが、すでに結果の項で示したように、各社のキット基質液中のマグネシウム含量については、最低0.001mM、最高0.006mM、平均0.0023mMで、一応の差は認められたが、この程度のマグネシウム含量の大小は、その他の因子に比較すると、実際の酵素活性に及ぼす影響は小さく、この実験では基質のマグネシウムと活性値の間に明確な相関は現れなかった。このことは当初の予想に反する結果であったが、その反面、実験5の結果に示されたように、試薬の純度により測定値に大きな差が認められたことは興味深いことである。

反応混液中のマグネシウム濃度と Al-P 活性値の関係を示した図 5 に関しては、この図の中に、血清マグネシウムの正常値 0.85 ± 0.19 ^{8)~10)} を用いて、Kind-King 原法と、渡辺らの変法における酵素反応時のマグネシウム濃度を記入すると、原法では $0.85 \times \frac{1}{21} = 0.04$ となり、変法では $0.85 \times \frac{1}{41} = 0.021$ となって、それぞれの濃度における活性値は、マグネシウムを至適濃度まで添加した場合の 76%、及び 61% になっている。また、これらの異なるマグネシウム濃度の方法において、実験 4 で得られた試験管の最大マグネシウム汚染量 0.0033mM に、基質中のマグネシウム汚染量の変動数を加えた数値 0.005mM を挿入して酵素活性の変動を図から読み取ると、原法の場合で 3.7%、変法では 8.8% に達する。すなわち、各種のマグネシウムの汚染から受ける測定誤差の大きさは原法より変法が約 2.4 倍、大きくなるのが推測される。このことは、筆者らが予測したことと一致するデータである。

現在、広く行なわれている臨床化学検査の精度調査の中では、アミラーゼ、Al-P、トランスアミナーゼ、LDH、r-GTP など酵素類が、他の項目に比して著明に変動係数が大きく、常に関連機関で精度改善のための努力が続けられてきている。この酵素類の変動係数を大きくしている基本的な事柄は、測定方法により基質濃度、pH、緩衝液、反応温度などが異なる場合が多いため、この点の統一を図らないかぎり、単に活性値単位の表現方法を国際単位（1 ml の酵素試料による 1 分間当りの基質変化量 μM で表わす）などで統一しただけでは解決されないことがよく知られている¹¹⁾。このために、日本消化器病学会肝機能研究班などが中心になって Al-P、トランスアミナーゼなどについては、すでに標準法が提示されているわけであるが²⁾、今回筆者らが取りあげた Al-P の Kind-King 法の渡辺らの変法は、学会が提示した原法の基質条件から Mg^{++} 濃度の点で離れたものとなっており、それが正確度を損なっているばかりでなく、精密度の面でも低下させる因子をはらんでいると結論すべき結果が得られた。

渡辺らの変法は、その操作の簡易性及び合理性から、第一線の臨床検査室用の方法としては好ましい面を持ったものであり、今回筆者らが得た結果から、ただちに否定することは避けるべきで、当面は短所を補なって存続させるべきものと思われる。その方法としては、 Mg^{++} 濃度を原法にもどすために、あらかじめ基質に Mg^{++} を 0.02mM 、添加することで足りると思われる。なお、原法にもどした場合でも、反応容器などにマグネシウムの汚染があるときは誤差を招くはずであるから、容器の洗浄に関しては、十分な注意が必要である。

最後に、Al-P の測定法の歴史的推移を物語る測定法の一覧表を掲げ、最近報告されている方法の多くが基質に至適量のマグネシウムを添加していることを示して、今後の Al-P 測定の標準法の方向を示唆するものとした。

表—2 血清アルカリホスファターゼ測定法の種類

基 質	発 表 者	発表年度	緩衝液 (pH)	保温時間 [分]	単 位 の 基 準	基質液中 Mg ⁺⁺ 濃度 [mM]	血清希釈倍数 [倍]	反応混液中 Mg ⁺⁺ 濃度 [mM]	成人正常範囲 [単 位]
β-グリセロリン酸	Bodansky ¹²⁾	1933	バルビタール (8.6)	60	mg-P/60'/dl	0	11	0.077	1.5~4.0 ¹²⁾
〃	Shinowaraら ¹³⁾	1942	〃 (10.9)	60	〃	0	11	0.077	2.2~8.6 ¹³⁾
フェニルリン酸	King-Armstrong ¹⁴⁾	1934	〃 (9.0)	30	mg-フェノール/30'/dl	0	21	0.04	3.7~13.1 ¹⁴⁾
〃	〃 変法 ¹⁵⁾¹⁶⁾	1953 1956	炭酸塩 (10)	15	〃				4~10 ¹⁷⁾
〃	Kind-King ¹⁾	1954	〃 (10)	15	〃	0	21	0.04	2.6~10 ¹⁸⁾
〃	〃 変法 ³⁾	1967	〃 (10.15)	15	〃	0	41	0.021	2.6~10
P-ニトロフェニルリン酸	Besseyら ¹⁹⁾	1946	グリシン(10.5)	30	mM-P-ニトロフェノール/60'/l	0.5	11	0.532	0.8~2.9 ¹⁷⁾
フェノールフタレイニン酸	Hugginsら ²⁰⁾	1945	バルビタール (9.7)	60	0.1mg-フェノールフタレイン/60'/dl		11	0.077	3~15 ²⁰⁾
〃	Kleinら ²¹⁾	1960	トリス (9.7)	30	1mg-フェノールフタレイン/60'/dl				1~3.5 ²¹⁾
フェノールフタレインモノリン酸	Babsonら ²²⁾	1966	プロパノール (10.15)	20	μMフェノールフタレイン/min/l	0	11.4	0.075	9~35 ²²⁾
α-ナフチルリン酸	橋ら ²³⁾	1961	クエン酸(11.0)	15	mg-α-ナフトール /60'/dl	0	6	0.142	13.8±3.6 ²³⁾
フェニルリン酸	北村ら ²⁴⁾	1974	炭酸塩 (10.15)	15	mg-フェノール /30'/dl	5.0	41	4.899	
〃	Kind-King変法 ²⁵⁾	1974	〃 (10)	15	〃	0.8	21	0.82	4~17 ²⁵⁾
P-ニトロフェニルリン酸	Bessey-Lowry変法 ²⁶⁾	1962	アメディオール-炭酸 (10.3)	30	mM-P-ニトロフェノール /60'/l	1.0	26	0.994	(小児17~33)

アルカリホスファターゼ測定用の市販キット試薬の問題点

文 献

- 1) Kind, P. R. N., King, E. J., Estimation of Plasma Phosphatase by Determination of Hydrolysed Phenol with Aminoantipyrine, *J. Clin. Path.*, 7, 322~326 (1954)
- 2) 高橋暁正, 榎本浩昌, “肝機能検査の標準法”, *臨床検査*, 7, 407~413 (1963)
- 3) 渡辺賢誠, 津田登代子, 北村元仕, 血清アルカリホスファターゼ測定法—Kind-King法の改良—, *臨床病理*, 15, 708~712 (1967)
- 4) 古池嘉朗他, 第2回長野県技師会コントロールサーベイの結果報告, *長野県衛生検査技師会報*, 15, 1~4, (1972)
- 5) 舟木正明他, 臨床化学検査研究班事業報告, *日本衛生検査技師会雑誌*, 24, 635~648 (1975)
- 6) 川西孝他, 臨床化学検査研究班事業報告, *日本衛生検査技師会雑誌*, 25, 1121~1142 (1976)
- 7) 北村元仕, 菅野剛史, 精度管理に関する国際シンポジウム—東京会議録, 学術組織委員会, 109~115 (1974)
- 8) Jones, J. E. et al, Determination of serum Mg., *J. Lab. Clin. Med.*, 66, 882 (1965)
- 9) Klein, B. et al, Determination of serum Mg., *Clin. Chem.*, 13, 788 (1967)
- 10) 堂森 興, マグネシウムの代謝に関する研究, *日本内科学会雑誌*, 57, 503 (1968)
- 11) 野本昭三, “臨床検査の中における酵素単位の混乱”, *けんさ*, 4, 2号, 13~18 (1973)
- 12) Bodansky, A., Phosphatase Studies II. Determination of Serum Phosphatase. Factors, Influencing the Accuracy of the Determination, *J. Biol. Chem.*, 101, 93~104 (1933)
- 13) Shinowara, G. Y., Jones, L. M., Reinhart, H. L., The Estimation of Serum Inorganic Phosphorus and Acid and Alkaline Phosphatase, *J. Biol. Chem.*, 142, 921~933 (1942)
- 14) King, E. J., Armstrong, A. R., A Convenient Method for Determining Serum and Bile Phosphatase Activity, *Canad. Med. Assoc. J.*, 31, 376~381 (1934)
- 15) King, E. J., *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*, p. 83, Churchill Ltd. (1956)
- 16) Reiner M., *Standard Methods Clinical Chemistry*, Vol. I, p. 75~83, Academic Press (1953)
- 17) 北村元仕, Alkaline Phosphatase 測定法, *臨床酵素学*, 赤堀四郎, 沖中重雄監修, p. 280~282, 朝倉書店 (1964)
- 18) 北村元仕, 血清アルカリホスファターゼ, *Medicina*, 2, 438~439 (1965)
- 19) Bessey, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J., A Method for the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase with five Cubic Millimeters of Serum, *J. Biol. Chem.*, 164, 321~329 (1946)
- 20) Huggins, C., Talalay, P., Sodium Phenolphthalein Phosphate as a Substrate for Phosphatase Tests, *J. Biol. Chem.*, 159, 399~410 (1945)
- 21) Klein, B., Read, P. A., Babson, A. L., Rapid Method for the Quantitative Determination of Serum Alkaline Phosphatase, *Clin. Chem.*, 6, 269~275 (1960)
- 22) Babson, A. L., Greeley, S. J., Coleman, C. M., Phillips, G. E., Phenolphthalein Monophosphate as a Substrate for Serum Alkaline Phosphatase, *Clin. Chem.*, 12, 482~490 (1966)
- 23) 橋 敏也, 橋本信子, 血清アルカリホスファターゼの測定とその臨床的意義, *臨床病理*, 9, 175~182 (1961)
- 24) 北村元仕, アルカリ性ホスファターゼ, *実践臨床化学*, 医歯薬出版, 327 (1974)
- 25) Demetriou, J. A., Drewes, P. A., Gin, J. B., Determination of Serum Alkaline Phosphatase, *Clinical Chemistry Principles and Technics*, 2nd ed. by Richard J. Henry, Harper and Row, 924 (1974)
- 26) Richterich, R., Gautier, E., Determination of serum alkaline phosphatase, *Schweiz. med. Wschr.*, 92, 781 (1962)