

# 高感度アンモニア測定試薬の開発

*Development of a highly sensitive reagent for the determination of ammonia*

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 生化学研究室 千室 智之  
TOMOYUKI CHIMURO

Biochemical Department of Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 臨床化学研究室 小口 雄二  
YUJI OGUCHI

Clinical Department of Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

## 1. はじめに

栄養素として取り込まれたアミノ酸のうち、タンパク質や核酸の生合成に利用されなかった過剰なアミノ酸は、水、二酸化炭素、アンモニアに分解される。アンモニアは非常に毒性の強い物質であるにもかかわらず、生命を維持する過程で絶えず産生されている。また、腸内に大量に常在している細菌もアンモニアを産生しており、産生されたアンモニアの一部は腸管壁を経て体内に侵入してくる。このように、生体は常にアンモニアの脅威にさらされているといえる<sup>1)</sup>。これに対して生体はアンモニアを無毒化するシステム(解毒システム)を体内に構築し、対応している。その中心となるのが肝臓の尿素サイクルである。血中のアンモニアはここで直ちに無毒な尿素に変換され、尿として体外に排泄される。さらに、体中の組織や腎臓にも複数のアンモニア消去機能があり、たとえシステムの一部に軽度な障害が生じたとしても、血中のアンモニアは常に低濃度(10~70  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ 程度)に保たれるようになってい<sup>1)</sup>。一方、肝硬変、肝癌、劇症肝炎などの重篤な肝臓疾患や先天性の尿素サイクル欠損症といったこのシステムに重度な障害を生じた患者は、血中のアンモニアを消去しきれないため、アンモニア中毒におちいるリスクが高くなる。アンモニア中毒が進むと昏睡や死に至ることもあることから、特にこのような患者に対しては血中アンモニア濃度を把握することが極めて重要になる<sup>2)</sup>。

今般著者らは、旭化成株式会社(現旭化成ファーマ株式会社)と共同で、血中アンモニアを測定する新たな方法を開発した。本稿ではその測定方法を体外診断薬に応用した例を中心として紹介する。

## 2. 開発の背景

先に述べたように、健常人の血中アンモニアは低濃度に保たれている。従って、測定法には少なくとも数 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ レベルのアンモニアを測定できる性能が要求される。また、赤血球中にはAMPデアミナーゼのようなアンモニア産生に関与する一連の酵素(核酸代謝酵素)と基質であるプリンヌクレオチドが存在しているため、検体中のアンモニア濃度は非常に上昇し易<sup>3)</sup>、採血後直ちに測定する場合以外は何らかの前処理が必要になる。通常、この前処理は検体の希釈を伴うため、測定法にはさらに低濃度のアンモニアを測定できる性能が望まれる。

体外診断薬として重要な点は測定結果の信頼性を確保することであり、測定感度の向上はこれを達成するための必須要件であるが、その他に操作の簡便性、試薬の安定性、汎用型自動分析装置への適用性などが求められる。現在、臨床検査に用いられている主な血中アンモニア測定法を表1に示したが、いずれの方法も一長一短があり、求められている性能のすべてをもつような測定法は見出されていない。

表1 血中アンモニア測定法と性能の比較

方法	検体	測定	感度	特異性	再現性	多検体
直接比色法 <sup>4)</sup>	血漿* 全血*	的手法	○	△	△	×
ドライケミストリー法 <sup>5)</sup>	全血	専用機	△	△	△	△
酵素法 (GIDH-UV法 <sup>6)</sup> )	血漿	汎用機**	△	○	△	○
酵素法 (NADS-UV法 <sup>7)</sup> )	血漿	汎用機**	△	○	○	○

各項目の性能を3段階で評価した(○:良好(高い), △:不良(低い), ×:不可)

\* 検体を除タンパク処理し、その上清を検体に用いる

\*\* 汎用型自動分析装置

GIDH: glutamine dehydrogenase

NADS: nicotinamide adenine dinucleotide synthetase

### 3. 酵素サイクリング法によるアンモニアの高感度測定

今般著者らは、3種類の酵素反応を組み合わせたアンモニアの測定方法を考案した(図1)。

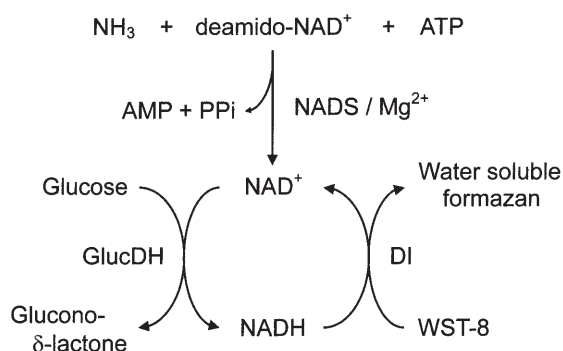


図1 高感度アンモニア測定試薬の測定原理  
NADS: NAD synthetase; GlucDH: glucose dehydrogenase;  
DI: diaphorase

本法は検体中のアンモニアを $\text{NAD}^+$ に変換する反応と、生成した $\text{NAD}^+$ をグルコースデヒドロゲナーゼ(以下GlucDHと略)とジアホラーゼ(以下DIと略)とで増幅する反応(酵素サイクリング反応)の2段階で構成されている。GlucDHとDIによって $\text{NAD}^+$ と $\text{NADH}$ 間のサイクリング反応が $n$ 回転すると、 $\text{NAD}^+$ (または $\text{NADH}$ )の $n$ 倍量の水溶性ホルマザン色素がWST-8から生成し蓄積されるために、単位時間あたりの回転数が多いほど感度が上昇することになる。さらに、水溶性ホルマザンの生成速度はアンモニアから変換された $\text{NAD}^+$ の濃度と比例関係にあるため、水溶性ホルマザンを分光学的に測定することで検体中のアンモニア濃度を求めることができる。

### 4. 測定感度の設定

測定感度はサイクリング定数 $Kc$ と時間 $t$ の積で決まり、 $Kc = (K_a \times K_b) / (K_a + K_b)$ であるため、 $K_a + K_b$ を一定としたとき、 $K_a = K_b$ で $Kc$ が最大になる( $K_a$ 、 $K_b$ はGlucDHとDIの酵素反応定数)<sup>8)</sup>。実際には、必要な測定可能範囲や試薬の安定性を考慮して、酵素濃度を調整し、 $Kc$ を決定する。本検討では血中のアンモニアを測定することを意図し、 $400 \mu\text{g}/100\text{mL}$ のアンモニアを検体としたとき測定終了時の吸光度が2.0以下で、かつ基準範囲( $12 \sim 66 \mu\text{g}/100\text{mL}^2$ )付近の測定再現性がCV 3%以下を満足するような試薬処方と分析条件(検体/試薬

比や反応時間など)を設定した。設定した条件でアンモニア標準液( $200 \mu\text{g}/100\text{mL}$ )を測定したときのタイムコースを図2に示す。

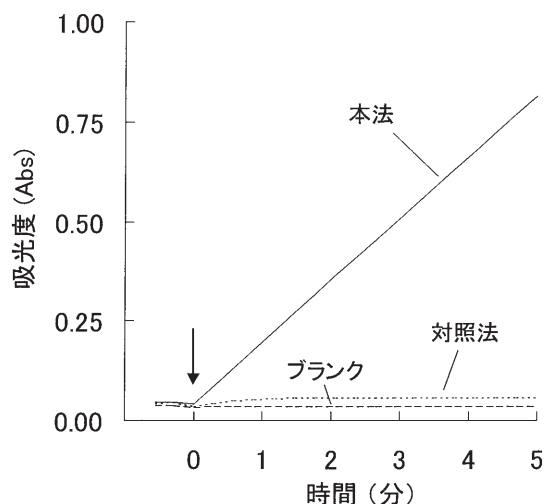


図2 アンモニア標準液( $200 \mu\text{g}/100\text{mL}$ )の測定(タイムコース)  
本法:水溶性ホルマザンを検出(450nmにおける吸光度)  
対照法: $\text{NADH}$ を検出(増幅なし、340nmにおける吸光度)

本法の場合、吸光度は時間軸に対して一次的に上昇し、5分間の吸光度変化量は0.75に達した。一方、酵素サイクリングをさせない対照法では、反応開始後ほぼ1分でプラトーに達し、5分経過した時の吸光度変化量は0.02でしかなかった。5分間の反応において、本法は対照法に対して37.5倍に増感された。なお、反応時間を延長することでさらに感度を上昇させることができるし、本法の場合にはGlucDH濃度を2倍、3倍と増やすだけでも感度を上昇させることが可能である(図3)。究極的には1000倍以上感度を高められる可能性がある。

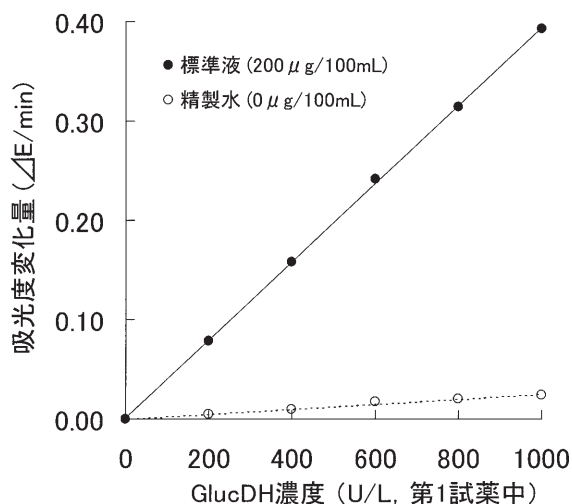


図3 グルコースデヒドロゲナーゼ濃度と測定感度の関係  
GlucDH: glucose dehydrogenase

## 5. 使用方法

本測定原理に基づき、第1試薬と第2試薬の2つの試薬から成るキットを作製した。

標準的な測定手順は次のとおりである。まず検体と30倍量の第1試薬を混合し、37°Cで5分間インキュベートする。続けて10倍量の第2試薬を加えて反応を開始し、450 nmでの吸光度変化量 ( $\Delta E/\text{min}$ ) を測定する。そして、専用の標準液を用いて予め作成した検量線から検体中のアンモニア濃度を算出する。

## 6. 基本性能

臨床検査で広く普及している汎用型の自動分析装置を用いて本試薬の基本性能を評価した。

### (1) ヒト血漿を検体とした場合

再現性は日内および日間とも変動係数(CV)が1~3%、測定可能な濃度範囲は3~400  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ であった。測定を妨害する可能性がある還元性物質(アスコルビン酸、グルタチオン等)やビリルビン、さらには溶血、乳び等の影響はほとんど認められなかった。従来の酵素法試薬との相関性は本法をY軸にした場合、回帰式 $y=1.02x-6.76$ 、相関係数 $r=0.999$ と良好であった。

### (2) 全血を前処理した検体の場合

採血後に生じる検体中のアンモニア濃度の上昇を防ぐには、タングステン酸ナトリウムを含んだ強酸性溶液で除タンパクする方法が有効である。この処理を行った検体は、長期間安定であるため信頼性を確保するのに有用であるが、これまでは検体の性質により直接比色法(用手法)にしか適用できなかった。本法はこの除タンパクを行った検体についても血漿を検体とした場合と同等の性能を示し、全血を検体として用いるドライケミストリー法との相関では、本法をY軸とした場合、回帰式 $y=0.969x+6.250$ 相関係数 $r=0.998$ と良好な結果が得られた。

本キットは製造後8ヶ月(冷蔵保存)以上安定であった。本キットは体外診断薬として十分な性能を有していると考えられた。

## 7. 他項目への応用展開

本稿で紹介した酵素サイクリング法は、ATPや $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ (金属濃度に応じてNADSが活性化する)の高感度測定試薬としてそのまま応用が可能である。さらに、図4に示したようにアンモニア、ATP、deamido- $\text{NAD}^+$ のいずれかを生成する酵素を組み合わせることで、様々な物質の定量や酵素活性のための高感度測定試薬への展開も可能である。

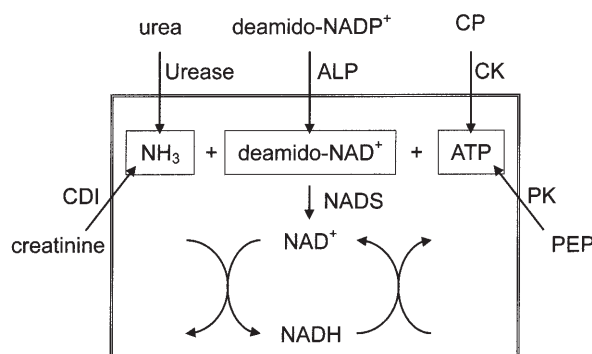


図4 酵素サイクリング反応を用いた高感度試薬  
ALP: alkaline phosphatase; CK: creatine kinase; PK: pyruvate kinase;  
CDI: creatinine deimidase; CP: creatine phosphate;  
PEP: phosphoenol pyruvate

## 8. おわりに

酵素サイクリング法は、高感度測定法として以前から研究されているものである<sup>9)</sup>。酵素サイクリング法は生体試料のように多種多様な成分を含む場合でも目的物質のシグナルのみを増幅させることができるため、臨床検査のように迅速性が要求される場合には特に有効な方法と考えられる。しかし、一般的に分析操作が煩雑な場合が多く、胆汁酸、ケトン体、カルニチンなど一部の項目にしか利用されていない。本稿では酵素サイクリング法の実用化の一例として血中アンモニアの測定試薬の開発について紹介させて頂いた。この試薬はReady to Useな試薬であり、高感度で再現性、特異性に優れ、長期間安定であるという特徴を有している。さらに、従来法と比べて検体/試薬比を小さくすることができるため、夾雑成分や除タンパク試薬の影響を受けにくく、従来法では困難であった全血を除タンパク処理した上清も検体として用いることが可能である。このことから、本試薬は臨床検査の様々な状況に対応できると考えている。なお、本試薬は平成15年8月からシカリキッドNH<sub>3</sub>として、さら

※21ページに続く

さらには加熱器具からの汚染も無視できない事例がある。熱伝導型のホットプレート市販品の多くは本体がアルミニウムで作られており、非常に細かい錆が徐々に発生し、特に本体内部にファンを装備している場合では、微量の汚染を噴出するような状態で引き起こしやすい。こうした場合、金属部の表面を樹脂等でコーティングしたり、本体の材質を樹脂製のものに換えるなど、また表面がガラスセラミック製の赤外線ホットプレートやハロゲンランプホットプレートなどに換えることで、より汚染の少ない分析が可能となる。

## 5. 分析による汚染

水酸化ナトリウムなどのナトリウム塩中の金属不純物を測定する場合、主成分を除去せずに各種の試料をICP質量分析装置に導入することがあるが、そのような場合白金製のスキマーコーンを使用すると、熱伝導の関係で2時間ほどでスキマーコーンの穴がナトリウム塩で塞がれてしまう。その対策としてニッケル製のスキマーコーンを使用することとなるが、この場合、ニッケル製スキマーコーンをステンレス製スキマーベースと組み合わせると銅の汚染が発生し、時として銅の測定が困難となることがあり、このような場合にはスキマーベースを真鍮製にすると汚染が発生しなくなる。このように装置自身の部品の材質によって特異な汚染があるので配慮を要する。また導入系からスキマーベースに至る部品を新しいもので交換し次の測定を実施すれば、効果的に前の試料の影響を除くことができるほか、ICP発光分析の場合では、試料導入前に界面活性剤を注入して汚れを落とす等のテクニックも効果があるので推奨したい。

## 5. おわりに

分析は、常に汚染との戦いといった一面を持っており、その目的を達成するためにいかなる環境下でどのような器具や試薬を用い、いかなる方法で行なうかを確実なものとするのが望ましい。しかし、実際の分析では予期できない汚染に直面することも多く、それらをどれだけ多く認識できるかが重要なポイントとなる。さらには、試験方法の妥当性確認を実施し、かたよりのない結果が得られることを事前に確認しておくことも大切である。

## 高感度アンモニア測定試薬の開発 ※16ページより続く

に、平成16年10月からは専用の検体前処理試薬(シカリキッドNH<sub>3</sub>除蛋白液)を加えて販売中である。

酵素サイクリング法は本稿で紹介した以外にもELISA<sup>10)</sup>やバイオセンサー<sup>11)</sup>などへの応用が検討されている。また、近年盛んに研究されている $\mu$ -TASのような微小空間での微量試料の分析にも有効と思われる。このように酵素サイクリング法は超高感度検出法の一つとして応用性が高いと考えている。

最後に、本試薬の開発にあたり、ご懇篤なるご指導を頂いた旭化成株式会社 診断薬事業部(現旭化成ファーマ株式会社)の皆様に厚くお礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) 上代淑人監訳: ハーパー・生化学 原書25版, 343-350, 2001, 丸善.
- 2) Medical Practice編集委員会編: アンモニア窒素 臨床検査ガイド2001~2002, 234-236, 2001, 文光堂.
- 3) 伏見了, 国沢貴久美, 林長蔵: 採血後のアンモニア上昇に対する研究, 臨床化学, **8**: 311-319, 1979.
- 4) 奥田拓道, 藤井節郎: 血中アンモニア直接比色定量法, 最新医学, **21**: 622-627, 1966.
- 5) 伏見了, 木下憲明, 林長蔵: ドライケミスリーの原理とその評価, Medical Technology, **15**: 984-986, 1987.
- 6) Mondzac A, Ehrlich G E, Seegmiller J E: An enzymatic determination of ammonia in biological fluids, *J Lab & Clin Med*, **66**: 526-531, 1965.
- 7) 山田満廣, 小味潤智雄: 新しい酵素反応系を用いた液状による血液中アンモニアの測定法に関する評価, 日本臨床検査自動化学会誌, **25**: 207-212, 2000.
- 8) 美崎英生: 酵素サイクリング法による高感度測定法の原理, 検査と技術, **27**: 973-980, 1999.
- 9) 加藤尚彦: 基礎生化学実験法(阿南功一ら編) vol 6 生化学的測定, 101-146, 1976, 丸善.
- 10) Johannson A, Stanley C J, Self C H: A fast high sensitive colorimetric enzyme immunoassay system demonstrating benefits of enzyme amplification in clinical chemistry, *Clin Chem Acta*, **149**: 119-124, 1985.
- 11) Hasebe Y, Uchiyama S: Chemically amplified adrenal medulla hormone sensor, based on substrate recycling using tyrosinase and l-ascorbic acid, *Anal Sci*, **9**: 855-857, 1993.