

2-Chloro-4-nitrophenyl-4-galactopyranosylmaltoside (Gal-G2-CNP)を基質とした新しいアミラーゼおよび膵型アミラーゼ測定法

A new assay method for measurement of total and pancreatic amylase activity with 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-galactopyranosylmaltoside (Gal-G2-CNP) as a substrate

—シカリキッド-N AMYおよびシカリキッド-N p-AMYの基本性能評価—

— Evaluation on basic performance of CicaLiquid-N AMY and CicaLiquid-N p-AMY —

関東化学株式会社 ライフサイエンス部 高笠 信之
NOBUYUKI TAKAGASA

Life Science Dept. Kanto Chemical Co., Inc.

1. 緒言

α -アミラーゼ (AMY) (EC 3.2.1.1 α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase) は膵臓、唾液腺に高濃度で存在するが、肝臓、肺、小腸、卵巣などにも分布しておりデンプン、グリコーゲン等の多糖類の α -1,4-グリコシド結合を加水分解し、グルコース等を生成する。ヒト体液中のAMYには膵型(以下、P型)および唾液腺型(以下、S型)の2種類のアイソザイムが存在する。現在、異なる合成基質を用いたいくつかの測定試薬が使用されているが、基質による反応性の違いから測定法間差が生じ、そのため基準範囲も方法により異なる等、施設間差縮小が困難となっていた。一方において、適当な検量物質があれば、現在市販の基質についてはどの方法を用いても校正が可能であるとの報告もあり、早期の勧告法制定が望まれていた。1998年、国際臨床化学連合(IFCC)より4,6-Ethylidene-4-nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside (Et-G7-PNP)を基質とする勧告法が公表され、2004年には日本・常用酵素標準物質(常用ERM) Lot 004制定時に於いて日本臨床検査標準協議会(JCCLS)がIFCC勧告法をJCCLS-標準操作法(SOP)として認証した¹⁾。さらに2005年10月、同基質を用いた方法が日本臨床化学会(JSCC)より、勧告法²⁾として承認された。これにより、各合成基質を用いた方法は検量用ERM等を用いることにより校正可能となり、長年の懸案であったAMY測定における施設間差縮小の問題解決が期待される。

2-Chloro-4-nitrophenyl-4-galactopyranosylmaltoside (Gal-G2-CNP)³⁾を基質に用いた「シカリキッド-N AMY」(以下、T-AMY)は共役系酵素を必要とせず、AMYによ

り加水分解され、遊離した2-Chloro-4-nitrophenol (CNP)を直接計測することにより、P型およびS型の総活性(以下、総AMY)を求めることができる。今回、本法の基本性能、検量用ERM「トレースキャリブ」によるJSCC勧告法への校正効果および抗S型AMY阻害抗体を用いた同基質のP型AMY測定試薬である「シカリキッド-N p-AMY」(以下、P-AMY)について紹介する。

2. 測定原理

2.1 T-AMYの測定原理

T-AMYおよびP-AMYの測定原理を以下に示す。
基質であるGal-G2-CNPの構造を図1に示した。

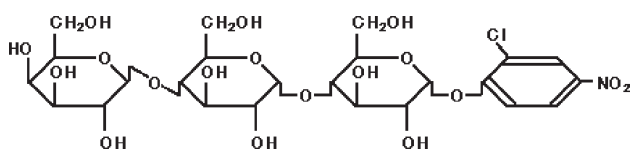


図1 基質の構造



Gal-G2-CNPは総AMYにより加水分解され、CNPを遊離する。このCNPの主波長400~415nmにおける吸光度を連続計測することにより、AMY活性を求めることができる。

2.2 P-AMYの測定原理

第一試薬中の抗S型AMY抗体により、S型AMYが阻害される。残存したP型AMYを以下の反応により、測定する。



3. 試薬組成

T-AMYおよびP-AMYの試薬組成および反応液終濃度は表1の通りである。

表1 試薬組成

T-AMY

第一試薬	第二試薬	反応液終濃度
50mmol/L, MES (pH 6.0, 37℃)	50mmol/L, MES (pH 6.0, 37℃)	49mmol/L
140mmol/L, KSCN	140mmol/L, KSCN	138mmol/L
5.0mmol/L, CaCl ₂	5.0mmol/L, CaCl ₂	4.9mmol/L
300mmol/L, NaCl	300mmol/L, NaCl	295mmol/L
	10.6mmol/L, Gal-G2-CNP	2.6mmol/L

MES : 2-Morpholino ethane sulfonic acid

P-AMY

第一試薬	第二試薬	反応液終濃度
50mmol/L, MES (pH 6.0, 37℃)	50mmol/L, MES (pH 6.0, 37℃)	49mmol/L
140mmol/L, KSCN	140mmol/L, KSCN	138mmol/L
5.0mmol/L, CaCl ₂	5.0mmol/L, CaCl ₂	4.9mmol/L
300mmol/L, NaCl	300mmol/L, NaCl	295mmol/L
	10.6mmol/L, Gal-G2-CNP	2.6mmol/L
20μg/mL, 抗ヒトS型アミラーゼマウスモノクローナル抗体		15μg/mL

4. 基本性能試験

4.1 同時再現性

T-AMYおよびP-AMYについて、3試料のn=30繰返測定を行った結果を表2、表3に示した。

表2 T-AMYの同時再現性 (単位:U/L)

Sample	n	MEAN	MAX	MIN	R	SD	CV (%)
血清 1	30	76.1	77	75	2	0.670	0.88
血清 2	30	84.7	86	83	3	0.862	1.02
血清 3	30	202.2	209	198	11	2.362	1.17

表3 P-AMYの同時再現性 (単位:U/L)

Sample	n	MEAN	MAX	MIN	R	SD	CV (%)
血清 1	30	37.3	38	36	2	0.512	1.37
血清 2	30	43.3	44	42	2	0.512	1.18
血清 3	30	112.7	115	111	4	1.106	0.98

4.2 希釈直線性

T-AMYおよびP-AMY共に直線性は約4,500U/Lまで認められた(図2、3)。

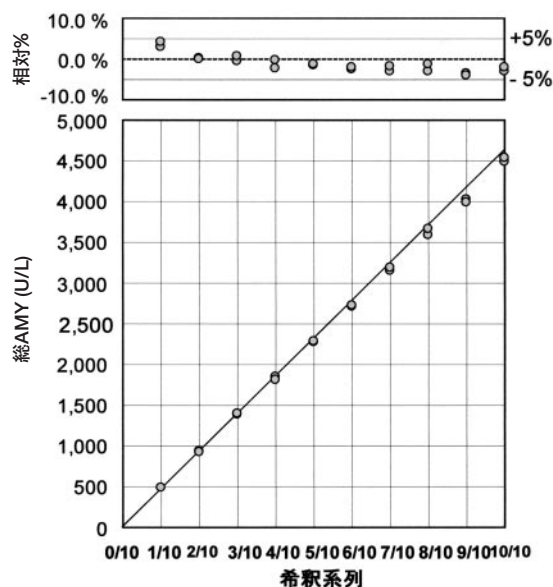


図2 T-AMYの希釈直線性

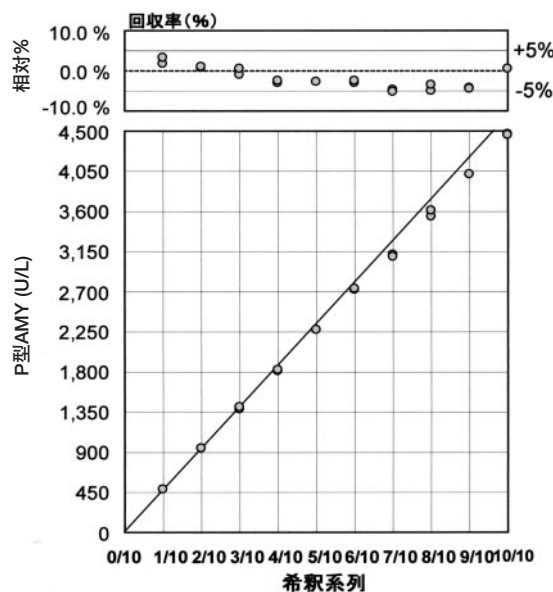


図3 P-AMYの希釈直線性

4.3 共存物質の影響

T-AMY、P-AMYについて共存物質の影響を調べた。ヒトプール血清に干渉作用の可能性のある成分を10%添加し、最大添加濃度が以下の濃度になるように調製した。ヘモグロビン500mg/dL、抱合型ビリルビン20mg/dL、遊離型ビリルビン20mg/dL、乳び2000ホルマジン濁度までの影響については、ヒト生体色素成分による測定干渉作

用確認試料である干渉チェック(シスメックス(株)製)を用い、アスコルビン酸50mg/dLまでの影響については純品(関東化学(株)特級)を用いた。その結果、いずれの影響も認められなかった。

4.4 反応タイムコース

生理食塩水、血清検体、尿検体のタイムコースを図4に示した。

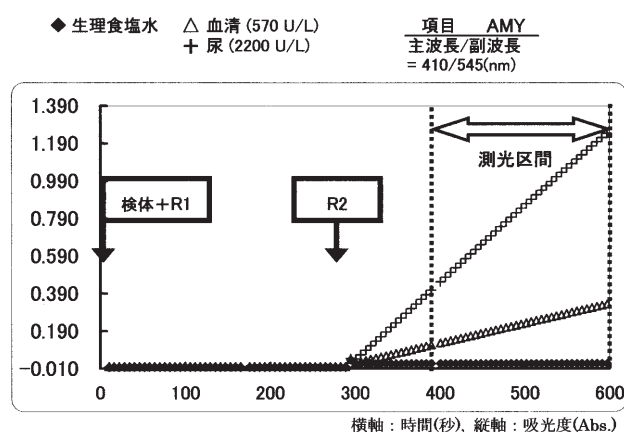


図4 反応タイムコース

4.5 抗S型AMY阻害抗体阻害能

P-AMYの抗S型AMY阻害抗体は、少なくとも7680U/LのS型AMYを98%阻害可能であることが確認された(図5)。

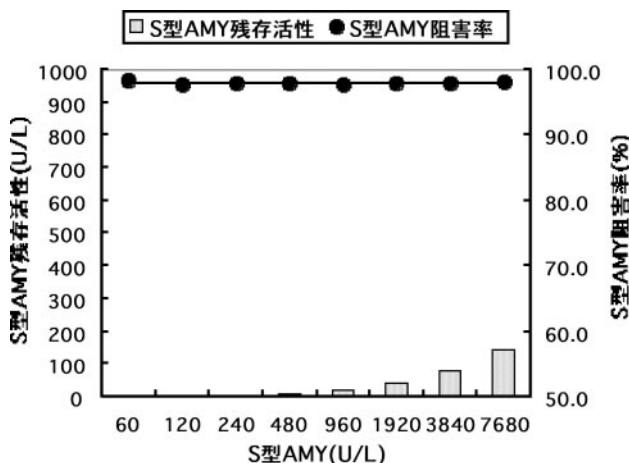


図5 抗S型AMY阻害抗体阻害能

4.6 JSCC/JCCLS-SOPとの相関

検量用ERM、トレースキャリブにより検量したT-AMY (y) のJSCC/JCCLS-SOP (x) との相関性試験の結果は、

n=234、相関係数; $r=0.996$ 、直線回帰式; $y=0.985x + 5.5$ であった(図6)。

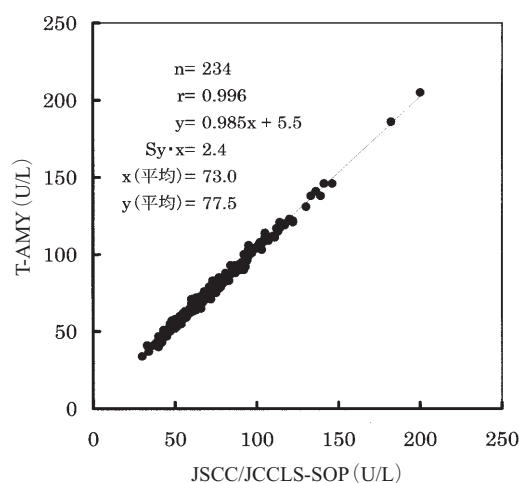


図6 T-AMYのJSCC/JCCLS-SOPとの相関

5. 結語

本法は試薬調製を必要とせず、そのまま使用可能な無調製試薬であり、測定原理は共役酵素を必要としない一次発色基質を用いたシンプルな反応系であることが特徴となっている。また、検量用ERMである「トレースキャリブ」を用いて検量すれば、上位のJSCC勧告法に校正することが可能であることが証明された。このことから、本法はJSCC標準化対応法試薬としての条件を満足する性能を有していると考えられる。したがって、学会等よりJSCC勧告法による基準範囲⁴⁾が提示されれば、それを本法に適用することが可能である。

以上のことから、本法は実用性に優れたJSCC標準化対応法試薬と位置付けることが可能と思われる。

参考文献

- 1) JCCLS認証委員会標準物質小委員会WG:酵素標準物質(ERM) Lot004の設定概要,日本臨床検査標準協議会会誌別刷,19:34-41,2004.
- 2) 日本臨床化学会酵素・試薬専門委員会:ヒト血清中酵素活性測定の勧告法— α -アミラーゼ,臨床化学,34:350-361,2005.
- 3) Yoshitaka Morishita et al.: Total and pancreatic amylase measured with 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside, Clin. Chem, 46:928-933, 2000.
- 4) 加藤隆則,他:JCCLS自動化法での基準範囲算出と標準化対応法のトレーサビリティの確認-その1 T-AMY,日本臨床検査自動化学会会誌,28:353,2003.