

クレアチニン測定法について

林 長蔵*

1. 歴史

クレアチニン測定が医科学の分野で注目され始めたのは1886年 Jaffe によって尿中クレアチニンがアルカリ性ピクリン酸と反応し、赤褐色に発色することが見い出されてからのことである。その後、臨床的意義の追究や測定法の改良が数多くなされたが、この反応の特異性面から実用化されるには種々の問題があった。1919年 Folin と Wu により除タンパク操作が加えられ、血清中クレアチニンの測定も可能となった。一方、他の試薬を用いた方法も数多く検討され今日に至っているが、その全てを紹介することは不可能である。そこで、測定原理の相違する代表的な測定法だけを大別したものが図1である。このように数多くの測定法が報告されているが、現在

臨床検査の分野で日常検査法として広く利用されている方法は、アルカリ性ピクリン酸を用いた Jaffe 直接法である。この方法は試料中のタンパク、ヘモグロビン、ビリルビンなどの共存物質の影響をうけるという問題がある。そのためピクリン酸濃度やアルカリ濃度を種々調整したり、反応変化の初期を測定することで、これらの影響を回避しているのが現状である。しかしながら最近、抗生物質などの薬剤投与の頻度が高まり、これら薬剤干渉がさらに問題となってきている。

図2に現在影響が確認されている抗生剤を示すが、特にセファロリジン、セファロチン、セフォキシチンの影響が甚だしい。用いる試薬や測定機器により差はあるが薬剤濃度500μg/ml で約4.0mg/dl (クレ

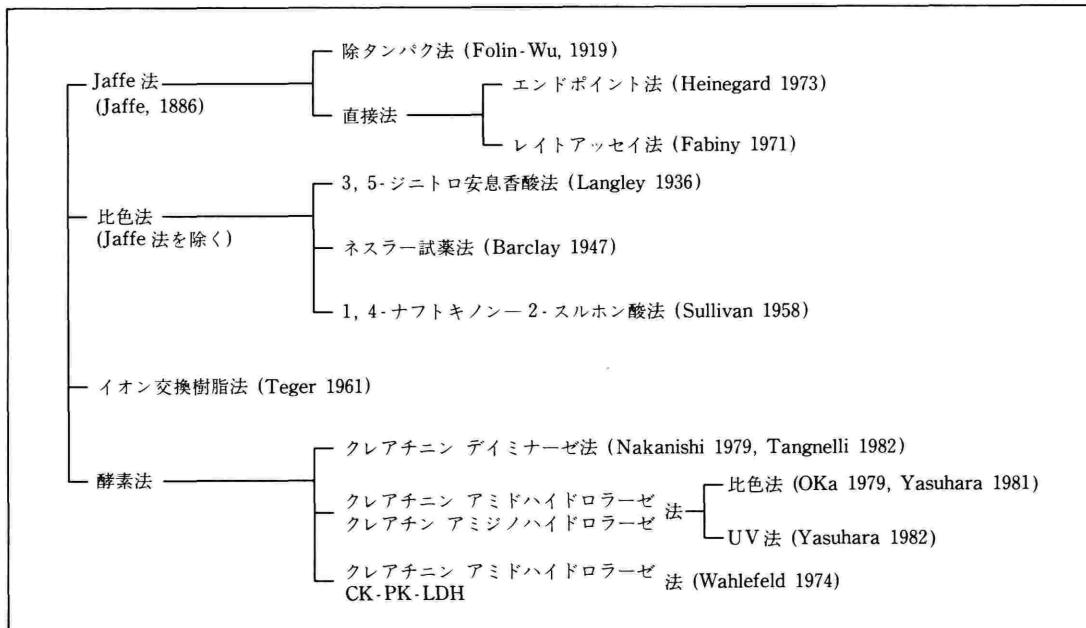


図1.

* Chozo Hayashi

大阪大学 医学部 臨床検査診断学講座 助教授

〒553 大阪市福島区福島1丁目1-50

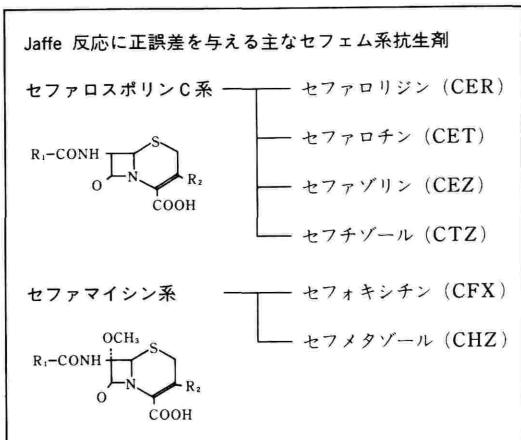


図2.

アチニン濃度) の正誤差を生ずる。

一方近年、酵素精製技術の向上と共に、測定試薬として酵素を利用した方法が数多く臨床検査の領域で普及してきた。その主な理由は、

- 1) 特異性に優れている。
- 2) 簡易性が高い (測定成分の抽出、精製、除タンパクなどの前処理が不要である)。
- 3) 比較的温和な条件で測定可能である。
- 4) 排液処理の問題がない。

などが上げられる。クレアチニン、クレアチニン測定においても従来より数多くの測定系が開発され検

討された。図3に現在まで検討された酵素的測定法の反応原理を示す。

2. クレアチニン、クレアチニンの酵素的測定法

1) クレアチニンディミナーゼ-GLDH 法

この測定法においてはアンモニアを測定するため試料中のアンモニアが影響するので、あらかじめアンモニアを消去するか、またはサンプルブランクを差引く必要性がある。しかし、この測定系では検体に尿を用いた場合、尿中の多量のアンモニアの影響でサンプルブランク値が異常に上昇するため、あらかじめアンモニアを消去する方法は使えない。またこの測定法において最近薬剤の影響が確認され、問題となっている。図4に薬剤とこの測定系での影響を示す。薬剤濃度10mg/dlで約1.5mg/dl(クレアチニン濃度) の正誤差となる。

2) クレアチニナーゼ-クレアチナーゼ-サルコシンオキシダーゼ-ホルムアルデヒドヒドロゲナーゼ法

この測定法では、一連の酵素反応系において測定対象となる中間生成物が試料中では微量なため、サンプルブランクの上昇は認められない。しかしながら試薬酵素中の混在酵素により影響を受ける。特にクレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼは km 値が $2.9 \times 10^{-2} M$ 、 $3.4 \times 10^{-3} M$ と他の測定系に用いら

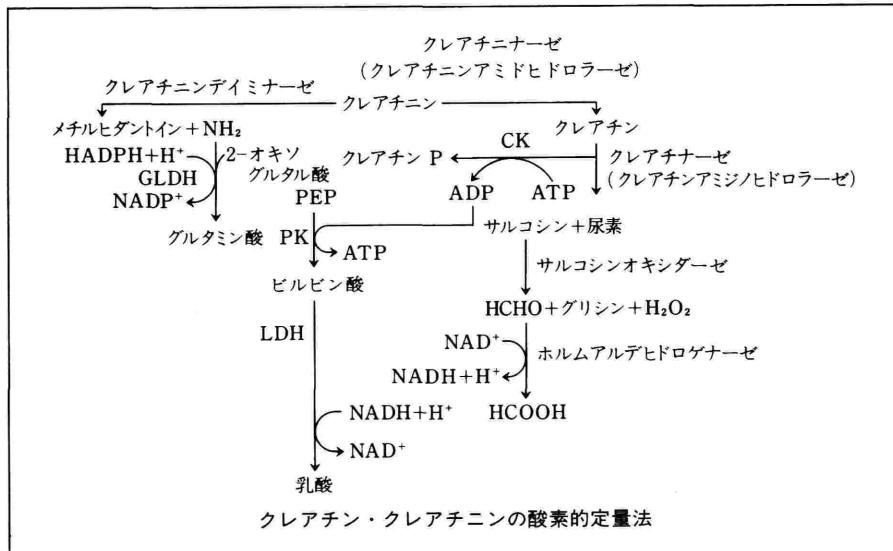


図3.

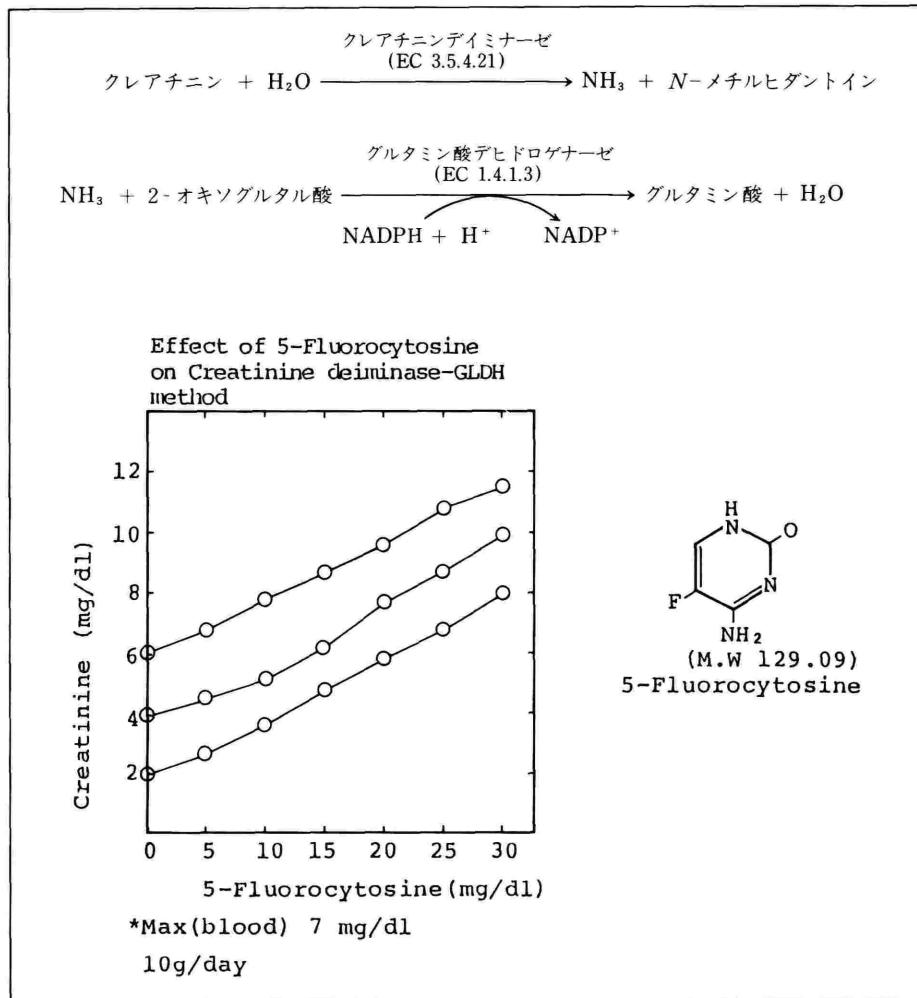


図4.

れている酵素試薬に比べ比較的大きいため添加量も多量となる。それについて混在酵素量も多くなり、より影響が現われる。クレアチニン、クレアチニンの酵素的測定法に使用する酵素は主に NADH 酸化酵素などの混在率が高く、反応によって生成した NADH がこれらの混在酵素により NAD に酸化され、測定値に負の誤差を与える。これらの影響は、試薬として NAD を用いるため試薬ブランクとして差引くことは不可能である。測定する試料中のクレアチニン濃度が、低ければ低い程その影響は大きなものとなる。

3) クレアチナーゼ-CK-PK-LDH 法

この測定法においては、検体中のクレアチニンおよびピルビン酸が測定系に影響を及ぼす。あらかじめ両者を消去するか、またはサンプルブランクを差引く必要性がある。しかしながら、あらかじめ試料中のクレアチニンおよびピルビン酸を消去する方法を用いたとしても、試薬酵素の PK および LDH の Km 値が比較的小さいため、短時間で処理でき、また NADH 酸化酵素等の影響は、試薬ブランクで差引き可能である。

以上のように酵素的測定法についても、まだまだ種々の問題点が残されている。しかしながら Jaffe 反応の特異性面から生ずる種々の問題は、日々深刻

なものとなってきており、一日も早く規準法や日常検査法を確立しなければならないと考える。

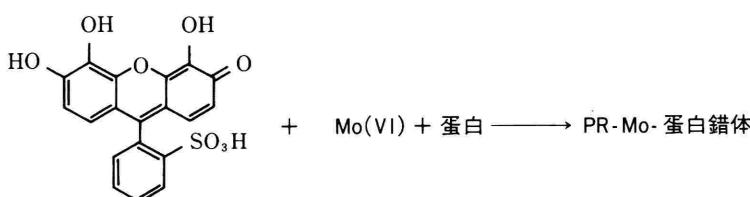
数多くのクレアチニン、クレアチニン測定法の中から規準法を選択する場合、最も重要な条件として次の事項が上げられる。

1)測定原理が明確で、その原理に基づいて正確な測定が可能であること。2)特異性の優れた方法であること。3)物理的指標を基準とする方法と標準物質を用いる方法の両方が測定可能であること。4)各施設での実施が可能であること、などである。しかしこれらの条件をすべて満足する測定法を検索または開発することは不可能に近い。測定法というのは常に新しい方法が開発され、改良が加えられている。規準法を選択する場合も同様で、その時代において最も前記の条件を満たす測定法を採用すべきと考える。クレアチニン、クレアチニン測定の場合は先にも記述したように、種々の問題点があるが、現時点においてクレアチナーゼ-CK-PK-LDH法の共役酵素を用いる方法が、他のいかなる測定法よりも優れていると思われる。

尿タンパク測定の現状と問題点 尿タンパクは1838年 Martin Solonにより発見され、古くからその存在が認められていた。当時、尿タンパク測定はその大半が煮沸試験法、強酸変性凝固試験などの定性法であった。近年、臨床検査の進歩とともに、Meulemans法、TCA-Ponceau法、 Cu^{2+} -Chelate法、CBB法などの定量法が開発され、今日なお腎疾患のスクリーニング検査やネフローゼ症候群の重症度判定法として大きな役割をなっている。しかしながら、これら定量法は従来の定性法よりも確かに優れているものの、数々の問題点がある。その主なものとしてタンパク種間の反応性の差や測定温度の影響、鋭敏度、操作性等などがあげられる。タンパク種間差の大きい測定法として Kingsbury-Clark法、Meulemans法、TCA法などが知られており、できるだけ規準法、日常検査法に用いるべきでないと考える。

それでは規準法、日常検査法に何法を採用するのが最良であるかを考えた場合、前記した問題点をすべて除外可能な測定法は現在のところない。最もタンパク種間差のない方法は TCA-ビューレット法、TCA-Ponceau法であるが、操作性等に問題があり日常検査法には不適であると考える。最近図5に示すように高感度な呈色法が開発された。測定原理は、試料とピロガロールレッド・モリブデン錯体試薬(470nmに極大吸収をもつ)を混和すると、試料中のタンパクとピロガロールレッド・モリブデン錯体が結合し、極大吸収が長波長(600nm)にシフトする。この600nmの吸光度の増加を測定し、試料中のタンパク量を求めるものである。まだ開発されたばかりだが、タンパク種間差も少なく自動化も可能なため、今後の各施設での評価が期待される測定法であると考える。規準法としては操作性等の問題より、むしろタンパク種間差のない測定法を選択し、日常検査法の正確度管理に利用するのが最良と考える。

[測定原理]



$\lambda_{\text{max}} : 470 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{max}} : 604 \text{ nm}$

図5.