

腎機能における臨床化学分析の問題点

国立循器病センター臨床検査部

片山善章, 初田和由
米田孝司, 相森裕三
奈須正人

はじめに

腎機能における臨床化学検査の一般的な項目といえば $\text{Na}, \text{K}, \text{Cl}$ の電解質と窒素化合物である Urea, Creatinine, Uric acid が主として挙げられる。 $\text{Na}, \text{K}, \text{Cl}$ の測定法は最近では、炎光法からイオン選択電極法へと変わりつつあり、その普及率は60数%を締めている。Urea, Creatinine, Uric acid は化学的測定法から酵素的測定法へと移り変わった。このように臨床化学検査の測定法は、ここ数年の中に測定法の改良・工夫、あるいは新しい測定法の開発などが行われているが、それなりに、新たに問題点も生じてきている。今回はその問題点について Creatinine, Uric acid を中心にして述べることにする。

Creatinine測定法の問題点

Creatinineの測定法はアルカリ性ピクリン酸との反応を利用した Jaffe 反応が操作の簡便なことでもっとも普及している。しかし、特異性に乏しく試料中の Jaffe 反応陽性物質が影響を与えることはよく知られている。なかでもセフエム系抗生物質である Cefoxin (CFX) が、図 1(a), (b) に示したごとく正誤差を与える。この実験は

Du Pont aca (Kinetic Jaffe 反応) における成績であるが、セフエム系抗生物質の Jaffe 反応への影響は測定波長、測定時間、測定方法を (rate assay, end point assay) 試薬濃度によって妨害率が異なる。

このような現状の中で、最近、図 2 に示した各種の酵素的測定法が酵素反応が特異性に優れているという点から、種々検討されて実用化されている。これらの酵素的測定法の正確度、精度の保障については、これらの酵素的測定法の特徴と問題点を述べることで理解できる。

まず経路 I では Creatinine deiminase の作用により NH_3 が生成し、この NH_3 を Glutamate dehydrogenase (GLDH) の存在下、 α -Ketoglutarate (α -KG) を基質として、NADPHの340nm における吸光度の減少を測定する。また II の経路では Creatinine amidohydrolase の作用により Creatine に変換し、さらに II-1 の経路で Creatine amidohydrolase を作用させて urea と sarcosine を生成し、urea を測定する場合は Urease-GLDH 反応による 2 分子の NH_3 を測定 (ただし内周性 urea を予め消去しておく必要がある) し、sarcosine は Sarcosine Oxidase を反応させると過酸化水素 (H_2O_2) とホルアルデヒド (HCHO)

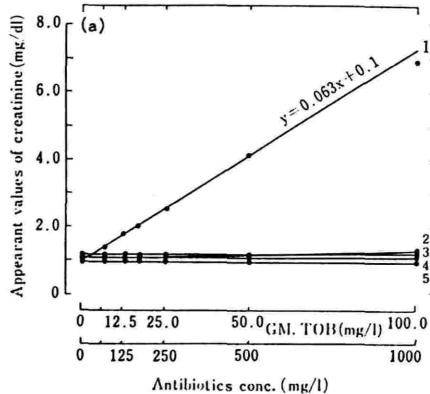


図 1(a) Jaffe 反応に及ぼす各種抗生物質とクレアチニンとの関係

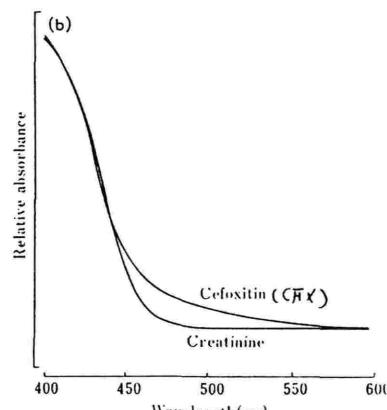


図 1(b) CFX の Jaffe 反応物質の吸収曲線

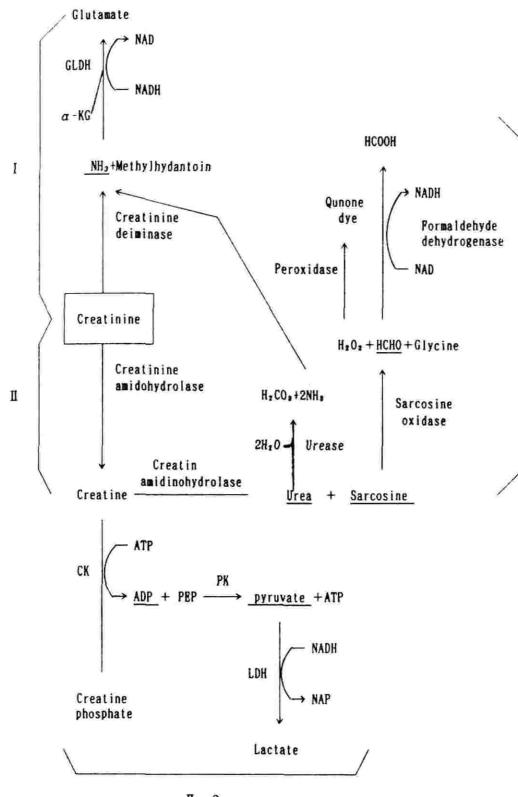


図2 クレアチニンの各種酵素的測定法

が生じる。 H_2H_2 Peroxidaseの存在下で呈色反応で測定を行い、 HCHO は Formaldehyde dehydrogenase 反応に導いて NADH の吸光度の増加を測定する。

一方、 II-2 の経路では Creatine kinase (CK) によって生成する ATP にホスホエノールピルビン酸 (PEP) と Pyruvate kinase (PK) を加えて生成した pyruvate を乳酸脱水素酵素 (LDH) 存在下で NADH の吸光度の減少を測定する。

したがって、現在では Creatinine deiminase 系、 Sarcosin Oxidase-Peroxidase 系、または Formaldehyde dehydrogenase 系、 CK-PK-LDH 系の 4 方法により Creatinine の酵素的測定が行われているが、各法ともそれぞれ問題点が指摘されている。

Creatinine deiminase 系においては試料中の NH_3 の影響を受けるので、予め GLDH 反応により NH_3 を消去するが、検体ブランクを差し引く必要がある。この測定系では血清試料の場合より、尿を検体とした場合にブランクが高くなる。また Creatinine の構造に類似している 5-fluorocytosine (抗真菌剤) が図 3 に示したように正誤差を与える。

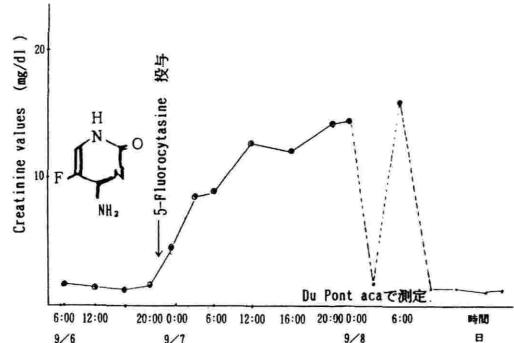
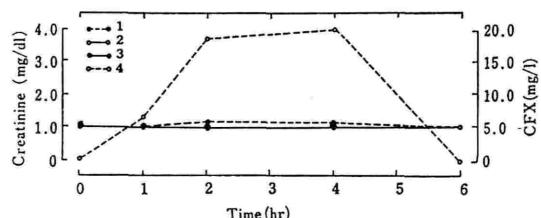


図3 Creatinine deiminase-GLDH 法における 5-Fluorocytosine の影響

CK-PK-LDH 系においては検体中 pyruvate が影響するので、あらかじめ pyruvate を LDH 反応で消去する必要があり、また溶血検体では ATP 分解酵素の遊出のために高値を示す問題点があるので、Creatinine amidohydrolase を除いた試薬ブランクを取れば正確度は保証できるということで、Creatinine の標準的測定法として検討されている。この方法の正確度の保証例を紹介する。

当センター病院、ICU 入室患者 9 名を対象とし Jaffe 法による Creatinine 実測値と補正值 (血清中の CFX の濃度を Bawdon らの方法に準じて HPLC 法により測定を行い、その濃度からみかけの Creatinine 値を図 1 (a) より求め、実測値より差し引く) および CK-PK-LDH 酵素法による測定値を比較した。図 4 に示すように CFX 投与後 2 ~ 4 時間で CFX $17.9 \pm 12.5 \sim 19.5 \pm 9.6 \text{ mg/l}$ となり Jaffe 法における Creatinine 実測値は $1.1 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$ であり、それ以外はすべて 1.0 mg/dl であった。この臨床成績は当

Method	Creatinine (mg/dl) n=9	After CFX ingestion					
		0 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	
1	Jaffe method Uncorrected	Mean ± SD	1.00 0.27	1.03 0.27	1.14 0.22	1.13 0.30	1.02 0.25
2	Jaffe method Corrected	Mean ± SD	1.00 0.27	1.00 0.29	1.03 0.24	1.03 0.24	1.02 0.25
3	Enzyme method	Mean ± SD	1.01 0.24	1.02 0.24	1.01 0.24	1.02 0.24	1.02 0.24
CFX (mg/l)							
4	HPLC method	Mean ± SD	0.41 0.63	5.84 8.00	17.92 12.53	19.46 9.64	0.01 0.03

図4 ICU 入室患者に 20 mg/kg 体重の CFX 1 回投与後の 血清中の CFX とクレアチニンの濃度の経時的変化

センター病院ICU における血清Creatinine値の0.1 mg/dl の変動が腎機能障害の程度を推定するために重要なのである。したがって血清Creatinineの測定には小数点2桁の変動が測定できる高感度でしかも特異性の高い測定法を開発しなければ0.1 mg/dl の変動を正確にとらえることはできない。

Sarcosine Oxidase 系ではH2O2かHCHOを測定するかで影響は異なるが、薬物の影響が報告されている。抗不整脈剤であるLidocaine の投与患者では、Lidocaine の代謝物がSarcosine と類似構造をもつため、その影響が報告されている。図5はEKTACHEM 700 Nによるドライリエジント法であるSarcosine Oxidase-Peroxidase法とCreatinine deiminase-GLDH法との相関性においてLidocaine投与患者は回帰式により乖離している。

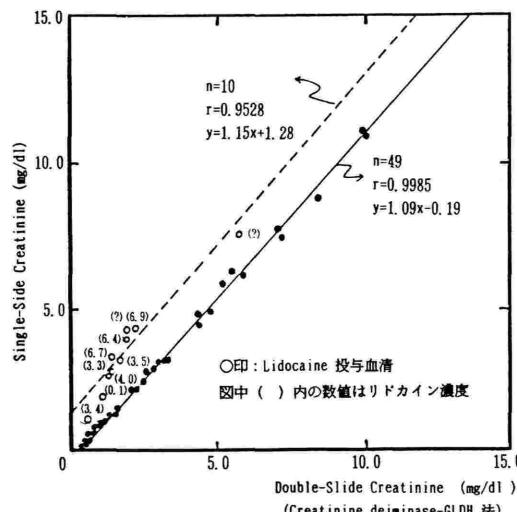


図5 Sarcosine Oxidase-Peroxidase法 (Single Slide EKTACHEM 700 N) におけるLidocaine投与の影響

以上のように特異性に優れているはずの酵素的測定法が種々の問題点について報告されているので、現状では酵素的測定法においても正確度、精度が完全に保証できる方法はない。しいて推奨できる方法は、II-2で経路のCK-PK-LDH 系を利用しCreatinine amidohydrolase を除いた検体プランクを取る方法か、II-1の経路でHCHOをFormaldehyde dehydrogenase反応によるNADHの吸光度の増加を測定する方法である。

Uric acid 測定法の問題点

Uric acid の測定法を原理的に分類すると、沈殿法、還元法および酵素法に大別することができる。沈殿法は

Uric acid がAg⁺、Cu⁺、Cu²⁺、Hg²⁺、NH₄⁺などと反応して不溶性の塩を形成するので、その沈殿の重量を測定する方法である。歴史的な方法として意味はあるが、現代では臨床検査には全く利用されていない。

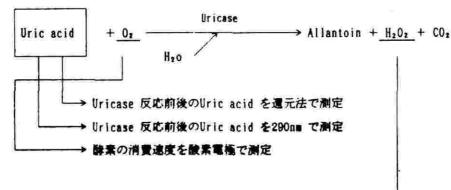
還元力を利用した方法はUric acid がアルカリ性において酸化されることにもとづいている。その代表的な方法として酸化剤にリンタングステン酸、アルゼノリンタングステン酸あるいはフェリシアナイトを用いた方法がある。またUric acid によるFe³⁺の還元によって生成したFe²⁺を鉄キレート剤で測定することにより間接的にUric acid を測定する方法が報告されている。これらの方法のうち、酸化剤としてリンタングステン酸を用いるCaraway 法、Henry 法の変法が利用されていたが、現在では次に述べる酵素的測定法に変遷している。

Uric acid の酵素的測定法は Uricaseを用いる。

Uricase によるUric acid の酸化分解は

$$\text{Uric acid} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Uricase}} \text{Allantoin} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2$$

の反応を触媒する。従って、Uricase を利用した Uric acidの定量法は図6に示したとおり、Uricase反応前後のUric acid を測定する方法、反応生成者である過酸化水素 (H2O2) を測定する方法およびUricase反応時に消費される酸素 (O2) の消費速度をポーラログラフィー式酸素電極で測定する方法がある。これらのうち、生成するH2O2を色原体の存在下でPeroxidaseを共役させて比色定量する方法が、現在、日常検査法としてもっともよく利用されている。この方法は発色感度および発色後の呈色の安定性の高い色原体について多くの研究が行われてきた。また、ビリルビン、溶血、アスコルビン酸などの



→ Peroxidase法: 水素供与体としてアリールアミン系化合物を用いて還元型色素を酸化型色素にて呈色される。または4-アミノアンチビリンとフェノールとの縮合反応に代表されるキノン体色素を測定する。

→ Catalase法: 水素供与体としてメチルアルコールを用い、生成したホルムアルデヒドをHantzsch の反応で測定するか、Formaldehyde dehydrogenase反応によるNADHの吸光度の増加を測定する。さらにエタノール水素供与体とした場合のアセトアルデヒドをAldehyde dehydrogenase反応によってギ酸を生成し、そのギ酸をFormate dehydrogenase 反応によって、理論的に2分子のNADHの吸光度の増加を測定する。

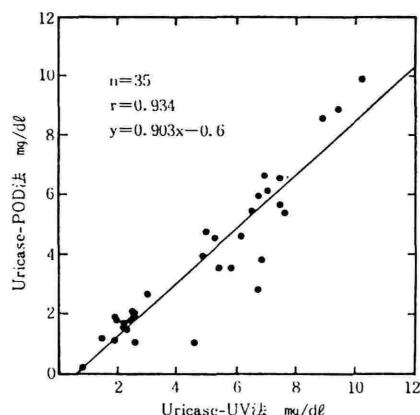
図6 尿酸の各種酵素的測定法

妨害除去についても検討されているが、原理的にはこれらの干渉物質の影響を完全に回避するすることができないまま普及してきている。

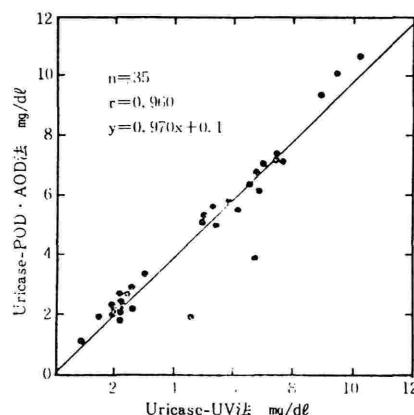
例えば、この干渉物質の代表としてアスコルビン酸の回避法としてAscorbate Oxidase (AOA) で予めアスコルビン酸を分解する方法が採用されている。このAOA 添加の有効性について人工透析患者血清(35例) および患者尿(29例) を対象として、AOA 無添加試薬、AOA 添加1試薬系、AOA 添加2試薬系のそれぞれ3方法とAmerican Association for Clinical Chemistry (AACC) の尿酸グループによりCandidate Reference Methodとして提唱されているUricase-UV法との比較を行った。人工透析患者血清については図7に示すとく、それぞれの相関係数は0.934、0.952、0.960 であり、患者尿については

図8に示すとく、それぞれ0.930、0.957、0.960 である。いづれもAOA 添加2試薬系ではアスコルビン酸が処理されて相関係数が良くなっているが、なかに回帰式からはずれている検体がある。これらの検体はAOA 反応で処理できない干渉物質の存在が推定できる。

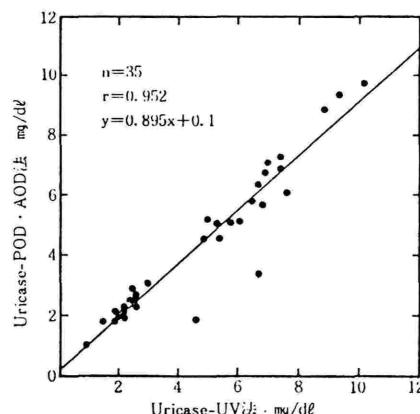
一方、H2O2はCatalase の存在下でMethanolをFormaldehydeに酸化する。これにアセチルアセトンとアンモニウム塩を縮合反応させて、黄色のピリミジン誘導体を生成することによりUric acid を測定することができる。本法は操作そのものは簡単であるが、発色に長時間を要し、またUricase を除いた試薬を用いて検体ごとの盲検をとる必要があるため、日常検査法としては普及率は低い。しかし、西ドイツにおいては干渉物質の影響を受けない方法として、Uricase-UV法とともにUric acid の標準法



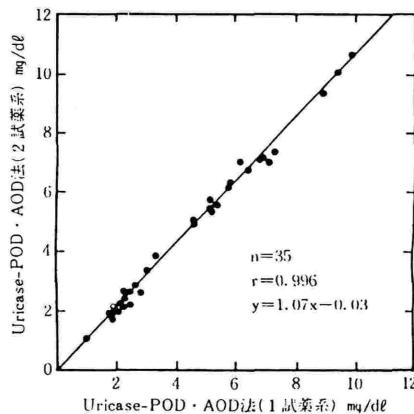
人工透析血清を用いたUricase-POD法とUricase-UV法との相関性



人工透析血清を用いたUricase-POD法(2試薬系)とUricase-UV法との相関性

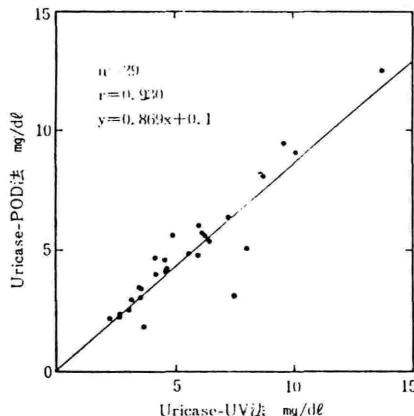


人工透析患者血清を用いたUricase-POD・AOA法(1試薬系)とUricase-UV法との相関性

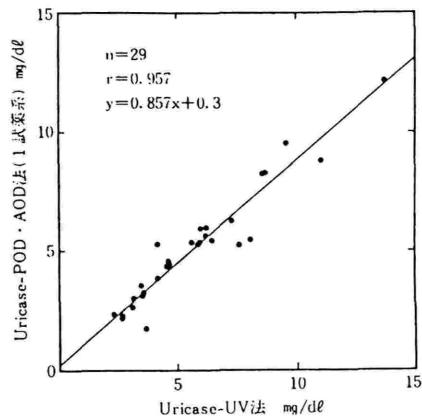


人工透析患者血清を用いたUricase-POD・AOA法(2試薬系)とUricase-POD・AOA法(1試薬系)との相関性

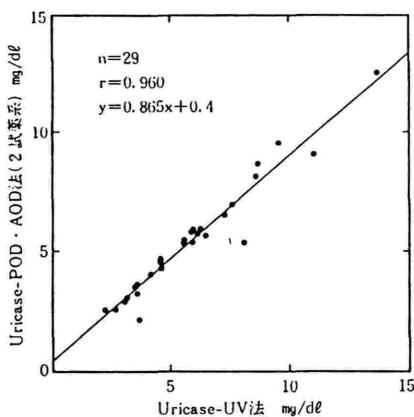
図7 人工透析患者血清のUricase-Peroxidase法による尿酸測定値



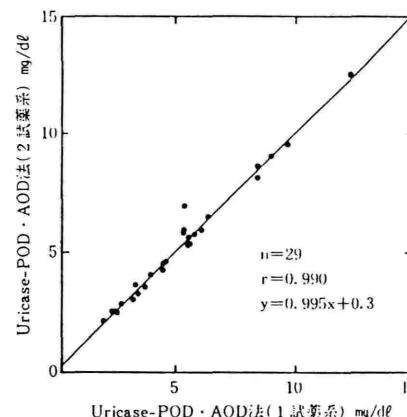
尿サンプルを用いたUricase-POD法とUricase-UV法との相関性



尿サンプルを用いたUricase-POD・AOD法 (1試薬系)とUricase-UV法との相関性



尿サンプルを用いたUricase-POD・AOD法 (2試薬系)とUricase-UV法との相関性



尿サンプルを用いたUricase-POD・AOD法 (2試薬系)とUricase-POD・AOD法 (1試薬系)との相関性

図8 患者尿のUricase-Peroxidase法による尿酸測定値

として扱われる。

またFormaldehydeを測定する方法としては図9に示すように、Formaldehyde dehydrogenase-Formate dehydrogenase反応を共役させて理論的に2分子のNADHを測定する測定系が考えられている。

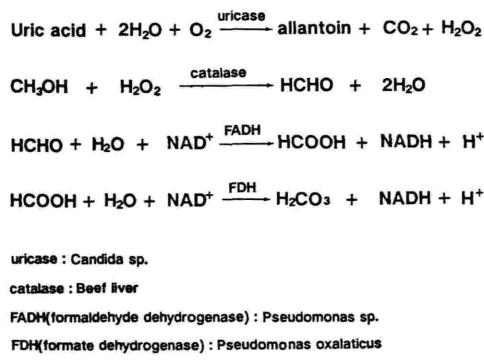


図9 Uricase-Catalase・FADH・FDH反応による尿酸の測定法

さらにMethanolの代わりEthanolを水素供与体として用い、AcetaldehydeをAldehyde dehydrogenase反応によってNADHの吸光度の増加を測定する方法も実用化されている。これらのNADH-UV法は、Uricase-Peroxidaseより干渉物質の影響を受けない方法として、特に尿中の

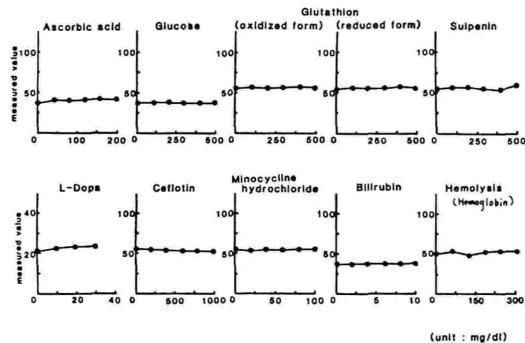


図10 Uricase-Catalase・Aldehyde dehydrogenase法による尿酸測定における各種干渉物質の影響

Uric acid測定法に適していると思われる。ちなみに Uricase-Catalase-Aldehyde dehydrogenase法による各種干渉物質の影響は認められない。

まとめ

臨床化学検査の測定法の現状と問題点をCreatinineと Uric acid を例にとって述べたが、ISE 法によるNa, K, Clの電解質の測定において多くの問題点が指摘されている。標準液はヒト血清のものを使用せねばならないということからISE 専用の一次標準血清が検討され、また、

Clについては人工透析後の患者血清に対しては大きな問題点があることが報告されている。その問題点を回避するため、ClはISE ではなく電量滴定法を採用している装置もある。

その他、自動分析装置の普及による測定法の改良（悪？）も大きな問題点である。本来、除蛋白あるいは抽出して測定せねばならない成分の化学的測定法をディスクリート式自動分析法では蛋白の共存下で測定しているわけであるから、問題点がいつも潜んでいるという認識のもとにデーターを管理しなければならない。