

腎機能における臨床化学分析の問題点

国立循環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 Na, K, 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。Na, K, 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。なかでもセフェム系抗生物質である Cefoxitin (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、セフェム系抗生物質の 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)

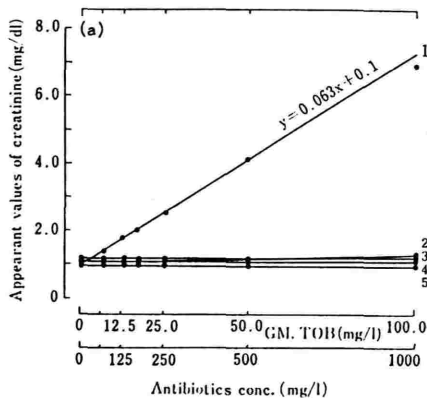


図1(a) Jaffe 反応に及ぼす各種抗生物質とクレアチニン値との関係

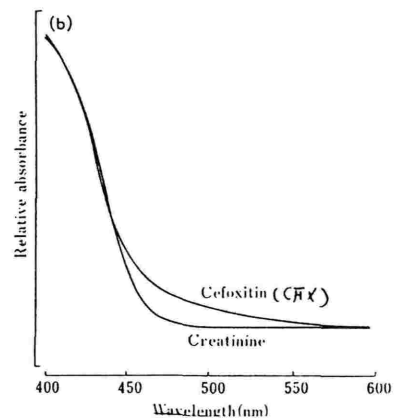


図1(b) CFX の Jaffe 反応物質の吸収曲線

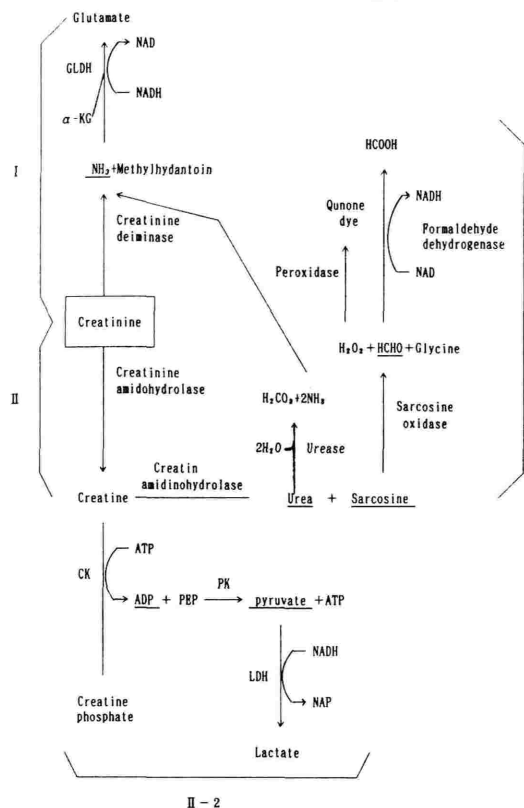


図2 クレアチニンの各種酵素的測定法

が生じる。H₂O₂ 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、Sarcosine 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NH₃の影響を受けるので、予めGLDH反応によりNH₃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。

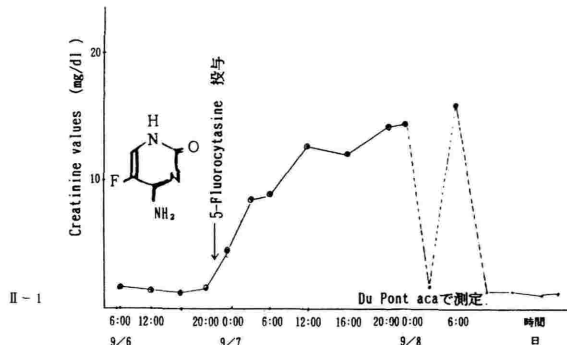


図3 Creatinine deiminase-GLDH 法における 5-Fluorocytosineの影響

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る、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HPL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CFX 17.9±12.5~19.5±9.6 mg/lとなりJaffe 法におけるCreatinine実測値は1.1±0.3 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	19.45 ±9.64	0.01 ±0.03

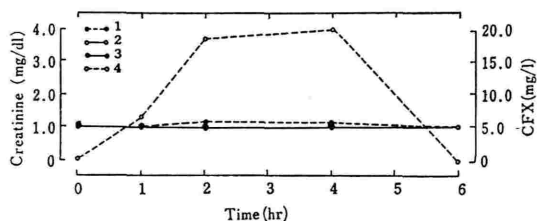


図4 ICU 入室患者に20mg/kg体重のCFX 1回投与後の血清中のCFX とクレアチニンの濃度の経時的変化

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HBOB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。

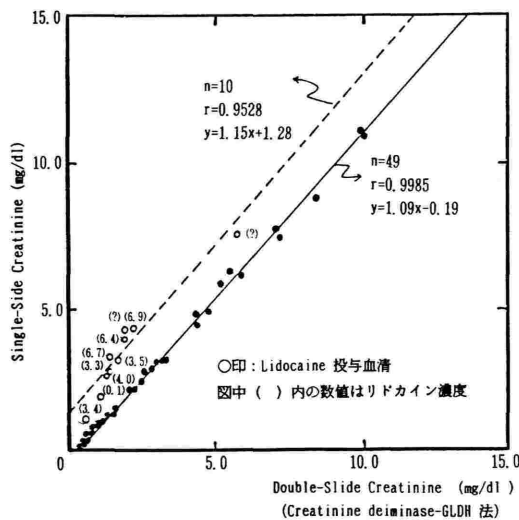


図5 Sarcosine Oxidase-Peroxidase法 (Single Slide EKTACHEM 700 N) におけるLidocaine 投与の影響

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を除いた検体ブ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

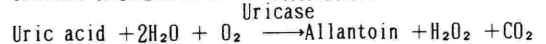
Uric acidの測定法を原理的に分類すると、沈澱法、還元法および酵素法に大別することができる。沈澱法は

Uric acidが Ag^+ 、 Cu^+ 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 NH_4^+ などと反応して不溶性の塩を形成するので、その沈澱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ンイドを用いた方法がある。またUric acidによる Fe^{3+} の還元によって生成した Fe^{2+} 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



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、反応生成物である過酸化水素(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HBOBは色原体の存在下で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

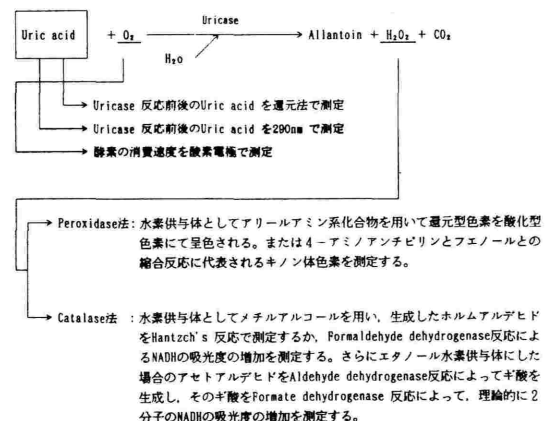


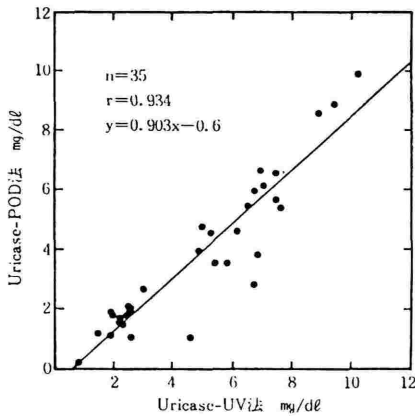
図6 尿酸の各種酵素的測定法

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。

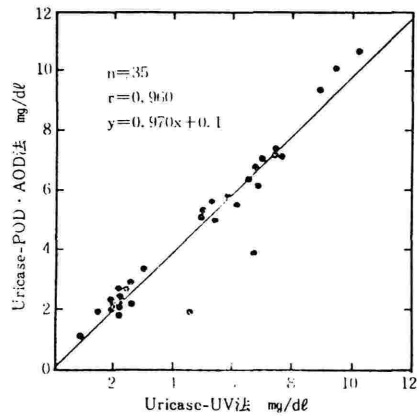
例えば、この干渉物質の代表としてアスコルビン酸の回避法としてAscorbate Oxidase (AOD) で予めアスコルビン酸を分解する方法が採用されている。このAOD添加の有効性について人工透析患者血清(35例)および患者尿(29例)を対象として、AOD無添加試薬、AOD添加1試薬系、AOD添加2試薬系のそれぞれ3方法とAmerican Association for Clinical Chemistry (AACC)の尿酸グループによりCandidate Reference Methodとして提唱されているUricase-UV法との比較を行った。人工透析患者血清については図7に示すごとく、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に示すごとく、それぞれ0.930、0.957、0.960である。いずれもAOD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AOD反応で処理できない干渉物質の存在が推定できる。

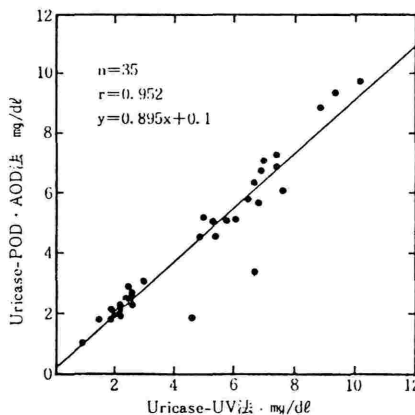
一方、HBOBはCatalaseの存在下でMethanolをFormaldehydeに酸化する。これにアセチルアセトンとアンモニウム塩を縮合反応させて、黄色のピリミジン誘導体を生成することによりUric acidを測定することができる。本法は操作そのものは簡単であるが、発色に長時間を要し、またUricaseを除いた試薬を用いて検体ごとの盲検をとる必要があるため、日常検査法としては普及率は低い。しかし、西ドイツにおいては干渉物質の影響を受けない方法として、Uricase-UV法とともにUric acidの標準法



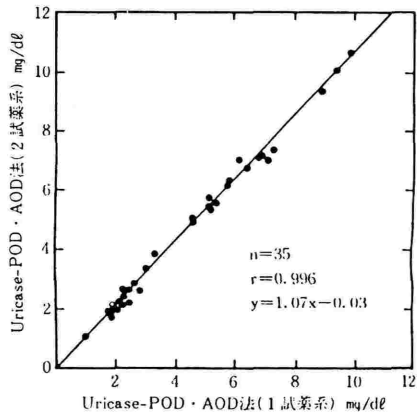
人工透析血清を用いたUricase-POD法とUricase-UV法との相関性



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

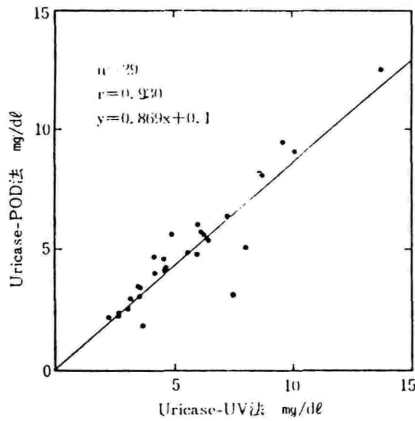


人工透析患者血清を用いたUricase-POD, AOD法(1試薬系)とUricase-UV法との相関性

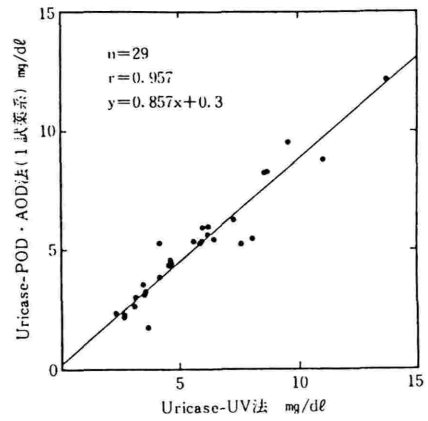


人工透析患者血清を用いたUricase-POD, AOD法(2試薬系)とUricase-POD, AOD法(1試薬系)との相関性

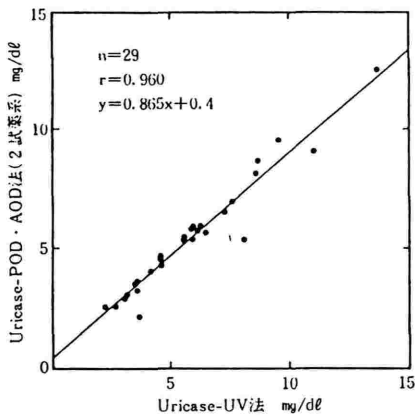
図7 人工透析患者血清のUricase-Peroxidase法による尿酸測定値



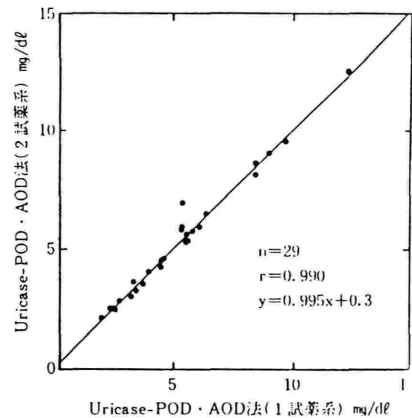
尿サンプルを用いたUricense-POD法とUricense-UV法との相関性



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



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

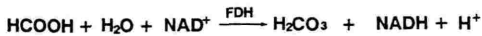
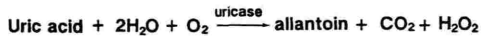


尿サンプルを用いたUricense-POD・AOD法(1試薬系)とUricense-POD・AOD法(2試薬系)との相関性

図8 患者尿のUricense-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。



uricase: *Candida* sp.

catalase: Beef liver

FADH(formaldehyde dehydrogenase): *Pseudomonas* sp.

FDH(formate dehydrogenase): *Pseudomonas oxalaticus*

図9 Uricense-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、Acetoaldehyde 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、Uricense-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

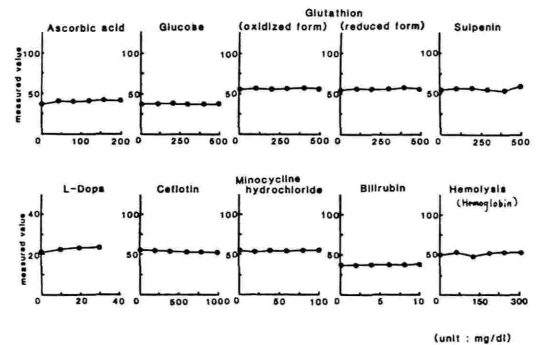


図10 Uricense-Catalase・Aldehyde dehydrogenase法による尿酸測定における各種干渉物質の影響

Uricacid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も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に、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。