

〈原著〉

## ヒト血清中リパーゼ活性測定の常用基準法候補法の改良法（案）の検討

飯塚 儀明

### Modified method of JSCC candidate reference procedure for determination of serum pancreatic lipase activity measurement

Yoshiaki Iizuka

**Summary** The present JSCC candidate reference procedure for determination of serum pancreatic lipase activity measurement must be modified to measure the sample blank for each specimen. Although this method is now regarded as one of the primary reference measurement procedures in IFCC, measurement of the sample blank has been pointed out as a serious drawback of the method. In order to solve the problem, a modified method without the sample blank has been developed and here its effectiveness was studied. As a result, the average sample blank value and SD in terms of lipase activity was 2.6U/L and 5.3U/L, respectively, compared with the present method of corresponding value as 1.6U/L and 16.5U/L among 274 human sera. As a whole, the validity of the modified method was confirmed as SD of sample blank values decreased one third of that of the present method. However, there remained some specimens with sample blank values of 40U/L to the maximum in a particular case even in the modified method. The future challenge is what the cause of the results is.

**Key words:** Serum pancreatic lipase, Candidate, Reference procedure, Commutability

#### I. はじめに

日本臨床化学会（JSCC）は、2004年9月にプロジェクト委員会を設立し、リパーゼ（LIP）活性測定値における施設間差を縮小し、データの共有化を行うために常用基準法を設定する活動を開始した。本年1月に、これまでの成果をプロジェクト報告として、雑誌臨床化学Vol. 41,

2012に「ヒト血清中の胰リパーゼ活性測定の常用基準法候補法」として掲載した<sup>1)</sup>。

一方、本法は、国際臨床化学会連合（IFCC）において、標準操作法の候補法のひとつとして取り上げられているが、検体ブランクの測定が必要であることが最大の問題点として指摘されている。そこで、今回、以下に示したとおり試薬処方改良を試み、その改良試薬を用いて性

つくば臨床検査教育 研究センター、  
つくばi-Laboratory 検査企画部  
〒305-0005 茨城県つくば市天久保2-1-17  
受領日 平成24年11月16日  
受理日 平成24年12月20日

Tsukuba Medical Laboratory of Education and Research,  
Tsukuba i-Laboratory,  
2-1-17 Amakubo, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0005, Japan

能試験を行ったので、その結果を報告する。

## Ⅱ. 試薬改良の概要

JSCC常用基準法候補法の測定原理を図1に、改良法における試薬の終濃度と標準測定操作法の改良点を表1、2にそれぞれ示した。試薬終濃度の主な改良点は、① 基質の溶解性を高めるために、従来法で用いているデオキシコール酸に加え、さらにタウロデオキシコール酸を追加した。② 予め検体と基質を混合させるためにDODG基質をR-1に移し、R-2でコリパーゼ(CoLP)を添加し、反応を開始させることとした。③ 検体ブランク軽減に多少効果の見られた

界面活性剤を選択し追加した。また、標準測定操作法の改良点は、試薬2の添加により反応セル内における温度の低下を軽減させるために、試薬1と試薬2の試薬比を2：1から3：1に変更した。

## Ⅲ. 検討方法

### 1. 測定試薬

JSCC常用基準法候補法（以下従来法）は、同法の調製手順に従って、用時調製した<sup>1)</sup>。従来法の改良法（以下改良法）は、試薬改良の概要で示した表1に従って、用時調製した。なお、改良法による検体ブランク値の大きさを把握する

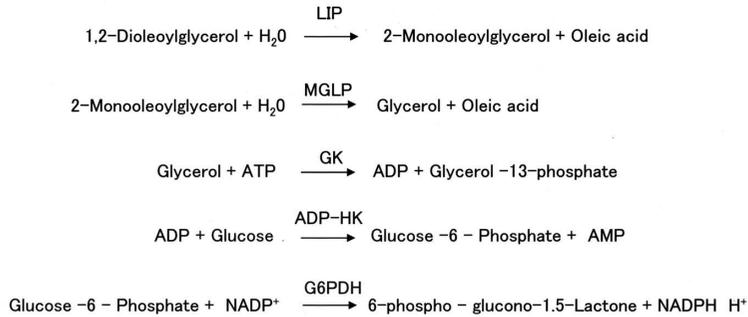


図1 測定原理

表1 試薬の終濃度（改良法）

	試薬Ⅰ (A:B=2:1)		試薬Ⅱ	終濃度
pH	(A) 7.95	(B)	7.95	
Bicine-NaOH緩衝液	75 mM		50 mM	50 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM	3.2 mM		1.8 mM
CaCl <sub>2</sub>	4 mM			2 mM
ATP	4 mM			2 mM
NADP	3.5 mM			1.75 mM
グルコース	3 mM			1.5 mM
DOC	20 mM			10 mM
<u>TDOC</u>	<u>20 mM</u>			<u>10 mM</u>
コリパーゼ			<u>60 U/mL</u>	<u>15 U/mL</u>
MGLP			<u>10 U/mL</u>	<u>2.5 U/mL</u>
GK	3 U/mL			1.5 U/mL
ADP-HK	8 U/mL			4 U/mL
G6PDH	3 U/mL			1.5 U/mL
<u>ジオレイン</u>		5.59 mM		<u>1.398 mM</u>
MES		0.99 mM		0.249 mM
BLAUNON N-510		0.6 %		0.15 %
NIKKOL PBC-34		0.16 %		0.04 %
NIKKOL BT-12	0.1 %			0.05 %
NIKKOL BL-21		0.5 %		0.125 %

ために、試薬 2 の MGLP を除いた試薬系を調製した。

日常検査用試薬キットによる活性値との比較には、以下の 4 社 5 試薬をそれぞれ用いた。

- ① リキテックリパーゼカラー II (ロシュ・ダイアグノステックス)
- ② カイノスオートシリーズ リパーゼ試薬 (カイノス)
- ③ リパーゼカラーオートテストワコー (和光純薬)
- ④ ネスコート VN (アルフレッサファーマ)
- ⑤ ネスコート VL II (アルフレッサファーマ)

検体ブランク値の検討には、以下の 5 試薬をそれぞれ用いた。

- ① リパーゼ試薬 (従来法)
- ② リパーゼ試薬 (改良法)
- ③ TTT : EA テスト TTT 栄研 (栄研)
- ④ TG : アクアオートカイノス TG-II (カイノス)
- ⑤ LDL-C : デタミナー L LDL-C (協和メデックス)

2. 測定装置

今回は、従来法と改良法との試薬性能を確認するために、汎用自動分析装置日立 7700-P モジュールを用いた。なお、測定条件は、従来法と改良法は、それぞれの標準測定操作法に従い、検量係数設定用グルコース (和光純薬社製) を用いて、実測 K ファクターをそれぞれ算出した。日常検査用試薬キットは、各社の標準的な測定パラメーターに従った。

3. 検討方法

- 1) 測定値の精密さ：①繰り返し測定：4 濃度のヒト・プール血清をそれぞれ連続 10 回測定し、平均値、SD、CV (%) をそれぞれ算出した。②ランダムイズ 2 回測定：2~250U/L 以下の患者検体 50 件を用いて、ランダムイズ 2 回測定を行い、標準偏差の期待値  $\hat{\sigma}$  の大きさをそれぞれ算出した<sup>3)</sup>。

- 2) 検出限界：盲検 (生理食塩水) と低濃度域試料 (約 20U/L) を用いて、10 段階の希釈系列を作成し、系列ごとに 10 重測定した。検出限界は、暫定的に盲検値 + 2.6SD の大きさと低値試料の平均値 - 2.6SD の大きさが重ならない試料の平均値とした。

- 3) 測定値の比例性：低濃度域と高濃度域のヒト・プール血清を用いて、10 段階の希釈系列を作成し、系列ごとに 3 重測定し、その平均値をそれぞれ求めた。測定値の比例性の範囲は、暫定的に希釈系列の 3/10 (約 200U/L) のリパーゼ活性値を 100% として、各希釈系列における相対値 (%) をそれぞれ算出し、相対値 ± 5% 以内の大きさとした。

- 4) 共存物質の影響：従来法と改良法の試薬を用いて、干渉チェック (シスメックス) でビリルビン F、C、ヘモグロビンおよび乳び (ホルマジン濁度) の影響を調べた。また、膵障害により脂肪酸エステルを加水分解するカルボキシエステラーゼ (EC 3.1.1.1) が血中に放出される場合があると報告されている<sup>3)</sup>。そこで、ブタ肝由来のカルボキシエステラーゼを生理食塩水に溶解して、従来法と改良法における測定値への影響をそれぞれ調べた。

- 5) 従来法と改良法との活性値の比較：患者検体 274 件を対象として、従来法と改良法とのリパー

表 2 標準測定操作法 (改良前後)

	従来法	改良法
	用手法：MGLP (+) (-)	用手法
検体	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
試薬 I	1,600 $\mu$ L (37°C で 5 分予備加温)	1,800 $\mu$ L (37°C で 5 分予備加温)
試薬 II	800 $\mu$ L	600 $\mu$ L
測定波長	340 nm	340 nm
検量方法	下記のとおり	下記のとおり
計測時間	反応開始後 8.5-9.5 分	反応開始後 8.5-9.5 分

$$\text{LIP 活性値 (U/L)} = \frac{\text{Abs 1/min} - \text{Abs 2/min}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{2.5}{0.1} \times 10^3$$

活性値を比較し回帰分析を行い、相関係数(r)、回帰式 $y=a+bx$ を求めた。また、従来法を基準

として、改良法との差の大きさを算出した。さらに、患者検体245件を対象として、従来法と改良法による検体ブランク値の大きさを比較し、検体ブランク値の平均値、SDおよびCV(%)をそれぞれ算出した。

6) 検体ブランク上昇の要因：患者検体274件を対象として、従来法と改良法による検体ブランク値と血清TTT、血清TGおよび血清LDL-C濃度値を同時に測定して、検体ブランク値が上昇する要因を調べた。

7) 市販試薬キットとの活性値の比較：患者検体274件を対象として、改良法と市販の試薬キットとのリパーゼ活性値を比較し回帰分析を行い、相関係数(r)、回帰式 $y=a+bx$ をそれぞれ求めた。

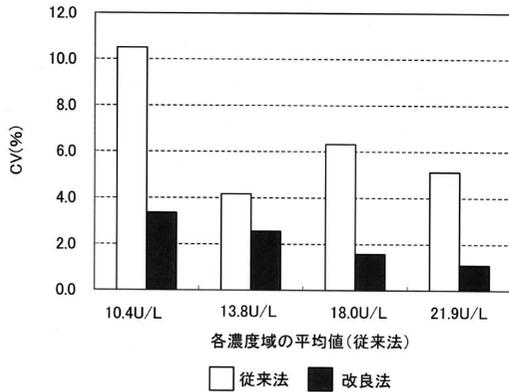
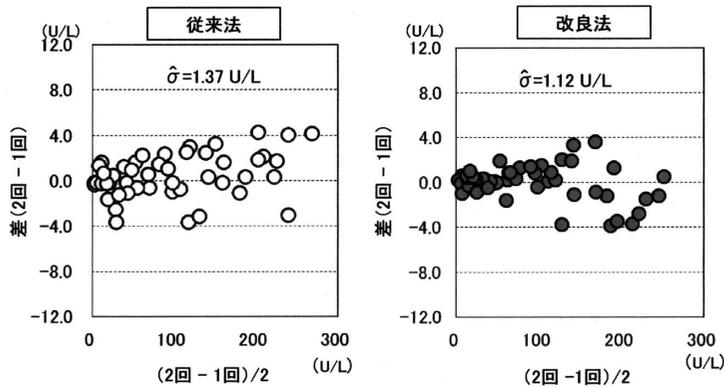


図2 繰り返し測定 (n=10)



—ランダムマイズ2回測定—

図3 精密さの評価

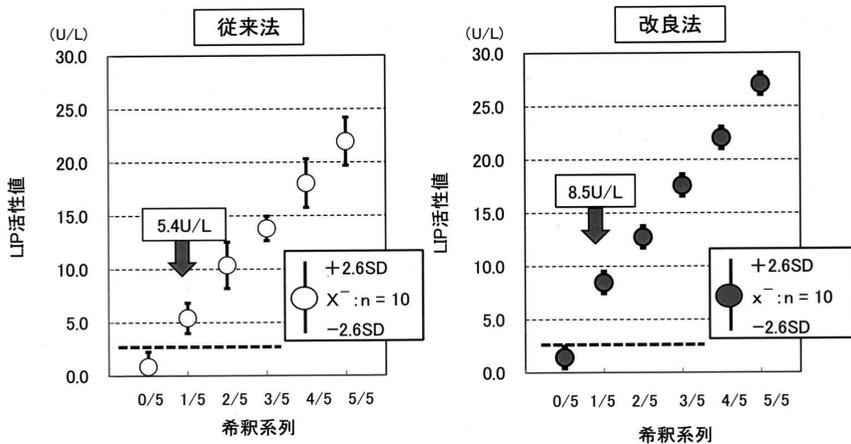


図4 検出限界

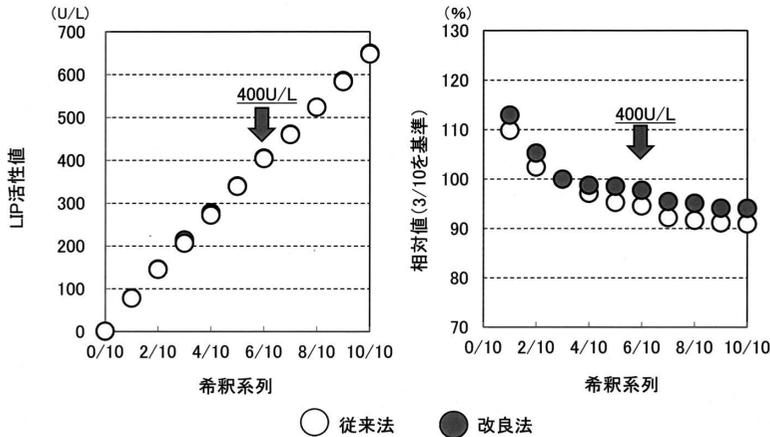


図5 測定値の比例性

IV. 結果

1. 測定値の精密さ

4 濃度のヒトプール血清をそれぞれ連続10回測定した結果を図2に、ランダム2回測定による標準偏差の期待値 $\hat{\sigma}$ の算出結果を図3にそれぞれ示した。その結果、従来法による連続測定では、平均値が10.4U/L、13.8U/L、18.0U/L、21.9U/Lで、CV (%) の範囲は4.2~10.5%であった。一方、改良法による連続測定のCV (%) の範囲は1.1~3.4%であった。

2. 検出限界

生理食塩水と低濃度域試料を用いて、希釈系列を作成し検出限界を図4に示した。その結果、検出限界の大きさは、従来法では5.4U/L、改良法では8.5U/Lであった。しかし、各希釈系列における $\pm 2.6SD$ の大きさは、改良法の方が小さかった。

3. 濃度値の比例性

低濃度域と高濃度域のヒト・プール血清を用いて、希釈系列を作成し活性値の比例性を図5に示した。その結果、活性値の比例性の範囲は、従来法、改良法とも約400U/Lまで確認できた。

4. 共存物質の影響

従来法と改良法の試薬を用いて、干渉チェックによる共存物質の影響を調べた結果、両測定試薬に大きな差は認められなかった。また、ブタ肝由来のカルボキシエステラーゼによる影響

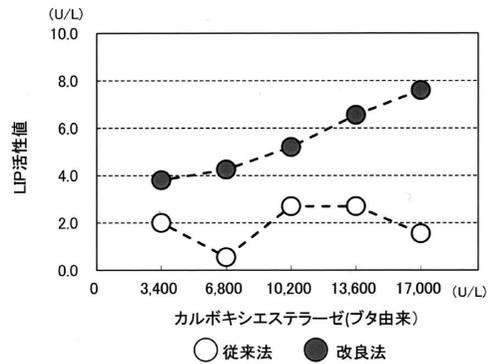


図6 共存物質の影響

の大きさを図6に示した。その結果、改良法によるカルボキシエステラーゼの影響では、カルボキシエステラーゼ10,000U/Lまでは、約5U/L程度の正の誤差であり、実質的に影響を受けないことが確認できた。

5. 従来法と改良法との活性値の比較

患者検体274件を対象として、従来法と改良法とのリパーゼ活性値の比較を図7に、検体ブランク値の大きさの比較を図8にそれぞれ示した。その結果、従来法と改良法との活性値比較では、相関係数 (r) は0.991、回帰式は $y = -4.48 + 0.96x$ であった。なお、従来法で特に検体ブランク値の大きかった6例は、改良法の方がやや高値となった。また、従来法と改良法との検体ブランク値を比較した結果、従来法の平均値は1.2U/L、1SDの大きさは16.5U/Lであったが、改良法の平

生物試料分析

表3 改良法と市販試薬キットの比較

	A法	B法	C法	D法	E法
n	274	274	274	274	274
相関係数 (r)	0.995	0.981	0.983	0.982	0.993
回帰式					
切片 (a)	3.17	-2.26	-3.59	-1.67	6.33
傾き (b)	0.76	0.77	0.77	0.39	0.66

X軸=改良法

Y軸= A法: リパーゼカラーⅡ (ロシュ)、  
 B法: カイノスオートシリーズ リパーゼ試薬 (カイノス)、  
 C法: リパーゼカラーオート (和光)、  
 D法: ネスコートVN (アルフレッサ)  
 E法: ネスコートVL-Ⅱ (アルフレッサ)

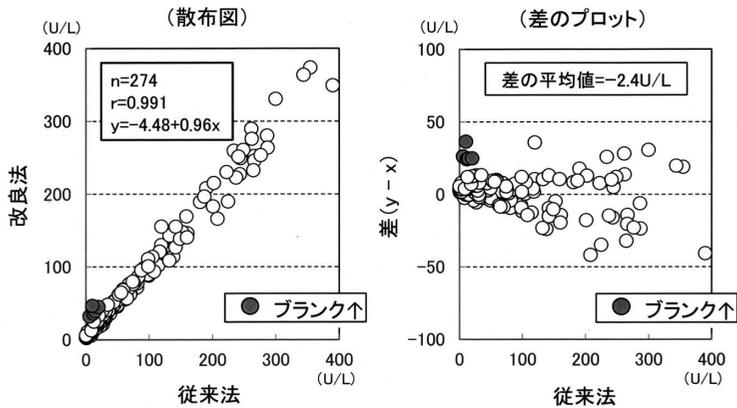


図7 従来法と改良法との比較

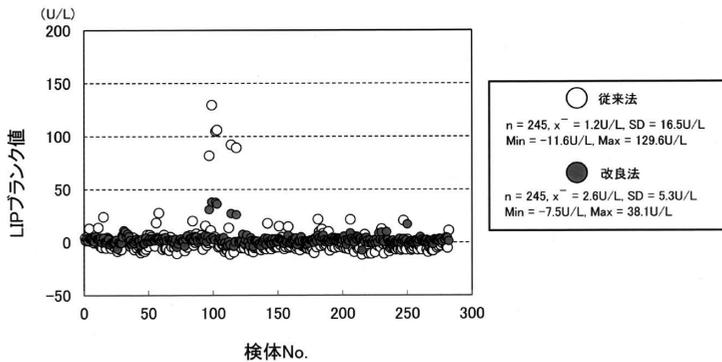


図8 検体ブランク値の比較

均値は2.6U/L、1 SDの大きさは5.3U/Lであった。

値と検体ブランク値には一定の傾向は認められなかった。

6. 検体ブランク上昇の要因

患者検体274件を対象として、従来法と改良法における検体ブランク値とTTT、TG、LDL-C濃度値との関係を調べた結果を図9に示した。その結果、TTT、TG、LDL-Cの3項目による濃度

7. 市販試薬キットとの活性値の比較

患者検体274件を対象として、市販の5試薬キットと改良法とのリパーゼ活性値の比較を表3に示した。その結果、相関係数 (r) はすべて

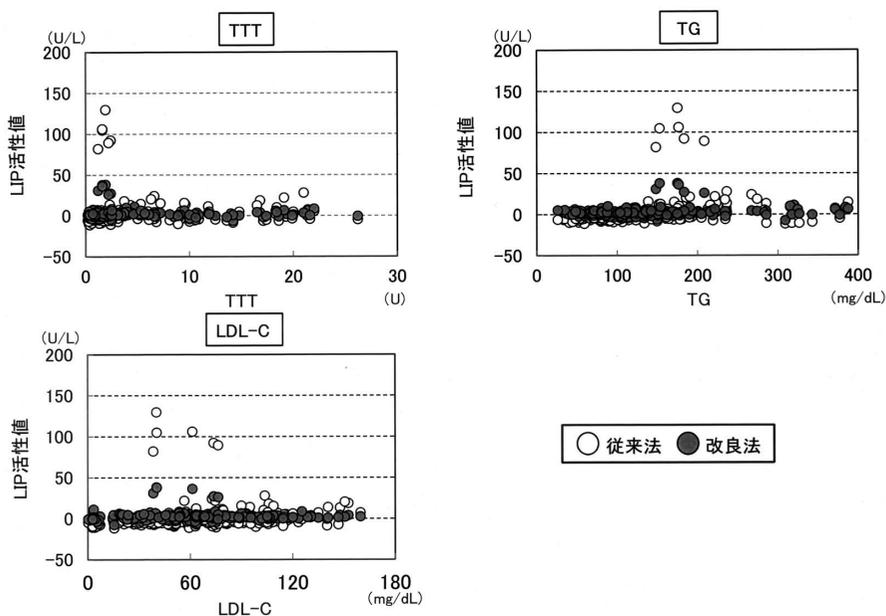


図9 ブランク値上昇の要因

0.98以上であり、回帰式 ( $y=a+bx$ ) のy切片 (a) の大きさの範囲は $-3.59\sim 6.33\text{U/L}$ 、傾き (b) の大きさの範囲は $0.39\sim 0.77$ であった。

### V. 考察

現在、血清リパーゼ活性の測定に用いられている主な方法は、1,2-O-ジラウリル-rac-グリセロール-3-グルタル酸-(6-メチルレゾルフィン)エステル(DGGR)を用いたレゾルフィン比色法<sup>4)</sup>と1,2-ジグリセリド (DG) 基質を用いた酵素共役反応法<sup>5)</sup>の2つである。これらの測定値は、最大で約2倍の試薬キット間差が認められている<sup>6)</sup>。そこで、日本臨床化学会酵素・試薬専門委員会では、2004年に「リパーゼ活性測定の常用基準法の設定」プロジェクトを設立し、血清リパーゼ活性値における施設間差是正のための活動を開始した。この委員会で検討された結果から、脂肪酸種がオレイン酸のみであるジグリセリド、1,2-Dioleoyl glycerol (DODG) を基質とし、検体ブランク値を同時に測定する方法が採用され、2012年に雑誌臨床化学Vol. 41, 2012に「ヒト血清中の膵リパーゼ活性測定の常用基準法候補法」として掲載された<sup>7)</sup>。一方、本法は、国際臨床化学会連合 (IFCC) において標準操作法の候補法

のひとつとして取り上げられているが、検体ブランク値を同時に実施する測定系は、測定操作が煩雑であるなどの問題点が指摘されている。

そこで、まず、従来の常用基準法候補法を、検体ブランク値を用いない測定系に改良することを試みた。

改良法による試薬処方では、基質の溶解性を高めるために、従来法で用いているデオキシコール酸に加え、更にタウロデオキシコール酸を追加するとともに、予め検体と基質を混合させるためにDODG基質をR-1に移し、R-2でコリパーゼ (CoLP) を添加し、反応を開始させることとした。また、検体ブランク値を軽減するための界面活性剤を選択し追加した。さらに、測定操作法では、R-2の添加により反応セル内における温度の低下を軽減させるために、R-1とR-2の試薬比を2：1から3：1に変更した。

次いで、従来法と改良法における試薬性能試験を行い、両者の活性値を比較した。その結果、低濃度域を対象とした繰り返し測定では、従来法に比べて改良法の方がCV (%) の大きさが小さい結果が得られたが、多数の患者検体を用いたランダムイズ2回測定では、両者に大きな差は認められなかった。これらの結果から、活性

値の精密さは、検体ブランク値を差し引く従来法の方が活性値のばらつきが大きくなることが推定された。検出限界の大きさは、改良法に比べて従来法の方が小さい値となった。しかし、希釈系列毎の試料に対する活性値のばらつきは、従来法の方が大きいことと、改良法では、希釈系列毎の濃度幅が広いことなどを考慮すると、検出限界の大きさは、改良法の方が小さくなることが予想された。活性値の比例は、従来法、改良法ともに約400U/Lであり、カルボキシエステラーゼによる特異性も両者に大きな差は認められなかった。従来法と改良法との活性値の比較では、高活性域になるほど両者の活性値に対する差が大きくなる傾向が認められたが、その差は最大で約±30%であった。また、従来法で特に検体ブランク値の大きかった6件は、検体ブランク値を差し引く従来法に比べて改良法の方が高値になった。さらに、従来法と改良法による検体ブランク値を比較した結果、改良法の方が従来法に比べて検体ブランク値の変動の大きさが約1/3に減少し、試薬処方などを改良した成果が確認できた。しかし、従来法で検体ブランク値が80U/L以上の検体では、改良法においても最大で約40U/L程度の検体ブランク値が認められた。そこで、これらの検体ブランク値が上昇する要因を解析するために、TTT、TGおよびLDL-Cの3項目を対象にして、従来法、改良法の検体ブランクにおける活性値と比較した結果、3項目の測定結果と検体ブランク値には、一定の関係は認められなかった。最後に、改良法と市販の試薬キットとの活性値を比較した結果、回帰分析では、相関係数(r)の大きさは0.98以上であったが、回帰式の傾き(b)の大きさは0.4~0.8となり、約2倍の試薬キット間差が認められた。

これらの検討結果から、改良法は従来法に比べて、測定値の精密さが向上したことが確認できた。また、カルボキシエステラーゼによる特異性についての検証も行うことができた。さらに、今回、最大の改良ポイントであった検体ブランク値を必要としない測定系の検討では、従来法に比べて検体ブランク値の大きさが大幅に縮小されると共に、その発生頻度が激減したことが確認できた。しかし、従来法による検体ブランク値が高値の検体では、改良法でも検体ブ

ランク値が認められた。そこで、改良法で検体ブランク値が上昇する要因の解析を行うことが、今後の課題となった。

## VI. まとめ

従来法に比べて改良法は、検体ブランク値が大きく減少する傾向が認められ、一部の検体を除けば検体ブランクなしで測定できることが示唆された。なお、今回、大きな検体ブランク値を示した検体については、その原因解明と対策が今後の課題となった。

## 謝辞

本研究は、つくば臨床検査教育・研究センターの平成24年度研究奨励助成金(TMER奨励/24.1.01)の御支援を頂き実施することができましたことと、本検討実験に際しては、塩尻雅子氏{和光純薬工業(株)}、宿屋 敬氏{(株)カイノス}、出口 篤氏{アルフレッサファーマ(株)}に、多大なるご協力を得たことに深く感謝致します。

## 文献

- 1) 日本臨床化学会酵素・試薬専門委員会: ヒト血清中の膵リパーゼ活性測定の常用基準法候補法. 臨床化学, 41: 72-85, 2012.
- 2) 日本臨床検査自動化学会: 日常検査法の性能試験マニュアル. 日本臨床検査自動化学会会誌, 27(Suppl, 1): 8-49, 2002.
- 3) Panteghini M, Bonora R, Pagani F: Measurement of pancreatic lipase activity in serum by a kinetic colorimetric assay using a new chromogenic substrate. Ann Clin Biochem, 38: 365-70, 2001.
- 4) 松井静代, 渡辺伸一郎, 小山祐康, 横田さゆり, 菊野晃, 北田増和: 新しいリパーゼ測定試薬「リキテックリパーゼカラー」による血清リパーゼ測定の基本的・臨床的検討. 医学と薬学, 41: 489-496, 1999.
- 5) Panteghini M, Pagani F, Bonora R: Clinical and analytical evaluation of a continuous enzymatic method for measuring pancreatic lipase activity. Clin Chem, 39: 304-308, 1993.
- 6) Panteghini M, Pagani F, Bonora R, Alebardi O, Ceriotti F: Diagnostic value of four assays for lipase determination in serum: a comparative reevaluation. Clin Biochem, 24: 497-503, 1991.