

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その17）〉

各論：1. グルコース（血糖、尿糖）－その1－

小川 善資¹⁾、沼上 清彦²⁾、渡辺亜希子³⁾

Summary The number of diabetes patients is steadily rising, and it is said that one in three adults will be affected. Since blood glucose measurement is necessary for diagnosis, a huge number of measurements are made. However, the focus is currently shifting to hemoglobin A1c (HbA1c), which is less affected by meals and gives a good picture of the status of blood glucose control over a long period. Even so, blood glucose measurement is an essential test for early detection of diabetes and to obtain more detailed information. Moreover, we are entering an age in which frequent measurements will be made by individual patients in addition to tests in the hospital. It is also an age in which measurements can be made at a local pharmacy. As a result, many people have become interested in their own blood glucose level. With acquisition of more wide-ranging knowledge and information on diabetes and blood glucose measurements, the position of test specialist may come to no longer exist. However, diabetes is still not completely understood. We need to keep learning as much as we can in reveal new knowledge in the future.

I. 臨床的意義

グルコースは古くから広く測定されており、検査項目名としても、様々な呼称が用いられています。グルコース、血糖値、空腹時血糖（FBS: Fasting Blood Sugar）、随時血糖などです。また、糖には様々な種類がありますが、血中では、グルコース以外の糖は無視できる程度の濃度しか存在しません。

血糖値が高くなるのが糖尿病と捉える方が多いと思いますが、グルコース濃度が不安定な方が糖尿病と考えるべきでしょう。正常な方の場合、食前でも、食後でも変動が少ない、これは血糖が高くなると、全身細胞に取り込まれて、元に戻ります。細胞に円滑な取り込みをさせるのがインスリンで、円滑でなくなった状態が糖尿病です。インスリンは全身細胞に分布しているインスリンレセプターに作用すると、血中グルコースを細胞内に取り込むタンパクGLUT4が血流面（細胞表面）に出現し、グルコースの取り込みが生じて、血糖が低下します。このインスリンレセプターの働きが悪くなった状態（インスリン抵抗性の上昇）が2型糖尿病です。高齢者に多く、糖尿病患者の90～95%が2型です。罹患初期の段階では、正常者より多くのインスリンが分泌されているにもかかわらず、血糖の高値が持続します。一方、インスリンの生産ができなくなるのが1型糖尿病です。いくつもの原因が知られていますが、インスリン投与が必要となることから、インスリン依存性糖尿病（IDDM: Insulin Dependent Diabetes Mellitus）とも呼ばれます。糖尿病には1型、2型以外にも、腎臓の近位尿細管における再吸収能が低下した腎性糖尿や妊娠糖尿病などもあります。

¹⁾北里大学薬学部

〒194-0042 東京都町田市東玉川学園1-9-19

²⁾公益社団法人日本毛髪科学協会

³⁾国立相模原病院

低血糖を引き起こす病態もあります。新生児や小児期に、低血糖状態を長く放置すると、意識障害や痙攣が生じ、最悪のケースでは脳の障害を来すことがあります。新生児期や幼児期の低血糖には注意が必要です。

糖尿病には3大合併症として、腎症、神経症、網膜症が知られています。糖尿病に罹患し、最も早く表れるのが神経障害です。血糖管理状態の良否で相違しますが、腎症と網膜症は罹患10～15年ごろにはほぼ同時に出現します。現在、人工透析を受けておられる患者の半数以上が糖尿病を原因としています。透析治療は大変な苦痛を伴います。しかも、時間を奪われ、大きな負担となります。透析治療受けたくなければ糖尿病に罹患しないこと、糖尿病にかかりたくなければ規則正しい食生活と運動を心がけましょう。

1. 血糖値とその意味

個人差があり、血糖値と症状は一致しませんが、おおよその症状は知っておくべきでしょう。また、血糖は濃度によって、いくつかの臨床的意義があり、それぞれが重要です。臨床的意義は次のようなものです。

- ①糖尿病のスクリーニング検査、診断のための検査
- ②新生児期、小児期における急性低血糖症の発見
- ③糖尿病患者の低血糖の発見
- ④急性糖尿病の発見
- ⑤血糖管理状態の監視

糖尿病を診断する方法は日本糖尿病学会が定めた診断手順があります。日本糖尿病学会ホームページよりご覧下さい。検査としては血糖測定とヘモグロビンA1c (HbA1c) の2つです。

糖尿病に罹患する前に血糖の動態を知るための検査として最も良いとされているのは糖負荷試験(OGTT)です。血糖値が上昇した時に、速やかに血糖を低下させる機能が正しく作動しているかが、糖尿病かどうかの判定になるので、血糖値がピークとなる時間とその血糖値から病態が判断できるためです。しかし、患者にとっては何度も採血されるという負担があり、医療関係者には医療費の抑制から採血回数が3回に限定されるという現実があるため、決して実用的な検査ではありません。これに変わる方法として、食事後60分ないし120分後のグルコース測定が良いとの提案がなされています。しかし、食事の摂取量や時間測定の煩わしさから、実際上は利用されていません。

糖尿病の初期では、症状が小さいことから、多くの患者が「本当に糖尿病かな?」、「診断が正しかったのかな?」と疑問を抱きます。このため、「血糖値がむしろ低いのではないか。」とか、「薬は飲み過ぎではないか。」と疑問を持たれます。糖尿と診断される前の状態か、罹患直後は真剣に糖尿病と向き合い、深刻な合併症発症の阻止が重要であることを知っていただく必要があります。

表1 血糖値と症状

血糖値 (mg/dL)	症 状
50 以下	痙攣 (新生児や小児の場合、処置遅延で脳障害)、意識障害
60~100	基準範囲
126	診断基準の上限值
170~180	閾値 (腎臓における再吸収限度濃度)
200	随時血糖上限値
300	運動後の立ち眩み、喉の渇き、下痢
400	頭痛
600	意識障害

多くの患者は視力障害が発生して初めてその重要性に気付くと言われています。

血糖降下薬は食事摂取しないまま服用すると、血糖値が低下してしまい、意識障害を起こすことがあります。この状態で、自動車の運転をされることはとても危険です。糖尿病の方は低血糖にも十分注意を払う必要があるのです。

最近の糖尿病患者は自己測定装置をお持ちです。正しく測定し、管理することが重要です。しかし、必ずしも正しい測定が実施されているか疑問です。データを見せていただくと、20とか30 mg/dLと書かれています。100 mg/dLの桁にあった数値を消去していたのです。患者には測定に関する疑問、測定値に関する質問があると思います。適切に指導し、正しい測定値を得られるように導くのが、専門家である臨床検査技師の仕事だと思えます。

血糖値と症状を簡単に示しました（表1）。50 mg/dL以下では痙攣を起こしたり、意識障害が発生する濃度です。一方、高血糖（600 mg/dL以上）でも意識障害が発生します。低血糖、高血糖の場合、迅速に主治医へ連絡することが重要です。このためには再検査などをする前に、まず、迅速な報告が求められます。40～1,000 mg/dLの範囲は常に測定できるよう万全の体制を整えておくべきです。尿糖に関しては溶解限界の8,000 mg/dLまで到達することがあります。

1-1. 糖尿病診断基準（日本糖尿病学会）¹⁻³⁾

1) 糖尿病型の判定

静脈血漿値で、空腹時血糖値 ≥ 126 mg/dl、75g OGTT 2時間値 ≥ 200 mg/dl、随時血糖値 ≥ 200 mg/dlのいずれかが上回っている。またはHbA1c $\geq 6.5\%$ である場合、糖尿病型と判定します。

2) 糖尿病の診断

① 別の日に行った検査で2回以上糖尿病型と認められれば糖尿病と診断できます。ただし、HbA1cのみの反復検査による診断は不可です。

② 同一採血で、血糖値とHbA1cの両方が糖尿病型を示す場合、糖尿病と診断してもよいとされています。

③ 次の条件のうち一つある場合、血糖値が糖尿病型を示していれば、1回の検査だけでも糖尿病と診断できます。

ア) 糖尿病の典型的症状（口渇、多飲、多尿、体重減少）の存在

イ) 確実な糖尿病網膜症の存在

1-2. 基準範囲とパニック値（表2）

基準範囲は施設によって相違しますが、一般的に下記のような範囲を設定されていることが多いと思います。パニック値は診療医との間で相談し、各施設で設定すべきです。ここでは一般的な数値を記述しておきます。

新生児の場合、元々低血糖（60 mg/dL程度）であるため、パニック値になる可能性が高くなります。もちろん、小児の低血糖においても、早急な報告が必要です。適切な処置は後遺症を残しません。医師への迅速な報告が望まれます。

表2 基準範囲とパニック値

基準範囲	60～100 mg/dL
パニック値	50 mg/dL以下、500 mg/dL以上

2. 濃度によって求められる再現性

臨床検査において実施されている測定は標準物質を用いる相対分析法が主体であるため、正確度

は標準物質に依存し、検量線の直線性さえ確保できていれば（高濃度試料に吸光度チェックで確認可）、正確性は十分確保されています。そのため、ここでは議論せず、再現性についてのみ記述します^{4,5)}。

2-1. 低血糖領域

40～60 mg/dLの測定値が出た場合、主治医に速やかに報告することが肝要です。このため、再測定することなく、即座に報告できる準備しておく必要があります。この濃度領域では常に1.0 mg/dL差を正しく測定できるように整備しておく必要があります（40 mg/dLで考えると、CVが2.5%程度と推定できるからです）。この精度が守れているかを管理できていれば十分臨床の要望に応えられます。具体的には40 mg/dL付近の管理試料を測定し、±1.0 mg/dL変動することは許されますが、±2.0 mg/dLになった場合は、原因究明プログラムを作動させなければなりません。

基準範囲に入る血清を精度管理試料として分析することが一般的かもしれませんが、基準範囲内の濃度は分析の問題が発生しにくい濃度です。問題点を発生し易い濃度で精度管理の方が有効です。低濃度領域ではキャリーオーバーやピペッチングに関する問題の検出に有利です。40～60 mg/dLの血清の測定を勧めます^{6,7)}。なお、管理図は吸光度で記述すべきです。

2-2. 随時血糖上限値付近

空腹時血糖値が126 mg/dLと割り切れない数値になっている理由は国際的基準である、7.0 mmol/Lを基準にしたためです。一方、判定基準に随時血糖200 mg/dLとありますが、この意味はいかなる時でも採血された検体は200 mg/dL以下でなければならないということです。糸球体において分子量わずか180のグルコースは全て通過します。しかし、通過したグルコースは普通全て再吸収されます。その吸収能力が腎臓における閾値で、170～180 mg/dLと考えられています。このことは血糖値が180 mg/dL以上になれば尿中にグルコースが出てきてしまうことを意味します。血糖値がこの濃度を超えないように管理されています。これを超えてしまうということは血糖管理が上手く作動していない、いわゆる糖尿病と考えられます。このため、監視すべき濃度は180 mg/dLとすべきですが、もう少し余裕を持たせて、200 mg/dLと設定されました。食事の影響を含めた（空腹時という枠組みの中で）生理的変動幅を4.0%とすると、約8.0 mg/dL変動が生じうると考えるべきです。次に、分析に与えられる変動（誤差）は、正確度からのズレと再現性を合計した誤差が残された範囲内（ $20 - 8 = 12$ mg/dL）でなければならないと規定されているのと同じです。よって、測定精度は最低でも6.0%以内を守らなければならないと考えます。しかるに、その2倍の精度3.0%を目標とすべきでしょう。医療関係者に提示するための精度管理試料としては126～200 mg/dLの試料の測定を勧めます。分析関係者以外の医療関係者に公示する管理図はこの濃度が適切です。このため、管理図は測定値にて記述すべきです。なお、180 mg/dLの管理血清を用いたとするなら、±5.0 mg/dL内に入れる必要があります。

2-3. 測定上限付近の精度

500 mg/dLを超える検体が提出される頻度はそれほどないと思います。各自の施設でパニック値が設定されていると思いますが、パニック値を40%程度超える濃度までは再検査することなく、速やかに報告できる準備をしておくべきです。医師はこの濃度に到達すると、精度の良い測定値より、より迅速な報告を希望すると思うからです。専門医との意見交換によって、測定上限と精度を決めておくべきだと思います。再現性は5.0%以内が守れれば十分でしょう。ただ、この高濃度試料の測定が試薬の異常、分析機器異常やサンプリングの問題などを最も発見し易い測定値です。また、検量線の直線性が保たれているかをチェックするためにはこの濃度域の試料の吸光度によるチェックが有効です。理論的に得られるはずの吸光度が±5.0%以内に入っているかをチェックすべきです^{6,7)}。

管理図は吸光度で記述すべきで、 ± 5.0 mg/dLに相当する吸光度を限界とするのがよいでしょう。

2-4. 分析の観点からの再現性

ヘキソキナーゼ (HK) 法やグルコースオキシダーゼ (GOD) 発色法など、吸光度測定から濃度を求める場合を考えてみましょう。使用する分光光度計の吸光度測定範囲を0.01から3.0とし、10%以下の再現性で測定できる吸光度 (吸光度測定の分析分解能) を0.001とすると、この分析機で測定できる段数は2,990段 $((3.0 - 0.01) / 0.001)$ となります。測定上限を900 mg/dLにすると、測定下限は約30 mg/dL、分析分解能は0.3 mg/dLと推定できます。S/N比の考え方に従うと、0.03 mg/dLがノイズレベルとなります。200 mg/dL付近では吸光度測定による再現性は誤差範囲で、分析装置や試料の持つ固有語差が支配的になると考えられます。一般的に、自動分析装置による誤差は3.0%より小さいので、要求される精度で、十分に達成できると考えられます。

II. 測定前の注意点

1. 解糖阻止剤

血糖測定において、採血直後に解糖阻止剤を添加することが基本です。血球が生命維持のため、グルコースを消費するからです。解糖阻止剤を添加しないと、おおよそ15 mg/dL/時の速度で、測定値が低下します。解糖阻止剤として、NaF, KFやモノヨード酢酸が用いられていますが、この作用点はエノラーゼとされています。グルコース代謝の初発の酵素を阻害するのではないことから、添加直後に解糖反応は停止されません。添加後、徐々に低下し、約60分後に停止します (Fig. 1)。

一方、尿糖の測定においては、サンプル中のグルコース濃度を変化させないように保持することはとても困難です。施設によっては蓄尿し、1日排泄量を求めることがあります。しかし、グルコースは多くの細菌類のエネルギー源として用いられるため、濃度を安定に維持できません。実験結果では病棟手洗いに、室温で、30分放置すると2,000 mg/dLもあったグルコースが全く検出されないレベルにまで低下することがありました (感染症の問題や落下細菌の問題のため、一定の速度で低下するものではなかった)。尿量が確定しない採尿前に多くの防腐剤を添加しなければならないため、経済的負担が大きく、とても現実的ではありませんでした。解決策は、新鮮尿を用いて患者自身が病棟にて測定してもらうことでした。

2. サンプルカップの蓋

測定精度が上昇しているため、サンプルカップを開口した状態にて分析まで放置すると、濃縮され、測定値の上昇が観察された。1時間の放置で2~3 mg/dL上昇することもありました。

3. 混濁の影響

混濁の問題は2つあります。1点目は、サンプルの有する混濁で、測定試薬の多くはサンプルの濁度を減少させる工夫が施されています。しかし、一定の時間内に濁度が完全に解消され

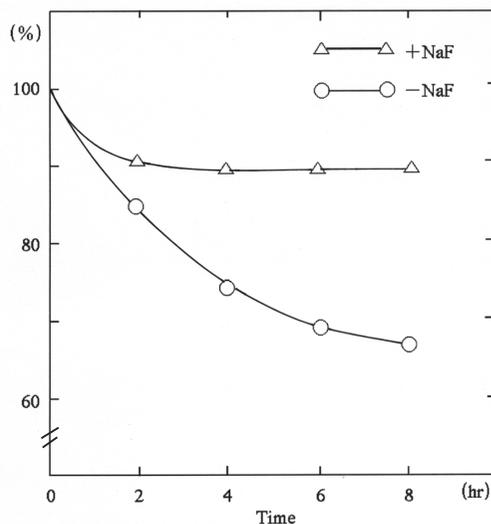


Fig. 1 Time-course of glucose concentration after the collecting blood addition or non-addition of NaF.

なかった場合は、影響を受けることがあります。これは、リポプテインの上昇、不溶性薬物摂取や寒冷凝集素が原因です。2点目の問題は、吸光度検出法によって正誤差になったり、負誤差になったりすることです。エンドポイントにて一度の吸光度測定で分析する場合、濁度は正誤差になります。ところが、試薬2添加前とエンドポイント到達時に2回目の吸光度測定を行い、その差で濃度を求める場合には濁度の減少は負の誤差となります。

Ⅲ. 測定方法

1. ヘキソキナーゼ (HK) 法

U.S. Department of Health, Education and Welfareからreference methodとして勧告され、日本においても勧告法として認定されています^{8,9)}。

酵素活性を測定する場合には「至適条件にて反応させること」がIUBによって勧告されていますが、物質濃度を求める測定方法においては、至適条件にて測定しなければならないという勧告はなされていません。しかし、酵素は一般的に100%精製されている訳ではなく、また、酵素自身が副反応を触媒することもあるため、酵素を過剰添加すると特異性が侵害されることにもなります。このため、至適条件にて反応させ、なるべく少ない酵素添加活性で、より短時間に反応を終了させ、測定することが特異性向上のため望まれているので、酵素反応の至適条件を検討する必要があります。

1-1. 測定原理

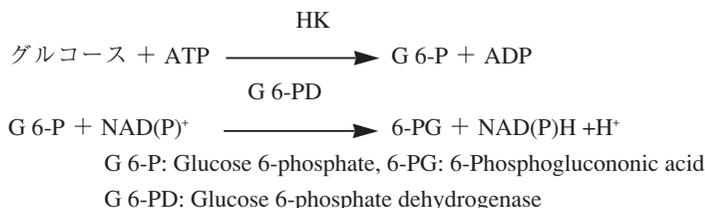


Fig. 2 Principle of glucose assay with hexokinase method.

HK法の測定原理はこの様に記述されていることが一般的です (Fig. 2)。しかし、G6-PD反応は次のように2段階の反応が生じており、2段階目は非酵素的に進行します (Fig. 3)。このため、測定系全体で考えると、逆反応が生じません。よって、化学平衡はなく、この測定法が勧告法に選択されている一つの理由でもあります。End point assayで、化学量論的にNAD(P)Hが産生されることが証明されています。

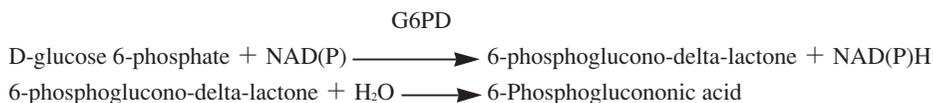


Fig. 3 G6-PD reaction and continuously reaction by non-enzymatic reaction.

また、HKはヘキソース環に対する特異性があるため、グルコース以外のヘキソース環を有する糖類にも反応します。具体的にはフルクトースに対して作用します。このため、特異性を取り上げる方がおられますが、ヒト血清を測定対象にする場合、フルクトースは検出できる濃度存在しません。この様に言い切れる理由はフルクトースの細胞膜透過性が低いからです。

1-2. 反応の至適条件¹⁰⁾

1) 緩衝液

中性付近で緩衝能を有するGood緩衝液のBES、TES、HEPESやトリシンおよびTrisaminomethane (Tris) 緩衝液、Triethanolamine緩衝液についてHK-G6PD反応の活性について検討を加えたが、TrisとTriethanolamine緩衝液が最も高い活性を示した。そこで、2種の緩衝液のpHと活性の関係をFig. 4に示しました。Triethanolamine緩衝液では、pH 8.2の活性が最も高かったので、pH 8.2の2種類の緩衝液の濃度と活性の関係を調べました (Fig. 5)。Triethanolamine緩衝液の場合100 mmol/L付近が最も高活性でした。

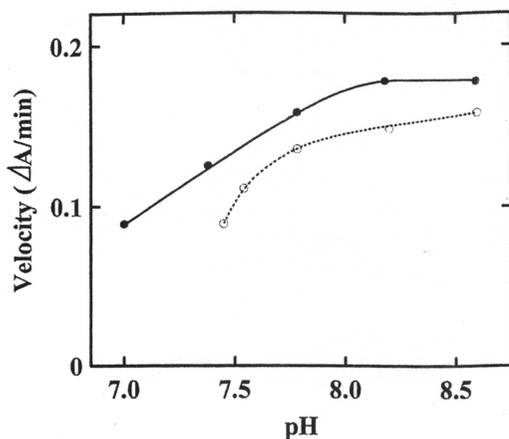


Fig. 4 Optimum pH for the HK reaction. Hexokinase activity was measured by the method described in Materials and Methods; 100 mmol/l Tris-HCl buffer (○—○) and 100 mmol/l triethanolamine buffer (●—●).

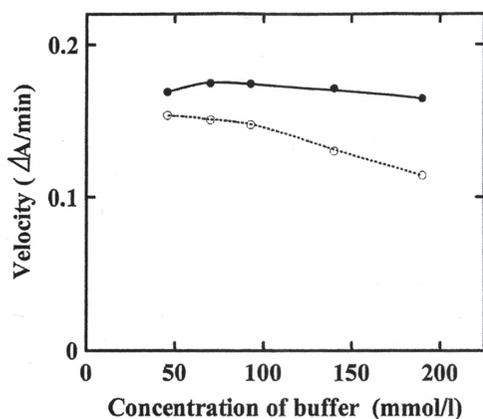


Fig. 5 Optimum conditions of buffer for the HK reaction. Tris-HCl buffer, pH 8.2 (○—○) and triethanolamine buffer (●—●).

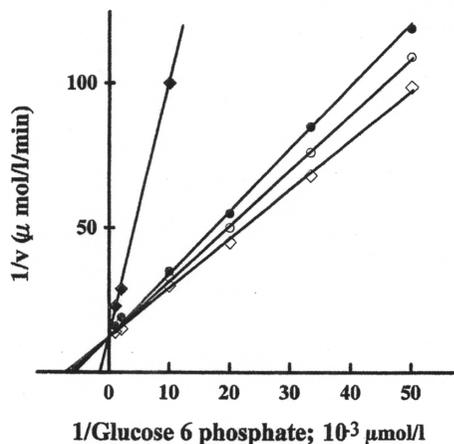


Fig. 6 Lineweaver-Burk plots of glucose 6-phosphate dehydrogenase (from *L. mesenteroides*) with 0, 1, 2, 8 mmol/l ATP concentrations. No addition of ATP (◇—◇), 1 mmol/l ATP (○—○) 2 mmol/l ATP (●—●) and 8 mmol/l ATP (◆—◆).

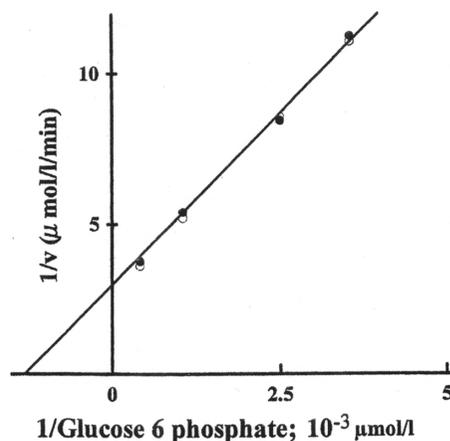


Fig. 7 Lineweaver-Burk plots of glucose 6-phosphate dehydrogenase (from Yeast) with 8 mmol/l (●—●) and without ATP (○—○).

2) NAD(P)とATP

G6-PDの由来によって要求する補酵素の種類が相違します。Yeast由来はNADPを要求し、Leuconostoc mesenteroides (*L. mesenteroides*) 由来はNADPでもNADでも作用します。また、*L. mesenteroides*由来はATPによって競合阻害を受ける (Fig. 6) のに対して、Yeast由来は阻害を受けませんでした (Fig. 7)。ATP濃度とHK活性の関係を調べたところ、ATPの至適濃度は1.0 mmol/Lでした (Fig. 8)。

3) 酵素添加量

2種の酵素活性を高くすればする程、反応終了までの時間は短くすることができます。しかし、最も効果的に2つの酵素を使用すべきであるため、2つの酵素が共に1次速度定数に従うとして、速度論的解析を行った。HK反応の一次速度定数を k_1 、G6-PD反応の一次速度定数を k_2 として、2つの連続反応の結果、生成する物質Cを求める式を立式すると次のようになります。

$$C = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot A_0}{k_2 - k_1} \{k_2 (1 - e^{-k_1 t}) - k_1 (1 - e^{-k_2 t})\} \quad \text{式 1}$$

酵素の反応曲線が最大となる点の変曲点で、変曲点の反応速度で濃度を求めることができます。変曲点とは式1を2回微分した時点なので、この式を2回微分し、反応速度が最大となる点を求めると次式となります (電極法にてグルコースを求める装置が使用されているが、この測定点を求める式と同様)。

$$t_{\max} = \ln \frac{k_1}{k_2} \quad \text{式 2}$$

式2を作図したものがFig. 9です。酵素量を最小限で最も効果的に反応を終了させるのはこの曲線の接線が最も大きくなる条件時で、 $k_1 = k_2$ となる点でした。我々の用いた両酵素の場合、具体的に

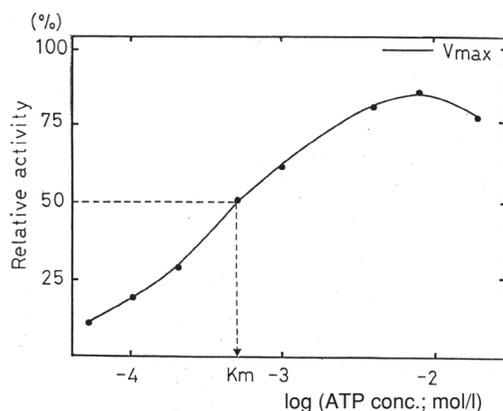


Fig. 8 Optimum concentration of ATP on hexokinase reaction.

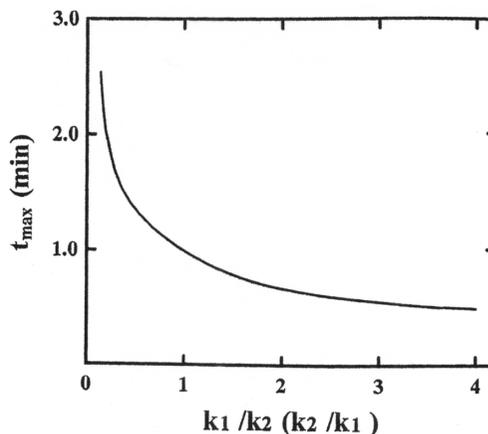


Fig. 9 Relationship between the ratio of reaction constants (k_1/k_2) ratio t_{\max} . The relationship of the ratio of the two first order reaction constants, the first order reaction constant of the HK reaction (k_1) and the G6PD reaction (k_2), and the time of the most reactive point, the second differential value becomes 0 shown in this Figure.

はHK 747 U/L、G6-PD 287 U/Lの添加で、4分以内に反応を終了させることができました。

4) その他添加試薬

① Mg添加量

HK活性にMgの存在が必要です。MgCl₂濃度とHK反応速度の関係をFig. 10に示したとおり、4.0 mmol/Lが至適濃度でした。

② NH₄SO₄の混入

酵素原料として硫酸アンモニウム（硫安）懸濁液を用いることがありますが、SO₄アニオンはHKの阻害剤です（Fig. 11）。このため、両酵素とも硫安懸濁液を用いないことをお勧めします。

③ EDTA添加

HKおよびG6-PDの安定性にEDTA添加は不可欠です。

1-3. 測定操作法

臨床医の要望、検査技師の要望、守らなければならない測定精度と使用する分析装置の限界などを考慮し、具体的にどの様な分析システムを組み立てるべきか記載したので、参照して下さい¹²⁾。

1-4. 問題点

1) 測定酵素中に存在するNADH減少反応

1970年代、国内的にも国際的にも、サーベイにおいてHK法の測定値は他のいかなる測定方法の平均値より低値でした。低値の理由は特異性の高さに由来すると説明されていましたが、この試薬にNADHを添加すると、持続的な吸光度低下が観測されたのです。世界中で市販されているHKとG6-PDの調査を進めると、全ての酵素にNADHを持続的にNADに変化させる活性が存在しました（Fig. 12）。試薬中にはNADHが存在しないため、吸光度変化は観測されませんでした。NADHを添加すると、この活性が観測されました。当然、グルコース定量反応においても、一度形成されたNADHの吸光度が経時的に減少するのが観測されました。実はこの減少がHK法の測定値を低値にする原因であったのです。現在はこの活性のない酵素が供給されています。

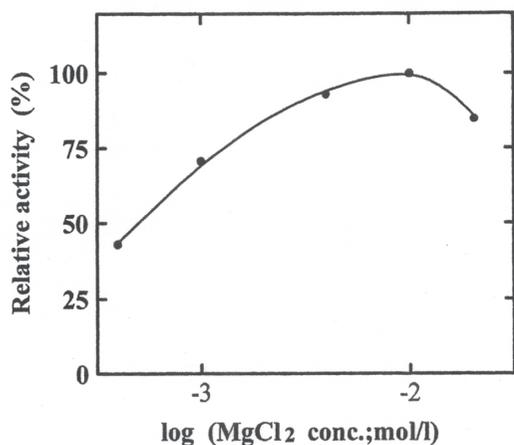


Fig. 10 Optimum concentration of MgCl₂ in the HK reaction.

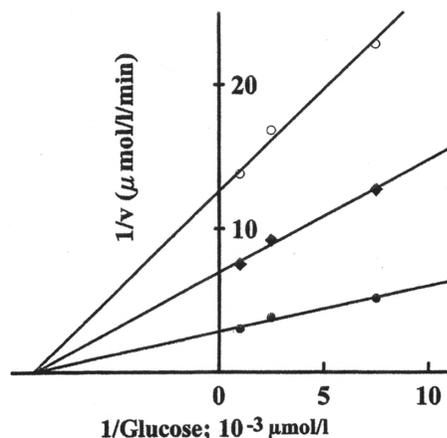


Fig. 11 Lineweaver-Burk plots of hexokinase with 0, 2, 8, mmol/l SO₄²⁻ anion. No addition of SO₄²⁻ (○—○), 2 mmol/l SO₄²⁻ anion (◆—◆) and 8 mmol/l SO₄²⁻ anion (●—●).

2) 検体の持つ吸光度の問題

この方法の一番の問題点は、340 nmにおける吸光度測定にあります。試薬2添加前の吸光度を測定し、エンドポイント到達後2回目の吸光度を測定して、この吸光度差からグルコース濃度を求めています。発色反応を用いる場合、検体が吸光度を示さない波長に発色させ測定できるため、エンドポイントにおける1回の吸光度測定で定量できますが、340 nmには複数の物質が吸光度を有するため、2回の測定が不可欠です。ここで測定誤差を発生させる原因は、この2回の吸光度測定の間NADH以外の吸光度変化が発生すると測定誤差を引き起こすためです。340 nmにて吸光度を有する

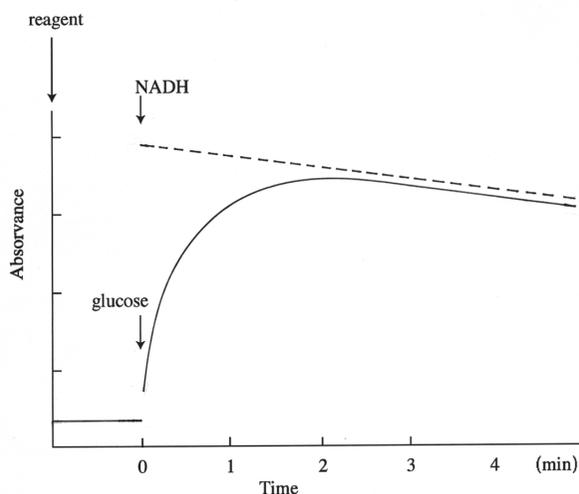


Fig. 12 Time-course of blank reaction (- - - - -) and assay reaction (———) with same reagent.

表3 各種測定法による特異性の比較

各種類似物質	HK法	GOD法	GOD×10	GDH法
Glucose	100	100	100	100
D-Mannose	0	0	0	0
Galactose	0	0	0	0
Fructose	6	0	0	0
2-Deoxy-glucose	5	17	61	131
D-xylose	0	0	0	0
D&L-Arabinose	0	0	0	0
Maltose	0	2	11	0
Saccharose	0	0	0	0
Glucosamine	0	0	0	7
Glutathione	0	0	0	0
Glucose 6-P	100	0	0	0
Fructose 6-P	0	0	0	0
Galactose 6-P	0	0	0	5
Fructose 1,6-P	0	0	0	0
Glucose 1,6-P	0	0	0	0

物質はビリルビン、ヘモグロビンや濁度に由来する吸光度が主としたものです。

3) 試薬の安定性

HKとG6-PDの両酵素は安定な酵素とは言いがたい点です。多くのメーカーは独自の有効な安定剤を添加しています。しかし、サンプル中に安定化に逆行する添加物が混入していないかが気になる点です。試薬チェック方法に記した方法でチェックしていただきたいと思います。

4) 基質特異性

測定原理の項にも記述しましたが、測定対象物質中にグルコースに近似する糖類が測定誤差範囲以下の濃度しか存在しないため、基質特異性を取り立てて問題にすることはありません。しかし、近年、点滴としてグルコース以外の糖類（マルトースなど）が投与されることがあり、注意が必要です。基質特異性のデータは表3（その2に記載）に示しました。

5) 干渉物質

最も深刻な影響は、乳酸デヒドロゲナーゼ（LD）反応です。解糖阻止剤が添加されているため、乳酸は試料中にさほど産生されていないと思われませんが、検体中にLDと乳酸が必ず存在し、その活性や濃度が患者によって大きく相違します。また、NADも存在し、pHが8.2であることより、NADH増加反応が進行する可能性があります。この心配を排除する目的でNADPを用いたり、LD阻害剤（オギザミン酸等）を添加する方法があります。しかし、試薬2添加前の吸光度変化をチェックし、この問題だけでなく、検体由来の様々な干渉反応が生じていないことを確認の方が有効です。

1-5. 試薬チェック法

1) NADHを消去する活性

試薬1と試薬2を混和し、ここにNADHが終濃度で0.16 mmol/Lとなるように添加します。吸光度減少反応がある場合は、試薬を変更して下さい（Fig. 12）。許容範囲は各施設で設定すべきです。1.0 mg/dL以下の誤差に設定するなら、1.0 mg/dLとなる吸光度変化量計算にて求め、さらに、反応時間が5分であるなら、その1/5以下の変化量として下さい。

2) 酵素安定性に関するチェック法

酵素活性が低下すると反応曲線が変化します。これを観察するとどちらの酵素が失活しているか判定することが可能です。もちろん、活性測定を行うとさらに正確に掌握することができます。HKの活性が低下した場合と、G6-PDの活性が低下した場合で、グルコース測定反応の反応曲線は変化します。精度管理法の項に詳細を記述しましたので、参照して下さい。

1-6. 精度管理法

精度管理には2つの目的があります。分析担当者が使用している試薬や分析機器の問題点をより早く察知し、患者血清測定には決してトラブルを発生させないことが一つの目的です。これとは別に、報告している測定値がどの程度の揺れを持っているか、測定値を利用いただいている方々に開示するためです。大きくはこの2つの目的で管理図を作成しています。

1) 分析担当者用管理図

① 試薬ブランク吸光度チェック^{6,7)}

試薬に劣化が生じると試薬に色調変化が発生することが多くあります。試薬の変化をより早く察知することを目的に試薬ブランクの吸光度チェックを実施します。

② 標準物質の吸光度チェック^{6,7)}

標準物質の吸光度チェックは、日常検査の正確度を端的に、しかも、リアルタイムにチェックできる方法として推奨します。測定値に変換すると様々な問題を隠してしまうため、必ず吸光度にてチェックし、理論的に得られるはずの吸光度と比較し、作図します。標準物質としてはCRMや様々なクライテリアの商品が市販されています。CRMは日常検査で使用するには経済的問題が発生するため、一般に市販されている物を使用することを想定しています。しかし、試薬変更、標準物質のロット変更などの折にはCRMを同時に測定し、比較すべきでしょう。

③ 管理試料の吸光度チェック^{6,7)}

標準物質の吸光度チェックと同様、管理試料の測定される吸光度チェックと作図を推奨します。異常検出時にはトラブルシューティングに従い、問題点の発掘と対処策を考案しなければなりません。

④ 試薬 2 添加前の吸光度変化量チェック

測定試料の異常によって、測定値が左右されていないかをチェックするために実施します。許容範囲を定め、必要に応じて、対処策に従い、問題のない測定値に導きます。

⑤ エンドポイント吸光度測定時における吸光度変化量のチェック

測定試料の問題と試薬異常を個々の検体測定でチェックする方法です。試薬ブランク、標準物質や管理試料の測定により、試薬の異常を検出できますが、患者個々の測定値に異常が発生していないかを検出する方法です。

2) 医療関係者用管理図

分析に関わらない、測定操作法を理解していない医療関係者に、吸光度変化を披露しても、理解していただくことは不可能です。このような場合は、全ての分析作業を経た後に算出された報告値が、どの様な変化で報告されているかを表現します。従来、広く用いられていた管理法が既に医療関係者に理解されており、見方も理解されやすいので、最適と思います。また、管理試料としては150~200 mg/dLの血清を用いるべきだと思います。

引用文献 (1)

- 1) Kosaka K, Kuzuya T, Yoshinaga H et al: A prospective study of health check examinees for the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus: relationship of the incidence of diabetes with the initial insulinogenic index and degree of obesity. *Diabet Med*, 13: S120-S126, 1996.
- 2) 小坂樹徳, 赤沼安夫, 後藤由夫 ほか: 糖尿病の診断に関する委員会報告. *糖尿病*, 25: 859-866, 1992.
- 3) The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes cCare*, 20: 1183-1197, 1997.
- 4) 小川善資: x-R管理法は分析機器や試薬の異常を見つけられない. *生物試料分析*, 34: 359-363, 2011.
- 5) 小川善資: 日常検査としての相対分析法のメリット、分析機器試薬アナリストのためのWeb勉強会. 1, 2011.
- 6) 小川善資: 新しい精度管理法の提案(その1). *生物試料分析*, 35: 347-357, 2012.
- 7) 小川善資: 新しい精度管理法の提案(その2). *生物試料分析*, 35: 431-439, 2012.
- 8) Neese J W, Duncan P, Bayse D, Robinson M, Cooper T, Stewart C: Development and evaluation of a Hexokinase/Glucose-6-phosphate dehydrogenase procedure for use as a national glucose reference method. U.S. department of health, education, and welfare, 1976.
- 9) 試薬専門委員会: 血清グルコース測定報告法 臨床化学報告法総集編. *臨床化学*, : 116a-123a, 1991.
- 10) Ogawa Z, Kanashima M, Nishioka H: Improvement of the quantitative method for glucose determination using glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Clin Chem Lab Med*, 39: 396-400, 2001.
- 11) 小川善資, 沼上清彦: エンドポイント法による物質定量法の分析システム構築法—臨床医と検査技師双方の要望を取り入れた分析システム構築法—. *生物試料分析*, 37: 364-378, 2014.