

〈特集〉

IFCC対応試薬「シグナスオート ALP IF」について

田中 利輝、中尾 友作、飯塚 直美、芳村 一

Evaluation of CYGNUS AUTO ALP IF, which has improved on-board stability.

Riki Tanaka, Yusaku Nakao, Naomi Iizuka and Hajime Yoshimura

Summary The Japan Society of Clinical Chemistry (JSCC) has decided to change the method for measuring alkaline phosphatase (ALP) activity from the conventional JSCC reference method to the same measurement condition as the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) primary reference procedures. This change implies that activity values will be approximately one-third of those obtained by the conventional JSCC transferable method, and, in particular, the reactivity with small-intestine-type isozymes will decrease. Therefore, we have developed CYGNUS AUTO ALP IF, which has excellent commutability with the IFCC method.

Reagents for ALP activity measurement are often associated with the problem of lowered on-board measurements. A decrease in reagent pH value is a cause of this problem. Our investigation revealed that a change in reagent pH value is not the sole cause of lowered measurements. To reduce the influence on activity values, we developed CYGNUS AUTO ALP IF, which has improved on-board stability.

Key words: Alkaline Phosphatase, JSCC Conventional Reference Method, IFCC Primary Reference Procedures, On-Board Stability

I. 諸言

アルカリホスファターゼ (ALP) はアルカリ側に至適pHを持つ水解酵素で、リン酸モノエステルを基質とする。主なアイソザイムには、高分子肝型 (ALP1)、肝型 (ALP2)、骨型 (ALP3)、胎盤型 (ALP4)、小腸型 (ALP5) があり、血清ALP活性及びアイソザイムの測定は、骨疾患

や肝胆道系疾患などの病態を識別する上で必要である¹⁾。

血清ALP活性測定は、パラニトロフェニルリン酸 (pNPP) を供与体基質とする測定法が主流であるが、受容体基質でもある緩衝液の種類によって活性値やアイソザイムの反応性が大きく異なることが知られている²⁾。

日本臨床化学会 (JSCC) は、1990年に公表

〒252-0331神奈川県相模原市南区大野台2-29-14
株式会社シノテスト R&Dセンター
TEL : 042-753-0354
FAX : 042-786-8553
Email : yusaku.nakao@shino-test.co.jp

SHINO-TEST Corporation, Research & Development
Department.
2-29-14 Oonodai, Minami-ku, Sagamihara-shi,
Kanagawa 252-0331, Japan.

されたALP勧告法において、各アイソザイムに対する反応性が均等な2-メチルアミノエタノール (EAE) を緩衝液として採用した³⁾。

現在、国内の血清ALP活性測定には、99.9 %の施設でJSCC標準化対応法が採用されている⁴⁾。

JSCC法が抱える課題として、血液型がBまたはO型で FUT2 (Se酵素) が分泌型の場合に、食後 (特に高脂肪食)、疾患とは無関係に小腸型ALPが上昇し、健常人でも高値を示す一因となることが指摘されている⁵⁾。また、JSCC勧告法には亜鉛 (Zn) が添加されていないため、原料中に含まれる微量のZnが活性値に影響を及ぼすことも明らかとなった²⁾。

一方、国際臨床化学連合 (IFCC) では、緩衝液に2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール (AMP) を用いることにより、肝・骨アイソザイムに優位な反応条件をIFCC基準測定操作法として設定している⁶⁾。現在は、わが国を除く全ての国において、IFCC法に準じた測定がおこなわれている。

JSCCでは2012年より勧告法改定の適否に関する調査を目的としたプロジェクトが発足し、JSCC勧告法をIFCC標準測定法にトレーサブルな方法へ変更する提案がなされた²⁾。その後、パブリックコメントの募集・結果報告を通じ、JSCC常用基準法を改定することがアナウンスされた^{6), 7)}。

こうした動きを受け、当社ではIFCC法に対応したALP測定試薬「シグナスオート ALP IF」の開発を行った。ALPの試薬条件は高アルカリ性に設定されている。検査室では自動分析装置上に試薬を開封したまま搭載しておくことが多いため、大気中の二酸化炭素が試薬中に溶解することにより経時的にpHが低下し、ALP活性値が低下することがしばしば問題となる。シグナスオート ALP IFは特にこの点に着目し、試薬構成に工夫を施すことで、開封後安定性の向上を図った。

II. 方法と材料

1) 測定原理

検体中のALPは、アルカリ性下でpNPPを基質として、パラニトロフェノール (pNP) とリ

ン酸を生成させる。このpNPの増加速度をALP活性として測定する。緩衝液として使用しているアミノアルコールはリン酸の受容体として働くことでALPの反応効率を高めている。

2) 使用機器

7180形自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。

3) JSCC法とIFCC法の血清相関

血清検体92例をIFCC標準測定操作法 (SOP)⁹⁾ 及びJSCC標準化対応法 [クイックオートネオALP JS (シノテスト)] で測定し、反応性の比較を行った。

検討試料にはTrina Bioreactives AGより入手した健常人血清を用いた。

4) 開封試験

試薬開封による影響を確認するために、自動分析装置上に試薬を開封状態で5週間搭載し、ALP活性値の変化を観察した。

さらに、(1) 上記試薬にNaOHを添加し、開封により低下したpHを未開封状態まで戻した試薬、(2) 未開封の試薬に炭酸水素ナトリウムを最終反応液で100 mmol/Lまで添加した試薬についても同様に、ALP活性値の変化を観察した。

検討試料として、プール血清と各社のコントロール血清 (a, b, c) を用いた。

5) シグナスオートALP IFの性能評価

(1) IFCC SOP との血清相関

血清検体92例をIFCC SOP、及びシグナスオートALP IFで測定し、相関性の評価を行った。

検討試料として、Trina Bioreactives AGより入手した健常人血清を用いた。

(2) 併行精度

濃度の異なる2種類の血清を20回連続測定し、併行精度の確認を行った。

(3) 高値直線性

高ALP活性試料を生理食塩水で段階希釈して、希釈直線性の確認を行った。各試料、3重測定の平均値を用いた。

(4) 共存物質の影響

ビリルビンF、ビリルビンC、ヘモグロビン、乳びによる測定値への影響の有無を確認するため、プール血清に干渉チェックAプラス (シスメックス) を添加し、段階希釈した試料を用いて検討を行った。各試料、3重測定の平均値を用いた。

Ⅲ. 結果

1) JSCC法とIFCC法の血清相関

既報²⁾の通り、IFCC SOPの測定値はJSCC標準化対応法に対して約1/3となった。CRM 001dのIFCC値を用いてJSCC標準化対応法活性値のIFCC活性値への換算を試みたところ、回帰式の傾きは1.098とIFCC SOPに近付いたが、検体によっては測定値が30%近く乖離した(Fig. 1)。

2) 開封試験

試薬開封期間に比例して、ALP活性値の低下を認めた(Fig. 2 A)。また、試料によりその程度は異なっていた。各期間の試薬をCRM 001cでキャリブレーションしても、コントロール血清bとコントロール血清cの値は、未開封試薬による活性値には戻らなかった(Fig. 2 B)。

シグナスオートALP IFはIFCC SOPと比較して、全ての試料において活性低下が軽減されており、開封後安定性が向上していることが確認された(Fig. 2 C, D)。

活性値の低下が試薬pHの低下によるものであることを確認するため、5週間開封した試薬のpHを未開封状態まで戻したとしても、活性値は完全には戻らなかった(Fig. 3 A)。

そこで、重炭酸イオンの影響を疑い、炭酸水素ナトリウムの添加検討を行ったところ、濃度依存的な活性低下が確認された(Fig. 3 B)。

3) シグナスオートALP IFの性能評価

(1) IFCC SOP との血清相関

シグナスオートALP IFはIFCC SOPとの良好な相関関係が得られた(Fig. 4)。

(2) 併行精度

2濃度の試料を連続20回測定した平均値は96.0 ~ 155.9 U/L、S.D.は0.91 ~ 1.11 U/L、C.V.は0.71 ~ 0.94%であった(Table 1)。

(3) 高値直線性

1169 U/L以上の直線性を確認できた(Fig. 5)。

(4) 共存物質の影響

ビリルビンF、ビリルビンCは20 mg/dL、ヘモグロビンは500 mg/dL、乳びは3000ホルマジン濁度まで殆ど影響は認められなかった(Fig. 6)。

Ⅳ. 考察

JSCCはALP活性測定法改定の主な理由の一つとして小腸型アイソザイムへの反応性低減を挙げている。今回の検討でも、試薬を現行のEAE緩衝液を用いた試薬のままIFCC法に準じた検量・測定を行った場合、本来のIFCC法に比べて高値に乖離する検体を認めたため、IFCC法への移行にあたり、試薬の変更は不可避であると考えられる。なお、この検体についてはアイソザイム解析により小腸型ALPリッチ

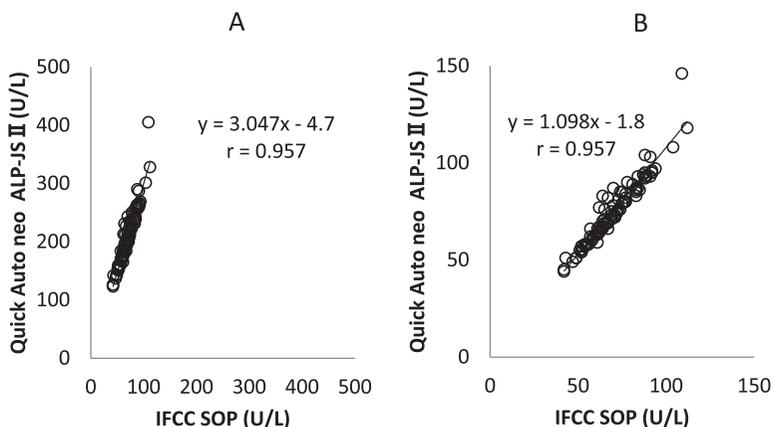


Fig. 1 IFCC SOP と JSCC 標準化対応法の血清相関
 A: IFCC SOP と クイックオートネオALP-JS II の血清相関
 B: クイックオートネオALP-JS II を CRM 001d の IFCC値でキャリブレーション

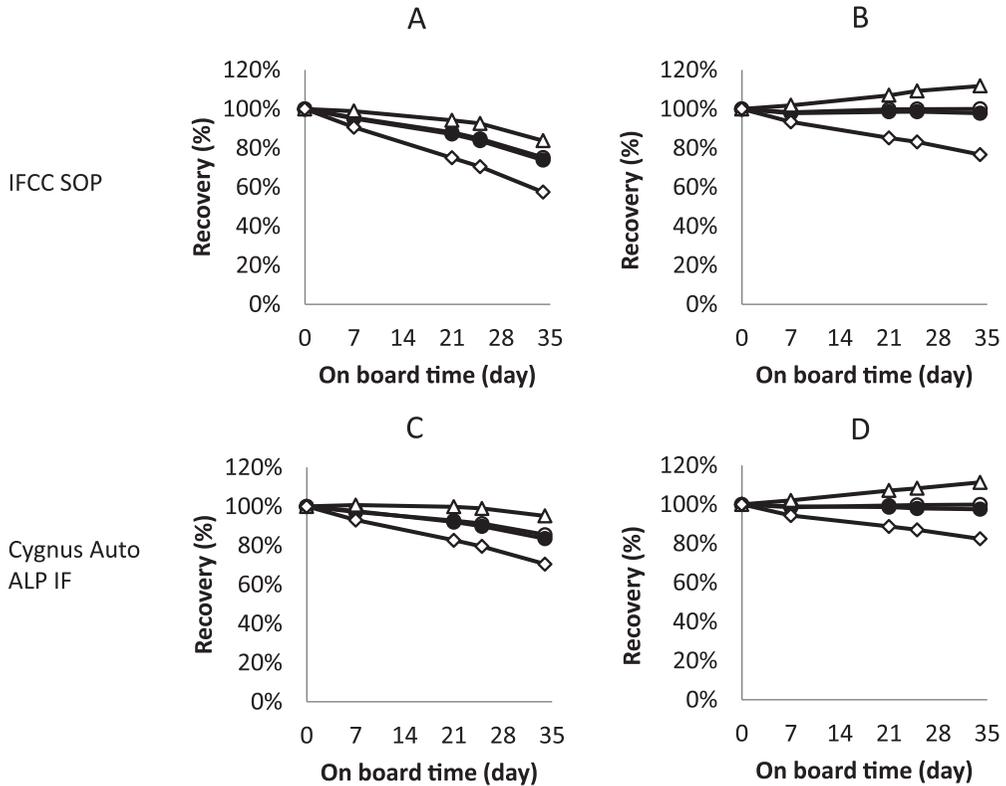


Fig. 2 IFCC標準測定操作法 (SOP) とシグナスオート ALP IF の開封後安定性
 試薬開封後5週間までの各試料の活性値をプロットした
 A, C: 初回のみキャリブレーション, B, D: 各測定ごとにキャリブレーション
 ○: プール血清、●: コントロール血清a、△: コントロール血清b、◇: コントロール血清c

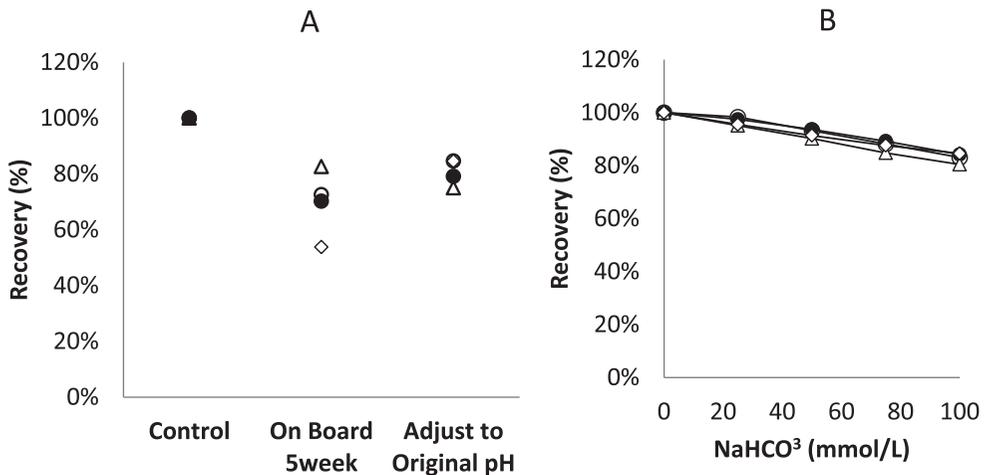


Fig. 3 A: IFCC SOP 未開封品を基準とした時の、5週間 開封条件においた試薬と、そのpHを未開封品と同レベルに調整した試薬の活性比
 B: 試薬に炭酸水素ナトリウムを添加したときのALP活性への影響
 ○: プール血清、●: コントロール血清a、△: コントロール血清b、◇: コントロール血清c

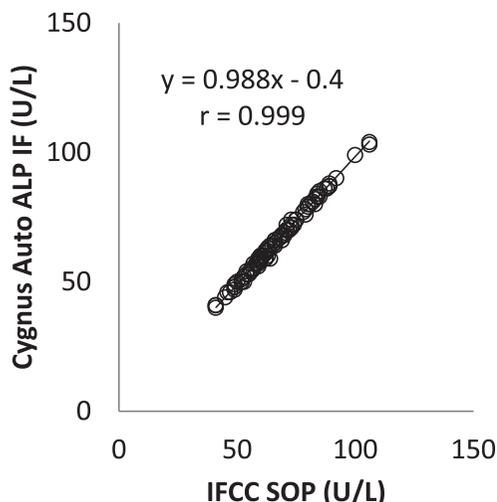


Fig. 4 シグナスオートALP IF ;IFCC SOP との血清相関

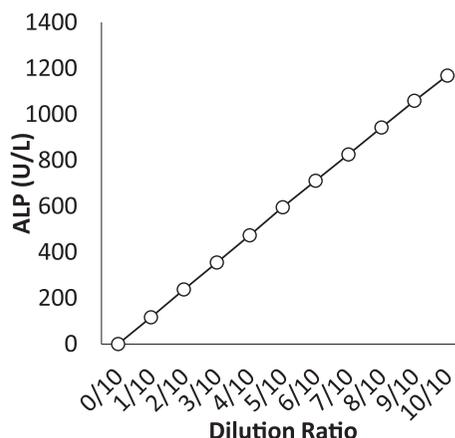


Fig. 5 シグナスオートALP IF ;高値直線性

Table 1 シグナスオートALP IF ;併行精度

	Mean (U/L)	S.D (U/L)	C.V (%)	Range (U/L)
Sample 1	96.0	0.91	0.94%	3
Sample 2	155.9	1.11	0.71%	5

な検体であることを確認した。

一方、試薬の開封試験では、試料によって影響の受け方が異なることが明らかとなった。これは試料に含まれるALPの由来の違いによるもので、それぞれのアイソザイムがもつ至適pHの違いが低下率に影響していると予想された。ところが、5週間の開封で低下した試薬pHを開封前の状態まで戻しても、各試料の活性値は完全には戻らなかった。pH以外の低下要因として、二酸化炭素が水溶液に溶解して生じた重炭酸イオンの影響を疑い、炭酸水素ナトリウムの添加検討を行ったところ、濃度依存的なALP活性への阻害が確認された。このことから、開封による活性値への影響は、試薬pHの変化に加えて、溶解した二酸化炭素がALP活性に阻害的に作用しているためだと考えられた。

常用酵素CRM 001 や、多くのメーカーの酵素キャリブレータには肝型ALPが添加されているが、いくつかのコントロール血清については試薬開封の影響について肝型とは異なる挙動を示し、試薬の劣化の程度を反映しないことが明

らかとなった。試薬pHが低下した状態であると、そのような試料についてはキャリブレーションを行っても本来の活性値が得られない。このように実検体とコントロール血清で試薬開封による活性値低下の挙動が異なる場合があるため、ALP試薬の管理には注意が必要である。

これらのことから、検査室ではALP試薬開封後の使用期間を短く設定したり、使用のたびに試薬のキャップを閉めて保管するなどの努力が行われている。

新たに開発したシグナスオートALP IFは開封後の安定性を高めるために試薬構成上の工夫を行った。IFCC標準測定法の試薬はR1に緩衝液、R2に反応基質という試薬構成となっており、アルカリ性であるR1試薬のpHが低下しやすいことが、開封後安定性不良の要因となっている。当社試薬はR1に反応基質、R2にアルカリ性の緩衝液という試薬構成をとることで、相対的に緩衝液の濃度を高め、pHの低下を抑制している。これは当社JSCC法試薬クイックオートネオALP JS IIでも採用されている特許技術である¹⁰⁾。

本試薬は基本的な性能を有し、IFCC SOPと良好な相関性を示すことに加え、開封後安定性を向上させたことでより使い勝手の良い試薬となった。本試薬が新たな標準化の一助となることを願っている。

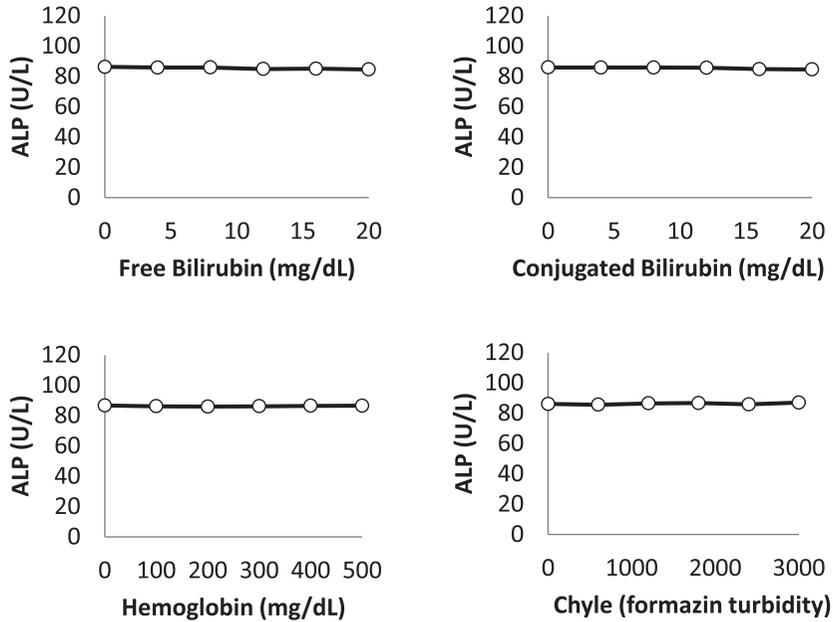


Fig. 6 シグナスオート ALP IF ; 共存物質の影響

文献

- 1) 金井 正光 監修：臨床検査法提要 改訂第34版, 金原出版, 東京, 2015
- 2) 山舘 周恒：血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定のJSCC勧告法をIFCC標準測定法にトレース可能な方法への変更に関する提案. 臨床化学, 46: 138-145, 2017.
- 3) 日本臨床化学会酵素専門委員会：ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 —アルカリホスファターゼ— (1989 - 08 - 30), 臨床化学, 19: 209 - 227, 1990.
- 4) 日本臨床衛生検査技師会：平成30年度 日臨技臨床検査精度管理調査報告書, 2019
- 5) 松下 誠, 入野 勉, 神山 清志, 菰田 二一：血清アルカリ性ホスファターゼ活性と血液型との関係, 臨床化学, 30: 217-222, 2001.
- 6) Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuther S, Franck PFH, Gella FJ, Jørgensen PJ, Kang D, Lessinger J-M, Panteghini M and Ceriotti F: IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C . Part9 : Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division, Committee on Reference Systems of Enzymes (C-RSE), Clin Chem Lab Med, 49: 1439-1446, 2011.
- 7) 前川 真人. “血清アルカリホスファターゼ (ALP) 常用基準法改定に関する意見の募集について” . 一般社団法人 日本臨床化学会. 2018-10-31. http://jscc-jp.gr.jp/home/wp-content/uploads/2018/10/ALP-Public-Comment_HP-1.pdf. (参照 2019-08-20).
- 8) 日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会. “血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定のJSCC 勧告法の変更に向けた活動” プロジェクト：パブリックコメント「血清アルカリホスファターゼ (ALP) 常用基準法改定に関する意見の募集について」に対する報告書”. 一般社団法人 日本臨床化学会. 2019-03-25. http://jscc-jp.gr.jp/file/pdf/alp_jscc.pdf. (参 照 2019-08-20).
- 9) 日本臨床検査標準協議会：JCCLSによる酵素活性測定の標準操作法 (SOP) (Ver.1.1) - IFCC基準測定操作法準拠 - アルカリホスファターゼ (ALP) [Alkaline phosphatase (ALP), EC 3.1.3.1], 日本臨床検査標準協議会会誌, 34: 19-21, 2019.
- 10) 株式会社シノテスト. 酵素反応を使用する被検物質測定方法及び測定試薬. 特開平11-046796. 1999-02-23.