

〈特集：検査機器・試薬・技術の新たな展開〉

## DGGMRを基質とするリパーゼ測定試薬 「シグナスオートLIP」について

引地 篤、飯塚 直美

### Evaluation of ‘Cygnus Auto LIP’ using DGGMR method

Atsushi Hikichi and Naomi Iizuka

**Summary** We developed the reagent kit ‘Cygnus Auto LIP’ (CA/LIP) for measuring lipase in human serum using the substrate 1,2-*O*-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester (DGGMR). The DGGMR method is more specific to pancreatic lipase than the other methods. Through particle size analysis, we found that lot-to-lot variability of the emulsion quality and reactivity to the substrate was very small. We assessed the basic performance characteristics of the reagent on a Hitachi LABOSPECT 006 automatic analyzer. Within-run precision (C.V.) was 0.54–1.27%. The calibration curve was linear up to 400 U/L and the lower detection limit was 1.6 U/L. Good correlation ( $r = 0.998$ ) was obtained between the present and other DGGMR methods. CA/LIP was stable for one year. Although azide affects the assay, this can be avoided by appropriately setting the measurement conditions. This kit enables one to perform the assay for lipase accurately and rapidly, on automated clinical chemistry analyzers.

**Key words:** Lipase, DGGMR, Acute pancreatitis lipase

#### I. 諸言

急性膵炎の診断基準は、1.上腹部に急性腹痛発作と圧痛がある。2.血中または尿中に膵酵素の上昇がある。3.超音波、CTまたはMRIで膵に急性膵炎に伴う異常所見がある。の3項目中2項目以上満たしたものを急性膵炎と判断している<sup>1)</sup>。血中の膵酵素はリパーゼ、アミラーゼ、P-アミラーゼ、トリプシン、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>、エラスターゼ1等が挙げられる。免疫学的方法で測定するトリプシン等は測定に時間を要するた

め、ルーチンに用いることは困難である<sup>2)</sup>。そのため、急性膵炎の診断に用いる血中膵酵素はリパーゼ、アミラーゼ、P-アミラーゼが用いられている。特にリパーゼは、急性膵炎診断に対する感度、特異度がアミラーゼより優れている報告があり、急性膵炎の診断に有用とされている<sup>3)</sup>。

2010年には急性膵炎ガイドラインが改訂され、急性膵炎の診断にリパーゼが推奨された。このようにリパーゼを測定する需要性が高まっている。

〒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：atsushi.hikichi@shino-test.co.jp

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

リパーゼ測定試薬は各試薬メーカーから販売されており、迅速な測定が可能になっている。また、1,2-*O*-Dilauryl-*rac*-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester (DGGMR) を基質としたDGGMR法と呼ばれるリパーゼ測定試薬は、従来法に比べ隣リパーゼをより特異的に測定できるとの報告がされている<sup>4)</sup>。我々はこの隣リパーゼ特異的であるDGGMR法に着目し開発を行った。

リパーゼ試薬は酵素の特性上、基質をエマルジョン形成させなければならない。液状で長期安定なエマルジョン形成には煩雑な工程や特殊な装置が必要となるため<sup>5)</sup>、ロット毎でエマルジョンの粒径のコントロールが難しい。リパーゼはエマルジョン表面と胆汁の界面で作用するため、エマルジョンの粒径とその表面積によって親和性が変わる<sup>6)-7)</sup>。つまりロット毎で得られる活性値が異なる可能性があり、ロット差の問題があるとされている試薬である。我々は、このロット差の問題を解消し、かつ、汎用自動分析装置対応試薬として液状でかつ長期間安定なDGGMRを基質とした試薬の開発を行った。今回は、本法の基礎的検討結果について報告する。

## II. 方法と材料

### 1. 測定原理及び調製方法

DGGMR法の測定原理は非常にシンプルである。DGGMRはリパーゼにより、1,2-*O*-Dilauryl-*rac*-glycerolと不安定な中間物質であるglutaric acid-(6'-methylresorufin) esterに分解される。後者はアルカリ条件下で自然にglutaric acidとmethylresorufinに分解する。このmethylresorufinの吸収極大近傍の580 nm付近における吸光度変化量を測定し、リパーゼ活性を求める(Fig.1)。

前述している通り、リパーゼ試薬は酵素の特性上、基質をエマルジョン化し、溶液状態で安定でなければならない。通常、リパーゼの基質をエマルジョン形成させるには煩雑な工程や特殊な装置が必要となるが、我々は簡易的に調製できる方法を見出した。界面活性剤にDGGMRを溶解し、精製水で希釈するという2ステップで調製することができる。(特許取得中)

### 2. 使用機器

検討には日立7180形自動分析装置(日立ハイテクノロジーズ)、自動分析装置LABOSPECT 006(日立ハイテクノロジーズ)を用いた。パラメータをTable 1に示す。

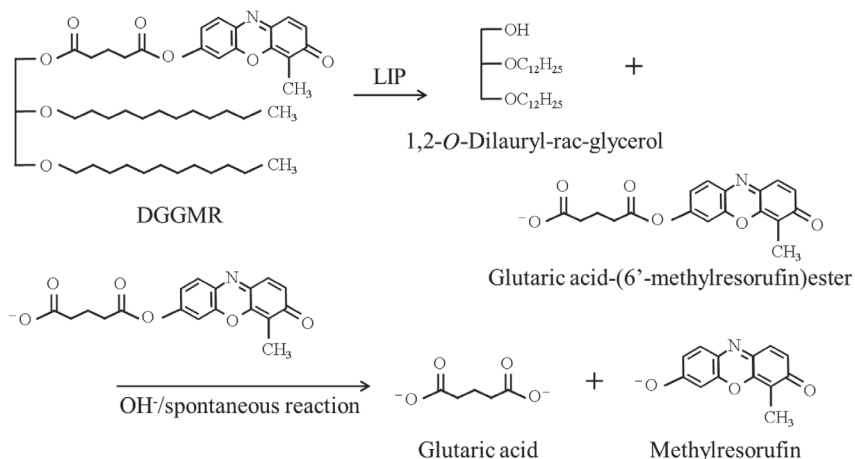


Fig.1 Reaction principle; Determination of lipase concentration by DGGMR method.

Table 1 Application parameter for Cygnus Auto LIP

	HITACHI 7180	LABOSPECT 006
Assay	Rate A	Rate A
Point	[20]-[24]	[20]-[24]
Wavelength(Sub/Main)	[700]/[570]	[700]/[570]
Sample volume	[2.6]	[1.6]
Reagent volume(R1)	[160]	[100]
Reagent volume(R2)	[80]	[50]

3. ロット差

本法の調製法でリパーゼ試薬を6ロット調製し、粒径を測定した。粒度分布計は動的光散乱式粒径分布測定装置 (HORIBA) を用いた。また、調製した6ロットについて常用参照標準物質JSCC常用酵素CRM-001cを測定し、参考値から100 U/Lあたりの吸光度変化量を算出した。

4. 同時再現性

濃度の異なる3種類の血清を20回重複測定し、同時再現性を検討した。

5. 測定範囲

LIP直線性試料 (シノテスト) を精製水で段階希釈して直線性を検討した。また、血清を生理食塩液で段階希釈して検出限界を検討した。検出限界は、各々の希釈系列を10回重複測定し、Mean ± 2.6 S.D.がブランクと重ならない濃度を設定した。

6. 共存物質の影響

ヘモグロビン、ビリルビンF、ビリルビンC、乳びによる影響の検討は、干渉チェックAプラス (シスメックス) を用いた。アスコルビン酸による影響の検討は、L (+)-アスコルビン酸 (埼京化成) を用いた。

7. 血清相関

60例の血清検体をDGGMR法リパーゼ測定試薬 (X社) 及び本法で測定し、二法での測定値を比較検討した。

8. 安定性

本試薬の経時安定性を確認するため、試薬を10℃ 12か月間保存し、4. 同時再現性で用いた

濃度の異なる3種類の血清を測定した。初日のみキャリブレーションし、その後の測定はノンキャリブレーションで測定を行った。

9. アジ化物の影響

アジ化ナトリウム水溶液を「シグナスオートLIP」R2試薬に、アジ化ナトリウム濃度0.000001% ~ 0.0001% になるよう添加し、初日のみキャリブレーションした。その後28日間ブランクキャリブレーションのみ行い日差再現性を検討した。

Ⅲ. 結果

1. ロット差

6ロットのメジアン径が105.9 ± 14.0 nmとほとんど差がない粒径のエマルジョンを調製できていることを確認した (Fig.2)。また、これらのロットについて100 U/Lあたりの吸光度変化量を検討すると、平均値に対し ± 5% 以内である

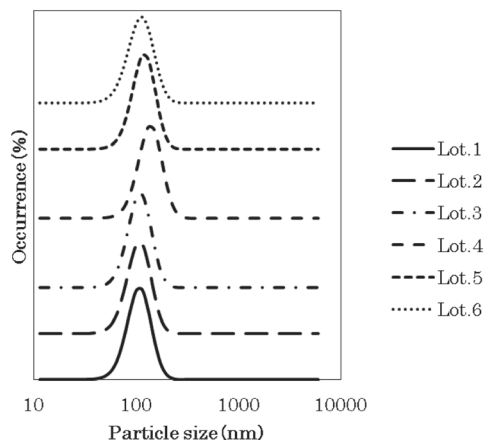


Fig.2 Particle size distribution.

ことを確認した (Table 2)。これらの結果から、本法はロット差がほとんどない試薬だということが示された。

Table 2 Absorbance per 100U/L

Absorbance per 100U/L (Abs.×10000)	
Lot.1	439
Lot.2	438
Lot.3	443
Lot.4	455
Lot.5	440
Lot.6	437
Ave.	442

## 2. 同時再現性

同時再現性は、血清1は平均24.8 U/L、S.D.は0.32、C.V.は1.27%、血清2は平均50.2 U/L、S.D.は0.47、C.V.は0.94%、血清3は平均96.2 U/L、S.D.は0.52、C.V.は0.54%であった (Table 3)。この結果からC.V.は2% 以下であり、同時再現性は良好であった。

Table 3 Within-run precisions (n=20)

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean(U/L)	24.8	50.2	96.2
S.D.	0.32	0.47	0.52
C.V.	1.27%	0.94%	0.54%
Range	1.0	2.1	2.1

## 3. 測定範囲

少なくとも400 U/Lまで良好な直線性を確認できた。また検出限界は1.6 U/Lであった (Fig.3)。

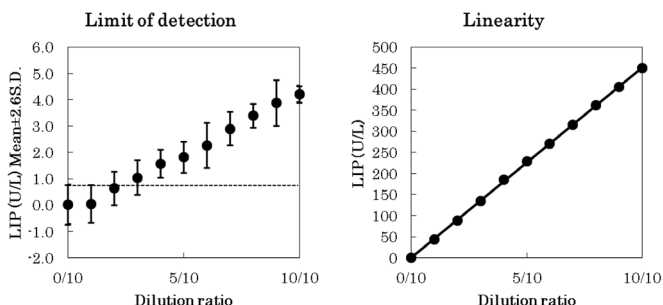


Fig.3 Limit of detection and linearity.

## 4. 共存物質の影響

ヘモグロビンは500mg/dL、ビリルビンF、ビリルビンCは50 mg/dL、アスコルビン酸は50mg/dL、そして乳びはホルマジン濁度で3000度まで殆ど影響は認められなかった。血清のような生体試料の分析においては、測定対象物以外の共存物質の影響を受けないことが求められる。今回の検討結果は、いずれも添加0濃度の測定値に対し10% 以下の影響であり、十分満足できるものと思われた (Fig.4)。

## 5. 血清相関

相関係数 $r = 0.998$ 、回帰式 $y = 1.066x - 5.3$ 、全例の平均値はX社リパーゼ測定試薬では52.9 U/L、本法では51.0 U/Lと良好な結果であった。本法は、対照法であるDGGMR法の既存試薬と同等の測定値が得られることが確認された (Fig.5)。

## 6. 安定性

濃度の異なる3濃度の血清すべてで12か月間ほとんど活性値に差はなかった (Fig.6)。この結果より、本法は1年間安定な試薬だということが示された。

## 7. アジ化物の影響

アジ化物の影響は少量でも混入すると、経時的に次第に感度が低下し活性値に影響を及ぼすことが確認された。アジ化ナトリウム0.0001%添加することにより、28日目では添加0日目に対し約85% と感度が低下し、影響を受けていた (Fig.7)。

ほとんどの体外診断薬には防腐剤としてアジ化ナトリウムが処方されているため、プローブ

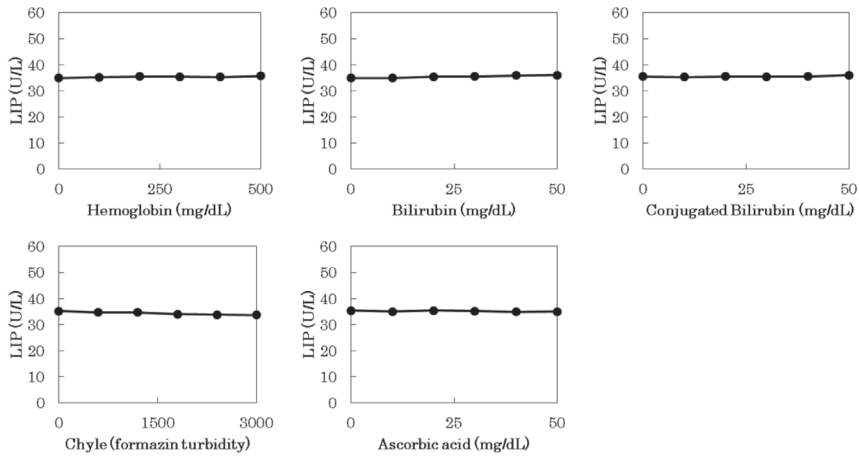


Fig.4 Effect of interfering agents on the assay.

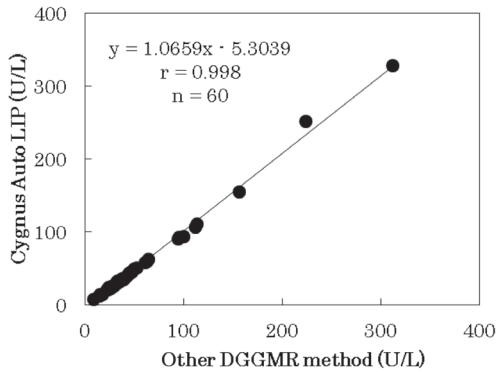


Fig.5 Correlation between the present and other DGGMR methods.

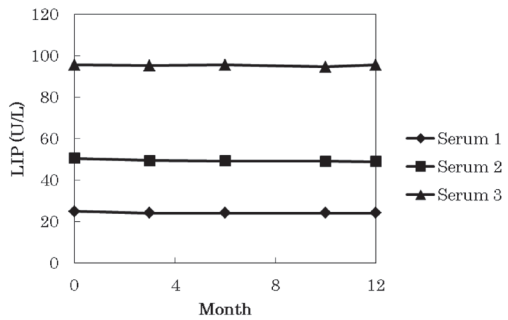


Fig.6 Long-term stability.

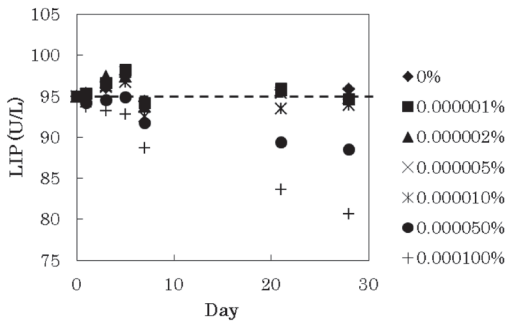


Fig.7 Effect of azide on the stability of the reagent.

コンタミネーションによりアジ化物が混入する可能性がある。また、アジ化ナトリウムが処方されており、かつ、pHが酸性の試薬からはアジ化水素ガスが発生する。このアジ化水素ガスが空中から混入する空中コンタミネーションによっても影響を受ける可能性がある。

#### IV. 考察

本試薬は簡易に調製することができ、ロット差なく均一で安定なリパーゼ測定試薬である。また、再現性、測定範囲、共存物質の影響、血清相関、安定性について検討し、いずれにおいても良好な結果が得られた。

しかし、アジ化物の影響検討の結果、アジ化

物の影響を受けることがわかった。多くの体外診断薬には防腐剤としてアジ化ナトリウムが処方されているが、アジ化ナトリウムの有無や濃度は検査薬によって様々である。また、自動分析装置の機種によってもコンタミネーション頻度は様々である。つまり、各施設における使用試薬、自動分析装置によってアジ化物の影響の受け方は大きく異なることが考えられる。

この影響を改善させるためにはいくつか運用での対策が有効となる。①プローブコンタミネーションの場合、測定時と残量チェック時に試薬プローブを介してリパーゼ試薬にアジ化物が混入する可能性がある。測定時におけるプローブコンタミネーションの対策としては、試薬プローブ洗浄の設定を入れる対策が必要となる。また、残量チェック時における対策としては、リパーゼ試薬をCh.1に設置するか、アジ化ナトリウムが処方されていない試薬の直後にリパーゼ試薬を設置する必要がある。②空中コンタミネーションの場合、アジ化水素ガスが発生する試薬に近ければ近いほど影響を受ける可能性がある。そのため、アジ化水素ガスが発生する試薬から極力遠ざけてリパーゼ試薬を設置する、または、アジ化水素ガス発生試薬と試薬庫を別にするといった対策が必要となる。このように

アジ化物の混入量を極力抑えることが有効な対策といえる。

これらの結果から、本法はロット差の問題を解消し、基礎的検討結果も良好であるためリパーゼ測定の普及に役立つことが期待される。

#### 参考文献

- 1) 高田忠敬編；急性膵炎診療ガイドライン2015第4版, 金原出版, 東京 (2015)
- 2) 北川元二、成瀬 達、石黒 洋、早川哲夫：膵疾患の診断における膵酵素測定の臨床的意義. 日本臨床検査自動化学会, 27(2): 120-123, 2002.
- 3) Ross C. Smith, James Southwell-Keely and Douglas Chesher: Should serum pancreatic lipase replace serum amylase as a biomarker of acute pancreatitis?. ANZ J. Surg, 75(6): 399-404, 2005.
- 4) 今野 稔：血清膵リパーゼ活性測定法間の測定値の乖離 - 偽高リパーゼ血症との関連 - . 臨床病理, 50(10): 976-981, 2002.
- 5) ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー：改良リパーゼ定量方法. 公表特許公報, 特表平11-504529, 1999.
- 6) Norbert W. Tietz and Denise F. Shuey: Lipase in Serum-the Elusive Enzyme: An Overview. Chin. Chem., 39(5): 746-756, 1993.
- 7) 東 俊彦：リパーゼ. 高分子, 16(11): 1220-1226, 1967.