

自動分析装置を用いた血清生化学検査での酵素活性計算法の変更について
—Kファクターとヒト標準血清を用いた測定(計算法)の比較—

斉藤 実・長谷川隆一・井上 達

Change of Calibration Method for Enzyme Assay in Clinical Biochemistry
Using Automatic Analyzer

—Comparison of calibration methods using K factor and human standard serum—

Minoru Saitoh, Ryuichi Hasegawa and Tohru Inoue

Enzyme activities in serum from experimental animals had been assayed by HITACHI 7150 Automatic Analyzer using K factors for calibration. Because K factor is derived from a molar extinction coefficient and, reagent and sample volumes for each assay system, it is a constant value in usual assay. As an alternative calibration method, a human standard serum, which is commercially available and well-controlled, is presently used in the same assay system because of some difficulties in supply. Four serum enzymes of human, rat, dog and monkey sera were determined by the above two methods. All values calibrated by human standard serum were approx. 10% higher than that using K factors. These small differences are allowable because data calibrated by human standard serum can be compared with previous data given by K factors.

Keywords : enzyme activities in serum, automatic analyzer, K factor, human standard serum

(Received May 31, 1996)

はじめに

日立 7150 形自動分析装置を用いた酵素活性の測定は、Kファクター法(以下に説明)を用いて行われていた。しかし、最近、血清の尿酸測定試薬の変更にもない、尿酸標準液がヒト標準血清(キャリブレータ:ベーリンガーマンハイム社製)に変更となった。ヒト標準血清は各種の酵素および血清成分が正確に測定された凍結乾燥品で、その保存法および測定時の調整法等が厳格に規定されたものである。

そこで、今後は血清酵素活性の測定についてもこのヒト

標準血清を用いて測定することになるために、ヒトならびに各種実験動物の血清酵素活性をKファクターおよびヒト標準血清を用いた方法で測定し、比較検討を行った。最初に上記の2法の測定(計算法)原理について解説する。

1. Kファクターによる計算法(Kファクター法)

Kファクター法はTable 1に示した式によって求められる値である¹⁾。個々のパラメーターのうち、試薬容量および試料容量は通常の測定では一定である。εは反応生成物のモル吸光係数であるが、基質緩衝液が決まれば実測することにより求めることが出来る。したがって、Kファクターは定値となり、試薬メーカーによって決定された値

Table 1. Calculation formula for enzyme activity

$$mU/ml, t^{\circ}C = \frac{\Delta A}{min} \times \frac{\text{K Factor}}{\frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{S_v + R_v}{S_v}} \times 10^6$$

U (Unit): Enzyme activity which transforms 1 μmol substrate per min

t°C: Temperature of measurement (usually 37°C)

ΔA/min: Change of optical density per min

ε: Molar extinction coefficient, Optical density of 1 M substance solution in 10 mm light path (l·mol⁻¹·cm⁻¹)

L: Light path (mm)

S_v: Sample volume (μl)

R_v: Reagent volume (μl)

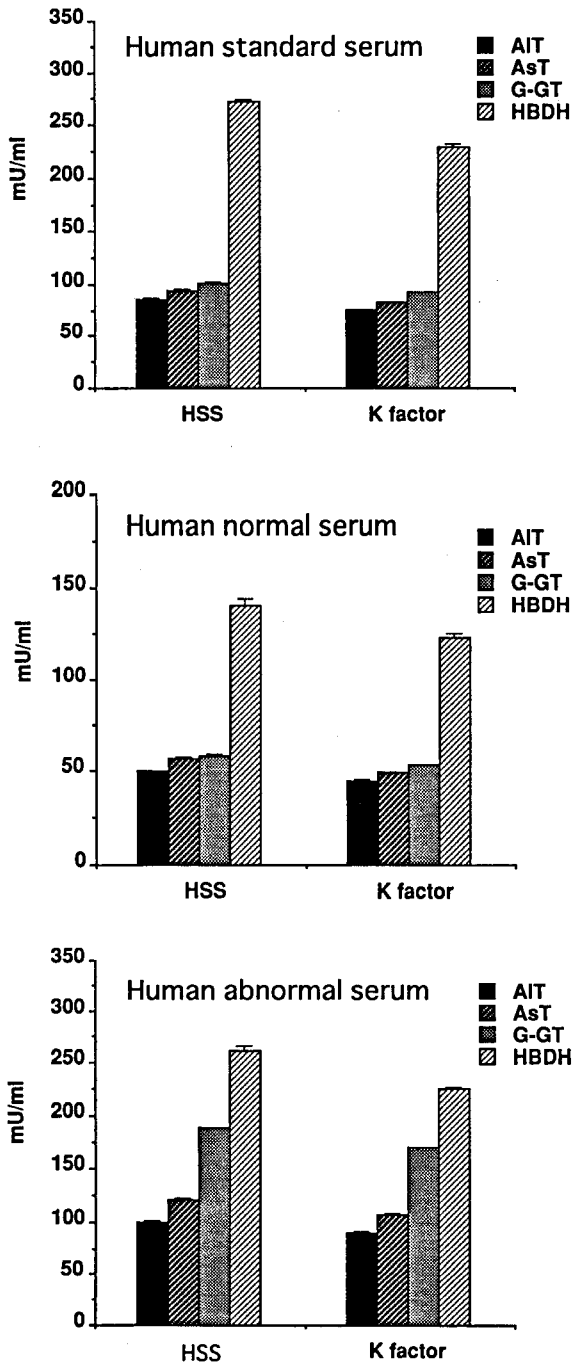


Fig. 1. Enzyme activities in three different human sera calibrated by human standard serum (HSS) and K-factors

を入力して使用することになる。

理論的には反応セルや光源の劣化など装置側の問題でKファクター法は変化しうるものであるが、通常は定期点検により恒常性は保たれるものと考えられる。なお、得られたサンプルの酵素活性は反応生成物の吸光度すなわち濃度と比例することになるので、測定時の酵素反応が正常に進行していることを直接示していることになる。

さらに、測定の度に管理血清を用いた精度管理が行われ

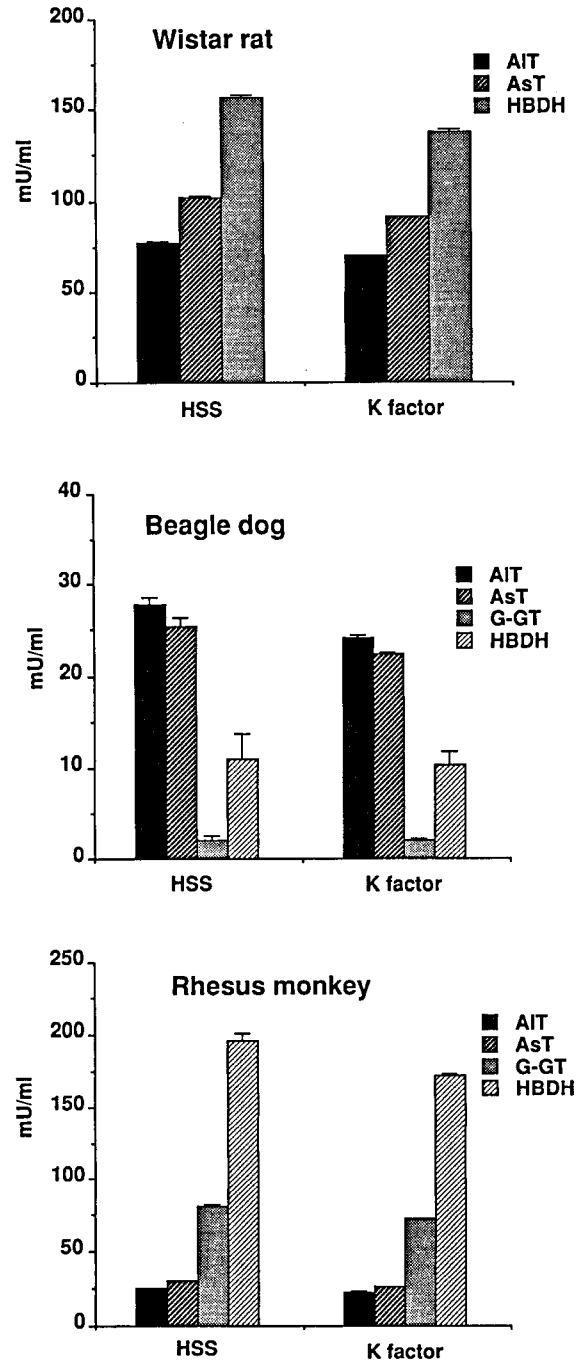


Fig. 2. Enzyme activities in rat, dog and monkey sera calibrated by human standard serum (HSS) and K-factors

る。管理血清としてヒト正常値血清およびヒト異常値血清が市販されており、それぞれの血清酵素活性および血清成分の値が変動幅を含めて記載されている。これらを測定しそれぞれの測定値がその範囲内に入れば試薬および装置が正常に機能しているものと確認される。

2. ヒト標準血清を用いた計算法 (キャリブレーション法)

試薬メーカーで調製、検定されたヒト標準血清を標準液として用い、それぞれの標準液に添付された酵素活性値を測定の度に入力して測定する。実際に酵素活性を有する標

準液を用いることから、測定装置あるいは試薬等が多少変化した場合でもサンプルの測定結果は信頼できるものである。

一方、得られたサンプルの酵素活性は標準液の酵素活性に基づいて計算されたものであるが、標準液の吸光度は常に表示されるため、酵素反応そのものが正常に進行していることを確認することは出来る。

さらに、上記と同様に測定の度に管理血清を用いて精度管理を行う。

3. Kファクターおよびキャリブレーション法による測定値の比較

両計算法を用いて、自動分析用キャリブレーション法（ヒト標準血清）、管理血清：Precinorm U（ヒト正常値血清）およびPrecipath U（ヒト異常値血清）（ベーリンガーマンハイム）、ラット（Wistar雄18週齢）、イヌ（Beagle雄）およびサル（Rhesus雄）の血清についてalanine transaminase (ALT), asparaginic acid transaminase (AsT), γ -glutamyl transaminase (G-GT) および2-hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH) を用いて活性をリキテック（ベーリンガーマンハイム）でKファクターおよびキャリブレーション法により日立7150形自動分析装置を用いてそれぞれのサンプルを4回測定した。なお、ラットのサンプルに限りG-GTの項目は測定しませんでした。

実験結果

その結果をFig.1およびFig.2に平均値およびS.D.で示した。その結果、キャリブレーション法を用いた場合の方がKファクター法を用いた場合に比べてヒト血清では、それぞれALT 10~12%, AsT 12~14%, G-GT 9~10%お

よびHBDH 13~15%、実験動物では、ALT 11~16%, AsT 13~20%, G-GT 5~14%およびHBDH 7~14%高い値であった。しかし、酵素活性の測定（計算）原理の異なる方法での結果としては容認できる程度の違いであると考えられた。

結 論

従来はKファクター法を用いて測定しており、現在まで特に問題は生じていない。しかし、尿酸標準液がその測定試薬の変更に伴って使用不能となった。新しい測定法ではヒト標準血清を標準液としているため、尿酸の測定のためにヒト標準血清を新たに購入する必要性が生じた。ヒト標準血清は尿酸のみならず、通常の測定項目の値が正確に検定され、記載されている。したがって、他の酵素活性等の測定の際にもヒト標準血清を用いて測定すれば、Kファクター法を用いた測定法よりも測定装置の状態や試薬の影響を回避できることになる。ここで取り上げたヒト、ラット、イヌ、およびサルの血清を用いた4種の酵素活性の比較では約10%程度異なった結果が得られたが、従来の測定結果と比較する上で特に問題となるほどの違いではないと考えられる。特徴としては、多少の反応セル、光源ランプおよび試薬キットの劣化した場合でも常に安定した測定値が得られる。そこで、今後は新規の毒性試験から得られた血清の測定からヒト標準血清法で測定することとする。

文 献

- 1) 大貫経一：反応指示物質を用いる方法。臨床検査, 37, 494~497 (1993)