

新規 UV エンドポイント法試薬 TG 試薬・KL「コクサイ」の基礎的検討

山下和昭，白波瀬泰史，花村卓司

シスメックス株式会社試薬開発本部：神戸市西区室谷 1-1-2（〒651-2241）

SUMMARY

血中トリグリセリド（TG）濃度の日常検査法には，リポプロテインリパーゼ，グリセロールキナーゼ，グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（GPO），ペルオキシダーゼ（POD）を用いた酵素法（GPO-POD比色法）が広く用いられている。しかし，この方法は開封後に感度が低下したり，還元性物質の影響を受け易い等の問題点を有している。そこで，これらの問題点を回避する新規 UV エンドポイント法（HK-UV法）試薬“TG 試薬・KL「コクサイ」”を開発した。本測定試薬の同時再現性は CV 値 1.0% 以内であり，少なくとも 2,400mg/dL まで原点を通る良好な直線性を示した。ビリルビン，ヘモグロビンを始めとする還元性物質の影響は認められなかった。さらに，従来法試薬に比べ開栓後の感度が安定しており，35 日間感度の変動を認めなかった。CDC 実用基準法である Carlson 変法や JSCC 勧告法との相関性は良好であり，正確性にも優れていることが示された。検体中の濁りは第一試薬添加により 1.0% イントラファット添加まで除去されることを確認した。以上の結果から，本測定試薬は従来の GPO-POD 比色法試薬の問題点を解決した非常に有用な TG 測定試薬であることが示された。

Key Words Triglycerides, UV, Endpoint, CDC, JSCC

はじめに

血中トリグリセリド（triglyceride：TG）は，動脈硬化症を始めとする循環器系疾患において重要な役割を果たし¹⁾，診断及び治療の指標となっている²⁾。血中 TG の測定法は，古くは化学的測定法^{3, 4)}が主流であったが，酵素的測定法⁵⁾が開発されて以来，簡易性，正確性，汎用自動分析装置への適応性等から飛躍的な発展を遂げた。今日ではリポプロテインリパーゼ（LPL），グリセロールキナーゼ（GK），グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ（GPO），ペルオキシダーゼ（POD）を用いた酵素法（GPO-POD 比色法）が主流となっている。しかし，この方法は本質的に溶存酸素の影響，開栓後の感度の低下や血清中

の還元性物質の影響を受けやすい等の問題点を抱えている。そこで，これらの問題点を解決するため，新規酵素 ADP 依存型ヘキソキナーゼ（ADP-HK）⁶⁾を用いた UV エンドポイント法（HK-UV 法）による中性脂肪測定試薬，TG 試薬・KL「コクサイ」を開発し⁸⁾，基礎的検討を行ったので報告する。

材料及び方法

1. 検討試料

患者血清ならびに社内ボランティアによる健常者血清を検体とした。

コントロール血清として QAP trol 1 X, 2 X

(国際試薬(株)), キャリブレーターとして脂質キャリブレーター (KL) ならびに TG 標準液 (国際試薬(株)), 正確性評価用試料として脂質測定用標準血清 WCHL001 (福祉・医療技術振興会 (HECTEF)) を使用した。また, 直線性検討用試料としてハイレベルチェック・TG (国際試薬(株)), 添加回収試験用試料としてハイレベルチェック・Lipid (国際試薬(株)), 共存物質の影響検討用試料として干渉チェック・A プラス (国際試薬(株)), アスコルビン酸 (和光純薬工業(株)), グリセロール (ナカライテスク(株)), 還元型グルタチオン (協和発酵工業(株)), 乳酸脱水素酵素 (LDH) (SIGMA CHEMICAL CO.), ピルビン酸ナトリウム (Merck KGaA) ならびにイントラファット注 20% (日本製薬(株)) を使用した。

2. 測定試薬

TG 試薬・KL 「コクサイ」(国際試薬(株)) を用いて各試料を測定した。

3. 測定方法

5 μ L の試料を 210 μ L の第一試薬と共に 37 $^{\circ}$ C で 5 分間加温し, 主波長 340nm, 副波長 700nm の吸光度を測定した。次に, 70 μ L の第二試薬添加により TG の加水分解反応を開始し, さらに 5 分間加温後, 主波長 340nm, 副波長 700nm の吸光度を再測定した (図 1)。

試料中の TG 濃度は脂質キャリブレーター (KL) を用いて作成した検量線から算出した。

4. 対照法

対照法として化学的測定法である Carlson 変法 (米国厚生省疾病管理・予防センター (CDC) 実用

基準法)^{9, 10)} ならびにアルカリ加水分解後, 酵素的に測定を行う日本臨床化学会 (JSCC) 勧告法¹¹⁾ を実施し, 従来法 (GPO-POD 比色法) 試薬である TG 試薬・L 「コクサイ」を使用した。Carlson 変法による測定は, 大阪府立健康科学センターにて CDC の規格に従って実施された。

5. 測定機器

以下の性能試験は日立 7170 形自動分析装置 ((株) 日立製作所) を使用した。開栓後の安定性試験のみ東芝 TBA-80FR 生化学自動分析装置 (東芝メディカル(株)) を使用した。

6. 性能試験

1) 同時再現性

3 濃度のプール血清を用い, 各々連続 20 回測定して同時再現性を求めた。

2) 直線性

ハイレベルチェック・TG ならびに 3 濃度のプール血清を生理食塩水を用いて 10 段階希釈ならびに 5 段階希釈し, 各々 3 回測定した。

3) 添加回収

3 濃度のプール血清に対し, 生理食塩水またはハイレベルチェック・Lipid の希釈液を 3 : 1 の割合に添加して各々 3 回測定し, その回収率を求めた。

4) 共存物質の影響

プール血清に対し, 干渉チェック・A プラスならびに他の試験液を 9 : 1 の割合に添加して各々 3 回測定した。この時, 最高添加終濃度はそれぞれ遊離ビリルビン 18.1mg/dL, 抱合型ビリ



図 1. 測定ダイアグラム (日立 7170 形自動分析装置)

検体中の TG 濃度は, 脂質キャリブレーター (KL) の検量線から算出した。

ルビン 21.6mg/dL, 溶血ヘモグロビン 480mg/dL, アスコルビン酸 100mg/dL, 還元型グルタチオン 50mg/dL, Glycerol 4,000mg/dL (トリオレイン換算値), LDH 10,000U/Lとした。

5) 開栓後の安定性

試薬を自動分析装置の保冷庫にセットしたままの状態、TG標準液の測定値を追跡した。このとき、TG標準液によるキャリブレーションは初日のみ実施し、日々の測定は生理食塩水による0点補正だけで各々3回測定した。

6) 相関性

健常者ならびに患者血清を用いてCarlson変法、JSCC勧告法ならびにTG試薬・L「コクサイ」との相関性を検討した。

7) 正確さの評価

脂質測定用標準血清 WCHL 001M, H, Tの3濃度を用いて各々5回測定し、認証値及び不確かさの幅と比較することにより測定値の正確さを評価した。

8) 濁りの除去の確認

プール血清に対し、イントラファット注20%を19:1の割合に添加して検体を調製し、第一試薬添加後の反応タイムコースから濁りの除去を確認した。

結果

1. 同時再現性

TG濃度 104mg/dL, 123mg/dL, 248mg/dLの血清でのCV値はそれぞれ0.80%, 0.78%, 0.68%であった(表1)。

2. 直線性

TG高値試料を用いた直線性試験より、少なくとも2,400mg/dLまで良好な定量性を示すことを確認した(図2A)。また、ヒト血清を用いた希釈試験でも原点に収束する良好な直線性を示した(図2B)。なお、2,400mg/dLのTG濃度までは、第二試薬添加

表1. 同時再現性

試料	血清1	血清2	血清3
平均値 (mg/dL)	103.6	123.4	248.2
標準偏差 (mg/dL)	0.82	0.96	1.68
CV値 (%)	0.80	0.78	0.68
レンジ (mg/dL)	3.1	3.2	6.7

3濃度のヒト血清を20回測定し、各々の平均値、標準偏差、CV値ならびにレンジを求めた。

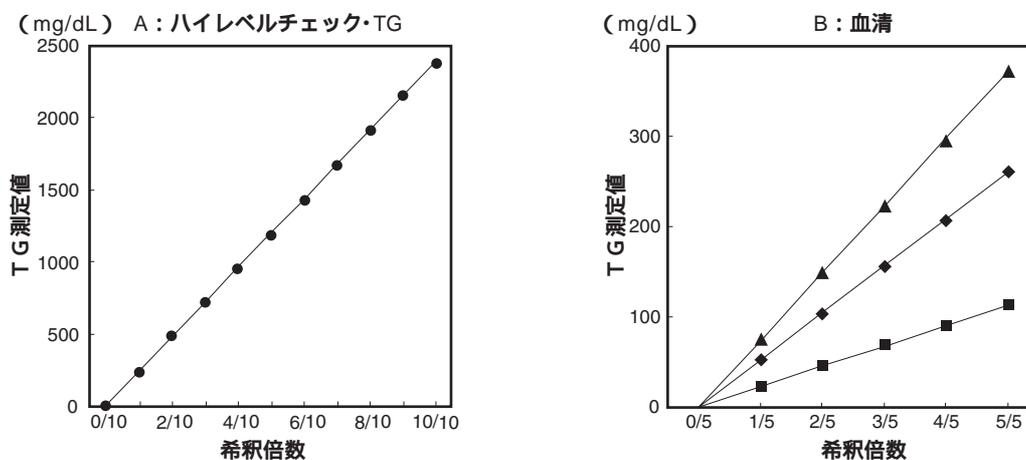


図2. 直線性

ハイレベルチェック・TGならびに3濃度のヒト血清を生理食塩水にて段階希釈し、各試料のTG濃度を測定した。

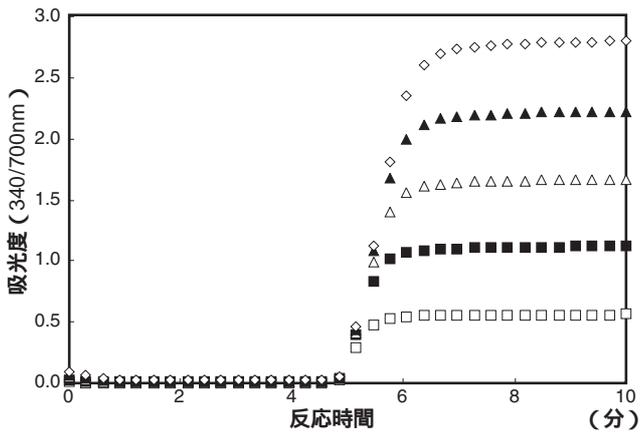


図3．反応タイムコース

ハイレベルチェック・TGを生理食塩水にて段階希釈した試料を本試薬で測定し、吸光度の変化を追跡した。
 :2/10, :4/10, :6/10, :8/10, :10/10

後3分以内に反応は終点に達しており、その後の吸光度は安定していた(図3)。

3. 添加回収

各々の添加回収率は95.7～102.8%であり、平均回収率は99.2%であった(表2)。

4. 共存物質による影響

遊離型、抱合型ビリルビンを始めとする還元性物質、グリセロール及びLDH(LD-1, LD-5)を血清に添加しても、対照に比べて測定値の変動が認められず、これらの物質が検体中に共存しても測定値に影響を与えなかった(表3)。なお、干渉チェック・Aプラスの乳ビはTGを主成分として含有するため使用しなかった。

表2．添加回収試験

添加量 (mg/dL)	血清1			血清2			血清3		
	測定値 (mg/dL)	回収値 (mg/dL)	回収率 (%)	測定値 (mg/dL)	回収値 (mg/dL)	回収率 (%)	測定値 (mg/dL)	回収値 (mg/dL)	回収率 (%)
0.0	102.4			168.9			239.0		
59.1	160.8	58.4	98.8	229.4	60.5	102.4	297.3	58.3	98.6
120.2	221.0	118.6	98.7	292.5	123.6	102.8	356.9	117.9	98.1
243.4	340.3	237.9	97.7	411.6	242.7	99.7	472.0	233.0	95.7

得られた測定値から、生理食塩水添加血清の測定値を減じて回収値を求め、この回収値を添加量で除して回収率を求めた。

表3．共存物質の影響

添加した化合物(濃度)	無添加 (mg/dL)	添加 (mg/dL)	干渉 (%)
ビリルビン			
遊離型(20 mg/dL)	101.5	101.5	0.0
抱合型(20 mg/dL)	101.3	101.3	0.0
ヘモグロビン(500 mg/dL)	99.9	100.8	0.9
アスコルビン酸(100 mg/dL)	101.0	101.1	0.1
グルタチオン(還元型)(50 mg/dL)	103.8	103.6	-0.2
グリセロール(トリオレイン換算: 4,000 mg/dL)	101.8	102.4	0.5
LD-1(10,000 U/L) + ビルビン酸(5 mmol/L)	100.3	100.7	0.4
LD-5(10,000 U/L) + ビルビン酸(5 mmol/L)	103.0	103.0	0.0

LD-1: 乳酸脱水素酵素-1(H₄)アイソザイム(ヒト赤血球由来)

LD-5: 乳酸脱水素酵素-5(M₄)アイソザイム(ヒト胎盤由来)

5. 開栓後の安定性

従来法試薬であるTG試薬・L「コクサイ」の測定値が開栓後徐々に低下し、35日目で約10%の低下が認められたのに対し、本測定試薬の測定値は35日目でも測定値が安定しており、感度の変動が少ない試薬であることが認められた(図4)。

6. 相関性

血清45例を用いたCarlson変法との相関性試験及び血清20例を用いたJSCC勧告法との相関性試験では、それぞれ回帰式 $y = 0.983x + 1.67\text{mg/dL}$, $r = 0.999$, $Sy \cdot x^{*1} = 1.13\text{mg/dL}$ と $y = 1.003x + 0.26\text{mg/dL}$, $r = 0.999$, $Sy \cdot x^{*1} = 2.83\text{mg/dL}$ が得られ、本測定試薬は両法と良好な相関性が認められた(図5)。また、血清69例を用いた従来法試薬TG試薬・L「コクサイ」との相関性は、回帰式 $y = 1.012x + 4.12\text{mg/dL}$, $r = 0.999$, $Sy \cdot x^{*1} = 1.71\text{mg/dL}$ であり良好であった(図6)。

*1 回帰式の標準誤差

7. 正確さの評価

HECTEFの脂質標準血清 WCHL 001M (認証値 89mg/dL, 不確かさ + 3, - 2 mg/dL^{*2}), WCHL 001H (認証値 145mg/dL, 不確かさ + 4, - 3 mg/dL^{*2}), WCHL 001T (認証値 212mg/dL, 不確かさ + 6, - 6 mg/dL^{*2}) を用いてTG試薬・KL「コクサイ」及びTG試薬・L「コクサイ」の正確さの評価を行った

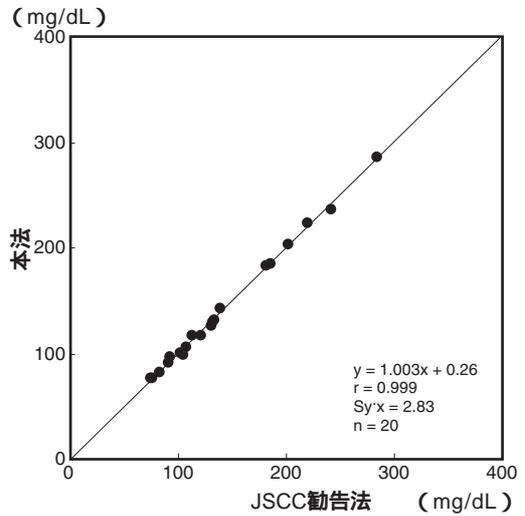
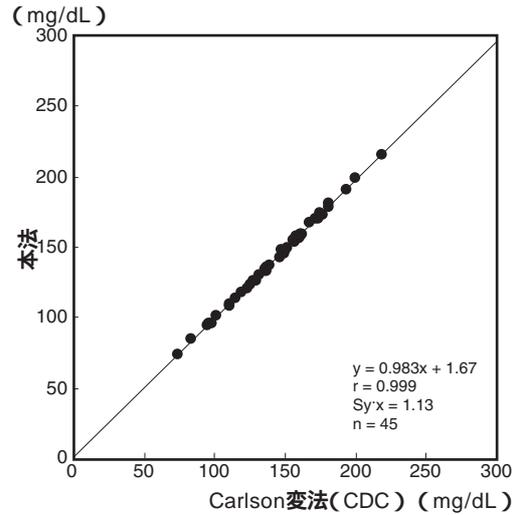


図5. 本法とCarlson変法(CDC実用基準法), JSCC勧告法との相関性

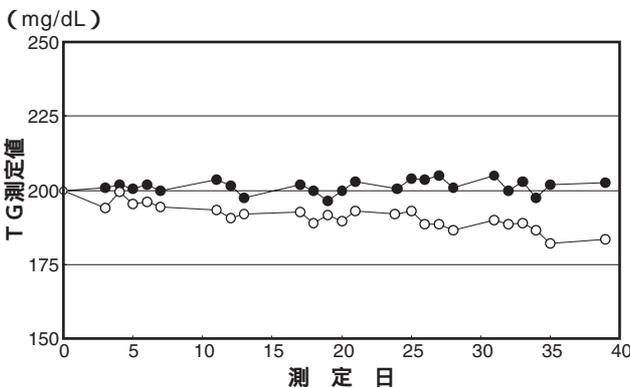


図4. 開栓状態での安定性

試薬を分析装置の保冷庫にセットしたままの状態、TG標準液(200mg/dL)の測定値を追跡した。TG標準液によるキャリブレーションは初日のみ実施し、日々の測定は生理食塩水による0点補正だけを行った。

●: TG試薬・KL「コクサイ」, ○: TG試薬・L「コクサイ」

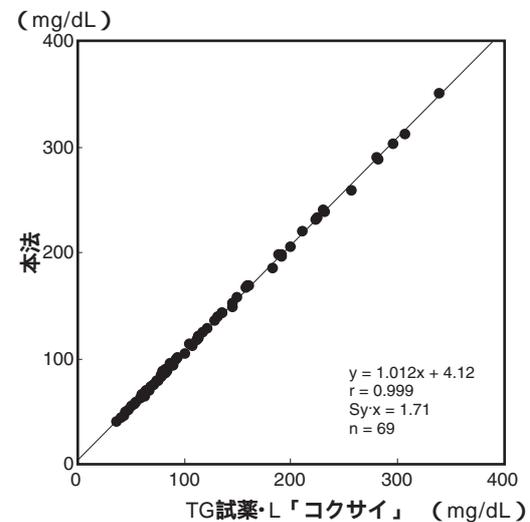


図6. 本法と従来法試薬(TG試薬・L「コクサイ」)との相関性

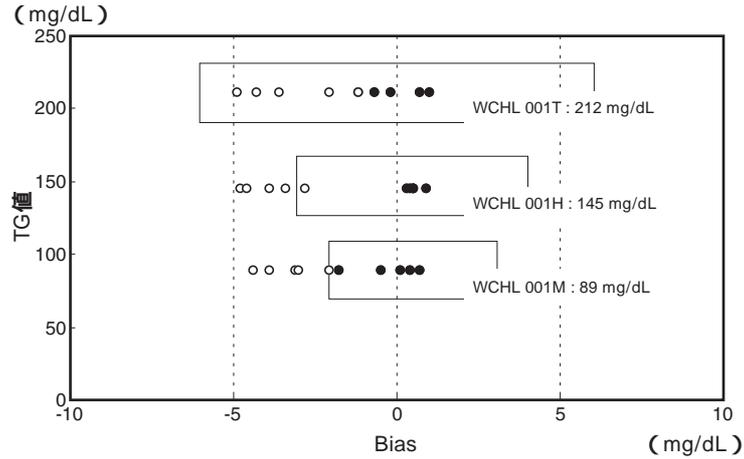


図7. 脂質標準血清 (HECTEF) による正確性評価
各認証値の不確かさの範囲を四角で示した。
○: TG 試薬・KL「コクサイ」, ●: TG 試薬・L「コクサイ」

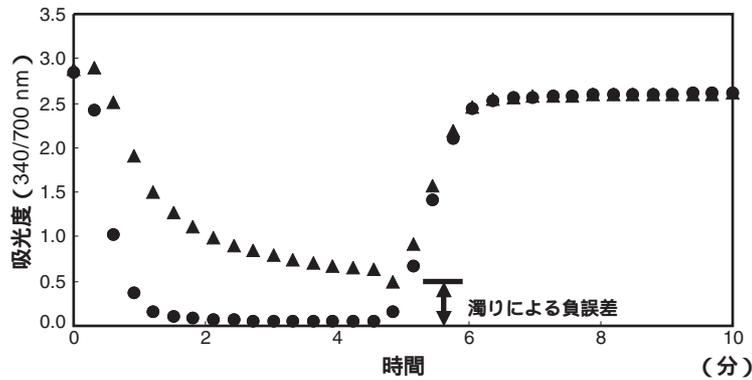


図8. 界面活性剤による検体中の濁り除去
本法の第一試薬に TritonX-100 (▲) または新規界面活性剤 (●) を添加し, 1.0% イントラファット添加血清を用いて検体中の濁り除去効果を比較した。

結果を図7に示した。TG 試薬・KL「コクサイ」のバイアスの平均値は, WCHL 001Mで -0.2mg/dL , WCHL 001Hで 0.5mg/dL , WCHL 001Tで -0.1mg/dL であり, 各測定値とも認証値の不確かさの範囲内に収まっていた。一方, TG 試薬・L「コクサイ」のバイアスの平均値は, WCHL 001Mで -3.3mg/dL , WCHL 001Hで -3.9mg/dL , WCHL 001Tで -3.3mg/dL と低値傾向を示し, 特に WCHL 001M, WCHL 001Hでは不確かさの範囲を超えて低値を示した。

*2 拡張不確かさにより不確かさを表したもので、真の値が存在する範囲を示す推定値 (95%信頼区間)。

8. 濁りの除去の確認

新規界面活性剤を第一試薬に0.5%添加することに

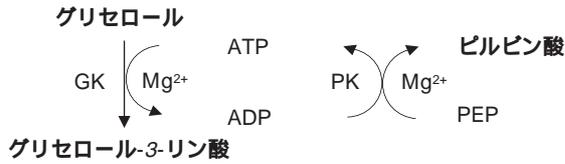
より, 1.0% イントラファット添加による血清中の濁りを5分以内に完全に除去出来ることが示された (図8)。

考 察

酵素的TG測定法であるGPO-POD比色法は, 汎用自動分析装置への適応性から臨床化学の分野で多大な貢献をしてきたが, 開栓後に感度が低下したり, 還元性物質の影響を受け易い等数多くの問題点が指摘されていた。そこで, これらの問題点を解決する新規UVエンドポイント法試薬“TG 試薬・KL「コクサイ」”を開発した。

本測定試薬の測定原理は図9に示す通りである。

第一反応



第二反応

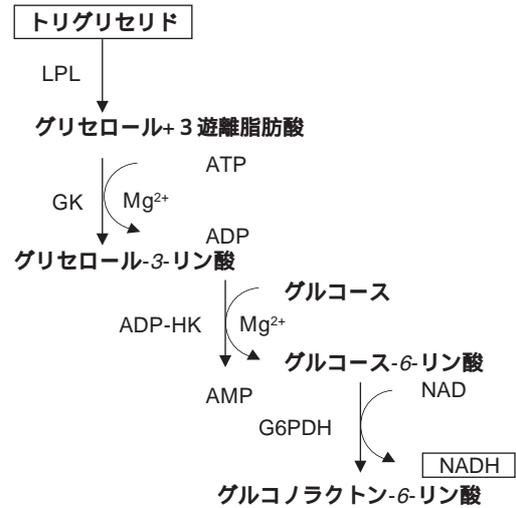


図9. 本法の反応原理

第一反応では、検体中の遊離グリセロールをグリセロール-3-リン酸の生成とATPの再生を同時に行うGK-PKの作用により消去する。第二反応において、検体中のTGは微生物由来のLPLの作用によりグリセロールと脂肪酸に加水分解される。シュウ酸の添加によりPK活性を完全に阻害した後、ATP存在下、GKの作用によりグリセロールからグリセロール-3-リン酸を生成すると同時にADPが生成される。生成したADPとグルコースの共存下でADP-HKの作用によりグルコース-6-リン酸(G 6 P)とAMPが生成され、更にG 6 PDHの作用によりG 6 Pから6-ホスホグルコン酸が生成されると同時にNADがNADHに変換される。即ち、生成されたNADH量は検体中のTG量を反映しており、NADH量を波長340nmの吸光度増加量として測定する。

LPL: リポ蛋白質リパーゼ、GK: グリセロールキナーゼ、PK: ピルビン酸キナーゼ、ADP-HK: ADP依存型ヘキソキナーゼ、G 6 PDH: グルコース-6-リン酸脱水素酵素

本測定試薬のKey EnzymeであるADP-HKは、超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の耐熱性酵素でATPの代わりにADPをリン酸基供与体とすることを特徴とする新規なヘキソキナーゼである。なお、JSCCならびにCDCではモノグリセリド、ジグリセリドを含めた総グリセリドをTGとして扱っており、本測定試薬も総グリセリドをTGとして測定している。

本測定試薬の同時再現性はCV値1.0%以内と良好な結果が得られ、低濃度領域、高濃度領域共に原点を通る良好な直線性が確認された。さらに、従来法試薬の問題点の一つである還元性物質の影響は認められず、溶血検体や黄疸を示す患者検体でも精度よく測定できると考えられた。本法を含め酵素的TG測定法は、LPLによるTGの加水分解反応の結果生成するグリセロールを測定するため、検体中の遊離グリセロールを前もって完全に消去しておく必要がある。本測定試薬はトリオレイン換算で4,000mg/dLまで検体中に遊離グリセロールが存在していても測定値が変動しなかったため、グリセロール製剤投与患者¹²⁾に対しても十分対処できると考えられた。また、

本測定試薬はグリセロール消去にカタラーゼを使用していないため、ブローブコンタミネーション等で他試薬からアジ化ナトリウムが混入してもグリセロール消去は可能である。本測定試薬は、NADHの生成量を測定してTG量を算出するため、検体中のLDHの影響を考慮する必要がある。本測定試薬ではグリセロール消去の際にピルビン酸を生成するため、ピルビン酸(5mM)共存下での影響を確認したところ、LD-1、LD-5ともに10,000U/Lまで負誤差の影響を認めなかった。本編では割愛したが、乳酸(20mM)共存下でもLD-1、LD-5ともに10,000U/Lまで正誤差の影響がないことを確認している。さらに、GPO-POD比色法試薬に比べ開栓後の感度が安定しており、開栓状態で35日間経過しても感度が一定していた。このことは共存物質の影響と共に本HK-UV法の特長の一つとなっている。

従来法試薬であるTG試薬・L「コクサイ」だけでなく、CDCの実用基準法であるCarlson変法ならびにJSCC勧告法とも良好な相関性が得られた。さらに、HECTEFの脂質測定用標準血清3濃度を用いた正確

性の評価でも非常に良好な結果が得られ、日常検査での正確性の追及という面でも十分な性能を保持していた。

酵素的TG測定試薬では、第一試薬の添加で検体中の濁りを完全に除去できない場合でも第二試薬中のLPLが持つ濁り澄清化作用により、最終吸光度は第一試薬で濁りを完全に除去した場合と同じとなる(図8)。従って、第二試薬添加直前と添加一定時間後の吸光度差からTG濃度を算出する本測定試薬では、第一試薬で除去できない濁りの分だけ吸光度差が小さくなり、負誤差の影響を受けることになる。従来からよく使用されているTritonX-100に代えて新規界面活性剤を使用することで、1.0%イントラファットを添加した血清中の濁りを完全に除去することができた。そのため本測定試薬では、検体中の濁りにより負誤差を生じる現象は完全に回避されている。

まとめ

新規UVエンドポイント法測定試薬“TG試薬・KL「コクサイ」”を開発し、基礎的検討を行った。その結果、再現性、直線性、還元性物質の影響、他方との相関性や開栓後安定性等の性能は非常に良好であり、正確性にも優れていることが示された。本測定試薬は、GPO-POD比色法試薬で問題点となっている共存物質の影響や開栓後の安定性を解決した非常に有用な測定試薬であった。

謝辞

Carlson変法による測定結果の使用を許可下さったUS National Cholesterol Reference Method Laboratory Networkの一員である大阪府立健康科学センター中村雅一先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Miller M : The epidemiology of triglyceride as a coronary artert disease risk factor. Clin Cardiol, 22 : 111 ~ 116, 1999.
- 2) 岡崎研二, 岡部紘明 : トリグリセライド. 日本臨床, 47 : 538 ~ 543, 1989.
- 3) Van Handel E, Zilversmit DB : Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. J Lab Clin Med, 50 : 152 ~ 157, 1957.
- 4) Fletcher MT : A colorimetric method for estimating serum triglycerides. Clin Chem Acta, 22 : 393 ~ 397, 1968.
- 5) Bucolo G, David H : Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem, 19 : 476 ~ 482, 1973.
- 6) Kengen SWM, et al. : Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J Biol Chem, 270 : 30453 ~ 30457, 1995.
- 7) Koga S, et al. : Biochemical characterization, cloning, and sequencing of ADP-dependent (AMP-forming) glucokinase from two hyperthermophilic archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. J Biochem (Tokyo), 128 : 1079 ~ 1085, 2000.
- 8) Yamashita K, et al. : Novel endpoint colorimetric method for assaying of total triglycerides in serum with ADP-dependent hexokinase and NADH. Clin Chem, 47 : A54, 2001.
- 9) Carlson LA, Wadstrom LB : Determination of glycerides in blood serum. Clin Chim Acta, 4 : 197 ~ 205, 1959.
- 10) Carlson LA : Determination of serum triglycerides. J Athero Res, 3 : 334 ~ 336, 1963.
- 11) 日本臨床化学会試薬専門委員会 : 血清中の中性脂肪測定の勤告法. 臨床化学, 25 : 39 ~ 51, 1996.
- 12) 松宮和人 : 臨床化学実践マニュアル, 脂質・脂質関連成分(脂質2) 検査と技術, 2(増刊号) : 112 ~ 114, 1993.

Fundamental Performance of TG Reagent KL “Kokusai” based on Novel Endpoint UV Method

Kazuaki YAMASHITA, Yasushi SHIRAHASE, and Takuji HANAMURA

Product Development, Sysmex Corporation,
1-1-2 Murotani Nishi-ku, Kobe 651-2241.

SUMMARY

The hydrolysis by lipoprotein lipase and glycerol kinase - glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) - peroxidase (POD) - H₂O₂ - chromogenic method (GPO - POD method) has been widely used for the detection of triglycerides (TG) in serum. However, this GPO - POD method is not suitable for TG assay because this reagent is not stable under open-bottle condition and reducing substances in serum interfere the measurement. Therefore, we have established a new reagent, TG Reagent KL “Kokusai”, which is based on new endpoint UV method (HK-UV method), and evaluated the fundamental performances. Analytical performances on automated analyzers were as follows: within-run CVs for human sera were less than 1.0%. Linearity was observed up to 2,400 mg/dL. Bilirubin, hemoglobin and other reducing substances in serum did not effect on the measurement. Moreover, the new reagent kept the slope of calibration curve constant under bottle-open condition for 35 days. New reagent showed good correlation with the modified Carlson method (the CDC reference method) and the recommended JSCC method. TG even in the artificial chylous serum containing 1.0% intrafat could be measured accurately, because the turbidity was clarified by addition of the reagent-1. This TG assay kit is superior to the previous reagents in stability and interferences by reducing substances.

Key Words Triglycerides, UV, Endpoint, CDC, JSCC
