

シンポジウム II : 私の研究

3. 臨床化学分析領域から

外園 栄作*

〔Key Words〕 臨床化学分析、カルシウム、尿中総蛋白、高感度検出

はじめに

臨床検査分野、特に臨床化学分析では、古くから生体試料成分を定性または定量分析する目的で、なんらかの発色試薬を用いて、目視あるいは分光分析に導き利用してきた。現在では分光光度計を組み込んだ生化学自動分析装置において、種々の検出系が利用され各々の標準物質を用いた検量線から目的成分を定量できる。患者さんから採取した血液・尿・その他試料を用いて行われる臨床化学検査は、診察前検査を始め臨床の診療において欠くことのできない貴重な情報を提供している。

現在、検査室で測定される生化学検査項目は数十種類にもおよび、また、その殆どの項目は標準化され国内のどの施設においても精度良く分析が可能である。このような優れた分析法が普及・浸透に至るまでには、これまで臨床検査に携わってきた多くの先人(先輩方)が改良に改良を重ね、世界でも類を見ないほどの信頼性の高い測定法、および試薬を作り上げてきた結果であると常々感じている。今回は、カルシウム測定の変遷に触れながら私自身が関与したカルシウム測定法について、どのような着眼点からその開発・改良に至ったのかその一部を紹介する。また私共の研究室で現在行っている研究内容についても幾つか紹介したい。

I. カルシウム測定法の変遷と
CPZ-III の開発・改良

臨床検査において生体中の血清カルシウム測定は、古くはまだ検査室に自動分析装置が普及する前から用手法にて測定されてきた項目である。その昔、沈殿滴定法にて測定されていた時代から色素によるキレート錯体化学を用いた分析へと移り変わった。その先駆けとなったのが *o*-CPC (*o*-cresolphthalein complexone) 法¹⁾ である。この方法は、カルシウムのキレート試薬である *o*-CPC が、アルカリ溶液中においてカルシウム 1 分子に対して 2 分子配位することで深紅色を呈する。しかしながら発色に用いる緩衝液がアルカリ性であったことから、大気中の二酸化炭素の影響をうけ緩衝液の pH が徐々に下がり試薬開栓後の安定性に問題があった。また、低濃度域における検量線が歪む問題も有していた。この検量線の湾曲の問題を解消し開発されたのが MXB (methylxylenol blue) 法²⁾ である。しかし、この方法もアルカリ緩衝液を用いていたため試薬安定性の問題を残した。そこで、登場したのが AZ III (arsenazo-III) 法³⁾ である。この試薬は先の 2 法とは違い中性条件下においてカルシウムと結合する色素を用いている。そのため、試薬が安定であり再現良く十分な定量特

*九州大学大学院 医学研究院 保健学部門 e_hoka@med.kyushu-u.ac.jp

性を有した試薬であった。しかし、色素構造内に砒素を含有しており環境や人体への影響を少なからず考える必要がある。 α -Amylase を用いたカルシウムの酵素測定法⁴⁾がある。この方法は、酵素 Amylase が血清中のカルシウム濃度に依存して活性が変化することを利用した測定法であり、先のキレート錯体化学を用いた方法とは全く異なる原理を用いた測定法で、自身も非常にインパクトを受けた測定法の一つである。酵素を用いているためキレート錯体化学と比べ非常に特異性の高い点の特徴であるが、試薬コストは色素法と比べ高い。そこで、できるだけ安価で試薬安定性があり、環境・人体への影響の少ない試薬の開発を目指した。そこで着目したのが CPZ III (chlorophosphonazo-III) である。その構造式を図 1 に示した。構造は arsenazo と類似するが、構造内に

砒素などの毒性を含まない。この色素は、もともと強酸性条件下 (pH 2.2) において水質検査用のカルシウム分析に用いられていた色素である。この色素をカルシウムの測定に応用するには、血清中の蛋白が凝集するため強酸性条件下では難しい。図 2 にこの色素の pH の違いによるカルシウムとマグネシウムとの反応性の違い⁵⁾を示す。中性域ではカルシウムとマグネシウムの両方と色素が結合するが、pH 6.0 以下または pH 10 以上においては、ほぼカルシウムとのみ結合することがわかる。しかし、アルカリ条件下では o-CPC 法や MXB 法と同じく試薬安定の問題が生じることから、酸性になり過ぎず、かつ、マグネシウムとの反応しない領域 pH 5.0~6.0 弱に反応 pH を合わせることでカルシウムに特異的に反応する条件を見出すことを目指して検討を行った。結果、再現性、直

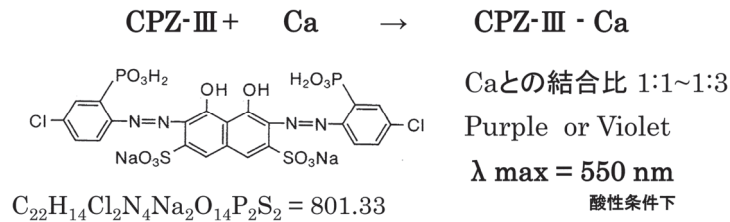


図 1 Chlorophosphonazo-III の構造式

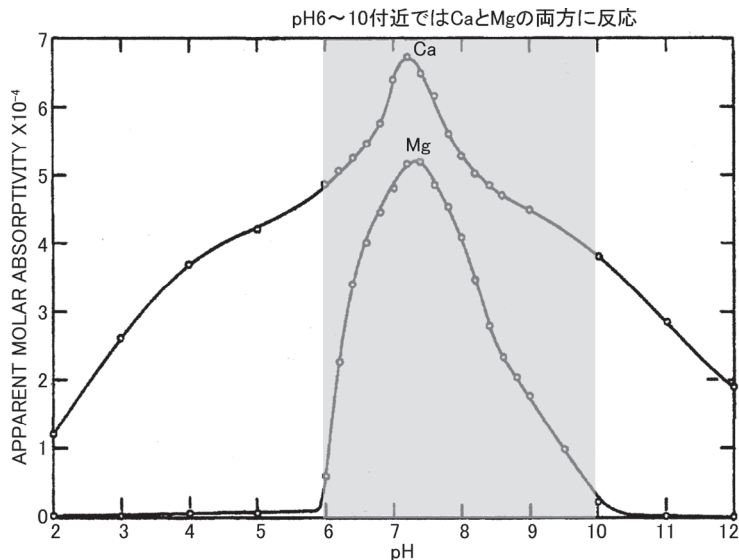
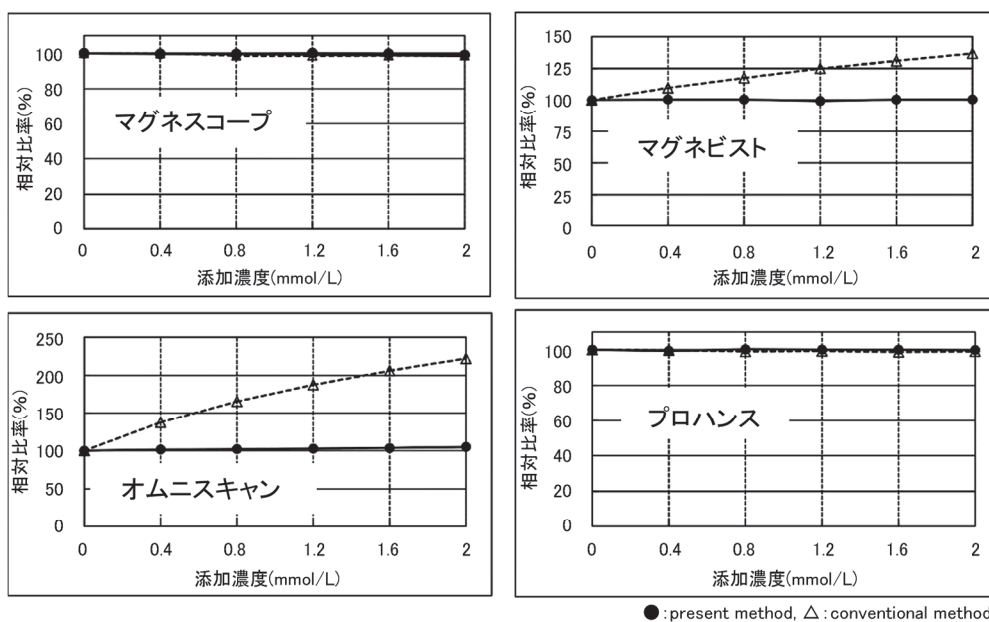


図 2 CPZ-III における pH の違いによる金属への反応性の違い (文献⁵⁾より改変引用)

表 1 各種 MRI 造影剤の特徴(文献⁷⁾より引用)

造影剤の種類	主成分	安定化剤	その他特徴
オムニスキャン	ガドジアミド Gd-DTPA-BMA	カルジアミドナトリウム Na(Ca-DTPA-BMA)	溶液 pH 6.0~7.0 $K^*=10^{16.9}$
マグネビスト	ガドペンテト酸メグルミン Gd-DTPA	ジエチレントリアミン 5 酢酸 DTPA	溶液 pH 6.8~7.8 $K^*=10^{22.5}$
マグネスコープ	ガドテル酸メグルミン Gd-DOTA	添加剤なし	溶液 pH 6.9~7.9 $K^*=10^{28}$
プロハンス	ガドテリドール Gd-HP-DO3A	カルテリドールカルシウム $\text{Ca}(\text{Ca-HP-DO3A})_2$	溶液 pH 6.0~7.0 $K^*=10^{22.8}$

*ガドリニウム(Gd)に対する各キレート剤の安定度定数 $\log K$

図 3 改良後の各種 MRI 造影剤に対する反応性(文献⁷⁾より改変引用)

線性、検出感度、試薬安定性を有した試薬⁶⁾となった。しかし、MRI などの検査目的に使用される造影剤の一部で正誤差を生じることが判明した。当時検討した 4 種類の造影剤の特徴を表 1 に示す。オムニスキャンとマグネビストにおいて正誤差がみられ、マグネスコープとプロハンスではその影響は見られなかった。この違いを追求していく中で薬品中に用いられている主成分のガドリニウム(Gd)の安定化剤に着目した。検討の結果、影響のあった 2 種の造影剤に用いられている

安定化剤 DTPA が本試薬の反応環境である pH 5.5 付近において、Gd との結合力が弱くなり反応溶液中に遊離し、その遊離した Gd と本試薬中の CPZ が結合・呈色反応が起こっていたことで正誤差を生じていたことが判明した。原因が判明したことから、遊離する Gd を特異的に隠蔽するためのキレート剤の検索を行い、試薬へ添加することでその影響の回避を試みた。改良後の各造影剤への反応を図 3 に示す。従来の正誤差は解消され、どの造影剤からも影響を受けない試薬⁷⁾となった。

II. 尿中総蛋白測定試薬 CAB 法の開発

各種腎・尿路系疾患において、尿中総蛋白を定量することは、その病態や治療の効果などを把握することが可能であり、臨床上その意義は大きい。現在、尿中総蛋白測定法としてピロガロールレッド・モリブデン錯体法(PR-Mo法)⁸⁾を原理とする測定試薬が各メーカーから販売され、国内外を問わず広く用いられている。この方法は、スルホフタイン系色素であるピロガロールが、金属であるモリブデンと結合することにより470 nmに極大吸収を持つ赤色の錯体を形成⁹⁾する。この錯体が酸性条件下において尿中の蛋白と結合することにより三次元錯体を形成し、長波長側に吸収帯がシフトし青紫色を呈することで尿中蛋白を定量している。先にも述べたようにこの方法は、非常に定評のある試薬として広く普及しているが、図4に示すように尿中に存在する蛋白はその固有の等電点の兼ね合いから、その反応溶液液中において荷電の仕方に違いが生じる。そのため、PR-Mo錯体と蛋白の結合様式において蛋白種間で差が生じ

る。図5にその一例を示した¹⁰⁾。特に低分子蛋白との反応性が低いなどの問題を有している。

そこで、各種蛋白間において呈色に差が少なく、低分子蛋白に対しても感度よく検出可能な測定法を目指し、銅とフェニルメタン系色素であるクロムアズロールB(CAB)を用いた新しい測定試薬の開発を行ってきた。CABはこれまでも、尿中の蛋白測定試薬としての報告¹¹⁾があったが、アルブミンの反応性とグロブリンの反応性に大きな乖離が生じていた。そこで、緩衝液の種類や濃度、pHを様々な条件で変化させて蛋白間差の少ない条件検討を試みたが、先人の研究報告と同じく、なかなかその差を埋めることができなかった。どうしたらこの差が埋まるのか、日々模索する中で、ビウレット反応を思い出した。この反応は、感度こそ低いが血清中の総蛋白を測定する古くからある反応で、アルカリ条件下において蛋白のペプチド結合と金属である銅がキレートすることによる呈色反応を利用した方法であり、今日の日常検査においても使用されている方法ある。そこで、考

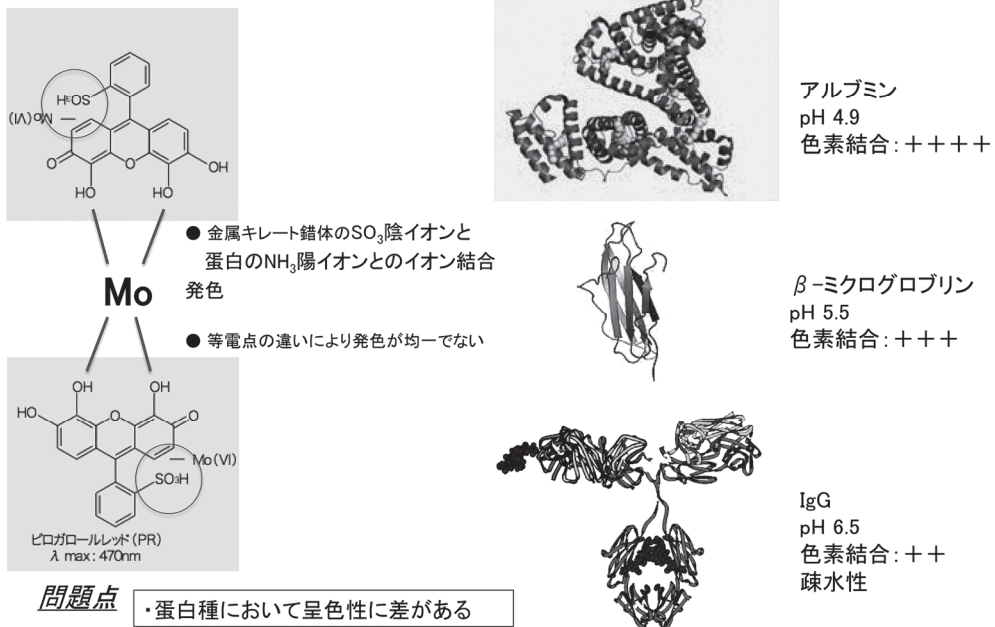


図4 各種蛋白の荷電状態と PR-Mo 法の発色様式と問題点

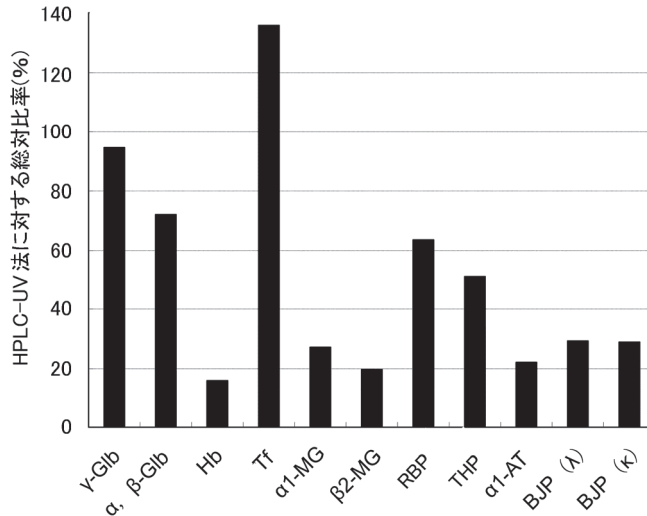


図5 PR-Mo法と各種蛋白との反応性(文献¹⁰)より改変引用)

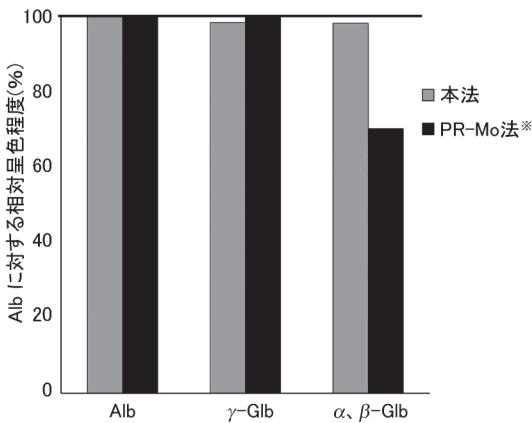


図6-1 本法とPR-Mo法と各種蛋白との反応性 (※文献¹⁰)より改変引用)

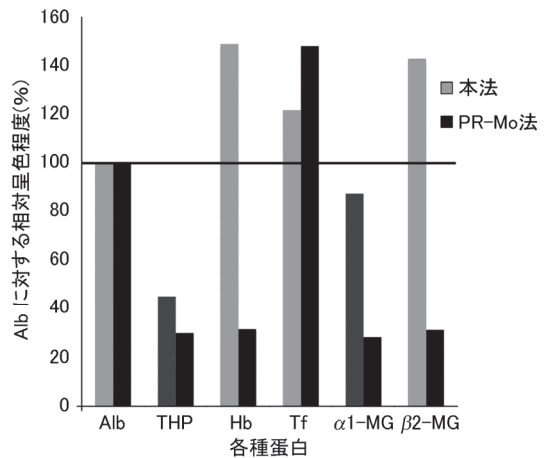


図6-2 その他蛋白との反応性

えたのが一度アルカリ条件下で銅を蛋白に配位させ(ビウレット反応)その後、蛋白銅の複合体に対して銅に特異的に反応する金属キレーターを結合させることを試みた。結果、図6-1、2に示したようにPR-Mo法と比べ、各種蛋白との反応性を大きく向上させることに成功した。このことで、①ビウレット反応のメリットである蛋白間における差が少なく、ビウレット反応の感度面の弱点を補う目的で②金属-金属キレーターの結合力の強さにより感度良く測定ができる測定法としての可能性の光が見えはじめた。現在、まだ試薬の開

発は継続中であるが、本法は再現性、最小検出感度など、臨床検体を測る上で十分な定量特性を有していることを確認している。今後、更に検討を重ね、市場試薬としての完成を目指す。

III. その他の研究

一高感度検出技術構築に関する検討一

当研究室では種々測定法の開発・改良に加えて、高感度な検出を可能とする技術改良も行っている。

臨床検査における生体成分の臨床化学分析では、多くのオキシダーゼ系酵素が用いられ、生成した

過酸化水素 (H₂O₂) をペルオキシダーゼ (POD) の存在下 4-アミノアンチピリンと水素供与体を酸化縮合発色させ可視領域で定量する方法 (Trinder's 試薬¹²⁾) がよく用いられる。この検出系は、同じく酵素の検出系である紫外部検出系 (NADH 検出系) と比較すると感度は 3~5 倍高い。しかし、反応に酸化縮合を利用していることから試料中に含まれる還元物質、特にビリルビンの影響を受けやすい。このことは特に、尿を試料とする際にはさらに大きな影響を及ぼす。

そこで当研究室では、従来の酸化還元反応による検出ではなく、直接、過酸化水素を高感度に検出する技術の構築を目指し検討を行っている。H₂O₂・金属・キレート錯体形成と界面活性剤による三次元錯体の発色を誘導することで現行の POD-H₂O₂ 検出よりもさらに高感度で特異性の高い新しい検出技術の構築の可能性について検証を行っている。詳細な報告は避けるが、現在までにある種の金属と金属キレーターを用いて現行法の

POD-H₂O₂ 検出法の約 10 倍の感度を引き出すことに成功している。

現在、生化学分析で用いられる自動分析装置には分光分析法が用いられているが、分光分析ではせいぜい数 μmol/L 程度の成分を検出するのが限界であるとされている。高感度検出技術の革新的改良が可能となれば、現行の生化学自動分析装置での新規検査項目の開拓を始め、現在、感度の問題から免疫学的測定法により測定されている検査項目も、測定対象項目となり得る可能性も考えられる (図 7)。また、現在、生化学検査項目の中でクレアチンは比較的、微量な血清成分にあげられるが、このクレアチンは慢性腎疾患のグレード分類に使用される eGFR (推定糸球体濾過率) の算出に用いられ、日本腎臓学会では、クレアチン測定値を小数点 2 桁まで代入し算出することを推奨している。しかしながら、現在のクレアチン試薬に用いられている検出感度では、十分な感度が担保されているとは言い難く、クレアチニン測

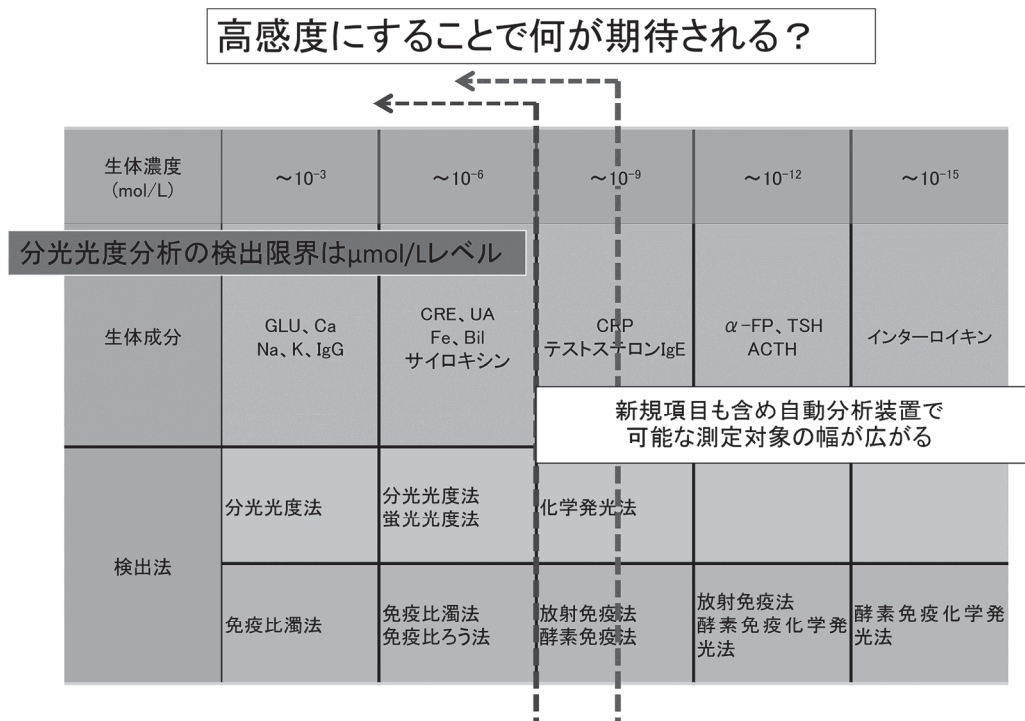


図 7 生体成分濃度と検出法との関係

定の小数点2桁目が信頼あるデータでないとした時に先のグレード分類の判定が変わる恐れも出てくる。このように臨床診断への影響の少ない安定したデータを提供する上でも高感度検出技術の構築は必須であると考えている。引き続き検出技術の高感度化に向けての検討を重ね、本研究における技術革新の可能性について探索を行う。

以上、今回は、これまでのカルシウム測定にみる先人たちの工夫を少し紐解きながら、臨床化学検査における現状とその課題について今一度目を向け、現在、私共の研究室で行っている研究内容の一部を紹介した。

おわりに

これからの臨床化学検査に求められる能力は、検体管理力、検査技術力、精度管理能力、検査データ診断力・・・と多岐にわたる。また、他の医療職のみならず患者さんへのデータ説明能力も求められる時代となった。多様化、複雑化する環境において、臨床から信頼され求められるデータ(測定法)はもとより、病に苦しむ患者さんのため新しい検査法、診断法について日々模索し、今後も自己を研鑽し続けようと思う。

謝辞：これまでの研究活動においてご協力、ご尽力賜りました多くの共同研究者の皆様にあらためて感謝いたします。

文 献

- 1) Stern J, Lewis WHP. The colorimetric estimation of calcium in serum with *o*-cresolphthalein complexone. *Clin Chim Acta* 1957; 2: 576-9.
- 2) Kazama T, Mamada K, Ito J, Osawa S, Yonemitsu HY. The colorimetric determination of serum calcium with methylxlenol blue. *Jpn J Med Tech* 1990; 39: 1820-6.
- 3) Michylova V, Ilkova P. Photometric determination of micro amounts of calcium with arsenazo III. *Anal Chim Acta* 1971; 53: 194-8.
- 4) Kayamori Y, Katayama Y. Enzymatic method for assaying calcium in serum and urine with porcine pancreatic α -amylase. *Clin Chem* 1994; 40: 781-4.
- 5) Ferguson JW, Richard JJ, O'Laughlin JW, et al. Simultaneous spectrophotometric determination of calcium and magnesium with chlorophosphonazo III. *Anal Chem* 1964; 36: 796-9.
- 6) Hokazono E, Osawa S, Kayamori Y, et al. Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III. *Annals of Clinical Biochemistry* 2009; 46(4): 296-301.
- 7) Hokazono E, Nakano T, Oguchi Y, Osawa S. Development of new measurement reagent for serum calcium that avoids influences of gadolinium contrast agent for MRI. *生物試料分析* 2010; 33(2): 191-7.
- 8) Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate Complex, Manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem* 1986; 32: 1551-3.
- 9) Fujita Y, Mori I, Kitano S. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (IV) complex, and protein. *Bunseki Kagaku* 1983; 32: 379-86.
- 10) 外園栄作, 栢森裕三, 大澤 進, ほか. Evaluation of the measurement reagent "Micro TP-AR(2)" for total protein in urine. *JJCLA* 2010; 35(5): 920-6.
- 11) Fujita Y. Spectrophotometric determination of protein with chromazurol B-beryllium (II) complex by manual and flow-injection methods. *Analytical Sciences* 1992; 8: 313-6.
- 12) Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6: 24-7.