

富士ドライケム α -アミラーゼ活性測定スライド FDC AMYL-P IIIの開発

戸田 悟*, 中村 健太郎**, 高橋 一浩***,
升田 喜士*, 寺島 薫*

Development of FUJI DRI-CHEM AMYL-P III Slide for α -Amylase Activity Measurement

Satoru TODA*, Kentarou NAKAMURA**, Kazuhiro TAKAHASHI***,
Nobuhito MASUDA*, and Kaoru TERASHIMA*

Abstract

In 1998, the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) released the recommended method for amylase measurement. In Japan, a recommended method based on the IFCC method was proposed by the Japan Society of Clinical Chemistry (JSCC) in May 2005. Since then amylase measurements are becoming increasingly standardized. The purpose of the standardization is to eliminate the variation in test results caused by differences in measuring instruments, methods and test centers; enabling mutual comparison of measured value regardless of time and place. Otherwise, clinical assay measurements would differ in every hospital, creating the problem of non-comparable measurement results when patients change hospitals. The collaboration between the industrial, administrative and academic sectors redresses this situation so as to facilitate mutual comparison of test data when such a change takes place. Through the Metabolic Medical Checkup System implemented in April, 2008, measurement criteria for eight clinical test items in each testing institute are already standardized. The introduction of this system prompts the standardization of other test items. FUJI DRI-CHEM (FDC) has developed a new α -amylase slide AMYL-PH which uses the substrate of the IFCC Reference Method. The new α -amylase slide corresponds to standardization and it has an improved correlation to the reference method. FDC has also been improved to measure not only human specimens but as well as animal specimens. Because canines and felines have higher reference intervals of α -amylase value than humans do, the dynamic range has been extended by controlling the pH of slides.

1. はじめに

国際臨床化学会IFCCは、1998年にアミラーゼ測定の勧告法を公表した¹⁾。国内においては、2005年5月にIFCC法を採用した勧告法が日本臨床化学会JSCCにより提出され、標準化が進んでいる²⁾。

標準化とは、「測定機器間、測定方法間、検査施設間の差を無くし、「いつでも」、「どこでも」測定値の相互比較を可能とすること」である。標準化をしないと、臨床検査の測定値がそれぞれの病院に特有のものになり、転院すると以前の検査データを単純には相互比較できないという状況が生じる。標準化は、これを是正する産官学

本誌投稿論文（受理2008年12月22日）

*富士フィルム（株）R&D統括本部

ライフサイエンス研究所

〒351-8585 埼玉県朝霞市泉水3-11-46

*Life Science Research Laboratories

Research & Development Management Headquarters

FUJIFILM Corporation

Senzui, Asaka, Saitama 351-8585, Japan

**富士フィルム（株）R&D統括本部

ライフサイエンス研究所

〒258-8577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

**Life Science Research Laboratories

Research & Development Management Headquarters

FUJIFILM Corporation

Ushijima, Kaisei-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa

258-8577, Japan

***富士フィルム（株）ヘルスケア事業統括本部

メディカルシステム事業部FDCグループ

〒351-8585 埼玉県朝霞市泉水3-11-46

***FDC Group

Medical Systems Business Division

Healthcare Business Headquarters

FUJIFILM Corporation

Senzui, Asaka, Saitama 351-8585, Japan

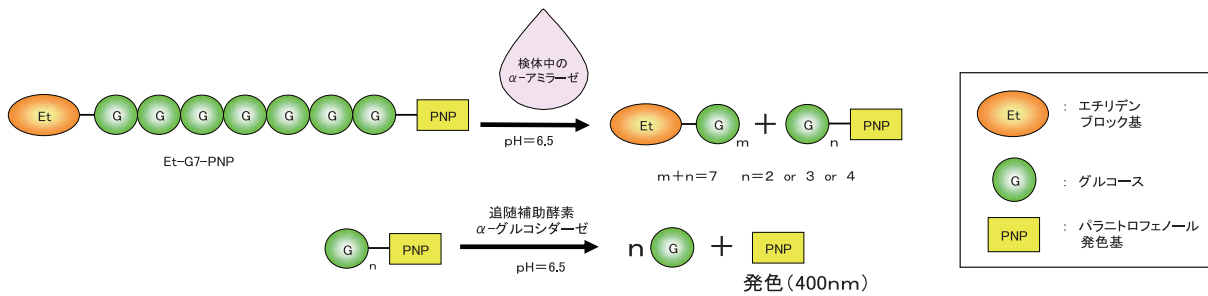


Fig. 1 Reaction Scheme of FUJI DRI-CHEM Slide AMYL-P III.

協同による活動である。2008年4月より実施されている特定健診の8項目についてはJSCCから勧告法が提示されており、標準化対応試薬を導入することによっていずれの検査機関でも標準化された状態になっている。

富士ドライケム (FDC) の α -アミラーゼ活性測定法においても、IFCC法の基質を使用して標準化に対応したFDCアミラーゼスライドAMYL-P III (IIIは標準化対応していることを示す)を開発したので報告する。

また、FDCは、ヒト検体だけでなく動物検体も測定できるよう進めている。イヌやネコの α -アミラーゼ活性の参考基準範囲はヒトのそれに比べて10倍以上高いため、測定域を拡大し、動物にも転用可能な試薬として開発することができたことを併せて報告する。

2. 開発のポイント

2.1 標準化対応

2.1.1 基質の変更

α -アミラーゼ測定における標準化のために検討した第一の変更点は、オリゴ糖の非還元末端がブロックされた基質4, 6-エチリデン-4-ニトロフェニル- α -D-マルトヘプタオシド (Et-G7-PNP) を用いることである。ここで、Gはグルコース基、数字はグルコース残基の数、Etはエチリデン基、PNPはp-ニトロフェニル色素を表わす。この基質は安定性や純度に優れ、また、性能面では α -アミラーゼのアイソザイムである膵臓由来のP型または唾液由来のS型との反応性に違いが少ないことなどの利点がある。反応原理をFig. 1に示す (α -アミラーゼの測定では、追従補助酵素反応が十分速いことが必須である)。

FDCの α -アミラーゼ測定値を標準化対応する方法として、従来より使用されているアミラーゼスライドAMYL-Pを用い、標準化された対照法に合わせて検量線を再構築することが考えられる。しかしながら、AMYL-Pスライドは標準化対応法の基質を使用しておらず (G5-PNP)、対照法に使用している基質との違いによる α -アミラーゼのアイソザイム (P型またはS型) との反応性の違いや α -アミラーゼ以外のアミラーゼ (例えば、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼなど) の測り込みにより、対照法と測定値が一致せず、相関性が悪化

するといった問題が生じる。

したがって、標準化に対応するために、勧告法と同じ基質Et-G7-PNPを用いたAMYL-P IIIの開発を検討した。Fig. 2に、FDCスライドの層構成を示す。

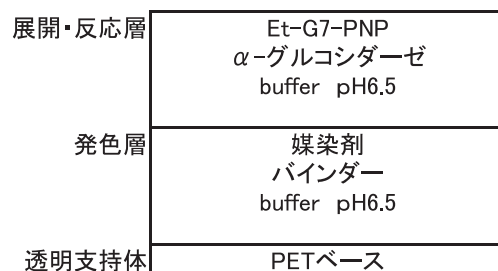


Fig. 2 Structure of FUJI DRI-CHEM Slide AMYL-P III.

2.1.2 補助酵素の選定

FDCの標準化対応に適した基質として選定した、Et-G7-PNPを従来のAMYL-Pスライドに置き換えたスライドを作成し、種々の α -アミラーゼ活性に対するPNP色素の生成反応のタイムコースを確認した (Fig. 3)。 α -ア

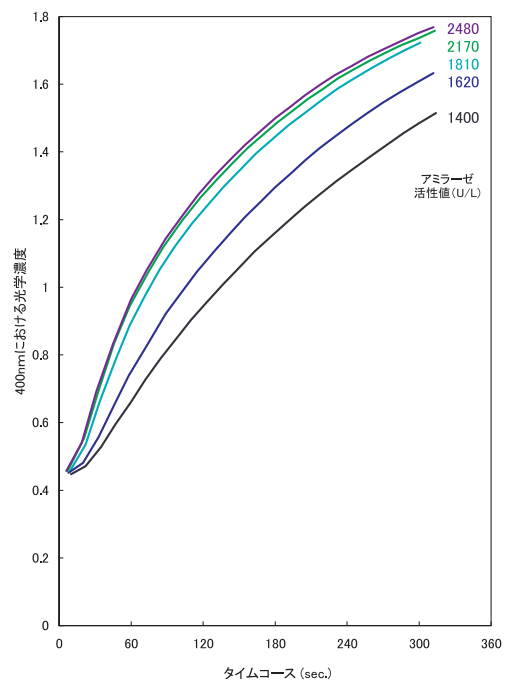


Fig. 3 Optical density time course of various α -amylase activity in AMYL-P Slide substituted Et-G7-PNP for G5-PNP substrate when the slide's pH is 7.3.

ミラーゼ活性値が1,810U/L付近でPNP色素の生成反応が頭打ちになっていることがわかる。

反応原理 (Fig. 1) に基づいて、 α -アミラーゼ活性を正しく測定するためには、 α -アミラーゼが基質を分解してオリゴ糖のPNP誘導体を生成する速度よりも、追従補助酵素の α -グルコシダーゼがより速やかにオリゴ糖のPNP誘導体を分解してPNP色素を生成しなければならない (α -アミラーゼ活性律速)。しかしながら、Fig. 3の α -アミラーゼ活性が非常に高い試料で起こるこの現象は、追従補助酵素の反応速度が α -アミラーゼの反応速度に比べて十分高くない(律速である)ことを示している。

従来より用いていた α -グルコシダーゼは酵母由来の酵素であり、オリゴ糖鎖長の異なるPNP誘導体に作用する場合、グルコース鎖長が4以上のものに対して実質的に活性を有さないことが知られている (Fig. 4)。AMYL-Pスライド開発当時はこの酵素が一般的で、 α -アミラーゼによって生成するオリゴ糖分解物Gn-PNPのn = 1, 2, 3である基質G5-PNPを用いることにより問題を回避できた。

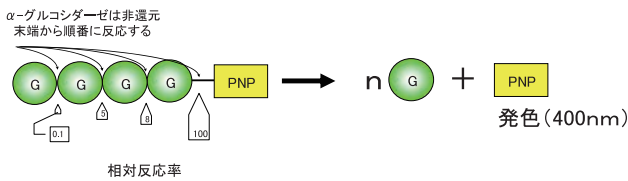


Fig. 4 Reaction scheme of α -glucosidase from *Saccharomyces* sp.

しかしながら、標準化対応基質Et-G7-PNPから生成するオリゴ糖分解物Gn-PNPはn = 2, 3, 4であるため、 α -アミラーゼ活性の高い領域においては補助酵素の反応が律速となり、 α -アミラーゼ活性が正確に測定できないといった問題が発生した。このことは、試薬の経時劣化を考慮すると、定量できる測定域上限が下がる危険性につながるものであり、改善が必要であった。

これらの問題を解決するため、オリゴ糖鎖の長いものにも作用することができる微生物由来の α -グルコシダーゼを用いると (Fig. 5)、標準化対応基質Et-G7-PNPからの分解物であるG4-PNPに対しても十分な反応速度を有し、 α -アミラーゼ活性が2,500U/L以上においてもPNP色素の生成速度が低下せず、高 α -アミラーゼ活性の領域まで測定できるようになった。

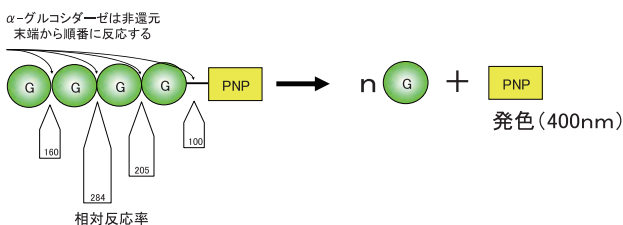


Fig. 5 Reaction scheme of α -glucosidase from Microorganism.

以上の検討結果を踏まえて作成したFDC AMYL-P III スライドと、FDCの標準化対応法としている α -アミラーゼ活性測定用試薬 (隣関連シリーズリキテック

AMY EPS (ロッシュ・ダイアグノスティクス社製))との相関性を示す (Fig. 6)。AMYL-P IIIは、標準化法と同じ測定原理を採用することで良好な相関性が得られていることがわかる。

一方、標準化法とは異なる反応原理を用いたAMYL-Pと対照法の相関バラツキは大きい (Fig. 7)。

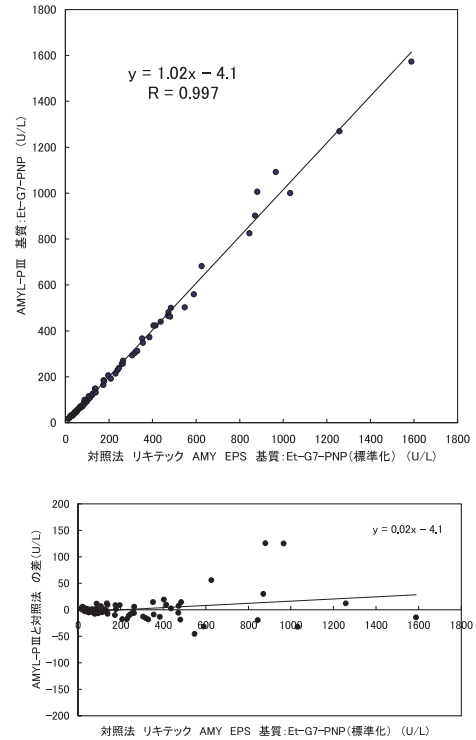


Fig. 6 Human serum sample (n=80) correlation of FDC Slide AMYL-P III with Et-G7-PNP method run on a Hitachi automated analyzer.

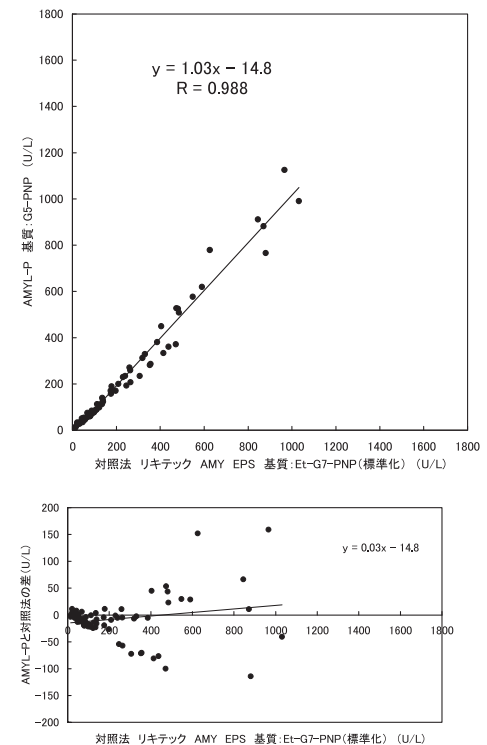


Fig. 7 Human serum sample (n=78) correlation of FDC Slide AMYL-P with Et-G7-PNP method run on a Hitachi automated analyzer.

2.2 測定領域の拡大

ヒト検体の α -アミラーゼ活性の参考基準範囲はおよそ37~125 U/Lである³⁾が、膵疾病患者においては数百U/Lに上昇する場合がある。

一方、動物検体でも α -アミラーゼ活性を測定することが多いため、FDCではヒト検体だけでなく動物検体も測定できるよう対応している。イヌやネコなどの動物検体での参考基準範囲は、200~1,400U/Lとヒトの10倍以上であり、膵疾病状態では2,500U/L付近まで存在する場合がある。従来のアミラーゼスライドAMYL-Pの測定域は1,200U/Lまでであり、イヌ検体の場合、無希釈の状態では全検体の約75%までしか測定できず (Fig. 8), 相当な頻度で再測定するか、検体を希釈 (または、希釈設定) して測定をしなければならないという煩雑性があった。

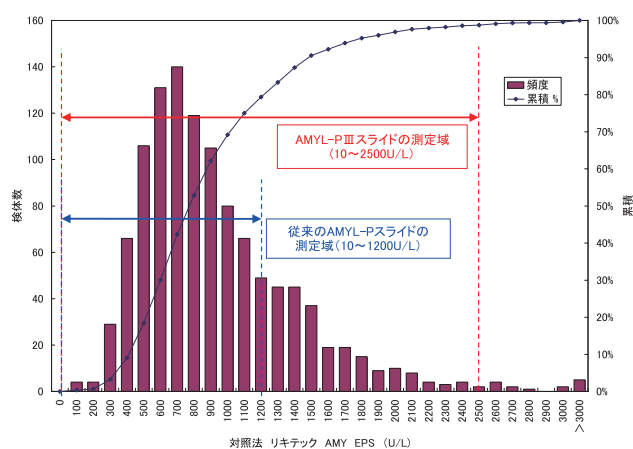


Fig. 8 Histogram of canine α -amylase activity (n=1133) and dynamic range of FDC AMYL-P Slide and AMYL-P III Slide.

したがって、標準化対応の試薬を検討する中で、再測定や希釈操作 (または、希釈設定) を無くして作業性を向上することを目的として、測定域の拡大を検討した。

高 α -アミラーゼ活性領域 (測定領域上限) の測定を制約する要因には、FDCアナライザーが採用している反射光学濃度測定の原理的限界がある。これは、色素の発色濃度が高くなりすぎると、色素の濃度変化に対する反射光学濃度変化が微小になり、精度良く測定できなくなることに対応する。標準化対応基質Et-G7-PNPを用いて作成したスライド (pH7.3) で、種々の α -アミラーゼ活性を持つ検体を測定した反射光学濃度の時間変化をFig. 9 Aに示した。初期の立ち上がり急峻であり、干渉物質などの影響を回避して測定できる時間 (2.5分から5分) での光学濃度の変化率は、1,900U/L付近で極大となっている。

このような光学濃度が高くなりすぎること回避する方策として、AMYL-P IIIではスライドの設定pHを意図的に低くすることで α -アミラーゼと基質の反応率を下げ、色素発色量を抑制した。つまり、設定pHを下げることで、酵素の反応率の低下と同時にPNP色素の発色効率をも抑えることとなり⁴⁾、両方の効果を用いて色素の発色濃度を相対的に低くすることを積極的に利用した (Fig. 9 B)。

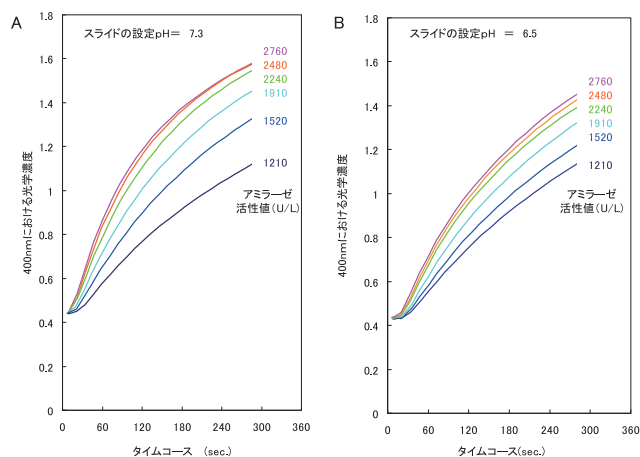


Fig. 9 Optical density time course of α -amylase activity in AMYL-P III Slide when the slide's pH is 7.3 (A) and 6.5 (B).

一方、スライドの設定pHをpH=6以下に下げすぎると色素PNPの解離が極端に抑えられ、低域~中域における感度が得られなくなるために最適な設定pHとしてpH=6.5を選択した。

2.1.2小節で選別した追従補助酵素 (微生物由来 α -グルコシダーゼ) の酵素活性は、pH6.5とpH7.3では変化がなく、相対的には有利な方向であると考えられる。

このようにして、 α -アミラーゼの反応性および色素の発色効率を下げることで高活性領域までの良好な直線性を有し、測定域上限を従来のAMYL-Pの1,200U/Lから2,500U/Lまで拡大することができた (Fig. 10)。

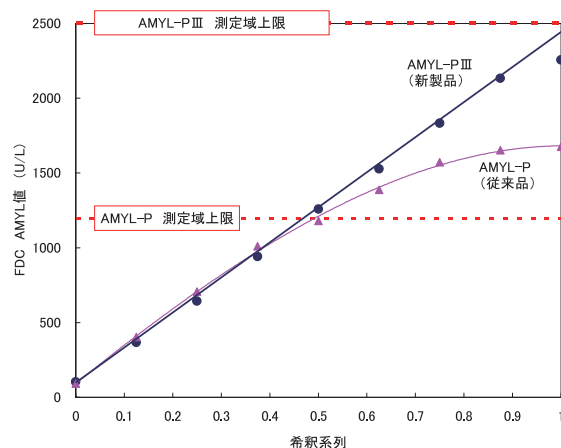


Fig. 10 Mutual dilution linearity data with human serum on AMYL-P III and AMYL-P.

3. 臨床性能

今回開発したFDC AMYL-P IIIスライドの有効性を確認するために、ヒトおよびイヌ検体を用いて臨床性能 (相関性) を評価した。

ヒト血清検体の相関性はFig. 6に示す通りであり、良好であった。AMYL-P IIIは血清検体だけではなく、血漿検体や尿検体も測定可能であり、いずれも次式で示す

ように対照法と良好な相関性を示した。

$$\begin{aligned} \text{血漿} &: y = 0.97x + 2.5 & R &= 0.995 \\ \text{尿} &: y = 0.97x - 9.0 & R &= 0.997 \end{aligned}$$

一方、動物、特にイヌ検体中には α -アミラーゼ（オリゴ糖鎖の中央を切断するエンド型の糖質分解酵素）以外に、ヒト検体にはほとんど存在しないグルコアミラーゼ（オリゴ糖鎖の非還元末端から順番に切断するエキソ型の糖質分解酵素）がおよそ15～80%存在する⁵⁾。従来のFDC AMYL-Pスライドでは、非還元末端がブロックされていないG5-PNPであったためにグルコアミラーゼなどによる余剰反応が起こり、標準化された対照法との相関性においては正誤差を生む要因となっていた。

一方、標準化法の基質Et-G7-PNPは、非還元末端がブロックされているためグルコアミラーゼなどによる余剰反応が起こらず、正誤差は発生しない（Fig. 11）。

このように、FDCの α -アミラーゼ活性測定スライドに標準化基質を採用することで、ヒト検体（血清、血漿、尿）および動物検体のすべてにおいて良好な相関性を有するものが得られることが検証された（Fig. 12）。

4. まとめ

標準化対応法と同じ基質Et-G7-PNPをFDCスライドに採用することで、良好な相関性を得た。同時に、イヌやネコなどの動物に存在するエキソ型糖質分解酵素のグルコアミラーゼなどによる余剰反応を防ぎ、相関性を改良した。

追随補助酵素を選択・最適化し、十分な高濃度（2,500U/L）まで α -アミラーゼの反応が追随補助酵素によるPNP色素生成速度を上回る条件を見出した（ α -アミラーゼ律速）。

スライドの設定pHをヒトの α -アミラーゼの至適pH7.3よりも合理的に低くして、 α -アミラーゼと基質との反応性および色素発色効率を下げ、反射測定的光学濃度を低下させることにより測定域の拡大（特に、測定域上限の拡大）を実現した。

このようにして、煩雑であった検体の再希釈や事前希釈操作が不要であり、測定値を標準化した富士ドライケム（FDC） α -アミラーゼ活性測定用スライドAMYL-PⅢを開発することができた。

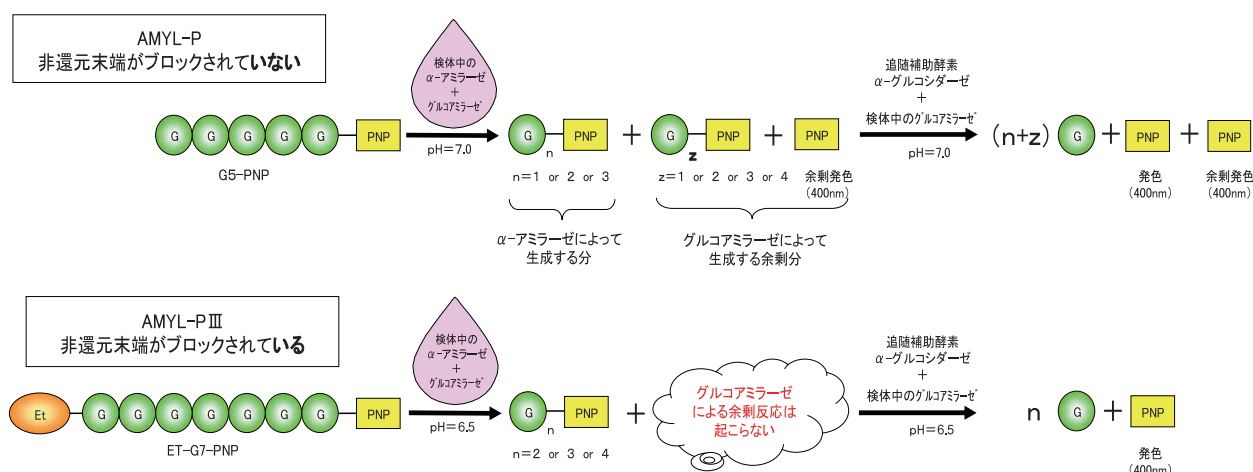


Fig. 11 Reaction Scheme of FUJI DRI-CHEM Slide AMYL-P and AMYL-PⅢ with extra-reaction based on glucoamylase.

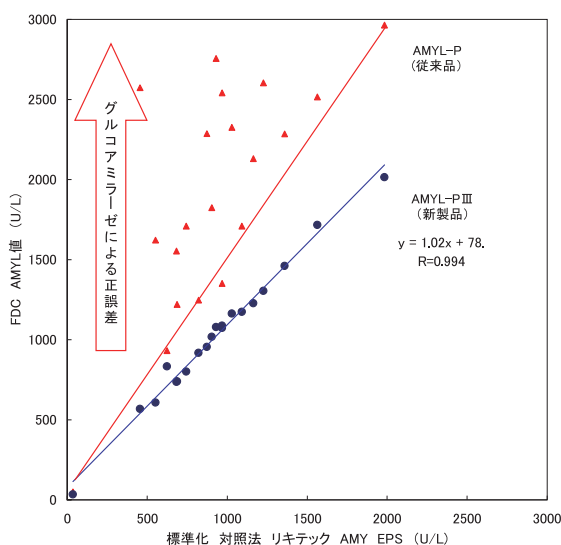


Fig. 12 Canine sample correlation of both FDC Slide AMYL-P and AMYL-PⅢ with Et-G7-PNP method run on a Hitachi automated analyzer. The samples were diluted three times by saline solution and measured for AMYL-P but were not diluted for AMYL-PⅢ.

5. 謝辞

本研究開発を進めるにあたって、動物検体の入手にご協力いただきました富士フイルムメディカル（株）CSCならびに営業の皆様にご心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Lorentz K. Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes Part9. IFCC Method for α -Amylase (1,4- α -D-Glucan 4-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1). Clin Chem Lab Med. **36** (3), 185-203 (1998).
- 2) 芳賀利一ほか. ヒト血清中酵素活性測定の勧告法 - α -アミラーゼ -. 臨床化学. **34** (suppl.1), 350-361 (2005).
- 3) 加藤隆則ほか. JCCLS自動化法での基準範囲の算出と標準化対応法のトレーサビリティの確認 - その1 ; T-AMY. 日本臨床検査自動化学会. **28** (4), 353 (2003).
- 4) 川崎和也, 寺島薫. ドライケミストリーによる小麦 α -アミラーゼ活性測定法の開発. 富士フイルム研究報告. No.48, 87-91 (2003).
- 5) Braun, J.P.; Ouedraogo, G.; Thorel, B.; Medaille, C.; Rico, A. G.. Determination of Plasma α -Amylase in the Dog : A Test of the Specificity of New Methods. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **28** (7), 493-495 (1990).

(本報告中にある“富士”, “FUJI”, “ドライケム”, “DRI-CHEM”は富士フイルム（株）の登録商標です。)