
演題名 血清ホスホジエステラーゼ酵素活性測定法の開発と臨床的意義

氏名 原田知明、外園栄作、大澤 進

所属 九州大学大学院医学研究院保健学部門 検査技術科学分野 臨床化学研究室

【目的】血清中ホスホジエステラーゼ (PDE) の酵素活性測定法を確立し、その臨床的意義について検討する。

【原理】

発色基質である Thymidine 5'-monophosphate 4-nitrophenyl ester (TPN) を基質として血清中のホスホジエステラーゼにより加水分解して生じた 4-ニトロフェノールの黄色を 405nm で初速度を計測し、酵素活性を求める。

【方法】

1. 試薬: 第一試薬 (R-1) pH: 9.65, 0.2mol/l トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン・酢酸緩衝液, 3.0×10^{-2} mol/l $MgCl_2$ を含む。基質試薬 (R-2) は TPN 2.62×10^{-3} mol/l 水溶液。

2. 測定条件: 血清 30 μ l を R-1 試薬 150 μ l と混合し、37°C で 5 分静置後、R-2 試薬 75 μ l を加え、主波長 405nm, 副波長 700nm のレート A 法にて測定を行った。

3. 使用機器

自動分析装置は、日立 7170 形自動分析装置を用いた。

【検討結果】

1. 至適 pH

血清を試料として THA (tris hydroxymethyl aminomethane) 緩衝液とトリス緩衝液を用いて至適 pH を求めたところ至適 pH は 9.65 であった。緩衝液濃度は緩衝能力を考慮し 0.2mol/L とした。

2. 活性化剤濃度

活性化剤の Mg 濃度は 18mmol/L であった。

3. Km 値

Mg イオンを含む THA 緩衝液での Km 値を Lineweaver-Burk のプロットで求めたところ、 1.31×10^{-4} mol/L であった。

4. 基質特異性

基質 TPN にアルカリホスファターゼ、ホスホリパーゼ D による基質水解を調べたが作用しなかった。

5. 基本活性特性

直線性は 290U/L、同時再現性 (n=20) は平均 40U/L で CV 0%、日差再現性 (n=20) は平均 55U/L で CV 1.1%、最小検出感度は 4U/L であった。干渉試験では乳びは 21000 ホルマジン濁度まで、遊離および抱合ビリルビンはそれぞれ 20mg/dL まで影響は見られなかった。500mg/dL Hb では -24% 負誤差が認められた。

6. 基準範囲

男女 128 例で 16.1~32.8U/L (平均 24.4 U/L) であった。男女の基準範囲は統計的に有意差があったので男女の基準範囲を求めると、男性 51 例では 15.8~31.0 U/L (平均 23.0 U/L)、女性 77 例では 16.6~34.1 U/L (平均 25.3 U/L) であった。

7. 他の生化学検査データとの関連性

PDE 活性と相関性が見られた検査は ALP と γ -GT で相関係数は共に 0.79 であり、その他の生化学検査および腫瘍マーカー、血球数や凝固検査とは関係が見られなかった。

【考察】

PDE の至適 pH はアルカリ性であるため緩衝液の安定性を維持するため緩衝液は 0.2mol/L とする必要があった。基礎的活性特性は良好であるが、Hb はアルカリ性による吸光度変化を生じ負誤差を与えた。

【結語】

PDE の測定条件を設定し、自動分析装置による性能評価は良好であった。男性と女性では基準範囲を区別する必要があった。PDE は ALP と γ -GT で相関性が見られたが、解離する例もあり、今後確定診断した患者での検討が必要である。