

■特集■

酵素検査の勧告法および標準化対応法—主要 8 酵素の現状と課題を整理する

2. 主要 8 酵素の勧告法

6) ChE (コリンエステラーゼ)

小池 亨

Medical Technology

第 51 卷 第 5 号 別刷

2023 年 5 月 15 日発行

2. 主要 8 酵素の勧告法

6) ChE (コリンエステラーゼ)

アーク調剤薬局/元 山梨大学医学部附属病院 検査部 技師長
小池 亨

コリンエステラーゼ (ChE) の JSCC 勧告法として備えるべき条件は、反応機序の明確さ、測定値に影響を及ぼす副反応の有無、分子吸光係数の明確さ、基質阻害の大小、非特異反応の有無、試薬調製の難易度、ジブカインナバー・フルオライドナバー測定への対応性などがあげられる。これらの条件を満たす勧告法として pHBC を基質とする方法が認定された。

● はじめに(勧告法決定までの経緯)

コリンエステラーゼ (cholinesterase ; ChE) には、アセチルコリンのみを加水分解するアセチルコリンエステラーゼ [EC 3.1.1.7] とアセチルコリン以外のエステルをも加水分解するコリンエステラーゼ [EC 3.1.1.8] があり、一般に前者を true cholinesterase, 後者を pseudo cholinesterase とよんでいる。血清 ChE として測定されるのは後者である。ChE は主として肝臓で生成され、肝での蛋白合成の増減を反映して変化することから、肝機能の全体的な指標として利用されている。また脂肪肝や有機リン製剤中毒の診断とフォローにも用いられる。

ヒト血清中の ChE 活性の測定には、初期においては、アセチルコリンを基質とし、ChE 活性により生成する酢酸による pH 変化を計測する柴田・高橋法が用いられていた。アセチルコリンは、上記の 2 種類のコリンエステラーゼに反応することや、pH 変化の非直線性などの問

題点を抱えていたため、多くの合成基質が開発された。日本臨床化学会勧告法 (JSCC 法) が制定されない状況下において、1998 (平成 10) 年には同学会に ChE 勧告法検討小委員会が組織され、以下の 3 つの基質が候補として選択され、それぞれの方法の特徴、問題点について検討されてきた^{1~3)}。

【基質の候補】

- ① 2,3-ジメトキシベンゾイルチオコリン (2,3-dimethoxybenzoylthiocholine ; DMBT) 〈東海支部〉
- ② *p*-ヒドロキシベンゾイルコリン (*p*-hydroxybenzoylcholine ; pHBC) 〈甲信越・中国支部〉
- ③ ヨウ化ベンゾイルチオコリン (benzoylthiocholine iodide ; BZTC) 〈関東支部〉

JSCC 勧告法として備えるべき条件項目としては、以下がある。

【勧告法の条件項目】

- ① 反応機序が明確で、モル吸光係数による計測

表 1 略語

ChE	: cholinesterase (常用名), acylcholine acylhydrolase (系統名), EC 3.1.1.8
4-HBO	: 4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase (常用名), 4-hydroxybenzoate, NADPH : oxygen oxidoreductase (系統名), <i>p</i> -hydroxybenzoate hydroxylase (別名), EC 1.14.13.2
PCO	: protococatechuate 3,4-dioxygenase (常用名), protococatechuate : oxygen 3,4-oxidoreductase (系統名), EC 1.13.11.3
pHBC	: <i>p</i> -hydroxybenzoylcholine iodide
pHBA	: <i>p</i> -hydroxybenzoic acid
PCA	: protococatechuic acid
NADPH	: β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced
FAD	: flavin adenine dinucleotide
BSA	: bovine serum albumin
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane

が可能であること。

- ② ChE に特異的であって、他の水解反応を含まないこと。
- ③ 至適基質濃度、至適 pH を維持しての測定が可能であること。
- ④ ジブカイン (dibucaine)、フルオライド (fluoride) などによる阻害試験が的確に行えること^{1,2)}。
- ⑤ 試薬の入手が容易であること。

ChE 報告法検討小委員会の第 6 回公開討論会 [2001 (平成 13) 年 9 月 14 日, パシフィコ横浜] では、上記の備えるべき条件項目を鑑みて、さらに酵素速度反応論的解析、非特異反応の解析、アロステリック酵素としての ChE の扱い、モル分子吸光係数などについて討論された。その結果、試薬調製で共役酵素系を使用すること、ジブカインナンバー (DN) やフルオライドナンバー (FN) の検討経過、それまでの日常検査に使われてきた経緯もふまえ、総合的な判断として「pHBC 法をヒト血清 ChE 活性測定 of 報告法候補として絞り進展させる」との方針が打ち出された。

これを受けて、日本臨床化学会甲信越支部では ChE 報告法案の作成に着手した。2002 (平成 14) 年 9 月に同学会の学術連絡委員会に提出

し、修正・追加などの指示を受けた後、2003 (平成 15) 年 3 月の理事会にて承認された (その間の経緯については、第 18 回～第 21 回日本臨床化学会夏期セミナー抄録集に記載されている)。

● JSCC 報告法

1) 略 語

JSCC 報告法にかかわる略語とその説明を表 1 に示す。

2) 適用範囲

本法は、血清 ChE 測定の日常検査法に対して基準となる測定法として、日常検査法による測定値のトレーサビリティを保つため、あるいは常用酵素標準物質の値付けのために用いる。

3) 測定原理

測定原理を図 1 に示す。

ChE は基質である pHBC を加水分解し、コリンと *p*-ヒドロキシ安息香酸 (*p*-hydroxybenzoic acid ; pHBA) を生成する (第一反応)。次いで、pHBA は NADPH の存在下において、4-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素 (4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase ; 4-HBO) によりプロトカテク酸 (protocatechuic acid ; PCA) に変換される (第二反応)。この時、酸化される NADPH の 340 nm における吸光度の減少から

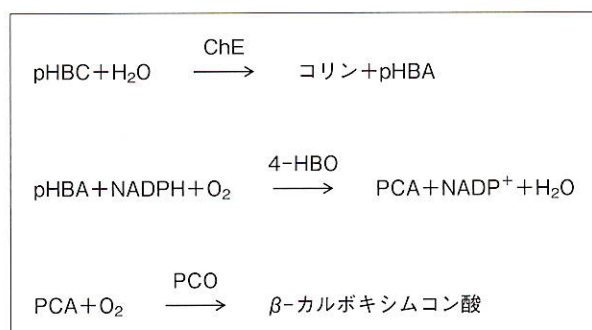


図 1 測定原理

表 2 試薬組成

試薬 I	
Tris-maleate 緩衝液	62.0 mmol/L (pH8.0±0.1, 37°C)
NADPH	0.25 mmol/L
FAD	2.5 μmol/L
BSA	0.25% (W/V)
4-HBO	1.12 U/mL
PCO	0.47 U/mL
試薬 II	
pHBC	6.2 mmol/L

表 3 試薬終濃度

Tris-maleate 緩衝液	50.0 mmol/L
NADPH	0.20 mmol/L
FAD	2.0 μmol/L
BSA	0.20% (W/V)
4-HBO	0.90 U/mL
PCO	0.38 U/mL
pHBC	1.0 mmol/L
pH (37°C)	8.0±0.1

ChE 活性を求める。第二反応の進行に伴って生ずる PCA の蓄積は主反応の吸光度測定に正誤差を与えるため、プロトカテク酸添加酵素 (protocatechuate 3,4-dioxygenase ; PCO) を反応液に共存させて測定系から除去する。

4) 試薬組成および測定操作

(1) 試薬組成・試薬終濃度

試薬組成を表 2 に、試薬終濃度を表 3 に示す。

(2) 測定操作

- ① 試薬 I 2 mL に検体 0.08 mL を加え、37°C で 5 分間加温する。
- ② あらかじめ 37°C に加温しておいた試薬 II 0.4 mL を加え混和後、37°C で 1 分間放置し、その後 2 分間の 340 nm における吸光度変化を測定し $\Delta A_2/\text{min}$ を得る。試薬ブランクは検

体の代わりに生理食塩水を用いて吸光度変化を測定し、 $\Delta A_1/\text{min}$ とする。

測定条件を表 4 に示す。

5) 酵素活性の定義、NADPH のモル吸光係数、計算および検量域

(1) 酵素活性の定義

ChE 活性の 1 単位 (U) は、前述の反応条件において 1 分間あたりに 1 μmol の基質を分解する酵素量と定義する。

$$1 \text{ U/L} = \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

(2) NADPH のモル吸光係数

NADPH のモル吸光係数は $6,300 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ とする。

(3) 計算法

測定した $\Delta A_1/\text{min}$, $\Delta A_2/\text{min}$ を次式に代入

表 4 測定条件

試薬 I	2.00 mL
検体	0.080 mL
(ただし、試薬ブランク測定時は生理食塩水)	
37°Cで5分間予備加温	
試薬 II *	0.40 mL
試薬 II を添加後 37°Cで1分間放置後、吸光度変化を2分間測定し、1分間あたりの吸光度変化を算出する	$\Delta A_2/\text{min}$
試薬ブランク	$\Delta A_1/\text{min}$

*試薬 I, II は 37°Cに予備加温.

表 5 試薬の規格

試薬名	略号	化学式	分子量	規格
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Tris	$C_4H_{11}NO_3$	121.14	99%以上 (JIS 特級)
Maleic acid	—	$C_4H_4O_4$	116.07	99%以上 (JIS 特級)
β -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt	NADPH	$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4 \cdot 4H_2O$	905.41	95%以上
4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase EC 1.14.13.2	4-HBO			pHBA に対する K_m は 5×10^{-5} mol/L 以下
Protocatechuate 3,4-dioxygenase EC 1.13.11.3	PCO			PCA に対する K_m は 5×10^{-5} mol/L 以下
p-hydroxybenzoylcholine iodide	pHBC	$C_{12}H_{18}O_3NI$	351.67	99%以上
Bovine serum albumin	BSA			FractionV ChE は 0.2 U/g 以下
Flavin adenine dinucleotide disodium salt	FAD	$C_{27}H_{31}N_9O_{15}P_2Na_2 \cdot 2H_2O$	865.55	98%以上
p-hydroxybenzoic acid	pHBA	$C_7H_6O_3$	138.12	99%以上
Protocatechuic acid	PCA	$C_7H_6O_4$	154.12	99%以上

して、ChE 活性を算出する.

ChE 活性 (U/L, 37°C)

$$= \frac{(\Delta A_2/\text{min} - \Delta A_1/\text{min})}{6.30 \times 10^3} \times \frac{2.48}{0.080} \times 10^6$$

単位の相互換算は、次の通りである.

$$1 \text{ U/L} = 0.0167 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$= 16.7 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$$

(4) 検量域

本法での測定下限は 10 U/L (37°C), 測定上限は 800 U/L (37°C) である.

6) 試薬規格

本法に用いる試薬の規格を表 5 に示す.

7) 測定試薬の調製法

測定試薬の調製法を以下に示す.

① 200 mmol/L マレイン酸溶液

② 試薬 I

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 7.51 g を精製水 900 mL に溶解し、37°Cに保ちながら 200 mmol/L マレイン酸溶液を約 67 mL 加えて pH を 8.0 ± 0.1 に調整する. NADPH 0.227 g,

表 6 測定機器の性能規格

項目	仕様	備考
波長の正確さ	±0.5 nm 以内	
波長設定の繰り返し精度	±0.2 nm 以内	
スペクトルバンド幅	2 nm 以下	
迷光	340 nm, 405 nm, 660 nm の波長で 0.03% 以下	
吸光度の比例性	吸光度 2 で ±3% 以内の直線性	
測光の正確さ	吸光度 0~1 の間で ±0.005 以内	NIST SRM9300 フィルターあるいは K ₂ Cr ₂ O ₇ 0.10 g を 1 mM HClO ₄ に溶解して 1 kg とした溶液を用いる
ベースラインの安定性	吸光度 0~1 の間で ±0.003 以内	
ノイズレベル	吸光度 2.0 付近において、スペクトルバンド幅 2 nm, レスポンス 2 秒の条件で 0.003 以下	
吸収セル	形状	角型
	光路長	10.00±0.01 mm 以内
	材質	石英製
測定温度の正確さおよび精密さ	吸収セル内測光部で 30.0±0.1°C, 37.0±0.1°C 以内	吸収セルホルダーの温度制御能 <ul style="list-style-type: none"> ・温度設定範囲：30°C, 37°C が設定できること ・温度リップル：±0.03°C 以内 ・温度調整幅：0.01~0.03°C 以下 ・温度ドリフト：周囲温度が ±2°C 以内の条件で ±0.04°C/30 min
その他の性状	デジタルあるいはアナログで吸光度が記録できること、活性値の自動算出機構および吸収セルホルダーの攪拌機構があることが望ましい	アナログ型レコーダ <ul style="list-style-type: none"> ・測定レンジ：吸光度 0~0.2, 0~0.5, 0~2.0 が使用できる ・確度：フルスケールの ±0.3% 以内 ・不感帯：フルスケールの ±0.1% 以内 ・平衡速度：フルスケールの移動時間 1.0 s 以下 ・チャートスピード：20~30 mm/min が使用できる

FAD 2.1 mg, BSA 2.5 g, 4-HBO 1,116 U, PCO 470 U を加えて精製水で全量 1,000 mL とする。

これらを添加した状態の pH は 8.0±0.1 となる。

③ 試薬 II

pHBC 2.18 g を精製水に溶解し、全量を 1,000 mL とする。

8) 測定誤差および精度

本法では、200~400 U/L の検体での同時再現性は CV (変動係数) で 5% 以内である。

9) 測定機器の性能

本法に用いる測定機器の性能規格を表 6 に示す。性能規格を満たす測定機器を用いて測定し、モル吸光係数が 6,240~6,360 (L・mol⁻¹・cm⁻¹) の値が得られる測定機器であることを確認したうえで本法を実施すること。なお、性能の確認法は、『臨床検査室における機器試験法マニュアル』[リファレンス法の開発・検討用分光光度計の性能規格⁴⁾, 340 nm 付近の NAD(P)H の見かけのモル吸光係数の算出法⁵⁾] に準じる。

10) 副反応の消去

ChE 反応と 4-HBO による共役反応の進行に伴って生ずる PCA が反応液中に蓄積すると主反応の検出に正誤差を与えるため、PCO により逐次、PCA を β -カルボキシムコン酸に酸化して反応系から除去することが本法での必須条件である。この時に必要な PCO 量を検討したところ最小必要量は 0.13 U/mL であったが、安定性、再現性などを考慮して 0.38 U/mL とした。

さらに、生成した PCA が本反応に影響を及ぼさないことを確認するために、ChE より生成する pHBA を HPLC で直接測定する方法と本法で比較を行った。

その結果、 $y=0.995x+1.776$ 、 $r=0.992$ と良好な相関 ($n=40$) を示し、本法には副反応の影響はないと考えられた。

11) 阻害試験

ChE 報告法案をまとめるにあたり、報告法として備えるべき条件として先述のような 5 項目を掲げたが、そのなかの「ジブカイン、フルオリドなどによる阻害試験が的確に行えること」については、検討過程において付帯要件として説明に加えることになった。そこで、変異リコンビナント rL330I のジブカインおよびフッ化ナトリウム (NaF) による阻害率を求めた。その結果、rL330I ではヒト血清の平均値よりも低値となり耐性を示し、両者の分別が可能であった。

12) 普遍性の検討

測定値の普遍性を確認する目的で、2 種類の血清試料によるサーベイを実施した。

本法の基本操作法 (用手法) による測定および K ファクター確認済みの自動分析装置による測定で、ほぼ同等の成績を示した (表 7)。

表 7 普遍性の評価

		試料 1	試料 2
基本操作法	Mean (U/L)	226.5	334.0
	SD (U/L)	3.79	5.67
	CV (%)	1.67	1.70
自動分析法	Mean (U/L)	231.5	340.6
	SD (U/L)	3.69	6.24
	CV (%)	1.59	1.83

Mean : 平均, SD : 標準偏差, CV : 変動係数.

13) 共用基準範囲

日本臨床検査標準協議会 (JCCLS) にて、以下の共用基準範囲が推奨された。

M (男性) : 240~486 (U/L)

F (女性) : 201~421 (U/L)

● 精確さの伝達⁷⁾

JSCC 報告法による精確さを伝達するために、JCCLS にて、常用参照標準物質の設定、認証値の設定手順、標準操作法 (SOP) の設定、常用参照標準物質 [ChE (JCCLS CRM-002d)] を用いた測定法の総合的な不確かさの評価と許容限界について規定された。

さらに、JCCLS により認証された標準物質を用いて、測定法の総合的な不確かさの評価と許容限界が示された。

● おわりに

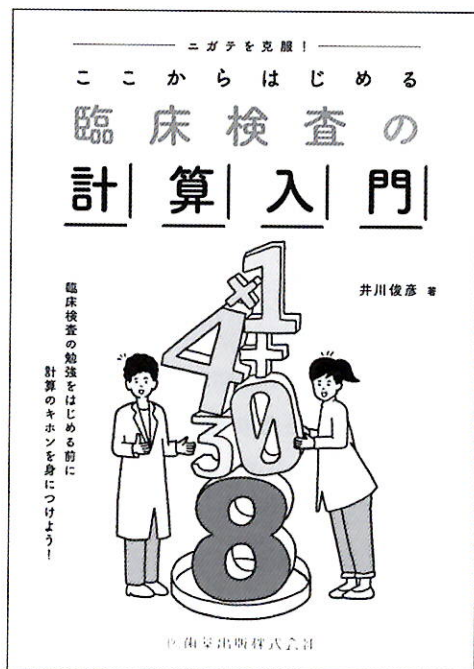
ChE の報告法としての問題点は、特に提起されていないので、日本初のグローバルスタンダードの構築が懸案事項として残されている。次のステップとして、JSCC 報告法を、IFCC 法として提示する必要がある。

文献

- 1) 刈米和子, 他: 血清コリンエステラーゼ日本臨床化学会報告法試案および各種測定法の特異性に関する検証 (第一報). 臨床化学, 28 (2): 78-83, 1999.

- 2) 市原文雄, 他: 血清コリンエステラーゼ日本臨床化学会勧告法試案および各種測定法の特異性に関する検証(第二報). 臨床化学, 28 (2): 84-90, 1999.
- 3) 大澤進, 他: ベンゾイルチオコリンを用いた血清コリンエステラーゼ活性測定のための紫外部検出試薬の開発と応用. 臨床化学, 24 (3): 138-145, 1995.
- 4) 日本臨床化学会教育委員会, 他 編: リファレンス法の開発・検討用分光光度計の性能規格. 臨床検査室における機器試験法マニュアル, pp.32-37, ありい出版, 1993.
- 5) 日本臨床化学会教育委員会, 他 編: 340 nm 付近の NAD (P) H の見かけのモル吸光係数の算出法, 臨床検査室における機器試験法マニュアル, pp.38-47, ありい出版, 1993.
- 6) 日本臨床化学会酵素専門委員会: ヒト血清中酵素活性測定のための勧告法: コリンエステラーゼ. 臨床化学, 32 (2): 162-179, 2003.
- 7) 日本臨床検査標準協議会: JCCJS による酵素活性測定の標準操作法 (SOP) コリンエステラーゼ (ChE). 日本臨床検査標準協議会誌, 21 (1): 64-65, 2006.

これから学びはじめる人に役立つ, キホンからわかる計算入門!



—— ニガテを克服! ——

ここからはじめる 臨床検査の 計算入門

井川俊彦 著

B5判 112頁

定価1,980円(本体1,800円+税10%)

ISBN978-4-263-22689-6

こちらを読み取ると
詳しい情報がご覧いただけます



- 臨床検査技師をめざすにあたりマスターしておきたい計算の知識について, 小学校の算数からわかりやすく解説.
- 四則, 分数, 指数, 対数といった基本の計算はもちろん, 臨床検査の勉強が必要とされる有効数字, 濃度の計算, pH, 電気回路, 波など化学・物理の計算についても分かりやすく紹介.
- 各項目に設けられた練習問題で理解度をチェックしながら学習を進めることができる.
- 養成校に入学したばかりの学生や入学を控えた方に最適!

医歯薬出版株式会社 ☎113-8612 東京都文京区本駒込1-7-10 TEL03-5395-7610 FAX03-5395-7611 <https://www.ishiyaku.co.jp/>