

臨床医化学分析における標準化の現状と課題

加藤 尚志*

(平成18年3月27日受理)

A Survey on standardization of clinical chemistry

Hisashi KATO

1. はじめに

医療の現場において臨床検査技師が行う臨床化学分析は、客観的な医療情報を提供する方法として現代の診療に欠かせないものとなっている。臨床化学分析により得られるデータは、医師が臨床現場においてそれぞれの患者に対して正確な診断を下すために必要不可欠なものである。そのため、これまでもその精度管理に対しては古くから注意が払われてきたが、その多くは検査施設内での再現性が意識されるにとどまっていた。

近年の臨床検査の普及、分析機器・試薬の広域化などにより、地域・国内は元より国際的に比較可能な形でデータを取得することが求められている。臨床化学検査データの標準化は、測定機関間での相互比較が可能となることによる患者自身の負担減少だけではなく、臨床検査データと個々の症例などを組み合わせたデータベース構築や診断基準の精度向上などの効果が期待されており、標準化についての取り組みもより活発化している。

標準化を進める上で必要な作業にはいくつかの要件が考えられるが、国家標準研究機関である計量標準総合センター (NMIJ) による寄与が期待されているのは、標準物質の設定および作成と精度保証の維持、および基準となりうる測定法の設定などがあげられる。NMIJでは、これらの分野における社会的な要請を元に、バイオメディカル標準研究室を新設し、臨床化学検査分野における標準物質開発などを行っている。

本調査研究では、臨床化学分析分野で検査対象とされている物質や項目のうち、蛋白や酵素などの高分子成分を除いたいわゆる低分子化合物について、その標準化に対する取り組みと現状を調査し、今後の標準開発に向けての課題などについて考察を行った。

2. 臨床医化学分析に関する国際標準化に対する現状

近年各国の国立標準研究所などを中心にして急速に整備が進められている標準物質に関する国際的な連携活動は、国際的な相互承認につながる計量標準のトレーサビリティの確保とそれを裏付ける不確かさ評価・表現の整合化をその基礎としている。測定結果の信頼性を表現するために、計量標準分野及び標準物質分野では「不確かさ」の概念が広く導入されている。パリのBIPM (Bureau international des poids et mesures, 国際度量衡局) を中心とするいくつかの国際合同委員会の設置でも、国際的な共通ガイドラインなどを整備するJCGM (Joint Committee for Guides in Metrology, 計量関連ガイドに関する合同委員会) において、計測・計量分野における重要な文書として知られているVIM (International Vocabulary of basic and general terms in Metrology, 国際計量基本用語集) の改訂 (第3版の編集) とGUM (Guide to the expression of Uncertainty in Measurement, 計測における不確かさの表現のガイド) を補完する文書の編集・作成が精力的に進められ、「不確かさ」の概念の普及を行っている。

基準測定操作法 (Reference Procedure) と標準物質の整備に関してはJCTLM (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, 検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会) を中心に進められており、国内においてはJCCLS (Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards, 日本臨床検査標準協議会) が先頭に立って国内における検査値の互角性確保に向けた作業が開始されている。

JCTLMは2003年12月からヨーロッパで施行された「欧州におけるIVD (In Vitro Diagnostics, 体外診断検査) に関するEU指令」に対応した臨床化学分野における国際整合性を持った基準測定法や標準物質の開発を目指しており、現在「トレーサビリティの確保された標準物質の開

* 計測標準研究部門 有機分析科

発と国際的に合意（認証）された基準測定操作法の選定」を目的としたワーキンググループ（WG）1と、これらを利用した国立標準研究所や基準測定検査室などによる国際的なネットワークラボラトリー構築を目的としたWG2のふたつを設置して、活発な議論を行っている。

WG1のPhase Iでは電解質、代謝物、ホルモン、凝固因子、タンパク質、ドラッグ、酵素、核酸の8分野、Phase IIでは血液型、血中ガス、生体中金属元素、ビタミン、感染症の分野においてトレーサビリティ体制を構築することを旨とし、高位標準物質と基準測定操作法を選定した。2006年2月1日に発表された第2回エントリーまでの選定結果はすでにBIPMのWebサイトに掲載されており、自由に閲覧することが可能となっている。現在125件の基準測定操作法（67項目）と193種類（113項目）の標準物質が登録されている。標準物質のリストはList IとList IIがあり、List IはSIトレーサブルあるいは国際的承認の得られた測定法により値付けされている標準物質、List IIは非SIトレーサブル標準物質となっている。また、選定された標準物質は“Higher Order”であり、“The Highest Order”ではないが、日常測定のための標準物質生産や測定法確認などの目的には上位標準として利用可能であるとみなされている。

現在List IIに掲載されている標準物質や基準測定操作法は各標準研究所や臨床検査機関からノミネートされたものが登録されている。しかし、今後は標準物質について

はその生産者が、基準測定操作法に関してはその測定を行っている機関（NMI、基準測定検査室、メーカー）がそれぞれの証拠（論文、標準物質など）をつけてノミネートする形に変更されていく予定となっている。WG 1では、これに準拠する形で標準物質及び基準測定操作法ノミネーション運用マニュアル（Quality Manual）の策定がすすめられている。

WG2では、これまでに各国から67の試験所・研究所がネットワークラボラトリーとしてノミネートされた。日本からはNMIJ、HECTEF (Health Care Technology Foundation, 福祉・医療技術振興会) などがノミネートしている。現時点では各ラボラトリーはJCTLMに参加している各国臨床関連機関からの推薦であり、各ラボラトリーの測定能力に関しては自己宣言を受け入れて選別等の作業は行っていないが、将来的にこの枠組みに参加していくためにはネットワークラボラトリーとして国際的な精度管理に参加して、国際的な相互承認を目指す必要がある。

3. 臨床医化学分析に関する国際標準物質の現状

JCTLMでまとめたList Iには、いわゆる低分子化合物に関する標準物質として102種類71化合物が掲載されている（表1）。これらはすべて前述の通り世界各国の標準研究機関や臨床検査機関からエントリーされたものであり、なかでもNIST (National Institute of Standards and Technology,

表1 臨床化学分析分野で利用されている主な標準物質

物質名	マトリクス	ID	頒布元
cholesterol	cholesterol crystalline material; neat	GBW09203b	NRCCRM / China
cholesterol	cholesterol crystalline material; neat	SRM 911b	NIST / USA
cholesterol	human serum	JCCRM 211	HECTEF / Japan
cholesterol	human serum (frozen)	SRM 1951b	NIST / USA
cholesterol	human serum (lyophilized)	SRM 1952a	NIST / USA
cholesterol	human serum (lyophilized)	SRM 968c	NIST / USA
cholesterol	human serum (lyophilized)	SRM 909b	NIST / USA
creatinine	human serum	BCR-573	IRMM / Belgium
creatinine	human serum	BCR-574	IRMM / Belgium
creatinine	human serum	BCR-575	IRMM / Belgium
creatinine	creatinine crystalline material; neat	SRM 914a	NIST / USA
creatinine	human serum	SRM 909b	NIST / USA
glucose	neat glucose crystalline material	SRM 917b	NIST / USA
glucose	human serum (frozen)	SRM 965a	NIST / USA
triglyceride	human serum	JCCRM 223	HECTEF / Japan
triglycerides	human serum	SRM 909b	NIST / USA
tripalmitin	tripalmitin crystalline material; neat	SRM 1595	NIST / USA
urea	urea crystalline material; neat	SRM 912a	NIST / USA
urea	urea crystalline material; neat	GBW09201	NRCCRM / China
urea	human serum	SRM 909b	NIST / USA
uric acid	human serum	SRM 909b	NIST / USA
uric acid	uric acid crystalline material; neat	SRM 913a	NIST / USA
uric acid	uric acid crystalline material; neat	GBW09202	NRCCRM / China

アメリカ) からエントリーされたものは58種類と過半数を超えている。その他, NMIA (National Measurement Institute Australia, オーストラリア), LGC (Laboratory of the Government Chemist, イギリス) が各13種類, IRMM (The Institute for Reference Materials and Measurements, ベルギー) が12種類, NRCCRM (National Research Center for CRM's, 中国) が3種類となっている。これに対し, 日本からの登録はHECTEFからヒト血清コレステロールとヒト血清トリグリセリドの2種類がエントリーされているにとどまり, 諸外国に比べ, 臨床分野での標準物質の整備が遅れている実情が見うけられる。

これらの標準物質の提供形態としてはヒト血清が46種類と最も多く, ついで水溶液や結晶を含む純物質系が43種類, ヒト尿が11種類, 牛血液が1種類となっている。なお, 2004年4月段階の第一回エントリーからの増分を見ると, 純物質系が0であるのに対し, ヒト血清試料が8種類, ヒト尿試料が1種類増加しており, 世界的に見てもいわゆる組成標準物質の開発が精力的に行われている様子が見られる。

4. 臨床化学分析に関する国際基準測定操作法に関する現状

JCTLMのListIに掲載されている低分子化合物に関する基準測定操作法は56種類26化合物である(表2)。手法としては, ガスクロマトグラフィー(GC)や液体クロマトグラフィー(LC)を併用した同位体希釈質量分析法(ID/MS)が最も多く51種類とそのほとんどを占め, その他の5種類はUVなどの分光学的手法を利用したものとなっている。現在標準物質と共にJCTLMにおいて基準測定操作法に関する第3回のエントリーが行われており, 今後さらに増加していくことが期待される。

5. 基準測定操作法に関する国内の取り組み

国内における臨床検査関連の標準化については, 主にJCCLSが各種の小委員会を設けて産学の関連団体から提示などについて承認・検討を行っている。低分子化合物に関する基準測定法に類するものとしては, 日本臨床化

表2 臨床化学分析分野で利用されている主な基準分析法

物質名	頒布元	適用試料	分析法
cholesterol	DGKC	human serum or plasma; lyophilized, fresh, or frozen	ID/GC/MS
cholesterol	CDC	human serum; lyophilized, fresh, or frozen	Spectrophotometry
cholesterol	NIST	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
cholesterol	U. Of Ghent	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
creatinine	DGKC	human serum or plasma; lyophilized, fresh, or frozen	ID/GC/MS
creatinine	DGKC	human urine; lyophilized, fresh, or frozen	ID/GC/MS
creatinine	NIST	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
creatinine	U. Of Ghent	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
glucose	NIST	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
glucose	U. Of Ghent	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
glucose	CDC	human serum	Spectrophotometry
total glycerides	NIST	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
triglycerides	NIST	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
urea	DGKC	human serum or plasma; lyophilized, fresh, or frozen	ID/GC/MS
urea	DGKC	human urine; lyophilized, fresh, or frozen	ID/GC/MS
urea	NIST	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
urea	CDC	human serum	Spectrophotometry
uric acid	DGKC	human serum or plasma; lyophilized, fresh, or frozen	ID/GC/MS
uric acid	DGKC	human urine; lyophilized, fresh, or frozen	ID/GC/MS
uric acid	NIST	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS
uric acid	U. Of Ghent	human serum; lyophilized, fresh or frozen	ID/GC/MS

学会 (JSCC) による勧告法があり、現在までに測定方法および標準物質関連が17編、規格・指針に関するもの16編の計33編が公開されている。ここで報告されている勧告法は、いわゆる実用基準法に相当するものであり、同位体希釈質量分析法などの一次標準分析法と、実際の医療現場で用いられている日常法の間をつなぐ存在である。また、これらの勧告法は「理想的な標準分析法」を構築することを目的としているのではなく、「患者データの相互比較を可能にするための方法」として位置づけられている。そのため、いくつかの手法においては一次標準分析法で得られた結果との間に系統的な誤差が生じていることが指摘されている。しかし、施設間誤差などについて詳細な検討が行われており、勧告法が本来目標としている「患者データの相互比較」という目的には十分に使用できるものとして広く普及している。

6. 臨床化学分析分野における低分子化合物分析の標準化への取り組み

臨床化学分析分野において、低分子化合物の分析値は活性や力価に基づいて体系づけられている酵素や抗体、ワクチンなどとは異なり、工業的な化学物質と同様にSI単位系にトレーサブルな形で体系づけられることが期待される (図1)。すなわち、SIトレーサブルである一次標準分析法によって値付けされた純物質系一次標準物質を介し、これにより値付けが行われたマトリクスを含む組成標準物質が存在する場合である。この場合、その下に実用基準法、二次標準物質、常用標準物質などが連なり、実際の医療現場で用いられている日常分析法につながる。しかし、臨床化学分析の対象となる物質の場合SIトレーサブルであることを期待できない場合もあり、その場合にはJSCC勧告法やCDCレファレンス法のような実用基準法にトレーサブルな形で標準化が図られる場合もある。

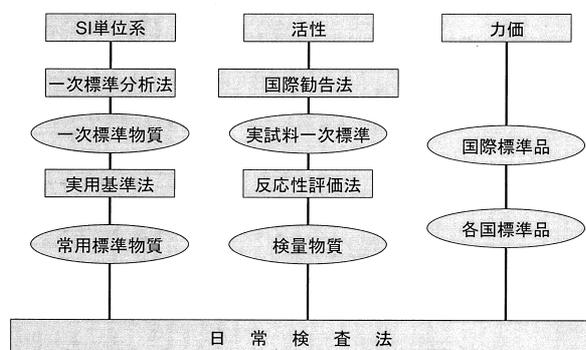


図1 臨床化学分野におけるトレーサビリティ

そのため、JCTLMではいわゆるprimary methodであるID/MS法以外のこれらの手法も基準測定操作法として登録されている。

以下では、それぞれの化合物について、JCTLMに登録されている基準測定操作法を中心に、日本国内での標準測定法として用いられているJSCC勧告法、そして実際の医療現場において用いられている日常分析法の現状について述べる。

6.1 グルコース (Glucose)

6.1.1 総論

D-グルコースは血中に含まれる糖質の中でもっとも多量に存在する化学種であり、解糖系により代謝を受けることで人体の重要なエネルギー源として使用されている。グルコースは通常その95%がグリコーゲンの形で肝臓や骨格筋細胞中に貯蔵されている。細胞内での需要が高まると肝グリコーゲンが分解され遊離グルコースが血中に放出されるが、通常は余剰の血中グルコースは腎糸球体において濾過され、尿管管でほとんど再吸収される。しかし、糖尿病などにより血中グルコース濃度が160~180 mg/dlを超えると、尿中に排出され尿糖が出現する。

血糖値を測定する場合、全血状態では赤血球によるグルコース代謝が進み誤差が生じる場合が多く、速やかに血清などの状態にするか、フッ化ナトリウムなどの阻害剤を添加する、氷冷するなどの対策が必要²⁾となる。

6.1.2 標準物質の状況

グルコース関連の標準物質としては、現在NISTから純物質標準であるSRM917bと組成標準物質であるSRM965aの二種類が配布されている。これらの値付けは917bに関しては、NMR、カールフィッシャー法による水分測定、灰化による残渣重量分析、HPLCによる差数法などで純度を決定している。また、965aはGC-ID/MSにより値付けが行われている。

6.1.3 基準測定操作法

グルコースの一次標準分析法としてよく用いられているのは、NISTにより報告されているGC-ID/MS法³⁾である。この手法は除蛋白後にジブチルボロン酸と無水酢酸により誘導体化し、GC-MSにより測定を行う。通常1%以下の不確かさで測定を行うことが可能であり、JCTLMにも登録されている。

この他、GC-ID/MSとしてJCTLMに登録されている手法として、ベルギーのGhent大学から提案されているアルドニトリル化後にアセチル化をしてID-MSを行う手法⁴⁾⁵⁾

がある。これはMagniらの手法⁶⁾の一部を改良して前処理に必要な時間などを短縮したもので、この手法でも1%前後の不確かさで測定することを可能としている。

また、この他CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 米国疾病予防管理センター) が、後述するヘキソキナーゼを利用した手法⁷⁾を登録している。

6.1.4 JSCC勧告法⁸⁾

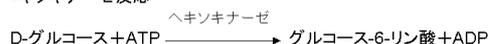
グルコースのJSCC勧告法としてはAACC (American Association of Clinical Laboratory Standards, 米国臨床化学学会) のレファレンス法であるヘキソキナーゼ (HK) - グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) 法⁷⁾を改良したものが提案されている (図2)。測定手順としては、水酸化バリウム溶液と硫酸亜鉛溶液を用いたソモジー法⁹⁾による除蛋白操作を行った後、それぞれの酵素を含む測定試薬により反応させ、試薬盲検を対象に生成物であるNADPHの340 nmにおける吸光度を測定する。

勧告法では検量線を必要としないように、厳密に試薬の反応時間や温度などが設定されているが、実際には測定上限を400 mg/dlとして設定した5種類の濃度を持つ標準試料により検量線を作成して定量値を求めることが推奨されている。このようにして厳密に手順を遵守して測定した結果、同時測定における再現性はCV値で2%以下であり、施設間で生じる誤差も±2.0 mg/dl程度にとどまったと報告されている。ID/MSでの測定値との相関についても検討され、それぞれの値が十分に一致することが示されているが、除蛋白操作を省くと5-8 mg/dl程度低い値が得られることも報告されている。

6.1.5 主な日常分析法

グルコースの日常分析法としては、主にアルデヒド基に対する還元力を利用したものと、グルコースオキシダーゼなどの酵素を用いた方法、そして無機酸あるいは酢酸と共に加熱して、フルフラール誘導体に変換する酸性

反応 1: ヘキソキナーゼ反応



反応 2: グルコース-6-リン酸脱水素反応



- 生成したNADPHの吸光度増加を測定
- α 型、 β 型いずれのグルコースとも反応
- 抗凝固剤の影響を受けず、尿中グルコースにも適用可能
- 前処理(除蛋白操作)を省くと、5-8 mg/dl低値を示す

図2 グルコースJSCC勧告法の反応原理

縮合法がある。

還元法として広く用いられてきた方法にHagedorn-Jense法¹⁰⁾がある。この手法は他の還元法と比べても10 mg/100 ml程度高い値を示すが、安定した値を示すことが知られている。反応の手順としては、血液を硫酸亜鉛と水酸化ナトリウムで除蛋白し、濾液をフェリシアン化カリウムのアルカリ性溶液中で加熱する。グルコースの還元力によりフェリシアン化カリウムから生じたフェロシアン化カリウムを硫酸亜鉛とヨウ化カリウムの混液でフェロシアン複塩として沈殿させる。酢酸酸性溶液中で未反応のフェリシアン化カリウムがヨウ化カリウムとの反応で遊離したヨウ素分子をチオ硫酸ナトリウムで滴定することにより、間接的にグルコース量を求めることができる。

Somogyi-Nelson法¹¹⁾⁻¹²⁾とFolin-Wu法¹³⁾⁻¹⁴⁾は共に除蛋白後に硫酸銅を加え、グルコースとCu²⁺の反応により生じた亜酸化銅により還元生成されたモリブデンブルーの吸光度を測定する方法である。タングステン酸と硫酸で除蛋白し、発色試薬にリンモリブデン酸を用いるFolin-Wu法に対し、硫酸亜鉛と水酸化バリウムにより除蛋白し、その後ヒ化モリブデン酸により発色するSomogyi-Nelson法は、非糖還元性物質のほとんどが除去されるため、還元糖としても15 mg/dlほど低い値が得られることが知られている。しかし、Folin-Wu法では非糖還元性物質を完全には除去できないため、逆に真のグルコースよりも20 mg/dlほど高い値を示すと言われている。

酵素法はJSCC勧告法としても用いられているが、その他にもacylP glucose-6-phosphotransferase法¹⁵⁾やグルコースオキシダーゼ法¹⁶⁾⁻¹⁷⁾などが日常分析法として用いられている。後者はグルコースオキシダーゼにより生成された過酸化水素を定量する手段によりいくつかの手法に分類され、代表的なものにペルオキシダーゼとo-トリジンにより発色させる手法¹⁶⁾や酸素電極により定量する方法¹⁷⁾がある。

酸性縮合法の代表としては、o-トルイジン・ホウ酸法(OTB法)¹⁸⁾がある。この手法は、酢酸溶液中でグルコースを加熱することにより得られたフルフラール誘導体をチオ尿素で安定化し、o-トリジンと縮合させてからホウ酸溶液中で比色定量を行う手法であり、比較的簡便である。

6.2 クレアチニン (Creatinine)

6.2.1 総論

クレアチニンは、筋や神経内においてクレアチニンリン酸から直接、あるいはクレアチンの脱水によって生成

されて血中に出現し、腎糸球体から濾過されて、そのほとんどが尿中に排出される。一日当たりの尿への排出量は、食事などで変化することはほとんど無く、各人の筋肉量にほぼ比例するため、糸球体濾過値（GFR）を求めることで、高窒素血症が腎前性か腎性かの判断基準となるなど、主に腎機能の評価に用いられている。

6.2.2 標準物質の状況

クレアチニン関連の標準物質として、現在NISTから純物質標準としてSRM-914aが頒布されている。また血清試料としてはIRMMから濃度レベルの異なる三種類（BCR-573,574,575）とNISTから頒布されているSRM-909bの4種類が登録されている。

値付け手法としては、SRM-914aはNMR、カールフィッシャー法による水分測定、灰化による残渣重量分析の他に中性子放射化分析による元素分析も行われている。またBCR-573,574,575は、GC-ID/MSとHPLC-UV法が用いられており、SRM-909bもGC-ID/MSによる値付けが行われている。

6.2.3 基準測定操作法

JCTLMには血清、尿などに含まれるクレアチニン分析法として4種類のGC-ID/MS法とLC-ID/MS法1種類が登録されている。

DGKC（Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie, ドイツ臨床協会）は、クレアチニンをイオンクロマトグラフィーによりクレアチニンと分離した後でトリメチルシリル（TMS）化を行う手法¹⁹⁾を提唱している。クレアチ

ニン-¹³C,¹⁵N₂を内標準として用いることによりCV=0.77%の再現性を得ている。DGKCはこの手法を元に、血清試料と尿試料に対応した二種類の手法をJCTLMに登録している。

これに対しNISTはクレアチニン-¹³C₂を内標準として用い、酸性レジンカラムによりクレアチンと分離後エチルエステル誘導体化する方法²⁰⁾を提唱している。この手法ではCV=0.23%の再現性で結果が得られると報告されている。

Ghent大学の提唱している手法は前処理にイソクラティックモードのLCを用いることで簡便化している。さらにt-Butyldimethylsilyl誘導体を用いることでカラムメモリー効果を抑え、1%前後の不確かさでの測定を可能としている⁴⁾。

LC-ID/MS法はJCTLMにおける基準測定操作法登録の第二回エントリー時にLGCから追加登録された手法²¹⁾で、ESI-positiveモードによる測定を行っている。血清試料からの抽出法や、内標準の種類や添加法などについて検討し、エタノールによる除タンパク操作とd₃-クレアチニンを内標準として用いた場合にもっとも良い精度で測定できることを確認している。しかし、GC-ID/MS法で得られた認証値に対して0.2%ほど低い値が得られていることも同時に報告されている。

6.2.4 JSCC勧告法²²⁾

血清クレアチニンに関するJSCC勧告法はトリクロロ酢酸除蛋白法と強酸性陽イオン交換樹脂によるイオンクロマトグラフィー-紫外吸光検出法を組み合わせたものである（図3）。

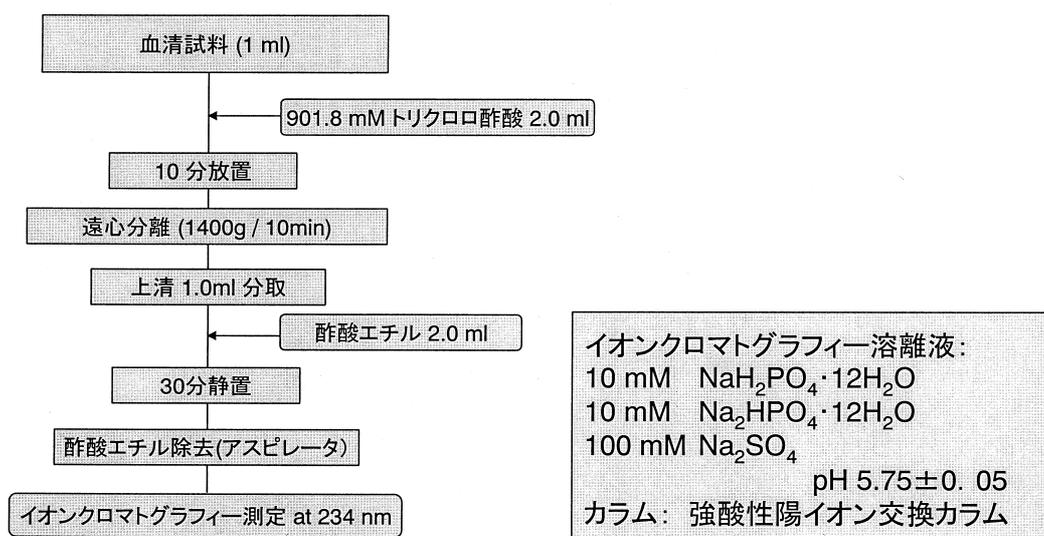


図3 クレアチニン JSCC勧告法プロトコル

各試料におけるクレアチニン濃度の計算手順は以下の通りである。NISTから頒布されているSRM-914aを用いて作成した7系列の濃度溶液について、ピーク面積と濃度の直線性を確認する。HPLCにより得られたピーク面積値と100.0 mg/l標準溶液を試料測定の前頭、中間、最後にそれぞれ二重測定をし、計6回のピーク面積平均値から含有量を計算する。この時、標準溶液の面積再現性はCV=2%以下であることが求められている。

13種の生体成分と11種類の各種薬剤について、これらの影響による妨害について調べられているが、常用血中濃度の10倍程度まで添加しても影響は見られないという報告がある。しかし、標準水溶液との間に前処理に由来すると思われる系統的な誤差があることも報告されている。また、常用法を用いた場合、HPLC法に対して17.6~26.5 μ mol/lほど高い正の誤差を持つことも報告されている。

6.2.5 主な日常分析法

クレアチニン分析にはアルカリ性条件下でピクリン酸と反応させるJaffe反応と酵素反応が利用されている。

Jaffe反応²³⁾を利用した手法には、タングステン酸ナトリウム-硫酸系溶液で除蛋白をした上清中の赤色複合体を比色定量するFoli-Wu法²⁴⁾が有名であるが、活性メチレン基を持つアスコルピン酸やピルビン酸、アセトン、グルコースなど様々な物質の妨害を受けるため、このまま測定した血清クレアチニン値の15-20%はクレアチニン以外の物質による呈色と考えられており、これをnon-creatinine chromogen (NCC)と呼んでいる。また、尿中におけるNCCは5%程度と見積もられている。NCCによる妨害を防ぐための試みとして、Lloyd試薬²⁵⁾や初速度反応解析²⁶⁾などにより特異性を向上させる試みがされている。これにより、除蛋白操作が不要な方法も開発され、自動分析装置にも利用されているが、初速度反応解析においてもピルビンによる妨害で負の誤差が生じることが知られている。

酵素法ではクレアチナーゼ、クレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼを連続的に作用させ、最終的に生成する過酸化水素をペルオキシダーゼにより呈色させる方法²⁷⁾が広く用いられている。しかし、ピルビンなどの還元性物質により負の誤差を生じることが知られており、同時に生成されるホルムアルデヒドをホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼにより分解して比色定量を行う手法²⁸⁾も知られている。

6.3 尿素 (Urea)

6.3.1 臨床的意義

尿素は人体における窒素代謝の最終産物であり、アミノ酸由来のアンモニア二分子と二酸化炭素一分子から肝臓内において(オルチニン回路)合成される。尿素は糸球体から尿中に排出されるため、肝疾患の場合には尿素合成能力低下と共に血中尿素量が低下し、腎機能不全の場合には尿素的の分泌能力の低下と共に血中尿素量は増加することが知られている。

6.3.2 標準物質の状況

尿素関連の標準物質として、NISTから純物質標準物質であるSRM-912aが頒布されている。また、血清標準物質であるSRM-909bにおいても認証物質の一つとして登録されている。その他、NRCCRMからも純物質系標準物質一種類がJCTLMに登録されている。

値付け手法としては、SRM-912aにおいては示差走査熱量測定法により純度が測定され、カールフィッシャー滴定法などで水分などの不純物を測定している。また、SRM-909bにおいてはGC-ID/MSにより値付けがされている。

6.3.3 基準測定操作法

JCTLM List I に登録されている尿素分析法にはGC-ID/MSを用いたものとして、NISTから提唱されている血清分析用プロトコル²⁹⁾とDGKCから提案された血清分析用、尿中尿素分析用各一種類ずつ³⁰⁾が提唱されている。この他にCDCから酵素法による手法³¹⁾が登録されている。

NISTによるGC-ID/MS法は¹⁸Oによりラベリングした尿素を用い、同位体平衡を達成後血清試料からメタノール抽出した尿素から6-methylurasilを経て6-methyl-2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]pyrimidineの形に変換して定量を行う。これに対し、DGKCは¹³C,¹⁵N₂ureaを添加した系で、尿素を2-hydroxypyrimidineのtrimethylsilylether誘導体の形に変換して測定を行っている。

酵素法はTalke³²⁾らの手法をSomogyi法⁹⁾により除蛋白を行った血清資料に適用したもので、常用分析法として用いられている手法(後述)と原理的には同一のものである。Sampsonらの報告では10~30 nmol/lの濃度範囲において1%前後のばらつきで測定を行っている。

6.3.4 JSCC勧告法

現在のところ尿素に対するJSCC勧告法は提案されていない。

6.3.5 主な日常分析法

尿素の定量に用いられてきた手法としては、化学的手法と酵素を利用した手法の二種類に分類される。

化学的手法の代表はジアセチルモノオキシムと尿素を強酸中で加熱することで生ずる黄色（Fearon反応³³）を比色定量する手法（ジアセチルモノオキシム法³⁴）、ウレアーゼにより生成したアンモニアをBerthlot反応³⁵によりインドフェノールブルーを生成して生じた青色を比色定量するウレアーゼ・インドフェノール法³⁶などがある。

しかし、ジアセチルモノオキシム法では副生するヒドロキシルアミンが妨害となるため酸化剤を共存させる必要があることや、操作が煩雑であることなどから、現在はウレアーゼにより生じたアンモニアをグルタミン酸デヒドロゲナーゼで処理し、NADHの減少量を吸光度法により測定する酵素法³⁷を用いるのが一般的である。アンモニアを検出する酵素法では内因性アンモニアによる妨害が問題となるが、初速度解析を行うことによりイオン変換速度の違いからその影響を除くことが可能であるため、自動分析法によく用いられている。

また、最近尿素アミドヒドラーゼとピルビン酸キナーゼを連続的に使用することで生じるピルビン酸を吸光度測定することで、アンモニアの影響を完全に無視できる手法³⁸も開発されている。

6.4 尿酸 (Uric acid)

6.4.1 臨床的意義

尿酸は核酸を構成するプリン体の最終代謝産物であり、肝臓、筋肉、骨髄における体細胞中における分解に由来している。主として肝臓における代謝で生じた尿酸は血液により腎臓に運ばれ、糸球体で濾過された後、筋に尿細管などで再吸収された後尿中に排出される。

この他、肉食で取り込まれた核酸からも尿酸が生じるため、脂肪食により血中濃度は上昇するが、糖質の摂取が多いと低値になる。血清中では尿酸ナトリウムの形、もしくは蛋白と結合した形で存在している。ウリカーゼを持つ動物では尿酸がアラントインとなり排出されやすくなるが、ヒトはこの酵素を持たないために、関節腔や組織に沈着し痛風の原因となる。

6.4.2 標準物質の状況

尿酸関連の標準物質としては、NISTから純物質標準物質であるSRM-913aが頒布されている。また、血清標準物質であるSRM-909bにおいても認証物質の一つとして登録されている。この他、NRCCRMから純物質系標準物質一種類がJCTLMに登録されている。

値付け手法として、SRM-913aにおいては乾燥時の重量変化や灰化後の残渣重量測定、さらにUV-LC法やダイレクトプローブ質量スペクトル測定などのデータから差数法により純度を推定している。また、SRM-909bにおいてはGC-ID/MSにより値付けがされている。

6.4.3 基準測定操作法

JCTLM List I に登録されている一次標準分析法にはGC-ID/MSを用いたものとして、NISTから提唱されている血清分析用プロトコル³⁹とDGKCから提案された血清分析用、尿分析用各一種類ずつ⁴⁰とベルギーのGhent大学から提唱された血清分析用の手法⁴¹⁻⁵⁾がある。

DGKCの手法は[1,3-¹⁵N₂]-尿酸を内標として用い、イオンクロマトグラフィーにより分離を行った後でトリメチルシリル誘導体としてGC-ID/MS測定を行っている。これに対しNISTの手法は尿酸をtetrakis-(t-butyl)dimethylsilyl誘導体に変換することで、RSD 0.1%前後の分析を可能としている。Ghent大学の提唱している手法は、限外濾過による簡便な除蛋白操作と、TMS化剤としてSily1991を用いたことにより1%前後の精度を保ちながらも、従来4時間から最大48時間要していた誘導体化反応を45分にまで大幅に短縮している。

6.4.4 JSCC勧告法⁴¹⁾

血清尿酸測定の勧告法としては、HPLC-UV法が提唱されている（図4）。前処理の除蛋白法としてトリクロロ酢酸法、アセトニトリル法、限外濾過法などが検討されたが、アセトニトリルでは回収率が変動しやすく、水酸化亜鉛を用いた場合には著しく回収率が悪いことがわかり⁴²、最終的にもっとも安定したベースラインが得られ、尿酸以外のピークが見られない過塩素酸法が採用されている。しかし、この操作で4%程度の未回収部分があることが指摘されており、水溶性標準液を標準として用いた場合と血清標準液を標準として用いた場合では、1 mg/l前後の正確度のずれが見られることが知られている。

また、サンプルループを用いて試料を注入した場合、ピーク面積の再現性はCV=0.7~0.9%であった。

6.4.5 主な日常分析法

尿酸の日常分析法は、尿酸が元々持つ還元性を利用した反応を利用したものが多いが、アルカリ溶液中で反応させる手法は非特異的であることから、近年は酵素反応を用いて特性を向上させた手法がよく用いられている。尿酸のアルカリ溶液中における還元性を利用した手法は、尿酸を不溶性塩として分離した後にリンタングステン酸

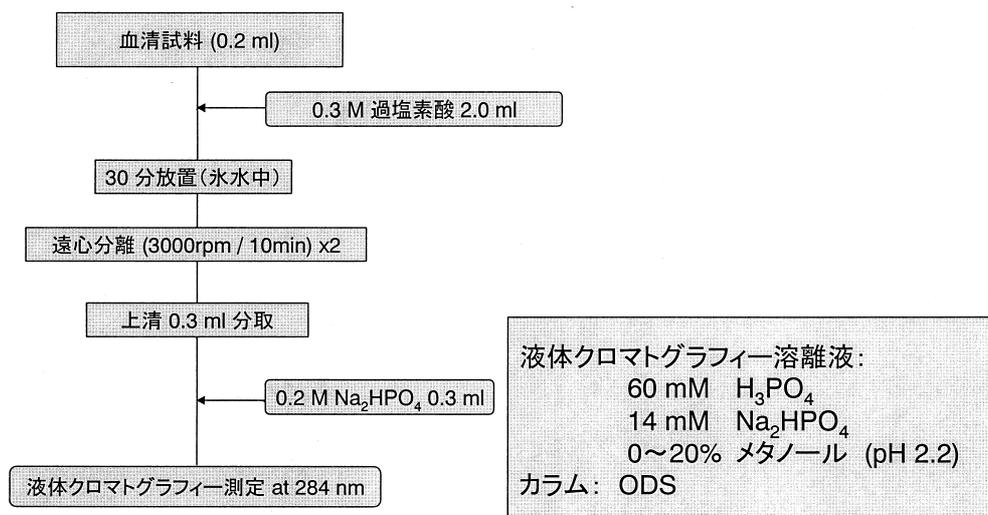


図4 尿酸 JSCC勧告法プロトコル

を発色剤として用いるFolin-Denis法⁴³とシアン化ナトリウムをアルカリ化剤として用いるBrown法⁴⁴を元にしたもののふたつに大きく分けられるが、多くの場合はアルカリ化剤として炭酸ナトリウムを用いた手法⁴⁵がよく用いられている。

酵素を用いた古典的な手法としてウリカーゼ法がある。この手法は尿酸がウリカーゼにより酸化されることで減少した294 nmにおける吸光度の減少を測定する手法⁴⁶があるが、血清蛋白ではこの波長における吸収が極めて高いために測定感度が悪いという欠点がある。そこで、近年は酵素反応により発生した過酸化水素をペルオキシダーゼで処理し、4-アミノアンチピリンとフェノールやジエチルアニリンなどのカップリング試薬と縮合反応を利用して発色させる方法⁴⁷やカタラーゼを利用した手法⁴⁸、NADとADH（アルデヒド脱水素酵素）の共役反応を利用して測定する手法⁴⁹などが用いられている。

6.5 コレステロール (Cholesterol)

6.5.1 臨床的意義

しばしば食事から摂取するコレステロール量が健康面などから話題に上るが、生体内に存在するコレステロールの90%は肝臓や腸において合成されたものである。合成されたコレステロールはリポ蛋白として胆管から血中に排出され、その大部分が血流中でエステル化される。健常人の場合血清コレステロール量の70%程度がコレステロールエステル型であるが、肝臓に障害がある場合には非エステル型である遊離コレステロールの割合が増大することが知られている。また血中コレステロール量は血中リポ蛋白の増減に依存しているため、リポ蛋白の形

で測定されることも多いが、低比重リポ蛋白 (LDL) と高比重リポ蛋白 (HDL) は冠動脈硬化症の危険因子として異なる働きを持っているため、それぞれ別個に測定する必要がある。ちなみに前者の濃度が上昇すると冠動脈硬化症の頻度が増大するのに対し後者は抑制的に働くことから、LDL, HDLをそれぞれ「悪玉コレステロール」、「善玉コレステロール」などと呼ぶ場合もある。

6.5.2 標準物質の状況

現在JCTLM List I に登録されている標準物質として純物質としてNIST (SRM-911b) とNRCCRM (GBW09203b) から種類ずつ登録されているが、この他にもNIMJからNIMJ-CRM 6001aが頒布されている。また組成標準物質として、血清凍結品がHECTEF (JCCRM 211) とNIST (SRM-1951b) からそれぞれ種類ずつ、凍結乾燥品としてNISTから含まれる認証物質が異なる形で、三種類 (SRM-1952a, 968c, 909b) が登録されている。

値付け手法としては、組成標準物質についてはそれぞれGC-ID/MSによる値付けが行われている。またSRM-911bに関しては、その他にもNMR, UV, TLC, 示差走査熱量測定法, 灰化による残渣重量分析や中性子放射化分析などによる元素分析などの手法で不純物量の推定を行っている。NMIJにおいても、GC-MS, UV, 残渣重量分析およびLCによる差数法などによる純度検定が行われている。

6.5.3 基準測定操作法

JCTLM List I に基準測定操作法として登録されている手法のうち、GC-ID/MSを用いたものとして、NIST⁵⁰と

DGKC⁵¹、そしてベルギーのGhent大学⁴⁾⁵⁾ からそれぞれ一種類ずつ血清分析用プロトコルが提案されている。その他、LGC⁵²⁾からLC-ID/MS法による手法とCDC (Centers for Disease Control and Prevention) から血清分析用の吸光光度法⁵³⁾が一種類提唱されている。

NISTによる手法では、内標準として¹³C₃-Cholesterolを用い、TMS化した後GCに導入している。これによりばらつきとして0.2%以下、確度として0.1%以下という結果を得ている。Ghent大の提唱している手法はGC導入のための誘導体化にTMS誘導体を用いているのはNISTと同様であるが、内標準に3,4-[¹³C₂]-cholesterolを用いる点で異なる。これにより精度・確度ともに1%以下の値を得ている。

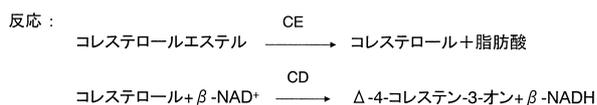
LGCによるLC-ID/MS法は第二回エントリー時に追加された手法である。この手法では内標準に25,26,27-¹³C₃コレステロールを用い、APCIインターフェースにより測定を行い、GC-ID/MS法とほぼ同等の結果を得ている。

CDCにより提唱されている吸光光度法はALBK (Abell-Levy-Brodie-Kendall) 法⁵⁴⁾を改良したもので、アルコール性水酸化カリウム中で鹸化させた後、ヘキサンで抽出しLiebermann⁵⁵⁾-Burchard⁵⁶⁾試薬による呈色反応を用いて620 nmにおいて定量を行う手法⁵⁷⁾が元になっている。この手法は古典的ではあるが、長年検討がなされており、上記のGC-ID/MS法とこの手法で得られた値との比較もされている。

6.5.4 JSCC勧告法⁵⁸⁾

ヒト血清コレステロール測定勧告法は、コレステロールエステラーゼ (CE) とコレステロールデヒドロゲナーゼ (CD) を連続的に反応させ、吸光光度法により定量を行う手法が提唱されている (図5)。この手法はCDCが設定したCRM (Cholesterol Reference Method) であるALBK法から伝達される比較対象法として規定されている。

試料中に存在するコレステロールエステルは、CEによりコレステロールと脂肪酸に分解される。コレステロー



- 生成するNADHの吸光度増加を測定
- 生成する $\Delta\text{-4-コレステレン-3-オン}$ をヒドラジンで捕捉・非活性化
- ALBK法 (CDCのコレステロールCRM) の値と比較可能
 - ALBK法はNIST推奨のID-MS法より1%高値との報告有り
- ある程度の熟練が必要

図5 コレステロール JSCC勧告法の反応原理

ルはNAD存在下で、CDの作用により酸化されてNADHを生成するため、NADH由来の340 nmにおける吸光度を測定することにより求める。

通常このCDによる反応は可逆的であるため、コレステロールとNADHの間には当モル関係が存在しない。そのため、生成した $\Delta\text{-4-コレステレン-3-オン}$ の3 β 位にあるケトン基をヒドラジンで捕捉することで不活性化し、CDによる反応を不可逆化させ、高精度な定量法としての利用を可能としている。

また、コレステロールエステルの加水分解についても、アルカリ加水分解との間で比較を行い、CEによる酵素反応と相違がないことを確認している。

また、3濃度の新鮮血清について同時再現性を調べ、CV=0.37~0.78% (n=20) が得られること、723 mg/dlまでの濃度範囲で原点を通る直線が得られることが確認されている。

しかし検体ブランク測定が必須な手法であることから、手法上の熟練を要するため、分析者にはトータルコレステロール 200 mg/dl前後の試料を10回測定した時のCVが1%以下になるまで、熟練することが推奨されている。

6.5.5 主な日常分析法

ALBK法でも用いられている無水酢酸と硫酸を利用したLiebermann-Burchard反応を利用した手法⁵⁵⁻⁵⁷⁾がもっとも古くから用いられてきたが、この反応は発色温度や反応時間などを厳密に制御する必要があると同時に、ピリルビンやヘモグロビン、カロチンなどの影響も大きい。そのため、日常法としては塩化鉄、酢酸と硫酸を用いたKiliani反応もよく用いられている⁵⁹⁾。しかしこの反応は、感度はL-B法より高いものの試薬中の不純物による影響が大きいため正確性について問題があることも知られている。

そこで、近年では酵素を用いた手法が用いられることがほとんどであり、自動化もされている。酵素法の中でもっとも広く用いられているのは、コレステロールエステルヒドロラーゼ (CEH) とコレステロールオキシダーゼ (COD) を血清に作用させることで発生したH₂O₂をペルオキシダーゼ (POD) 環境下で測定する手法⁶⁰⁾である。この手法では血清中の総コレステロール量として測定値が得られるが、この時CEHを用いずにCEDのみを用いて同様の測定を行うことで、容易に遊離コレステロール量を測定できるため、両者の測定値の差をエステルコレステロール量として評価することも可能である。

6.6 トリグリセリド (Triglyceride)

6.6.1 臨床的意義

トリグリセリドは、いわゆる中性脂肪と呼ばれるものの95%以上を占めており、エネルギーの貯蔵庫となる貯蔵脂肪として、また皮下脂肪として体温の維持や機械的な外相からの保護などの役割を持つ。

食事などから取り込まれる脂肪の大部分もトリグリセリドであるが、これらは一度モノグリセリドと脂肪酸の形に加水分解されてから吸収される。その後腸上皮細胞中でトリグリセリドに再合成され貯蔵される。体内の糖質が減少してくると、これらの貯蔵脂肪はグリセロールと脂肪酸に分解されてエネルギーとして消費されるが、大部分は再びトリグリセリドに再合成されるというプロセスを取る。

一般に臨床分析において注目されるのは高値を示した場合で、冠動脈硬化症発生病因因子として考えられる他、糖尿病、急性アルコール性脂肪肝、尿毒症など様々な疾患に由来している可能性が考えられる。

6.6.2 標準物質の状況

トリグリセリドとしてJCTLM List I に登録されている標準物質には、現在HECTEF (JCCRM223) とNIST (SRM-909b) からそれぞれ種類ずつ人血清試料の形で供給されている。純物質標準としては、NISTからトリグリセリドの一種であるTripalmitin (SRM-1595) が提供されている。

これらの値付けは組成標準に関してはGC-ID/MSによる値付けが行われており、SRM-1595ではGC-MS, LC, NMRなどにより不純物の測定が行われている。

6.6.3 基準測定操作法

JCTLM List I に登録されている一次標準分析法にはNISTからGC-ID/MSを用いた血清分析用プロトコル種類⁶¹⁾と後述するJSCC勧告法⁶²⁾である酵素法の二つが提案されている。

この手法では¹³C₃-tripalmitinを内標準として用いる。血清試料中から、まずクロロホルム-メタノール系の液液分配とシリカ系の固相抽出法を併用してトリグリセリドのみを抽出する。(この操作を行わずに血清試料にそのまま以下の操作を行った場合には、モノグリセリドやジグリセリドを含む総グリセリド量として測定値が得られる。) エタノール性の水酸化カリウム中で鹸化を行い、イオン交換カラムによりイオン性の共存物を全て取り除き、さらに十分に水分を除去した後ピリジン中で1-butaneboronic acidと反応させた後、TMS化を行い

GC-ID/MSにより測定を行う。この手法を用いることで、トリグリセリド量、総グリセリド量それぞれ0.5%程度のばらつきと認証値に対して0.3%前後の確度を得ている。

6.6.4 JSCC勧告法⁶²⁾

JSCCではトリグリセリド単体の測定勧告法としてではなく、中性脂肪 (TG) としてトリグリセリドを測定すると同時に、モノグリセリド、ジグリセリドもトリグリセリドとして測定する手法を提唱している (図6)。

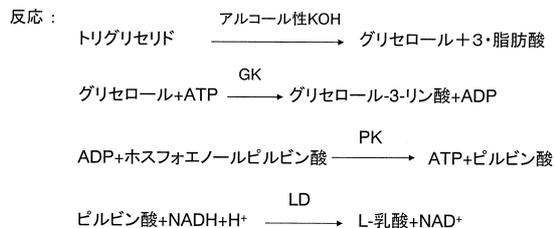
原理としては、アルコール性の水酸化カリウムによる加水分解系とグリセロールキナーゼ (GK) とピルビン酸キナーゼ (PK)、乳酸脱水素酵素 (LD) を組み合わせた指示反応系を組み合わせて用いている。

TGを加水分解することで得られた遊離グリセロールはGKによりATPからADPを生成する。生成したADPとホスフォエノールピルビン酸はPKの作用によりピルビン酸とATPに変化する。このようにして得られたピルビン酸をLDによりL-乳酸にする際に共存させるNADHがNAD⁺と変化する際の吸光度変化をモニタリングすることにより、TG量が算出される。

加水分解法としては、アルカリ溶液法の他にリポ蛋白リパーゼなどによる酵素分解法も知られているが、これらの場合凍結乾燥血清などのように変性を起こしているリポ蛋白に対する反応性が低いことが予想されるため、勧告法ではアルカリ溶液法が採用されている。

しかし、この手法もコレステロールの場合と同様、ブランク測定が必須な用手法であることから、200~300 mg/dl相当のTG濃度を持つ試料についてn=5~10における同時再現性がCV=2%以下になるまで熟練することが推奨されている。

この手法を用いて二施設間における同時再現性を調べたところ、それぞれCV=2%以下の値が得られている。また、16施設間における施設間再現性も2.6~4.6%との報告がある。



- 340 nmにおけるNADHの吸光度減少量を測定
- 過酸化水素系では問題になるピルビンの影響無し
- ある程度の熟練が必要

図6 トリグリセリド (中性脂肪) JSCC勧告法の反応原理

6.6.5 主な日常分析法

従来はトリグリセリドを血清などから抽出した後、鹼化処理によりグリセロールを遊離させ、過ヨウ素酸化により生成したホルムアルデヒドをクロモトローブ酸法⁶³⁾やアセチルアセトン法⁶⁴⁾によって定量する化学的手法が主に用いられてきた。クロモトローブ酸法はリン脂質の影響を除くためクロロホルム溶媒中でゼオライトを吸着剤として用いることで、中性脂肪の抽出とリン脂質の除去を同時に行うなどの工夫が凝らされてはいるが、全体的に操作が煩雑で共存物による妨害も無視できないため、近年ではJSCC勧告法にも用いられている酵素法を用いる場合が多い。JSCC勧告法以外の酵素法には、加水分解にリポプロテインリパーゼ (LPL) を利用する場合が多い。ここにグリセロールヒドロゲナーゼ (GD)⁶⁵⁾、グリセロールキナーゼ (GK)⁶⁶⁾やグリセロールオキシダーゼ (GOD)⁶⁷⁾などを作用させることによりNADHの変化量や発色試薬との反応をみて測定している。

7. まとめ

7.1 臨床医化学分析の標準化整備の現状と今後について

本調査では臨床医化学分析における標準化整備の状況と検査対象とされている低分子化合物の標準物質、およびそれぞれの一次標準分析法から医療現場における日常分析法まで様々な段階で用いられている分析法について、その原理や適用範囲などについて調査を行った。

臨床医化学分析における標準化整備は世界的にはJCTLMを中心に進められており、各国のNMIを中心に標準物質・分析法の両面から急速に整備が進められている。日本においてもJSCCによる勧告法の開発・普及をはじめ、世界的な情勢や社会の要求に対応した積極的な活動が行われている。

臨床医化学分析分野の現場において、直接的に求められている標準物質は実際の分析対象となる目的物質が血清などのマトリクス中に存在する、いわゆる組成標準物質である。しかし、これらの開発のためにまず必要となるのは基準となる純物質一次標準物質であり、これらの整備・開発と国内における供給体制の確立はNMIJが担当することになっている。臨床医化学分析分野における純物質一次標準物質についてもっとも進んでいるのはNISTであるが、NMIJでもコレステロールの純物質一次標準物質の頒布を2005年4月から開始し、2006年4月にはJCTLMへの登録を予定している。また、現在6節で列挙した化合物を中心に純物質一次標準物質の開発検討を進めてい

る。現在JSCCをはじめとした国内の関係組織や試薬・測定機器メーカーや関係省庁などを含む臨床検査における標準化を推進する研究会が設立され、国内における臨床検査の標準化を進めている。NMIJは主に標準物質・標準測定法に関する部分で貢献をすることを期待されており、今後もこの研究会との連絡を取りながら研究の展開を進めていくことが必要である。

7.2 臨床医化学分析における標準測定操作法の現状と今後について

現在、臨床医化学分析分野における日常分析法や常用基準法として用いられる分析法の主流は、化学的手法から酵素法にシフトしている。酵素法は反応特異性が高く、共存物質による妨害を考慮する必要も少ないため、前処理も簡便で扱いやすいという特徴がある。そのため、現在も精力的に新たな手法の開発や利用可能な酵素の探索が進められている有用な方法である。しかし、酵素法はいわゆるprimary methodとしては認められていないため、標準物質開発などに直接利用することはできない。そのため、純物質一次標準物質の値付けには目的物質の物性に依りて、熱分析法や差数法など様々な方法がそれぞれの物質の物性に依りての組み合わせで用いられている。

しかし、組成標準物質の値付けには実質的に同位体希釈質量分析 (ID/MS) 法以外の選択肢がなく、JCTLMに登録されている組成標準物質もGC-ID/MS法により値付けされている場合が多い。GC-ID/MS法は古くから検討されており、臨床医化学分析の対象となる物質では、GC-ID/MS法を適用する際の誘導体化処理はほぼ必須となるために煩雑な前処理が必要となるものの、いわゆる「枯れた」技術であるために信頼性も高く、広く利用されている。しかし、GCは試料の汚れに比較的弱く、誘導体化反応の際に試料中の共存物質が反応を妨害する可能性もあるため、誘導体化処理の前に除タンパクや液一液分配、各種のクロマトグラフィーなどの前処理が必要となる場合が多い。

GC-ID/MS法と同様にID/MSを用いた手法にLC-ID/MS法がある。LC-ID/MS法では基本的に誘導体化は不要であり、GCと比較すると試料の汚れにも比較的強いことから、より簡便な前処理で分析が行えることが期待される。また、新たなイオン化手法の開発など機器的な面についての積極的な改良により分析可能な化合物の適用範囲も急速に広がっている。すでにいくつかの物質ではLC-ID/MS法が基準測定操作法としてJCTLMに登録されており、今後さらに増加することが期待される。

比較的簡便な前処理で分析可能なLC-ID/MS法におい

ても、共存物質の種類によっては感度が大幅に減少することがあるため、GC-ID/MS法と同様、前処理法は重要な検討課題である。これらの前処理法の開発には、酵素法以前に用いられてきた日常分析法である化学的手法の研究において蓄積されてきた共存物の種類や量、あるいは目的物質の安定化処理などに関する知見が基礎となる場合もあり、このような過去の知見が持つ有用性にはいまだ注目すべきものがある。

近年発達が著しい前処理法に固相抽出法があげられる。従来はシリカやODSなどLCで用いられる充填剤をそのまま利用したものがほとんどであったが、近年はサイズ排除能やイオン交換能など複数の機能を持つ固相抽出に特化した充填剤やマイクロファイバーなどを利用した新しい固相抽出剤の開発も進んでいる。現在でもタンパクをはじめとした共存物との前分離など、従来の前処理技術と同等の結果を比較的容易に得ることが可能となっているが、今後も新たな固相抽出剤が開発されることで、さらに効率が向上することが期待される。また、LC-MS法は単純な絶対量感度でGC-MS法に劣る場合もあるが、固相抽出法を血清や尿などの水系試料の前処理に用いることで前分離と前濃縮を同時に行い、分析法全体における感度向上も可能であるため、今後LC-ID/MSと固相抽出を組み合わせた手法はますます注目されていくと考えられる。

参考文献

- 1) <http://www.bipm.fr/en/committees/jc/jctlm/jctlm-db/>
- 2) J. V. Pileggi and C. P. Szustkiewicz: Clinical chemistry principles and technics, ed.2, ed. R. W. Henry, D. C. Cannon and J. W. Winkelmann (Harper & Row, New York, 1964).
- 3) E. White V, M. J. Welch, T. Sun, L.T.Sniegoski, R. Schaffer, H. S. Hertz and A. Cohen: The Accurate Determination of Serum Glucose by Isotope Dilution Mass Spectrometry – Two Methods, Biomed. Mass Spectrom. 9-9(1982)395-405.
- 4) D. Stockl and H. Reinauer: Candidate Reference Methods for Determining Target Values for Cholesterol, Creatinine, Uric Acid, and Glucose in External Quality Assessment and Internal Accuracy Control. I. Method Setup, Clin. Chem. 39-6 (1993) 993-1000.
- 5) D. Stockl and H. Reinauer: Candidate Reference Methods for Determining Target Values for Cholesterol, Creatinine, Uric Acid, and Glucose in External Quality Assessment and Internal Accuracy Control. II. Method Transfer, Clin. Chem. 39-6 (1993) 1001-1006.
- 6) F. Magni, R. Paroni, P. A. Bonini and M. Galli Kienle: Determination of Serum Glucose by Isotope Dilution Mass Spectrometry: Candidate Definitive Method, Clin. Chem., 38-3 (1992) 381-385.
- 7) J. W. Neese, P. Duncan, D. Bayse, et al.: Development and evaluation of a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase procedure for use as a national glucose reference method, HEW Publication NO. (CDC) 77-8330. HEW. USPHS, Centers for Disease Control, (1976).
- 8) 日本臨床化学会学術連絡委員会: 血清グルコース測定勤告法, 臨床化学, 20-4 (1991) 247-254.
- 9) M. Somogyi: Determination of Blood Sugar, J. Biol. Chem., 160-1 (1945) 69-73.
- 10) H. C. Hagedorn and B. N. Jensen: Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid, BioChem. Zschr., 135 (1923) 46-58.
- 11) M. Somogyi: A New Reagent for The Determination of Sugars, J. Biol. Chem., 160-1 (1945) 61-68.
- 12) N. Nelson: A Photometric Adaptation of The Somogyi Method for The Determination of Glucose, J. Biol. Chem., 153-2 (1944) 375-380.
- 13) O. Folin and Hsien Wu: A System of Blood Analysis, J. Biol. Chem., 38-1 (1919) 81-110.
- 14) O. Folin and Hsien Wu: A System of Blood Analysis. Supplement I. A Simplified and Improved Method for Determination of Sugar, J. Biol. Chem., 41-2 (1920) 367-374.
- 15) H. U. Bergmeyer and H. Moellering: Enzymatische Glucose-Bestimmung mit Acylphosphat: D-Glucose-6-Phosphotransferase, Clin. Chim. Acta, 14 (1966) 74-82.
- 16) G. R. Kingsley and J. C. Sternberg: Direct Ultramicro Glucose Oxidase Method for Determination of Glucose in Biological Fluids, Clin. Chem., 6-5 (1960) 466-475.
- 17) 金井正光: 第6章臨床化学検査V. 糖質とその代謝関連物質 (有機酸), 臨床検査法提要 第32版, (金原出版,2005) 517.
- 18) 佐々木禎一: 血糖の迅速微量定量法, o-Toluidine-硼酸法による, 臨床検査, 17 (1967) 409-413.
- 19) L. Siekmann: Determination of Creatinine in Human Serum by Isotope Dillutuin-Mass Spectrometry. Definitive Methods in Clinical Chemistry, IV, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 23-3 (1985) 137-144.

- 20) M. J. Welch, A. Cohen, H. S. Hertz, K. J. Ng, R. Schaffer, P. Van Der Lijn and E. White V: Fetermination of Serum Creatinine by Isotope Dilution Mass Spectrometry as a Candidate Definitive Method, *Anal. Chem.*, 58-6 (1986) 1681-1685.
- 21) P. Stokes and G. O'Connor: Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum, *J. Chromatogr. B*, 794 (2003) 125-136.
- 22) 日本臨床化学会学術連絡委員会: HPLCを用いる血清クレアチニンの測定勧告法, *臨床化学*, 23-4 (1994) 326-334.
- 23) M. Jaffe: *Z. Physiol. Chem.*, 10 (1886) 391.
- 24) O. Folin: Beitrag zur Chemie des Kreatinins und Kreatins im Harn, *Z. Physiol. Chem.*, 41 (1904) 223-242.
- 25) H. N. Haungen and E. M. Blegen: The Determination of Endogenous creatinine in plasma and urine, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 5-1 (1953) 48-57.
- 26) D. L. Fabiny and G. Ertingshausen: Antomated Reaction-Rate Method for Determination of Serum Creatinine with the Certification, *Clin Chem*, 17-8 (1971) 696-700.
- 27) 金井正光: 第6章臨床化学検査IV. 非蛋白窒素化合物, 臨床検査法提要 第32版, (金原出版,2005) 501.
- 28) 金井正光: 第6章臨床化学検査IV. 非蛋白窒素化合物, 臨床検査法提要 第32版, (金原出版,2005) 500.
- 29) M. J. Welch, A. Cohen, H. S. Hertz, F. C. Ruegg, R. Schaffer, L. T. Sniegowski and E. White V: Determintaiion of Serum Urea by Isotope Dilution Mass Spectrometry as a Candidate Definitive Method, 56-4 (1984) 713-719.
- 30) A. Kessler and L. Siekmann: Measurement of Urea in Human Serum by Isotope Dilution Mass Spectrometry: A Reference Procedure, *Clin. Chem.* 45-9 (1999) 1523-1529.
- 31) E. J. Sampson, M. A. Baird, C. A. Burtis, E. M. Smith, D. L. Witte and D. D. Bayse: A Coupled-Enzyme Equilibrium Method for Measuring Urea in Serum: Optimization and Evaluation of the AACC Study Group on Urea Candidate Reference Method, *Clin. Chem.*, 26-7 (1980) 816-826.
- 32) H. Talke and G. E. Shubert: Enzymatic Urea Determination in the Blood and Serum in the Warburg Optical Test, *Klin. Wochenschr*, 43 (1965) 174-175.
- 33) W. B. Fearon: The Carbamido Diacetyl Reaction; A Test for Citrulline, *Biochem. J.*, 33-6 (1939) 902-907.
- 34) A. A. Ormsby: A Direct Colorimetric Method for the Determination of Urea in Blood and Urine, 146-2 (1942) 595-604.
- 35) R. H. Brown, G. D. Duga, S. Korke and P. Handler: A Colorimetric Micromethod for the Determination of Ammonia; The Ammonia content of Rat Tissues and Human Plasma, *Arch. Biochem. Biophys.*, 66 (1957) 301-309.
- 36) A. L. Chaney and E. P. Marbach: Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia, 8-1 (1962) 130-132.
- 37) C. J. Hallett and J. G. H. Cook: Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Coupled Reaction for Emergency Blood Urea Estimation, *Clin. Chim. Acta*, 35-1 (1971) 33-37.
- 38) 菅野剛史, 仁科甫啓, 安部彰:臨床検査技術学10臨床化学 第3版, (医学書院,2000) 89-90.
- 39) P. Ellerbe, A. Cohen, M. J. Welch and E. White V: Determination of Serum Uric Acid by Isotope Dilution Mass Spectrometry as a New Candidate Definitive Method, *Anal. Chem.*, 62-20 (1990) 2173-2177.
- 40) L. Siekmann: Determination of Uric Acid by Isotope Dillutuun-Mass Spectrometry. Definitive Methods in Clinical Chemistry, III, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 23-3 (1985) 129-135.
- 41) 日本臨床化学会学術連絡委員会: HPLCを用いる血清尿酸測定の勧告法, *臨床化学*, 22-4 (1993) 300-307.
- 42) R. Sakuma, T. Nishina and M. Kitamura: Deproteinizing Methods Evaluated for Determination of Uric Acid in Serum by reversed-Phase Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection, *Clin. Chem.*, 33-8 (1987) 1427-1430.
- 43) O. Folin and W. Denis: A New (Colorimetric) Method for the Determination of Uric Acid in Blood, *J. Biol. Chem.*, 13-4 (1913) 469-475.
- 44) H. Brown: Ther Determination of Uric Acid in Human Blood, *J. Biol. Chem.*, 158-3 (1945) 601-608.
- 45) W. T. Caraway: Determination of Uric Aicd in Serum by a Carbonate Method, *Amer. J. Clin. Path.*, 25 (1955) 840-845.
- 46) 牧野義影, 紺野邦夫: Uricase-Peroxidase系による尿酸定量法について, *臨床病理*, 15 (1967) 148-151.
- 47) 金井正光: 第6章臨床化学検査IV. 非蛋白窒素化合物, 臨床検査法提要 第32版, (金原出版,2005) 505.
- 48) N. Kageyama: A Direct Colorimetric Determination of

- Uric Acid in Serum and Urine with Uricase Catalase system, *Clin. Chim. Acta*, 31-2 (1971) 421-426.
- 49) 菅野剛史, 仁科甫啓, 安部彰:臨床検査技術学10臨床化学 第3版, (医学書院,2000) 95.
- 50) P. Ellerbe, S. Meiselman, L. T. Sniegowski, M. J. Welch and E. White V: Determination of Serum Cholesterol by a Modification of the Isotope Dilution Mass Spectrometric Definitive Method, *Anal. Chem.*, 61-15 (1989) 1718-1723.
- 51) L. Siekmann, K. P. Huskes and H. Breure: Massenfragmentographische Bestimmung von Cholesterin im Serum – Eine Klinisch-Chemische Referenzmethode, 279-2 (1976) 145-146.
- 52) C. S. J. W. Briche, D Carter and K. S. Webb: Rapid Comm Mass Spectrom., 16 (2002) 848-853.
- 53) G. R. Cooper, S. J. Smith, I. W. Duncan, A. Mather, W. D. Fellows, T. Foley, I. D. Frantz Jr., J. B. Fill, T. A. Grooms, I. Hynie, R. Laessig, F. A. LoBasso, J. Martin, H. Naito, H. A. Newman, L. Sideman, J. H. Turner and D. Williams: Interlaboratory Testing of the Transferability of a Candidate Reference Method for Total Cholesterol in Serum, *Clin. Chem.*, 32-8 (1986) 921-929.
- 54) L. L. Abell, B. B. Levy, B. B. Brodie and F. E. Kendall: A Simplified Method for the Estimation of Total Cholesterol in Serum and Demonstration of Its Specificity, *J. Biol. Chem.*, 195-2 (1952) 357-366.
- 55) C. Liebermann: Uber des Oxychinoterpen, *Ber.*, 18 (1885) 1803-1809.
- 56) H. Burchard: Beitrage zur Kenntnis des Cholesterins, *Chem. Zentralbl*, 61-1 (1890) 25-27.
- 57) W. Autenrieth and A. Funk: Uber Kolorimetrische Bestimmungsmethoden: Die Bestimmung des Gesamtcholesterins im Blute und in Organen, *Munchen. Med. Wschr.*, 60 (1913) 1243-1248.
- 58) 日本臨床化学会学術連絡委員会: ヒト血清コレステロール測定 of 勧告法, *臨床化学*, 30-3 (2001) 189-194.
- 59) 菅野剛史, 仁科甫啓, 安部彰:臨床検査技術学10臨床化学 第3版, (医学書院,2000) 119-120.
- 60) 金井正光: 第6章臨床化学検査VI. 血清脂質とリポ蛋白, *臨床検査法提要 第32版*, (金原出版,2005) 541-542.
- 61) P. Ellerbe, L. T. Sniegowski and M. J. Welch: Isotope Dilution Mass Spectrometry as a Candidate Definitive Method for Determining Total Glycerides and Triglycerides in Serum, *Clin. Chem.*, 41-3 (1995) 397-404.
- 62) 日本臨床化学会学術連絡委員会: 血清中の中性脂肪濃度測定 of 勧告法, *臨床化学*, 25-1 (1996) 39-51.
- 63) D. Van Handel and D. B. Zilversmit: Micromethod for the Direct Determination of Serum Triglycerides, *J. Lab. Clin. Method*, 50 (1957) 152-157.
- 64) M. J. Fletcher: A Colorimetric Method for Estimating Serum Triglycerides, *Clin. Chim. Acta*, 22-3 (1968) 393-397.
- 65) S. H. Grossma, E. Mollo and G. Ertingshausen: Simplified, Totally Enzymatic Method for Determination of Serum Triglycerides with a Centrifugal Analyser, *Clin. Chem.*, 22-8 (1976) 1310-1313.
- 66) G. Bucolo and H. David: Quantitative Determination of Serum Triglycerides by the Use of Enzymes, *Clin. Chem.* 19-5 (1973) 476-482.
- 67) 金井正光: 第6章臨床化学検査VI. 血清脂質とリポ蛋白, *臨床検査法提要 第32版*, (金原出版,2005) 543-544.