総合論文

血清中微量金属及びタンパク質のマイクロプレート比色分析 システムの開発

牧野 鉄男*

Development of a colorimetric assay system of trace metals and proteins in serum using microtiter plates and sensitive reagents

Tetsuo MAKINO*

*Department of Clinical Chemistry, Kanagawa Prefectural College of Nursing and Medical Technology, 1-5-1, Nakao, Asahi-ku, Yokohama 241-0815

(Received 12 June 2000, Accepted 3 August 2000)

A new colorimetric assay system using microtiter plates is presented for the determination of trace metals and proteins in serum samples. The use of polystyrene microwells with about 400- μ l capacity and sensitive reagents made it possible to reduce the sample size and required reagent. Rapid determination methods for iron, copper and zinc in 20 ~ 50 μ l of serum using a water-soluble pyridylazo dye were developed. Drug-bound iron *e.g.* saccharated ferric oxide, and transferrin-bound iron in serum were simultaneously determined using a combined system of kinetic and end-point assay. A system for serum zinc with a cationic porphyrin was three-times more sensitive than that with the pyridylazo dye. A latex agglutination immunoassay was utilized for the determination of α 2-macroglobulin and albumin in serum. The proposed systems are sensitive, accurate, precise, simple, and relatively inexpensive.

Keywords : downsizing of sample and reagent; microtiter plates; colorimetric assay; highly sensitive reagents; trace metals; serum proteins.

1 緒 言

臨床検査において比色分析により血清中の目的物質を定量しようとした場合、まず血清試料と試薬の総液量を通常のキュベットやフローセルで測定できる2~5 mlとなるように、そして試料の採量、試薬添加、混合、比色までの一連の測定操作を、手動及び独自の工夫（例えば試薬添加にセミオートマチック式ピペットを使用）を取り入れてデザインした方法（用手法）を開発するのが一般的である。しかも開発した用手法は、迅速・簡便・微量・正確・精密・採算という臨床分析における不可欠な基本条件のすべてを充たしていなければならない。

臨床検査用全自動分析装置（自動分析装置）によれば、

用手法における試料と試薬はその1/10~1/15までダウンサイズ化可能である。一方、ウェル容量が350~400 μ lのポリスチレン製平底のマイクロタイタープレート（マイクロプレート）は、エンザイムイムノアッセイにおいて、抗体もしくは抗原などをウェル表面に固定化させて使用する酵素標識固相免疫測定（ELISA）法のために誕生した。このウェルが機能的に自動分析装置の反応容器に似ていることから、血清分析への適用を図った。ところがマイクロプレートリーダー（MPR）の測光特性そして振動型かくはん方式の採用により、利用可能なウェル容量はその60~70%で、およそ260 μ lのために7 mmのライトパス（液高）が限界である。更に気泡の回避、小数点以下3けた目限度の吸光度測定という制約がある。

半値幅10 nmの干渉フィルター、400~700 nmにおける単波長、二波長測定という普及型MPRを用いて、用手

* 神奈川県立衛生短期大学衛生技術科: 241-0815 神奈川県横浜市中区中尾1-5-1

Fig. 1 Spectral interferences in clinical samples
N, normal; L, lipemic; H, hemolyzed; I, icteric; I',
icteric (with oxidant) serum

法に匹敵する再現性実現のために、ピペットの選択をはじめとするマイクロプレート測定システムを構築し、血清中微量金属定量に初めて適用したことは既に述べた¹⁾。本稿では、その後に開発したポルフィリン試薬を用いる血清中亜鉛測定、及びラテックス凝集比濁法による血清中タンパク質測定を含め、臨床分析におけるマイクロプレートの活用とその問題点について総合的に述べる (Table 1)。

2 測定システムの構成

マイクロプレートはモジュールタイプ (#467679, 16 ウェル, Nunc 製) と 96 ウェルタイプを、試料採量にマイクロマン-BIO ピペット (1~10 μ l 用, 10~100 μ l 用, ギルソン製), 試薬添加にエッペンドルフ製 4780 ピペット, そしてマイクロミキサー V-5 でかくはん, 空気循環式恒温槽マルチウォーマー AW-20 で 37°C 恒温に (いずれもサーマル化学産業製), 吸光度測定は MPRA4i (東ソー製) を用い, 必要に応じてデータ処理はパソコン (NEC98 シリーズと東ソー製データ解析プログラムの組み合わせ) で行った¹⁾。

3 水溶性高感度試薬を用いた微量金属測定

3.1 吸光光度法と臨床分析

吸光光度法で患者血清試料を取り扱う場合, 時として, リポタンパクを主とする濁りである乳び, ビリルビンを中心とするおうだん (黄疸), 赤血球から流出したヘモグロビン (Hb) に代表される溶血など, 色調に由来する分光学的干渉が現れる (Fig. 1)。600 nm より長波長側を測定に利用することは干渉を回避する上で有効であるが, 黄疸血清の場合, 二価銅定量目的で添加した酸化剤により生成したビリベルジンの吸収が, この領域にまで拡大してきた (Fig. 1)²⁾。

高感度試薬の利用は試料を微量化させ試料空試験の軽減

につながる。更に MPR の繰り返し測定という特性を生かし, この空試験測定を EDTA などにより金属キレート錯体を分解する³⁾, もしくは呈色試薬を含まない緩衝液を第 1 試薬とする^{4)~8)}システムにより行った。

また現在, 臨床分析は酵素反応の関与した測定系で誕生した二つの分析システムから成り立っている。基質のすべてが変換又は反応が平衡となり終結したポイントで測定するエンドポイント・アッセイは, 一般に, 測定に長時間を要するが, そのぶん測定対象である生成物の量が多くなり増感効果が期待できる。しかし前述したような試料空試験測定を必要とする。一方, 反応初期における単位時間当たりの基質又は生成物の変化量 (吸光度) を速度論的に求めるキネティック・アッセイは, その測定感度と精度が温度と時間に依存される。反面, エンドポイント・アッセイに比べ測定時間が短く, 原理上試料空試験測定の必要がない。これらの分析システムを効果的に使い分けることでマイクロプレート法をデザインした。

3.2 微量金属の迅速測定

十万前後のモル吸光係数 (ϵ) を持つヘテロ環アゾ化合物は金属との錯形成速度が速いため, マイクロプレート測定システムにおいても数分間の迅速分析が期待できる。更に除タンパク前処理しない直接測定法において, タンパクによる影響回避の目的で使用する塩酸グアニジンの存在は, タンパク吸着を目的とした高結合能タイプをはじめとする様々な種類のマイクロプレートの使用を可能とした。また, 測定対象となる金属によっても違うが, これらキレート試薬単独で血清タンパクから金属を解離させることは難しく, 解離を助ける pH 3~5 の弱酸性領域で利用可能な試薬を選択するのが一般的である。

2-(5-ブロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)アニリン (5-Br-PSAA)⁹⁾, 2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール (nitro-PAPS)¹⁰⁾, そして 2-(5-ブロモ-2-ピリジルアゾ)-5-(*N*-プロピル-*N*-スルホプロピルアミノ)フェノール (5-Br-PAPS)¹¹⁾ などの試薬とマイクロプレートを用いて, 血清中の銅³⁾, 鉄⁴⁾⁷⁾, 亜鉛⁵⁾⁶⁾の測定法を開発した。ところが銅測定においても用手法²⁾と同様に, 血清ビリルビンは 5-Br-PSAA よりも銅と強く錯形成し, 測定を干渉した³⁾。また亜鉛測定において, 鉄と銅の同時マスクングの目的で使用した毒性の強いシアン⁵⁾による問題が残された。なお, これら微量金属は血清中に μ mol/l レベルで存在するため, 十万前後の ϵ ではマイクロプレートを用いても血清試料は 50~20 μ l までしか微量化できなかった (Table 1)。

Table 1 Microplate colorimetric assay for determination of trace metals and proteins in serum

Analyte	Reference interval in adult serum	Reagent	Sensitivity (ϵ)/ $l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$	Sample/ μl	Measuring system ^{*3}	Ref.
Cu	16 ~ 25 $\mu mol/l$	5-Br-PSAA	6.5×10^4	50	E	3)
Fe	14 ~ 22 $\mu mol/l$	nitro-PAPS	9.4×10^4	30	E	4)
Zn	11 ~ 23 $\mu mol/l$	nitro-PAPS	14.5×10^4	20	E	5)
Zn		5-Br-PAPS	13×10^4	25	E	6)
Drug-Fe		nitro-PAPS	9.4×10^4	30	K & E	7)
Zn		ttmapp	41.5×10^4	6.3	E (37°C)	8)
AMG	1.5 ~ 3.5 g/l	AL	$\times 10000^{*1}$	40 ^{*2}	K	— ^{*4}
Albumin	39 ~ 49 g/l	AL	$\times 5000^{*1}$	8.3 ^{*2}	K	— ^{*1}

^{*1} Dilution factor in serum, ^{*2} Diluted serum, ^{*3} E: end point assay; K: kinetic assay, ^{*4} Preparing the manuscript AMG: $\alpha 2$ -macroglobulin; 5-Br-PSAA: 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropylamino)aniline Na salt; nitro-PAPS: 2-(5-nitro-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropylamino)phenol Na salt; 5-Br-PAPS: 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(*N*-propyl-*N*-sulfopropylamino)phenol Na salt; ttmapp: $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tetrakis(4-*N*-trimethylaminophenyl) porphine tetratoluenesulfonate salt; AL: antibody-coated latex particles

Fig. 2 Effect of reaction time on the dissociations of iron from transferrin-bound iron ($\square$: Serum-Fe) and drug-bound iron ($\bullet$: Fesin-Fe)

Reaction temperature: 22°C; Fe1: first measuring point; Fe2: second measuring point

3.3 血清鉄と薬剤鉄の同時測定

鉄欠乏性貧血治療目的で直接、静脈血管内に注射された薬剤鉄（静注薬剤鉄）の測定は、特に慢性じん不全患者における詳細な鉄動態の把握、そして薬剤の過剰投与防止の上からも静注薬剤鉄の測定は意義があると言われる。ところが著者らが開発するまで、薬剤鉄とトランスフェリン鉄（血清鉄）を同時に測定する方法はなかった。nitro-PAPSと銅のマスキングにチオグリコール酸を用いた血清鉄の手法¹⁰⁾を改良して、マイクロプレート測定システムに適用した⁷⁾。

トランスフェリンからの鉄解離が完了、同時に薬剤鉄解離を最小限に抑えられるポイントで測定 (Fe1) し、次に薬剤鉄のすべてを解離させるポイントで測定 (Fe2) して、それら2ポイントにおける各々の鉄の存在量について関係式を導き、薬剤鉄と血清鉄を分別測定する方法を考案した⁷⁾。例えば含糖酸化鉄として知られるフェジン（吉富製薬製）の場合、室温にて Fe1 は反応開始1分後、Fe2 は

Table 2 Cases of Fesin given to chronic hemodialysis patients

Data:

Serum sample	Before administration [Before hemodialysis]			After administration [After hemodialysis]		
	Fe 1	Fe 2	(AAS)	Fe 1	Fe 2	(AAS)
A	530	500	(560)	1500	3260	(3300)
B	750	740	(750)	1550	5180	(5150)
C	850	820	(950)	1590	2810	(2890)

Calculations:

Serum sample	Serum-Fe (Before administration)		Fesin-Fe [Time after administration]	
A	1110	(530)	2150	[1 h]
B	750	(750)	4430	[1 h]
C	1320	(850)	1490	[4 h]

AAS: atomic absorption spectrometry; Units: $\mu g/l$ serum

60分後となった (Fig. 2)。投与直後の血中における薬剤鉄の推定量を 15000 $\mu g/l$ とすれば、投与1～4時間後（透析後）の薬剤鉄は投与量の10～30%まで減少していたが、逆に血清鉄は投与前の150～200%に増加していた (Table 2)。この血清鉄の増加は、細網内皮系に取り込まれた薬剤鉄の血中への再出現が考えられ、本法ではそのトランスフェリンに結合している薬剤由来の鉄までは区別して把握できない。更に測定原理上、ポイント Fe1 における薬剤から鉄の解離速度が大であるほど、特に正確な血清鉄量が求めにくくなる。コンドロイチン硫酸鉄及びグルコン酸第二鉄がこれに該当する。その他試料中に混在した場合の Hb 鉄（溶血時）、フェリチン鉄（疾患時）も測定してしまうのが本法の欠点である。

なお、このように温度により測定が影響される場合、96 ウェルプレートの A と H の No.2～12, A～H の No.1 及び使用しないウェル、そしてウェル間プールにあらかじめ室温と同温度の水を入れておく必要がある。

Table 3 Effect of interfering substances on the determination of zinc in serum using ttmap

Conc added to Zn standard (mmol/l)	Interfering substances
Inorganic substances:	
200	Na, K, Li, Cl
10	Ca, Mg, P, S
0.05	Ni, Cd, Mn, Co, Cr, Sn, Al, Hg, Pb, Au, Pt, Sr, V, Se, As, Mo, W, F, Br, I Cu(II, -20%)*, Fe(III, -10%)*, Ti(-6%)*, Pd(+10%)*
Organic substances:	
500	urea
10	creatinine, ascorbic acid, uric acid (+10%)*
1	creatinine, uric acid
0.5	heparin Na, citrate, cysteine, D-penicillamine, glutathione red. 2,3-dimercaptopropanol, desferrioxamine B bilirubin in human albumin base, conjugated bil.(-100%)* EDTA 2Na (-22%)*

* The values in parentheses are atomic valences and the magnitudes of analytical error. These substances except the presence of > 10 mmol/l uric acid and EDTA did not affect the determination in the presence of human albumin.

3・4 ポルフィリン試薬と試料の超微量化

高感度試薬である陽イオン性ポルフィリン, $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラキス(4-N-トリメチルアミノフェニル)ポルフィンテトラトレンスルホン酸 (ttmap)¹²⁾ を用いて血清中亜鉛の除タンパク前処理の不要な直接測定を試みたが, 亜鉛と ttmap の錯形成反応促進に 100℃ 加熱以外の方法を見いだせなかったのが 20 年近く前になる。その後反応促進剤として 7-ヨード-8-ヒドロキシキノリン-5-スルホン酸 (フェロン)¹³⁾ が報告されたので, より高感度な血清中亜鉛測定法の開発を再開した。フェロン及び他のオキシ誘導体について比較検討した結果, フェロンが最も効果的で, しかも都合の良いことに血清中のタンパク結合亜鉛の解離剤としても働くことが分かった¹⁴⁾。亜鉛標準液においては, 鉄, 銅及び尿酸そして抱合型ビリルビンなどが測定を干渉した (Table 3)。意外にも, 標準液に代えて血清を分析対象とすると, アルブミンなど血清中に存在するタンパクが, あたかもマスキング剤のごとく働き, これら干渉物質による影響を回避できることが分かり, わずか 50 μ l の血清試料量による用手法を完成させた¹⁴⁾。

マイクロプレート (#3881-096, Iwaki 製) のウェル内に 6.3 μ l の試料を採り, 100 μ l の pH 5.0, 0.25 M 酢酸緩衝液を加え, かくはん後に 420 と 700 nm にて 1 回目の吸光度 (血清試料空試験) 測定を行い, 次に 50 μ l の 250 μ M フェロン, 100 μ l の 7.82 μ M ttmap を加えかくはん後, ウェル間プール内及び未使用ウェルに水を入れてからシーリングテープでウェルを密封する。37℃ 45 分間加温後, 30 分間室温にて放冷, テープを除いて 2 回目の吸光度測定を行ない, 計算により, 試料空試験値を補正して亜鉛値を求めた⁸⁾。ところが Fig. 3 に示すように, 用手法¹⁴⁾と比較してウェル壁へのタンパク吸着が起因となる反応速度減少と低亜鉛測定値を生じた。第 1 試薬の緩衝液に少量のウシアルブミンを添加することでウェル壁のプロッキング

Fig. 3 Effect of microplates on the determination of zinc in serum

$n = 22$; $\triangle$: Nunc#269620, $r = 0.95$, $y = 0.91x - 2.84$; $\square$: Iwaki#3881-096, $r = 0.96$, $y = 0.94x - 0.96$; $\bullet$: using Iwaki#3881-096 and buffer containing albumin, $r = 0.95$, $y = 1.05x - 0.37$

を行い, この問題は全面的に解決したかに思われたが, 抱合型ビリルビンによる干渉だけは問題として残った⁸⁾。それでもマイクロプレートを活用することで, 血清試料量と試薬量は用手法の 1/16 までダウンサイズ化可能となった。更にシアン使用の課題を抱えていた, nitro-PAPS を用いたマイクロプレート法⁵⁾の 1/3 まで試料の微量化を実現したことになり, ファーネス原子吸光法¹⁵⁾と比べても遜色ない。

4 ラテックス凝集比濁法によるタンパク質測定

血清中の α 2-マクログロブリン (AMG) などの特殊な

Fig. 4 Effect of reaction temperatures on the determination of α 2-macroglobulin in serum

Reaction time ($t_2 - t_1$): 9 min; $\triangle$: 17°C, 1.90 gAMG/l serum; $\bullet$: 20°C, 1.88 gAMG/l serum; $\square$: 23°C, 1.90 gAMG/l serum

タンパク質の測定は、臨床検査の現場における免疫学的測定専用の自動分析装置によらなければならないのが一般で、小さな研究室レベルで利用できるものはなかった。ラテックス凝集比濁法 (latex agglutination immunoassay, LAIA) は ELISA 法よりも感度的にはやや劣るものの、ポリエチレングリコールを用いた免疫比濁法と比べ、非特異反応による影響が少なく、測定が簡便・精密・迅速である点が優れている。LAIA をマイクロプレート測定システムに適用した例として、血清中の胎盤性ラクトゲン¹⁶⁾と β 2-ミクログロブリン¹⁷⁾の報告があるが、どちらも測定に長時間を要し、また何よりも LAIA とマイクロプレートの特性を十分に活用していなかった。そこで今回キネテック・アッセイの利用を図ることで、ウェル間のばらつきや試料空試験値補正の必要がなく、そのため正確で精度の高い測定が期待できた。

4.1 血清中 AMG の定量

抗体を含んだ免疫学的測定用試薬は大変高価であると同時に、特に抗体結合ラテックス試薬などを研究室レベルで必要時に独自に少量調整するのでは、試薬誤差の小さい一定の品質を維持するのが難しいという側面を持っている。今回、試薬は栄研化学製の尿測定用試作品を用いた。

HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) 緩衝液で 5 千倍に希釈した血清試料 40 μ l をマイクロプレート (#3881-096, IWAKI 製) のウェル内に採り、ウシアルブミンを含む緩衝液 150 μ l を加え、かくはん、次いで抗ヒト AMG ウサギ免疫グロブリン G (IgG) 感作ラテックス液 50 μ l を加え、かくはん、その開始 1 分後に 670 nm にて 1 回目の吸光度を、その開始 10 分後に 2 回目の吸光度を測定し、9 分間の吸光度変化量 (ΔA) を

Fig. 5 Microplate method for α 2-macroglobulin in serum compared with ELISA

求めた。標準液 (栄研もしくは DAKO 製) より作成した検量線 (Fig. 4) から AMG 濃度 (ng/ml) を求め、5 千倍して試料中濃度 (g/l) に換算した。

普及型 MPR では 37°C における正確なキネテック・アッセイが不可能な現状にある。そこで 17, 20, 23°C の各室温にて 4, 9, 14 分間の ΔA について比較検討した結果、0~2000 ng AMG/ml の範囲で反応時間に比例した検量線における ΔA と S 字傾向の増加が見られた。そのうちの反応時間 9 分間における結果を Fig. 4 に示す。反応温度の違いによる測定値への影響がなかったので、反応時間は感度面も考慮して、9 分間 (23°C ; 0.001 ΔA = 3.2 ngAMG/ml 血清) に決定した。検出限界は 24.5 ngAMG/ml. 5 gHb/l までの溶血, 0.5 g ジタウロビリルビン/l までの黄疸, 20 g イントラリボス/l までの乳び, そしてリウマトイド因子 500 IU/ml による測定値への影響がないことを確認した。添加回収率は 95~105%, 同時及び日差測定の相対標準偏差 (RSD) ($n = 5$) は各々 1.89~4.84%, 6.24~8.74% であった。20~54 歳男女 48 名からなる健常人による平均値 $\pm$ 2SD は 1.87 ± 1.00 g/l. 同一の患者試料 ($n = 80$), 試薬及び標準液を用いてのアロカ製自動分析装置 LX-2200 (LX2200, x_1) との相関は $r = 0.975$, $y = 1.14x_1 - 0.272$, 更に ELISA 法¹⁸⁾ (x_2) との相関 ($n = 70$, Fig. 5) は $r = 0.988$, $y = 0.961x_2 + 0.112$ と良好であった。

4.2 血清中アルブミンの定量

試薬は血清・尿アルブミン測定用 LX 試薬 '栄研' Alb-II 及び HEPES 緩衝液 (緩衝液) を使用した。標準液として標準 XX '栄研' を 0~12.45 μ gAlb/ml に緩衝液で適度希釈して用いた。

最初に緩衝液で希釈して1万倍の希釈血清試料を作る。マイクロプレート(#3881-096, IWAKI製)のウェル内に希釈試料8.3 µlを採り、抗ヒトアルブミンマウスIgG感作ラテックス液250 µlを添加後、直ちに45秒間かくはんする。670 nmにて、かくはん開始1分後と10分後の吸光度を測定する。すなわち9分間の吸光度変化量を求め、検量線より血清中のアルブミン濃度を算出した。

AMGと同様に反応温度の違いによる測定値への影響はなかったため、反応時間は感度面も考慮して、9分間(23℃; 0.001 ΔA = 0.03 µgAlb/ml 血清)に決定した。検出限界は0.43 µgAlb/ml、5 gHb/lまでの溶血、0.5 g ジタウロビリルビン/lまでの黄疸、20 g イントラリポス/lまでの乳び、そしてリウマトイド因子500 IU/mlによる測定値への影響がないことを確認した。添加回収率は95.7~108%。同時及び日差測定のRSD ($n=5$)は各々1.40~5.80%, 5.90~11.2%であった。20~54歳男女48名からなる健常人による平均値 $\pm 2SD$ は 46.7 ± 8.56 g/l。患者血清($n=80$)を用いてのLX-2200(x_1)との相関は $r=0.917$, $y=0.946x_1+3.104$, また新プロモクレゾールパール(新BCP, x_2)法¹⁹⁾との相関は $r=0.928$, $y=0.913x_2+5.023$ であった。

新BCP法は試薬処方の改良により免疫学的測定法とよく一致した値が得られることが知られている¹⁹⁾。同一の試薬、試料を用いてのLX-2200(y)と新BCP法(x)との相関が、 $r=0.969$, $y=0.983x+3.491$ で、本法と新BCP法のそれ($r=0.928$)に比べて良好なことから、マイクロプレートを用いることの不具合について考察した。既にボルフィリン試薬を用いた血清中亜鉛測定のマイクロプレート法で経験したように、ウェル壁とタンパク(抗体結合ラテックス粒子)間の相互作用による影響が考えられる。本法が1液法であるためポリスチレン製ウェル壁へのタンパク吸着のブロッキングには、ウェルの材質を含めた検討が今後の課題であろう。しかし、いずれにしろマイクロプレート測定システムが、小さな研究室における利用や専用自動分析装置トラブル時のバックアップシステムとしての有効性を秘めていることには変わらない。

5 結 語

血清など試料のダウンサイズ化はまさに臨床分析そのものであり、メインである微量金属定量法の開発研究のかかわり、必要に応じて本システムに適用してきたものが、こ

れまでに六つの分析対象に八つの報告になった(Table 1)。

マイクロプレートにおけるウェル間の光学的ばらつきや金属汚染など、開発当初と比べ、どのメーカー品を使用しても大きな品質差は見られなくなった。使用後のマイクロプレートはラボクリーン(三光純薬製)の1%液で洗浄後、微量金属測定目的には、更に2 M 塩酸をウェルに加え、マイクロミキサーで30分かかくはん洗浄して、数回再使用している。

装置が安価で、広い設置スペースを必要とせず、低ランニングコストでもある本システムの最大の特長は、むしろ“だれでも”が“手軽”に“直ぐ”にでも利用できる点にあると言えよう。しかし意に反し適用されている分析対象は少ない。さらなる活用の道が開かれるよう本稿が役立てば幸いである。

文 献

- 1) 牧野鉄男: ぶんせき (*Bunseki*), **1998**, 49.
- 2) T. Makino: *Clin. Chim. Acta*, **185**, 7 (1989).
- 3) 牧野鉄男, 神辺恵子, 鎌田 智, 藤沢俊正: 日本臨床検査自動化学会会誌, **14**, 451 (1989).
- 4) 牧野鉄男, 神辺恵子, 鎌田 智, 藤沢俊正: 臨床病理, **37** 補冊, 182 (1989).
- 5) T. Makino: *Clin. Chim. Acta*, **197**, 209 (1991).
- 6) 牧野鉄男: 臨床化学, **21** (supp. 2), 59b (1992).
- 7) 牧野鉄男, 稲川和男, 久松俊英, 鎌田 智, 藤沢俊正: 日本臨床検査自動化学会会誌, **19**, 697 (1994).
- 8) 牧野鉄男, 鎌田 智, 藤沢俊正: *Biomed. Res. Trace Elements*, **10**, 265 (1999).
- 9) D. Horiguchi, M. Saito, T. Imamura, K. Kina: *Anal. Chim. Acta*, **151**, 457 (1983).
- 10) T. Makino, M. Kiyonaga, K. Kina: *Clin. Chim. Acta*, **171**, 19 (1988).
- 11) D. Horiguchi, M. Saito, K. Noda, K. Kina: *Anal. Sci.*, **1**, 461 (1985).
- 12) T. Makino, J.-I. Itoh: *Clin. Chim. Acta*, **111**, 1 (1981).
- 13) C. Zhang, F. Yin, J. Cheng: *Fenxi Huaxue*, **12**, 110 (1984).
- 14) T. Makino: *Clin. Chim. Acta*, **282**, 65 (1999).
- 15) J. P. Matousek, B. J. Stevens: *Clin. Chem.*, **17**, 363 (1971).
- 16) D. Collet-Cassart, J. N. Limet, L. Van Krieken, R. De Hertogh: *Clin. Chem.*, **35**, 141 (1989).
- 17) D. Collet-Cassart, S. Poncelet, P. De Nayer: *J. Immunol. Methods*, **142**, 183 (1991).
- 18) H. Ishibashi, K. Hayashida, H. Okubo: *Methods Enzymol.*, **163**, 485 (1988).
- 19) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 臨床化学, **26**, 38 (1997).

要 旨

ウェル容量がわずか 400 μl ほどのマイクロタイタープレートと高感度比色試薬を利用することで、血清試料と試薬のダウンサイズ化を図った。更にマイクロピペットをはじめとする周辺機器を整備することで、簡便で高精度な測定システムを構築した。ヘテロ環アゾ化合物を用いての鉄、銅、亜鉛の迅速分析、血清鉄と薬剤鉄の同時定量、亜鉛測定における陽イオン性ポルフィリンを用いての試料の超微量化、更にラテックス免疫凝集反応を利用した $\alpha 2$ -マクログロブリンとアルブミンの定量など、試薬量 250 μl を限度として、50 ～ 6.3 μl の試料量で、 $\mu\text{mol/l}$ の濃度レベルの測定に成功した。しかし一部の方法において、血清中に共存するビリルビンやタンパクによる影響の問題を残している。このように本稿においては臨床分析におけるマイクロタイタープレートの活用とその問題点を中心に議論する。