原 著

腹膜平衡機能検査における酵素法と ヤッフェ法を用いたクレアチニン測定と比較

中村 信也 朝 長 香 北條 みどり 飯高 喜久雄

西 田 陽*

北里大学小児科 同臨床病理*

key words : CAPD, 腹膜機能検査, クレアチニン測定, 酵素法

〈要旨〉

現在クレアチニン (Cr) の測定は、ヤッフェ直接法と酵素法で行われている。腹膜透析液には高濃度のグルコースが含まれており、ヤッフェ直接法による Cr の測定はグルコース濃度の影響を受けるため、グルコース濃度に対する補正が必要である。一方、酵素法による Cr の測定においてはグルコース濃度の影響は受けない。今回は小児 CAPD 患者の腹膜機能検査 (PET) においてヤッフェ 直接法と酵素法により透析液中の Cr を測定し、両者間の差を検討した。ヤッフェ直接法 (グルコース補正後) における D2/P (Cr) と D4/P (Cr) の平均は各々 0.494 と 0.788 で、酵素法における平均は各々 0.478 と 0.722 になり、腹膜機能の値に差がみられた ($p < 0.01$)。

PET における透析液中の Cr 値の測定は、グルコース濃度による影響が少なく、グルコース濃度の補正をせずに、Cr 値の測定が可能な酵素法がより有用であると思われた。

Evaluation of creatinine determination by enzymatic assay and the Jaffe reaction method in peritoneal equilibration test

Shinya Nakamura, Kaori Tomonaga, Midori Hojo, Kikuo Iitaka, Akira Nishida*

Department of Pediatrics, and Clinical Pathology*, Kitasato University School of Medicine

We measured creatinine in peritoneal dialysate by enzymatic assay (EA) and the Jaffe reaction method (J), to perform peritoneal equilibration tests (PET) in children. Average D2/P ratios measured by J (corrected by glucose), and EA of D2/P were 0.494 and 0.478 ($p < 0.01$), respectively, and those of D4/P were 0.788 and 0.722 ($p < 0.01$), respectively. EA is more accurate and useful for measuring creatinine in peritoneal dialysate since this method is not influenced by the glucose concentration of the dialysate.

緒言

腹膜透析患者の腹膜機能の評価には Towardowski ら¹⁾の提唱した腹膜平衡機能検査 (PET) が行われている。その測定には透析液中のグルコースとクレアチニン (Cr) 濃度の比を利用して、Cr の測定はヤッフェ直接法 (以下ヤッフェ法と略す) と酵素法を用いて行っている。ヤッフェ法は簡便な方法であるが、測定上いろいろな因子に左右される欠点がある。特にグルコース濃度に対する補正が必要とされている。今回我々は小児

の PET における透析液中の Cr の測定を酵素法を用いて測定し、ヤッフェ法による測定値と比較検討した。

対象

本院で CAPD 施行中の男子 14 例、女子 4 例の計 18 例を対象とした。年齢は 5 歳 5 か月から 18 歳、平均 12 歳 10 か月で、透析期間は 2 か月から 78 か月、平均 43 か月であった。原疾患は低形成腎 9 例、逆流腎症 2 例、慢性糸球体腎炎 3 例、多発性動脈周囲炎 1 例、巣状糸球体硬化症 1 例、ネフ

ローゼ症候群 1 例，先天性ネフローゼ症候群 1 例であった。

方法

1. クレアチニンの測定

1) ヤッフエ法

HITACHI 7150 (日立製) を使用し，ヤッフエ直接レート法試薬 (デンカ生研製) を用い，測定波長は 600/505 nm で吸光度を測定した²⁾。

2) 酵素法

TBA-30R (東芝製) を使用し，UV 法試薬 (デンカ生研製) を用い，測定波長は 340/524 nm で NADH の増加による吸光度の変化を測定した³⁾。

3) 液体クロマトグラフィー (HPLC) 法

HPLC 装置，カラムは Shim-pak ISC05/S0504 (島津社製) を使用し，流速 0.7 ml/分，カラム温度 40°C，検出波長 234 nm，検出器感度フルケース 0.64 前後の条件下で測定を行った。溶解液は 10 mM リン酸緩衝液 (100 mM 硫酸ナトリウム含む) pH 5.75 を使用した⁴⁾。

これらの測定にはデンカ生研製クレアチニン標準液 5.00 mg/dl を使用した。

2. 検体の測定

1) 酵素法は他の物質の影響を受けにくい測定法であるが，確認の意味で，今回 PET 施行時に使用した透析液中の Cr 値を HPLC 法と酵素法で測定し比較した。

2) Cr を含まない各種濃度のグルコース溶液を作成し，酵素法およびヤッフエ法で測定し，ヤッフエ法による測定値のグルコースに対する補正式を求めた。

3) 透析液中の Cr 値 (DCr) の測定を酵素法およびヤッフエ法で行い，両者の測定値を用いて 2 時間目の D2/P (Cr) と 4 時間目の D4/P (Cr) を求め，相違を検討した (P=血清クレアチニン値)。

3. 検定方法

二群間の相関は，回帰分析，*t*-test で求めた。

結果

1. 透析液中のグルコース濃度と Cr 濃度
PET で採取した 18 例の全透析液中のグルコー

図 1 HPLC 法と酵素法を用いて測定した透析液中クレアチニン値の相関 (HPLC 法対酵素法)

ス濃度は 217~2,234 mg/dl で，ヤッフエ法により測定された透析液中 Cr 濃度 (グルコース濃度補正後) は 0.63~12.40 mg/dl であった。

2. HPLC 法と酵素法の Cr 測定の相関

今回の透析液検体の Cr 値を HPLC 法と酵素法で測定したところ，両者の Cr 値の間には高度の相関が得られ ($y=0.968+0.17$, $r=0.997$)，有意差を認めなかった ($P=0.953$) (図 1)。

3. Cr 測定に及ぼすグルコース濃度の測定

各濃度のグルコース溶液を用いてヤッフエ法と酵素法で Cr 値を測定した。酵素法による Cr 値の測定はグルコース濃度による影響はみられなかったが，ヤッフエ法ではグルコース濃度に比例して，Cr 値の上昇がみられ，真の Cr 値 ($Cr=0$ mg/dl) と差を認めた (図 2)。この結果よりグルコース濃度に対する Cr の補正式として [真の $Cr=Cr$ (ヤッフエ法) $-0.00031 \times$ 透析液中のグルコース濃度] が得られた。

4. 透析液中 Cr の測定：ヤッフエ法と酵素法の比較

今回使用した腹膜透析液中の Cr 値の測定をヤッフエ法と酵素法で行った。ヤッフエ法で測定した Cr 値はグルコース濃度で補正した。両者の測定値の間には相関係数で $r=0.998$ と非常に良好な相関が得られた [$y=1.020x+0.031$] (図 3)。さらに両集団は *t*-test で $p=0.001$ と有意差が得

図2 ヤッフェ法と酵素法での各種グルコース溶液におけるクレアチニン測定値の変化

図3 ヤッフェ法(糖補正後)と酵素法により測定した透析液中のクレアチニン値の相関

図4 酵素法とヤッフェ法で測定したクレアチニン値を用いて得られた腹膜平衡機能検査値の比較

られた。

5. ヤッフェ法で測定した Cr 値をグルコース濃度で補正した後に得られた D2/P (Cr) と D4/P (Cr) の平均は各々0.494 と 0.788 で、酵素法による D2/P (Cr) と D4/P (Cr) の平均は各々0.478 と 0.722 となっており腹膜平衡機能の値に差がみられた (t -test $p < 0.01$) (図4)。

考察

近年 Cr の測定は、除蛋白を行わないアルカリ性ピクリン酸の呈色反応 (Kinetic Jaffe 法)^{3,4)}を利用した自動分析装置が多く用いられている。この反応系は測定値に影響を与える物質が多く存在することが知られており⁵⁾、その影響を除くため、酵素法を用いた測定法の有効性が報告されてい

る^{6,7)}。

腹膜平衡機能検査は1987年 Twardowski ら¹⁾が成人例における結果を報告し、現在透析患者の腹膜機能の評価に役立っている。腹膜の除水能と拡散能を透析液中のグルコース濃度の低下率とCr濃度の透析液/血清比の経時的変化を測定して評価する。透析液中には高濃度のグルコースが存在するため、ヤッフエ法を用いてCrを測定するにはグルコースに対する補正式が必要である。

Twardowski らは補正式として [真の Cr=Cr (ヤッフエ法) - 0.00033 × 透析液中のグルコース濃度] で計算することを推奨した。しかしいろいろな測定機械が存在するため、各々の施設でのグルコースに対する独自の補正式が必要であると後に訂正している。今回我々の検討の結果、補正式として [真の Cr=Cr (ヤッフエ法) - 0.00031 × 透析液中のグルコース濃度] が得られた。酵素法によるCr測定に関しては透析液および透析排液中に通常含まれる程度のグルコース、アルブミン、尿酸、アンモニア、尿素窒素等ではほとんど影響を受けないと報告されている。今回我々もPETで得られた217~2,234 mg/dlのグルコース濃度の透析液について、酵素法とHPLC法で測定したところ両者間では非常に良い相関が得られ、酵素法が他の物質に影響されないことを証明した。同一検体をヤッフエ法で測定しグルコース濃度で補正したCr値と酵素法で測定して得られた値とを比較したところ、両者間で $y = 1.020x + 0.031$ (y: ヤッフエ法, x: 酵素法) の回帰式が得られた。相関係数, $r = 0.998$ と非常に良い相関が得られたが, t 検定では $P = 0.001$ と有意差を認めた。以上の結果よりヤッフエ法による透析液中のCrの測定は、さらにグルコース以外の因子をも除外する必要があると思われた(図3)。グルコース以外の因子についての検索は今回は行っていないが、このような影響因子を含んだCrの測定方法は透析液の測定には不向きではないかと思われた。

Twardowski らの補正式のみではD2/P (Cr), D4/P (Cr) で5%前後の測定値の違いが生じることがわかった。腹膜機能検査におけるCrの測定は、グルコースや他の因子による影響が少なく、これらの因子による影響の補正を必要としない酵素法がより正確で有用であると思われた。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました北里大学小児科主任教授松浦信夫先生に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第36回日本腎臓学会(横浜)において報告した。

文献

- 1) Twardowski ZJ: Peritoneal equilibration test. Perit Dial Bull 7: 138-147, 1987
- 2) Jaffe M: Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsaure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. Z Physiol Chem 10: 391-400, 1886
- 3) Larsen K: Creatinine assay by a reaction-kinetics principle. Clin Chem Acta 41: 209-217, 1972
- 4) Taussky HH: A procedure increasing the specificity of the Jaffe reaction for the determination of creatine and creatinine in urine and plasma. Clin Chem Acta 1: 210-214, 1956
- 5) Miller B, Dubos R: Determination by a specific enzymatic method of the creatinine content of blood and urine from normal and nephrotic individual. J Biol Chem 121: 457, 1937
- 6) Yasuhara M, Fujita S, Arisue K, Kohda K, Hayasi C: A new enzymatic method to determine creatinine. Clin Chem Acta 122: 181-188, 1982
- 7) 中野幸弘, 松森康有: 日立736形自動分析装置におけるクレアチニン酵素法の比較検討。日本臨床検査自動化学会会誌 16: 72-77, 1991