〔原 著〕

超高感度オルトトルイジン試薬による 血糖の全血直接定量法の開発について*

高 原 喜八郎**

Summary

A new method was developed for the whole blood direct determination of blood sugar by an ultra-highly sensitive ortho-toluidine reagent (OT-37).

The sensitivity of OT-37 was 2.6 fold higher than the regular reagents. The procedure for the determination was as follows. 10 μ l of whole blood was mixed with 5 ml of OT-37 by blowing out from a capillary pipette. The blood hemolyzed immediately on mixing. Absorbance at 565 nm (Eb) was read and the tube was heated at 100°C for 3 minutes and 30 seconds. After cooling the tube in running water, absorbance at 565 nm (Ea) was read again. The difference between the two readings, $\Delta E = Ea - Eb$, was found to be proportional to the glucose concentration.

In contrast with the negative interference caused by hemoglobin iron at the regular wave length of determination (635 nm), no interference was observed at 565 nm. Addition of 10 μ l of 10 mg/ml glutathione, either reduced or oxidized, gave no effect on readings. Positive interference caused by NAD or NADH was found to be cancelled by coexisting hemoglobin.

Recovery tests and comparison with the values obtained by conventional methods gave satisfactory results.

The new method seemed, therefore, to be satisfactory and useful especially in emergency determinations.

はじめに

今日、血糖の臨床検査件数は日常検査項目中、最も多数を占めており、その検査要求の出され方については緊急検査と日常検査の2つの場合があり、また、定量原理別としては還元法、縮合法、酵素法の3種に大別され、各々の方法は手法または自動化機器法として適用されている。自動化機器法は多数(30件以上)の検体をまとめて迅速に精度よく検査するのに適した方法であるが、緊急的に発生する少数検体の迅速処理には、あまり有効でないことは周知であり、この理由から例えばベックマンのグルコース分析計のような血清に分離した後、10 μ lの試料として分析計に注入すると、約10秒後にグルコース値がデジタル表示されるような専用機が高価であるにもかかわらず緊急検査の要望に沿って使用されている。しかし、この場合でも試料は血清(漿)であるために採血後血清分離までに数分の時間と遠心機を必要とするた

め、ベッドサイドや外来付近で検査を実施するにはやや不便である。従って、血清に分離しない全血のまま直接注入して血糖値がほぼ正確に、安価に測定できる装置があれば、より便利であろうことはいうまでもない。著者はこのような装置に乗せる目的で安価な反応系を探究し、実用に供され得ると思われる試薬と反応系を開発して、全血直接法による血糖定量実験を行なったので、その成績について報告する。

実験法および結果

1. 装置・器具・試薬
- 1) 日立 124 型分光光度計
- 2) 日立 QPD 53 型記録計
- 3) 中外製薬ラビドブラッドアナライザー (RaBA)
- 4) グリンバム超微量自動ピペット
- 5) Drummond 毛細管定量ピペット
- 6) グルコース標準液、特級無水ブドウ糖を 100,

* Studies on a new whole blood direct method of the determination of blood sugar by an ultra highly sensitive ortho-toluidine reagent.

** Kihachiro Takahara, 神奈川県立衛生短期大学臨床化学教室.

(124) 生物物理化学

200, 300, 400 mg/dl になるように次の2種の溶媒にて溶解した。

A) 飽和安息香酸水溶液

B) Bovine albumin 6 %溶液 (溶媒; 1/2 飽和安息香酸, 0.2 % NaF, 0.1 % NaN_3 含有)

7) 市販標準血清; Hyland normal.

8) プール血清; 自家製 (用手法にてグルコース濃度既知のもの)

2. 発色試薬 (OT-37)

佐々木匡秀によるオルトトルイジンホウ酸試薬 (O-T B 試薬)¹⁻⁴⁾を著者の研究により高感度に改良したものを使用した。本試薬は既報⁵⁻⁷⁾の如く 37°C においても発色が進行し、定量に利用できるので OT-37 と呼称する。その調製法は次の如くである。

関東化学特級氷酢酸 850 ml を 1 l の三角フラスコに入れ、湯浴などで約 70°C に加温する。この中に特級ホウ酸 6.80 g を入れ、攪拌保温により完全に溶解させる。約 30 分を要する。次いで特級チオ尿素 5.00 g を加え溶解させる。三角フラスコを湯浴などよりとり出し、流水中で冷却後、無色透明に精製したオルトトルイジン (和光純薬) 150 ml を加えよく攪拌混和する。液温は上昇するから再び流水中で冷却後、褐色びん中に入れ密栓し、冷暗所に保存する。本試薬は調製後 20 日後までは感度やや上昇するも以後安定となり、数か月間の保存に耐える。

OT-37 中には使用した氷酢酸中の微量 (約 1 % 以下) の水分以外の水は含んではならない。これ以上の水分混入はグルコースの定量感度を大いに低下せしめる。これは感度上昇を与えるホウ酸分子が溶液中で水相に移行して、反応の場であるオルトトルイジン分子から遠ざかるためであろうと考えられる。⁵⁾

3. 実験操作

RaBA 用試験管または 10 ml 容小試験管に OT-37 を自動分注器などにより 5.0 ml ずつ分注し、グリーンバムまたは毛細管ピペットなどにより、被検液 10 μl を正確に注入混和する。被検液が全血の場合は毛細管ピペットにより試薬中に完全に吹き込み、ひきつき約 10 秒間空気の吹き込みを続けながら毛細管自体で試薬内を攪拌し溶血を助ける。この場合、ピペット内を試薬で洗い込む操作をしてはならない。管壁の内側に残り付着している血液が凝固して 5 % 以上の負誤差となるからである。被検液注入後の反応管は約 3 分室温に放置してから RaBA または分光光度計にて加熱前の吸光度 E_b をよむ。分光光度計の波長は後述する理由から 565 nm にセットするが、比較の目的から通常の 635 nm のよみも記載しておく。RaBA の場合の波長は $540 \pm 10 \text{ nm}$ の単一フィルタ

ーより成っている。

次いで E_b をよんだ反応管を沸騰している水浴中に浸し、正確に 3 分 30 秒加熱してただちに流水中に移して 3 分間水冷する。再び上記の波長での吸光度をよみ E_a とする。

4. 検量線

上記の操作条件においては、グルコース標準液に飽和安息香酸水溶液を用いる場合でも、10 μl の微量水分が 5 ml の試薬中に混入する程度では試薬の感度は影響を受けないから、標準液としては上記の 6)-A) または B) のいずれを使用してもよい。むしろ 6)-A) が適当であろう。本法による感度を原法の佐々木 O-TB 試薬による感度と比較して検量線に示すと Fig. 1 の如くとなり、約 2.6 倍の感度上昇と直線性が認められた。原法試薬としては、市販グルコテスト (Glucotest, 中外) を使用した。

Fig. 1. Calibration curve for the determination of blood glucose by OT-37, 100°C procedure. 10 μl of sample and 5 ml of the reagent were used. Left ordinate is RaBA (Rapid Blood Analyzer, Chugai Seiyaku Ltd.) reding.

5. 発色の安定性

水冷後の色調の安定性を追跡すると Fig. 2 の如くとなり、約 30 分後までは安定であることが認められた。

6. 血球内諸物質の干渉について

本法のように超高感度化せしめたオルトトルイジンとグルコースの反応には、血球内諸物質の干渉が懸念される。そこで血球内物質として色素 (Hb), グルタチオン (GS), グルタチオン還元型 (GSH), NAD, NADH,

Fig. 2. Stability of coloration in the OT-37, 100°C procedure.

Top : observation at 24°C.

Bottom : observation at 31.5°C.

10 μ l of 200 mg/dl glucose solution was mixed with 5 ml of the color reagent and heated for 3 minutes and 30 seconds at 100°C and cooled for 3 minutes.

RaBA readings were taken for the following 90 minutes.

および Fe^{+++} をとりあげて以下の実験を行なった。血餅に水を加えて攪拌溶血せしめ、室温に数日放置してグルコースを消失せしめたHb水溶液 (Hb=5.5 g/dl, シアンメトヘモグロビン法) をつくり、この 20, 40, 60, 80 μ l

を RaBA 用反応管にそれぞれ加え、さらに 200 mg/dl グルコース 10 μ l を各々追加注入しよくまぜる。RaBA による Eb, Ea をよんで Hb による RaBA 法への干渉をチェックした (Table 1, A 群)。

RaBA の内蔵固定フィルター (540 $\pm$ 10 nm) による成績では Table 1 に示すように Hb ゼロ (グルコースのみ) の Ea-Eb= Δ E は 148 であり、5.5% Hb が 20, 40, 60, 80 μ l と共存増加してゆくに従って Δ E はそれぞれ 165, 181, 198, 209 とプラスの干渉を示した。この増加率を求めると、それぞれ 1.11, 1.22, 1.34, 1.41 の係数を得た。たまたま Table 1 における Eb の値についてみると、それぞれ 116, 225, 339, 441 であり、偶然これらの Eb の値の上 2 桁を小数点以下として、1.00 に加えた数値 (ここでは 1.11, 1.22, 1.33, 1.44) は上記の係数に極めて近似していることが判明した。そこで RaBA の Δ E 値を 1. [Eb] で割れば Hb によるプラスの干渉が補正されるものと考えられ、以下の全血直接 RaBA 法値はすべてこの補正を行なった。

Hb 以外の GS, GSH, NAD, NADH については、それぞれの 10 mg/ml (全血中平均濃度の約 100 倍量), Fe^{+++} については 10 mg/dl (全血中の 1/5 濃度) 水溶液をつくり、各々の 10 μ l を、グルコース 200 mg/dl 液 10 μ l を含む反応管に加えた B 群と、さらにそれらにグルコースをゼロとした全血 10 μ l を加えた C 群をつくり実験した。すなわち、B 群は Hb と共存しない血球内物質の干渉実験であり、C 群は Hb と共存する上記物質の干

Table 1. Interference of Hb on the OT-37, 100°C reaction and a new correction formula for RaBA method.

		OT-37	EDTA-4Na	Glucose 200 mg/dl	Hb pooled 5.5 %	RaBA (530 nm)			Ratio
						Bef. H.	Aft. H.	Δ E	
	1	5 ml	—	20 μ l	—	0	129	129	1.00
	2	5 "	10 mg	20 "	—	0	131	131	
	3	5 "	—		20 μ l	114	120	6	
	4	5 "	10 mg		20 "	115	115	0	
	5	5 "	—	20 "	20 "	118	275	157	1.20
	6	5 "	10 mg	20 "	20 "	117	262	145	1.11
A group	7	5 "		20 "	—	0	148	148	1.00
	8	5 "		20 "	20 "	116	281	165	1.11
	9	5 "		20 "	40 "	225	406	181	1.22
	10	5 "		20 "	60 "	339	537	198	1.34
	11	5 "		20 "	80 "	441	650	209	1.41
	12	5 "		20 "	100 "	535	752	217	1.47
						hemolyzed in H ₂ O	Corrected RaBA reading= $\frac{\text{Ea}-\text{Eb}}{1. [\text{Before}]} = \text{Net Abs.}$		

Table 2. Interference of intracellular substances on OT-37, 100°C reaction.

	Name of substance	RaBA (corrected)				635 nm				565 nm			
		Bef.	Aft.	mg/dl	Recv. %	Bef.	Aft.	mg/dl	Recv. %	Bef.	Aft.	mg/dl	Recv. %
B group	0 —	0	100	200		0	.230	200		0	0.90	200	
	1 GS	0	99			0	.228			0	0.88		
	2 GSH	0	100			0	.228			0	0.86		
	3 NAD	0	118	↑		0	.222	↓		0	0.91		
	4 NADH	0	133	↑↑		0	.235			0	1.05	↑	
	5 Fe ⁺⁺⁺	0	118	↑		0	.208	↓↓		0	.093		
C group	0 —	0	98	200	100	0	.230	200	100	0	.090	200	100
	1 Blood	181	310	227	113	.088	.282	167	83	.099	.192	205	102
	2 GS+Blood	179	285	187	93	.088	.275	161	80	.098	.190	204	102
	3 GSH+ "	175	294	210	105	.085	.270	159	79	.093	.188	211	105
	4 NAD+ "	175	312	241	120	.083	.278	168	84	.093	.193	222	111
	5 NADH+ "	179	312	234	117	.083	.264	156	78	.096	.192	213	106

EXP. OT-37+Glucose 10 μ l (200 mg/dl)+Subse. (10 mg/ml).

Remarks: GS, Gultathione oxidized, Fe⁺⁺⁺—(FeCl₃)50 mg/dl.

GSH, " reduced, Blood 4 days aged.

渉実験である。これらの結果を Table 2 に示す。

すなわち、635 nm において有意の干渉を示すものは Fe⁺⁺⁺であってマイナス 10 %に及ぶが 565 nm では大差なくなった。

GS および GSH はグルコース 単独の場合には RaBA, 635 nm, 565 nm による測定値に対しては対照に比して大なる差は与えない。しかし、Hb がさらに共存すると大きなマイナス干渉を 635 nm 値に受けている。

NAD および NADH はグルコース 単独の場合、RaBA 値に対しては約 20 %のプラス干渉を、565 nm 値では NADH が 17 %のプラス干渉を与える ようであるが 635 nm では大差を認めない。しかるに Hb が共存すると RaBA 値では約 20 %のプラス干渉を、635 nm 値では約 20 %のマイナス干渉となり、565 nm 値では干渉は半減するも、なお 6~11 %のプラス干渉を残している。従って、565 nm 値においてさえ、正常量より 100 倍多量の NAD, NADH が共存すると軽度のプラス干渉があり、また、補正 RaBA 値でも大幅のプラス干渉から逃げられないようである。これは恐らく NAD などに含まれている Fe⁺⁺⁺ による影響であろうと思われ、Fe⁺⁺⁺ による干渉を、さらに、くわしく検討するために、次の実験を行った。

すなわち、100, 200, 300, 400 mg/dl のグルコース液 10 μ l ずつを反応管にそれぞれ加えてから、50 mg/dl の Fe⁺⁺⁺ 液 (FeCl₃) をさらに 10 μ l (Fe⁺⁺⁺ として 5 μ g) ずつ追加したもの (Fe 群) と、追加しないもの (対照群) について 100°C 加温発色させてから、これら 8 本の呈

Fig. 3. Interference of ferric ion in the OT-37, 100°C procedure.

色液の吸収スペクトルを描記させたところ Fig. 3 の結果を得た。すなわち Fe⁺⁺⁺ を含んだ呈色液は 635 nm においては対照群に比して、それぞれ約 20 %のマイナス干渉を受けるが、565 nm においては Fe⁺⁺⁺ の有無に関せず両群は同一の吸光度を示し (交叉し)、565 nm 以下においては Fe 群は対照群に比してプラスの干渉を示す (例えば 530 nm においては約 +15%) ことが認められた。

Fe⁺⁺⁺ によるこれらの干渉は、実際には Hb-鉄としても同様に作用するので、単に試薬中に EDTA などに加えたのみでは Hb-鉄の干渉からは逃げられない。従って感度を約 1/2 に低下させても 565 nm における吸光度を利用することによって、はじめて Fe の干渉から完全に逃げるができると思われる。感度の 1/2 に低下する

ことは、しかしながら OT-37 が従来の O-TB 試薬に比して感度が2.6倍であることから、1/2に低下してもなお1.3倍の感度を保持しているので問題とはならない。

以上の成績から Fe^{+++} が重大な干渉を与える最大原因であるらしいことが判明したが、なお 565 nm においても NADH または NAD によって プラスの干渉がやや認められる理由については不明である。恐らく正常量の100倍の大量添加によるものか、あるいは NAD などの

存在下では交叉波長域のずれが起こるのか別個の検討を要する問題であろうが、実際的にはあまり大なる影響ではない。

7. 実験成績

回収試験の成績を Table 3 に示す。グルコースフリー血液 10 μ l 共存下で 100 および 200 mg/dl グルコース液 10 μ l 添加による回収率は、無補正 RaBA 値では 111%, 108%であるのに対して補正 RaBA 値では 99%, 93

Table 3. Recovery (%) of the OT-37, 100°C reaction coexisting with blood.

ml of OT-37 added	Conc. of 10 μ l glucose added mg/dl	μ l of blood added	Value expected mg/dl	Value observed (mg/dl) & recovery (%)							
				RaBA		RaBA		635 nm		565 nm	
				Not corrected	Rec. %	Corrected	Rec. %	Obsd.	Rec. %	Obsd.	Rec. %
1	5	100	—	100							
2	5	(Plasma)	10	(131)		130		102		135	
3	5	100	10	100	111	99	99	70	70	102	102
4	5	200	10	200	216	187	93	140	70	202	101

Table 4. Glucose levels (mg/dl) obtained by the new method.

No.	Whole blood			Plasma			
	RaBA	635 nm	565 nm	RaBA	635 nm	565 nm	AAI*
1	190	141	174	220	187	192	187
2	140	97	113	144	125	140	140
3	211	154	211	232	195	200	200
4	189	138	200	208	178	184	191
5	134	92	132	108	93	100	106
6	125	88	125	130	113	124	131
7	101	70	80	96	85	77	94
8	110	79	106	103	100	88	105
9	105	75	106	105	95	88	102
10	115	85	123	109	100	100	110
11	108	92	117	119	108	106	111
12	107	79	95	100	91	84	105
13	162	119	153	192	172	160	178
14	104	84	117	123	111	100	113
15	112	79	112	123	113	106	118
16	111	101	127	125	121	111	133
17	149	108	127	155	143	137	154
18	162	115	153	190	178	177	178
19	114	87	122	101	95	90	112
20	113	79	122	96	93	100	104
21	112	83	122	100	97	100	111
22	101	80	108	93	87	90	99
23	109	79	122	100	93	95	124
24	113	85	128	118	110	110	124
Mean	129	95	129	133	120	119	130
Remarks	Corrected						

Color development; 100°C₃30'', cooling, 3'.

* Technicon Autoanalyzer, Basic Type, O-TB method.

%であった。また635 nm 値では、いずれも70%でマイナス30%の干渉が認められたが、565 nm 値では102%、101%と最も良好な結果を得た。

Table 4 に実際の全血試料およびそれぞれからの血漿試料についての各法の成績を示す。全血直接法値(635 nm を除く)が血漿値と大差ないことが認められるようである。

総括および結論

一応、考慮される血球内諸物質と共存させたオルトリジン-グルコース呈色反応の検討の結果、最も大きな干渉を与えるものは色素鉄であるが、測定波長を565 nm にえらぶことによって、これらの干渉から逃れ得ることを知った。また、RaBA 法の場合には色素濃度に依存する補正式を考案した。

OT-37 試薬自身に対しては色素自体は何んらの吸光度増加をも加熱によって与えず、単なる下駄ばき効果としての吸光度増加である。そして、これにグルコースが共存すれば、加熱によって特有の呈色調が追加されるので Fe^{+++} の干渉のない565 nm における吸光度増加分を測定することによって全血による血糖の直接定量法が可能となった。この反応系を利用することにより、専用の血糖分析計の設計も可能となるものと思われる。

おわりに、本研究において、OT-37 が実現したのは

恩師宮本璋先生よりご指導賜わった水和水に関するす知見に負う所が絶大であり、ここに特記して、謹んで本研究を故宮本璋先生の御霊前に捧げます(本研究の要旨は、第20回日本臨床病理学会総会において発表した)。

文 献

- 1) 佐々木匡秀：オルトリジン-ホウ酸法による血糖超微量定量法，臨床病理 12, 434 (1964)。
- 2) 玄番昭夫，他：O-Toluidine による血糖ならびに血清(漿)糖定量法の追加検討 II，O-Toluidine 一段法に付帯する諸問題，臨床病理 15, 580 (1967)。
- 3) 佐々木禎一：O-Toluidine-ホウ酸法による血糖の迅速微量定量法，臨床検査 11, 409 (1967)。
- 4) 佐々木禎一：O-Toluidine を用いる血糖の簡易定量法，臨床病理特集 15 号，45~54 (1968)。
- 5) 高原喜八郎，他：水を含まない新オルトリジン-ホウ酸試薬の開発と自動化学分析機への導入，臨床検査 16, 524~528 (1972)。
- 6) 高原喜八郎，他：37°C 加温で発色する血糖定量用新 O-TB 試薬の開発とディスクリート式自動化学分析機への導入について，第4回臨床検査自動化研究会記録，15~18 (1973)。
- 7) Kihachiro Takahara, et al.: Sensitive O-Toluidine Reagent for Glucose Assay at Moderately Elevated Temperatures, Microchem. J. 19, 319 (1974)。