(色材, 54 [5] 287-295. 1981)

医療診断用色素の問題点と新展開

杉 山 正 康*・平 田 文 雄*

はじめに

ここでは主として生体機能を保持するための有効成分(たとえば脂質, アミノ酸, たん白質, 酵素, 糖質)を生化学的検査を行なうための酵素法発色系に關係する医療診断用色素について記述したが, これらの技術は色材工業における原料としての色素への応用あるいは化粧品, 塗料, 印刷インキ, 複写剤などにおける配合剤の分析法としても利用できるものと思われる。

1. 序 説

1.1 医療診断用色素の定義

生体は必要に応じて外界から物質を取り入れ, これを素材として, 各組織から生体機能を保持するための有効成分を一定の割合で生産し, 代謝することでエネルギーを獲得し, また, 各種ホルモンや生理活性物質を産生して生体の活動を調節している。これらは連続的に血液その他の体液により輸送されるか, または生体機能に関与したのち化学変換を受け排泄されることが多い。各種疾患時には, このような流れが破綻をきたし, これら成分の濃度の変化を指標として診断が行なわれる。

医療診断用色素はこのような生化学的検査(臨床化学検査)において, 測定しようとする目的物質を化学量論的に特定波長の吸収を生ずるような指示物質に変換する一連のシステムに用いられる化合物群を指すことになる。

臨床化学検査に必要な条件¹⁾は一微量—迅速—簡易—精密—正確—の五条件と考えられており, その特質は微量の特定物質を短時間に多成分系試料からピックアップする能力を有していることにあるので, 特異性が高い高

感度な指示発色系がなければ上記の条件を満足することができない。

1.2 検査項目とその診断的意義

通常, 日常検査で測定される主なもの²⁾は血液, 尿試料であるが, さらに詳しい病態の把握には細胞変化, 血球像, 生体各臓器の機能検査なども行なわれている。

これらの値の持つその診断的意義は, たとえば, ある目的物質を測定して特異的に疾患がわかるもの, 先天性代謝異常での特定アミノ酸の血中濃度上昇などを除けば, その大半はプロファイリングなものであり, 数項目の組合せでの診断がその信頼度を高める結果となる。表-1に臨床化学検査の項目と疾患の關係を示す。

1.3 比色法の変遷と酵素法の導入

このように考えていくと医療診断用色素の臨床検査に占める役割は大きいことが推察されるが, これは Lambert & Beer の法則にもとづいた光吸収によりその吸光度と濃度の比例關係から比色を数量化することが可能となり, 半定量から定量へ, 肉眼から器械的比色へと発展させることができるようになったため, その測定値が臨床サイドからの要請に答えられるほどの信頼性を増してきた事によると考えられる。

しかし, このように光電比色計などハード面の開発と共にこれら色素の改良案も進められてきたが, 化学的反應の範囲内ではいかに感度が高く特異性を持たせようと努力しても化学量論的モル—モル反應の場では限界があり, また多成分系における排他的特異性の高いものを見出すことは困難であった。

酵素は目的物質に対する親和性, 特異性をもっているので, 数多くの体液成分の混在している検体試料よりその標的物質を選択的に見出して反應することができ, 常温下簡単に微量成分を迅速, 特異的に処理し, しかも増幅変換により正確に指示発色系へ導くことができる。

今日では数多くの微生物産生酵素の開発により共役酵素や指示発色系が考案され, 定量性の高い感度の良い酵素法³⁾が急速に普及している。

昭和 56.1.5 受理

The Topics of the Coloring Matter on Clinical Chemistry

Masayasu SUGIYAMA and Fumio HIRATA

* 小野薬品工業(株)中央研究所

大阪府三島郡島本町桜井 3 丁目 1 番 1 号 (〒618)

表-1 生化学検査における主な測定項目と疾患の関係

	測定項目	正常値	診 断
有機物質	総蛋白	6.5~8.0 g/dl	肝炎, 腎炎, ネフローゼ, リウマチなど
	アルブミン/グロブリン比	1.4~1.7	(低下)
	蛋白分画	アルブミン4.0~5.5 g/dl グロブリン1.5~3.6 g/dl	リウマチと他疾患の鑑別
	尿素窒素	8~20 mg/dl	尿毒症, 糖尿病など (増加)
	クレアチニン	0.8~2.0 mg/dl	糸球体腎炎, 筋ジストロフィー (増加)
	尿酸	2.0~6.0 mg/dl	尿毒症, 痛風 (増加)
	ブドウ糖	60~100 mg/dl	糖尿病 (増加), アジソン氏病 (低下)
	総コレステロール	130~230 mg/dl	ネフローゼ, 動脈硬化, 糖尿病 (増加)
酵素	中性脂肪	60~150 mg/dl	糖尿病, 動脈硬化など (増加)
	アルカリフォスファターゼ	4~10 KA 単位	閉塞性黄疸, 肝炎 (増加)
	酸フォスファターゼ	0~2 KA 単位	前立腺癌 (増加)
	GOT, GPT	10~38, 4~35 単位	肝炎, 心筋硬塞など (増加)
	LDH	50~400 単位	心筋硬塞, 悪性貧血 (増加)
	HBD	120~280 単位	心筋硬塞, 悪性貧血 (増加)
	LAP	180~200 単位以下	肝炎, 閉塞性疾患 (増加)
	コリンエステラーゼ	0.8~1.1 単位	肝炎, 悪性貧血 (低下)
素	アミラーゼ	8~20 単位	膵炎 (増加)

1.4 酵素法に用いられる診断用色素

酵素法については各論に詳述するが、物質を測定する場合、通常、初発酵素により中間生成物に変え、指示酵素を共役させて指示発色系へ導くことが多い。

共役酵素は主に二群に大別され、一つは脱水素酵素を利用するもの、他は初発反応に各種のオキシダーゼを用い、これに共役させたヒドロペルオキシダーゼと一般に呼ばれるペルオキシダーゼおよびカタラーゼ系を利用するものに分けられる。

このようにまず測定物質に適した初発酵素を用いるが、その中間生成物は過酸化水素 (H_2O_2) か、脱水素酵素に特異的な物質かに変換し、さらに図-1 に示すように、ヒドロペルオキシダーゼまたは脱水素酵素を共役させ比色法に導く。

測定の目的が酵素活性である場合、たとえば加水分解酵素については、生体内の基質に類似させた一般にクロモジェニックサブストレートと呼ばれる色素結合性基質を用い、遊離した色素量で酵素活性を測定する。

2. 各 論

2.1 物質の測定

2.1.1 直接発色法 (化学的)

現在では、そのほとんどは古典的ともいえる方法に属しているので、主な測定項目について以下簡単に紹介する。

(A) 脱水素酵素系

(B) ヒドロペルオキシダーゼ系

(1) ペルオキシダーゼ系

(2) カタラーゼ系

図-1 酵素法に使われる指示発色システムの分類

(i) グルコースの場合

グルコースのアルカリ性における還元力を利用し、共

存する Cu^{2+} を Cu^+ へ還元し、これにヒ化モリブデン酸液 (Nelson 試薬) を反応させ、生ずる還元モリブデンによるモリブデン青を測定する方法⁴⁾、あるいはアルカリ性下のグルコースの還元力による 3,6-ジニトロフタル酸を用いた百瀬らの発色法⁵⁾、グルコースを酸性下に脱水してフルフラールとし、*o*-トルイジンなどの芳香族アミンと縮合させて青色物質を測定する方法などがある。

(ii) 尿酸の場合

グルコース測定と同様に尿酸のアルカリ条件下での還元力を利用する。すなわちタングステン酸ナトリウムと硫酸亜鉛により除蛋白し、リンタングステン酸試薬を添加し、その還元力により生じたタングステン青を測定する方法 (λ_{max} 740 nm) がある。

(iii) コレステロールの場合

クロロホルム中でコレステロールが無水酢酸および濃硫酸により青から緑色を呈することを利用する Liebermann-Burchard 法、氷酢酸中でコレステロールが塩化第二鉄と濃硫酸で赤紫色を呈することを利用する Kiliani 法など多くの化学的方法がある。

(iv) 中性脂肪の場合

中性脂肪を有機溶媒にて抽出後、アルカリで加水分解し、生成するグリセロールをメタ過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し 2 分子のホルムアルデヒドに変換させる。このホルムアルデヒドを濃硫酸存在下にクロモトロフ酸と反応させて生ずる赤紫色を測定するか、あるいはホルムアルデヒドにアンモニアとアセチルアセトンとを反応させて、生じるルチジンを比色する方法などが良く知られている。

その他、クレアチニン⁶⁾、尿素窒素などの多くの生体成分の化学的測定法が開発されてきたが、これらのものは目的物質の還元作用を間接的な形で測定したり、あるいは目的物質の構造の一部を利用して発色物質へ誘導したりしているため、おのずからその特異性が限定され、多種の構造類似生体成分の共存する血液や尿では当然これらの干渉が考えられ、除蛋白処理も時には必要となり、特に正確性の面で問題となる。一方、脂質 (コレステロール、中性脂肪) などの測定においては抽出分離操作が必須となり、溶媒の濃縮やアルカリ加水分解処理、濃硫酸や酢酸を用いての発色など煩雑で危険な操作を要求される。

2.1.2 酵素法

初発酵素の処理のみで発色系が作動して定量される場合もあるが、序説で述べたように初発酵素と指示酵素の共役系が利用されることが多い。初発酵素には各種の生

体部分の個々にその特異性の高い酵素が用いられる。初発酵素により生成した中間体は発色系と組み合わせることが出来る指示酵素に接続し測定系が完成する。

(i) グルコース

現在の検査室での日常検査の大半を占めているのは、グルコースオキシダーゼ (GOD) を初発酵素に用いる方法である。測定物質の濃度に依存して生ずる H_2O_2 は共役酵素としてペルオキシダーゼ (POD) により発生期の酸素を発生し、水素供与体である色原体がこれにより発色する方式である。また、 H_2O_2 はメタノールの存在下カタラーゼ (CAT) の作用によりホルマリンを発生させ、このホルマリンをアセチルアセトンとアンモニアの共存によって発色安定性の良い 3,5-ジアセチル-1,4-ジヒドロオキシルジン (λ_{max} 410 nm) に変換させることも利用される⁷⁾。図-2 にこれら指示発色系をまとめた。

GOD-POD 系はオルトトリジンやオルトジアニシジンの色原体として利用したが、これらは発癌性を有していることがわかり、最近では二つの化合物を用いる酸化縮合発色^{8~10)}が一般に用いられている。これらは比較的中性付近で発色し、酵素反応の場で同時発色するので測定操作上試験管内に検体を入れるだけで発色測定し得るメリットを有している。問題点は、これら考案された発色系の中で一部その吸収波長が血中に共存するビリルビンやヘモグロビンの色調に影響されるものがあり、この

図-2 血糖 (グルコース) の酵素的発色法

場合プラス誤差の生ずることも考えられる。4-アミノアンチピリン-ジメチルアニリン (DMA) 系^{11,12)}はその発色至適 pH が 5~6 の弱酸性であり、またその発色がより長波長側で吸収されることからビリルビンやヘモグロビンの色調に影響されないばかりか、ビリルビンの還元作用に対する抵抗性もありマイナス誤差も少ない。

また一方、GOD-CAT系を用いて生成するホルマリンのアセチルアセトンとの反応によるルチジン発色では、GOD-POD系を用いての発色の場合と異なり血中還元物質のもつその還元作用による酸化縮合発色の妨害や、血中カタラーゼによる H_2O_2 消費の心配はないが、その発色終結に要する時間が長いから迅速性の上からデメリットとなる。

(ii) コレステロール

2.1.1 で述べたように、脂質の化学的測定法においては有機溶媒による抽出操作が必須であり、しかも手間がかかるわりには不正確であった。このような背景で酵素法が登場し、前処理が不要で迅速、簡便なこの方法は爆発的に普及した。コレステロールの酵素測定は、成人病診断上必須の測定項目として日常検査に採用されており、その測定原理はまず、エステル型コレステロールはコレステロールエステラーゼ (CEH) にてすべてフリー型とし、これにコレステロールオキシダーゼ (COD) を作用させ、生ずる H_2O_2 に POD か CAT を共役させてグルコースの項で述べたと同じ発色系^{13,14)}へ導き比色定量する。

(iii) 中性脂肪

中性脂肪 (トリグリセリド) の測定に用いられる初発酵素は、これを三分子の脂肪酸と一分子のグリセロールに加水分解するリポプロテインリパーゼ (LPL)¹⁵⁾である。引き続き遊離したグリセロールを指標として、これを酵素的¹⁶⁾に測定する方法が一般的に利用されている。

グリセロールに作用させる酵素としては、グリセロール脱水素酵素 (GDH)¹⁷⁾、グリセロールキナーゼ (GK)、グリセロールオキシダーゼ (Gly-OD) などがあるが、GK はビルビン酸キナーゼ (PK)¹⁸⁾あるいはグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (G-3-POD)-POD系と共役させ、それぞれに適した指示発色体が考案されている。

一方、図-3 に示すように GDH など脱水素酵素系の指示発色には電子伝達体としてフェナジンメトサルフェート (PMS) などを介在させ、これにテトラゾリウム塩を共役させて最終的にホルマザン発色させる系¹⁹⁾が用いられている。図-4 に示すように各種のテトラゾリウム塩があるが、基本となるトリフェノールテトラゾリウム (TT) から生ずるホルマザンは λ_{max} 500 nm で赤味を

図-3 中性脂肪の酵素的測定法

(モノ) テトラゾリウム塩

(ジ) テトラゾリウム塩

図-4 テトラゾリウム塩の種類

帯びる。ヨードニトロテトラゾリウム (INT) やメチルチアゾリルテトラゾリウム (MTT) は溶解性にすぐれ日常的にはこれを用いてモノホルマゼン発色させる。

一方、ジテトラゾリウムから生成するジホルマゼンは長波長側にシフトした吸収をもち、青色発色であるため、ヘモグロビン、ビリルビンなどの色調に影響されることが少ない。このうち、ネオテトラゾリウムブルー (NT) は光の影響を受けやすく、退色性も強いのでニトロテトラゾリウムブルー (NTB) のような安定性の良いものが開発された。テτραニトロテトラゾリウムブルー (TNTB)、チオカルバミルニトロテトラゾリウムブルー (TCNTB) は細胞や組織の活性染色に利用できるよう工夫されたものである。

しかし、これらテトラゾリウム塩を用いるホルマゼン発色における問題点として生成した還元型色素の沈着性が大きく、また中性脂肪測定の際に良く用いられる界面活性剤の作用による非特異的発色も生じ、これらによる測定値への影響が考えられる。このような点を考慮に入れると、血中還元物質の影響を受けるとはいえオキシダーゼ POD 系での指示発色系が有利である。

(iv) 尿酸

尿酸はウリカーゼ (尿酸オキシダーゼ) により酸化され、アラントインと H_2O_2 を生成するが、他の体液成分に比しその濃度が低い。したがってこれを測定する場合、発色感度が良くビリルビンやヘモグロビンなど内因性干渉物質による発色系への影響を避けるように指示発色系が考案されなければならない。すなわち、尿酸の場合もグルコースなどと同じく H_2O_2 を POD 処理し、指示発色に酸化縮合系を用いることができるが、グルコースなどに比しその基質濃度が低いことから内因性干渉物質による影響がより大きくなる。そこで、このような心配のない CAT 処理による指示発色系がより有利となる。通常 CAT-ルチジン発色系 (ハンチ反応) による λ_{max} 410 nm の吸収の利用が考えられるが、最近このハンチ反応より高感度で色調がより長波長の紫色となり、短時間で発色が完了する指示発色系、CAT-アミノヒドラジノメルカプトトリアゾール (AHMT) 系^{20,21)}が考案されており、図-5 にその原理を示す。

(v) その他

尿素窒素はウレアーゼにより二分子のアミノニアと一分子の二酸化炭素に分解されるので、この生成されるアミノニアを pH 指示薬で検出するかキノクロラミンを利用したインドフェノール発色によって定量する。

リン脂質はホスホリパーゼ D-コリンオキシダーゼ系が利用され、クレアチ(ニ)ンではクレアチ(ニ)ンアミデ

4-AMINO-3-HIDRAZINO-

5-MERCAPTO-1,2,4-

TRIAZOLE (A H M T)

λ_{max} 550 nm

図-5 カタラーゼ AHMT 法の原理

ィノハイドロラーゼ-ザルコシンオキシダーゼ系が検討されている。前者は POD-酸化縮合発色系での比色定量が、また後者では CAT-AHMT 発色系による比色定量が行なわれている。

2.2 酵素活性の測定

2.2.1 色素結合性基質利用法

色素結合性基質 (クロモジェニックサブストレート) は主に加水分解酵素の測定に用いられており、その原理は 1.4 で示した。臨床診断の目的で測定される主なものについて順次説明する。

従来、アミラーゼは天然基質のでん粉を用い、反応後、残存したでん粉量を測定して酵素単位を求めるアミロクラスティック法や、生成した糖量より求めるサッカロジェニック法などがあるが、最近では色素を結合させた着色不溶性でん粉を基質とする測定方法が各種考案されている。

このように生体内の基質に類似したものを人工的に作り、その遊離色素の色調を種々考案して精度の向上を計ることが各種の加水分解酵素についても可能である。

アルカリフォスファターゼ (AL-P) もリン酸に *p*-ニトロフェノールなどの各種の水酸基を有する化合物をエステル結合させた基質によってその活性測定が行なわれるが、この場合、酵素作用により遊離した加水分解産物の *p*-ニトロフェノールを直接測定する。

γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) やロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) のようなペプチド鎖を加水分解する酵素は、図-6 のような β -ナフチルアミン (β -NA) や *p*-ニトロアニリン (*p*-NA) をこれら酵素に特異的なアミノ酸やペプチドの C 末端にアミド結合させた基質を用いて反応させる。酵素反応により生成する β -NA はパラジメチルアミノベンツアルデヒドと反応させ、黄色色素 (λ_{max} 455 nm) を測定することができるが β -NA には発癌性があるため、最近ではもっぱら *p*-NA が主流である。*p*-NA はそれ自体に λ_{max} 405 nm の黄色色調があり、そのまま酵素反応速度のレートアッセイ

LAP あるいは γ -GTP の作用部位

図-6 LAP, γ -GTP の合成基質による測定法

への導入が可能である。

血液凝固における各因子の中にはプロトロンビン, K, X, XI, XII など活性化されて蛋白分解酵素活性を示すようになるが, これらの酵素活性も同様の原理で測定できる²²⁾。表-2 に現在, 市販されているこれら基質の例を示す。

2.2.2 共役酵素利用法

この方法は測定しようとする酵素にその基質を作用させ, 得られた反応生成物にこれを基質とする酵素を共役させて指示発色系へ誘導する方法である。

コリンエステラーゼ活性測定法は一般にベンゾイルコリンを基質に用い, 生成したコリンをコリンオキシダーゼ-POD 系に共役させ, 4-アミノアンチピリンと DMA の酸化縮合発色系により比色定量し, この値から酵素単位を求める。

GOT, GPT のトランスアミナーゼは, GOT ではアスパラギン酸の α -アミノ基を, また GPT ではアラニンの α -アミノ基を, それぞれの系に共存する α -ケトグルタル酸に転移させる酵素特性を有するので, この性質

を利用して, 生成するグルタミン酸にグルタミン酸脱水素酵素 (GLDH)—ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (フォスフェート) (NAD(P)) を作用させ, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (フォスフェート) 還元型 (NAD(P)H) の増加をホルマザン発色系へ誘導する方法が考案されている。

2.2.3 その他

臨床診断的意義を有する酵素測定に利用される指示発色系は 2.2.1 と 2.2.2 にほぼ集約されるが, それ以外に酵素と基質との反応によって生成する物質を化学的に誘導化して発色させる方法がある。

その代表例として生成するケト酸に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを作用させてヒドラゾン発色する方法があり, GOT, GPT あるいはアルドラーゼの測定に利用されている。

2.3 特殊な診断用色素

前節までは主として肉眼で検知し得る可視部吸収物質による指示発色系について述べてきたが, 肉眼では見えない紫外部吸収物質や, ケイ光物質, 発光物質, pH 指示薬もまた広義には医療診断用色素に入ると考えられる。

NAD(P)H は $\lambda_{\max}$ 340 nm に紫外部吸収を有しており, 乳酸脱水素酵素 (LDH) などの各種脱水素酵素系の測定に利用される。

ケイ光測定は特定物質の特定波長の紫外線照射による励起により, その物質に依存した発ケイ光が紫外線の入射光に対し直角方向に得られるので, これを利用して高感度なケイ光強度が定量できる。

また, 図-7 に示すようにケイ光物質を結合させた一種のクロモジェニックサブストレーツ的な基質²³⁾も考案

表-2 ペプチド-PNA 基質とその利用

測定酵素(凝固因子など)	基 質	販 売 会 社
トロンビン	Bz-Phe-Val-Arg-PNA Z-Gly-Pro-Arg-PNA Tos-Gly-Pro-Arg-PNA	KABI (スウェーデン) Pentapharm (スイス)
Xa 因 子	Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-PNA	KABI
腺性カリクレイン	H·D-Val-Leu-Arg-PNA	KABI
血漿カリクレイン	Bz-Pro-Phe-Arg-PNA H·D-Pro-Phe-Arg-PNA	Pentapharm KABI
ウロキナーゼ	Bz-Val-Gly-Arg-PMA Pyr-Gly-Arg-PNA	Pentapharm KABI
カプトガニ凝固酵素	Boc-Leu-Gly-Arg-PNA	蛋白質研究奨励会

Bz: ベンゾイル Z: ベンジルオキシカルボニル Tos: *p*-トルエンスルフォニル

H·D: D-光学異性体 Pyr: ピログルタミル

Boc: 第3級ブチルオキシカルボニル

酵素作用部位

図-7 ケイ光基質の例示

(1) 生物発光

(2) 化学発光

図-8 発光法の原理

されている。

発光による測定²⁴⁾においては、図-8に示すように光の照射によって生ずるケイ光と異なり、生物または化学発光のように測定物質が自らの反応によりエネルギーを獲得し、一定の時間にもとの基底状態にもどるまで発光する原理を利用するが、ここにみられるような H₂O₂ の定量でのルミノール発光³⁰⁾を用いれば、これをオキシダーゼ-POD 系と共役させることで種々の物質の定量が可能となる。

この方法は高感度な微量分析に適した方法であり、今後の進歩が期待される。

pH 指示薬の臨床診断への導入は、主として血液、尿、胃液などの体液の pH の測定であるが、この pH 指示薬を血清アルブミンと結合させ、その色調の変化からアルブミン濃度も測定できる²⁶⁾。

2.4 診断用色素の利用による検査法の進歩

2.4.1 検査の自動化

診断用色素を利用する分析の操作法は、通常検体と試薬を試験管中に採取混合し、一定時間、一定温度の下で反応させて最終的に産生される発色物質の濃度について比色計を用い最大吸収波長で測定し、標準液の検量線から外挿して換算する方法が一般的であった(用手法)。

しかし前述のような酵素法を用いる発色系の進歩とともに、従来古典的方法では必要であった除蛋白、抽出分離操作、遠心分離後の上澄液採取操作が省略されるようになり、また一方では、検査件数の増加による検体処理能力の増強や、精密高度な診断のための多項目検査の必要性などにもとづく検体容量の微量化などからも、その自動化が要望され、ハード面の進歩も著しいものがある。

自動分析器²⁷⁾を大別すると三つのタイプに分けられる。すなわち、1) 用手法の操作を自動的に実施するディスクリットタイプ、2) 特に酵素のレートアッセイに適している遠心型のファーストアナライザー、また、3) 試験管の代用としてチューブを用い独創的な空気分節法(試料間の混合汚染を防ぐ)によるコンテナスフロータイプのものがある。現在これらが、それぞれの特色を発揮して稼働している。

2.4.2 酵素免疫測定法

生体の抗原抗体反応を利用して、これと酵素反応を共役させて測定する方法である。この酵素免疫測定法(エンザイムイムノアッセイ)を放射免疫測定法(ラジオイムノアッセイ)と比較した場合、抗原抗体反応の特異性を同じように利用しているが、測定のものさしがそれぞれ異なる。つまり酵素免疫測定においては抗原に標識するものがアイソトープの代りに酵素であり、抗原(測定物質)に対して特異性の高い抗体を選び、酵素標識抗原と未標識抗原間の抗体への競合反応を行なわせ、抗体結合型と非結合型の各抗原を分離する。

結合型抗原の酵素活性を測定する場合は二抗体法により抗原抗体結合物を遠心分離して測定することができ、また非結合型抗原の測定では抗体をガラスビーズなど固相表面に固定化し、反応後の溶液中の酵素活性から測定物質の定量値を求めている。この酵素免疫測定法は酵素

の機能を活用し、そのターンオーバーによる活性増幅をはかり感度を上昇させることができるので、抗原抗体反応と酵素活性の特徴を生かした微量分析が可能である。

通常、 β -ガラクトシダーゼ、POD、AL-Pなどの酵素が標識酵素として用いられ、インシュリン、コルチゾール、アンジオテンシンなどの微量生理活性物質の測定が行なわれているが、今後、放射能汚染、廃棄物処理などの問題のある放射免疫分析に代ってその社会的要請が増大するであろう。したがってこれら酵素反応検出のための色素の開発もまた重要である。

2.4.3 簡易検査

いわゆる dip and read な試験紙によるベッドサイド方式の診断は今後ますます要望され、したがってこれにマッチした医療診断用色素の開発が重要である。現在、これら試験紙法は尿糖、尿素窒素は別として、化学的発色法を利用したものが主であるが、今後、さらに 2.1.2 で述べた原理を利用した酵素固着による方法が主流をなすと考えられる。その他、最近では種々の細菌テストもその細菌と色原体との特異的なかわりあいを利用して行なう簡易検査も考案されている。

これら試験紙などによる方法は微量、迅速簡便さなど多くの利点を有し、また最近ではその判定のための機器も市販されるなど市場性も大で、今後新しい分析系の主役となり得る可能性がある。

3. ま と め

臨床診断に用いられる医療診断用色素は、まず色の濃淡や色調を標準品と比較する肉眼的比色での半定量的測定から順次生成物質の特定波長での分子吸光係数を基本として数量化された定量性の高い比色計による定量的測定へとその利用法が変換されつつあり、これに伴い、有用性の高い高感度で安定な色素の臨床診断に果たす役割が増々大となり広い範囲に浸透しつつある。

近年、酵素触媒の高い基質特異性を利用した正確で迅速な、公害の少ない酵素的測定法がこの分野に導入されるようになり、そこに用いられる医療診断用色素もまた新しい局面を迎えることになった。

今日の医療診断用色素は機能検査は別として、その大半は酵素法に用いられる発色系を指しているといっても過言でない位その占める割合は大きい。また、この発色系は酵素と共役しているので、酵素反応で生じた中間生成物、あるいは最終発色物質においても各測定項目に共通性を帯びた低分子物質として生成させることができる。また、その指示発色系は主に各種オキシダーゼ-ヒドロペルオキシダーゼ (POD あるいは CAT) 系、脱水素

表-3 POD 系に影響する内因性干渉物質

ビタミン C, ビリルビン, ビリルビングルクロナイド, 一酸化炭素, カテコール, クレアチニン, システイン, グルタチオン, ゲンチジン酸, L-ドーパ, ニトラゼパム, ノルアミドピリン, フェナセチン, テトラサイクリン, トルプタミド, 尿酸, トリプトファン, イプロニアジド, イソニアジド

酵素-酸化還元系の二つに大別されるのでその問題点も狭い範囲に絞られる。

たとえば、POD 系に用いられる酸化縮合発色系では、体液中に共存する内因性還元物質による発色阻害の問題がありその代表例を表-3 に示す。最近、アスコルビン酸オキシダーゼを用いて血中などのビタミン C を分解して上述の影響を回避する方法も考えられているが、その他の共存還元物質も存在するので、今後はやはり色素を中心としてその解決の方向を見出さねばならない。

一方、脱水素酵素系での発色システムに関しては、用いられる電子伝達体の PMS の光による不安定さを解決する方法が必要であり、これには光に安定な 1-メトキシ-PMS の開発²⁹⁾が報告された。また、別の問題としては生成したホルマザン色素での難溶性のために起こる沈着による器具汚染などの解決されなければならない問題点も少なくない。

つぎに色素結合性基質 (クロモジェニックサブストレート) を用いる加水分解酵素などの測定では、生体内の天然の基質との相違が問題となる。著者らの最近の経験では、LAP の新しい基質を用いた測定法の検討において、従来のクロモジェニックサブストレートをを用いる方法では検出されなかった真の LAP 活性を検出し、その臨床上的の評価を見直す必要性を認めるに至った²⁹⁾。

以上のような観点から、今後の医療診断用色素の開発の方向を考えてみると、

- 1) 表-4 に示すような現状の発色色素系よりもさらに高感度で、ビリルビンなどの色調に影響されない 600 nm 以上の長波長側に吸収をもつ発色系。
- 2) 体液中の干渉物質による (還元や酸化の) 影響の少ない発色系。
- 3) 短時間に発色し、出来るだけ 1 ステップで行なうことができる発色系。
- 4) 測定する生体成分 (物質や酵素) を正確に反映する発色系や (クロモジェニックサブストレート)。
- 5) 色原体、発色物質、クロモジェニックサブストレートなど色素構造素材の溶解性および安定性が高い発色系。

表-4 現在までの発色系の感度比較

方 法	分子吸光係数	λ_{nm} (nm)
1. ヒドロベルオキシダーゼ系		
POD-4 AA・フェノール	12×10^3	505
POD-4 AA・DMA	26×10^3	550
POD-MBTH・DMA	55×10^3	600
CAT-ハンチ反応	7×10^3	410
CAT-AHMT	$15 \sim 60 \times 10^3$	550
CAT-MBTH・Fe	60×10^3	630
2. 脱水素酵素系		
NAD(P)Hのみ	6×10^3	340
NAD(P)H-PMSホルマザン	12×10^3	580

6) 発癌性や公害要素のない発色体。

などに集約される。

近年、酵素を固定化する方法³⁰⁾を用い、自動分析器³¹⁾、免疫化学検査³²⁾、酵素電極など臨床診断法の改良が盛んであるが、これらに付随する問題点の解決が早いのか、上述の診断用色素における各種の問題点の解決が早いのか、当面の焦点であろう。なぜなら両者は臨床化学検査における微量、迅速、簡易、精密、正確の五大必須条件をみたすべき宿命を負いながら進展しつつあり、これに加えて資源、公害、省力化など社会的要請もある。今後多くの解決すべき問題点を有しているので、その進展如何によっては、お互いが大きく影響を受けるものと考えられる。

引用文献

- 北村元仕, 斎藤正行, 丹羽正治: 臨床化学分析 I, II, IV, 日本分析化学会編分析ライブラリー 3, 東京化学同人
- リヒテリッヒ著, 麻生芳郎訳: 臨床生化学, 基礎と臨床, 第3版, 広川書店
- 臨床検査, 1978年臨時増刊号, 22[11], 酵素による臨床化学分析, 医学書院
- Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944)
- 百瀬 勉, 向井節子, 河辺節子: 臨床検査, 5, 107 (1961)
- Jaffe, M.: *Z. Physiol. Chem.*, 10, 391 (1886)
- Fletcher, M. J.: *Clin. Chim. Acta.*, 22, 393 (1968)
- N. Gochman et al.: *Clin. Chim.*, 18, 943 (1972)
- Allain, C. C. et al.: *Clin. Chim.*, 20, 470 (1974)
- 特公昭 55-2960
- 杉山正康, 清水 浩, 倉都妙子, 平野和行, 杉浦衛: 臨床病理, Vol. 23, 補冊 269 (1975)
- 同上: 日本薬学会第95年会講演要旨集, 107(1975)
- 特開昭 50-150496
- 特公昭 55-2277
- 杉浦 衛, 田中美郎, 浅野 弘: 岐阜薬科大学紀要, 第18号別刷, 47 (1968)
- 特公昭 51-35158
- 特公昭 50-21553
- 特開昭 49-69186
- Bergmeyer: *Methods of Enzymatic Analysis.*, Vol. 13, 1196 (1974)
- 杉山正康, 溝口香代子, 菅野剛史: 日本臨床検査自動化研究会会誌, 3[10], 46 (1978)
- 特願昭 51-029313
- 岩永貞昭: PRF蛋白質研究奨励会ペプチド研究所報, 4[1] (1978), (1979)
- Gerge, G. Guilbault: *Enzymatic Methods of Analysis.*, Pergamon Press (1970)
- D. Glick: *Clin. Chem.*, 23, 1465 (1977)
- 神谷 功: 化学発光, 現代の化学シリーズ 8, 講談社 (1976)
- Rodkey, F. L.: *Clin. Chem.*, 11, 478 (1969)
- 自動分析機器要覧, 臨床検査自動化研究会編 (1973)
- Yagi, T.: *Biochim Biophys. Acta.*, 548, 96 (1979)
- 杉山正康, 田村澄洋, 平田文雄, 神田進司, 須藤加代子, 菅野剛史: 臨床化学, Vol. 9, No. 3, 313 (1980)
- Mosbach, K.: *Methods in Enzymology.*, Academic Press, New York (1976)
- J. Endo, M. Tabata, T. Murachi: *Clin. Chim. Acta.*, 95, 411 (1979)
- 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔: 酵素免疫測定法, 医学書院 (1978)