

新製品の開発（第4報⁽¹⁾）

—血清カタラーゼの定量—

岩 村 淳 一

1. はじめに
2. 測定法の確立
3. 自動化
4. おわりに

Keywords

血清カタラーゼ，レイトアッセイ，日常検査法，NADH，ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ，国際単位，自動分析装置，肝炎

1. はじめに

血清中のカタラーゼ活性は，急性および慢性肝炎，肝癌，腎盂腎炎で高値を示し，特に急性肝炎では高い活性値を示す¹⁾ことが報告されている。また，カタラーゼは生体内で発生した過酸化水素を分解，解毒する酵素であることから炎症，生体防御の点においても注目され，本酵素の正確で迅速な測定法の確立は重要な問題と考えられる。しかし，現在カタラーゼ測定法として知られている方法には，過酸化水素の減少を紫外外部吸収の減少として測定する方法²⁾，過酸化水素の分解による酸素の生成量を酸素電極により測定する方法³⁾，生成

(1) 第3報：岩村淳一，近畿大学短大論集第24巻第1号P. 87～108 (1991).

熱を測定する方法⁴⁾，沈澱物を定量する方法⁵⁾，反応後の残存過酸化水素を滴定⁶⁾もしくは硫酸チタンと複合物を形成させ，その吸光度を測定する方法⁷⁾などである。これらの従来法は信頼性に乏しかったり，特殊な機器を必要としたり，強酸を使用したり，また，操作が煩雑であるため，臨床検査において日常的に用いにくい方法であった。今回，血清カタラーゼ活性の測定を迅速かつ正確に行いうる方法の検討を行った。本法の測定原理は，メタノールの存在下，過酸化水素をカタラーゼの基質とし，作用時に生成す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の作用でNADH量に変換し，この増加量を波長340nmで測定し国際単位に変換するものである。カタラーゼ活性の測定を行うにあたり，臨床検査で一般に用いられている37℃での条件を用いた。また，本法は，レイトアッセイが可能であることから自動分析への応用も容易であると考えられ，臨床検査での日常検査法として有用な方法であろうと思われる。血清カタラーゼの定量法開発におけるコンセプトを以下に要約した。

科学的側面

1. 自動化の技術が確立されていない。
2. 測定方法により値の表現を異にする。
3. カタラーゼ量と病体との関係が充分明らかではない。
4. 生理的条件下でのカタラーゼの真の役割に不明な点が多い。
5. 臨床的には無または低カタラーゼ血症の診断に用いられるほかはあまり利用されていない。

経済的側面

1. 保健点数が80点である
2. 従来法は手分析であるためコスト高で経済的メリットが低い。
3. 無カタラーゼ血症は日本人46家系90人，在日韓国人1家系3人，スイ

新製品の開発（第4報）

ス人3家系1人，ペルー人1家系2人が報告されている。日本人の500人に1人の割合で低カタラーゼ血症が存在している。低カタラーゼ血症患者は口腔壊疽の病像を示すことが知られている。

4. 慢性膵炎，急性膵炎，膵癌でカタラーゼ活性が上昇する。
5. 低カタラーゼ血症のスクリーニングが可能になり集団検診の項目としても有用である。

科学的側面をクリアーすることによって，疾患に対し予防，治療が可能になり，その経済的側面においても保健点数が80点である。即ち，1測定経費が800円であることなどからかかる定量法の確立は社会的にも極めて有用であると考えられる。

2. 材料および実験方法

2.1. 試薬

カタラーゼはシグマ社，2500U/mg（EC 1.11.1.6），ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（EC 1.2.1.1，以後FADH）は東洋紡，2.74U/mgおよび3.51U/mg， NAD^+ はオリエンタル酵母を使用した。 CH_3OH は関東化学特級を蒸留して使用した。 H_2O_2 は三菱瓦斯化学，リン酸緩衝液は関東化学を使用した。

2.2. 材料

血清は任意のヒト血清を使用した。

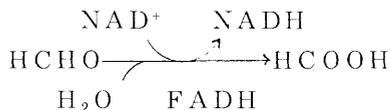
2.3. 使用機器

自記分光光度計UV-240（島津製作所製）を使用した。初速度測定法により，カタラーゼ活性値を求めた。FADH， NAD^+ ， CH_3OH をリン酸緩衝液で希釈した測定試薬3mlにカタラーゼ溶液（Sample）0.1mlを加え，37℃

で1分間プレインキュベートした後、 H_2O_2 基質緩衝液0.1mlを添加してから3～4分後の吸光度変化を測定した。一方、自動分析にはディスクリート方式自動分析装置、日立7150を使用した。

2. 4. 測定原理

測定原理を次式に示した。



また、カタラーゼ活性は下記の式より国際単位として算出した。

$$U / l = \frac{A / \text{min} \cdot V \cdot D}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

A / min : the change in absorbance
at 340 nm for one minute

V : total volume (3.2 ml)

D : enzyme dilution (10^9)

ϵ : molar extinction coefficient
(6.22×10^6)

v : sample volume (0.1 ml)

3. 測定法確立のための結果

3. 1. 緩衝液の条件設定

緩衝液について至適 pH 及び至適濃度を検討した。FADH 100U / l,

新製品の開発（第4報）

NAD^+ 0.9 mol/l, CH_3OH 1.25 mol/l, カタラーゼ 0.2 mg/l, H_2O_2 450 mmol/l の条件下で, リン酸緩衝液 50 mmol/l の pH を 6.8 ~ 8.0 の範囲でカタラーゼ活性を測定した。pH 7.8 で最も活性値が高かったので, 至適 pH は 7.8 とした。次に, この系におけるリン酸濃度を 10 ~ 50 mmol/l 範囲内で測定した結果, 顕著な差は認められなかったが 50 mmol/l で高活性値を示した。そこで緩衝液濃度は 50 mmol/l とし, 以下の実験では pH 7.8, 50 mmol/l のリン酸緩衝液を用いることにした。

3. 2. 基質濃度 (H_2O_2) の設定

FADH 250 U/l, NAD^+ 0.9 mmol/l, CH_3OH 1.25 mol/l, カタラーゼ 0.2 mg/ml の条件下で H_2O_2 基質-活性曲線を求めた。基質濃度は 90 ~ 540 mmol/l まで 90 mmol/l ずつ変化させた。360 mmol/l に最大活性を示したが, カタラーゼ酵素希釈の直線性との関係を調べた結果, 基質濃度は 270 mmol/l とした。

3. 3. 基質濃度 (CH_3OH) の設定

FADH 250 U/l, NAD^+ 0.9 mmol/l, カタラーゼ 0.2 mg/ml, H_2O_2 270 mmol/l の条件下での CH_3OH -活性曲線を求めた (図 1)。図 1 から明らかなように, 2.5 mol/l が最適濃度であるので CH_3OH 量は 2.5 mol/l とした。

3. 4. FADH 量の設定

NAD^+ 0.9 mmol/l, CH_3OH 2.5 mol/l, カタラーゼ 0.2 mg/ml, H_2O_2 270 mmol/l の条件下で, 至適 FADH 濃度を求めた。FADH-活性曲線を図 2 に示した。図 2 に示すように, FADH 量は 850 U/l で適当であったので, FADH 量は 850 U/l とした。

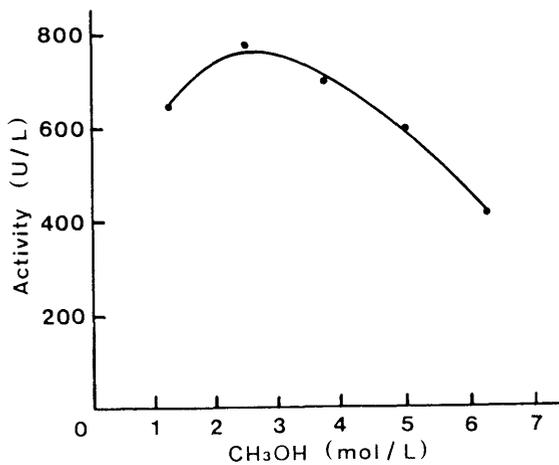


図1 メタノールの影響

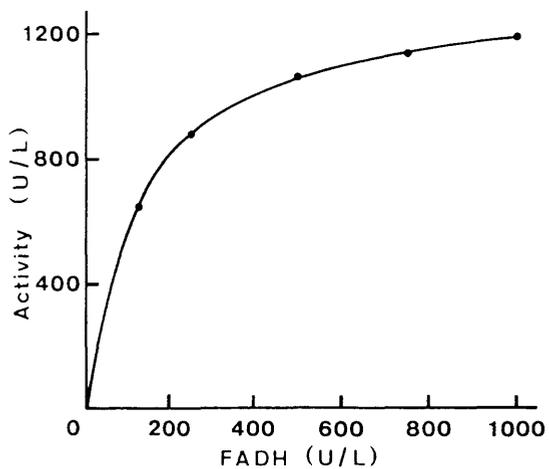


図2 FADHの影響

3.5. NAD⁺ 量の設定

pH 7.8, FADH 850U/l, CH₃OH 2.5mol/l, カタラーゼ 0.2mg/ml, H₂O₂ 270mmol/l の条件下で, NAD⁺ 濃度に対するカタラーゼ活性を求めた。NAD⁺ - 活性曲線は NAD⁺ 0.15mmol/l ぐらいまで一時的に急激に増加し, 0.75mmol/l 以降は緩やかに増える傾向にあった。よって, NAD⁺ の濃度は 0.75mmol/l とした。

3.6. 直線性の検討

上述の1~5から求めた結果により, 50mmol/l リン酸緩衝液, pH 7.8, FADH 850U/l, NAD⁺ 0.75mmol/l, CH₃OH 2.5mol/l, H₂O₂ 270mmol/l, 37°Cの反応条件を設定し, この系を用い, 標準カタラーゼを段階希釈して直線性を調べた。図3に示すように, 約1150U/l まで良好な直線性が認められた。

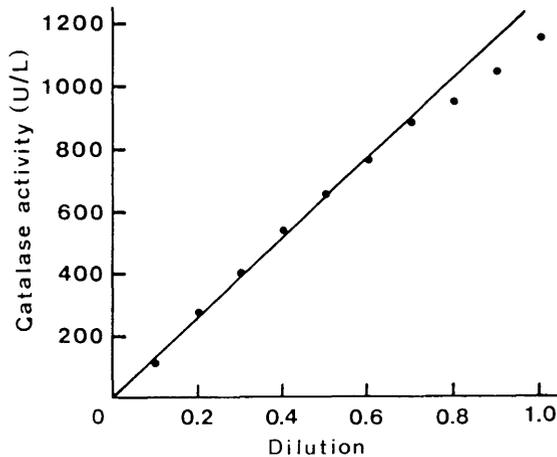


図3 直線性

3.7. 精度および感度の検討

本法による任意のヒト血清を用いての同時再現性を調べた結果、 $n=10$ で平均値 64.0U/l 、その変動係数(CV)は 4.0% で、同時再現性が良好であり、精度が高いことを示唆している。

また、標準カタラーゼを倍々希釈して感度を求めたところ、カタラーゼ活性値 15.4U/l まで直線性が認められたことから、本法における低活性の感度限界は 15U/l とした。

3.8. 血清測定における Titan 法⁷⁾との相関

30検体(内正常検体25)の任意のヒト血清を用い、本法と Titan 法との相関関係を明らかにした(図4)。この時の相関係数は 0.9846 であり、 $p=0.01\%$ 以下で、Titan 法との相関はきわめて良好であることがわかった。

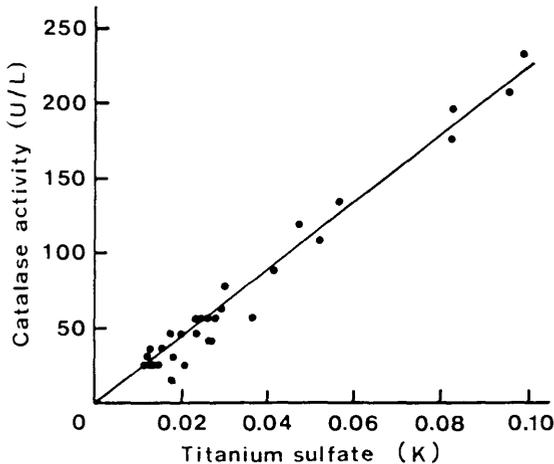


図4 チタン法との相関

3. 9. 正常値に関する検討

本法を用いての任意血清30検体における測定結果は $\bar{x} \pm 2SD = 72.5 \pm 118.5 \text{ U/l}$ で、正常人血清25検体を用いた時のそれは、 $\bar{x} \pm 2SD = 41.9 \pm 31.2 \text{ U/l}$ であった。

4. 測定法確立のための考察

血清カタラーゼの測定は、膝疾患検査として役だつ測定項目の一つとされている。しかし、いまだ日常検査に適用されるまでには至っていない。その理由として、 H_2O_2 の紫外部吸収を測定する方法²⁾では、血清中のカタラーゼにより分解された H_2O_2 量に、カタラーゼ以外の物質に由来する H_2O_2 量を加算されるために、真のカタラーゼ活性値が高値として測定される。Titan法⁷⁾では強酸を使用していること、電極法³⁾はいまだ一般的に使用されるには至っていないことなどが挙げられる。また、現在実施されているカタラーゼ測定温度は主として25℃であり、自動分析の現状を考えると、37℃での測定が望まれる。

われわれは、上記の事項を考慮し、現在一般的に使用されている自動分析計に適用できるように、カタラーゼが H_2O_2 分解時に CH_3OH を酸化しホルムアルデヒドを生成することに着目し、この生成したホルムアルデヒドを NADH 量に変換することによって、カタラーゼ活性値を簡単かつ迅速に測定できると予測し、測定条件の検討を行った。

その結果、カタラーゼ標品を使用した実験において表1の測定方法を見いだした。

反応は、基質である H_2O_2 を添加することにより開始した。この結果、カタラーゼ活性値が50～1000U/l 範囲の測定において、反応開始後2.5～4.5分間で良好な直線性を示すことが確認された。そこで、lag time を3分間として3～4分間の吸光度変化を測定して、計算に用いた。

表1 カタラーゼ活性の定量法

試薬	濃度	使用量	総量
CH ₃ OH ^{a)}	2.5 mol/l	-	
FADH ^{a)}	850 U/l	3.0 ml	3.0 ml
NAD ⁺ ^{a)}	0.75 mol/l	-	
検体	-	0.1 ml	3.1 ml
37 °Cで1分間放置			
H ₂ O ₂ ^{a)}	270 mol/l	0.1 ml	3.2 ml
3分間放置			
1分間波長 340nmで吸光度変化を測定			

a) リン酸緩衝液 (pH7.8, 50mol/l) に溶解

任意血清30例における測定値の $\bar{x} \pm 2SD$ は $72.5 \pm 118.5U/l$ であり、本法が $700U/l$ まで、相関係数が 0.9998 の直線性があることにより、高活性検体の測定にも追跡が可能であると考えられる。本法による正常人25人の血清での測定結果は、 $10.7 \sim 73.0$ (Mean = 41.9) U/l であった。また、Titan法との相関では、その相関係数は 0.9846 で $p = 0.01\%$ 以下で有意であった。このように本法は、他法との相関性も良好で信頼性の高い方法であることを示唆している。

以上のことから本法は、日常的な臨床検査において、正確で迅速な測定法として非常に有効である。

5. 自動化のための結果

自動化のための測定条件を表2に示した。

新製品の開発（第4報）

表2 日立7150における測定条件

TEST	[Catalase]
ASSAY CODE	[RATE-A]:[30]-[50]
SAMPLE VOLUME	[10]
R1 VOLUME	[300]
R2 VOLUME	[10]
WAVE LENGTH	[405][340]
CALIB. METHOD	[K FACTOR](5734)

5.1. 直線性

カタラーゼ（シグマ社）2,500U/mg を蒸留水に溶解して標準系列を作成し直線性を検討した。その結果、図5に示すように1,200IU/lまでは良好な直線関係が認められた。

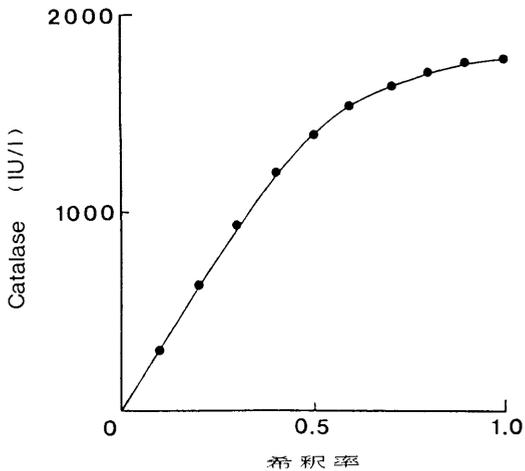


図5 直線性

5. 2. 精密性

1) 同時再現性

ヒトプール血清、市販管理血清（オーソノーマル、オーソアブノーマル）を用いて同時再現性（ $n=10$ ）を検討した。その結果、表3に示すように変動係数（C.V.）は最大3.0%と良好であった。

2) 日差再現性

市販管理血清を用いて測定間（ $n=10$ ）におけるバラツキをみた。その結果、表3に示すように満足しうる成績であった。試薬は毎日用時調製とした。

表3 精密性

a.同時再現性				b.日差再現性		
No.	プール血清 (IU/l)	ノーマルコン トロール (IU/l)	アブノーマル コントロール (IU/l)	No.	ノーマルコン トロール (IU/l)	アブノーマル コントロール (IU/l)
1	32	53	114	1	47	108
2	33	54	112	2	48	110
3	32	52	115	3	47	103
4	33	53	119	4	46	104
5	33	51	120	5	48	104
6	34	54	116	6	48	110
7	33	54	112	7	47	107
8	33	53	112	8	47	105
9	32	54	109	9	50	106
10	32	53	110	10	48	107
Mean	32.7	53.1	113.9	Mean	47.6	106.4
S.D.	0.6	0.9	3.4	S.D.	1.0	2.3
CV(%)	2.0	1.8	3.0	CV(%)	2.1	2.2

5. 3. 測定感度

標準カタラーゼを希釈して感度を求めたところ、カタラーゼ活性値10IU/lまで直線性が認められたことから、本法における低活性の感度限界を10IU/lとした。

5.4. 正確性

添加回収率：患者血清に標準カタラーゼ溶液を添加した際の回収率は94～98%ではほぼ満足しうる成績と考えられた。

5.5. 血中共存成分の影響

還元性物質（アスコルビン酸：関東化学）、ビリルビン（緩衝チェックA：国際試薬）、乳び（ホルマジン：国際試薬）、溶血（自家溶血）の本測定への影響を検討した。その結果、乳びは2800度まで影響はなかったが、アスコルビン酸は20mg/dlで10%程度の負の誤差を生じた。一方、ビリルビンC 6 mg/dlでは60%程度、ビリルビンF 6 mg/dlで20%程度の正の誤差を認めた。

カタラーゼは赤血球中に高濃度で存在するため、溶血が明瞭な血清で血清カタラーゼ値を測定しても無意味であるが、日常検査の場合では溶血の影響は興味のあるところであり、また血清の溶血の情報はカタラーゼ値を解釈するうえでは重要と考えられる。そこでどの程度の溶血までであればカタラーゼ値として評価できるかを検討した。溶血の測定には簡便なBM-6テスト（シオノギ）を用いた。

ヘモグロビン値13.3g/dlの血液を水で2500倍希釈して溶血させたものは（3+）陽性でうすらと赤味を帯びており、5000倍希釈では（2+）陽性、1万倍希釈では（+）陽性、100万倍希釈では（-）陰性であった。この溶血液のカタラーゼ活性は2500倍希釈液で21IU/l、5000倍希釈液で8IU/lであり、1万倍希釈以上では測定感度以下で測定誤差内の影響であった。

これらの結果から、微量の溶血であってもヘモグロビンが（+）陽性以下の血清検体であればカタラーゼ測定検体として用いても差し支えないと考えられた。

5.6. 反応曲線

日立7150でのタイムコースは第2試薬添加後、直線的に進行した。

5.7. みかけのモル吸光係数

グルコース測定試薬（グルコースデヒドロゲナーゼ）およびグルコース標準液を用いて主波長340nm、副波長405nmでのNADHのみかけのモル吸光係数を日立7150自動分析装置で測定し、そのときの ϵ は $5.58 \times 10^2 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ であった。活性算出のKファクターとして5735を用いることとした。

5.8. 日立7150でのクロスコンタミネーション

通常ルーチンでよく使われる項目についてセルおよびプローブのクロスコンタミネーションをチェックしたが、クロスコンタミネーションは認められなかった。

5.9. 他法との相関

患者血清を用いて本法とチタン法、および第1報との相関を調べた。その結果は図6に示すように、相関係数0.982（ $n=40$ ）、0.985（ $n=40$ ）と良好な結果であった。

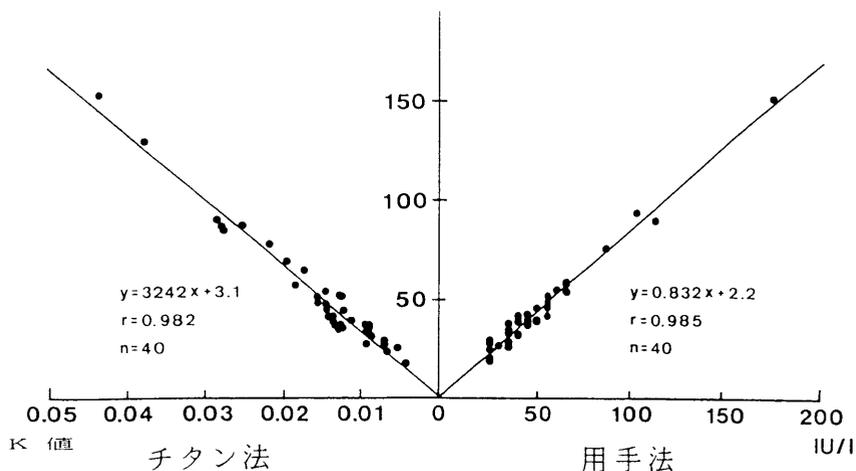


図6 他法との相関

5.10. 正常参考値

千船病院で健康診断を受診した男女100名（男55名，女45名）について検討した。年齢は男性が26～69歳（平均45.9歳），女性は19～63歳（平均33.1歳）であった。全データをCRRP法で統計処理して求めたところ正常参考値は18～92IU/lであった。

5.11. 症例

急性膵炎の患者の血清カタラーゼ，血清アミラーゼ，尿アミラーゼ，血清リパーゼの値を入院時より約1ヶ月間測定し，その経日変化を比較検討した結果，血清3酵素活性の変動はよく並行して変化しており，また尿アミラーゼ（U-アミラーゼ）も同様の傾向を示した（図7）。

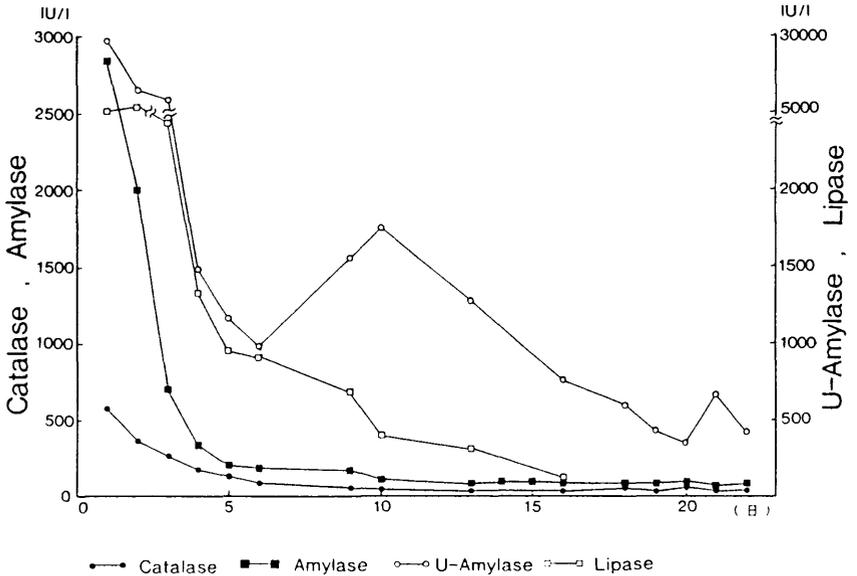


図7 急性膵炎患者の膵関連酵素の経日変化

6. 考察

既に筆者らが報告しているNADH量の増加量を340nmでレートアッセイする方法を本法にも利用したが、この方法は現在市販されている自動分析装置の多くに応用することができるという高い便宜性がある。さらにグルコース標準液とグルコース測定試薬（ヘキソキナーゼあるいはグルコキナーゼ法またはグルコース脱水素酵素法）を用いて容易に各機器のみかけのモル吸光係数を求めることが可能で、機器間差や施設間誤差を生じにくい利点もある。

第2試薬添加後の反応は直線的に進行するためどこで測定してもよいが、今回は装置の特性を考慮して攪拌が終わり安定したときの30～50の間を測光ポイントとした。この時の同時再現性は、表3のようにヒトプール血清、ノーマルコントロール、アブノーマルコントロールのCVは1.8～3.0%と非常に良好であった。ただ、第1試薬中のメタノールの自動酸化によるものと思われる試薬ブランクの上昇がわずかながら認められるので、試薬は用時調製が望ましい。

また測定範囲が10～1200IU/lであることから、低カタラーゼ血症や膵炎などの高活性検体においても十分対応できると考えられる。

本法による正常参考値は18～92IU/lで第1報の10.7～73.0IU/lとほぼ一致した。本法とチタン法および第1報での方法との相関係数は0.982、0.985と非常に良好であった。

今回1名ではあるが、急性膵炎で入院した患者について血清カタラーゼ活性などの経日変化を測定した結果、岡田⁸⁾および築山ら⁹⁾の報告とは若干異なり、カタラーゼ活性の高値期間はアミラーゼと同程度であった。

明らかな溶血検体や高ビリルビン血清では、本法によって膵由来の血清カタラーゼ活性を測定することは困難である。しかし、このことはカタラーゼアイソザイムの識別測定法の開発や検体の前処理および試薬の改良によって近い将来、解決されるものと思われる。

現在、本法で患者血清カタラーゼ活性の測定も試験的に始めており、本法は

新製品の開発（第4報）

日常のほとんどの血清検体に有用であると感じている。

7. まとめ

自動分析装置を用いた血清カタラーゼの測定は、再現性、正確性、他方との相関性などにおいて十分満足できるものであった。これにより血清カタラーゼの定量を、日常の臨床検査とすることができ、肝および膵関連の疾患の診断の有力な方法の1つとして大いに役だつものと思われる。

一方、カタラーゼの測定に要するコスト（定価ベース）算出例を以下に示す。

1) 試薬

NAD	1g	5,350円
FADH	1000U	23,000円
メタノール（JIS 特級）	3ℓ	2,400円
過酸化水素（特級）	500ml	670円
リン酸二ナトリウム無水（JIS 特級）	500g	1,500円
リン酸水素二ナトリウム・二水和物（JIS 特級）	500g	950円

☆用手法で 1,000検体を測定するとして

FADH	2,550U	=58,650円
NAD	2.25mM (=1,598mg)	=8,426円
CH ₃ OH	7.5M (≒240ml)	=213.3円
H ₂ O ₂	27mM (≒3.1ml)	=4.15円
Na ₂ HPO ₄	129mM (≒18.3g)	=54.9円
NaH ₂ PO ₄	26mM (≒4.056g)	=7.7円

67356.05円／1,000検体

用手法 : 67.4円／検体

自動分析法 : 6.74円／検体 …… ①

2) 装置

自動分析装置 日立7150 (600テスト/時間) 2,950万円

☆ 1日600テスト, 1ヶ月24日稼働するとして

5年間の償却で 34.14円/テスト …… ②

(※ 光熱費, 消耗品を含まず)

3) コスト

日立7150によるカタラーゼ測定にかかるコストは

① + ② = 40.88円/検体

工業的には更に廉価となり, その効用はさらに増大し, 実用化が可能となる。

<尚, 本報は岩村淳一, 血清カタラーゼの定量法. 臨床検査35:1347-1350, 1991, 岩村淳一, 他, 血清カタラーゼの定量法 (第2報). 臨床検査37:87-90, 1993. を参照した。

これらの論文は特集検査値をよむ'93に宇治義則, 岡部紘明 (カタラーゼ, 内科:71;1058, 1993) に紹介されている。>

文 献

- 1) 岡田尚武: 臨床病理, 24, 68 - 72 (1975).
- 2) Bergmeyer, H. U. : Biochem. Z., 327, 255 - 258 (1955).
Beers. R. F. Jr., Sizer, J. W. : J. Biol. Chem., 195, 133 - 140 (1952).
- 3) 岡田尚武: 臨床病理, 22, 807 - 810 (1973).
- 4) Landahl, H. D. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 74 - 79 (1953).
- 5) Higashi, T., Yagi, M., Hirai, H. : J. Biochem. (Tokyo), 49, 707 - 712 (1961).
- 6) Bonnicksen, R. K., Chance, B., Theorell, H.: Acta Chem. Scand., 1, 236 - 267 (1948).
- 7) 特許出願公開 昭61-67499 血中カタラーゼ活性の測定方法および測定試薬 (1986)

新製品の開発（第4報）

- 8) 岡田尚武：各種疾患における血清カタラーゼ値. 臨床病理, 24, 68 - 72 (1975)
- 9) Tsukiyama Y, et al : Studies on serum catalase in pancreas disorders,
Med. J. Osaka Univ., 12, 105 - 135 (1961)