

# 生化学自動分析装置を用いた亜鉛比色測定法

株式会社シノテスト研究開発部 日暮和彦

## 要約

- \*我々は、亜鉛欠乏の早期発見、欠乏症のエビデンスにもとづいた治療のため、自動分析装置用亜鉛測定試薬を開発した。
- \*開発した試薬は、臨床検査において十分な精度、測定範囲、正確性を有していた。
- \*亜鉛測定に際しては注意すべき点もあるが、自動分析装置での測定により、簡易・迅速化、検体の少量化、容易な多検体処理が実現し、測定結果を迅速に臨床医に渡すことが可能となり、小児の栄養管理や、診断前検査にも有用と思われる。

## はじめに

臨床検査における亜鉛測定は、ほとんどが原子吸光法、一部が用手法の比色法で行われていた。従来の測定法の問題点として、いずれの方法でも、検体の前処理を必要とすること、サンプル量が多く必要なこと、結果報告までにかかる時間が長いことが挙げられる。そこで、特殊な機器や煩雑な操作を必要とするこれらの方法に替わる、簡便で迅速、かつ正確な測定法が求められていた。亜鉛欠乏の早期発見、欠乏症のエビデンスにもとづいた治療のために、我々は、自動分析装置用亜鉛測定試薬の開発に着手した<sup>1)</sup>。

## 1. 亜鉛測定試薬の開発

本邦の臨床検査の分野においては、微量元素の殆どは原子吸光法にて測定されており、比色法が一般的に用いられているのは、鉄 (Fe) と銅 (Cu) だけに過ぎない。鉄は 2-Nitroso-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol (Nitroso-PSAP) 法、Bathophenanthroline 法が用いられている<sup>2,3)</sup>。そ

の反応原理は、いずれも transferrin と結合している  $\text{Fe}^{3+}$  を酸性下で還元遊離させ、 $\text{Fe}^{2+}$  として Nitroso-PSAP または Bathophenanthroline のキレート発色剤と錯体を形成させ、その吸光度を測定し、鉄濃度を求めている。銅は 4-(3,5-Dibromo-2-pyridylazo)-N-ethyl-N-(3-sulfopropyl) aniline (3,5-DiBr-PAESA) 法が用いられている<sup>4)</sup>。その反応原理は ceruloplasmin と結合している  $\text{Cu}^{2+}$  を酸性下で還元遊離させ、 $\text{Cu}^{+}$  として 3,5-DiBr-PAESA と錯体を形成させ、その吸光度を測定し、銅濃度を求めている。これらはいずれも、他の生化学項目と同じく自動分析装置に適用されている (図 1)。一方、鉄、銅とほぼ同じ濃度で血清中に存在する亜鉛については、除蛋白操作を含む用手法試薬こそ発売されているが自動分析装置用測定試薬発売または適用の報告は皆無に近いのが現状である。その理由の主たるものは、蛋白変性剤等で亜鉛を蛋白質などのリガンドから遊離させた後に、それら遊離リガンド共存下で発色剤を添加した場合、亜鉛と発色剤の錯体形成を 100% にする条件が見つからなかったためと考えられる。

測定系の構築に当たり、課題は大きく分けて 3



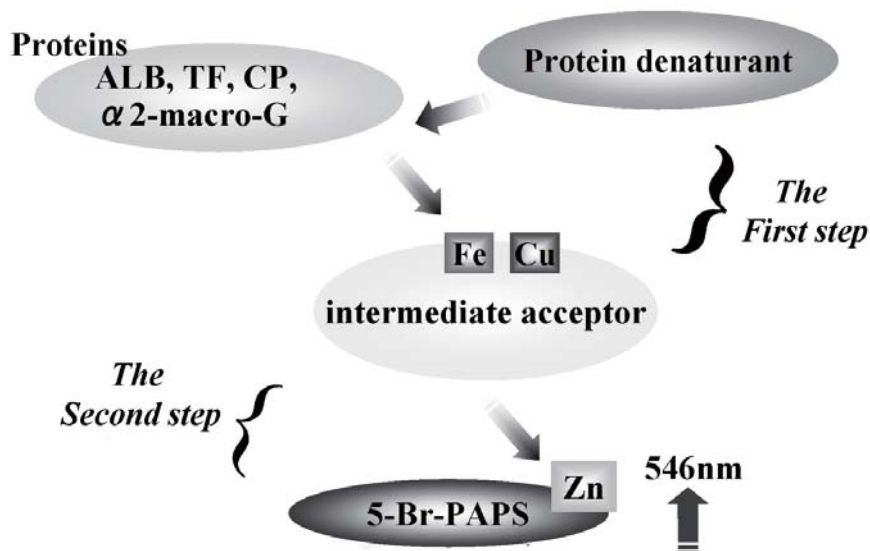


図3 Reaction principle

## 2. 亜鉛測定試薬の性能

再現性は他の自動分析装置用試薬と同等に良好、測定範囲は5～500  $\mu\text{g}/\text{dL}$ であった。標準物質の測定結果も認証値の許容幅の中に得られ、従来の原子吸光法との血清相関も良好であった(表1, 表2, 図4, 図5, 図6)。

従来の方法と比較し、本試薬は、検体の前処理を必要とせず、サンプル量は微量、結果報告も他の生化学項目と同時に、迅速に行うことが可能である。

表1 Within-run and between-run precisions

| Within-run precision. (n=20)     |         |         |         |
|----------------------------------|---------|---------|---------|
|                                  | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 |
| Mean ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) | 61.3    | 76.2    | 115.4   |
| S.D.                             | 0.4     | 0.8     | 0.8     |
| C.V.                             | 0.69%   | 1.03%   | 0.71%   |
| Range                            | 1.3     | 3.1     | 2.7     |
| Between-run precision. (n=9)     |         |         |         |
|                                  | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 |
| Mean ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) | 59.8    | 76.2    | 115.5   |
| S.D.                             | 1.0     | 1.4     | 1.6     |
| C.V.                             | 1.73%   | 1.86%   | 1.41%   |
| Range                            | 2.7     | 4.2     | 4.9     |

表2 Assesment of accuracy by certified reference material

|             | Certified Value<br>( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) | Measured Value<br>( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) | (Measured Value)/<br>(Certified Value) ratio |
|-------------|--|---|--|
| CRM BCR-637 | 111 $\pm$ 22                                   | 110.6   | 99.6%  |
| CRM BCR-638 | 143 $\pm$ 21                                   | 143.7   | 100.5%                                       |
| CRM BCR-639 | 236 $\pm$ 14                                   | 232.9   | 98.7%  |

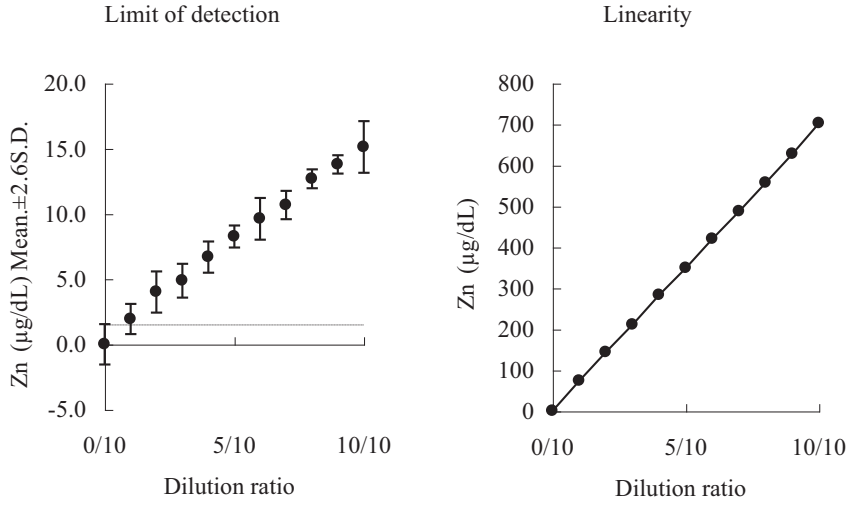


図 4 Limit of detection and Linearity

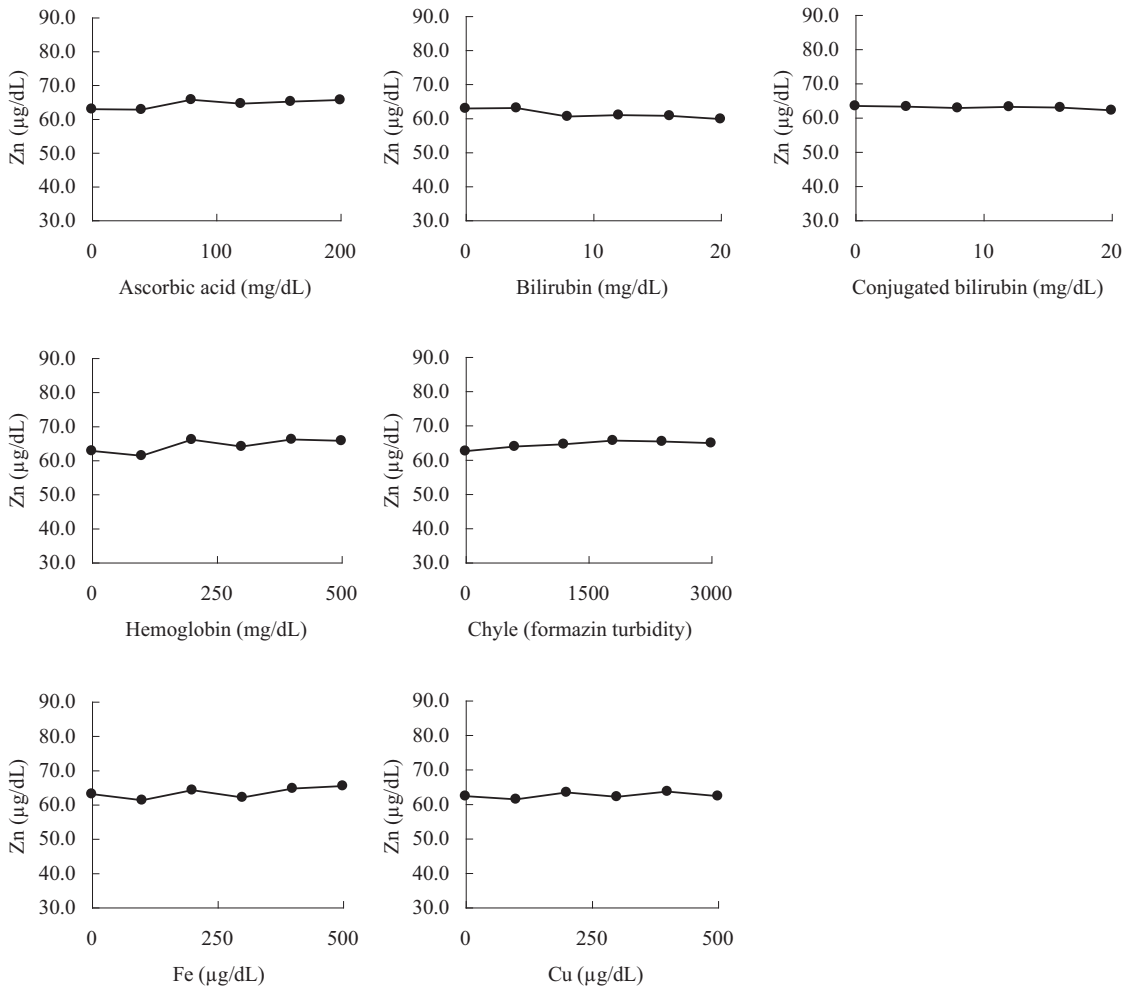


図 5 Effect of interfering substances

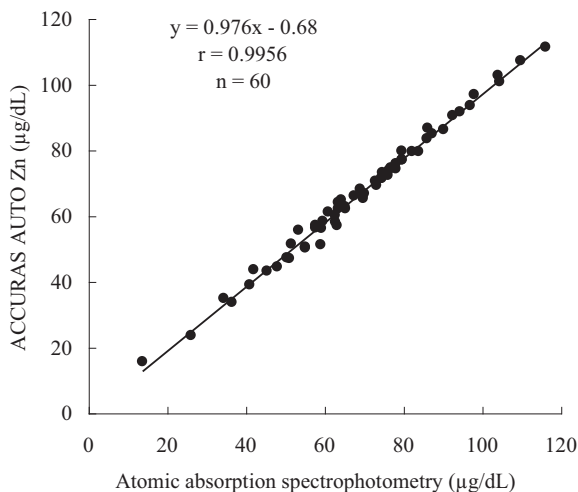


図6 Correlation between the value of serum zinc by atomic absorption spectrophotometry and ACCURAS AUTO Zn

### 3. 亜鉛測定の見注意点

亜鉛は、ゴムからの汚染があることが知られているので、採血管、注射筒の選択には注意を要する<sup>7)</sup>。検体取り扱い時のグローブの取り扱いも同様である。特に採血管については、微量金属測定用のものでない場合、汚染の無いことを十分に確認して使用することを推奨している。

また、採血後の血清または血漿の遠心分離までの時間経過によって測定値が上昇することが報告されている<sup>8)</sup>。分離前でも冷蔵保存することで本現象は抑制されること、血清と血漿で上昇の度合いに差がある(血清のほうが上昇する)ことから、高濃度で存在する血球または血小板中の亜鉛が何らかの機序により解離して血清または血漿中へ出てくるものと考えられているが、詳細はわかっていない。速やかな遠心分離、またはやむをえず分離前に長時間放置する場合は冷蔵保存することを推奨している。

さらに、鉄と同様に、日内変動があることが報告されている<sup>8)</sup>。朝方に高値を示し、日中次第に

低下し、夜間において最も低値を示す。

従来の測定ではこれらがおざなりになっていたことが、血清または血漿亜鉛の臨床的意義やその基準範囲を不明瞭なものにしていたと考えられる。これらに留意した上で、亜鉛測定を行う必要がある。

### まとめ

本法は、臨床検査において十分な精度、測定範囲を持ち、共存物質の影響も殆ど認められなかった。標準物質の測定結果ならびに原子吸光法との相関は良好であり、正確性も満足できる。このような自動分析装置での測定により、簡易・迅速化、検体の少量化、容易な多検体処理が実現し、測定結果を迅速に臨床医に渡すことが可能となり、小児の栄養管理や、診断前検査にも有用と思われる。今後も、亜鉛及び亜鉛欠乏症についての研究の更なる発展が望まれる。本法がその一助となれば幸いである。

◆文 献

- 1) 日暮和彦, 飯塚直美, 芳村 一, 田中龍彦, 野本昭三: 生化学自動分析装置を用いた亜鉛比色測定法. *Biomed Res Trace Elements* 18 (4) : 380-385, 2007
- 2) 山田満廣, 谷岡房子, 岸 和子, 幡中うき, 大西将則: ニトロソ-PSAPを用いた血清鉄および不飽和鉄結合能の自動測定法. *日本臨床検査自動化学会誌* 13 (5) : 659-665, 1988
- 3) Beale RN, Bostrom JO, Taylor RF : Improved rapid methods for the determination of iron content and binding capacity of serum. *J Clin Pathol* 15 : 156-160, 1962
- 4) Abe A, Yamashita S, Noma A : Sensitive, direct colorimetric assay for copper in serum. *Clin Chem*. 35 (4) : 552-554, 1989
- 5) Makino T, Saito M, Horiguchi D, Kina K : A highly sensitive colorimetric determination of serum zinc using water-soluble pyridylazo dye. *Clin Chim Acta*. 120 : 127-135, 1982
- 6) Foote JW, Delves HT : Albumin bound and alpha 2-macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of healthy adults. *J Clin Pathol* 37 (9) : 1050-1054, 1984
- 7) Helman EZ, Wallick DK, Reingold IM : Vacutainer contamination in trace-elements studies. *Clin Chem*, 17 (1) : 61-62, 1971
- 8) 野本昭三, 山内一由, 中林徹雄: 血清亜鉛値による亜鉛欠乏症検出システムの現況 その欠落部への提言. *Biomed Res Trace Elements* 14 (4) : 335-337, 2003