

# 黄疸疾患診断用 “富士ドライケム DBIL-P スライド” の開発

阿部義彦\* , 天野芳和\*

## Development of FUJI DRI-CHEM DBIL-P Slide for the Diagnosis of Jaundice

Yoshihiko ABE\* and Yoshikazu AMANO\*

### Abstract

A dry chemistry slide for the determination of Direct Bilirubin (DDBIL) concentration in serum or plasma has been developed. The choice of diazonium salt capable of selectively reacting with DBIL, enhancing the OD of the complex resulting from the coupling between the diazonium salt and DBIL, and improving the storage stability of the slide have been the key breakthroughs in this development. When a drop of serum or plasma is applied onto the slide, DBIL selectively reacts with the diazonium salt in the slide, and is quantified by the reflective photometry of the formed dye at 577nm. Satisfactorily stable results were obtained with within-run measurements. The present method based on dry film assay technology has proved to provide highly reliable data for the diagnosis of Jaundice with quick and efficient operations.

### 1. はじめに

医療の現場において、疾患の診断および病態を把握するために、血液中の化学成分や酵素を定量的に測定することが広く行われている。こうした臨床検査分野において、従来の高信頼性、高能率性に加え、迅速性、即時性への追求が盛んにうたわれてきている。米国臨床化学会において POCT (Point of Care Testing) が検査における重要な市場分野と認識され始め、多くの技術や商品が発表されている<sup>1)</sup>。富士ドライケムは(以下、FDCと略す)は、こうした現場の即時性、随時性の要求に応え、高信頼下、簡易かつ迅速に検査結果を提示できるシステムとして広く知られている。試薬は、乾燥状態で一体化した試薬スライドを用い、血液などの検体を1滴点着するだけで、血液中の目的物質濃度や酵素活性値が測定できるというドライケムストリーの代表的システムである。FDCの主な特長として、検体として血清、血漿、全血、その他、尿にも対応する、試薬、水、反応容器、測定セルなどが不要である、実際の操作は検体の点着だけである、水を使用しないため、廃液処理設備も不要で、災害時にも強い、などがあげられる<sup>2)3)</sup>。FDCはこれまでに、生化学14項目、酵素10項目、免疫項目1項目、そして電解質3項目を含む、

合計28項目の試薬スライドを開発してきた<sup>4)</sup>。

本報告では、黄疸疾患の診断に有用なDBIL(直接ビリルビン)スライドを開発したので紹介する。

### 2. スライド開発

#### 2.1 開発の背景

正常人の血中ビリルビンの大部分は網内系で老化した赤血球細胞の破壊によって遊離するヘモグロビンに由来する。こうして生成したビリルビンは間接ビリルビン(遊離ビリルビン)であり、このほとんどが肝細胞へ運搬される。肝細胞では、グルクロン酸転移酵素(Glucuronyl Transferase)によって、グルクロン酸1分子または2分子と間接ビリルビンのプロピオン酸とエステル結合による結合体を生成する。これが、直接ビリルビン(抱合ビリルビン)となる。直接ビリルビンの大部分は、その後胆管を経てウロピン体として体外に排出される。疾病がなければ血中のビリルビンはごくわずしか存在しない(Fig.1)。

このビリルビン代謝に障害や異常が生じると、血中のビリルビン値(直接ビリルビンまたは間接ビリルビン)に上昇がみられ、皮膚や各種臓器が黄染する。これが、いわゆる黄疸と呼ばれる現象であり、種々の原因に起因する。間接ビリルビンのみが上昇する主な原因として、溶血性貧血、すなわち、赤血球の崩壊が亢進することがあげられる。間接ビリルビンは、高濃度のままでは、その毒性のために脳障害を生じ、精神薄弱に至ることもある。一方、直接ビリルビンの上昇として代表的な疾病として、閉塞性黄疸が知られている。これは、直接ビリルビンが肝細胞から胆管への排泄される代謝に障害を起こすことに起因し、胆管炎や胆嚢炎を併発す

本誌投稿論文(受理1999年11月30日)

\*富士写真フイルム(株)朝霞研究所

〒351-8585 埼玉県朝霞市泉水3-11-46

\*Asaka Research Laboratories

Fuji Photo Film Co., Ltd.

Senzui, Asaka-shi, Saitama 351-8585, Japan

る場合がある。その他、肝細胞がビリルビンの取り込みを行えない場合、肝細胞中での抱合能力が低下した場合、ウイルスなどによる肝細胞が障害を受けている場合(ウイルス性肝炎)には、直接と間接ビリルビン両方の値が上昇することが知られている。なお、間接ビリルビンの値は、総ビリルビンと直接ビリルビンの差から求める<sup>5)</sup>。

このように、黄疸は、さまざまな原因により現れる症状であり、臨床検査においても、黄疸の鑑別には、血清総ビリルビンのみの測定では不十分であり、総ビリルビン値に対する直接ビリルビンの比が、重要な情報を与える。

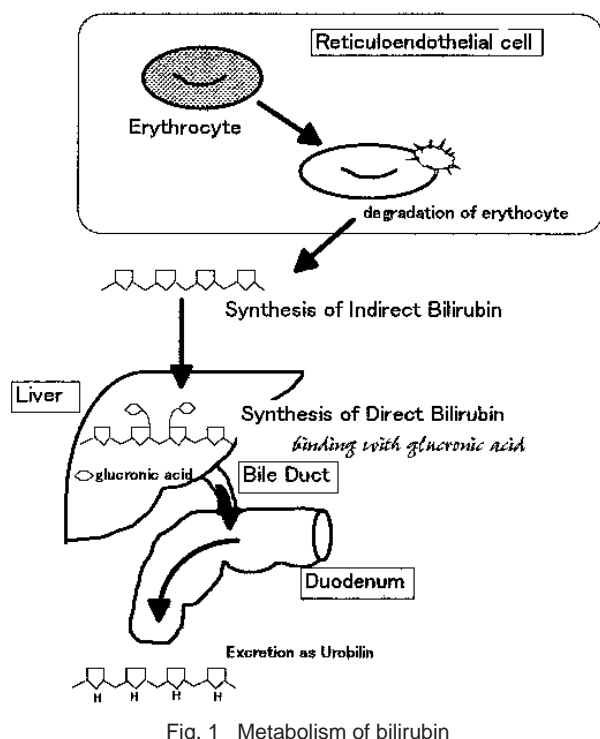


Fig. 1 Metabolism of bilirubin

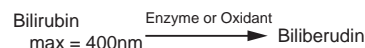
FDCの項目には、総ビリルビン測定用スライドTBILはあるものの、DBILを測定することはできなかった。そこで、こうした背景のもと、緊急検査として有用な、直接ビリルビン(DBIL)の開発を始めた。

## 2.2 測定原理およびスライドの層構成

### 2.2.1 測定原理の選択

DBILの測定は、一般にジアゾ試薬を用いたジアゾ法と酵素や酸化剤を用いた酸化法の2つの方法が知られている(Fig.2)<sup>6)</sup>。酸化法は400nmのビリルビン自身の色素の消滅からその差を濃度に換算して求める方法が用いられている。一方、ジアゾ法はビリルビンとジアゾ試薬がカップリングして生成する色素量を濃度に換算する。FDCはそのシステム上、試薬と反応する前の検体の光学濃度を測定することは不可能であることから、ジアゾ法を用いた測定法を用いることにした。

#### Oxidation Method



#### Diazonium Method



Fig. 2 Principle of bilirubin measurement

### 2.2.2 層構成について

DBILスライドの層構成をFig.3に示す。ポリエチレンテレフタレート(PET)の光透過性支持体上に吸水層、展開反応層の2層から構成されている。展開反応層に、血清などの検体を点着すると、検体は展開層で均一に自由展開を行い、近傍に存在するジアゾ色素とカップリング反応を起こす。カップリングした複合体は、570nmをmaxとする色素を形成する。この色素をアナライザーでは、支持体側から577nmにて反射測光し、37℃で5分間インキュベートした後の反射光学濃度を求め、あらかじめアナライザーに内蔵された検量線に従って、DBIL濃度に換算する。

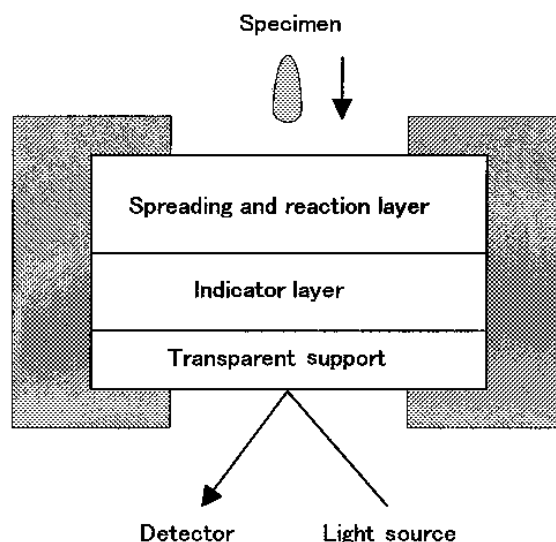


Fig. 3 Structure of FUJI DRI-CHEM DBIL slide

## 2.3 スライド開発

### 2.3.1 反応特異性

血液中には、前述したとおり、直接ビリルビンのほかに類似の構造をもつ間接ビリルビンがある(Fig.4)。直接ビリルビンの測定において、ポイントとなるのはいかに特異的に直接ビリルビンと反応を行わせるかである。ジアゾ試薬を選択することによって、直接ビリルビンのみの測定が可能になった。Fig.5に多検体相関のバイアスにより、間接ビリルビンの影響について確認した。

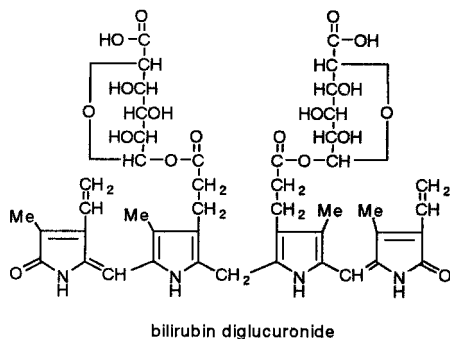
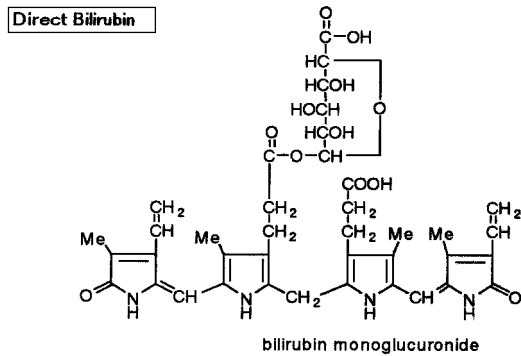
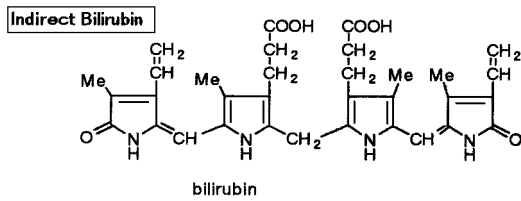


Fig. 4 Structure of bilirubin

### 2.3.2 感度UP

直接ビリルビンの正常域は0.3mg/dL以下と低く、このレベルにおける高い精度を達成させるためには、測定域内の検量線の傾きをいかにたたせるかがポイントとなった。

1,5-ナフタレンジスルホン酸を用いることにより、感度をUPさせることができた。Fig. 6に1,5-ナフタレンジスルホン酸の効果について、そのスペクトルを示した。1,5-ナフタレンジスルホン酸を導入することにより、色素スペクトルの深色効果が見られ、感度を増大させることができた。

### 2.3.3 保存安定性

ジアゾ試薬は、一般にその保存経時性が悪く、不安定な物質として知られている。本スライドについても、経時によりODが上昇する現象が見られた。さらに、キャピラリー電気泳動機を用いて、経時したスライドよりジアゾニウム塩を抽出定量した結果、明らかにジアゾニウム化合物の分解が起きていることを裏付ける結果を得た(Fig. 7)。この課題に対し、硫酸亜鉛7水和物を添加することにより、ジアゾニウム塩を安定化させ、保存安定性能を改良することができた。Fig. 8に、DBIL濃度の3レベルにおけるスライドの実経時データを示す。9ヶ月の有効期間内で十分安定な性能を示している。

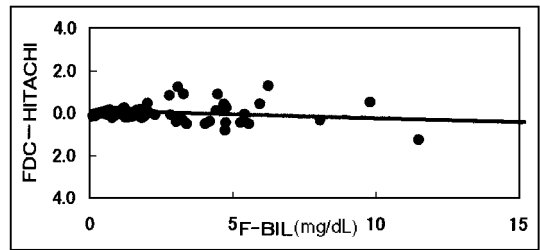


Fig. 5 Bias of indirect bilirubin on FUJI DRI-CHEM

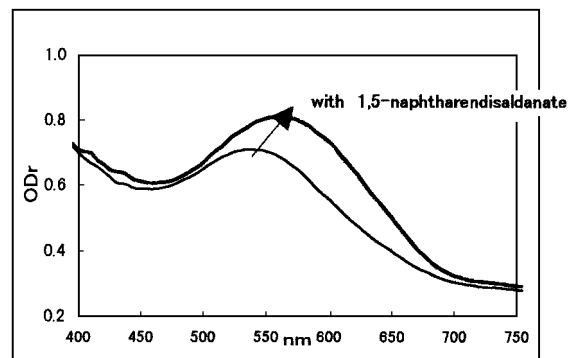


Fig. 6 Effect of 1,5-naphthalendisulfonate

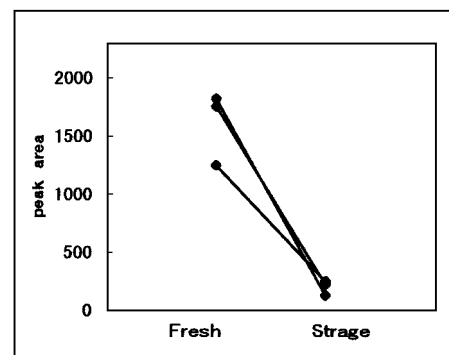


Fig. 7 Measurement of diazonium salt in slide by capillary electrophoresis

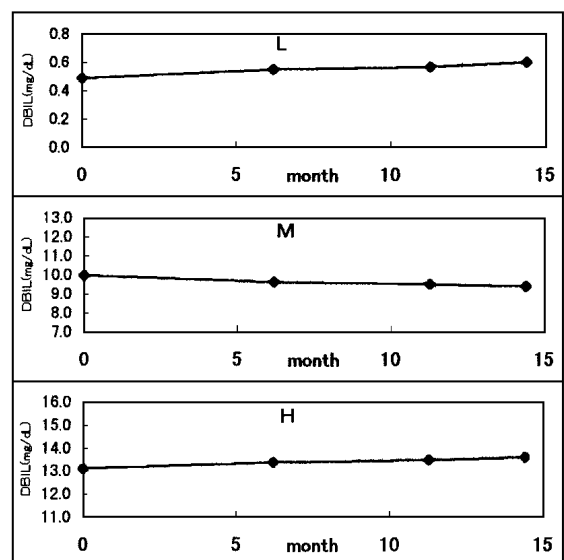


Fig. 8 Storage stability of the slide at 4°C

### 3. スライド性能

#### 3.1 干渉物質の影響

##### (1) 溶血の影響

元来ジアゾ法は、発色する色素の波長とヘモグロビンの波長が重なってしまうために、溶血検体では正誤差を生じることが知られている。本スライドにおいて溶血の影響を調べた結果をFig. 9に示す。スライドにおいても同じ理由により、正誤差を示すことを確認した。

##### (2) アスコルビン酸の影響

本スライドについて、血清中のアスコルビン酸の影響について調べた。Fig. 10に、その結果を示す。血清中のアスコルビン酸の影響はないことを確認した。

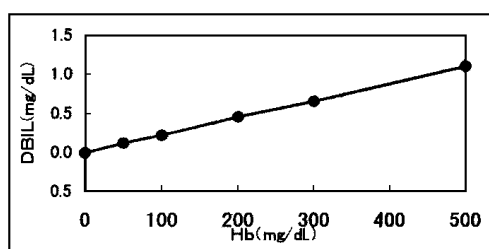


Fig. 9 Interference with hemoglobin

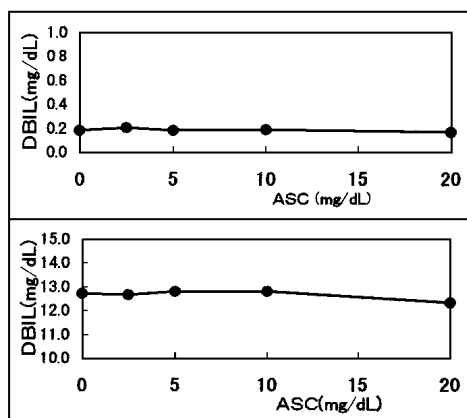


Fig. 10 Interference with ascorbic acid

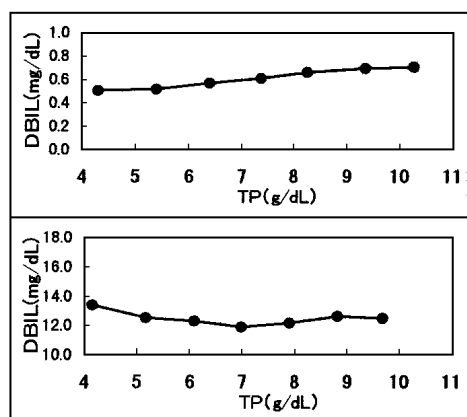


Fig. 11 Interference with protein

##### (3) タンパクの影響

本スライドについて、血清中のタンパクの影響について調べた。Fig. 11にその結果を示す。血清中のタンパク量の増大に伴って、Lレベルで若干高値化する傾向があるが、大きな影響はないことを確認した。

##### (4) 乳ビの影響

本スライドについて、血清中の乳ビの影響について調べた。Fig. 12にその結果を示す。血清中の乳ビの影響は、ないことを確認した。

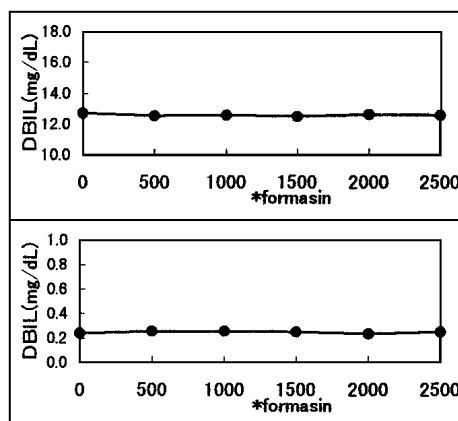


Fig. 12 Interference of chyle (\*formasin means degree of chyle)

### 3.2 実技試験

実際の患者検体を用いて、本スライドの有用性を確認した。

##### (1) 同時再現性

濃度の異なる血清5検体についてN=10で測定したときの同時再現性をTable 1に示す。正常域レベルでSD ; 0.02mg/dL, 高濃度域でCV ; 0.83 ~ 1.38%と良好な結果であった。

Table 1 Precision (within-run) Data for Human Serum

	sample1	sample2	sample3	sample4	sample5
	0.85	3.18	6.68	9.49	14.13
	0.86	3.14	6.59	9.52	13.94
	0.83	3.23	6.68	9.55	13.97
	0.82	3.16	6.60	9.59	14.24
	0.84	3.20	6.67	9.59	14.15
	0.86	3.21	6.74	9.60	13.93
	0.84	3.18	6.72	9.25	13.83
	0.86	3.21	6.77	9.69	14.22
	0.87	3.20	6.64	9.35	14.06
	0.89	3.20	6.78	9.60	14.21
AVERAGE	0.85	3.19	6.69	9.52	14.07
SD	0.020	0.026	0.066	0.131	0.143
CV	2.40%	0.83%	0.98%	1.38%	1.02%

##### (2) 相関

検体72検体を用いて、自動分析装置HITACHI7150との相関を調べた。Fig. 13にその結果を示す。回帰式  $y=0.9953x+0.0201$ , 相関係数 ;  $R=0.9969$ ,  $Syx=0.997$ と良好な関係を示した。

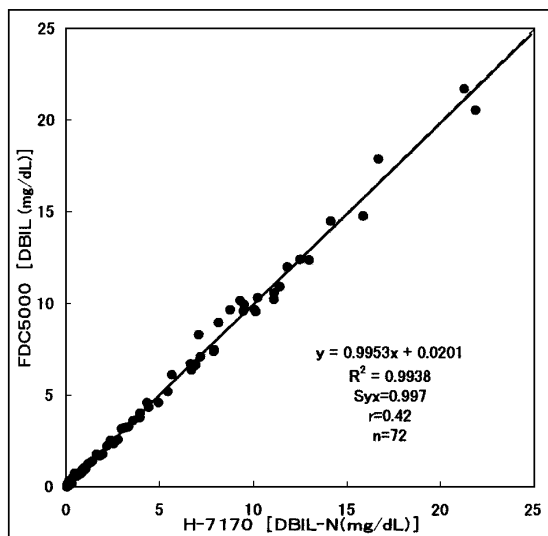


Fig. 13 Correlation between the results with FDC DBIL slide and HITACHI7150

#### 4. 終わりに

FDCの測定項目には、総ビリルビン測定用スライド (TBIL) しかなく、今まで黄疸の診断は、その人体に及ぼす影響を判断することしかできなかった。今回、新たにDBIL測定スライドが加わることによって、その診断の幅が大きく広がったことは言うまでもない。DBILスライドは、今後ドライケミストリーの特長である測定の簡便性、即時性を活かし、TBILスライドと共に、黄疸の鑑別に有用な製品として、現場で使用され、FDCシステムの発展に貢献すると考える。

#### 参考文献

- 1) MacLeod, GK. Arch Pathol Lab Med. An Overview of Health Care, 119, 575 (1995)
- 2) 片山善章, 臨床病理 特集, 106, 166 (1997)
- 3) 北島昌夫, 医療電子と生体工学, 22, 274 (1984)
- 4) 田中秀明ほか, 富士フィルム研究報告, No.43, 87 (1998)
- 5) 長島秀夫ほか, 臨床検査 MOOK「黄疸の検査」(1981)
- 6) 飯田陽子ほか, 臨床病理, 31, 6 (1977)

(本報告中にある“富士”, “FUJI”, “ドライケム”, “DRI-CHEM”は富士写真フイルム(株)の商標です。)