

# 呈色法による血糖値測定法と臨床検査装置

田中 正一・大石 晴樹

## Blood Glucose Determination and Its Clinical Diagnostic Device by the Colorimetric Method

Shoichi TANAKA and Haruki OISHI

As for the history of the development of the blood glucose determination, the reduction method and the condensation method, which were the leading method of the blood glucose determination before, has shifted to the enzymatic colorimetric method. The enzymatic method has high specificity and sensitivity and its reagent is generally safe. Hexokinase G-6-PDH method is established as a standard method, and is utilized worldwide. Various auto analyzers have been improved as for the measurement accuracy and precision, and are working active in urgent and routine clinical diagnosis. Recently, the simple point of care testing (POCT) instrument that even a patient can use has been coming out. This technology under still development will be helpful to raise QOL for the patient in the medical care.

**Key words:** blood glucose, enzymatic method, colorimetry, auto analyzer, clinical diagnosis

血糖値（グルコース値）測定は、単に糖尿病を診断する目的だけでなく、広く糖代謝の変調を知るために古くから用いられてきた<sup>1)</sup>。その方法は還元法から始まり、縮合法、そして今日の酵素法に至るまで、さまざまな開発改良を経ながら常に重要な臨床検査として広汎に実施されてきた。手技としてかつては重量法や滴定法が利用された時代もあったが、多数検体を迅速かつ簡単に光学的に測定する比色測定装置が現在の主流となり、臨床検査分野では自動分析装置による定量測定が一般的になっている。最近では、血糖値の緊急検査あるいは迅速モニターを目的としたベッドサイドでの簡易測定装置も普及しつつある。本稿では、これら呈色法による血糖値測定法と臨床検査装置について述べる。

### 1. グルコース測定法

血中グルコースの測定法は、還元法、縮合法、酵素法の3種のタイプに分けることができる。おのおのの詳細と、その特徴について述べていく。

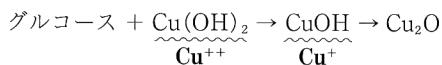
#### 1.1 還元法

アルカリ溶液中のグルコースの還元作用を利用するもので、Somogyi-Nelson法（S-N法）など銅塩の還元によるアルカリ性第二銅イオン還元法、Hagedorn-Jensen法（H-J法）などフェリシアン化カリウムの還元によるアルカリフェリシアン還元法がある<sup>2)</sup>（図1）。これらの還元法は30年前までは臨床検査分野で主流であったが、必要とされる試料の量が多いこと、操作が繁雑で時間を要すること、適切な反応条件（除タンパク剤選択および還元反応の条件）の設定が難しいこと、さらに血中のグルコース以外の特異性を左右する非糖性還元物質（アスコルビン酸、尿酸など）の干渉を防止する必要があることなど、さまざまな課題を抱えていた。

#### 1.2 縮合法

グルコースは強酸性で、アンスロンなどのフェノールや、*o*-トルイジン（*o*-T法）<sup>2)</sup>などの第一級の芳香族アミンと縮合して着色物質を生じる。この性質を利用してグルコースを測定する方法を、縮合法とよぶ（図2）。還元法に

### Somogyi-Nelson 法



$\text{Cu}_2\text{O} + \text{硫酸モリブデン酸} \rightarrow \text{モリブデン青}$

### Hagedorn-Jensen 法

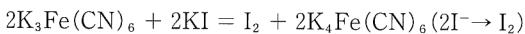
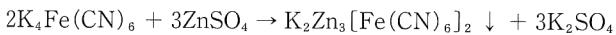
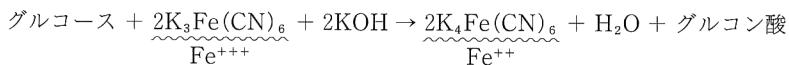
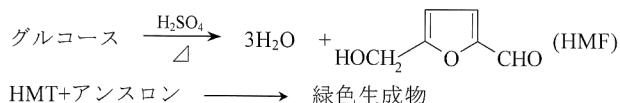


図1 グルコース測定法（還元法）。

### フェノール法



### o-トルイジン法

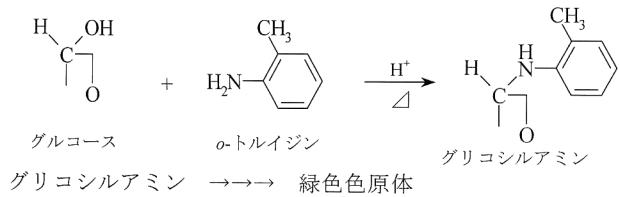


図2 グルコース測定法（縮合法）。

比較してより特異的な発色反応である縮合法は、早くからアンスロン法が知られていたが、血糖測定法として実用上の評価を得たのは芳香族アミンの *o*-アミノビフェニル（*o*-AB）法が開発されて以降である<sup>3)</sup>。ただ、この*o*-AB法は発がん性の点から敬遠され、その後開発された*o*-T法や日本で改良された*o*-トルイジン-ホウ酸（*o*-TB）法<sup>3)</sup>が普及し、近年まで広く利用してきた。これら*o*-Tあるいは*o*-TB法は還元法に比べ、グルコースにより特異的であり、操作段階も少なく多数検体の迅速測定処理が可能で実用性が高かったため、従来の血糖測定法であった還元法に不満を抱いていた検査室が臨床検査に要求する特性に応えた方法となった。しかし、強酸を使用する危険性、氷酢酸の臭気の問題、酸性腐食による秤量精度の問題から、自動分析装置には必ずしも適しているとはいはず、現在の測定法は酵素法に移っている。

### 1.3 酵 素 法

#### 1.3.1 GOD-POD 法<sup>4)</sup>

血液試料中の  $\beta$ -D-グルコースは、発色試液中に含まれるグルコースオキシダーゼ（GOD）の作用を受けて酸化され、同時に過酸化水素を生じる。生成した過酸化水素は、

共存するペルオキシダーゼ（POD）の作用により発色試液中のフェノールと4-アミノアンチピリン（4AAP）とを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成させる。この赤色の吸光度を測定することにより、試料中のグルコース濃度を求める。このGOD-POD反応系に4AAPとフェノール類との縮合反応を利用し、生成したキノン色素を比色測定する方法が最も広く普及し、開発市販されているキット製品のほとんどがこの反応を基盤にしている（図3）。

#### 1.3.2 ムタロターゼ GOD-POD 法<sup>5)</sup>

グルコースは溶液中では  $\alpha$ -異性体と  $\beta$ -異性体で動的平衡状態にあり（室温で  $\alpha$ -異性体36%，  $\beta$ -異性体64%），グルコース酸化酵素（GOD）は  $\beta$ -異性体に特異的であるので、 $\alpha$ 型を反応させるには、これを  $\beta$ 型に変えなければならない。この転換の速度はpHと温度によって変化する。この転換を促進するための酵素が異性化酵素（ムタロターゼ）であり、速やかに  $\alpha \rightarrow \beta$ 型の変化を起こさせてからGOD-POD反応を行う。

#### 1.3.3 PyrOD-POD 法<sup>2)</sup>

グルコース溶液中の立体構造の特異性に注目して、GODよりも基質特異性の高いピラノーゼオキシダーゼ（PyrOD）を用いる。このPyrODは  $\alpha$ 、 $\beta$ 同型に作用するので、ムタロターゼの必要もなく、反応所要時間も短い。PyrODの触媒作用によりD-グルコースより生成した過酸化水素は、PODの共役下で4AAPとHSDA [Na-N-( $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline]と縮合しキノン色素を形成する。これを波長585 nmで吸光度測定する。

#### 1.3.4 ヘキソキナーゼ G-6-PDH 法<sup>6)</sup>

アデノシン-5'-三リン酸（ATP）存在下、試料中のグルコースは、ヘキソキナーゼ（HK）の触媒作用によりグルコース-6-リン酸とアデノシン-5'-二リン酸（ADP）になる。グルコース-6-リン酸はNAD(P)共存下、グルコ-

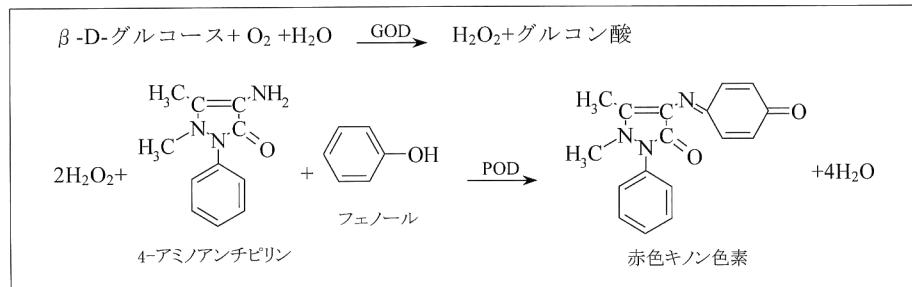


図3 GOD-POD法.

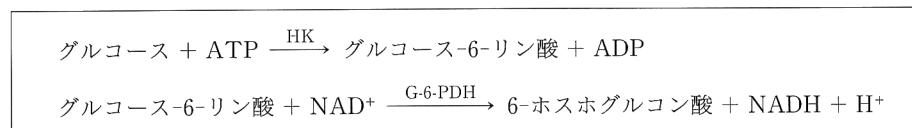


図4 ヘキソキナーゼG-6-PDH法.

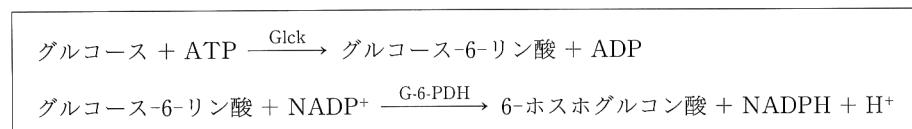
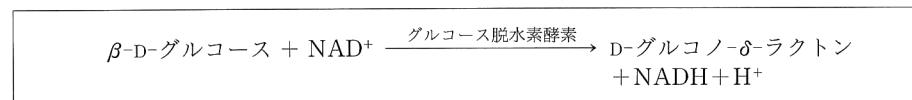


図5 グルコキナーゼ G-6-PDH 法.



## 図6 グルコース脱水素酵素法.

ス-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) により 6-ホスホグルコン酸になり、同時に NAD(P) は NAD(P)H に還元される。この際の NAD(P) → NAD(P)H の変化を 340 nm における吸光度の変化（増加）を測定することにより、試料中のグルコース濃度を求める。この HK/G-6-PDH 法はグルコースに対してより特異的な方法で、現在は標準法として確立し、国際的に広く普及している<sup>7)</sup>（図 4）。

### 1.3.5 グルコキナーゼ G-6-PDH 法<sup>8)</sup>

アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) 存在下、試料中のグルコースは、グルコキナーゼによりグルコース-6-リン酸とアデノシン-5'-二リン酸 (ADP) になる。グルコース-6-リン酸は NAD(P) 共存下、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) により 6-ホスホグルコン酸になり、同時に NAD(P) は NAD(P)H に還元される。この NAD(P)H の吸光度の増加量を測定することにより、試料中のグルコース濃度を求める。ヘキソキナーゼ (HK) が熱に不安定なうえ、ヘキソース、グルコース、マンノース、グルコサミンなどにも作用するのに対して、グルコキナーゼはグルコースに特異的に反応し、耐熱性菌由来酵素である (図5)。

### 1.3.6 グルコース脱水素酵素法<sup>9)</sup>

試料にグルコース脱水素酵素を作用させると、試料中の $\beta$ -D-グルコースは NAD の存在下 D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンに酸化され、同時に NAD は NADH となる。その際の NAD → NADH の還元反応に伴う 340 nm の吸光度の変化を追跡して、NADH の生成速度を測定することにより、試料中のグルコース濃度を求める。この方法は操作段階が少なく、エンドポイント法 (end point assay) もレート法 (rate assay) も可能である。試薬は比較的安定であり、血液以外の試料（尿、髄液）のグルコースについても適用可能である。また、特異性が高く、ビリルビン、アスコルビン酸の干渉を受けにくく、HK/G-6-PDH 法との相関も高いなど、すぐれた特徴をもっている（図 6）。

### 1.3.7 酵素法のまとめ

初期の酵素的測定法は、除タンパク操作や濃硫酸の使用など、あまり実用的でなかったが、特異性の面からは画期的な方法であった。現在日本で広く利用されているのはGOD法の改良法で、生成した過酸化水素にPODを共役させフェノールまたはその誘導体と適当な色素を縮合させるものであるが、後半の反応は必ずしも特異的ではなく、

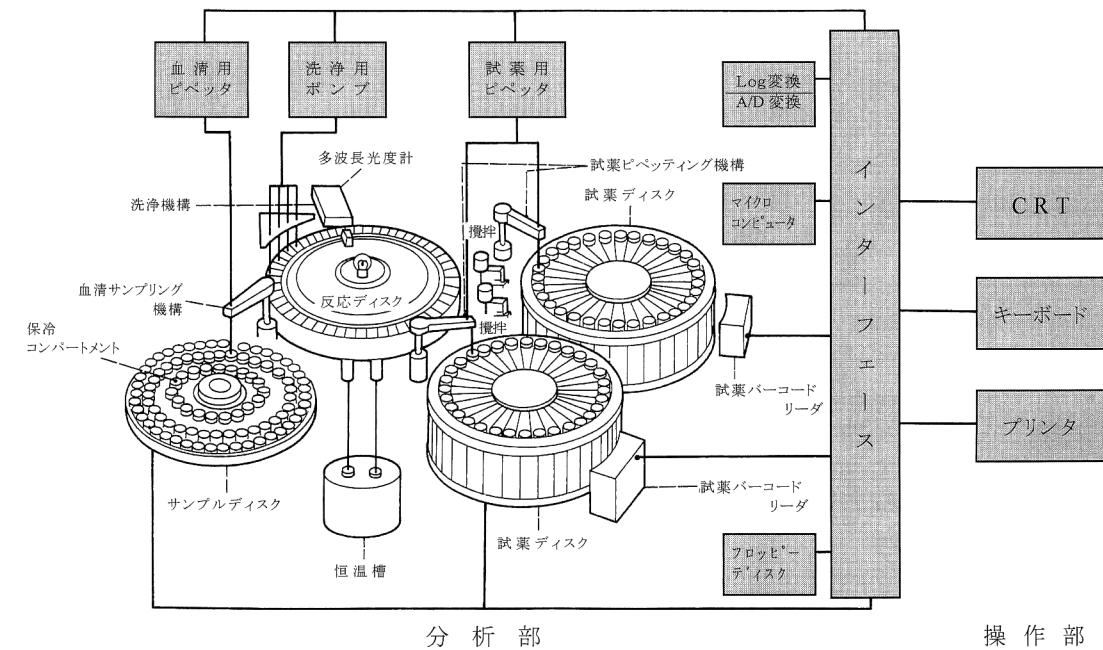


図7 ディスクリート方式の構成例。

酸化性あるいは還元性物質に影響されやすい。そのため、HK/G-6-PDH 法が国際的には標準法として推奨されている<sup>8)</sup>。最近では、グルコース脱水素酵素、ムタロターゼや PyrOD を利用して、反応を促進させる改良法も開発されている。

現在自動分析装置に利用されている日常の血糖検査は、酵素を用いる測定法が主流である。その理由としては、特異性が高く感度も高いこと、各種共役酵素系の開発が進み 1~2 試薬系が可能となったこと、rate assay が自動化され多数検体処理が可能となったこと、酵素を含む高品質の試薬が安価に安定に供給されるようになったこと、試薬が安全であり廃液処理も容易であること、酵素活性の測定がさまざまなセンサーの開発で容易になってきたこと、などがあげられる。

## 2. グルコース分析装置

血糖値測定法は以上述べてきたように、還元法から縮合法、そして酵素法へと進歩してきた。また、多数検体を迅速かつ簡単に測定できる比色測定が主流となり、自動分析装置が一般的になった。初期のころは試料量を多く必要としたが、現在では 5 μl 以下の超微量試料で高い精度の測定が可能となっている。除タンパク処置も不要となり、試料と試薬を混合して、1 ステップの反応で比色測定できるまでに反応段階は短縮されている。これらの開発の成果は数多くの試薬キット製品として販売され、手軽に使用できる。この章では、グルコース値を測定する装置について述

べる。なお、簡易血糖値測定装置として、酵素電極法を用いた装置も最近では多く市販されているが、本稿では呈色法に限り、電極法についての説明は従来の成書<sup>10)</sup>にゆずることとする。

### 2.1 汎用型自動分析装置

臨床検査の要望に応えて、血糖値検査への自動化装置導入は顕著であった。当初は 1 検体ごとに測定する装置を中心で、緊急検査用、ベッドサイド用機器として活躍したが、現在では多数検体の連続測定が可能となり、大規模な検査室でも日常検査に利用されるようになった。各種の多項目汎用型自動分析装置では、いずれもグルコースの測定が可能となっている。

汎用型自動分析装置<sup>11)</sup>は、使用目的に応じてさまざまな機種が開発されてきた。一時期臨床検査の自動化に主導的な役割を果たした連続流れ分析型は、コンタミネーションの問題、適用方法の制限などのために、近年はディスクリート（非連続）型の装置にとってかわられている。ディスクリート型とは、試料ごとに、おのおの試験管（または容器）を割り当てて反応を行わせ、比色その他の計測を行う形式のものをいうが、その中でも、ターンテーブル多サイクル型を応用した自動分析装置が最も広く検査室で利用されている。

ターンテーブル多サイクル型では、図 7 のように、円形の反応ディスクの外周部に反応セルを配置し、反応ディスク（に付随する反応セル）の回転と停止の動作を繰り返す。ディスクの停止中に周辺に設置されているピペット

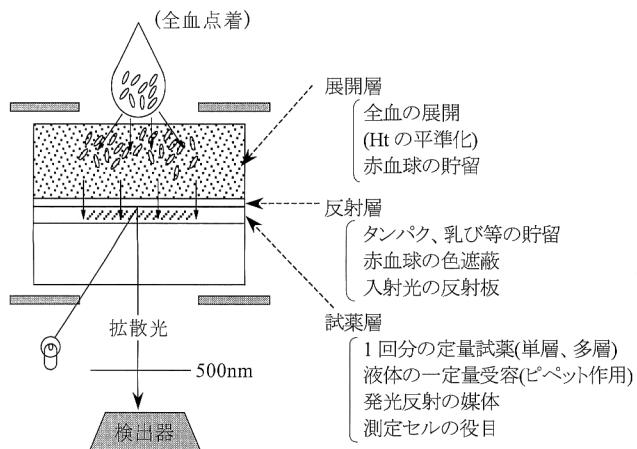


図8 富士ドライケムスライド (GOD/POD4-アミノアンチピリン・キノイド色素法)。

ング機構などにより、反応セルへの試料サンプリング・試薬ピペッティング・反応液攪拌・測定が終了したセルの洗浄などが行われる。ディスクは1回転1秒程度の速度で回転されるが、このとき1回転ごとに反応セルのポジションをひとつ前へ進めて停止させ、一定時間(約20秒程度)休止した後、次の回転を行う動作を繰り返す。これをサイクルとよぶが、1サイクルは約15~20秒程度である。反応液の吸光度は、反応ディスクの回転に伴って各反応セルが多波長光度計の前を通過するたびに測定される。読み取られた吸光度値は、各セルの反応経過曲線としてコンピューターに記憶され、分析方式に応じて検量線演算により濃度値・活性値が計算される。

以上の多項目、多検体を同時に精度よく、効率的に分析することを実現したディスクリート方式の汎用型自動分析装置は、臨床化学検査機器の主流となっている。

## 2.2 ドライケミストリー

必要に応じていつでも迅速に血糖値を求める目的を目的に、幾種かの簡易血糖測定装置が開発されてきた。本稿では特に、試験紙などの検出部にグルコースオキシダーゼ(GOD)などの酵素を使用し、その検出部における反応過程を光学的に測定するドライケミストリーについて述べる<sup>12)</sup>。ドライケミストリーシステムは、おもに多層フィルム方式と試験紙方式に分けられ、前者には卓上型と多項目測定用の大型自動化システムの装置が、後者には小型の卓上型装置がある。

### 2.2.1 多層フィルム方式

富士ドライケムシステム(図8)を例に、多層フィルム方式について説明する。本方式では、反応と測定を写真フィルムと類似の多層化されたフィルム(ドライケムスライド)上で行うことの特徴がある。ドライケムスライド上に

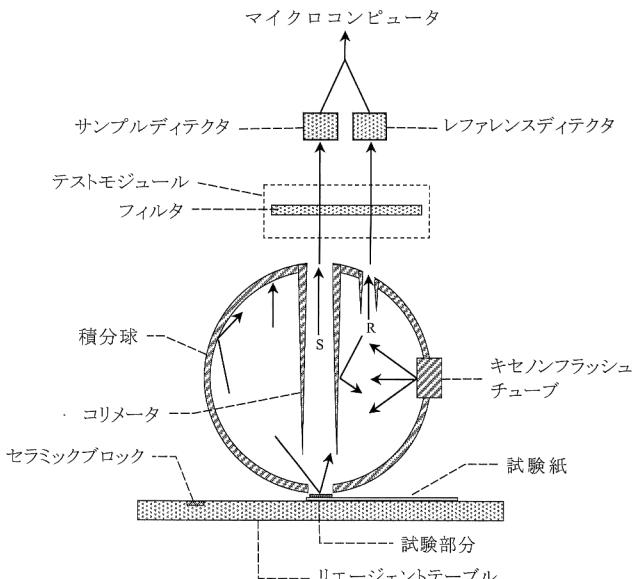


図9 セラライザーシステムの測定機構。

血液を点着すると、血液成分は表面処理を施した織物である展開層で均一に展開し、下の層へ拡散していく。反射層でタンパクや血球が除去され、血漿成分のみがその下の試薬層に拡散浸透する。反射層はTiO<sub>2</sub>微粒子をゼラチン層中に分散させたもので、ヘモグロビンやビリルビンなどの着色物質の試薬層への移行を防ぐとともに、反射光測定時の反射板ともなっている。試薬層中で、血液成分中のグルコースとグルコースオキシダーゼ(GOD)との反応により発生した過酸化水素は、ペルオキシダーゼ(POD)の存在下、発色試薬と反応し赤色色素が生成する。スライドは測定装置内で37°Cで一定時間インキュベーションされた後、試薬層の拡散反射光が測定され、装置に内蔵された検量線によりグルコース濃度が計算される。

### 2.2.2 試験紙方式

ドライケミストリーの別の例として、試験紙方式について説明する。多層セラライザーシステム(バイエル-三共)の測定機構を図9に示した。セラライザーは、硬質プラスチック片に試験試を貼付したスティック上で反応と測定を行うのが特徴である。この試験紙は比較的安定であり、室温で保存できる。測定手順は、セラライザー試験紙の試験部分に試料を含浸させ、反応終了後に積分球を使用した反射光測定系で試験紙からの拡散反射光量を測定し、レファレンス光量から反射率を算出するというものである。得られた反射率はキャリブレーターで校正した検量線から濃度値に換算され、ディスプレイに表示される。測定機構のリエージェントテーブルは37°Cに加温されており、反応温度を一定に保っている。キセノンフラッシュチューブは測

定系の温度を上昇させることなく試験紙を照射し、光路Sを通った試験紙からの反射光がディテクターに検出され、演算処理される。

### 2.3 装置の動向

グルコース測定装置としてはこれまで述べてきたように汎用型自動分析装置あるいは専用の小型分析装置が普及しているが、最近では、血液ガス分析装置でもグルコースを測定できる複合機が登場してきた。また、簡易型のグルコースセンサーを搭載し、糖尿病患者が自己血糖値を測定するハンディータイプの小型装置が急速に普及しつつある<sup>13)</sup>。これらはおもに、GOD酵素電極を検出部に用いている。採血時に痛みを軽減するなど操作上の工夫もなされており、患者のQOL向上のため、将来は非侵襲で使いやすい装置の開発が期待されている。

呈色法による血糖値測定法について、過去の測定法を含め整理し紹介した。各測定法の実際については、今ではほとんど用いられなくなった還元法も、その化学的歴史の意義も含める意味で説明し、縮合法、そして現在の酵素的測定法に至るまでを順に記述した。また、最近の傾向として、臨床検査室に広く浸透してきた自動分析装置をドライケミストリーの例も含めて紹介し、その原理について概述した。血糖値測定については、現在も試料の微量量化、採血の無痛化、非侵襲測定などの技術開発が活発に進められて

おり、本稿が呈色法による血糖値測定法の理解に役立てば幸いである。

## 文 献

- 1) 萩 三男：“糖類”，臨床化学一要點，第3版，萩 三男著（近代出版，2000）pp. 72-82.
- 2) 玄番昭夫，荒木仁子（監訳）：“第三章 炭水化物(糖質)”，グラッドウォール臨床検査学，臨床化学，1 (1984) 240-251.
- 3) 山中 學，村地 孝，林 康之（編集主幹）：“血糖検査法”，糖尿病の検査，臨床検査MOOK, 18 (1984) 13-28.
- 4) 和光純薬工業(株)：グルコースB-テストワコー(GOD法)，添付文書 (1991).
- 5) 和光純薬工業(株)：自動分析装置用試薬-AR IIワコーグルコース-AR II（ムタローター・GOD法），添付文書 (1991).
- 6) 和光純薬工業(株)：LタイプワコーGlu2（ヘキソキナーゼ・G-6-PDH法），添付文書 (2001).
- 7) 五十嵐すみ子，島崎道弘，仁科甫啓ほか（日本臨床化学会試薬専門委員会）：“血清グルコース測定勧告法”，臨床化学，20 (1991) 247-254.
- 8) 和光純薬工業(株)：グルコース-HR IIワコー（グルコキナーゼ・G-6-PDH法），添付文書 (1991).
- 9) 和光純薬工業(株)：OA テストワコーグルコース-OA テストワコー（グルコース脱水素酵素法），添付文書 (1991).
- 10) 金井 泉，金井正光：“糖質とその代謝関連物質”，臨床検査法提要，31 (1998) 524-529.
- 11) 金井 泉，金井正光：“汎用型自動分析装置”，臨床検査法提要，31 (1998) 26-37.
- 12) 金井 泉，金井正光：“ドライケミストリによる検査方法”，臨床検査法提要，31 (1998) 18-26.
- 13) 矢野経済研究所：2002年～2003年版血液分析装置に関する市場動向調査 (2003).

(2004年2月9日受理)