

Transaminase 検 量 線 に つ い て

国立岡山病院(日下連院長)

才 川 秀 男

〔昭和39年10月7日受稿〕

緒 言

血清トランスアミナーゼが臨床的に問題となつて来たのは最近のことであるが、1953年 Karmen, Wroblewski¹⁾等の報告後、多くの研究者により検討され、その活性値測定は心筋硬塞^{2,3)}および肝疾患^{4,5)}における重要な検査法となつた。その測定法として1955年 Karmen⁶⁾の発表した方法は最も進歩した方法であつたが、日常臨床検査法として不適な点もあつた。その後 Reitman and Frankel⁷⁾によつて比色による簡便な方法が研究発表され、正確度では Karmen 法に劣るとはいへ、多くの利点をもつため、臨床的に充分利用出来るものとして、種々検討されつつある^{8,9)}。

ただ検量線作製については Reitman and Frankel は pyruvate と α -ketoglutarate (2mM) の混合物に同量の呈色液 (2,4-dinitrophenylhydrazine 1mM) を加えて直線になると述べているが、これは著者の実験と全く異なる。即ち著者の実験では同量の呈色液を加えた場合は pyruvate が 0.2 μ M 以上になると曲線となる。又一方溝部⁹⁾は基質液と同量の呈色液 (2,4-dinitrophenylhydrazine) を加えると pyruvate の量が 0.3 μ M 以上になると曲線となると述べている。即ち両者とも呈色液 (2,4-dinitrophenylhydrazine) を基質液と同量加えたことに、理論的に疑問があるのであり、著者は呈色液の加える量を増すことにより pyruvate の量が 0.2 μ M 以上になつても直線になることを確認した。

実験材料および方法

試薬

1) Pyruvate 規準液

焦性ブドウ酸リチウム塩 Lithiumpyruvate (片山化学) 188mg を蒸留水 100ml にとかし、用に臨んで10倍に稀釈する。(pyruvateの濃度: 2mM)

2) 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.4)

第2磷酸ソーダ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (片山化学特級) 3.58g/dl 液および第1磷酸カリ KH_2PO_4 (片山化学特級) 1.36g/dl 液を80:20の割合に混ぜて pH 7.4 に調整する。

3) 基質液

α -ketoglutaric acid (片山化学特級) 29.2mg と dl-alanine (片山化学特級) 1.33g を上記 2) の緩衝液で完全にとかし、後 N-NaOH で pH を 7.4 に補正し、緩衝液で全量を 100ml にする (α -ketoglutaric acid の濃度: 2mM)。

4) 呈色液

2,4-dinitrophenylhydrazine 19.8 mg (片山化学特級) を濃塩酸 7.0 ml にとかした後、全量を水で 100 ml にする。(2,4-dinitrophenylhydrazine の濃度: 1mM)

5) 0.4N-NaOH 液

NaOH (片山化学特級) 16g を水で 1000ml にとかす。

検量線の作製

試験管内に表1のように 2mM pyruvate 基準液および基質液を加え、さらに呈色液 0.5ml 1.0 ml または 1.5 ml を混和して全量が 2ml になるように蒸留水を加える。20分間室温に放置し、0.4 N-NaOH 液 5.0ml を加え発色させ、発色30分後に日立分光光度計 EPB-U 型を使用し、505m μ で吸光度を測定した。縦軸に吸光度、横軸に pyruvate (μ M) をとり、試験管番号 1, 2, 3, 4, 5 の吸光度から 0 号の吸光度を差引いた値をいれ、検量線を作製した。

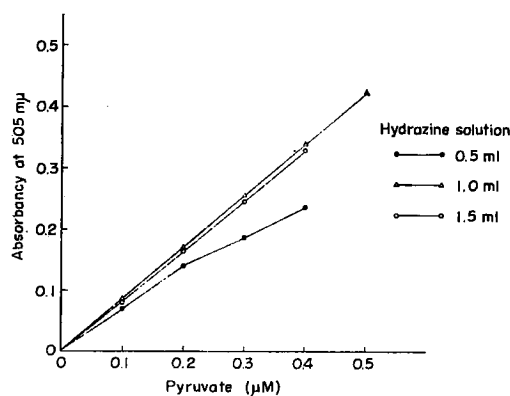
実験成績

図1で明らかのように呈色液を 0.5 ml 加えた場合は pyruvate の含量が 0.2 μ M 以上になると曲線をえがき、1.0 ml, 1.5 ml 加えた場合は直線になる。なほこの実験に用いた溶液の全量は 7.0ml であるが、他の研究者の用いた全液量は 6.1ml であつた。したがつて、ここにあげた検量線の傾斜は幾

表1 規準液のつくり方

試験管番号	試薬 2mM-Li-pyruvate(ml)	基質液(ml)
0	0.00	0.50
1	0.05	0.45
2	0.10	0.40
3	0.15	0.35
4	0.20	0.30
5	0.25	0.25

図1 呈色液の添加量と吸光度



呈色液を 0.5ml 加えた時は pyruvate の含量
0.2 μ M 以上から曲線をえがくが, 1.0ml,
1.5ml では直線となる。

分低くなっている。これは呈色液を段階的に加える
ことによつて液量が増すため、同一濃度にそろえて
検量線を比較しようとしたからである。

考 察

2,4-dinitrophenylhydrazine は pyruvate および
 α -ketoglutarate とそれぞれ 1 : 1 の割合で反応し、
それぞれそれらの hydrazone を作る。Reitman ら
の方法⁷⁾によれば pyruvate だけに対しては十分な
量の呈色液が用いられている。ところが、基質液に
含れている α -ketoglutarate も同様に呈色液と反応
する。したがつて基質液中の α -ketoglutarate およ
び pyruvate の含量とが反応するのに必要な呈色液

の量は少なくとも両者の含量と同量でなければなら
ない。

呈色液を 0.5 ml 用いる場合は理論量の半分である
から、2,4-dinitrophenylhydrazine は一部は pyruvate
と反応し、一部は α -ketoglutarate と反応する。そ
して未反応の pyruvate および α -ketoglutarate が
残っている。

また呈色液の pyruvate および α -ketoglutarate
に対する反応性が異なるため検量線は曲線となつて
あらわれる。これらの欠点を除くため、著者は
pyruvate および α -ketoglutarate に対して理論量
以上の呈色液を加えることによつて直線性のある検
量線をかくことができた。

なお、図1において呈色液 1ml および 1.5ml を
加えた場合、両者は等しくなるはずであるが、後者
が少し低い値を与えるのは、呈色液が強い酸性溶液
であり、水酸化ナトリウム溶液を加えても、前者ほ
ど強い塩基性を示さないためであろう。呈色液の濃
度について溝部⁹⁾が考察しているが、著者の実験に
よれば Blank の吸光度は 0.3 附近であり、十分実
用に供することができる。なお本実験に用いた呈色
液の濃度は 19.8mg/dl であるが、濃度を濃くして
も十分利用出来るものと考ええる。

結 論

血清トランスアミナーゼの検量線を検討し次の結
論をえた。

1) 理論的に濃度 1mM の呈色液 (2,4-dinitro-
phenylhydrazine) は基質 (2mM) と pyruvate (2
mM) の含量の 2 倍以上加えるべきである。

2) 1)の方法により pyruvate の量が 0.2 μ M 以上
になつても直線の検量線をうる事が出来る。

稿を終るにあたり、本研究に際し、御懇篤な御指
導と御校閲を賜つた岡山大学理学部桐栄恭二教授、
並びに種々御援助を賜つた宮田晴夫講師、国立岡山
病院富山繁技官に厚く御礼申上げる。

引 用 文 献

- 1) Karmen, A. et al: Clin. Res. Proc., 1, 90, 1953.
- 2) Chinsky, M. et al: J. Lab. & Clin. Med., 47, 108, 1956.
- 3) La Due, J. S. et al: Science, 120, 497,

1954.

- 4) Wreblewski, F. et al: Ann. Int. Med., 43, 345, 1955.

- 5) Wreblewski, F. et al: Ann. Int. Med., 45, 782, 1956.

- 6) Karmeu, A.: J. Clin. Invest., 34, 126, 1955. 8) 新谷和夫 : 臨床病理, 5, 254, 1957.
7) Reitman, S., and Frankel, S.,: Amer. J. 9) 溝部源之 : 山口医学, 7, 596, 1958.
Clin. Path., 28, 56, 1957.
-

On the Standard Curves of Transaminase Activity

Hideo Saikawa

Okayama National Hospital

Author's Abstract

Of late clinical assay of transaminase has gained a greater importance and the methods of the assay are now being studied from various angles. As for making the standard curves there are such methods as that of Reitman and Mizobe's, the latter being very similar to the former, but there still remain problems that need to be solved in these methods with respect to the quantity of 2,4-dinitrophenylhydrazine solution to be added. With the purpose to clarify these points, the author conducted a series of experiments and demonstrated theoretically and clinically that the addition of 2,4-dinitrophenylhydrazine solution in the quantity more than twice the amounts employed by various investigators would yield a perfectly straight line curve in contrast to the available reports where the addition of pyruvate in the concentrations up to 0.3 μ M as reported by Mizobe and others gives a straight line curve but any quantity above that tends to distort the straight line.
