

血 糖 定 量 の 検 討

高桑克子* 船木章悦*
沢部光一* 児島三郎**

I は じ め に

血糖を測定するにあたり、わが国で、現在おもに用いられている血糖（血清糖）測定法を調べた。そのうち代表的なものについて2, 3検討した。

現在、最も真糖に近い測定法と言われている酵素法 Glucose oxidase を用いて、特に採血の条件や測定するまでの条件などについて試験検査を行った結果を述べる。

II 血糖測定法の原理と特徴

A 現在わが国で行なわれている測定法

- 1) Hagedorn-Jensen法 (H—J法)
 - 2) Somogyi-Nelson法 (S—N法)
 - 3) Folin-Wu法 (F—W法)
 - 4) Auto Analyzer法 (AA法)
 - 5) Glucose Oxidase法 (GOD法)
 - 6) α -Toluidine法 (α -T法)
 α -Toluidine-硼酸法 (α -TB法)
(α -Aminodiphenyl法)
 - 7) 百瀬法⁶⁾
- 等である。

1) のH—J法は最も古く(1918年)から使用された方法である。その原理は過剰の酸化剤(赤血塩)による糖の酸化を行ない、余った酸化剤の測定(ヨード測定法)を行なうものである。

この方法は、わが国でも近年まで、日本糖尿病学会で支持されていた方法である。しかし、平田¹⁾も利点として採血の条件や再現性をあげているが、最大の欠点として非糖性還元物もすべて還元される点をあげている。又、滴定法の繁雑さ等から、検査に時間がかかると柴田²⁾は指摘している。これらから、この方法は衰退の一途をたどっている。

還元法の代表的なものとして、2) のS—N法がある。この方法の除蛋白(水酸化バリウム、硫酸亜鉛)は非糖性還元物をほとんど除去出来るというすぐれた方法である。このため、長い間GOD法とならんで真糖に近い標準法とみなされてきたが、除蛋白操作等に段階が

多いことや逆酸化の問題らからバラツキが大きく、操作にも習練を用する点などから、しだいに敬遠されつつある。

3) のF—W法はS—N法と同じ原理であるが、除蛋白試薬(タングステン酸、硫酸)が異なるだけである。この除蛋白法は非糖性還元物を除去できないという難点がある。しかし、石戸谷⁴⁾らはこの方法はS—N法に比べて、試薬調整が容易で手技もやり易く、また尿糖を同時測定出来る点をあげている。

当然、時代の流れとして、4) のAA法は大きな検査室では用いられるようになってきた。AA法にも色々な方法があるが、従来の用手法と異なる大きな点は、除蛋白法としてAA法の透析法を利用することにある。AA法の中のHoffman法を報告している野本⁵⁾らはこの透析法の非糖性還元物への影響はSomogyi除蛋白法と同程度と考えられるとしている。

この方法は短時間に多検体測定出来、再現性も非常に良い、しかし機械のため、管理をよくしないと時として異常値が出て気がつかない場合があるので、常にチェックをして他の方法と併用するのが望ましいと考える。今後、Glucose Oxidase法を用いたAA法の開発が期待される。

5) のGOD法は、Glucose Oxidase (GOD) が β -Glucoseのみ作用するという特異性が早くから知られていたが、現在の比色定量法が確立された(1956)のはGODの純品が得られるようになり、その後いろいろのあゆみをかきながらである。

この方法の問題点は1つは α - β 移行の問題である、しかしGOD中には α 型を β 型に変換する酵素(mutarptase)が入っている所以この移行は完了するものと考えられる。もう1つには妨害因子の問題である。血液(血清)中の共存成分(カタラーゼ、尿素)やGOD中の不純物は反応へ影響を及ぼし、正負の誤差をあたえる。しかし蛋白法を用いることにより、前者は除去出来る。又最近ではすぐれたキット(kit、既成試薬)も出来て酵素標品の一定の品質のものを使用出来るようになった。

他の方法にくらべて少し低い値が出るのではという懸念もあり、いまだ理想的な方法とはいえないが、GOD

* 秋田県衛生科学研究所 成人病科

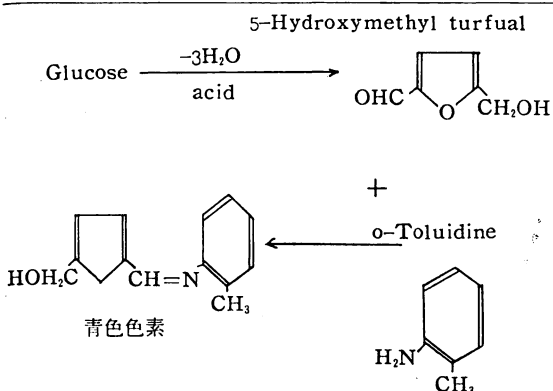
** 秋田県衛生科学研究所

表1の① S-N法, GOD法, o-TB法,

	Somogyi—Nelson法 ³⁾	Glucose—Oxidase法 ⁷⁾⁸⁾⁹⁾
原	Glucose $\longrightarrow$ Gluconic acid $\text{CuO} \longrightarrow \text{Cu}_2\text{O}$ Molybden blue $\longrightarrow$ Acetyl molybdic acid	$\beta\text{-D glucose} \xrightarrow{\text{oxidase}} \text{Gluconic acid}$ O-dianisidine 黄色色素
操	試料 + H_2O + $0.3\text{N Ba}(\text{OH})_2$ * A) 5 g/dl ZnSO_4 遠心又はろ過 上清又はろ液 + Somogyi 銅試薬 * B) 沸騰水浴中 (20~30分) 流水冷却 + Nelson 試薬 + H_2O 比 色 (500~540 $m\mu$)	試料 + 0.33N HClO_4 * D) (又はSomogyi除蛋白法) 遠心又はろ過 上清又はろ過 (0.1 ml) + 糖試薬 * E) (2.5 ml) 37°C 加温 35分 (又は室温放置) + 50% H_2SO_4 (2.5 ml) 比色 (430~480 $m\mu$) 比色 (510~550 $m\mu$) 黄褐色 紅 色
特	- 除蛋白法がすぐれている。 - Fe イオンの影響なし ($\text{Fe}(\text{OH})_3$ として除かれる) ほとんどの非糖性還元物を除去出来る - 除蛋白液の調整保存が困難である。 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 液と ZnSO_4 のバランスがとれないで Zn イオンが多いと加熱のとき Cu_2O の逆酸化がおこる - 再現性が悪い ($\pm 7 \sim 8\%$)	- Glucose oxidase は β 型 Glucose のみ反応するという特異性にすぐれている。 - 再現性が非常によい ($\pm 1\%$, $\pm 2\%$) - 反応の妨害因子が多く正, 負の誤差が組み合った測定値が出てくる。
性	操作段階が多い, Nelson 試薬の加え方 空気中の酸素で逆酸化	従って見かけ上真の Glucose 値を示している。7) 多量の抗凝固剤は使用出来ない。
正常	血 糖 値 60 ~ 100 (mg/dl) 血 清 糖 値 70 ~ 110 (")	50 ~ 95 65 ~ 110

表 1 の②

o-Toluidine-硼酸法¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾



* F)

血清 (漿) + o-TB 試薬 (5 ml)
(0.05 ml)

↓

沸騰水浴中
5 ~ 8 分

↓

流水冷却
(室温放置)
(3 分 ~ 5 分)

↓

比色 (640 mμ)
青色

(試料を全血で行うときは除蛋白を必要とする)

- ・直接法である。微量測定法である。
 - ・迅速かつ簡単である。
 - ・反応機序がわからないため、病氣服薬による関連がわからない。
 - ・再現性が良い。
- しかし、発色後、呈色液は除々に退色するため、一度に多検体は出来ない。

68 ~ 100

70 ~ 118

備考 表 1 の①, ②

* A) 除蛋白試薬の順序をかえると値が低くなる。

試料 + H₂O + Ba(OH)₂ + ZnSO₄ の順序でおこなう。

Somogyi-Nelson 法の試薬の量はいろいろある、文献 3) の表 2、文献 2) を参照のこと。

* B) Somogyi 銅試薬³⁾

(1952 年 M. Somogyi によって改良された新しい試薬 (1 l 溶液中の組成))

Na ₂ CO ₃	24 g	I 液	800ml	使用前に混和
ロツシエル塩	12 g			
NaHCO ₃	4 g			
Na ₂ SO ₄	144 g	H ₂ O	200ml	
Na ₂ SO ₄	36 g			
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5 g			
		II 液		

* C) Nelson 試薬²⁾

(NH₄)₂ MoO₄ 25 g を H₂O 450 ml にとかす、
ここに濃 H₂SO₄ 21 ml 滴下…………… I 液
Na₂HAsO₄ · 7 H₂O 3 g (or KH₂AsO₄ 1.8 g) を H₂O 25 ml にとかす…………… II 液
I 液に II 液を加え、38°C に 2 日放置後使用

* D) 0.33M HClO₄

試料と HClO₄ の割合は常に一定にしておくこと (1 : 10)
高濃度の時は呈色液を等量の 50% グリセリンで希釈して測定値を 2 倍にする

* E) 糖試薬 (Farb-Test を用いた時⁸⁾)

I 液 : 0.10M phosphate buffer, P.H.7.0
: 40 μg POD/ml 250 μg GOD/ml (3 週間安定)
II 液 : 6.6 mg o-dianisidine hydrochloride/ml (6 週間安定)
I, II 液を使用前に 100 : 1 に混合 (数時間安定)

* F) o-Toluidine 硼酸試薬

表 2 を参照

みの特異性と再現性の良さ、さらに簡便性を加え、日常法として注目をあびてきた。

同じ頃から、6)のo-T法が迅速測定法として知られていた。わが国にも玄番ら¹⁰⁾によって紹介されたが、純度の高いo-Toluidine (o-T)の入手難から、あまり利用されなかった。その後、佐々木 (匡秀)¹¹⁾は硼酸を添加し、感度の増加をはかり、又直接法にすることにより、この方法は超微量簡便法として確立された。この方法は呈色液の退色という難点はあるが、操作が簡単なことから、キットとしても多くの会社から売りだされ、最近特に、日常検査法として急激な利用度を示めている。

B S-N法, GOD法, O-TB法について

それぞれの方法に一長一短があるが、測定にあたり、代表的なもので現在なお利用されている方法について、表1に原理、測定法、特性についてまとめた。

AA法については、設備が必要なことと又機種により異なるため、今回ははぶいた。

C 解 説

私たちは実用的な面から迅速性のo-TB法、中でも改良されたo-TB法、真糖と言われているGOD法を検討してみた。

1 o-Toluidine-硼酸法

この定量法において、o-T濃度が高いほど感度が良いが発色後の呈色液の退色も非常に早いという難点があるこのため、o-Tの濃度をビリルビンの影響をうけない程度(最低濃度5%)に下げることにも必要になってくる。又、現在o-TB法として知られている方法や、ほとんどのキットの方法は溶血の影響を受ける。それは安定剤にチオ尿素を用いているためと考えられる。このチオ尿素は一部チオシアン酸アンモニウムとなり、Feイオンと反応してチオシアン酸鉄錯塩体になり、640mμにおいて本反応を阻害する。

内田¹⁵⁾は、Feイオンのマスキングのため、Ethene diamine tera acetate acetic acid(EDTA)を用いたら、これはチオ尿素の代りにo-Tの安定剤にもなり、溶血の影響も妨ぐことが出来たと報告している。又、同著者¹⁴⁾は、FeイオンはSomogyi 除蛋白法によつての

表2 o-T B 改良法の比較

	o-T B 法 ^{12) 13)}		o-T B 改良法 ¹⁵⁾	
	I		II	III
(試薬)				
水 酢 酸	920ml	このの 1.5g } 960ml 80ml } 40ml	950ml	このの 100ml } 960ml 30ml } 40ml
チ オ 尿 素 *1	1.5g		—	
メチルセルソルブ *2	—		50ml	
o-Toluidine *3	—		—	
飽和硼酸水溶液 *4 (6%)	—		40ml	40ml
E D T A *5	—		1g	0.5g
o-Toluidine 濃度	7.7%		4.8%	2.9%
最大発色加温時間	5分(8分) *6		7分	9分
呈色液の退色	室温ではかなり顕著である、流水中でいくらか防げる		やや遅くなる、15分でほぼ安定する	ほとんどなし
試薬の安定性	半年以上		半年以上	1ヶ月(氷室)しだいに褐色おびる
Fe (Ⅲ) の影 響 (溶 血 血 清)	Hb濃度 100mg/dl 6% } 低値を示す 500mg/dl 10.3% }		いずれも 0.5%以下の低値	
ビリルビンの影響	20mg/dlまで		20mg/dlまで	

* 1 o-Toluidineの安定剤として使用している。
* 2 o-T濃度を下げるとビリルビンの影響をうけるのでそれを防ぐため感度の増すために使用。
* 3 内田孝夫は片山化学G, Rを使用している。
* 4 飽和溶液で5%が最も発色度が良いが4%となっている。
* 5 Fe (Ⅲ) のマスキングとo-Tの安定剤として使用、この添加濃度は改良試薬1ℓにつき、0.5g, 1.0g, 2.0gで吸光度に差なしとされている。²⁵⁾
* 6 最大発色加温時間は5分だが強すぎるため、実際の測定には少し吸光度のおちた8分を使用している。¹²⁾¹³⁾

表3 同時測定検体数による血糖値の違い
(平均値, mg/dl)

	o-TB法Ⅰ	o-TB法Ⅱ	GOD法
A	94	90	92
B	80	86	92

*A: o-TB法Ⅰ), Ⅱ) とともに, 10本ずつ加熱, 冷却, 比色の繰返し操作した。

B: 25本同時に加熱, 冷却, 測定は順次行った。
o-TB法Ⅰは和光キット血糖測定用OTB-試液を使用した。

GOD法はベリンガーハイハム社 Blood Sugar-Testを使用した。

除くことが出来ると報告している。この点でもS-N法はすぐれているといえる。

表2に, 佐々木(禎一)¹²⁾の報告している現行のo-TB法(Ⅰ)と内田¹⁵⁾の報告しているo-TB改良法(Ⅱ, Ⅲ)とを比較してみた。

私たちは和光のキットを利用してⅠの方法と, EDTAを入れたⅡの方法について検討してみた。結果的には, 残念なことにo-Tの純度の高いものがえられなく, 試薬が長もちしないため, くいしい検討は出来なかった。

o-TB法において, 同時にどのくらいの検体数を出来るかを行ってみた。表3のように, Ⅰの方法ではo-T濃度が高いため退色が早く, 一度には少数体しか出来ない。

しかし, Ⅱの方法では, 呈色液の退色はブドウ糖値の15分値で平均4.5%の低下, 30分値は15分値とほぼ同一(±1%程度の差), 60分値は30分値と同一の値を示した。

これら呈色液の退色については, 発色後の温度条件等を改良することにより, 日常検査には充分利用出来ると考え, 今後も検討してみたいと考えている。

2 Glucose Oxidase法

試薬の管理の点から, Blood Sugar-Test—酵素の血糖測定法—(Farb-Test, Boehringer-Mannheim GMBH製, 山之内製薬販売)を用いた。

除蛋白試薬は, Somogyi 除蛋白法がすぐれていると考えられるが, 実用的な面から, 0.33M 過塩素酸溶液を用いた。北村ら⁷⁾はGOD法における過塩素酸除蛋白による値と Somogyi 除蛋白による値は同一値が出たと報告している。この除蛋白液は特に全血の時, 血液を入れたらただちによく混和しないと, かたい凝集塊が出来て, バラツキの原因になるため注意を必要とする。又, 除蛋白液と試料の比率は, 特に全血の時に変えない方がよいとされているが,^{7) 8)} そののちの操作はキットの説明書の半量法で行うことが出来る。

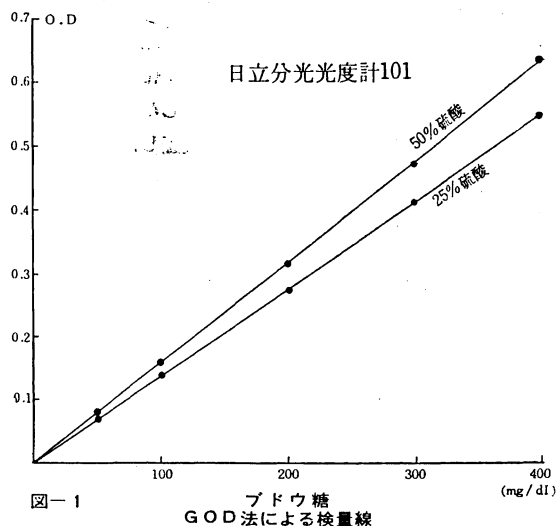


図-1

—25%硫酸用いた場合と50%硫酸用いた場合—

発色は室温でも良いとされているが⁷⁾, 37°C 35分にておこなった。この時間は±5分以内では, 血糖値には差がなかった。

糖試薬を加えたのちの黄褐色呈色体は, 長時間の安定性に欠けるが, 硫酸を加えることによって, 長時間安定であるとされている。^{7) 8) 9)} 私たちの測定でも, 非常に安定で, 50% H₂SO₄添加で15時間後でさえも, 吸光度の低下は1%以内であった。従って, 標準液も同時に行った場合は長時間放置出来る。

又, 25%硫酸でなく, 50%硫酸を使用したのは, 前者では血糖(血清糖)値が高い時, 発色しきれないためである。

この方法の精密度はきわめて良く, 北村ら^{7) 9)}と同じく, 私たちの研究室でも, 同時重複測定法によるバラツキは±1%前後におさまった。全血の時, 少し劣るが日差変動も2~3%前後におさまった。このように再現性は非常に良い。

正確度の点では, キットの標準液をいくつか同時測定すると, 再度検査しても同一値のものもあるが, 5%前後異なる値のものも出た。そこで, 私たちは第一化学のブドウ糖標準液(10mg/ml)を希釈して用いたら, キットのその値より, 3~9%位高く出た。

キットの標準液を使用すると, コントロール血清(ハイランドの正常コントロール血清, ケムトロール)値は, ほぼ範囲内におさまる。しかし, 第一化学の標準液より作ったのでは, コントロール血清値は, ハイランドコントロール血清(80~92mg/dl)が平均77mg/dl, ケムトロール(184~190mg/dl)が平均175mg/dlと低値に出る。

和光の無水ブドウ糖（特級）を用いて標準液を作ってみたが、ほとんど第1化学の標準液値に近い値が出た。そこで私たちは再現性の良さから、第1化学のブドウ糖標準液を希釈して作った標準液を使用した。

毎回、100mg/dℓの標準液を用いて検査し、計算からブドウ糖値を出した。糖の呈色は測定条件によって変わるで、毎回標準液を立るべきである。

Ⅲ 採血の条件と試料の保存について

A 採血の条件

1 動脈血（毛細管血）と静脈血

私たちはすべて静脈血でおこなった。

毛細管血すなわち耳染血による血糖値は動脈血の血糖値とよく一致するところから、動脈血血糖値とみなされる。

動脈血の血糖値は、静脈血の血糖値よりも高く出る、この差（動静脈較差、arteio-venous difference）は空腹時で小さく、ブドウ糖摂取後では大きい。この差は日本糖尿病学会の判定基準値¹⁷⁾では100g 負荷試験で空腹時で0、1時間で20mg/dℓ、2時間値で10mg/dℓ、50g 負荷試験では空腹時は0、1時間値は20mg/dℓと同じで2時間値は0～10mg/dℓとなっている。

2 全血と血清（漿）

私たちは全血の場合は、採血後ただちに除蛋白をし、血清の場合もただちに遠心分離をし、7分位でほとんどの血球と血清（漿）を分離した。この時血清糖値は、全血による血糖値よりも、GOD法において15%～19%程度高く出た。この差は玄番³⁾や石渡¹⁶⁾の報告では10%前後とされている。これも測定法によって異なるようである。

血清と全血のブドウ糖量の差は両者の水分量の差によるともいわれている。

B 試料の保存

1 血糖（血清糖）値の経時変化

血糖を測定するにあたり、まず問題なのは解糖作用である。

解糖作用を阻止するためには、

1) ただちに除蛋白する。2) すぐに分離して血清（漿）にしてしまう、3) 解糖阻止剤を入れるかである。

a 全血の場合

血糖の解糖速度は解糖阻止剤無添加（ペパリンのみ添加）で、はじめの血糖値に関係なく、25°C（室温）で毎時平均8mg/dℓ、15°Cでは毎時平均2.5mg/dℓと百瀬⁶⁾石渡¹⁶⁾、柴田¹⁸⁾によって報告されている、この作用は解糖阻止剤をある一定量以上添加すると、一定程度におさえられるが、完全におさえられないのは、フツ化ソーダ等でエノラーゼを阻害してもその段階まで解糖が進むからである。

従って、私たちは全血の場合、解糖作用を阻止するために、採血直後、採血者のそばにてただちに除蛋白をすることにした。この点からも、過塩素酸除蛋白液は適していると言える。

b 血清（漿）の場合

私たちは、血清分離するまでの時間内におきている解糖作用で、血清糖値がどのように変化しているかをGOD法で調べた。（図2）

この結果から、全血の時の報告と同じく、血清糖値の平均低下は、室温に無添加で血液を放置後遠心をかけた時、毎時7mg/dℓ位であった。又、解糖阻止剤としてフツ化ナトリウム（4mg/血液1ml）とシユワ酸カリウム（2mg/血液1ml）を添加して血液を放置後分離した方は、初め30分ないし60分までは同程度の低下率を示すがその後、低下速度が劣る。

採血直後では、解糖阻止剤無添加の方が添加したものよりわずかに高く出た。これはGODがシユワ酸カリウムの影響を受けるためとされている¹⁶⁾が、私たちの研究室ではO-TB（Ⅱ）を用いて同一検査を行ったが同様な結果が出た。

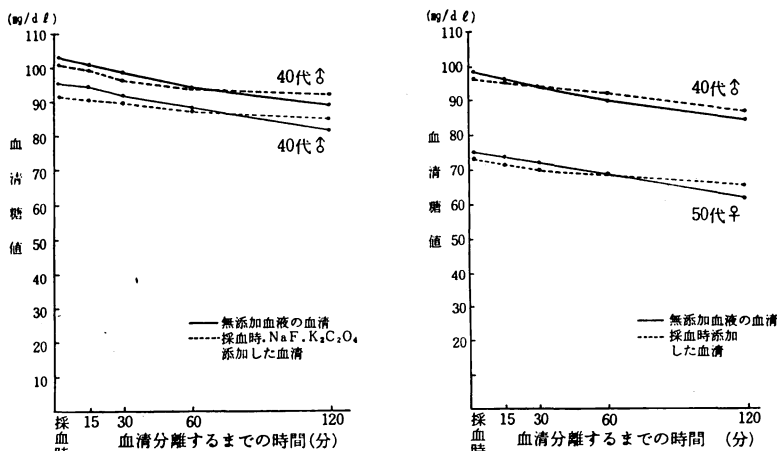


図-2 血清分離する時間による無添加と採血時解糖阻止剤添加した血清の血清糖値の変化—GOD法—

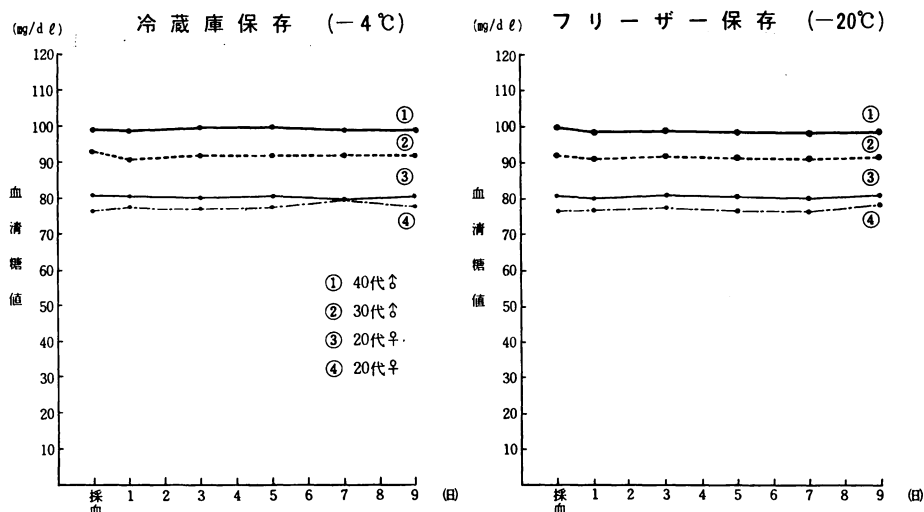


図-3 血清保存中の血糖値の変化 —GOD法—
冷蔵庫保存とフリーザー保存した血清は同時採血を分けて使用

結果としては、血液の損失はみられるが、ただちにすくなくとも15分~30分以内に遠心分離して血清にするのが望ましい、遠心操作がすぐ出来ない時は、解糖阻止剤を入れた方が、血糖値の低下は防げる。

図3は、冷蔵庫中と、フリーザー中に血清を保存した場合の採血日から9日間の経過である。その差は最も大きいところで3%位であった。従って、血清糖値は採血後、分離してしまうと冷蔵庫、フリーザー中どちらも安定である。

2 ろ液の保存

無添加の全血、解糖阻止剤添加した血漿、血清、いずれも室温中において、過塩素酸を加えた状態で、3、4時間放置しておいても血糖値は低下しなかった。

又、ろ過してからろ液か、遠心して上清にしてみると、冷蔵庫保存で、それぞれについて5日間血糖(血清糖)検査を行ったが、変化なかった。

IV おわりに

o-TB法、特にEDTAを入れた方法は純度の高いo-Toluidineを求め、日常検査に使用出来るようにしていきたいと考えている。

GOD法を用いて、諸問題の検討と、日常検査を行ったが非常に再現性が良く、バラツキがなかった。この点からも前者の方法の管理目的に併用してはという私たちの考えを確実なものにした。

(この稿を終るにあたり、御協力を賜った秋田脳血管センター検査科飛田穂積技師に謝意を表わします。)

文 献

- 1) 平田幸臣: Hagedron-Jensen 法, 臨床病理, 特集号15, 3—10 (1968)
- 2) 柴田 進: 分析ライブラリー 3, 臨床化学分析Ⅲ 第1版, 東京化学同人, 血糖, 1—11 (1966)
- 3) 玄番昭夫: Somogyi-Nelson 法, 臨床病理, 特集号15, 11—20 (1966)
- 4) 石戸谷豊, 橋本一夫, 伊藤忠一, Folim-Wu法, 臨床病理, 特集号15, 78—84 (1968)
- 5) 野本昭三, 金井正光: Auto Analyzer法, 臨床病理, 特集号15, 21—34 (1968)
- 6) 百瀬 勉, 大倉洋甫: 百瀬法, 臨床病理, 特集号15, 64—70 (1968)
- 7) 北村元仕: Glucose Oxidase 法, 臨床病理, 特集号15, 35—44 (1968)
- 8) ベーリンガー・マンハイム社 Blood Sugar-Test 使用説明書(日本語版)
- 9) 北村元仕, 深谷順子: 分析ライブラリー 3, 臨床化学分析Ⅲ, 第1版, 東京化学同人, 血糖, 16—20 (1966)
- 10) 玄番昭夫, 谷中誠, 小田喜君代, 近藤弘司, 臨床病理, 11, 116—119 (1963)
- 11) 佐々木匡秀: オルトトルイジン—硼酸法による血糖超微量定量法, 臨床病理, 12, 434—437 (1964)
- 12) 佐々木禎一: o-Toluidine を用いる 血糖の簡易定量法, 臨床病理, 特集号15, 45—54 (1968)
- 13) 和光純薬工業株式会社: o-TB—試薬使用説明書
- 14) 内田孝夫: o-Toluidin—硼酸法による 血糖測定におよぼす第2鉄イオンの影響について, 臨床病理, 19,

704—706 (1971)

15) 内田孝夫：o-Toluidineを用いる血糖定量法について，臨床病理，19，869—871 (1971)

16) 石渡和男：糖尿病，血糖検査，診断と治療，45(9) 1578—1584 (1970)

17) 葛谷信貞，他：糖負荷試験における糖尿病診断基準委員会報告，糖尿病，13，1—7 (1970)

18) 繁田幸男：血糖測定法と血液保存の問題，日本医事新報2493，161 (1972)