

## b. ALPのIFCC法

本法は、4-NPP, 4-NPなどの試薬規格を定め、至適条件と測定操作などに詳しい検討が行われ、標準法として勧告された (IFCC Document 1981, IFCC method for ALP. 中甫: Medical Technology, 10: 415, 1982 参照)。

**【試薬】** 試薬作製用の水はすべて滅菌精製水を使用する。

① **金属イオン緩衝液** (HEDTA 112.2 mmol/l,  $Zn^{2+}$  56.1 mmol/l,  $Mg^{2+}$  112.2 mmol/l): 約 70 ml の精製水に 4.266 g の HEDTA (*n*-hydroxyethyl ethylenediamine triacetic acid) を溶解し、次に  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1.613 g を加え完全に溶解する。 $Mg$  ( $C_2H_3O_2$ )<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 2.407 g を混和しながら完全に溶解し、精製水で正確に 100 ml とする。2~6°C で最低 3ヵ月安定。

② **AMP-金属イオン緩衝液** (AMP 0.393 mol/l, HEDTA 2.24 mmol/l,  $Zn^{2+}$  1.12 mmol/l,  $Mg^{2+}$  2.24 mmol/l, pH<sub>30°C</sub> 10.40±0.05): AMP は完全に液状になるまで 37°C で加温する。AMP (2-amino-2-methyl-1-propanol) 17.52 g を約 400 ml の精製水に溶解して混和する。1.0 mol/l HCl を加えて 30°C で pH 10.4 に調整する。よく混和しながら、10.0 ml の試薬①を加え、1.0 mol/l HCl を用いて 30°C で pH 10.40±0.05 に調整する。精製水で 500 ml まで希釈し、蓋をして CO<sub>2</sub> の吸収を防ぐ。2~6°C で最低 3ヵ月安定。

③ **179.5 mmol/l 4-NPP 溶液**: 4-nitrophenyl phosphate (2Na 塩-6H<sub>2</sub>O, M. W. 371.2) 0.666 g を約 8 ml の精製水に溶解し 10.0 ml とする。この試薬は用時調製する。2~6°C で最高 8 時間安定。

④ **1.0 mmol/l 4-NP 保存液**: 約 400 mg の高純度 4-nitrophenol を 10 ml ビーカーにとり、50°C のオープンに 24 時間入れ、その後デシケーター中で 2 時間放冷する。吸湿しないよう可及的速やかに 139.1 mg 秤量し精製水で溶解して 1,000 ml とし、よく混和する。光、蒸発をさければ最低 3ヵ月安定。

⑤ **0.04 mmol/l 4-NP-AMP-金属イオン緩衝液**: 検定済ホールピペットを用いて正確に 10.00 ml の試薬④を 250 ml メスフラスコにとり、試薬②で標準線まで満たし、よく混和する。この溶液を 10 mm キュベットに入れ 30±1°C, 波長 405 nm で測定法と同じ機器および波長半値幅を用いて、試薬②をブランクとして吸光度を測定する。この実質吸光度を ALP 活性の計算に使用する。試薬④, ⑤は少なくとも 2 回調製し、吸光度の測定はそれぞれ三重測定を行う。すべての読みは平均に対して 1% 以内の誤差でなければならない。

⑥ **基質-緩衝液**: 10 容の試薬②と 1 容の試薬③を混和し測定に用いる。2~6°C で最高 5 日間安定。-20°C に 1 回の必要量を保存しておけば、1 回のみ融解では最低 3ヵ月安定。

**【測定装置】** 測定波長 405±1 nm, 波長半値幅 ≤ 2 nm, 光路長 10±0.01 mm, 測定温度 30±0.1°C, サーモスタットキュベット付き

**【実施】** ① キュベットに基質-緩衝液 2.50 ml をとり 3~5 分間加温したのち、試料 50 μl を加えて混和し、反応を開始し、300 秒間吸光度変化を連続計測して ΔE<sub>A</sub>/分を求める。

② ①と同様にして、試料の代わりに精製水 50 μl を加えて試薬ブランクの ΔE<sub>B</sub>/分を測定する。ΔE<sub>A</sub>/分-ΔE<sub>B</sub>/分=ΔE/分を求める。

**【計算】** ALP 活性 (U/l) =  $\frac{\Delta E/\text{分}}{\epsilon} \times \frac{V}{v} \times 10^6$

ε: 4-NP の分子吸光係数, v: 試料量 (ml), V: 反応液量 (ml)

**【注】** ① ALP 活性単位は IFCC では kat (カタール) を使用しているが、まだ普及していないから、国際単位 (U) の計算法を記した。両者の関係は

$$1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s} = 60 \text{ mol/分} = 60 \times 10^6 \mu\text{mol/分} = 6 \times 10^7 (\text{U})$$

$$1 \text{ U/l} = \frac{1}{60} \mu\text{kat/l} = 16.67 (\text{nkat/l})$$

② IFCC の報告では ε=18.560±170 であり、本法の v=0.05 ml, V=2.55 ml であるから、ALP (U/l) = (ΔE/分) × 2,748 として計算できる。本法では 800 U/l までの試料で、300 秒間一定速度を示す。

③ 反応混液の終濃度は AMP 0.35 mol/l, 4-NPP 16 mmol/l, HEDTA 2 mmol/l, Mg ( $C_2H_3O_2$ )<sub>2</sub> 2 mmol/l,  $ZnSO_4$  1 mmol/l である。なお、IFCC 法では ALP 活性化剤として  $Mg^{2+}$  のほかに  $Zn^{2+}$  を加え、これらのイオン緩衝作用を保持させるために、キレート剤の HEDTA を使用している。