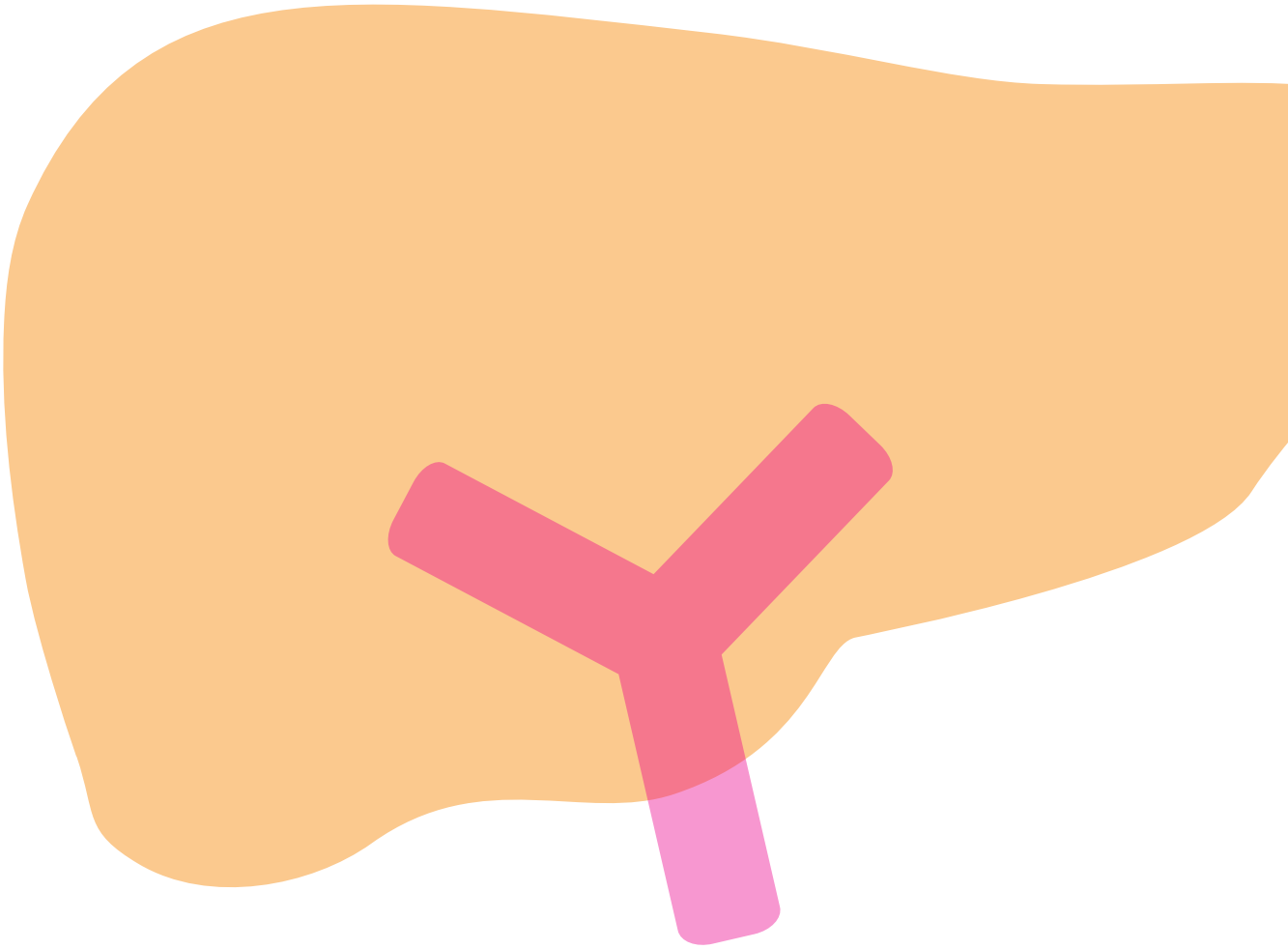
serotec

Cholinesterase



ChE 測定法のガイド

JSCC 勧告法と正確な測定値の確認方法

目次

I.　コリンエステラーゼ（ChE）.....2
1.　コリンエステラーゼ（ChE）とは.....2
2.　臨床的意義.....2
3.　生理的変動.....4
4.　測定に影響を及ぼす因子.....4
5.　測定値の変動に関するピットフォール.....4
1)　ChE 測定値が前回値の半分以下になった場合.....4
2)　ChE 測定値が「0U/L」になった場合.....4
II.　ChE 活性測定法.....6
1.　ChE 活性測定法の変遷.....6
2.　ChE 測定法の種類と特徴.....7
3.　日本臨床化学会による ChE 測定の標準化.....7
4.　JSCC 勧告法、JCCLS-SOP 法.....8
5.　「セロテック」ChE－ML.....9
6.　「セロテック」ChE－ML の試薬組成.....9
III. トレーサビリティ.....10
1.　ChE 活性測定のトレーサビリティ.....10
2.　正確さの伝達.....10
3.　不確かさ.....11
IV.　「セロテック」ChE－ML　オンボード安定性.....12
V.　参考文献・資料.....13

I. コリンエステラーゼ（ChE）

1. コリンエステラーゼ（ChE）とは

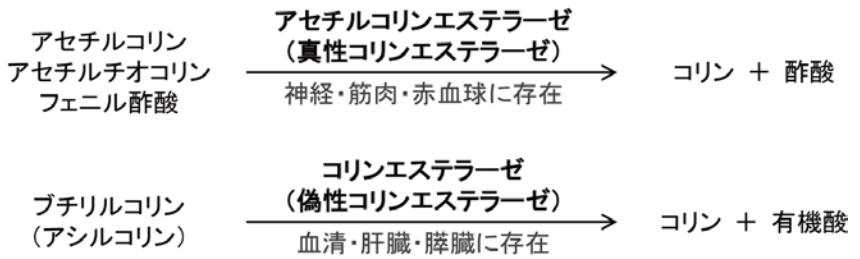
コリンエステラーゼはコリンエステルを加水分解する酵素です。生体中にはアセチルコリンエステラーゼとコリンエステラーゼ（ChE）の 2 種類のコリンエステラーゼが存在し、それぞれ反応する基質に違いがあります（図 1）。

アセチルコリンエステラーゼは神経、筋肉、赤血球などに存在し、神経伝達物質であるアセチルコリンを分解します。ChE は血清、肝臓及び膵臓に多く存在しブチリルコリンを分解しますが、その生理的役割はまだよくわかっていません。検査では ChE の活性を測定しています。

▸アセチルコリンエステラーゼ：Acetylcholine acetylhydrolase（EC 3.1.1.7）
特異的コリンエステラーゼ、真性コリンエステラーゼとも呼ばれる。

▸コリンエステラーゼ：Acylcholine acylhydrolase（EC 3.1.1.8）
アシルコリンエステラーゼ、非特異的コリンエステラーゼ、偽性コリンエステラーゼ、pseudo cholinesterase(シュードコリンエステラーゼ)とも呼ばれる。

■図 1　生体中のコリンエステラーゼの反応



2. 臨床的意義*1

*1
▸参考文献 1）臨床検査法提要改訂第 34 版 p.568

血清 ChE は肝で生成されるため、肝機能検査の 1 つとして重要です。また、ChE 阻害薬使用時や有機リン中毒などの診断､治療上にその測定が不可欠です。

他にも先天性の血清 ChE 活性低下または欠損症が知られています。

＜高値＞

ネフローゼ症候群、肥満、高脂血症、脂肪肝、糖尿病、甲状腺機能亢進症 など

＜低値＞

肝障害（肝硬変、肝細胞がん、劇症肝炎）、低栄養、敗血症、有機リン製剤中毒の診断　など

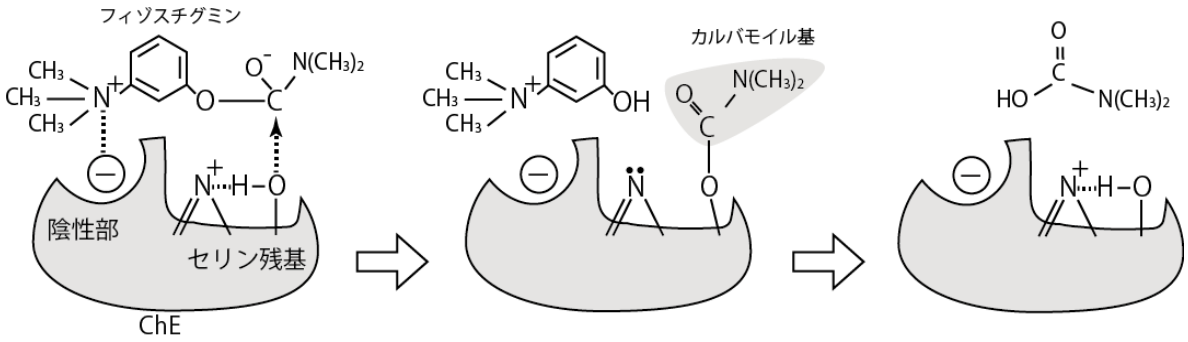
コリンエステラーゼ阻害のしくみ

ChEは排尿障害や認知症などの治療薬として使用されるChE阻害薬（カルバミン酸誘導体：フィゾスチグミン、ネオスチグミン、ピリドスチグミン、ジスチグミンなど）によって阻害される他、各種の有機リン製剤（農薬として使用されるスミチオン、ダイアジノンなどや神経ガスのサリン）によっても不可逆的に阻害を受けます。

カルバミン酸誘導体はChEをカルバモイル化し、有機リン製剤はChEのセリン残基の水酸基をリン酸化して阻害します。カルバミン酸誘導体による阻害は自然回復が早く、可逆的な阻害に思われがちですが、酵素学的には不可逆的阻害です。

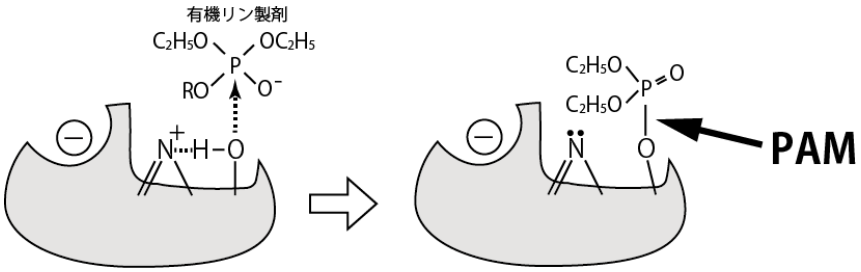
ChE阻害薬に対する再賦活化剤としてはアトロピンやPAM（プラリドキシムヨウ化メチル）があります。

ChE 阻害薬による ChE 阻害模式図



カルバモイル化されたセリン残基は自然回復する

有機リン製剤による ChE 阻害模式図



PAM はセリン残基からリン酸基を除去することで ChE の活性を再賦活化させる

3. 生理的変動

血清 ChE は個体差が大きく、年齢や性別によっても異なります。新生児では成人の 65%程度ですが、数週間くらいで成人の約 1.3 倍まで上昇します。その後は成人値と同等になり、さらに加齢と共に低下します。

女性では性周期に伴う増減が認められ、月経時に減少します*[2]。

*2
▸参考文献 1)臨床検査法提要改訂第 34 版 p.568

4. 測定に影響を及ぼす因子

フッ化ナトリウム入りの採血管で得られた血漿中の ChE の測定値は低値を示します*[3]。

ChE は室温（16～30℃）保存の場合 1～3 日、冷蔵（2～10℃）で約 1 ヵ月、凍結（－20℃以下）保存の場合、3 ヵ月間安定です*[4]。

ゴキブリなどの害虫処理のために検査室内で殺虫剤（有機リン剤など）を散布した場合、分析機器、使用器具、あるいは検体が汚染されて測定値が低下する事例が報告されています。そのため検査室内で殺虫剤を散布する際には、関連機器等をビニールで覆うなど特に注意が必要です*[5]。

*3
▸社内データ

*4
▸参考文献 2)検査と技術 Vol.40 No.8 p.756

*5
▸参考文献 3)Medical Technology Vol.29 No.13 p.1533

5. 測定値の変動に関するピットフォール

1) ChE測定値が前回値の半分以下になった場合

白血病や胃がん、膵がん、肝がんなどの治療に使用される抗がん剤のシクロホスファミドを投与された患者検体で、他の検査項目に異常がなく、ChE の測定値が前回値と比較して半分以下になる事例が報告されています。通常、ChE の測定値は肝臓の蛋白合成能を表し、血清アルブミン濃度と連動しますが、ChE の値だけが低値を示しました。報告によると、シクロホスファミド、あるいはその代謝物が ChE に結合して活性を阻害しており、PAM を検体に添加すると ChE 活性が 200%以上再賦活化する*[6] とのことです。また、シクロホスファミド投与翌日より投与量に関係なく急激に低下*[7] するそうです。

前回値と比較し 50%以下となる様な急激な低下が見られた場合には、この薬剤の投与の有無を確認してみてはいかがでしょうか。

*6
▸参考文献 4)第 51 回東北医学検査学会 2010 抄録, 一般演題 47 p.80

*7
▸参考文献 5)第 52 回東北医学検査学会 2011 抄録 , 一般演題 98,99 p.105-106

2) ChE測定値が「0U/L」になった場合

ChE 測定値が異常に低値であった場合、まず、他の項目の変動がないかどうか、特に血清アルブミン濃度に異常がないかどうかを確認します。他の項目に異常がなく、ChE 測定値が低値の場合は次の 2 つのことを考えます。

① **ChE の活性が阻害されている場合**

前述の農薬や殺虫剤などの有機リン製剤を摂取した場合、ChE の活性が阻害され、値がゼロに近くなることがあります。また、排尿障害や重症筋無力症、認知症などの治療に使用される ChE 阻害薬によって低値となることがあります。このように体内で ChE の活性が阻害されて低値を示す場合には、めまいや嘔吐、呼吸困難などの臨床症状が現れていることが予想されます。臨床症状と検査結果が一致しない場合は、採血後の検体に ChE 活性を阻害する殺虫剤などの混入が疑われます（p.4 4.測定に影響を及ぼす因子　参照）。

② **遺伝性低 ChE 血症である場合**

遺伝性低 ChE 血症は、日本人では約 200 人に 1 人の割合で存在するとされ、参考基準値平均の 1／3 程度を示します。さらに数万人に 1 人程度とされる遺伝子型の場合は、測定値がゼロであるような極端な低値を示す*8 ことがあります。臨床所見および他の肝機能検査で異常が見られない場合は、遺伝性低 ChE 血症であることが考えられます。

*8
▸参考文献 6）臨床検査 Vol.59 No.11 増刊 p.1200

このような 2 つの状況を見分けるために、ChE の活性を阻害する物質が検体に含まれているかどうかを、検体と既知活性の試料（コントロールやキャリブレータ）を等量混合して測定を行い確認します。既知活性試料の 1／2 の活性値が期待値となります。期待値を下回る場合は検体中に ChE の活性を阻害する物質が存在し、期待値を得た場合は阻害する物質が存在せず、ChE 活性が低い状態であることがわかります。

II. ChE 活性測定法

1. ChE活性測定法の変遷

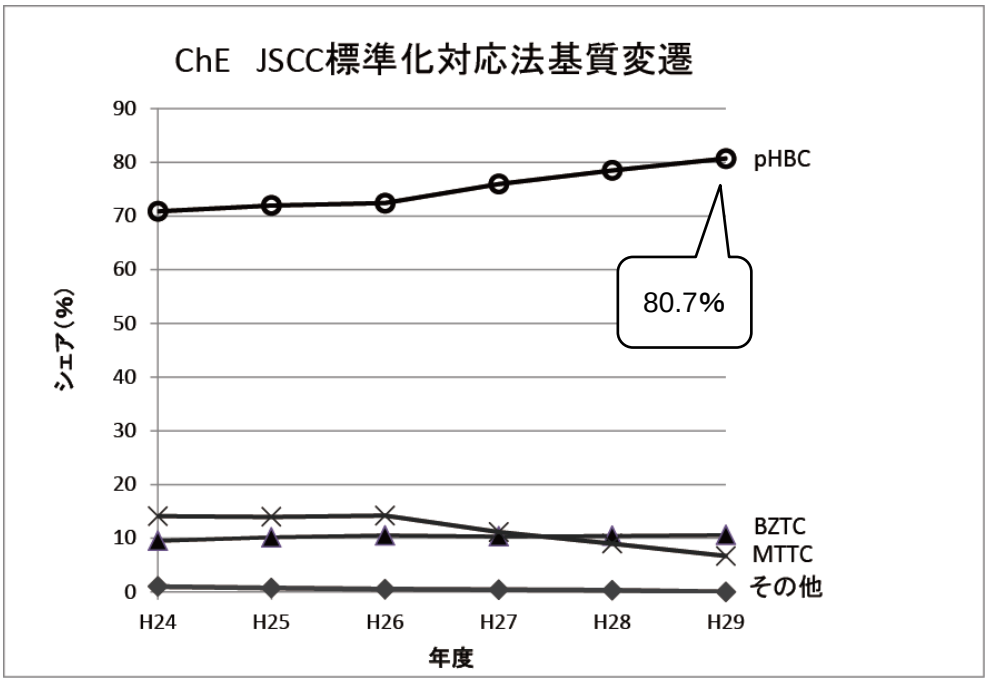
日本では長い間、柴田-高橋法（ΔpH 法）が主流でした。この方法は、検量線が比例的ではないため直線範囲が狭く、酵素活性を国際単位で表現できない、といった問題を有していました。

そこで、問題を解決するべく多くの合成基質が開発されました。ChE の特異基質としてベンゾイルコリンを用いる方法（Kalow 法）は、基質阻害がかかることと、汎用の自動分析装置では対応できず普及には至りませんでした。

その後、ChE の基質として各種のチオコリンエステルを用い、チオコリンエステルが分解されて生じたチオコリンの SH 基を測定する方法が普及していました。

現在は p-ヒドロキシベンゾイルコリン（pHBC）を用いる方法が主流となっています。日本臨床検査技師会精度管理調査のデータから、基質の変遷を図 2 に示しました。

■図 2　ChE JSCC 標準化対応法基質の変遷*9



▸柴田-高橋法(ΔpH 法):
アセチルコリンを基質とし、アセチルコリンが ChE で分解されて生じる酢酸により反応液の pH が変化することをフェノールレッドなどの pH 指示薬を用いて捉える方法。反応の特異性に問題があった。

▸Kalow(カロウ)法:
基質としてベンゾイルコリンを用い、ChEによって基質が分解されて減少する 240nm での吸光度を追跡する方法。波長が自動分析装置で対応できず普及しなかった。

*9
▸参考文献 9）平成 29 年度日本臨床検査技師会精度管理調査臨床化学（資料）

2. ChE測定法の種類と特徴

現在、JSCC 標準化対応法として販売されている主な 3 種類のコリンエステル基質法の特徴を表 1 に示します。

■表 1　ChE 測定方法と特徴

測定方法	ベンゾイルチオコリン（BZTC）基質法
特　　徴	・紫外部測光のため、生体色素の影響を受けにくい。 ・基質阻害がかかる。 ・直線性能が低い。
測定方法	5-メチル-2-テノイルチオコリン（MTTC）基質法
特　　徴	・直線性能が低い。
測定方法	p-ヒドロキシベンゾイルコリン（pHBC）基質法
特　　徴	・直線性能が優れている。 ・反応系が複雑。 ・紫外部測光のため、生体色素の影響を受けにくい。

ChE による加水分解で生じるチオコリン中の SH 基を定量する BZTC 基質法と MTTC 基質法では、検体中の SH 基を含有する物質（アルブミンなど）との非特異的反応が懸念されています。また、これらの測定法では直線性能が低いという問題点を有しています。特に、これらの測定法（x 軸）と異なる測定法（y 軸）で相関性を比較した場合、直線性能の優れた試薬に y 切片が生じてしまい、あたかも非特異的な反応があるような誤った判断をさせる場合があります。

3. 日本臨床化学会によるChE測定の標準化

2003年に日本臨床化学会(JSCC)が、p-ヒドロキシベンゾイルコリン(pHBC)を基質とする ChE 測定の勧告法を発表しました。

日本臨床検査標準協議会（JCCLS）は、2006 年 5 月に「JCCLS による酵素活性測定の標準操作法（SOP）（Ver1.0）コリンエステラーゼ（ChE）」（JCCLS-SOP 法）を公表しました。この方法によって、現在 JCCLS は標準物質である常用参照標準物質：ChE（JCCLS CRM-002）に ChE の認証値を表示しています。

▸日本臨床化学会(JSCC):
The Japan Society of Clinical Chemistry

▸日本臨床検査標準協議会(JCCLS):
The Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards

4. JSCC勧告法、JCCLS-SOP法

JSCC 勧告法の試薬組成は以下のとおりです。JSCC 勧告法と JCCLS-SOP 法の試薬組成は同一です。

①試薬組成

第一試液（R－1）		第二試液（R－2）	
Tris Maleate Buffer	62.0 mmol/L	pHBC	6.2 mmol/L
FAD	2.5 μmol/L		
BSA	0.25 %		
pHBH	1.12 U/mL		
NADPH	0.25 mmol/L		
PCO	0.47 U/mL		

［R－1：R－2＝5：1 混合反応時 pH8.0±0.1（37℃）］

②測定原理

（第一反応）ChE は基質である p-ヒドロキシベンゾイルコリン（pHBC）を加水分解し、p-ヒドロキシ安息香酸とコリンを生成します。

$$\text{pHBC} + H_2O \xrightarrow{\text{ChE}} \text{p-ヒドロキシ安息香酸} + \text{コリン}$$

（第二反応）p-ヒドロキシ安息香酸は NADPH の存在下、p-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素（pHBH）により 3,4-ジヒドロキシ安息香酸に変換されます。このとき NADPH は酸化されて NADP となるので、340nm における吸光度の減少速度より ChE の活性を求めます。

$$\text{p-ヒドロキシ安息香酸} + O_2 \xrightarrow[\text{NADPH}\ \ \text{NADP}]{\text{pHBH}} \text{3,4-ジヒドロキシ安息香酸} + H_2O$$

（副反応）第二反応の進行に伴って生じる 3,4-ジヒドロキシ安息香酸は、再び pHBH の基質として作用し、ChE の反応に関与しない NADPH の減少を引き起こすため ChE の活性が偽高値となります。

$$\text{3,4-ジヒドロキシ安息香酸} + O_2 \xrightarrow[\text{NADPH}\ \ \text{NADP}]{\text{pHBH}} \text{3,4-ジヒドロキシ安息香酸} + H_2O_2$$

（副反応回避系）副反応による ChE の偽高値を回避するため、プロトカテキュ酸酸素添加酵素（PCO）を反応液に共存させて測定系から除外します。

$$\text{3,4-ジヒドロキシ安息香酸} + O_2 \xrightarrow{\text{PCO}} \text{β-カルボキシムコン酸}$$

5. 「セロテック」ChE－ML

「セロテック」ChE－ML は JSCC 勧告法にトレーサブルな JSCC 標準化対応法の ChE 測定用試薬です。オンボード（開栓後）の安定性に優れた試薬です。

6. 「セロテック」ChE－MLの試薬組成

試薬の終濃度は JSCC 勧告法に準じています。ただし、JSCC 勧告法では PCO と pHBH を R－1 に添加していますが、「セロテック」ChE－ML では PCO を R－1、pHBH を R－2 に添加しています。PCO と pHBH には NADPH を分解したり、基質である pHBC を分解する混在酵素が多く存在します。したがって、JSCC 勧告法のように PCO と pHBH の両方を R－1 に添加した場合、R－1 中の NADPH が経時的に分解されるために、R－1 は長期間保存できません。そこで、PCO と pHBH の両方を R－2 に添加することが考えられますが、この場合にはこれらの酵素によって基質 pHBC が分解され、その分解産物である p-ヒドロキシ安息香酸が pHBH の基質として作用するため、R－1 中で NADPH は安定であったとしても、反応混液中で ChE の反応によらずに NADPH が消費されます。

「セロテック」ChE－ML では R－1 に PCO、R－2 に pHBH を添加することにより、NADPH と pHBH の両者を安定化させています。さらに、PCO 及び pHBH には混在酵素活性が少ないものを使用し、試薬の保存安定性を向上させています*[10]。

*10
▸特許第 3942966 号

「セロテック」ChE－ML 試薬組成

第一試液（R－1）		第二試液（R－2）	
NADPH	0.36 mmol/L	FAD	6.2 μmol/L
PCO	0.2 U/mL	BSA	0.062 %
		pHBH	4.13 U/mL
		pHBC	4.1 mmol/L

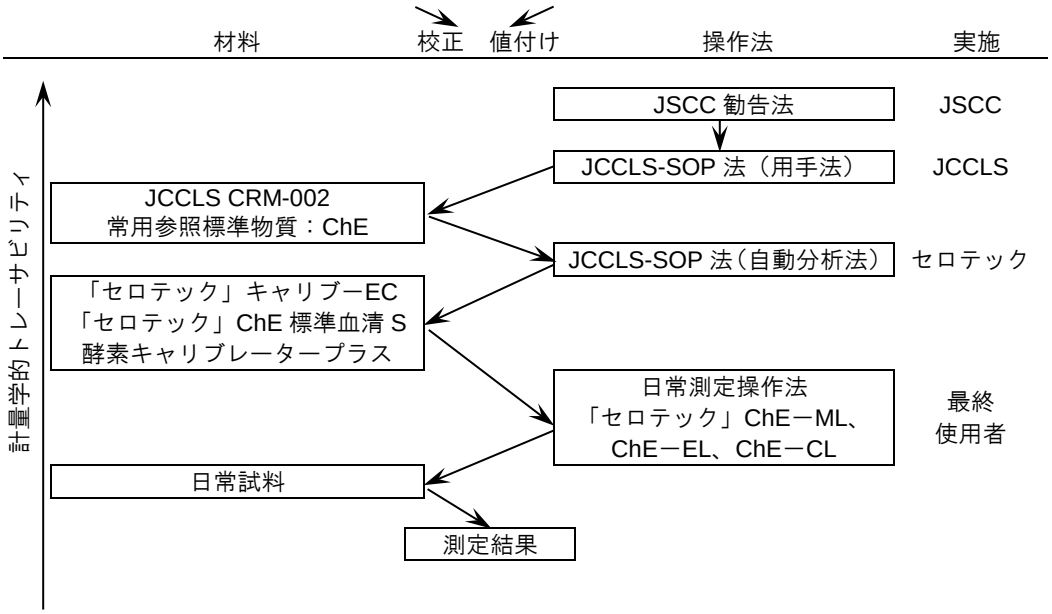
［R－1：R－2＝3：1 混合反応時 pH8.0±0.1（37℃）］

III. トレーサビリティ

1. ChE活性測定のトレーサビリティ

弊社では ChE 活性の値付けと正確さの伝達性を図 3 の方法で確認しています。

■図 3　ChE 試薬におけるトレーサビリティ体系図



2. 正確さの伝達

コリンエステラーゼの常用参照標準物質（常用ERM）が 2006 年 4 月に発売されました。現在は、JCCLS認証標準物質である常用参照標準物質：ChE（JCCLS CRM-002）として頒布（はんぷ）されています。これにより、JSCC勧告法の測定値を日常測定操作法に伝達するためのトレーサビリティ体系が確立されました。キャリブレータに正確さを伝達するためには、JCCLS CRM-002 を用いて校正を行います。

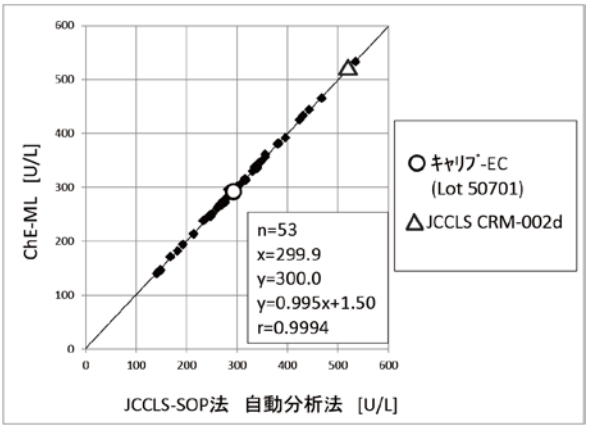
この際、日常測定操作法とキャリブレータの組合せで得られた測定値と、JCCLS-SOP 法と JCCLS CRM-002 の組合せで得られた測定値が一致することを確認しておく必要があります。

▸「セロテック」キャリブーEC:
酵素項目測定用マルチキャリブレータ。ヒト血清。凍結融解 5 回繰り返しても安定。凍結製品。

▸「セロテック」ChE 標準血清 S:
ChE 専用キャリブレータ。ヒト血清ベースの凍結乾燥品。

▸シスメックス株式会社製 酵素キャリブレータープラス もキャリブレータとして使用可能。ヒト血清液状凍結品。

■図 4　「セロテック」キャリブーEC の反応性



（社内データ、2015 年 11 月測定）

▸JCCLS CRM-002d：末尾のアルファベットはロット番号を示す。

弊社では製造業者社内標準測定操作法に JCCLS-SOP 法（自動分析法）を設定し、校正物質に JCCLS CRM-002 を用い、「セロテック」キャリブーEC に値付けを行っています。

「セロテック」キャリブーEC はヒトプール血清をベースとした凍結液状品です。キャリブレータの反応性について評価した結果を図 4 に示しました。「セロテック」ChEーML による測定において、ヒト血清と同等の反応性であることが示されました。

3.　不確かさ

不確かさは、認証値の許容範囲を示してはいません。認証値とは真値ではなく最良の推定値であり、不確かさは最良推定値のばらつきです。

▸最良推定値：測定値の中で補正できるものがあれば、補正した後の真の値に近いと思われる一番実現可能な値。

非常に精度の高い測定条件で測定された結果であれば不確かさは小さく表記され、逆に精度が高くない測定条件で測定された場合であれば不確かさは大きく表記されます。不確かさは上位の標準物質より伝達され、下位の標準物質になるほど、測定の誤差等が付加されるので、不確かさはより大きな表記となります。

不確かさは正確さとともに上位の測定方法から伝達されるものであり、不確かさを表記していない試料やキャリブレータを用いてもトレーサビリティを保証することにはなりませんし、測定結果の正確さを論じることもできません。

■表 2　JCCLS-SOP 法による「セロテック」キャリブーEC の ChE 表示値

Lot No.61101

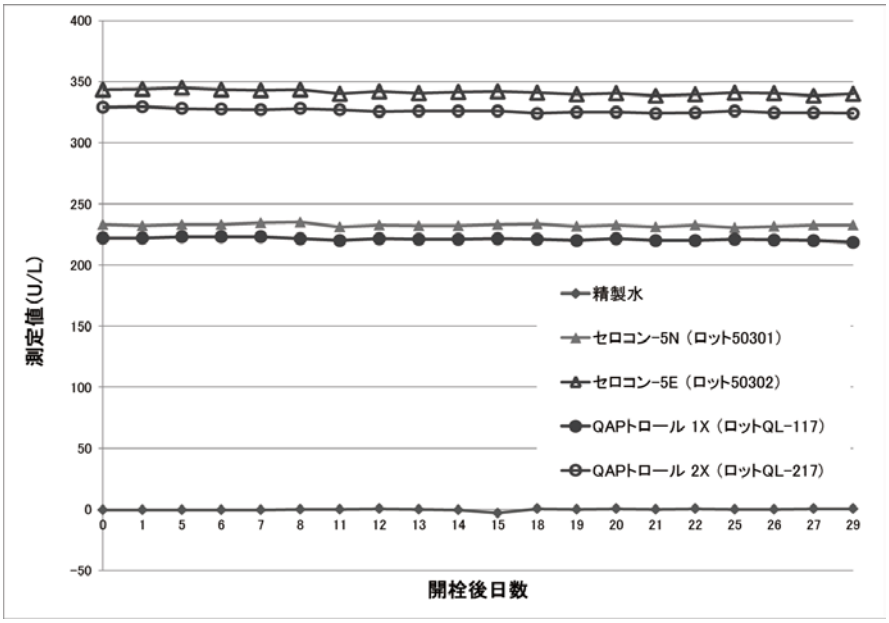
表示値　　不確かさ	校正用物質
303 U/L　± 5.4 U/L（包含係数 *k*=2）	JCCLS CRM-002

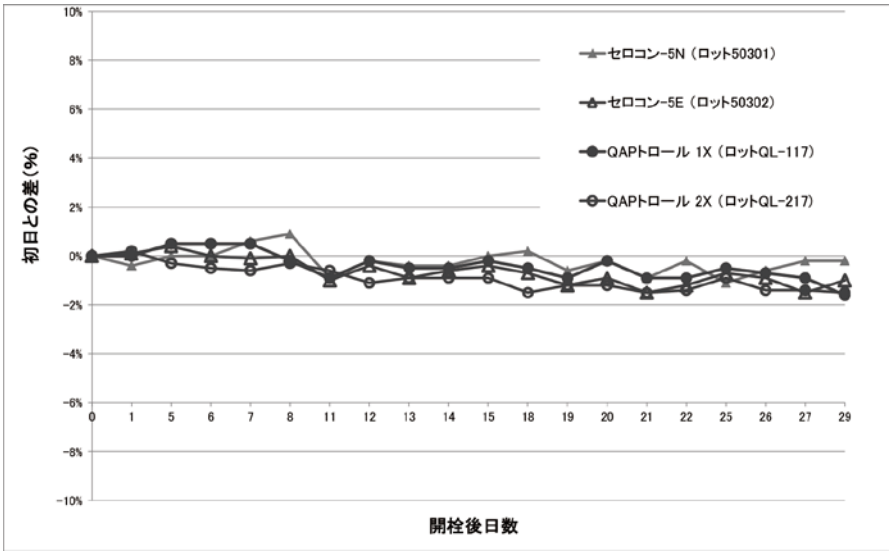
IV.「セロテック」ChE－ML　オンボード安定性

「セロテック」ChE－ML をオンボードで 29 日間各種コントロールを測定しました。検量は初日に「セロテック」キャリブーEC で実施し、その後は検量せずに測定しました。コントロールには、「セロテック」セロコン－5N、5E およびシスメックス株式会社製 QAP トロール 1X、2X を使用、自動分析装置には株式会社日立ハイテクノロジーズ社製 LABOSPECT 008 を使用しました。

▸精度管理用血清
「セロテック」セロコン－5N,5E:
生化学検査項目用コントロール血清。凍結製品。

■図 5　「セロテック」ChE－ML　オンボード安定性





（社内データ、2016 年 11 月測定）

29 日間測定した結果、初日の活性値から±2.0%以内の変動となり、良好な結果が得られました（図 5）。

V. 参考文献・資料

1) 金井正光 他,臨床検査法提要改訂第 34 版:567-570,2015
2) 山崎浩和 他,臨床医からの質問に答える,検査と技術,40:755-759,2012
3) 刈米和子,コリンエステラーゼを測定する検査室でゴキブリ退治などのため殺虫剤を撒いてはいけない, Medical Technology,29:1533,2001
4) 白田亨 他,シクロホスファミドによる血清コリンエステラーゼ活性低下原因の検討, 第 51 回東北医学検査学会 抄録,一般演題 47:80,2010
5) 阿部知世 他,シクロホスファミド投与後の血清コリンエステラーゼの変動（1)、(2）,第 52 回東北医学検査学会 抄録,一般演題 98,99:105-106,2011
6) 刈米和子,Ⅲ報告前に必要なチェック ChE,臨床検査,59 増刊:1200-1204,2015
7) 平成 29 年度日本臨床検査技師会精度管理調査臨床化学（資料）
8) 前川真人,異常値をひもとく 低コリンエステラーゼ血症,臨床検査,57:453-458,2013
9) 新谷裕 他,遺伝性低コリンエステラーゼ血症の 1 症例,日本救急医学会雑誌,12:420-423,2001

ChE

(No.R-009a)

平成 29 年 11 月改訂

株式会社 セロテック

〒062-0021　札幌市豊平区月寒西 1 条 8 丁目 8-7

TEL 011-855-1131　FAX 011-855-0143

お問い合わせ先　企画開発室　E-mail:kikaku@serotec.co.jp

www.serotec.co.jp

1000