

# JCCLS による酵素活性測定 of 標準操作法(SOP) (Ver.1.1) -IFCC 基準測定操作法準拠-

アルカリホスファターゼ (ALP)  
[Alkaline phosphatase (ALP), EC 3.1.3.1]

## 文 献

- 1) International Federation of Clinical Chemistry(IFCC), Expert Panel on Enzymes : IFCC method for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes . Part 5. IFCC Method for Alkaline Phosphatase. IFCC Document Stage 2. Draft 1. Clin Chem Clin Biochem, 21:731-748, 1983.
- 2) International Federation Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) : IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 9: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase, Clin Chem Lab Med, 49:1139-1146, 2011.
- 3) 日本臨床化学会酵素・試薬専門員会：血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定の JSCC 勧告法を IFCC 標準測定法にトレーサブルな方法への変更に関する提案, 臨床化学, 46:138-145, 2017.

## 反応原理



## 試 料

常用参照標準物質：JSCC 常用酵素 CRM-001

## 反応混合液最終濃度

2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP)	750 mmol/L
pH (37°C)	10.20 ± 0.05 (注)
4-Nitrophenyl phosphate	16 mmol/L
硫酸亜鉛	1 mmol/L
酢酸マグネシウム	2 mmol/L
HEDTA	2 mmol/L
試料対試薬容量比	0.0196 (1:51)

注：最大許容誤差(信頼度 95%)

## 測定条件 (用手法)

反応温度	37.0 °C ± 0.1°C
波 長	405 nm ± 1 nm (注)
スペクトル半値幅	≤ 2 nm
光路長	10.00 mm ± 0.01 mm (注)
加温時間	60 秒
ディレイタイム	90 秒
測光時間	120 秒
測光ポイント数	≥ 6

注：最大許容誤差(信頼度 95%)

## 試薬調製

### (1) 溶液 A

25.50 mmol/L HEDTA、12.75 mmol/L 硫酸亜鉛、25.50 mmol/L 酢酸マグネシウムを含む溶液 100 mL の調製。

- HEDTA 0.878 g を約 70 mL の脱イオン水に溶解する。
- 硫酸亜鉛 0.367 g を溶液に加える。
- 硫酸亜鉛を完全に溶解した後に酢酸マグネシウム 0.547 g を加える。
- 酢酸マグネシウムを溶解する。
- 100 mL のメスフラスコに移す。
- メスフラスコと水を 20℃にする。
- 20℃でメスフラスコの標線まで脱イオン水を加える。

2～8℃での安定性：3 ヶ月

### (2) 試薬 I

2-Amino-2-methylpropanol (AMP) 956.3 mmol/L(pH10.2、37℃) 溶液 100 mL の調製。

- 2-Amino-2-methylpropanol (AMP) 8.52 g を脱イオン水約 70 mL に溶かす。
- この溶液を 37℃に保ち、25 %塩酸で pH10.3～10.5 に調整する。
- 溶液 A を 10 mL 加える。
- 37℃に保った状態で(2 mol/L の塩酸で pH10.2 に調整する。
- 100mL のメスフラスコに移す。
- メスフラスコと水を 20℃にする。
- 20℃でメスフラスコの標線まで脱イオン水を加える。

2～8℃での安定性：3 ヶ月

### (3) 試薬 II

81.6 mmol/L 4-Nitrophenyl phosphate(disodium salt, hexahydrate)溶液の調製。

- 4-Nitrophenyl phosphate(disodium salt, hexahydrate) 0.757g を秤量する。
- 脱イオン水約 15mL に溶かす。
- 25mL のメスフラスコに移す。
- メスフラスコと水を 20℃にする。
- 20℃でメスフラスコの標線まで脱イオン水を加える。

2～8℃での安定性：1 週間

## 分析パラメーター

表 1 に分析パラメーターを示す。

表 1 分析パラメーター

	用手法	自動分析法
	日立 U3900 の場合	日立 7180 の場合
測定温度 (°C)	37.0±0.1	37.0±0.1
試料 (μl)	50	5
試薬 I (μl)	2000	200
試薬 II (μl)	500	50
総量 (μl)	2550	255
S/V	1/51	1/51
波長(nm)	340	(主/副) : 340/405
測光ポイント	90 秒待ったのち 120 秒間吸光度変化測定	22-34

注：自動分析法では、必要に応じて試薬に界面活性剤トリトン X-100 などを終濃度で 0.05%程度添加する。

### 測定操作法（用手法）

表 2 に測定操作法（用手法）を示す。

表 2 測定操作法

試薬 I	2.00 mL
	攪拌しながら37℃になるまで予備加温
検体	0.05 mL
	攪拌しながら60秒間加温
試薬 II (37.0℃に予備加温)	0.50 mL
	37℃±0.1℃で攪拌し90秒間の待ち時間
	波長405nmで120秒間吸光度変化を測定 (ΔA 1 / 分)

試薬ブランク(ΔA 2 / 分)は生理食塩水を検体として同様に測定

### 活性値算出

測定されたΔA 1 / 分およびΔA2 / 分を次式に代入して、ALP 活性を計算する。  
ただし、試薬・試料容量は実測値を代入して計算する。

$$\text{ALP 活性(U/L)} = \frac{(\Delta A 1 / \text{分} - \Delta A 2 / \text{分})}{1869} \times \frac{2.55}{0.05} \times 10^6$$