

<資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その1）>

## ̄X-R管理法は分析機器や試薬の異常を見つけられない！

小川 善資

### I. はじめに

管理試料を用いた精度管理法を実施していない施設はないと思います。また、自動分析装置の中には̄X-R管理図を自動的に作成するシステムが組み込まれている装置もあります。ところが、̄X-R管理法で分析装置や試薬の異常を見出すことは大変困難なのです<sup>1)</sup>。理由は相対分析法を用いている施設がほとんどであるため、管理試料の測定誤差が標準液の測定誤差に相殺されほぼ正しい測定値が得られるためです。もう少し具体的に記述すると、物質の濃度をエンドポイント法で測定する時に、恒温槽の温度を37℃に設定したつもりが、35℃であったとします。反応は終点に達しません。しかし、標準液も、検体も同じ率で反応が進行しています。このため、測定値に誤差が出ないのです。測定値に問題は出なくとも、「バラツキが大きくなる」と思われる方が多いと思いますが、実際に試してみると、再現性にもほとんど変化は見られませんでした<sup>2)</sup>。実はこの様な利点が日常検査法として相対分析法を用いる利点です。多少の問題が分析装置に発生していても、試薬に発生していても、正しい測定値を提供してくれる方法なのです。この事実は管理試料の測定値を用いた管理法で分析装置や試薬の異常を発見できなくなることを意味しています。

### II. 試薬異常は発見できるの？

#### 理論的には証明できるの？

恒温槽の温度設定が低温になることと、試薬

に添加されている酵素活性が低下し、反応終了点が伸びたことは同じ現象です。ともに所定の時間内に反応は終了しなくなります。反応が終了していなくとも正しい定量値が得られる理由を酵素反応速度論から考えてみましょう。酵素反応は一次速度定数に従うとして考えます。測定反応は一段階酵素反応で、次式に示す反応で測定するものとします。



酵素 (E) により、測定物質 (S) は生成物 (P) に変換され、Pと同量のNADHが生成します。このとき時間 (t) におけるS、Pの関係を式で表すと次式となります。

$$P_t = S_0 e^{-kt}$$

$P_t$ ：時間tにおける生成物濃度  
 $S_0$ ：測定物質の初期濃度

k：一次速度定数 ( $-V_{max}/K_m$ )

ある時間tにおける生成物 $P_t$ に関してこの式を見ると、 $P_t$ は $S_0$ に比例することを示しています。酵素の添加量と時間が一定であれば $e^{-kt}$ は一定であるため、反応が終了した時点でなくとも、一定の時間に測定すると、 $P_t$ は $S_0$ に比例することになり、分析が成り立つことを示しています。さらに、証明しますと、標準液中の測定物質濃度を $A_0$ 、検体中の測定物質濃度を $B_0$ とし、時間tにおける生成物濃度をそれぞれ $P_{t\text{ std}}$ と $P_{t\text{ sam}}$ とすると、次のように求められます。

$$\begin{aligned} \text{Pt std} &= A_0 e^{-kt} \\ \text{Pt sam} &= A_0 e^{-kt} \end{aligned}$$

この両者の比は次のようになります。

$$\frac{\text{Pt sam}}{\text{Pt std}} = \frac{B_0 e^{-kt}}{A_0 e^{-kt}} = \frac{B_0}{A_0}$$

すなわち標準液の測定物質の濃度 ( $A_0$ ) と、検体中の測定物質の濃度 ( $B_0$ ) 比になることを表しています。このことは、酵素添加量が不足していても、恒温槽の設定温度が誤っていても (誤っている場合  $k$  の数値が変化します)、誤差なく測定できることを表しています。

Web勉強会資料では総コレステロールに例を取り、試薬中に添加されている酵素量が不足したとき、どの様な測定値になるかを具体的に示しました。総コレステロール測定は2段階の酵素反応を用いていること、標準液に添加されているリポプロテインはヒト由来なのかなど、上記に示した例より複雑ですが、測定値にほとんど変化を与えないことを実験的に示しています。さらに、測定の実験的再現性にも影響を与えないことを示しています。

一次速度定数を用いて計算することにご不満をもたれる方や2段階、3段階の酵素反応を解析したいと思われる方は直接Michaelis-Menten式を用いた演算を勧めます。ただ、分母に変数項 (基質濃度  $S$ ) を含むため、代数解を求めることはできません。著者らは酵素反応を解析するための近似値計算法をコンピューターを用い演算させる方法を提案しています<sup>26)</sup>。より正確な演算解を望まれる方はこの様な方法の利用を考えて下さい。

### Ⅲ. 酵素活性測定においても異常は発見出来ないの？

Web勉強会 (第1回の資料) に掲載したアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性測定に掲載しましたが、同じ試薬によって標準液と試料の酵素活性を測定すると、試薬に誤りがあったとしても、測定値に誤差の生じないことを示しました<sup>7)</sup>。この問題も、同様に理論的に考えてみましょう。酵素反応はMichaelis-Menten式に従うことはよく知られています。も

う一度この式を書いてみます。

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S}$$

標準液に添加されている酵素量を  $E_1$ 、検体中に存在する酵素量を  $E_2$  とし、ASTの速度定数を  $k$  とすると、標準液を測定する時の  $V_{\max 1}$  と、検体を測定する時の  $V_{\max 2}$  は、それぞれ次のように表すことができます。

$$V_{\max 1} = E_1 \times k \quad V_{\max 2} = E_2 \times k$$

標準液に用いられている酵素の  $K_m$  値が同一 (検体中に存在する酵素と同じ由来) で、速度定数が同一であれば、標準液を測定する時の反応速度を  $V_{\text{std}}$  と、検体測定時の反応速度を  $V_{\text{sam}}$  の比は次の様に計算できます。

$$\frac{V_{\text{sam}}}{V_{\text{std}}} = \frac{\frac{V_{\max 2} \times S}{K_m + S}}{\frac{V_{\max 1} \times S}{K_m + S}} = \frac{\frac{E_2 \times k \times S}{K_m + S}}{\frac{E_1 \times k \times S}{K_m + S}} = \frac{E_2}{E_1}$$

要するに、標準液を測定した時の反応速度  $V_{\text{std}}$  と検体を測定した時の  $V_{\text{sam}}$  の比は両試料中酵素濃度比になることを意味しています。例え、試薬が誤っていても (試薬が誤っているとこの式中の  $S$  や  $k$  が変わることとなります) 酵素濃度比が測定できることとなります。このことは、管理試料の測定値に何の誤差も現れないことになり、管理試料の測定値は正しく測定されることを表しています。コントロール血清にヒト以外に由来する酵素を添加した場合、多くの方が直ぐに問題を指摘されました<sup>6)</sup>。これとは対照的に、長い間何の指摘も受けなかった問題があります。トランスアミナーゼ (ASTとALT) の測定法としてライトマンフランケル法が用いられていました。この方法では基質添加量が明らかに誤っていました。勧告法に用いられている約6~7分の1の基質濃度しか添加されていなかったのに、何の指摘もされずに利用され続けていました。この事実が今回ここで示した、試薬の異常を発見出来ないという問題を雄弁に証明してくれていると思います。

### Ⅳ. 何処に利点があるのか？ $\bar{X}$ -R管理は何を見ているのか？

$\bar{X}$ -R管理法の最大の長所は分かり易いことで

す。診療医が100 mg/dl付近で2.0%以内の再現性を望んでいるとすれば、100 mg/dl付近の管理試料を用いて、管理図を作成すれば、分析精度の維持や、過去から今日に至る測定精度推移を簡単に表現でき、理解してもらえます。精度管理データは測定者が出したデータですが、測定値を利用していただいている多くの方が共有できるデータでなければなりません。いかなる分析も誤差なしに測定できないのですから、どの程度の誤差を含んでいるかを公表する義務もあると思います。Barnetは、検査データを利用する診療医が誤った診断を行わないために、診断にとって重要な濃度とその濃度における許容誤差を提示しています。この要求に対しどの程度答えられているかを表示する手段として $\bar{X}$ -R管理図はとても有効だと思います。

分析者にとって $\bar{X}$ -R管理図はどのような意味があるのでしょうか。標準液や管理試料の異常を感度良く表してくれます。標準液や管理試料の劣化、濃縮、希釈などを鋭敏に知らせてくれます。また、標準液を測定してから、同じ管理試料を連続して測定すると、測定時間内に発生する試薬の劣化、測定装置の変化を敏感に教えてくれます。また、これらとは別に、標準液と検体で相違する物質を測定している場合や、本来測定すべきものを測定していない場合にも異常を知らせてくれます。

平井らはHDL-コレステロールの管理図から、ある市販メーカーのHDL-コレステロール測定試薬がHDL中の遊離コレステロールを測定していないことを発見しています<sup>9)</sup>。この試薬ではHDL中エステル型コレステロールのみを測定していました。本来、測定すべきものはHDL中遊離型+エステル型コレステロールであるにも関わらず、HDL中エステル型コレステロールのみを測定していたためです。複雑なことに、HDL中の遊離コレステロールは保存によってレシチン・コレステロール・アシル・トランスフェラーゼ (LCAT) の作用を受けて遊離コレステロールからエステル型コレステロールに変化するため、検体保存によって測定値が次第に高値になるという影響も見い出しておられます。なお、この問題は黒崎らも同様な結果を報告しています<sup>9)</sup>。

## V. どのような装置異常も発見出来ないのか？

どのようなトラブルが発生したとしても、常に誤差が相殺できるはずがありません。前述した様に標準液を測定し、キャリブレーションを行った後の経時変化は発見できます。また、比例関係が成立する影響の場合、誤差は相殺できますが、比例関係から逸脱するような誤差が発生する場合、誤差は相殺できません。その例としては迷光が大きくなるようなトラブルが発生した場合、測定物質の濃度と吸光度の関係が比例関係でなくなり、曲線の関係になることがあるため、補正できなくなることがあります。

吸光度のある物質濃度と吸光度の間には比例関係があり、この原理を利用して比色分析法が成立していることはご存じのことと思いますが、吸光度が高くなり過ぎると比例関係を消失することも良く知られていることです。この原因は迷光です<sup>10)</sup>。迷光が大きくなると吸収ピークの波長が長波長側にズレ、特定波長で測定していると吸光度が高くなると低値に測定する誤差が発生します (図1、図2)。一般的には標準液は高濃度のもを用いるため、標準液の測定する吸光度が非直線部分に入っていたとすれば図2に示す様に、全ての測定値が誤って高値に測定してしてしまうこととなります。これ以外にも、精度管理試料にのみ発生する問題 (濁度を持つ問題、多くの保存剤を用いている問題など) などで $\bar{X}$ -R管理図が動くことがあります。今後、Web勉強会の各論でなるべく詳細に取り上げ記述したいと思います。

## VI. どうすれば試薬異常を発見出来るのか？

既に、多くの方が実践されていることですが、自動分析装置初動直後に測定されている試薬ブランクの吸光度と標準物質の吸光度をモニターすることが大切です。試薬ブランクは試薬の吸光度で、試薬に着色が発生しているかを観察できます (一般に試薬の着色は試薬劣化の指標となることが多い)。また標準液の吸光度は計算にて求められます。この吸光度に達していないことは明らかに試薬の劣化を意味します。具体的な例を示します。グルコースをヘキソキナーゼ法で測定しているとします。400 mg/dlの標準

液と200 mg/dlの管理試料を用いて測定したとします。測定される吸光度差（ $\Delta$  Abs）は下記のようになることが予測できます。

$$400 \text{ mg/dl} = \frac{\Delta \text{ Abs}}{\text{NaDHのセル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液液量}}{\text{サンプル量}} \times \frac{1}{180 \times 1000 \times \frac{1}{10}}$$

NADHのモル吸光係数を $6.3 \times 10^3 \text{ l/mol/cm}$ とすると

$$\text{予想される } \Delta \text{ Abs} = 140 \times \frac{\text{サンプル量}}{\text{総反応液量}}$$

同様に200 mg/dlの管理試料を測定した時の $\Delta$  Absはこの1/2と予測できます。予測される $\Delta$  Absより、著しく低下していたり、大きかったりすることは何らかの問題が発生していることを意味しています。

正確で、しかも精密度の高い測定を実施しなくてはならないことは当然のことですが「正確度」はどの様にチェックされていますか。認定標準物質を購入し、標準値にどれだけ近い測定値を測定できるかを知ることでも正確度のチェックですが、自施設で使用している分析装置によって「見かけのモル吸光係数」を求め、上記式によって標準物質の測定値と $\Delta$  Absを比較し、正確度をチェックする方法もあります。試薬代もほとんどかからず、今すぐにもでもチェックできる方法です。是非試して下さい。Web勉強会で示す次のテーマは、①正確度チェック法、②目標として設定した精密度に合わせる方法、③測定可能範囲の設定法と測定システムの構築法です。是非一緒に勉強しましょう。

これ以外にも、簡易に出来る試薬チェック法があります。例えば、AST、ALT活性測定試薬のチェック法としては試料として2.0 mmol/lピルビン酸溶液を用い、AST、ALT活性を測定し、活性が求められれば、試薬に異常が発見出来ることを意味します。

ピルビン酸溶液がAST、ALT活性を持っているはずがありません。AST、ALT活性測定試薬中にはLDが相当量添加されています。目的は試料中に存在するピルビン酸によって、NADHの減少反応が発生するため、AST、ALT測定前にピルビン酸を消去するためです（AST、ALTの項参照）。

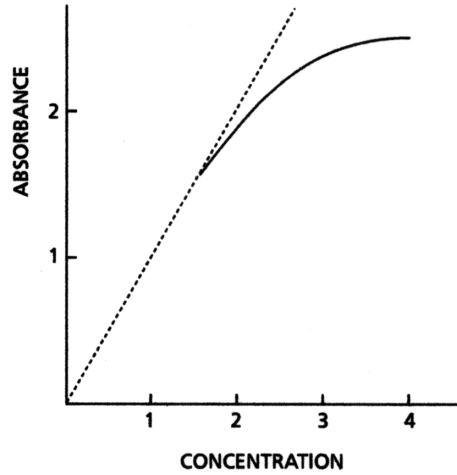


図1 0.3%の比迷光を有する分光器を用いた時の測定物質濃度と吸光度の関係<sup>10)</sup>

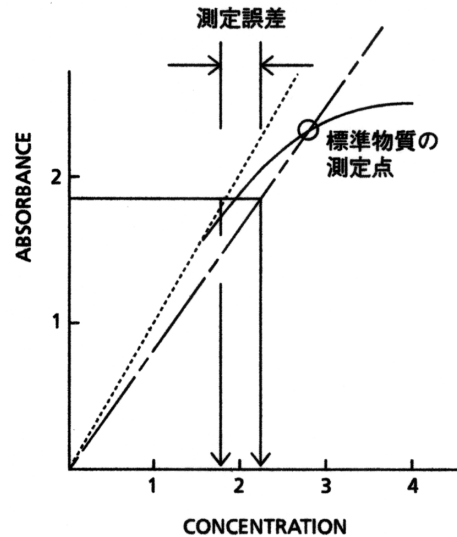


図2 標準液の測定が非直線部になった場合に発生する誤差  
0.3%比迷光を有する分光器を用いて高濃度の標準液を発色させ吸光度2.0を超えてしまった。測定者が非直線部で測定していることを知らなかった場合、全ての濃度測定で図のような誤差が発生し、高値に測定してしまう。

## VII. まとめ

精度管理法についてももう一度最初から勉強してみませんか。正しいと思い込んでいることでも、見方を変えれば正しくないこともあります。35巻2号に掲載予定のその2には「添加回収試験法で正確度はチェックできない」というテーマを取り上げたいと思っています。もちろん、どのような方法にも長所、短所があるため、全てが間違っているわけではありませんが、本来の目的から逸脱してしまい一方的に信じていることがあるかもしれません。全ての臨床検査室で正確で精密度の高い分析ができるようになるためには、冷静に真実を捉え、正しいことは何かを自分自身で構築する必要があると思います。Web勉強会はその一助となればと考えて運営しています。もちろん、ここに掲載したことを確認するための実験法についても掲載予定ですので、実験をしてチェックしてみてください。

### 引用文献

- 1) 小川善資: 日常検査法としての相対分析法のメリット, 生物試料分析学会分析機器試薬アナリストのためのWeb勉強会資料. 1: 1-7, 2011.
- 2) Ogawa Z, Kanashima M, Hayashi C, Itoh H: Computer simulation of coupling enzyme reaction (laying stress on the ALT activity assay using LDH as coupling enzyme). *J Anal Bio-Sc*, 12: 20-32, 1989.
- 3) Ogawa Z, Morita A, Numagami K, Itoh H: Computer simulation of coupling enzyme reaction II (The Michaelis-Menten constant (Km value) of malate dehydrogenase in consideration of the reaction velocity of NADH): *J Anal Bio-Sc*, 12: 79-85, 1989.
- 4) 小川善資, 金島才仁, 伊藤 啓: 酵素反応速度論入門(その4). *生物試料分析*, 16: 109-113, 1993.
- 5) 小川善資, 金島才仁, 伊藤 啓: 酵素反応速度論入門(その5). *生物試料分析*, 16: 150-157, 1993.
- 6) 小川善資, 金島才仁, 伊藤 啓: 酵素反応速度論入門(その6). *生物試料分析*, 16: 200-207, 1993.
- 7) Marui Y, Ogawa Z, Naka M, et al.: Determination of anew method for serum amylase activity using the automated analyzer. *Jpn J Clin Lab Auto*, 4: 36-39, 1979.
- 8) Hirai N, Kizawa S, Hirooka y: Reaction analysis of a HDL-C mesurement method based on free cholesterol elimination of lipoptotein other than HDL—The effect of unreported elimination of free cholesterol of HDL. *Jpn J Med Tec*, 55: 202-207, 2006
- 9) Kurosaki Y, Hachimura Y, Ogawa Z: With a novel evaluation method comparison of 2 homogeneous assay kits for high density lipoprotein cholesterol. *Clin chim ACTA*, 401: 110-113, 2009.
- 10) 網沢義夫: 分光光度計の精度に関する諸要件と光源: 分光器の構造, 特徴について. *生物試料分析*, 2: 1-16, 1980.