

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その2）〉

## 正確度の検証法（1）

### —分析反応と理論とは一致しているか、検量線の予測—

小川 善資

#### I. 正確度をどのように検証するか

臨床検査技師の行う分析は正確で、精密度の高い測定が求められています。精密度を求める方法は多くの方法が確立されており、実践されています。しかし、「正確度をどのように検証したらよいか」が今ひとつ確立できていません。最も広く利用されている方法は正しい測定値（標示値<sup>1)</sup>を持つ標準液を測定し、その距離を確認する方法です（トレーサビリティ）。この方法の基軸が認証標準物質（CRM）や酵素標準物質（ERM）とその標示値にあるため、標示値のない検査項目はチェックできません。さらに、標準物質が入手できない検査項目（各種酵素活性測定、ホルモン測定や一部の脂質検査）はさらに問題です。また、標準物質（液）の安定性に問題があることも多々あります。この場合、正確度を確認することが大変困難で、様々な問題が発生しています。

さて、測定値に問題が発生したのではないかと考えた時、実際の測定現場で行っている行動はどのようなことなのでしょう。たぶん「反応曲線」をまずチェックすることが多いのだらうと思います。そして反応曲線に問題がなければ正しい測定ができているとする方が多いと思います。この根拠は何でしょう。測定に対する「理論的裏付け」がとれたからではないでしょうか。「正しく測定されている場合にはこの様に反応が進行するはずである。」もしくは、「測定方法を導入した際、検討した結果と同様な反応曲線であった。」つまり、同じ反応曲線だから正しく測定されていると考えられるからではないでしょうか。正確性を検証する方法として、これと似た考え方を導入できると思います。まず「理論との一致性」について記述します。はじめに取り上げるのは検量線の予測です。実験などしなくとも検量線は書けることをご存じでしょうか。この理論的な検量線と実際の検量線が一致していれば、正しい測定をしていると自信を持ってください。

#### II. 検量線の予想

検量線を予測する方法は測定方法によって相違するため、次に示す方法ごとに記述することにし、今回は物質濃度測定法のエンドポイントアッセイとレートアッセイについて説明します。

##### 1. 物質濃度測定法

###### 1-1. エンドポイントアッセイ

###### 1-2. レートアッセイ

<sup>1)</sup>標示値：何れかの機関によって認証された数値。日本においては日本臨床検査標準協議会が認証した標示値を持つ各種標準物質が市販されている。

表示値：コントロール血清やリファレンス血清などに標記された測定値標示値とはあえて区別して表記する。

CRM: Certified Reference Material 認証標準物質

ERM: Enzyme Reference Material 酵素標準液

2. 酵素活性測定法

2-1. 連続モニター法

2-2. ワンポイントアッセイ

3. 吸光度を正確に測定しているかの検証方法

4. 日常検査法との相違点

1. 物質濃度測定法

試料中に存在する物質濃度を測定する方法で、一般的に最も多く利用されている方法はエンドポイント法です。これ以外に反応速度を利用した測定も若干あります。

1-1. エンドポイント法

エンドポイント法で検量線を予測する方法は、認定講習会テキスト「分析システムの構築法」に記載した方法と同じです。テキストをお持ちの方はこれを参照して下さい。しかし、とても重要な事柄なので、重複しますが一例だけを記載します。

(例1) ヘキソキナーゼ (HK) -グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 法にてグルコースを測定した。サンプル量を  $2 \mu\text{l}$  用い、試薬 I を  $100 \mu\text{l}$ 、試薬 II を  $50 \mu\text{l}$  とし、反応が3分間で完全に終了する試薬を用いて  $340 \text{ nm}$  にて吸光度を測定し、定量する。試薬および試料中に  $340 \text{ nm}$  に吸収を持つ物質はなく、酵素の阻害剤のないものとする。セルの光路長が  $1.0 \text{ cm}$  で、 $\text{NAD(P)H}$  のモル吸光係数は  $340 \text{ nm}$  で  $6.3 \times 10^3 \text{ l/mol/cm}$  とする。使用する標準液は  $100 \text{ mg/dl}$  および  $200 \text{ mg/dl}$  とする。また、精製水を用いてブランク反応では吸光度変化はなかったものとする。また、グルコースの分子量は  $180$  とする。

(解答例) 吸光度と濃度の関係を式に表すと次のようになります。

$$\text{標準液の濃度 (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\text{検出物質のモル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times \text{分子量} \times 100$$

この公式に具体的な標準液の濃度を代入して、吸光度変化量 ( $\Delta \text{Abs}$ ) を求めます。

標準液濃度  $100 \text{ mg/dl}$ 、モル吸光係数  $6.3 \times 10^3 \text{ l/mol/cm}$ 、総反応液量  $152 \mu\text{l}$ 、サンプル量  $2 \mu\text{l}$ 、分子量  $180$  を代入すると、次のような式になります。

$$100 \text{ (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{Abs}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{152 \text{ ml}}{2 \text{ ml}} \times 180 \times 100$$

$$\Delta \text{Abs} \approx 0.461$$

同様に  $200 \text{ mg/dl}$  で演算すると  $0.922$  になり、横軸にグルコース濃度、縦軸に  $\Delta \text{Abs}$  を取り作図すると理論的な検量線となります (図1)。

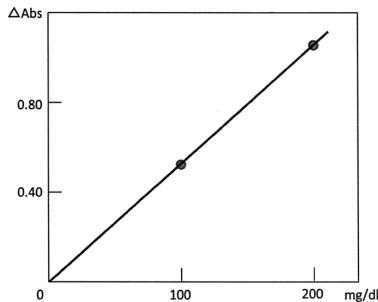
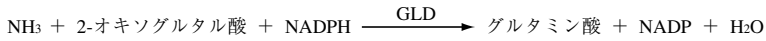
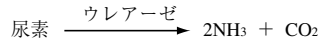


図1 HK-G6PD法によるグルコースの理論的検量線

1-2. レートアッセイ

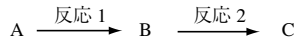
反応速度を測定し、物質の濃度を求める方法です。臨床検査で広く用いられている方法として、尿素窒素 (BUN) の酵素法を例に説明します。測定原理は次に示す 2 段階の反応です。



この反応全体を持ち込む演算方法は少し複雑です。このため、一度簡単な反応に置き換えて演算します。



さらに、尿素有 A、2NH<sub>3</sub>を B、2NADPを C として反応式を書き直します。



反応 1 と反応 2 の両方の反応が一次反応速度で進行するとすれば、2 つの連続する反応を段階ごとに次の反応速度式で表すことができます。

$$\text{Aの減少速度: } -\frac{dA}{dt} = k_1A \dots\dots\dots \text{式 1}$$

$$\text{Bの生成速度: } \frac{dB}{dt} = k_1A - k_2B \dots\dots\dots \text{式 2}$$

$$\text{Cの生成速度: } \frac{dC}{dt} = k_2B \dots\dots\dots \text{式 3}$$

k<sub>1</sub>は反応 1 の一次速度定数、k<sub>2</sub>は反応 2 の一次速度定数です。

A の初期濃度を A<sub>0</sub>として、この連立微分方程式を解くと次のようになります。

$$A = A_0 e^{-k_1 t} \dots\dots\dots \text{式 4}$$

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \dots\dots\dots \text{式 5}$$

ここで A<sub>0</sub> = A + B + C なので、

$$C = \frac{A_0}{k_2 - k_1} \times [k_2(1 - e^{-k_1 t}) - k_1(1 - e^{-k_2 t})] \dots\dots\dots \text{式 6}$$

となります。この生成物 C の濃度を t で微分すると、反応速度になります。

$$\frac{dC}{dt} = \frac{k_1 k_2 A_0}{k_2 - k_1} \times (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \dots\dots\dots \text{式 7}$$

となります。要するに、生成物 C の生成速度は「A<sub>0</sub>に比例する」という式になりますから、反応速度を測定することで、尿素濃度を測定できることになります。

ここで考えなければならない問題は酵素反応が一次速度定数に従う反応である、として演算したことです。酵素反応はミカエリス-メンテン式に従うのですが、ミカエリス-メンテン式を演算することが難しすぎるために一次反応速度に従うとして計算したのです。では、どれだけ誤差が発生しているのかを演算してみましょう。

基質濃度を A とし、K<sub>m</sub> ≫ A であれば、反応は一次反応速度で進行するので、ミカエリス-メンテンの式は次のように変形できます。

$$v = \frac{V_{\text{max}} \times A}{K_m} \dots\dots\dots \text{式 8}$$

したがって誤差は次の式で演算できます。

$$\text{誤差 (\%)} = \frac{\frac{V_{\max} \times A}{K_m} - \frac{V_{\max} \times A}{K_m + A}}{\frac{V_{\max} \times A}{K_m + A}} \times 100 = \frac{A}{K_m} \times 100 \dots\dots\dots \text{式 9}$$

基質濃度がKm値の1/10の場合 (A/Km=1/10)、誤差は10%になり、1/5の場合は20%の誤差がでることを示しています。

すなわち、式7で反応速度を求め、式9で発生した誤差を差し引くと、正しい反応速度が求められることとなります。実際に尿素を測定する時の検量線を作図してみると図2になり、基本的に検量線は直線にはなりません。尿素濃度が濃い場合に、次第に曲がってきます(反応速度を用いて基質濃度を測定したい場合、Km値の大きな酵素を用いた方が検量線の直線領域は広がります)。

それでは実際の反応と、どこまで一致するのか検証してみましょう。

実験で得られた検量線を図2の予想された検量線と一致させると、両者が良く一致することが理解できると思います(図3)。

この結果から、検量線の傾きを強くし、感度よく測定をしたければ酵素添加量を増やせばよいことが分かります。この実験結果を投稿しましたので、ご参考にしていただければと思います。なお、一次反応速度を用いず、2つの反応ともミカエリス-メンテン式に従うとして酵素反応の演算を行いたい方は2つのミカエリス-メンテン式が連続して起こる微分方程式をオイラー (Euler) の近似値計算式によって解くためのプログラムを用いてください。なお、より演算精度を上げたい方はルンゲ・クッタ・ギル (Runge-Kutta-Gil) 法を用いて演算してください。

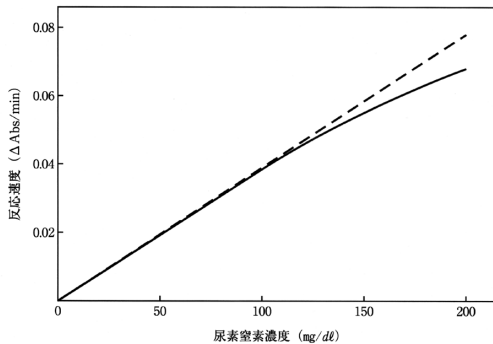


図2 尿素窒素定量における検量線予測  
2つの反応が共に一次反応に従うと考えた予測 (-----) とオイラー法による予測 (——)

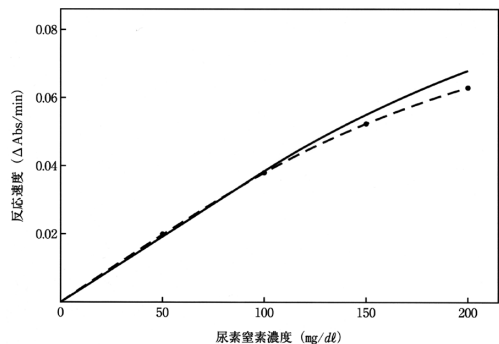


図3 尿素窒素定量における検量線予測と実験結果の検証  
オイラー法による予測 (——)  
実験結果 (●-----●)