

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その13）〉

エンドポイント法による 物質定量法の分析システム構築法

—臨床医と検査技師双方の要望を取り入れた分析システムの構築—

小川 善資¹⁾、沼上 清彦²⁾

Summary In routine work is it necessary for all instruments and reagents used in the measurements to be perfect? If there are parts where they do not need to be perfect, these parts should be identified and it should be clarified where needs to be directed and what must be controlled. On the other hand, there are concentrations where high-precision analysis is demanded and concentrations where rapid report of results is desired more than precision. In addition, the physician and clinical scientists has each requests with respect upper and lower measurement limits minimum concentration for assay capacity. Using automatic analytical equipment, the method of measuring substance concentration with an endpoint method is adopted. Thinking about how to build an analytical system that can respond to these requests, we next contemplated trying to understand which part of the analysis system determines precision and whether we could build a system that responds to as many of these demands as possible. In addition, we would also like to think about what kind of preparation needs to be done for an analytical system in order to quickly report measurements near the panic value sought from early report of results. The analytical range and the level of precision are changed greatly by the performance of the equipment that is used in laboratory procedures using automatic analysis equipment. Each piece of equipment would have to be measured with respect to the performance of analytical instruments. In this paper performance is assumed and a specific example of an analysis system is devised. Therefore, a method is introduced to build an analytical system with a procedure for quantifying glucose in serum with the hexokinase method.

Key words: Routine assay, Assay system, Molecular absorption

はじめに

日常検査において、測定に関わる全てに装置・試薬が完璧でなくてはならないのでしょうか。もし、完璧でなくてもいい部分があるとすれば、これを明確にし、何に注意を払わなければならないか、何を管理しなければならないかを明確にすべきだと思います。さらに、精度の高い分析を要求されている濃度と、精度より、早急な結果報告が望まれている濃度があります。また、分析分解能、測定下限や上限に関する要望が診療医と分析担当者から出ています。自動分析装置を用い、エンド

¹⁾北里大学薬学部

²⁾公益社団法人日本毛髪科学協会

連絡先：生物試料分析科学会 理事長 小川 善資

〒194-0042 東京都町田市東玉川学園1-9-19

ポイント法にて、物質濃度を測定する方法を取り上げ、これら要望にどうすれば応えられる分析システムが構築法について考え、次いで、分析システムのどこで精度が決まるのかを知り、その上で、なるべく多くの要望を満たせるシステムが構築できるのかを考えます。さらに、より早急な結果報告が求められているパニック値付近の測定を速やかに報告するためには分析システムとして、どの様な準備を備えておかなければならないかも考えたいと思います。

なお、自動分析装置を用いた検査法では使用する装置の性能によって、分析できる範囲や精密度が大きく変化します。分析機器の性能は各自の装置で測定してもらわなければなりません。本稿では性能を仮定し、分析システムの具体例を立案します。その上で、ヘキソキナーゼ法による血清中のグルコース定量法の分析システム構築法を紹介します。

分析システム構築法、診断基準、パニック値

1. 分析装置の性能と測定誤差の関係

正しい装置を用い、正しい試薬を使えば、正確で、精密な測定が可能です。では、正しいとは何がどの様になっていることを指しているのでしょうか。日常検査を行う上で、装置も試薬も、完全であり続けることは不可能に近い努力を要します。そこで、あまり問題とならない性能と、しっかりと注意すべき性能を掌握します。その上で、分析システムの構築法を考えることにします。なお、ここでは酵素法で、しかもエンドポイント法による物質定量法について記述します。この相対分析法の測定原理は次の反応式に従うものとします。



測定したい物質はAとし、Eはこの反応を触媒する酵素で、Bは試薬として用いられる物質、生成物がCとDで、Cが波長500 nmに吸収を有し、そのモル吸光係数は $5.0 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ とします。日常検査は相対分析法によって測定されますが、吸光度と測定物質との間には次式が成立するものとします。

$$\text{物質濃度 (mg/dL)} = \frac{\text{吸光度変化量}}{\text{ミリモル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times \text{分子量} \times \frac{1}{10} \times 1000 \cdots \text{式 1}$$

用語（本稿にて用いた言葉の意味）

測定下限：一定の精度を保証でき、報告できる最小の測定値。検出限界とは相違する。

測定上限：希釈することなく、直接測定できる最大の測定値。

測定可能範囲：測定下限から測定上限までの範囲。

分析分解能：有意差を持って測定できる最小の濃度差。分析段数の1段の高さ。

パニック値：生命の維持が危ぶまれるような異常値。

ディシジョンレベル：診断の分岐点となる濃度。

相対分析：標準液の表示値から検体中の濃度を求める分析法。これに対して、標準液を用いることなく、モル吸光係数など物理的な指標に基づき濃度を測定する分析法を指標分析法とする。なお、最も正確な測定値を提供してくれる方法はディフィニティブ法である。

終濃度：反応の場での濃度。

使用する単位（本稿にて主として用いる単位）

時間：min（分）

物質濃度：化学計算に用いる場合はmmol/L、臨床的な問題ではmg/dL

酵素活性：U/L（ $\mu \text{ mol/L/min}$ ）

モル吸光係数：L/mol/cm 使用するセルの光路長は0.5 cmとするが、装置が表示する吸光度は光路長1.0 cmのデータで表示するものとする。

1-1. サンプルング量

サンプルングノズルの詰まりによってサンプルング量が増えた場合、当然正確性が失われます。しかし、サンプルング量に変動なく、一定の誤差が発生している場合、測定値の正確性に影響を与えません。サンプルング量のバラツキは直接、測定値のバラツキにつながります。サンプルング量が少なくなると感度が低下し、バラツキの原因となります。

例えば、サンプル量を誤って一定に10%多く取る装置であったとします。この装置を用いて標準液を測定すると、正しいサンプルングによって得られる吸光度 (ΔAbs1) から10%高い吸光度 ($\Delta \text{Abs1} \times 1.1$) が測定されます。同じようにサンプルを測定すると、正しいサンプルング量で測定した時の吸光度 (ΔAbs2) から10%高い吸光度 ($\Delta \text{Abs2} \times 1.1$) となります。正しいサンプルング量にて得られた濃度を求める式は次式で求められます。

$$\frac{\Delta \text{Abs1}}{\Delta \text{Abs2}} \times \text{標準液の表示値} = \text{試料の正しい濃度} \cdots \text{式2}$$

これに対して、10%多くサンプルングした装置の場合、次のように濃度が求められます。

$$\frac{\Delta \text{Abs1} \times 1.1}{\Delta \text{Abs2} \times 1.1} \times \text{標準液の表示値} = \text{試料の正しい濃度}$$

サンプルング量が誤っていても一定量のサンプルング量が取れていれば、相対分析法においては、測定値の正確さに問題は生じません。ただし、測定下限と測定上限は誤った分だけ高くなったり、低くなったりします。

1-2. 試薬分注量

試薬量のバラツキは測定値のバラツキにつながるかもしれませんが、分注量の数%のズレは測定値の正確度に影響を与えません。この問題はサンプルング量の誤差と同じことです。しかし、試薬量が少なくなった場合、次の2つの誤差の発生が考えられます。

- ①試薬Bが足りなくなり、正しい測定ができなくなる可能性。
- ②酵素Eの添加量が減少することにより所定の反応時間内にエンドポイントが迎えられなくなり、測定値の正確さが失われる可能性。

まず、①の場合、試薬Bは反応溶液中で、測定物質Aより濃度が低くなると測定できなくなります。試薬量が少なくなると測定上限が低下する可能性があります。数%の試薬量減少で、測定に影響が出るようなギリギリの試薬量に設定していることはほとんどありません。

次に②の問題ですが、エンドポイントに到達していない時間に吸光度測定を行ってしまうと、誤って低値に測定してしまうのではないかと考えられる方が多いと思いますが、誤差は発生しません。誤差が発生する可能性のあるのは、単一の物質を測定していない場合です。具体的にはコレステロール測定やトリグリセライド測定です。コレステロールやトリグリセライドは単一の物質を測定するのではなく、様々な脂肪酸が結合した物質を測定する必要があるため、単純には解説できません^{1,2)}。これに対して、単一の物質を測定する時には誤差を与えません。少し難しくなりますが、理論的に説明します。酵素の反応曲線を計算で求める計算法から説明します（計算法は様々な方法が報告されています^{3,7)}。物質Aを測定する酵素反応が一次速度定数に従う反応であったとします。反応式1に記述した反応ですが、試薬として物質Bを大過剰添加すると、この反応速度は物質Bの濃度に依存しなくなり、物質Aの濃度のみ依存することになります。この条件で、物質Aは100%物質Cに変換されることとします〔酵素反応において酵素-基質結合体 (ES complex) ができますが、ここでは無視できる程少ない程少ないと考えます〕。すると、この反応速度は次式で表すことができます。

$$-\frac{dt}{dt} = \frac{dC}{dt} = k1[A] \cdots \text{式3}$$

$k1$ はこの反応の一次速度定数、 $[A]$ は物質Aの濃度

この微分方程式を物質Aについて解くと次のようになります。

$$-\frac{dA}{A} = k1dt$$

時間0における物質Aの濃度をA0、時間tにおける物質Aの濃度をAtとし、両辺を積分すると、

$$-\int_{A0}^{At} \frac{dA}{A} = k1 \int_0^t dt$$

$$-[\ln A]_{A0}^{At} = k1[t]_0^t$$

$$-(\ln t - \ln A0) = k1t \dots \text{式4}$$

$$-\ln \frac{At}{A0} = k1t$$

$$\frac{At}{A0} = e^{-k1t}$$

$$At = A0 e^{-k1t} \dots \text{式5}$$

式4は時間tにおける物質Aの濃度を示しています。一方、物質Aは必ず物質Cになるとしたことであり、次式が成立します。

$$A0 = At + Ct$$

式5に式4を代入すると

$$Ct = A0(1 - e^{-k1t}) \dots \text{式6}$$

となります。この式5と式6を作図すると、反応液中の物質Aの減少曲線と生成物Cの生成曲線となります(図1)。この物質Cの濃度にモル吸光係数を乗じると吸光度が得られるため、反応曲線が計算できます(左縦軸は物質AとCの濃度、右縦軸は吸光度)。

式6は生成物Cが時間に関わりなく、A0に比例することを表しています。よって、反応が完全に終了したエンドポイントであっても、反応の中間であっても、物質Bの生成量から物質Aを定量できることを表しています。もちろん、エンドポイントで測定した方が検量線の傾きが強くなるため、分析分解能が上昇し、精密度が高くなります。

理論的な解説とは別に、実験的にも本当に測定できるのか、精密度がどの様になるかは興味深いことだと考え、確認実験をしました⁸⁾。具体的にはヘキソキナーゼ(HK)を用い、反応開始3分で終了する試薬を用い、反応開始3分で測定した場合と2.5分でグルコース測定を行いました。反応曲線は図2に示しました。反応開始2.5分後では反応の97.8%、2.0分後で95.5%反応が進行していました。測定時間を2.0、2.5分に変化させてグルコース濃度を測定しましたが、測定値には全く影響がなく、精密度にも変化を示すことはありませんでした(表1)。

すなわち、試薬量が不足して、酵素量が多少、

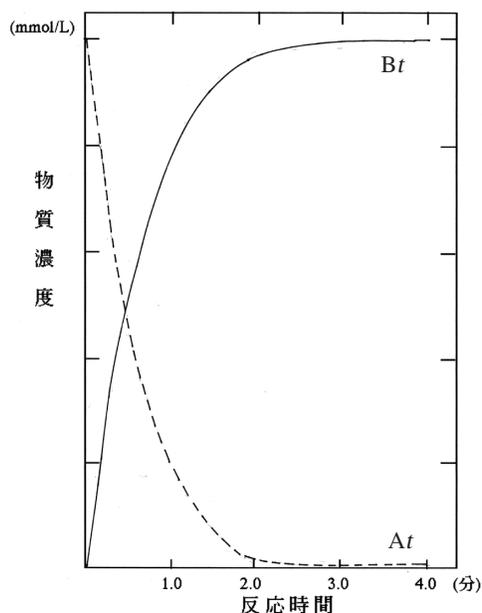


図1 予測した反応曲線と実験で得られる反応曲線

物質Aの曲線と物質Cの曲線は線対称となる。物質Aの100%が生成物Cに変換するまでの時間は無限大の時間が必要となる。物質Aの99%が生成物質Cになった点を反応終了点とした。

物質Aの濃度が1.0 mmol/Lとした時の反応曲線。左縦軸に物質AとCの濃度を取り、右縦軸に吸光度を示した。測定には試料を0.1 mLと試薬0.9 mLを用いた時の吸光度とする。

生 物 試 料 分 析

表1 反応開始3.0分でエンドポイントを迎える試薬を用い、反応開始2.0分、2.5分と3.0分で測定した時の測定値と標準偏差

測定時間		試料	Glucose 濃度 (mg/dL)				
			100	200	300	400	500
2.0分	平均値		99.8	200.1	300.2	399.7	500.8
	(SD)		(0.3)	(0.4)	(0.6)	(0.5)	(0.8)
2.5分	平均値		100.1	200.7	300.1	400.2	500.2
	(SD)		(0.2)	(0.1)	(0.2)	(0.2)	(0.5)
3.0分	平均値		100.1	200.3	300.8	400.2	399.6
	(SD)		(0.2)	(0.2)	(0.3)	(0.4)	(0.8)

少なくなったとしても、反応開始後、一定の時間に測定していれば、正しい測定値が得られるし、精密性にも影響を表さないことが確認されたのです。

なお、試薬搬送チューブのつなぎ目に発生する試薬結晶の析出によって、試薬の吹き出し事故が発生することがあり、注意が必要です。問題の発生し易い試薬は経験上分かっているはずで、注意して下さい。また、試薬のキャリーオーバー（試薬中に添加された物質が次の測定反応管に混入すること）は深刻な問題を生じさせます。シングル・マルチ式の分析装置ではこの影響を回避するためのシステムが組み込まれていますので設定を忘れずに行ってください。

1-3. 恒温槽の温度設定

酵素反応は温度依存性が高いため、恒温槽の温度管理は重要です。50℃を超える高温になると、失活することがあるし、低くなると反応速度が低下します。しかし、恒温槽の温度が多少変化しても、物質濃度測定にはあまり影響が出ません。温度によって酵素反応が早くなった場合、エンドポイントが早く来るだけで、測定値に影響はありません。温度が低くなっても高くなっても、反応終了時間は変化しますが、前項で記述したように、反応が遅延しても影響がありません。式6のk1が低下しますが、CtがA0に比例することに関わりがなく、正しく測定できます。

1-4. 波長正確性

波長の正確さは測定値の正確性に影響は与えません。普通、吸収極大波長（吸収曲線のピークとなる波長）にて測定することが望めます。理由は感度が高く、精密度を上げることができるからです。また、極大吸収波長で測定した場合、様々な測定誤差に関する理論的解析が可能ですが、波長が相違すると解析出来なくなります⁹⁾。

1-5. 吸光度測定の直線性

ランバート・ベール法則に基づき、吸光度によって、定量分析を実施しています。しかし、吸光度が検出物質の濃度と比例関係がなくなれば、ランバート・ベール法則が成立できず、検量線が曲がります。全ての吸光度測定装置は無限大に直線性があるわけではありません。吸光分析を行ってはならない4つの注意点の中に、「吸光度が高すぎる場合」が入っています⁹⁾。要するに、全ての吸光度測定装置は測定限界（直線性を失う限界）があります。限界が発生する原因は迷光です。さらに難しいことに、「迷光の大きさは変化する」ことです。定期的にチェック（分析装置チェック法参照）し、測定可能範囲を正しく知ることが必要です。厳密には6ヶ月に1度チェックすべきでしょう。

迷光は少なくなることはなく、大きくなるだけです。その原因は湿気とホコリです。分析装置を部屋のコーナーに押し当てるように設置されていませんか。隅にホコリが貯まりやすく、修理の時

も大変です。部屋の中央に設置することが肝要です。平素、装置周りの清掃と整理整頓に心がけて下さい。

1-6. 吸光度測定 of 正確性

吸光度測定 of 正確性は、測定値 of 正確性に影響を与えません。理由は相対分析を行っているからです。標準物質を測定時も、検体を測定する際にも同じ誤差が発生するため、双方 of 誤差が相殺されるからです。

自動分析装置 of 分光器として、最も多く利用されているのが干渉フィルターです。一方、吸光度 of 正確性をチェックするためのフィルターが市販されています。しかし、このフィルターは、6ヶ月に一度 of 正確性のチェックが求められています。もしも吸光度 of 正確性が求められるのであれば、干渉フィルター of チェックを6ヶ月に一度実施するか、フィルター交換すべきなのでしょう。しかし、そのようなことを実施している施設は聞いたことがありませんし、必要性もないのでしょう。これこそ、吸光度測定 of 正確性を必要としていない証明だと思えます。

1-7. 分析装置 of まとめ

自動分析装置を用い、相対分析によって実施される日常検査法 of 正確度と精密度に影響を及ぼす性能についてまとめてみます。まずは正確度に影響を及ぼす因子は次の2つです。

(正確度に影響を及ぼす性能)

- ① サンプルノズル of 詰まり
- ② 吸光度測定 of 直線性 of 欠如

この2点については常時注意を払うべきです。サンプリングノズル of 問題は様々な解決法 of 試みがなされていますが、完全な回避法はありません。最新の医療では抗凝固薬を使用する治療法が増加しているため、いっそう発生頻度が増えています。また、ほんの少し of 詰まりであっても影響が出るし、さらに、サンプリング量が減少の一途をたどっている現状を考えると、とても大きな影響を測定値に与えることとなります。さらに、トラブル発生時、そのつどノズル of 清掃ができればよいのですが、ほんの少し of 時間であっても、分析の流れを止めることができないため、とても頭の痛い問題です。

次に精密度に影響を及ぼす因子は下記に示した要因です。これらの問題こそ、精度管理による早期発見が望まれます。

(精密度に影響を及ぼす性能)

- ① サンプリング量 of バラツキ、サンプリング量 of 減少
- ② 試薬分注量 of 変化
- ③ 恒温槽 of 温度正確性
- ④ 波長正確度

なお、分析装置 of 性能は個々の装置で相違します。また、使用によって、その性能が低下します。このため、各自 of 装置 of 性能を求めておいて下さい (分析装置 of 性能検定法を参照)。この稿では使用する分析装置 of 性能は次のようなものと仮定し、以下のシステムを構築します。なお、「正しく測定」と記した意味は「正確度と精密度を合計し10%以下 of 正確性にて測定できる」という意味です。10%以下を希望される方はそれぞれのデータに従い、応用して下さい。(表2)

表2 今回使用する自動分析装置で測定できる吸光度範囲と検出限界 (仮定)

測定できる下限 of 吸光度	0.005
吸光度分析 of 分析分解能 (正しく測定仕分けられる吸光度差)	0.001
測定できる上限 of 吸光度	2.000

この項 of 以下を記述するにあたって of 仮定としての数値。

生 物 試 料 分 析

表3 各種グルコース測定法による特異性

各種糖	酵 素 法			化学法
	HK法	GOD法	GDH法	OTB法
Glucose	100	100	100	100
D-Mannose	0	0	0	120
Galactose	0	0	0	190
Fructose	60	0	0	13
2-Deoxy-glucose	5	17	131	0
D-Xylose	0	0	0	3
D & L-Arabinose	0	0	0	2
Maltose	0	2	1	13
Saccharose	0	0	0	20
Glucosamine	0	0	7	69
Glutathione	0	0	1	0
Glucose 6-phosphate	100	0	0	8
Fuctose 6-phosphate	0	0	0	0
Galactose 6-phosphate	2	0	5	17
Glucose 1,6-di phosphate	0	0	0	0
Fuctose 1,6-di phosphate	0	0	0	0

2. 試薬と測定誤差の関係

2-1. 正確度を左右する試薬の問題

単一物質を測定する場合、正確な測定するため必要なことは次の2つです。

- ①特異性を有していること
- ②干渉反応を受けないこと

特定の物質を測定しようとしているのに、それ以外の物質を検出しては正確性を保つことができません。例えば、グルコースを測定しようとしている場合に、グルコース以外の糖を測定してしまったら正確度を欠きます。ヘキソキナーゼ法、グルコースオキシダーゼ法あるいはグルコースデヒドロゲナーゼ法にて様々な糖類を測定すると、検出される物質が多数ありました（表3）。ただし、臨床検査では血液中のグルコースを測定ごとに特化しているため、グルコース濃度に対して他の糖類がどの程度存在するのかを考慮する必要があります。ヘソキナーゼ法を用いた場合、グルコース6-リン酸（G6P）を100%検出することになるし、フルクトースの60%を検出することになります（表3）。しかし、血清中にG6Pは存在しませんし、フルクトースもほとんど存在しません。細胞内でグルコースから生成したG6Pは細胞膜を通過できず、腸管から吸収されたフルクトースは細胞へ迅速取込まれてしまうからです。もし、フルクトースが1.0 mg/dL存在したとして、どの程度影響を受けるのか計算してみます。影響を大きく受けるのはグルコース（分子量を180とします）濃度の低い場合です。そこでグルコース濃度を基準範囲下限付近の60 mg/dLであったとします。モル濃度に変換すると $60/180 \times 10 = 3.3 \text{ mmol/L}$ となります。同様にフルクトース（分子量を180とします）もモル濃度に変換すると $1/180 \times 10 = 0.056 \text{ mmol/L}$ となります。フルクトースの場合60%の検出ですから、フルクトースによって受ける正誤差はグルコース濃度に変換し、 $0.056 \times 0.6 = 0.034 \text{ mmol/L}$ 分となります。この誤差をパーセントで表すと $0.034/3.3 \times 100 = 1.03\%$ の正誤差が発生することになります。この誤差をどの様に考えるかは分析担当者としての皆さんの判断することだと思います。

この様に特異性に影響を及ぼす物質とその濃度がわかっていれば補正もできますが、影響物質の濃度を測定していないため、補正することができません。この誤差が許容されるかを考えることで

す。なお、フルクトースの影響を受けたくない場合、ヘキソキナーゼではなくグルコキナーゼを用いると、影響はなくなります。

さて、ヘキソキナーゼ法にて、反応時間を早くしたいために、ヘキソキナーゼを10倍多く用いたとします。グルコースを測定するための反応時間は1.5分に短縮できたとします。しかし、フルクトースに対する反応時間も短縮し、2.0分後に測定するとフルクトースの反応率が60%から100%に上昇することになり、特異性を悪化させてしまいます。要するに、特異性は使用する酵素の純度と添加量によって変化します。使用する酵素の純度は日々高なっているとしても、酵素を10倍も添加すると、特異性は大きく崩れます。正しい酵素の使い方は酵素にとって最も働き易い条件を与え、必要最小限の酵素を用いることが、物質定量でも要求されることです。

干渉物質の影響も同様で、後日、干渉物質の影響を除去しようとしても、干渉物質の濃度が測定されていない限り補正の方法がありません。30年前、酵素法ではなく、酢酸と硫酸を用いる化学法で総コレステロールを測定していた頃は、基準範囲上限は280 mg/dLか、それより高濃度と設定されていました。現在の基準範囲は大幅に低下しています。化学法は特異性が低く、ステロイド骨格を持った各種ホルモンや薬物の影響があったと思われるが、特異性の問題だけでなく、干渉の問題も含まれていたことは明らかです（ビリルビンが発色し、正誤差を与えました）。このため、酵素法以前のデータと酵素法のデータを比較することができません。

2-2. 測定反応はコンピュータ上で再現できる

測定反応が正しく反応しているのか、分析者の考えもしなかった反応が進行していないのかを明確にすることは正しい分析を行う上でとても大切なことです。理由はコンピュータで想定できる反応に従っているなら、正しい反応が起こっており、想定もしていない反応が生じていれば、正しい測定ができていないと推定できるからです。検量線や反応曲線が予測できることは前述の通りです¹⁰⁾。予測できない反応曲線になっていることは問題の発生を意味します。ヘキソキナーゼ法によるグルコース測定の反応曲線を予測し、使用酵素が失活した時、どのような反応曲線になるかは予測できません¹¹⁾。ところで尿酸定量反応は予測できるのでしょうか。

2-3. ウリカーゼ発色反応はどうして遅延するのか？

尿酸をウリカーゼで測定する方法は広く用いられていますが、尿酸とウリカーゼの反応はとても早いものに対して、尿酸定量反応ではとても時間を要しています。このことを最初に取り上げられたのは本学会名誉会長・野本昭三先生（信州大学）です。我々も直ぐに実験してみると、尿酸とウリカーゼの反応は1分程度で終了する条件とし、これにPODを加え、発色反応を連結させると、3分以上の時間を要するのです。この現象は、尿酸をウリカーゼとPODの両酵素が取り合うことにより、反応速度を極端に遅延させていることによります。私は「酵素による酵素活性の阻害」と称しています¹²⁾。同じような阻害反応はASTやALT活性測定でも見られます。

2-4. 試薬に関する問題のまとめ

試薬に問題が発生していることをいち早く教えてくれるのが反応曲線です。臨床検査で用いられている酵素反応は全てコンピュータ解析ができ、反応曲線を予測できると考えています。予測される反応曲線からずれた場合、問題が発生していることを表しています。具体的な反応曲線予測と問題発生時の反応曲線のズレ方に関しては各検査項目毎に記述することにします。多くの分析反応中には解析出来ない反応が多いと考える方がおられます。予測しにくい例として、上記2つの測定反応を記しました。コンピュータ解析と実際の反応曲線が合致しなかったことより発見出来た様々な問題もありました。具体的には今から20数年前、グルコース測定値が方法により差異がありました。平均値が最も低いのがヘキソキナーゼ法でした。理由は特異性にあると説明されていました。とこ

ろが、ヘキソキナーゼおよびグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）中にNADHオキシダーゼが混入していたことが原因でした。このことを公表し、改良していただきました。現在では、ヘキソキナーゼ法による測定値が他の測定法による測定値よりも高くなりました。これ以外にも硫酸懸濁液とした硫酸アニオンによってヘキソキナーゼが阻害されていること、リン酸によるG 6-PDへの阻害などが確認されました¹²⁾。要するに、実際の反応曲線と理論的解析で一致しない場合、分析者が念頭に入れていない、何らかの反応が生じているのです。未知の問題解析を行って下さい。理論と一致することで試薬の正確性が保証されます。

試薬の特異性欠如と干渉反応の問題については、試薬採択時に十分な吟味が必要です。試薬内に添加されている酵素が変更されたり、酵素量を変化させると、特異性も干渉反応も変化します。しかし、これに気付くことは大変難しいので、学会への参加やサーベイへの参加で、多くの方の情報を早期に集め、対処することが肝要でしょう。

3. 高い精密度で測定しなければならない濃度

通常、精度の高い測定と記載されることが多いですが、これ以降では精密度と限定します。もちろん精度とは「正確度と精密度」を併せた意味ですが、正確度に関しては、分析装置、試薬の両面で影響を及ぼす問題がほとんど無いからです。

さて、病気であるかないか、また、病気のステージを決定付ける濃度など、病態の分岐点となる濃度（診断基準、治療開始濃度やディシジョンレベルなど）付近では精密度の高い測定が求められています。医事紛争になった場合、治療の適切さが報告された測定値に左右されることがあるからです。

3-1. ディシジョンレベルについて

診断基準（糖尿病診断基準、ネフローゼ症候群の診断基準や治療開始領域など）や病態識別濃度（CKDのステージ分類やChild-Pughによる肝硬変の重症度分類など）は、適切な治療がなされていたのかを判断する際の重要な測定値となります。また、ディシジョンレベルという言葉はBarnettが精度管理の考え方で提唱したもので、重要な考え方であり、分析システムを構築する上で重要な情報です。一方、医療施設にはそれぞれの事情があり、それぞれの施設において、重要な判断基準となる濃度があります。重要なことは「施設の診療医がどの様な濃度を重要と考えているか」、「この濃度がどの様な背景から出てきた数値であるか」を知ることです。是非、臨床医の意見を聞き、施設毎の大切な濃度を特定して下さい。

3-2. 分析システムから推定できる精密度

精密度に影響を与えるものには次のような因子があります。

- ① 分析装置の再現性（ピペッティング、試薬分注量）
- ② 吸光度測定装置が有するノイズ（再現性）
- ③ 吸光度測定の分析分解能（検出できる最も小さい吸光度差）
- ④ 試薬に由来する再現性の低下
- ⑤ サンプル使用量

では、「精密度がどのように決められるか」について、考えてみましょう。現在、自動分析機においては、の試料ピペッティングや試薬分注量の再現性は極めて高くなっています、また、キャリアオーバーもほとんどなくなっています。もちろん、自施設の分析装置がどの程度の再現性か、調べることを勧めます。

②の吸光度測定のノイズは測定値の精密度に影響を与えます。吸光度が低くても高くてもこの影

響を大きく受けます。ここでは10%以下の再現性で測定するなら、吸光度0.005~2.000とします。

③は測定できる最小の吸光度差です。例えば、分析分解能が吸光度0.200付近で0.001ということは吸光度0.200と0.201は差を持って測定でき、中間の吸光度は測定できないという意味です。この吸光度が何mg/dLになるかを知ると、分析分解能が判ります。具体的にはここで使用する装置では吸光度0.001以下の差を測定できないため、式1を利用して、検出限界の物質濃度を計算することができます。

$$\text{物質濃度 (mg/dL)} = \frac{\text{吸光度変化量}}{\text{ミリモル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times \text{分子量} \times \frac{1}{10} \times 1000 \cdots \text{式1}$$

この式に具体的な測定条件を代入します。なお、測定物質の分子量は100、検出物質のモル吸光係数は 8.0×10^3 L/mol/cm、サンプル量 $5 \mu\text{L}$ 、試薬量 $200 \mu\text{L}$ にて測定するものとします。

$$\text{検出限界 (mg/dL)} = \frac{0.001}{8.0 \times 10^3} \times \frac{205}{5} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000 = 0.05 \text{ mg/dL}$$

この結果から、0.05 mg/dL以下の差を測定できないことがわかります。もう少し具体例を示しますと、濃度10 mg/dLの試料を用い、再現性を求めた場合、予測される変動係数(%)は次式で求められます。

$$\text{変動係数 (\%)} = \frac{0.05}{10} \times 100 = 0.5 \%$$

要するに、上記条件で測定した場合、標準偏差は0.05 mg/dL以下にはならないので、変動係数は0.5%以下にはならないことがわかります。実際に再現性を求め、これ以下の数値が出たととしても、分析学上の意味を持たない数値だと思います。

④はほとんど発生しませんが、試薬が原因で精密度を低下させることもあります。例えば、試薬中に濁度が生じた場合、吸光度測定にノイズを発生することになります。また、モル吸光係数の高い検出物質を使用する場合、保存により空気酸化を受けて試薬ブランクの吸光度が高くなります。吸光度が高くなると吸光度測定ノイズが上昇し、精密性を低下させる要因となります。

⑤の問題は③に示した式にサンプル量が入っていることで明らかです。

【測定例1】 下記に示す反応で、NADHの生成量を340 nmにて吸光度を測定し、物質A (分子量100)の濃度を測定した。NADHの340 nmにおけるモル吸光係数は 6.3×10^3 L/mol/cmとする。



試薬量を0.2 mL、サンプル量を0.002 mLとし、吸光度変化が完全に終了する前後の吸光度差 $\langle \Delta \text{Abs} \rangle$ を測定した。測定に用いた分光光度計で測定出来る最も小さな吸光度は0.001でした。測定出来る最小の濃度は幾らになるか。

(解答例) 式1に具体的な数値を代入し、測定出来る最小の濃度を求めると次のように計算できます。

$$\text{検出限界 (mg/dL)} = \frac{0.001}{6.3 \times 10^3} \times \frac{0.202}{0.002} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000 = 0.16 \text{ mg/dL}$$

この分析システムでは0.16 mg/dL以下の濃度差を測定できないことになります。50 mg/dLの試料を測定した時の変動係数(CV)は0.32%もしくはこれ以上になると推定できます。この様に推定したのは吸光度測定ノイズからのみ発生する再現性です。実際にはこれ以外に様々な原因で再現性が低下することを理解しておいて下さい。

【測定例2】 測定例1と同様に測定するが、サンプル量を $5 \mu\text{L}$ とすると分析分解能はどの様になるか。また、測定できる最小の濃度を推定しなさい。

(解答例) 例1と同様式1に、サンプル量のみを $5 \mu\text{L}$ (0.005 mL)とし、総反応液量を2.005 mLとし、測定出来る最小濃度を求める。

$$\text{検出限界 (mg/dL)} = \frac{0.001}{6.3 \times 10^3} \times \frac{2.005}{0.005} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000 = 0.064 \text{ mg/dL}$$

例1に比べると測定精度が2.5倍となります。要するにサンプル量を多くすると再現性が良くなり、少なくすると測定精度が悪くなります。同様に吸光度測定上限値を代入すると理解できますが、サンプル量を減らすと測定上限が高くなります。

次に、測定下限を求めます。吸光度測定下限が0.005であることより、同様に式1に代入すると、0.32 mg/dLとなります。

3-3. 標準偏差から求める分析分解能

分析結果から分析分解能を求める方法について記述します。極めて濃度の近接する試料を測定し、明らかに相違する濃度であると考えられることができる濃度差について考えてみましょう。相違する2つの試料を多重測定し、2つの平均値に有意差を示すと考えられるためには2つの試料を測定してヒストグラムの重なりが10%以下であれば、有意差があると言えます。分析した分布が標準正規分布をするとすれば、ヒストグラムの重なりが10%になる点のSDIは1.64SDとなります（図2）。2つのヒストグラムが互いに10%以下の重なりとなるためにはこの倍の3.28SD差がなければならないこととなります。具体的には10 mg/dLの試料を測定し、平均値10 mg/dLで、SDが0.1 mg/dLであったとすると、 $0.1 \times 3.28 = 0.328 \text{ mg/dL}$ が分析分解能となります。

4. 測定上限はどの様に決めるか

4-1. パニック値から考える

パニック値付近の測定値の場合、臨床医は早く結果を報告してもらいたいと考えるでしょう。ところが、中には「このようにとんでもない測定値は返せない」と思われる方がおられるのではないのでしょうか。確かに不安を感じるでしょう。しかし、不安を取り除いてくれるのは測定可能範囲を論理的に設定し、この範囲が維持できていることを常にチェックしておくことで、測定に自信を持つることになると思います。測定下限・上限を大幅に超える検体の場合には「測定可能範囲を大きく上回りましたので、正しい測定値を報告するためにはもう少し時間が必要ですが、測定上限値を

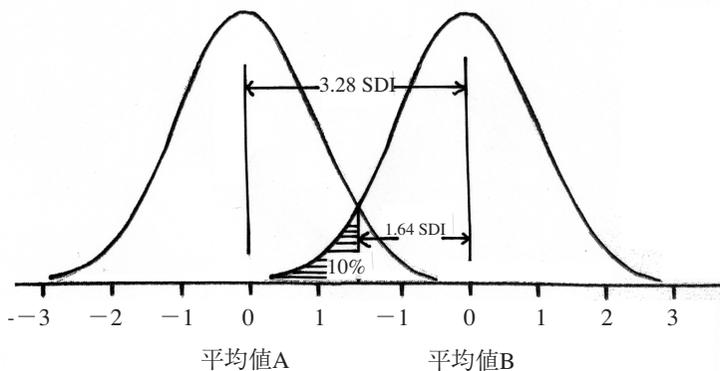


図2 2つの標準正規分布曲線の重なり

濃度差のほとんど無い2種の試料を測定した時のヒストグラム確率的に片側確率10%となるSDIは1.64%なる。このため2つのヒストグラムが互いに10%重なる点はおおよそ3.28SDIとなる。

上回る高値（低値）です。」と報告するべきだと思います。

具体的に記述すると、血液中のグルコース値のパニック値が500 mg/dLだとすると、600 mg/dL付近まで希釈することなく測定出来るようにすべきです。

4-2. 吸光度測定上限から考える

分光光度計には吸光度測定の上限があります。主として分光器の持つ迷光と光路長によって決定されます⁹⁾。上限が分かれば、自施設の性能に従い、計算して下さい。ここでは吸光度2.000まで測定出来るものとし、例題を解きます。

【測定例3】 測定例1と全く同じ方法にて物質Aを測定する。ただし、分光光度計の測定出来る最大の吸光度を2.000とすると、希釈することなく測定出来る濃度は幾らか。

(解答例3) 測定出来る吸光度の最大値が2.000であることより、式1に代入し、測定上限を求める。

測定上限はおおよそ320 mg/dLと推定できます。

$$\text{物質A濃度 (mg/dL)} = \frac{2.000}{6.3 \times 10^3} \times \frac{0.202}{0.002} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000 = 320.6 \text{ mg/dL}$$

4-3. 試薬によって発生する測定上限

試薬中には測定したい物質の濃度を超える試薬が添加されていなければ、測定できません。測定例3の場合で考えると、物質Aの濃度が320 mg/dLであれば、終濃度（反応最終段階の濃度）は0.32 mmol/Lのため、これ以上のNAD濃度が存在しなければ測定はできません。ところが、反応式に明確に記述されているに関わらず、試薬として添加しない物質については注意を欠いてしまうことがあります。具体的には反応液中に存在する溶存酸素の限界を忘れることがあります。溶存酸素量は反応溶液の温度によって決定されますが、通常37℃で測定することが多く、この温度では70 μmol/L程度です。したがって、測定物質の終濃度が70 μmol/L以下になるよう考えなければなりません。サンプル量を2 μL、試薬を2.0 mL添加するとすれば、測定できる上限は次のように計算できます。

$$\text{測定物質Aの濃度} \times \frac{0.002}{2.002} \leq 70 \mu \text{ mol/L}$$

$$\text{測定物質Aの濃度} \leq 70 \text{ mmol/L}$$

$$70 \times 100 \text{ (分子量)} \times 1/10 = 700 \text{ mg/dL}$$

この様に、測定限界を推定することができます。また、吸光度から考えると、フェノールと4-アミノアンチピリン(4-AA)を用いたキノン体（モル吸光係数は $1.2 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$ ）生成法では次式の吸光度が測定限界となります。

$$70 \times 10^6 \text{ (mol/L)} \times 1.2 \times 10^4 \text{ (L/mol/cm)} = 0.84$$

すなわち、吸光度がこれ以上になる場合は、反応は急速に低し、正しい測定が困難となります。用手法で測定している時には、反応液に空気中の酸素を吸収させ、反応を継続させ測定することができますが、自動分析法では一定の時間内に測定が実施されるため大きな誤差を生じることになり、溶存酸素濃度を無視できないのです。

4-4. 再検査率から設定すべき測定上限

測定可能範囲をオーバーする検体が出た場合、その検体を希釈して再測定することは当然ですが、その次に測定した検体はどれだけのキャリーオーバーを受けているのか想定できないため（濃度が測定出来ないほど高値であるため、どれだけ影響を受けているか推定できない）、再測定の必要があります。測定可能範囲をオーバーする検体が2.0%あったとすると、再検査しなければならない検体は4.0%です。20チャンネルの分析装置の場合、測定可能範囲をオーバーする検体が全ての検査項目で同時にオーバーするわけではないため、全測定項目で再検査率が4.0%もあると、全体では60～

70%の再検査率となってしまいます。これでは自動分析装置を担当する方は怒り出すでしょう。測定頻度を検索し、1.0%程度の再検査率となるようにすべきです。しかし、測定上限を上昇させることは精密度を低下させることです。例題を解き、考えて下さい。

【測定例4】測定例1と全く同じ方法にて物質Aを測定する。ただし、再検査率1.0%で測定するためには100 mg/dLまで希釈することなく測定したい。サンプル量をどの様にすべきか。なお、 ΔAbs は1.000で、試薬は0.20 mL添加するものとし、サンプル量は1.0 μ L以下は取れないものとする。

(解答例4) 100 mg/dLを希釈することなく測定したいことより、式1に代入し、サンプル量 (s) とし立式する。

$$100 \text{ (mg/dL)} \leq \frac{1000}{6.3 \times 10^3} \times \frac{0.20 + s}{s} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000$$

$$s \leq 0.0032 \text{ mL}$$

サンプル量 (s) を3.0 μ Lとすれば良いことになります。

なお、 ΔAbs に測定出来る最小吸光度 (0.001) を代入すると、測定下限が計算できます。このときサンプル量を5.0 μ Lとすると、0.064 mg/dLの差を正しく測定出来ますが、3.0 μ Lとすると、正しく測定出来るのは0.11 mg/dLの差ということになり、サンプル量を5.0 μ Lにすることで、再現性が5/3大きくなることが予測されます。

5. 測定下限はどの様にして決まるか

5-1. 吸光度分析の分析分解能から決定する方法

正しく測定できる吸光度差がわかれば、測定出来る最小濃度を推定することができます。吸光度によって測定誤差が変化することは分析機器の項に記した通りです⁹⁾。図2より、10%以下の精密度を確保できる吸光度を知ることができます。これを式1に代入して得られた結果が測定出来る最小の濃度になります。

(エンドポイントで測定する場合の測定下限)

正しく測定できる吸光度差を0.005、検出物質A (分子量100) のモル吸光係数を 5.0×10^4 L/mol/cm、サンプル量5.0 μ L、試薬量200 μ Lとすると次のように計算できます。

$$\text{検出限界 (mg/dL)} = \frac{0.005}{5.0 \times 10^4} \times \frac{205}{5} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000 = 0.041 \text{ mg/dL}$$

5-2. 同時再現性から求める

4-3に記述した方法でも測定下限を求めることができます。希望として設定している測定下限よりやや高濃度の試料を調整し、最低10回測定して平均値とSDを求めて下さい。得られたSDに3.28を乗じると測定下限付近での分析分解能が求められます。目的として分析分解能をクリアしていれば測定下限が目的通り設定できていると言えます。また、SDと平均値から変動係数 (CV) を求め、10%以下ならOKとも考えられます。

さらに、臨床精密度の求められる濃度においても同様の測定を行い、目的が達成できているかを判定して下さい。

6. エンドポイントアッセイの分析システム構築例

－血清中グルコースの定量－

血清中グルコースをヘキソキナーゼ法にて測定する具体的な分析システムについて記述します。

6-1. 高い精密度を求められる濃度とパニック値

高い精密度の求められる濃度は次の2濃度です。

①126 mg/dL付近

②200 mg/dL付近

①は空腹時の診断基準、②は随時超えてはならない濃度です。

パニック値は次の2濃度です。

①40～50 mg/dl以下、

②500 mg/dl以上

新生児の基準範囲は50～60 mg/dLですが、40 mg/dLより低値になると、痙攣を起こしたり、放置すると脳障害を発症することがあります。成人でも50 mg/dL以下となると、意識障害を発生させることがあります。一方、500 mg/dL以上でも意識障害を発生させることがあり、①、②いずれも速やかな報告が求められます。

6-2. 分析担当者として考える精密度と測定可能範囲

測定者として、以下の精密度は確保したい。

①1.0 mg/dlの差を正確に測定できること。

②再検査率を1.0%とするために、600 mg/dLまでは希釈することなく測定したい。

6-3. 分析に関する要望の整理

測定上限値 600 mg/dL

測定下限値 30 mg/dL

正しく測定出来る最小の濃度差 1 mg/dL

120 mg/dLから200 mg/dL付近で5.0%以下の再現性にしたい。

(標準偏差を1.2～2.0 mg/dL以下としたい)

また、グルコースの分子量は180、NADHのモル吸光係数は 6.3×10^3 l/mol/cmとし、サンプルは1.0 μ L刻みでしか取れないこととし、試薬量は200 μ Lとします。

6-4. 分析段数から大まかな分析計画を立てる

正しく測定仕分ける濃度差を1.0 mg/dLとした場合、測定上限と測定下限は5 mg/dLと1,995 mg/dLとなります。測定上限が高すぎるため、約1/2にすることが可能なので、分析分解能を0.5 mg/dLとします。この条件で120 mg/dLおよび200 mg/dL付近で再現性0.25～0.42%で測定可能と推定できます。よって、0.5 mg/dL差を正しく測定できる測定条件を設定すれば良いこととなります。式1にこの条件を代入し、サンプル量 (x) をどの様にすれば良いかを計算します。

$$0.5 \text{ (mg/dL)} \leq \frac{1000}{6.3 \times 10^3} \times \frac{0.20 + x}{x} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000$$

$$x \geq 0.000635 \text{ mL}$$

サンプル量を0.6 μ L以上とすれば良いこととなります。一方、測定上限を800 mg/dL以上にするためのサンプル量を求めます。

$$800 \text{ (mg/dL)} \geq \frac{2.000}{6.3 \times 10^3} \times \frac{0.200 + x}{x} \times 100 \times \frac{1}{10} \times 1000$$

$$x \leq 0.000797 \text{ mL}$$

サンプル量を0.8 μ L以下にすれば良いこととなりますが、自動分析装置の性能から1.0 μ L以下のサンプル量に設定できないため、0.5 mg/dLの差を正しく測定出来るシステムを構築できません。し

たがって、サンプル量を1.0 μ Lと設定した時の分析分解能を求め直すと、約0.3 mg/dLとなります。

6-5. 作案の確認

それぞれの要望に合致しているかを確認しましょう。

①低濃度のパニック値 (40 mg/dL) 付近での測定再現性

測定下限は式1に測定できる最小の吸光度0.005を代入すると約1.6 mg/dLであるため、40 mg/dLは十分測定できるはずですが。また、分析分解能が0.3 mg/dLであるため、40 mg/dL付近の試料を作成し、少なくとも10回測定し、平均値、SDを求めます。

②臨床高精密度の要求される126および200 mg/dLにおける精密度

126 mg/dLと200 mg/dLを測定した時の吸光度を求めると、126 mg/dLの時の吸光度は0.395で、200 mg/dLの時は0.627と予測できます。この吸光度は図1から、十分精密に測定できる範囲であり、分析分解能が約0.3 mg/dLであることから、精密度も推定できます。

③測定上限600 mg/dLの再現性

測定時の吸光度は1.88と推定できます。吸光度が高いため、精密度は低下すると推定できますが、実際にどの程度の精密度になるかを540～590 mg/dLの試料を調製して、データを取って下さい。

以上の結果から、目標とした要望はほぼ満足できる測定が可能と考えられます。しかし、ここで記述した誤差の原因は吸光度測定の誤差だけです。実際の測定においては試料に由来する濁度、ビリルビン濃度、溶血の問題や薬物の問題などを勘案しなくてはなりません。これらによって発生する誤差を見抜く方法については別途記述する予定ですが、有効な手段の一つが過去の測定値との対比であると思います。

今回は取り上げなかったが検体によって発生する誤差もある。各項目で記述する。

引用文献

- 1) 小川善資, 有馬裕美, 有末一隆他: LPL(ONO)によるコレステロール、トリグリセライドの同時測定の試み. 臨床病理, 23: 239, 1975.
- 2) 片山善章: 臨床検査技術の評価. 分析機器・試薬アナリスト認定講習会, 平成22年度版: 5-17, 2010.
- 3) Bergmeyer HU, Reaction kinetics, 95-103, Method of enzymatic analysis, first ed. by Bergmeyer, HU ed, Academic Press Inc, New York, (1974)
- 4) McClure WR: A Kinetic analysis of coupled enzyme assays. Biochem, 8: 2732-86, 1969.
- 5) Michaelis L, Menten MML: Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem, Z, 49: 333-69, 1913.
- 6) Horio T, Takagawara I, Yamauchi J, Yoshimura S: Kinetic analysis of enzyme activity. Jap J Clin Chem, 5: 1-12, 1976.
- 7) Takagawara I, Yamauchi J, Fujii K, Horio T: Theoretical and experimental analysis of coupled enzyme reaction. J Biochem, 93: 1145-57, 1983.
- 8) 小川善資他: 相対分析法によるグルコース測定において試薬の異常と測定値に及ぼす影響. 準備中
- 9) 網沢義夫: 分光光度計の精度に関連する諸因子と光源; 分光器の構造、特徴について. 生物試料分析, 2, 1-22, 1980.
- 10) 小川善資: 正確度の検証法(1)ー分析反応と理論とは一致しているのか、ー検量線の予測ー. 生物試料分析, 35: 184-7, 2012.
- 11) 小川善資: 正確度の検証法(2)ー分析反応と理論とは一致しているのか、ー反応曲線の予測ー. 生物試料分析, 35: 254-64, 2012.
- 12) Ogawa Z, Kanashima M, Nishioka H: Improvement of the quantitative method for glucose determination using hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. Clin Chem Lab Med, 39(5): 396-400, 2001.