

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その10）〉

## 精度管理問題集

小川 善資、池谷 均、沼上 清彦

### 問題編

問題1 精度の中には2つの要素がある。何と何の要素か。2つ選べ。

1. 精密度
2. 精製度
3. 清算度
4. 正確度
5. 正規度

問題2 標準物質を用いる自動分析において、正確度を大きく左右するのは何か。

1. トランスファビリティ (transferability)
2. リピータビリティ (repeatability)
3. トレーサビリティ (traceability)
4. プレシジョン (precision)
5. バリデーション (validation)

問題3 正確度を知る方法はどれか。

1. 認証値を持つ標準物質を測定し、正確値と測定値の距離を知る。
2. 市販管理試料に表記された表示値と測定値の距離を知る。
3. 外部精度管理サーベイに参加し、他施設の測定値との距離を知る。
4. プール血清を測定し、日々の測定値の変化を知る。
5. 内部精度管理で、日内変動を知る。

問題4 日常検査において、自動分析を用い、標準物質を購入し、グルコース濃度を測定している。次のうち正しい文章はどれか。2つ選べ。

1. 恒温槽の温度が2℃低下し、所定の反応時間に反応が終了しなくなっても、正しい測定値が得られる。
2. 検体毎にサンプリング量の変動があっても測定値に影響を与えない。
3. アンプリングノズルに凝固塊が引っかかり、数検体、サンプリング量が10%低下した。しかし、この数検体も、誤差なく測定されている。
4. 試薬に含まれる酵素が失活し、約半分になっても、標準物質測定と検体測定に、同じ試薬を用いれば正確に測定できる。
5. 標準物質に落下細菌が混入し、グルコース濃度が低下したが、正しい測定値が得られる。

## 生物試料分析

問題5 精密度を表す指数はどれか。2つ選べ。

1. 標準偏差
2. 相関係数
3. 回帰式の傾き
4. 系統誤差指数
5. 変動係数

問題6 標準偏差と変動係数に関して正しいのはどれか。

1. 変動係数は係数であり、精密度を知ることができない。
2. 標準偏差は標準値に関わりなく、偏差を知ることができる。
3. 標準偏差は正確度と再現性の合わせたものを表す。
4. 平均値に左右され難い再現性を示すのが変動係数である。
5. 変動係数は日内変動ではなく、日差変動を示す。

問題7 外部精度管理法によって、正確度がチェックできない理由は何か。

1. 参加者の平均値が基準だから
2. 参加施設が少ないから
3. 全ての施設が同じ測定方法を用いていないから
4. サーベイ試料がヒト血清と相違するから
5. サーベイ試料の安定性が悪いから

問題8 標準液を用い、自動分析装置にて測定を実施している。 $\bar{x}$ -R管理図法の意義として、正しいのはどれか、2つ選べ。

1. 報告している測定値の再現性を表せる。
2. 分光光度計のわずかな測定誤差を見い出せる。
3. 試薬の分注量が10%少なかった。この誤差を見いだせる。
4. サンプル採取量の誤差を監視できる。
5. 報告している測定値の継続性を表せる。

問題9 標準液と自動分析装置を用いた相対分析にて酵素活性を測定している。誤っている文章はどれか。2つ選べ。なお、標準液に添加されている酵素はヒト血清中の酵素と同じ温度依存性を有するものとする。

1. 反応温度の多少のズレは測定値の正確性に影響しない。
2. アイソエンザイムの比率に関わらず、正しく測定できる。
3. 反応スタートから測定までの時間と測定終了時間は一定でなくてはならない。
4. 活性によって、測定時間を変えることができる。
5. 標準液の酵素安定性と検体中の酵素安定性は相違することがある。

問題10～12 グルコースオキシダーゼ (GOD) とペルオキシダーゼ (POD) を用い、4-アミノアンチピリンとフェノールを縮合させたキノン体 (モル吸光係数 $1.2 \times 10^4$  L/mol/cm, 500 nm) を測定し、グルコース濃度を求める方法で添加回収試験を行った。操作法はサンプル $30 \mu$ Lと試薬1.97 mlを加え、37℃にて5分間反応させ、500 nmにて光路長1.0 cmのセルで吸光度を測定した。標準物質にも試薬にも500 nmにおける吸光度はなかった。100 mg/dLの標準液を測定した時の吸光度は0.500で、200 mg/dLは吸光度1.000であった。また、プール血清を測定すると80 mg/dLであった。この血清100 mLにグルコース100 mgを加え、十分混和し、反応させたところ、吸光度が0.800となった。反応は完全に

終了していた。設問に答えなさい。

なお、反応曲線に問題はなく、5分間で反応は完全に終了し、測定時間後の吸光度変化も認められなかった。

問題10 上記の標準物質の測定結果から、グルコース測定について、正しいのはどれか。

1. 正確な測定ができています。
2. 反応が終了していない可能性がある。
3. 標準物質が10%劣化している。
4. 吸光度測定に問題がある。
5. サンプリング量に問題が発生している。

問題11 回収率は何%になるか。

1. 70%
2. 75%
3. 80%
4. 90%
5. 100%

問題12 この回収率の結果から、どの様なことが生じていると想像できるか。正しい推測を2つ選べ。

1. 正確に測定できている。
2. グルコースを正確に測定できない方法である。
3. プール血清中に発色反応を妨害する物質が存在する。
4. 標準物質に測定反応を妨害する物質が存在する。
5. プール血清中にGODを阻害する物質が存在する。

問題13~14 ヘキソキナーゼ (HK) とグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) を用い、グルコース濃度をエンドポイントにて求めた。反応は所定の時間内に終了した。測定は最終生成物であるNADHで、モル吸光係数は $6.3 \times 10^3$  L/mol/cmで、光路長1.0 cmのセルを用いて測定した。以下の設問に答えなさい。

なお、測定方法は試薬 I 150  $\mu$ L とサンプル10  $\mu$ L を混和し、37℃にて5分間予備加温し、試薬 II 50  $\mu$ L を加え、3分間37℃にて反応させ、試薬 II 添加前後の吸光度差からグルコース濃度を求めた。なお、グルコースの分子量は180とする。

問題13 180 mg/dLのサンプルを測定した。試薬 II 添加後の吸光度差はいくらになると予想されるか。

1. 1.5
2. 2.0
2. 2.5
3. 3.0
4. 4.5

問題14 再現性5%以下で測定できる最小の吸光度が0.01とする。再現性5%以下で測定できるグルコース濃度 (mg/dL) はいくらになると考えられるか。

1. 0.6 mg/dL

## 生物試料分析

2. 1.2 mg/dL
3. 1.8 mg/dL
4. 3.0 mg/dL
5. 3.6 mg/dL

問題15 測定可能な最大の吸光度が4.0で、試薬にもサンプルにも吸光度を有するものが無かったものとする。測定できる最大のグルコース濃度はいくらと予測されるか。

1. 240 mg/dL
2. 360 mg/dL
3. 480 mg/dL
4. 960 mg/dL
5. 1200 mg/dL

問題16 測定上限を2倍に上げたい。試薬、分析機器をそのままにして、測定操作法のみを変更して対応したい。どの様にすれば良いか適切なものを選び。

1. 試薬Ⅰと試薬Ⅱ添加順序を変える。
2. 試薬Ⅰ添加量を150  $\mu$ Lから75  $\mu$ Lに変える。
3. 試薬Ⅱ添加量を100  $\mu$ Lに変更する。
4. 試薬Ⅰと試薬Ⅱの使用量をともに1/2にする。
5. サンプル量を1/2にする。

問題17～20 クレアチニンを酵素法にて測定した。クレアチナーゼ、サルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼを用いた発色法で測定した。反応は5分以内に完全に終了し、試薬Ⅱ添加前後の吸光度差を測定したものとする。発色物質のモル吸光係数は $5.0 \times 10^4$  L/mol/cmであった。また、 $H_2O_2$  2分子から、1分子の発色物質が形成される。下記の設問に答えなさい。

なお、測定方法は試薬Ⅰ150  $\mu$ Lとサンプル10  $\mu$ Lを混和し、37℃にて5分間予備加温し、試薬Ⅱ50  $\mu$ Lを加え、3分間37℃にて反応させ、試薬Ⅱ添加前後の吸光度差からクレアチニン濃度を求めた。なお、分子量は100（本当は113.12ですが、この演習では100として下さい）とする。

分析機器の性能は再現性5%以下で測定できる最小の吸光度が0.01、正しく測定できる吸光度差（分析分解能；再現性5%以下の再現性）は0.001とする。また、使用している分析機器による測定できる最大の吸光度は3.0とする。

問題17 正しく測定仕分けられる濃度（分析分解能：mg/dL）はどの程度と考えられるか。

1. 0.004 mg/dL
2. 0.008 mg/dL
3. 0.04 mg/dL
4. 0.08 mg/dL
5. 0.4 mg/dL

問題18 この条件で、測定上限はどの程度と考えられるか。

1. 12 mg/dL
2. 25 mg/dL
3. 36 mg/dL
4. 50 mg/dL
5. 60 mg/dL

問題19 分析段数はどの程度あると考えられるか。

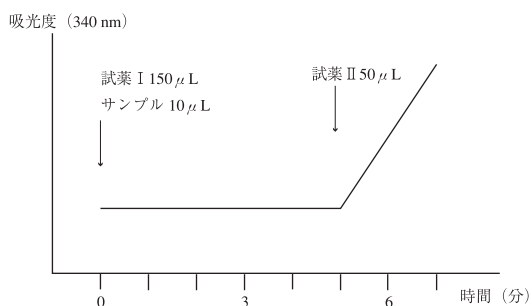
1. 29段
2. 299段
3. 300段
4. 2990段
5. 3000段

問題20 クレアチニン濃度が1.0 mg/dLのコントロール血清を用いて再現性を求めた。CVはどの程度になると推定されるか。

1. 0.05%以下
2. 0.1%以下
3. 1.0%以下
4. 2.5%以下
5. 5.0%以下

問題21～22 標準液を用いた相対分析にて乳酸デヒドロゲナーゼ (LD)活性を測定 (L→P法) する精度管理において、コントロール血清の測定値はいつも通り100 U/Lであった。しかし、コントロール血清の測定値が0.035/minであった。反応曲線は図のような結果であった。下記の設問21、22に答えなさい。

なお、試薬 I 150  $\mu$ L は緩衝液と NAD で、サンプル 10  $\mu$ L と混和し 5 分間反応させ、試薬 II 50  $\mu$ L 添加後、2 分間 340 nm にて吸光度変化を測定したものとする。また、NADH モル吸光係数は  $6.3 \times 10^3$  L/mol/cm とする。設問に答えなさい。



(図 1)

問題21 100 U/Lの試料を正しく測定したとすれば、吸光度変化量はどの様になるか。

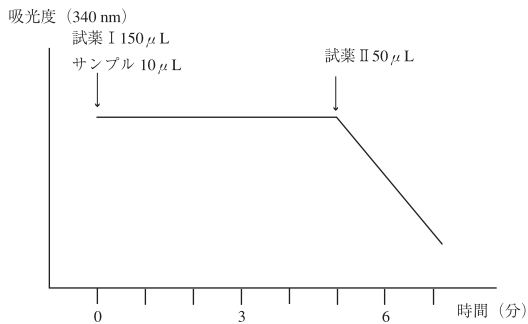
1. 0.03/min
2. 0.06/min
3. 0.09/min
4. 0.3/min
5. 0.06/min

問題22 下記の中に原因がある場合、最も可能性が高いのは分析機器・試薬のどの部分と思われるか。2つ選べ。

1. サンプル中にブランク反応を生じさせる物質が発生した。
2. 試薬が劣化し、正しい反応速度が得られなくなっている。
3. 反応槽の温度管理に問題が発生し、設定温度 (37℃) より高温になっている。
4. 分光光度計の吸光度測定装置に異常が発生し、誤って低値に測定されている。
5. 試料のサンプリング部分に問題が発生し、試料を多めにサンプリングしている。

問題23、24 標準液を用いた相対分析にて乳酸デヒドロゲナーゼ (LD) 活性を測定 (P→L法) する精度管理において、ロットの相違するコントロール血清を測定したところ、測定値が表示値より高値になった。慌てて、精製水をブランクとする測定値とコントロール血清の測定値をチェックしたが、問題は見られなかった。そこで、コントロール測定の反応曲線を見た (下図)。下記の設問に答えなさい。

なお、試薬 I 150  $\mu$ L は緩衝液と NADH で、サンプル 10  $\mu$ L と混和し 5 分間反応させ、試薬 II (ピルビン酸) 50  $\mu$ L 添加後、2 分間 340 nm にて吸光度変化を測定したものとする。また、NADH モル吸光係数は  $6.3 \times 10^3$  L/mol/cm とする。下記の設問に答えなさい。



(図 2)

問題23 サンプル中にピルビン酸が入っている。このため、反応開始液としてピルビン酸溶液を選択すると、反応開始液添加前から LD 活性がスタートする。この問題に関して正しいのはどれか。

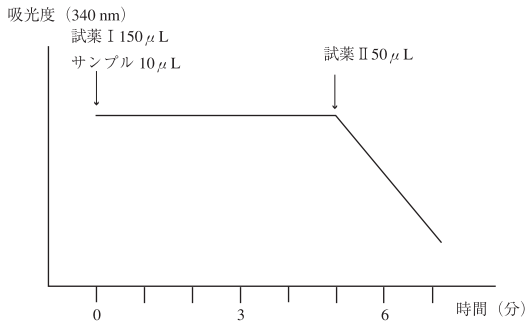
1. 試薬 II 添加前に試薬ブランクを測定してはいけない。
2. ピルビン酸溶液を反応開始液に選択してはいけない。
3. 検体ブランクを測定してはいけない。
4. NADH 溶液を反応開始液に選択しなくてはならない。
5. 検体ブランクを正しく測定することができない。

問題24 500 U/L の標準物質を用いていた。この反応曲線にも問題がなく、反応速度にも問題がなかった。新しいロットのコントロール血清測定に、どの様な問題が発生していると考えられるか。

1. ブランク反応を発生させる物質があった。
2. 濁度があり、試薬によって濁度が変化した。
3. LD 活性が高かった。
4. グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が高かった。
5. 蛍光を発生させる物質が混入していた。

問題25、26 標準液を用いた相対分析にてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性を測定 (JSCC法) する精度管理において、コントロール血清の測定値はいつも通り 100 U/L であった。しかし、コントロール血清の測定値が 0.036/min であった。反応曲線は図のような結果であった。下記の設問に答えなさい。

なお、試薬 I 150  $\mu$ L は緩衝液と NAD で、サンプル 10  $\mu$ L と混和し 5 分間反応させ、試薬 II (2-オキソグルタル酸) 50  $\mu$ L 添加後、2 分間 340 nm にて吸光度変化を測定したものとする。また、NADH モル吸光係数は  $6.3 \times 10^3$  L/mol/cm とする。



(図 3)

問題25 コントロール血清の測定結果からどのような問題があったと推定できるか。可能性のあるものを選び。

1. 試薬ブランクが発生していた。
2. 検体ブランクが発生していた。
3. 共役酵素の劣化が発生していた。
4. 基質の劣化が発生していた。
5. コントロール血清の酵素が失活した。

問題26 試薬 I の340 nmにおける吸光度が1.0であった。NADH以外の試薬で、試薬 I 中に含まれる試薬には吸光度はなかった。試薬 I に添加されていたNADH濃度はいくらか。

1. 0.08 mmol/L
2. 0.10 mmol/L
3. 0.16 mmol/L
4. 0.20 mmol/L
5. 0.40 mmol/L

問題27 標準物質と自動分析装置を用い、相対分析にて酵素活性を測定した。この時、±10%程度、同じ誤差が連続して発生していた。測定値に影響与える可能性のあるものはどれか。

1. サンプル量
2. 吸光度測定値を低値に測定した。
3. 恒温槽の温度
4. 測定時間
5. 基質濃度

## 解答編

問題 1 正解 1, 4

精度は正確度と精密度の2つの要素から成立している。正確度は測定値が真の値からの距離を知ること。精密度は再現性の高さで、精度とは正確でしかも精密度の高いこと。

臨床検査分野においては測定値を利用する上で、必要な精度がある。病気という観点から、検査項目毎に許容範囲がある。 $10^{-3}$ mol/Lレベルの相違で病気を発見できることもあれば、 $10^{-15}$ mol/Lレベルまで測定しなければならないこともある。測定項目毎に、診療医の要望がある。この要望に添った許容範囲を設定し、測定精度を考えなければならない。この考え方を具体的に示した最初の方がBarnettである。



問題 2

正解 3

標準物質を用いた自動分析法において、正確度を決定するのは標準物質に付けられた基準値です。自動分析を用いた現在の分析法においては標準液と検体を平衡して測定し、相対的に、検体中の様々な物質濃度を求めます。この様な分析においては試薬や分析機器の多少の異常が発生しても、正確な測定値を求められる。このことをトレーサビリティと称す。反応温度、サンプリング量や一部試薬の多少の異常などがあっても、正しい測定値が得られる。もちろん、異常の内容や程度によって、正確度が保証できなくなる問題もあります。一般的に物質定量においては問題が少ないのですが、酵素活性測定のような場合、補正できない問題が発生します。例えば、標準物質の中に添加されている酵素の温度依存性と、検体にて測定される酵素の温度依存性が一致しない場合、正確な測定値は得られなくなる。具体的には標準物質に用いられた酵素が温度依存性が無く、35℃で測定しようと、37℃で測定しようと、同じ活性を示すが、検体中に多く存在する酵素が35℃と37℃では35℃の方が10%活性が低くなるとすると、誤って35℃にて測定すると、10%低値に測定してしまう。同様に、試薬異常によっては誤差が発生したり、しなかったりするため、検査項目毎、測定方法毎に具体的な問題を勉強してください。認定講座ではなるべく具体的に記述する方針で、各論が書かれています。なお、唾液腺由来アミラーゼは多少の温度変化によって活性は変わりません。

問題 3

正解 1

一定の割合で、正確度をチェックする方法は幾つかあります。しかし、最も簡単で、問題なく正確度を知るための方法は認定標準物質 (SRM) や酵素標準物質 (ERM) を測定し、自身の測定値との距離を知る方法です。SRMやERMに関する質問で、「濃度の相違する標準物質をどうして販売してくれないのか」という質問があります。1濃度であるのは正確度を測る目的で作成されているからです。

問題 4

正解 1, 4

相対分析法を用いて測定する場合、恒温槽の温度、サンプリング量の正確性、反応時間の正確性などに多少の誤差があっても、標準物質を測定する場合と検体を測定する場合に、同じ誤差が発生しているのなら、正確性は保たれます。反応が終了していなくとも、試薬が劣化し、所定の反応時間内に反応が終了していなくとも、正しい測定値が得られます。参考文献をご覧ください。データも示しております。ただし、コレステロール測定のように、測定すべき物質が単一ではなく、複数の物質を同等に測定したいときには正確性が保証されなくなります。例えば、コレステロールエステラーゼはコレステロールに結合している脂肪酸によって水解速度が相違します。具体的に言えば、オレイン酸などには働き易いのですが、短鎖の脂肪酸や長鎖の脂肪酸には作用速度が低下します。十分な酵素と十分な時間をかけると、問題なく定量できますが、時間や酵素が不足すると、標準物質の脂肪酸組成と検体中の組成が一致しないと、正確性は保てなくなります。また、血清中に存在する干渉物質を除去する様な反応系を利用している場合にも、正確性が脅かされる可能性があるため注意が必要です。

また、標準物質にて正確性を担保しているわけですから、標準物質に問題が発生すれば、正確度を維持できるはずがありません。①標準物質の密閉、②標準物質にピペットを入れない、③できうる限り低温保存し、溶解・開封日にのみ使用する。など、様々な約束事を決めて使用する必要があります。

問題 5

正解 1, 5

標準偏差は精密度 (再現性) を表します。変動係数は標準偏差を平均値にて割り算し100を乗じ



た数値ですから、精密度を表します。相関係数は2つの事象を表す数値の回帰式との距離（偏微分値）を表したもので、精密度とは何の関係もありません。回帰式は2つの事象を表す数値の関係を最も合理的に表す関係式（最も相関係数を小さくさせる直線式か曲線式）の傾き。精密度とは関係がない。系統誤差は一定の傾向を持った誤差で、様々な補正法や数式化が考えられているが、一般的な指数として計算できる方法はない。このため、系統誤差指数という言葉の定義はない。

問題6 正解 4

変動係数は標準偏差を平均値で割り、100を乗じた数値。平均値が小さいと標準偏差も自動的に小さくなります。標準偏差だけで精密度を評価されるのであれば、なるべく平均値の小さな物質を測定すると偏差値は小さくなり、精密度があたかも小さいように見せることができる。そこで、平均値に左右されることなく精密度を知るために、標準偏差を平均値に対する相対値で表記する方法が変動係数です。平均値に左右されることなく精密度を知ることができる。

正確度は標準偏差でも、変動係数でも知ることができない。再現性（精密度）が悪ければ必然的に正確度も悪くなる。しかし、精密度が高いことは正確度の高いこととは直接関係がない。

問題7 正解 1

参加者の平均値を基準にすることが一般的であるため、正確度の規準となりにくい。近年、ターゲットバリュを設定し、この値との距離から一定の正確度を知る方法が採用されているサーベイが増えている。

酵素活性測定の場合、基質が相違すると得られる活性は全て相違する。このため、同じ物差しにて比較することはできない。物質定量に関しても、さまざまな問題から、測定方法毎に測定値が相違する検査項目もある。このため、測定方法を超えて、安易に測定値を比較できない。

サーベイ試料はヒト血清を使用したり、それ以外の溶液であったり、様々である。ヒト血清か否かで正確度を議論できない。ただ、サーベイ試料として重要なことは安定性の高いことで、サーベイ用試料には様々な添加物が加えられたり、一部の血清成分を消去したり工夫されていることが多い。しかし、この工夫が、さまざまな問題を引き起こすことがあるため、一概に良否を結論できない。

問題8 正解 1, 5

x-R管理図法による管理において、測定値の再現性を表わせる。これを日々行うことによって、測定値が継続して安定な測定値を提供していることを表せる。

標準液を用いた相対分析においては試薬や分析機器の多少の問題を見出すことができない。サンプリング量もサンプリングできなく程の問題が発生すると発見できるが、多少の誤差はチェックできない。

問題9 正解 2, 4

相対分析で酵素活性を測定する場合、反応温度に多少にズレがあっても、誤差は相殺される。ただ、標準液に添加された酵素と測定試料の酵素が同じ温度依存性がある場合に限られる。アイソエンザイムの比率が偏っている場合、アイソエンザイムの温度依存性が相違すると正確度は保てなくなる。動物由来の酵素などでは温度依存性が相違することが多く、何度も問題を生じさせている。また、ヒト由来の酵素であっても、温度依存性の相違するアイソエンザイムを標準液に用いると同様な問題が発生する。

酵素活性測定で最も大切なことは反応開始から一定時間に測定することである。活性によって測定時間を変化させてはならない。かつては活性によって測定時間を変更する装置があった。誤った

## 生 物 試 料 分 析

操作法である。生成物阻害の大きな酵素や基質阻害の大きなこくでは大きな誤差を招くことになる。

検体中では不安定な酵素でも、標準物質の中では安定性が極めて高い酵素が多い。この原因は血清中には様々な物質が混在しているからである。具体的にはケレアチンキナーゼ（CK）は検体中で不安定であるが、標準物質中では安定である。これは尿酸によるもので、標準液には尿酸が添加されていないことが多い。「標準物質と検体の安定性が相違すれば、正しい活性が求められなくなる。」と考えられる方が多いかもしれないが、標準物質を使用するのはキャリブレーション時だけであるため、問題を起こさないことが多い。もちろん、検体中の安定性と、その対策は十分知っておかなくてはならない。

### 問題10～12

正解      6-10   1            6-11   3  
                 6-12   3, 5

一般に酵素反応により、基質 1 mol から生成物 1 mol が生成する場合は式①で示することができる。

$$\text{物質濃度 (mg/dL)} = \frac{\text{吸光度変化量}}{\text{モル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times \text{分子量} \times 100 \cdots \text{式①}$$

GOD-POD法にてキノン体を形成させた場合、グルコース 1 分子から 1 分子のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が産生される。次に 1 分子のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>から 1/2 分子のキノン体が作られる。このため、吸光度変化量とグルコース濃度の関係は次式で表される。

$$\text{グルコース濃度 (mg/dL)} = \frac{\text{吸光度変化量}}{\text{モル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times \text{分子量} \times 100 \times 2$$

100 mg/dL 標準物質を測定した場合の吸光度変化量を計算すると、吸光度変化量は0.500、標準物質濃度200 mg/dLは1.000と推定することができる。標準物質の測定結果は想定値と一致しているため、次のことが言える。

- ①理論的に考えられる正確性をクリアーしている。
  - ②吸光度測定、サンプリング量、試葉採取量に問題がない。
- 回収率は次式で求められる。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{測定された濃度 (添加後の測定値 - 血清濃度)}}{\text{添加した濃度 (血清に添加された濃度)}} \times 100$$

添加後の吸光度測定値が0.800であったことより、測定値は160 mg/dLとなる。これを上式に代入すると次のようになる。

$$\frac{(160 \text{ mg/dL} - 80 \text{ mg/dL})}{100 \text{ mg/dL}} \times 100 = 80\%$$

標準物質を測定する際、問題がなかったが、血清にグルコースを添加し測定すると、正しい測定値が得られなかったのであるから、プール血清中に測定にトラブルを与える物質が存在した可能性を示している。

### 問題13～16

正解      6-13   4            6-14   1  
                 6-15   1            6-16   5

式①に物質濃度180 mg/dLを代入すると吸光度変化量は3.0となる。

同様に、吸光度変化量が0.01の時の濃度を式①で求めると0.6 mg/dLとなる。吸光度の測定上限が4.0とすると、式①に代入すると、240 mg/dLとなる。

測定上限を上げる場合、サンプル量を1/5にすると測定上限を5倍に上げることができる。しかし、測定精度が5倍悪くなる。また、サンプル量を減らすことにより感度も1/5となるために発生する問題もある。分析装置の固有誤差が相対的には5倍大きくなる。具体的な問題は教科書を参照下

さい。

問題17～20

正解 6-17 2      6-18 2  
 6-19 4      6-20 5

吸光度測定の実験性は吸光度が0.434で最も再現性が高くなり、吸光度が小さくなくても、大きくなっても再現性が悪くなる（認定講習会資料参照、36巻3号比色分析装置の基礎）。この問題では5%以下の再現性で測定できる吸光度が0.01となることより、式①に代入すると測定下限は0.008 mg/dLと推定できる。同様に、測定できる最大の吸光度が3.0であることより、濃度に式①にて求めると24 mg/dLとなる。

分析できる最小吸光度と最大級光度が0.01と3.0であり、0.001の吸光度差を正しく測定できることより、分析段数は次式で求められる。

$$\text{分析段数} = \frac{3.0 - 0.01}{0.001} = 2,990 \text{ 段}$$

よって、この分析装置を用いると、分析分解能を0.008 mg/dLとすると、測定上限が24 mg/dLとなり、分析分解能を0.8 mg/dLにすると、測定上限は2,400 mg/dLとなる。測定の精度を上げれば測定上限が下がり、測定上限を10倍に上昇させると、測定精度（分析分解能）は10倍大きくなることを示している。もちろん、分析分解能が大きくなると再現性が低下する。ただし、分析装置と再現性の関係は明確な一次比例をするわけではなく、分析装置には固有誤差がある。この大きさによって、分析分解能と測定下限は決定されるので、注意する必要がある。問題6-20においても、1.0 mg/dL クレアチニンのサンプルを測定すると、吸光度0.25と演算でき、吸光度0.01を測定する時より再現性が上昇することは推定できるが、具体的に何分の1となるかは分からない。このため、確実言いえる5%以下と考えるのが妥当である。

問題21、22

正解 6-21 1      6-22 3、5

吸光度変化から酵素活性を求める式②にて、反応速度を求める。

$$\text{酵素活性 (U/L)} = \frac{\Delta \text{Abs/min}}{\text{モル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times 10^6 \cdots \text{式②}$$

数値を代入すると0.03/minとなる。

問題6-9の解答から、①誤って反応速度を上昇させていること、②相対分析に持ち込んだ場合、測定値に問題が出ていないことより、標準物質測定とサンプル測定で同じ誤差が発生していることが判断できる。その上で、酵素活性を誤って上昇させている原因を究明する。

サンプルブランクを発生させる物質があった場合、標準物質測定では誤差が発生せず、サンプルブランクを発生させる物質が混在しているサンプルの測定値のみが上昇する。この問題とは相違する。また、誤って高値に測定しているため、サンプルと試薬Iを混和した状態で、吸光度変化が進行するはず。反応曲線を見る限り、試薬IIを添加する前に反応が生じていません。LD反応で発生したNADHを減少させる反応が発生する場合には試薬II添加後にのみブランク反応が発生します。この場合は吸光度変化を見ると、今回と同じ現象になりますが、誤って、低値に測定されることはあっても、高値に測定することはありません。

酵素活性測定においては最も高い活性を示す条件を与えています。試薬に何らかの問題が発生すると、正しい吸光度変化量より低値に測定されます。

吸光度測定も、最も高い吸光度が得られる条件を設定しています。誤って高い吸光度に測定するのはサンプルによる混濁によることがあります。この場合、標準物質測定時に同じ程度の誤差が発生することは考えにくく、今回の万台とは相違します。

## 生物試料分析

恒温槽の温度設定が高めになった場合とサンプリング量が多めになった場合、標準物質測定にも、サンプル測定にも同じ誤差が乗ってきますので、得られる吸光度変化量は大きくなりますが、測定値に誤差は発生させません。

### 問題23、24

正解 23 5 24 2

分析反応はシンプルな方が良いとされていますが、LD活性測定のように、シンプルすぎることも問題があります。試薬ブランクを除去する方法が選択できません。具体的にはNADHのない状態では測定物質がないため、LD反応もブランク反応も検出できません。ならば、反応開始液をピルビン酸にした場合、サンプル中にピルビン酸が存在するため、ほんの少しではあってもブランク反応と同時に本来のLD反応が生じ、正しくブランクを測定することができません。実験的にも、①ピルビン酸スタート、②NADHスタート、③検体スタートの3種測定値を比較すると、少しずつ活性値が変わります。検体ブランクが発生している可能性があるのでしょうか。ASTやALT活性のブランク反応を観察すると、検体中に存在するLD反応物質が反応してきます。ピルビン酸のみが反応するのであれば、十分なLD活性を添加しておけば、ごく短い時間に吸光度変化はなくなるはずですが、検体によっては長引くものがあります。 $\alpha$ -ケト酪酸やLD反応性物質が検体中に存在することが確認しています。極わずかな活性であるため、具体的には問題は小さいが、「正確なLD活性測定」ということには難しい難問である。

ブランクの反応、標準物質の測定に何もなかったにもかかわらず、新ロットのコントロール血清の測定値を高値にさせた。このことより、新ロットのプール血清に原因のあることは明確である。表示値と測定値との乖離の原因は正の干渉を与える原因がプール血清にある。血清中に正の干渉を与える酵素が混在している可能性である。グルタミン酸デヒドロゲナーゼがあった場合、正誤差を与える。この酵素反応を起こさせるためにはアンモニアと2-オキシグルタル酸が必要。コントロール血清作成時に硫酸懸濁酵素を用いると、アンモニアは有る可能性はあるが、LD反応に共役酵素を使用することはなく、アンモニアが反応液ないに混入し難い。また、2-オキシグルタル酸も添加されていない。

コントロール血清に濁度があることは一般的です。多くは添加するリポタンパクによるもので、試薬に添加された界面活性剤（チューブ内をスムーズに試薬を移動させるためには界面活性剤の添加は日常的に行われている）によって混濁が減少する場合、あたかも吸光度の減少反応が生じることがある。

### 問題25、26

正解 25 1 26 3

100 U/Lのサンプルを測定した時の反応速度を式②から求める。

$$\text{酵素活性 (U/L)} = \frac{\Delta \text{Abs}/\text{min}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{210}{10} \times 10^6$$

計算結果より反応速度は0.03/minのはずであるが、結果は0.036/minであることより、誤って高い反応速度となっていた。反応速度が高くなる可能性のあるのはブランクの発生か、吸光度の減少反応が発生している時。しかし、検体ブランクの場合、試薬「添加前に吸光度減少反応があるはず。反応曲線よりその傾向が見られないため、試薬ブランクの可能性しかない。なお、共役酵素として添加されたLDやリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MD）が2-オキシグルタル酸を基質としNADHを減少させる反応（2-ハイドロオキシデヒドロゲナーゼ）を有していることが報告されている。この反応が生じている可能性が考えられる。

## 問題27

## 正解 5

サンプリング量、吸光度測定、恒温槽の温度、測定時間。共役酵素、NADやNADHなどの試薬分注量が増減しても測定値に影響を与えません。測定には影響を受けますが、標準物質測定とサンプル測定が同じ程度の誤差を受けるため、誤差が相殺されるためです。測定時間（反応開始から測定までの時間、レートアッセイする測定時間間隔）の何れに問題があったとしても、測定値に誤差を与えません。共役酵素は高活性試料に対応できるように、過剰に添加されています。多少の減少では誤差を発生させません。NADやNADHも影響を受けることはありません。しかし、酵素の賦活剤、サンプル中に存在する可能性のある干渉物質の影響を取り除く試薬は濃度依存性のものが多く、一般的に正しい添加量が必要です。また、基質濃度もアイソエンザイムを均等な活性で測定できるように選択されたことが多く、濃度が変化すると、アイソエンザイム毎に影響が相違することが多く、試薬濃度を一定に確保しなければならない。測定酵素毎に、試薬にはどのような工夫がなされているのか、勉強して下さい。