

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その3）〉

正確度の検証法（2）

—分析反応と理論は一致しているか、反応曲線の予測—

小川 善資

II. 検量線の予想（つづき）

2. 酵素活性測定法

酵素活性測定において、次式が成立します。

$$U/l = \frac{\Delta \text{Abs}/\text{min}}{\epsilon} \times \frac{TV}{SV} \times 10^6 \dots\dots\dots \text{式1}$$

この式は国際単位の規定である「毎分 $1 \mu\text{mol}$ の基質を変化させる酵素活性を 1U/l とする。」に由来するもので、いかなる酵素活性にも共通する。例題を挙げて説明します。

（例2）乳酸デヒドロゲナーゼ（LD）活性をJSCC法にて測定した。100、200、300、400 U/lの標準液を用いた場合の検量線を予測しなさい。

JSCCはNADH ($\epsilon = 6.3 \times 10^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) の生成速度を測定し、酵素活性とする。また、サンプル量は0.2 mlで、試薬量は2.8 mlである。よって、100 U/lの標準液を測定した時の反応速度 ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$) は次の様に予測できます。

$$100 \text{ U/L} = \frac{\Delta \text{Abs}/\text{min}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{3.0}{0.2} \times 10^6$$

$$\Delta \text{Abs}/\text{min} = 0.042/\text{min}$$

同様に、200、300、400 U/lの $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ は0.084、0.126、0.168と計算できる。このことより検量線を作図すると図1となります。

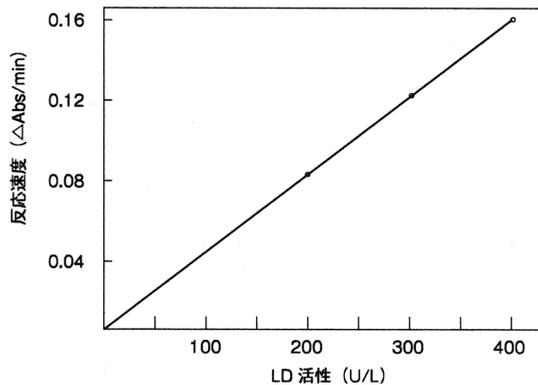


図1 LD活性測定の見量線

3. 検量線の推定から、どうして正確度をチェックできるのか？

\bar{X} -R管理図法にて試薬の異常と分析機器の問題を発見できないことは当認定講座にて説明したとおりです。この問題は \bar{X} -R管理図法に限らず、相対分析法にて測定したプール血清やコントロール血清の測定値を用いた全ての精度管理法に当てはまる考え方です。累和法においても双値法を用いても、ほんの少しの試薬や分析機器の異常を見出すことはできません。

どのような方法で管理すれば試薬や分析装置の異常を早期に検出できるのでしょうか。一つの方法は使用している標準物質の発色した吸光度をチェックすることです。酵素活性測定であれ、物質濃度の測定であれ、検量線の予測ができるのですから、用いている標準液もしくは標準血清の表示値から、エンドポイントにおける吸光度や1分間に变化する吸光度変化量を予測し、予測された数値にあってるかをチェックして下さい。確実に試薬と分析機器の問題点をあぶり出すことができます。なお、この時、ブランクの測定を必ず行ってください。水を測定したブランクも大切ですが、試薬Ⅱを精製水に置き換えて標準液を測定したブランクの吸光度が測定できればなお良いと思われまます。具体的な試薬・分析機器のほんの少しの異常を見出し、しかも原因を追及し、対応策を立てることのできる「新しい精度管理法」については反応曲線推定法の後に記述したいと思います。ご期待下さい。

Ⅲ. 反応曲線の予測

分析に何らかの問題があった場合、反応曲線を見ますね。反応曲線から何が解るのでしょうか。論理的に説明し、具体的にどの様に反応曲線が変化するかを勉強して下さい。漠然と見るより、少しは試薬の問題、分析機器の問題が見えてくると思います。

1. エンドポイント法にて物質定量する場合

分析誤差が発生しにくいのは「単純な原理、単純な操作の測定法が良い。」とよく言われる方がおられますが、簡単過ぎると、ブランクを求められなくなり、正しい測定に導けないことがあります。LDを用いたピルビン酸定量を例に取り上げましたが、1段階の酵素反応であるため、演算は簡単で、考えやすいのですが、簡単すぎて、正しい分析を行うことが難しいし、反応曲線の予測も本当は難しい検査項目です。この問題はLD活性測定においても同様です。どこが難しいかは最後に示すとして、もし確認実験をする場合には血清を用いずに、水溶性のピルビン酸溶液と、酵素溶液を用いることを推奨します。なお、LDの希釈は充分ご注意ください。単純に冷却した緩衝液にて希釈しますと活性が約半分になります。希釈後にLD活性を測定し、チェックすることをお勧めします。なお、LD希釈法はこの項の最後に記述させていただきます。

1種類の酵素を用いてエンドポイントにて定量する時の反応曲線を予測しましょう。具体的にはLDを用いたピルビン酸定量法にて考えてみましょう。

(例3) LDを用いたピルビン酸定量

LDを用い、NADHの減少量を340 nmにて測定し、ピルビン酸定量を行う反応曲線を予測する。測定操作法は下記に示す操作法とする。なお、NADHのモル吸光係数は $6.3 \times 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とする。また、LDのピルビン酸に対する K_m 値は $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ とし、ピルビン酸の分子量は88とする。なお、反応は一次反応速度に従うものとする。

測定操作法は次の様にします。

表1 ピルビン酸定量の測定操作法

	容量	終濃度
100 mmol/l THCl Buffer (pH7.6)	2.62 ml	100 mmol/l
2.4 mmol/l NADH	0.2 ml	0.16 mmol/l
50 mmol/l EDTA	0.06 ml	1.0 mmol/l
5 U/ml LD	0.06 ml	0.1 U/ml
Preincubation at 37°C for 10 min		
試料	0.06 ml	
Incubation at 37°C and determination of Abs at 340 nm		

反応の予測

1) 反応開始時の吸光度

反応開始時の吸光度は次の様に計算できます。

$$2.4 \times \frac{0.2}{3.0} \times 6.3 = 1.008$$

2) サンプル中にピルビン酸1.0 mmol/l存在するとどの様な反応になるかピルビン酸の終濃度 (A_0) を求めます。

$$1.0 \times \frac{0.06}{3.0} = 0.02 \text{ mmol/l}$$

エンドポイントにおける吸光度変化量を求めます。

$$0.02 \times 6.3 = 0.126$$

3) 0.5分後の吸光度変化量を求めます。

一次速度定数を求めます。

$$\frac{V_{\max}}{K_m} = \frac{0.1}{0.1} = 1.0 \text{ min}^{-1}$$

0.5分後の生成物濃度 ($B_{0.5}$) を計算します。

$$B_{0.5} = A_0 \times (1 - e^{-kt}) = 0.02 \times (1 - e^{-1.0 \times 0.5}) = 7.92 \times 10^{-3}$$

生成物濃度にモル吸光係数を乗じると、減少分の吸光度が計算できる。従って、0.5分後の吸光度は次の様に求められる。

$$\text{反応開始時の吸光度} - B_{0.5} \times 6.3 = 0.9504$$

となります。同様に、各時間毎の吸光度を演算し、グラフ化すると、反応曲線が推定できます (図2)。

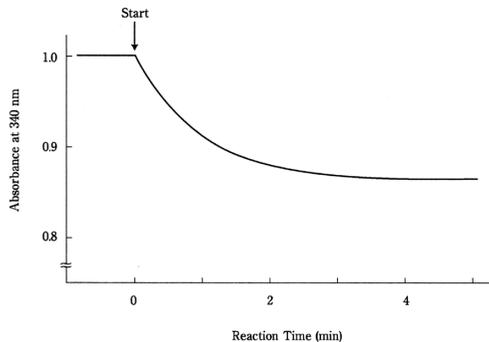


図2 LDを用いピルビン酸を定量する時の反応曲線

4) ミカエリスーメンテン式を用い近似値計算する方法

酵素反応が一次速度条件に従うとして演算しました。しかし、物質の定量反応の場合、反応開始から反応が終了するまで、一次反応速度を継続するとは考え難いのです。というのも、反応開始時の濃度が高い場合もあるし、低い場合もあります。高い場合、一次速度より速い速度にて進行するため、上記演算で求めた時間より早く反応が終了します。大まかにどの程度の時間で反応が終了するのかを計算する場合は上記演算でも充分ですが、反応の正確性を議論したい場合には不向きです。コンピュータによって演算できるプログラムを掲示したのでこれを使用することを推奨します。

5) 実験の問題点

① ブランクが取れない

正しく測定する場合、検体ブランク、試薬ブランク、標準液、管理試料の4種の試料を測定すべきことは当然のことです。ピルビン酸の定量においても、検体中に存在するLD反応物質があり、若干正誤差をあたえます（ピルビン酸定量を実施していただければ直ぐに気づかれると思いますが、反応が直ぐに終了せず、だらだらと反応する部分があります。これは明らかにピルビン酸が反応しているものではなく、何らかのLD反応物質が反応しているものと思われます）。ならば、検体ブランクを取り、差し引けばよいことです。ところが、検体ブランクを取ることができません。理由はこの定量反応に必要な試薬は3種で、LD、ピルビン酸、NADHです。ところが、LDとピルビン酸の2種が正常検体でも存在します。このため、NADH抜きでブランクを取りたいのですが、NADH抜きではいかなる反応も起きないため、検体ブランクを取ることができません。この問題はLD活性測定においても同様の問題が発生するため、厳密に正しい測定はできません。

② LDの希釈

LDを緩衝液にて希釈することは当然のことです。ところが、単純に冷却した緩衝液で希釈すると活性は簡単に1/2程度に低下します。通常酵素は-OH基が複数存在する物質によって保護されます。具体的にはグリセロール、ショ糖などの糖類を加えると失活し難くなると考えられています。グリセロールは液の粘性を高め、泡立ちやすくなるため嫌われる傾向があります。また、タンパクは液体表面に薄い膜を形成する性質があります（豆乳表面に湯葉が形成するのと同じ原理です。また、この性質があるため、タンパク液は「泡立てないように取り扱いなさい。」と言われます）。酵素が膜に変形されると活性がなくなるため、ほんの少し、アルブミンを添加します。我々は実験にて酵素を扱う際、測定緩衝液に10 mg/dlヒトアルブミンと10%グリセロールを添加した溶液にて希釈しています。

2. 2種類の酵素を用いるエンドポイントアッセイ

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)の2種類の酵素を用いてグルコース濃度を測定する時の反応曲線を推定してみましょう。

(例4) HKとG6PDを用いたグルコース定量

HKとG6PDを用い、NADHの増加量を測定することによって、グルコースを定量する反応の反応曲線を推定する。測定操作法は下記に示す操作法とする。なお、NADHのモル吸光係数は $6.3 \times 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ とする。また、HKのグルコースに対する K_m 値は $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ とし、G6PDのG6Pに対する K_m 値は $6.3 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ とし、グルコースの分子量は180とする。また、反応は一次反応速度に従うものとし、360 mg/dlグルコース溶液の測定反応を推定する。また、試薬、試料に340 nmにて吸光度を持つ物質はないものとして演算しなさい。

測定操作は次の表2とします。

1) 反応開始時の吸光度

試薬、試料中に340 nmにて吸光度を持つ物質はないことより、反応開始時の吸光度はありません。

2) 検体中のグルコース濃度からエンドポイントにおける吸光度を計算します。360 mg/dlグルコースをモル数に変換します。

$$360 \text{ mg/dl} \longrightarrow 3,600 \text{ mg/l} \quad 3,600 \text{ mg/l} \div 180 = 20 \text{ mmol/l}$$

検体/総反応液量 (6/3,000) とモル吸光係数より、エンドポイントの吸光度差は、 $20 \times 6/3,000 \times 6.3 = 0.252$ となる。

表2 HK法によるグルコース定量測定操作法

試薬	容量	終濃度
100 mmol/l Triethanolamine Buffer (pH8.2)	2.494 ml	100 mmol/l
60 mmol/l NAD	0.1 ml	2.0 mmol/l
60 mmol/l ATP	0.1 ml	2.0 mmol/l
120 mmol/l MgCl ₂	0.1 ml	4.0 mmol/l
22.41 U/ml HK	0.1 ml	747 U/L
8.61 U/ml G6PD	0.1 ml	287 U/L
Preincubation at 37°C for 10 min		
試料	6 μl	
Incubation at 37°C and determination of Abs at 340 nm		

3) 反応開始1.0分後の吸光度は次の様に演算できる。

2段階の酵素反応の解析には少し難解な演算式となる。2つの反応が共に一次速度に従うとすれば最終生成物Cは次式によって求められる。

$$C = \frac{A_0}{k_2 - k_1} \times \{k_2 (1 - e^{-k_1 t}) - k_1 (1 - e^{-k_2 t})\} \quad \text{-----式2}$$

この式にそれぞれの実数を代入し演算すると各時間における生成物濃度が計算でき、これにモル吸光係数を乗じると吸光度が求められます。具体的に1分後の吸光度を求めてみましょう。

まず、 k_1 、 k_2 、 A_0 を求める。

$$A_0 = 20 \times 6/3,000 = 0.04 \text{ mmol/l}$$

$$k_1 \text{ (HKの一次速度定数)} = 0.747/0.1 = 7.47$$

$$k_2 \text{ (G6PDの一次速度定数)} = 0.287/0.063 \doteq 4.56$$

1.0分後の吸光度

$$C_{1.0} = \frac{0.04}{4.56 - 7.47} \times \{4.56 \times (1 - e^{-7.47}) - 7.47 \times (1 - e^{-4.56})\} \times 6.3 = 0.245$$

となります。同様に、各反応時間における吸光度を計算し反応曲線を求めて下さい。

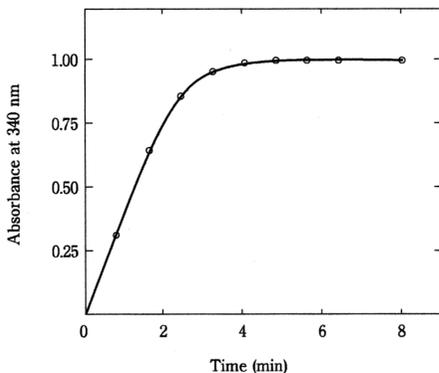


図3 HK法によるグルコース定量の反応曲線 (360 mg/dlグルコースを試料とし、総反応液量3.0 ml、サンプル6 μl、747 U/L HK、287 U/L G6PD添加時の反応曲線)

測定に使用する2つの酵素（HKとG6PD）は大過剰に添加すると、酵素に混在するほんのわずかな共雑酵素の影響を受け、測定特異性を失わせたり、干渉反応を引き起こす可能性があります。できれば、必要不可欠な添加量を適切に添加すべきです。両酵素の適切な活性比を知るため、生成物Cの生成速度と k_1 , k_2 の関係を調べました。反応速度が最も早くなる時を求めめるため、生成物Cの生成式を2回微分し、2回微分値が"0"となる点（変曲点）に至る時間（間 t_{max} ）を求めました。次式となります。

$$t_{max} = \frac{\ln k_1/k_2}{k_1 - k_2} \dots\dots\dots \text{式 3}$$

この式から明らかなのは k_1/k_2 の関係において k_1 を極端に増加させても、 k_2 を増加させても反応終了までの時間をあまり短縮できないことが分かります。

4) コンピュータによる反応曲線の推定

HKとG6PDの活性が変化すれば、反応曲線がどのように変化するのでしょうか。コンピュータを用いれば、簡単に反応曲線を予測できます。一つの酵素が失活した場合、反応曲線はシグモイド状になることを図4が示しています。具体的にはHKを543 U/lとし、G6PDを308 U/lとした場合の反応曲線です。結論から言うとシグモイド状の反応曲線が現れると、酵素が失活していることが直ぐに分かります（2つの酵素が同時に、しかも同じ速度で失活することは考えにくい）。また、試料中に反応物質が入っていた場合や干渉物質が混入していた場合も同様に判別がつきます。HK法において硫酸イオンがHKを阻害すること、*L. mesenteroides*由来G6PDはATPによって阻害を受けるが、Yeast由来は阻害を受けないことなど、コンピュータシミュレーションによって、発見することができました。

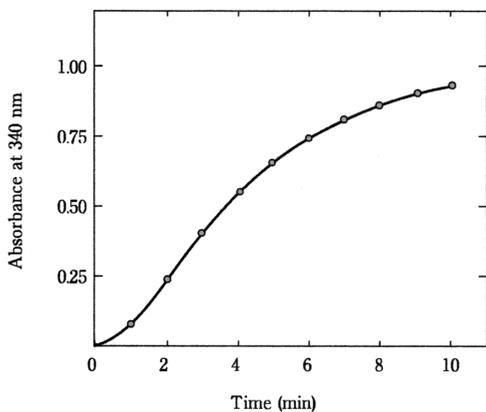


図4 酵素が失活したときの反応曲線

一般に、酵素が失活していない場合、効率よく短時間に反応が終了よう酵素が添加されているため、反応曲線は図3のようになると思います。ところが、酵素の失活が発生すると、2つの酵素のバランスが崩れ、図4のように反応曲線がシグモイド状になることが多く、酵素の失活を見つけることができます。