

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その4）〉

## 新しい精度管理法の提案（その1）

小川 善資

### 1. 正確度・試薬の劣化・分析装置の不調をチェックするための新しい精度管理法の提案

#### 1-1. 精度管理の目的は何か？

精度管理法は「正確で精密な測定値」を報告するためにあることは言うまでもありません。しかし、現状の精度管理法は「正確度」を見ることができません。「正確度」を知らずに精度管理を続けて良いのでしょうか。良いはずがないですよ。「正確度」をチェックするにはCRM（認定標準物質）やERM（酵素標準物質）を測定し、標準値と測定値が一致するかを見る方法があります。しかし、一致しなかった時、何がどの様に悪かったのか、どの様な誤差が発生しているかといった具体的な問題点を教えてはくれません。本来CRMやERMは正確さに対する指針であって、測定法の問題点や誤差原因を追及するツールではないからです。ならばこそ、問題点を究明できる手段を持つ必要があるわけです。具体的な正確度チェック法を組み立て、チェックを行いながら、問題がある時には原因究明に進み、改善が完了したと考えてから、改善の最終確認を行うためにCRMやERMを用いて測定すべきでしょう。

「精度管理法は自らを慰めるための行為で、何の役に立っているのか？」という指摘を聞かれたことがあると思います。私は臨床検査の世界に入って最初に聞きました。しかし、どうしてそのようなことを言われるのか当時は良く分かりませんでした。まじめに精度管理に取り組んでいる方は怒りを感じますよね。この様な誤解を受けないように、精度管理の目的を明確にすべきだと思います。そして、それぞれの目的に対する具体的な取り組み、方法を明示すべきです。

それではまず目的を列挙してみます。

- ① 測定値のバラツキやデータの偏りを診療医に明示すること
- ② 試薬の異常を初期に発見し、トラブル発生前に見つけ出す監視法
- ③ 分析装置のわずかな異常を発見し、トラブルを未然に防ぐ監視法
- ④ 測定限界が維持できているかの確認法
- ⑤ 測定出来る最小値を割り出し、確認する。
- ⑥ 自動分析装置の買い換え希望を明確な数値で示す。

検査技師の中には、すでにこの様なことが出来る優秀な方が沢山おられます。私の身近にも何人ものすばらしい検査技師がいます。しかし、この優秀さが長年の経験や“勘”だけに頼っているのではいけません。我々は何のために学問を重ねなければならなかったのでしょうか。データを集め、思考することで、“勘”だけに頼らず、様々な問題解決法を理論的に導き出すことではないのでしょうか。私は「臨床化学分析は全て計算で解析できる。」と考えています。ならば、上記目的を正確に解析できる方法を構築できるはずですよ。この解析法を一つ一つお示し、これからの新しい精度管理法を構築していきたいと思っています。

さて、「管理図法で試薬や分析装置の問題はチェックできないことを記述しました<sup>1),2)</sup>。この原因

は標準物質を用いた比較分析を行っているからです。問題が発生しても、標準物質を測定する時と検体を測定する時に同じ測定誤差が発生するため、誤差が相殺されてしまうからです。このことは、x-R管理図法に限られた問題ではありません。双値法も、累和法も、x-Rs-R管理図法も、精度管理試料を用いる精度管理法全て同じです。双値法で、「系統誤差と偶発誤差が分けられる。」と勉強した方が多いと思いますが、現在の自動分析を用いた分析では偶発誤差がほとんど発生しませんし、偶発誤差ではなく、少し違った問題が見えてきます。同様にサーベイ結果の解析も少し違った見方が出てきます。

現在の検査室を取り囲む状況から考えると、精度管理にお金のかけられる状況ではありません。経済的負担がなく、あまり複雑な操作もなく、比較的簡単にしかも様々な目的を果たすため、皆さんの頭脳をフル回転していただき、新しい合理的な精度管理法を構築していこうではありませんか。

### 1-2. 目的別精度管理法の提案

精度管理の目的6点を前述しましたが、この目的を現実のものとするための具体的な精度管理法を考えていきましょう。まず、「正確度をどの様にチェックするのか」という問題から取り組みます。それに加え、他に5つの目的を掲げました。この目的を叶え、問題が発生した場合、どの様に確認し、本当に発生している問題は何かを推定できる監視法まで言及したいと思っています。ただ、ほとんどの方法は既に行われている監視法です。失望せずに最後まで読破してください。

#### 目的別精度管理法

1. 正確度をチェックするための精度管理法
2. 試薬をチェックするために精度管理法
3. 分析装置をチェックするための精度管理法
4. 診療医の要望にとこまで答えられているかを明示する管理法
5. 分析可能範囲が維持できているかを確認するための管理法

この様な目的を遂行するために、まずはデータ取りが必要です。また、分析装置の使用方法にも明るくなっていただく必要があります。ただし、使用されている装置で取ることの出来ないデータがある可能性があります。そのような場合は、分析機器メーカーの方にご相談してください。

また、毎日収集していただくデータと、事前に入手しておいていただきたいデータがあります。なるべく事前に基本となるデータを収集し、ここで精度管理法の概要を頭の中に確立していただき、その上で、日々のデータ収集をしていただく必要があります。このため、まず最初に目的を達成するための概念と基本的考え方から入ります。これが終わった上で、実際の作業を記述します。2度、3度同じ問題が重なって記載されますが、ご容赦ください。

### 1-3. 許容範囲

精度管理や標準法の問題を議論する時に、いつも問題になることは、どこまでの精度を要求するかということです。「正確」な測定値は神にしか分からない、という議論を持ち出されると、全ての議論がぶちこわしになります。もちろん、「出来るだけ正確な測定値にたどりつけるようになりたい。」とは考えるべきだとは思いますが、自ずと目標とすべき精度の限界はあると思います。臨床化学検査ではできる限り迅速かつ大量検体の処理が要求されるわけですから合目的な許容範囲を設定すべきです。

具体的な許容範囲としてはTonks<sup>3)</sup>の考え方やBarnett<sup>4)</sup>の考え方があります。臨床医が提示した大変貴重な意見であると思います。しかし、分析をする者の立場から考えますと、少し納得の出来ない甘い部分があると思います。例えば“62”という数値を明記したことは61でも63でもなく、62であることを表明したのです。これが、「実は実質的な意味合いの差はあまり無いのです。」というような発言を後でしたくはありません（許容誤差が10%であるとすれば、62という測定値は56~68間に真値があると言うことで、62としての測定値の持つ意味としてはかなり変化します）。心ある分析

表1 目標とする測定誤差とダイナミックレンジ

測定項目	Tonksによる 許容誤差	Barnettによる Clinical valueと許容誤差	提案したい許容誤差	
			重要ポイントと許容誤差	測定可能範囲と許容誤差
アルブミン	4.8%	7.1% (3.5 g/dl)	±0.1 g/dl (3.0 g/dl)	2.0~10.0 g/dl ±0.1 g/dl
ビリルビン	5%	20% (1.0 mg/dl) 7.5% (20 mg/dl)	±0.1 mg/dl (6 mg/dl)	0.5~8.0 mg/dl ±0.1 mg/dl
クレアチニン	2.5%		±0.1 mg/dl (1.0 mg/dl)	0.5~8.0 mg/dl ±0.1 mg/dl
グルコース	5%	10% (50 mg/dl) 5% (100 mg/dl) 4.2% (120 mg/dl)	±0.1 mg/dl (50~100 mg/dl)	40~800 mg/dl 40~300 mg/dlで±1.0 mg/dl 300 mg/dl以上で±5.0 mg/dl 500 mg/dl以上で±20 mg/dl
AST, ALT	5%		±0.1 U/l (70 U/l)	5~1,000 U/l 5~300 U/lで±1.0 U/l 3300 U/l以上で±10 U/l
LD	5%		±10 U/l (200 U/l)	50~1,000 U/l 50~500 U/lで±10 U/l 500 U/l以上で±50 U/l
CK	5%		±1.0 U/l (50 U/l)	5~1,000 U/l 5~300 U/lで±1.0 U/l 300 U/l以上で10 U/l

者はついて行けますでしょうか。要するに、整数値で報告するのなら、1.0の差を有意に測定できる分析系で測定したいと考えていると思います（真値との距離を表す数値とは相違しますので誤解しないで下さい）。私はここで記述する許容限界は、報告値としての最小値が有意な差を持って測定出来る分析系とし、この差を有意測定出来ないときには報告値の再考を提案させていただきます（信頼できない小さな数値を報告しないで下さいという意味です）。

この考え方は分析する方にとって、大変過酷な提案でもあります。例えば、血糖値を136 mg/dlと報告したければ、1.0 mg/dlの差を有意に測定出来るように考えなさいということ。簡単に言えば、「136 mg/dlを0.74%以下で測定しなさい。」と言っていることになります。もっと極端なことを言えば、900 mg/dlを±1.0 mg/dlで測定出来るのか、ということになります、これは少し言い過ぎです。分析法はどの様な濃度においても同じ精度で測定出来るはずがありません。合目的な精度を各項目毎に表示すべきだと思います。TonksやBarnettの考え方と対比させて、私が考える測定誤差を表1にまとめてみましたので参考にしていただければ幸いです。

これとは別に、一度目標とした精度は「必ず守りたい」、「守れているかチェックする。」という信念だけは持ち続けて欲しいと思います。そのための具体的方法についても言及したいと思います。

## 2. 分析装置の性能チェック

いかに頑張って正しい分析を実施しようとしても、使用する分析装置の性能を無視することはできません。まずは冷静に分析装置の性能に関するデータを収集しましょう。収集するデータは次のものです。

- (1) 吸光度測定 of 誤差チェック
- (2) 吸光度直線性チェック
- (3) 吸光度別測定再現性チェック
- (4) 恒温槽温度チェック
- (5) ノイズチェック

(6) ドリフトチェック

自動分析装置の場合、各パーツを外して検定できることが少なく、また、検定後に正しく戻すことも大変です。このため、通常の測定条件にてチェックできる方法を提案します。

(1) 吸光度測定 of 誤差チェック

臨床化学検査では吸光度を測定し、濃度を計算することに利用します。分析装置にて、ほぼ正しく吸光度が測定されているかをチェックすることは大変重要な問題です。どの様な点に問題があると正しい吸光度が測定できなくなるのでしょうか。

- a) 波長設定の誤り
- b) 測定光のスペクトルバンド幅の広さ
- c) 迷光の発生
- d) 透過率"0"の設定誤差

c、dの問題は吸光度測定 of 直線性を逸脱させます<sup>5)</sup>。別途チェックします。波長正確度と測定光 of バンド幅の問題は見かけ of モル吸光係数 of 算定に影響します<sup>6)</sup>。まず正しいモル吸光係数通り of 測定にどこまで近づけることができるのかを見かけ of モル吸光係数測定法にてチェック（分光光度計チェック法(1)参照）しましょう。

通常、吸収極大での吸光度測定を行います。その理由は次のような点です。

- ① 感度が高い。
- ② ノイズを小さくして測定したい（再現性良く測定したい）ため、測定感度を低下させず、極力強い測定光を用いたい。

- ③ 波長設定 of 誤差があっても、誤差を最小限に止めることができる。

装置 of 波長設定がずれていても測定光 of バンド幅が広くとも正しいモル吸光係数 of 測定には近づきことができませぬ<sup>6)</sup>。しかし、測定光がシャープすぎるとノイズが大きくなり、測定にバラツキが生じます。具体的にどの様な条件を選択すべきか、正しく選択して下さい<sup>6)</sup>。干渉フィルターを用いてNADH（スペクトルバンド幅 of 半値幅は40 nm）を測定する場合、高品質 of 干渉フィルターを用いてもバンド幅が8 nm程度のため、NADHを測定すると98% of モル吸光係数しか得られません。

(2) 吸光度直線性チェック

最近 of 自動分析装置は光路長を短くし、測定可能吸光度範囲を広く設定した装置が市販されています。光路長を1/3にすることによって、測定できる吸光度上限を3倍上げるという原理です。しかし、測定 of シグナルは1/3になるため、ノイズは3倍増加することになります。これを克服するため、測定光 of 強度を上昇させ、ノイズが大きくならないように工夫がされています。このため、吸光度3.0以上測定できるようになっている装置も広く利用されています。直線性を失わせる原因は迷光です。この迷光は購入時点が最も小さく、使用に従って大きくなります。現在使用されている装置が、どの程度 of 直線性を有しているかを知ることは測定上限 of 設定と直接関係があるため、定期的にチェックを実施して下さい。

(3) 吸光度別測定再現性チェック

吸光度測定において最も安定しているのは吸光度0.3から0.9付近です。それより低くても、高くてもノイズは大きくなります<sup>7)</sup>。吸光度測定 of 安定性をチェックして下さい。

- (4)～(6)に関しても同様にチェックして下さい。

3. 正確度 of チェック法 —理論値から正確度を見る—

3-1. 物質濃度をエンドポイントにて求める方法では

臨床化学検査のほとんどは実際の化学反応をさせなくとも、計算で推定できることを記述してきました。「検量線」が計算可能なことは既に記述しました<sup>3)</sup>。計算された検量線と実際の検量線が一致していれば、実際の測定が理論と一致しており、理論通りの分析(=正確な分析)が実行されていることとなり、分析の「正確さ」を証明することになります<sup>8)</sup>。

NADH測定ではこの様な計算が通用するが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>測定系では使えないと思っておられる方がおられます。その様なことはなく、当然クレアチニン測定でも、総コレステロールにおいても、エンドポイント法なら、同じ計算が可能です。クレアチニン測定の例をもう一つ紹介しておきます。

サンプル量 3 μl で、試薬 I 150 μl、試薬 II 50 μl を用いて測定し、発色物質のモル吸光係数が 5.02 × 10<sup>4</sup> l/mol/cm で 5.0 mg/dl 標準物質を測定したときの吸光度を計算します。

$$5.0 \text{ (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{ Abs}}{5.02 \times 10^4} \times \frac{203}{3} \times 113.12 \times 100$$

$$\Delta \text{ Abs} = 0.328$$

と計算できます。(ここではブランクの吸光度を考慮していませんのでご注意ください。) 同様にチェックしてみてください。

一致しなかった時、何が悪いのかこのデータだけでは判断できません。分析装置の問題か、試薬の問題か、それとも両方ともに問題があるのか解析できません。まずは分析装置チェックに進まれた方が良いでしょう。なお、ここで問題があったとしても日常検査は正常に測定できますのであわてることはありません。どうして分析装置チェックに進んでいただくかと言うと、やはり分析装置に問題がある場合、グルコース測定だけの問題でなくなる可能性があるため、やはり優先的にチェックすべきだと思います。分析装置に問題がなければ試薬チェックシステムに進んでください。過酸化水素定量系ではビリルビンやビタミンCの影響を受けるため、この様な計算に一致しないと考えておられるなら、水溶性の標準液が市販されていますし、自身で作成することもできますからトライして下さい。なお、現状の市販試薬でビリルビンやビタミンCの影響はほとんどありません。

### 3-2. エンドポイント法における試薬チェック法 (1)

試薬チェック法は各項目毎に具体的なチェック法を明記する予定ですが、全般的に活用できる方法を記述します。

まずは解析のためのデータを収集しましょう。毎日、次のデータを収集し、グラフに書き込んでください。

- ① ブランクの吸光度をモニターする。
- ② 標準液の吸光度をモニターする。

ブランクの吸光度は次第に変化するものですが、あまり高くなることは問題です。具体的にはあまりにも吸光度が上昇すると測定上限を確保できなくなります。前述のヘキソキナーゼ法でのグルコースを測定している場合、800 mg/dl で吸光度が約 1.70 (ブランクの吸光度 0.05 として) です。測定できる吸光度の上限が 1.8 とすると、ブランクの吸光度が 0.15 に達すると、測定上限が測定できなくなります。

また、標準液の吸光度 - ブランクの吸光度はブランクの吸光度にかかわらず一定のはずです。これが確保できなくなっている場合、分析装置か試薬に問題が発生していることを示しています。具体的にはヘキソキナーゼ法をご覧ください。

- ③ エンドポイントにおける吸光度変化量チェック

エンドポイント法ですから、吸光度測定時点においては吸光度変化が終了しているはずですが、この時点で吸光度変化が発生していることは何らかの問題が発生していることを示しています。試薬の劣化を疑われる方が多いと思いますが、分析装置に問題のある場合もあります。恒温槽の温度設定か、ヒーターの問題である可能性もあります。この様な時、基本データとして、反応曲線を取っておかれると便利です。反応曲線解析システム、もしくは恒温槽チェックシステムに進んでくださ

い。

このエンドポイントにおける吸光度変化量もモニターして下さい。わずかには変化します。試薬のチェックに利用できます。

### 3-3. エンドポイント法のまとめと監視法

エンドポイント法における精度管理法をまとめておきます。精度管理する上で、使用する分析機器の性能データは必ず事前にお取り下さい。そして、どの様な測定システムを作りたいのかを診療医や検査技師の方々の意見を伺い、具体的に構築下さい<sup>8)</sup>。そこで、測定可能範囲、分析分解能、再現性が明確な数値として表れますので、日々、何をチェックし、何をモニターすれば良いのかが明確となります。ヘキソキナーゼ法によるグルコース測定で具体的に考えてみます。

(グルコース測定における医師からの要望)

1. パニック値は50 mg/dl以下、800 mg/dl以上として下さい。
2. 測定精度を要求する点は126 mg/dl付近です。

再現性は3.0%以下として下さい。

この問題を具体的に考えてみます。患者検体の測定で、パニック値が出現した場合、毎回、測定値が正しいか否かを確認していれば、時間を要してしまいます。このため、50も800 mg/dlも測定可能範囲内にしたく、また、吸光度を安定して測定できる範囲は0.1から0.9の範囲なので、126 mg/dlの測定ではこの範囲内に入るようにしたいわけです。なお、使用する吸光度分析の再現性は吸光度0.1から0.9の範囲で1.0%以下で、0.05から0.1と0.9から1.5の間で3.0%とします。また、測定できる最小の吸光度(吸光度測定の分析分解能)は0.001で、吸光度の測定下限は0.01、測定上限は2.0とします。

では、分析システムを構築します。まず、測定上限付近での許容誤差を3.0% (800 mg/dl付近で±18 mg/dlの精度を黙認する) とし、測定上限の設定法から考えて検体量を計算します。

(検査技師からの要望)

1. 再検査率を3.0%以下としたい。
2. 新生児検体の測定においては検体量を0.5 mlでも測定できるようにしたい。
3. 糖尿病患者は診察前検査であるため、分析時間を3分以内としたい。
4. 緊急対応測定を可能にしたい。

再検査率を設定するために、検査値の測定頻度に関するデータが必要です。50 mg/dl以下が0.5%、800 mg/dlを超える方が1.0%、900 mg/dlを超える方が0.7%であったとします。測定可能範囲を超える検体の次に測定する検体は全て再検査となるため、測定下限を50 mg/dl以下に、測定上限を800 mg/dlと設定すると、再検査率は2.0%となり、目的を叶えることができますが、パニック値の観点からは800 mg/dl以上とします。次に、全血で0.5 mlとすると、血漿0.2 mlは確保できます。必要検体量は極力少なくしたく、また、エンドポイントのため、3分以内に反応が終了できるように使用する酵素量を設定します。自動分析装置が割り込み可能な機能を有しているため、緊急対応は可能なものとします。なお、反応総液量は1,000 μlとし、サンプル量をx、NADHのモル吸光係数は6.3 × 10<sup>3</sup> l/mol/cmとします。

$$800 \text{ (mg/dl)} < \frac{1.5}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1.000}{x} \times 180 \times 100$$

$$x < 5.36 \mu\text{l}$$

となります。一方、測定下限を50 mg/dlとするためのサンプル量は次のように計算できます。

$$50 \text{ (mg/dl)} > \frac{0.01}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1.000}{x} \times 180 \times 100$$

$$x > 0.57 \mu\text{l}$$

要するに、サンプル量を0.57 μl以上、5.3 μl以下の範囲に設定すると良いことになるので、5 μlに

したとして、各濃度における再現性を計算します。

この分析装置を使用した場合の分析分解能は

$$x \text{ (mg/dl)} < \frac{0.001}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1.000}{5} \times 180 \times 100$$

$$x < 0.57 \text{ mg/dl}$$

となります。一方、50 mg/dlを測定する場合の吸光度は0.0875と予測できるので、この吸光度における再現性は3%なので、1.5 mg/dl程度の測定誤差が推定されます。

126 mg/dlにおける分析分解能は0.57 mg/dlで、測定する吸光度は0.2205 (\*1)と推定され、再現性は1%と考えることができるため、1.26 mg/dl程度の測定誤差が発生することが予測されます。同様に800 mg/dlの検体を測定した場合、吸光度は1.4 (\*2)と推定され、この時の吸光度を測定する再現性は3%と推定されるため、24 mg/dlの誤差を許容しなくてはならないこととなります。また、測定できる吸光度の上限が2.0であることより、測定上限は1,140 mg/dl (\*3)と推定できます。3分間で反応を終了させることのできる酵素活性の添加量は後述します。また、緊急検体用割り込み測定機能のついている装置を用いれば、全ての要望を満足できる測定法を構築できることとなります。ただし、1.0 mg/dlの差を正しく測定したいと記述しましたが、全測定範囲では到底無理で、57~100 mg/dlの間では可能であるものの、50 mg/dl付近では1.3 mg/dlの誤差が、100 mg/dl以上では次第に誤差が大きくなり、514 mg/dl付近で5.0 mg/dl程度の誤差が予測され、800 mg/dl付近では前述したとおり24 mg/dl程度の誤差となります。この点を良く考慮し、監視しなければなりません。

さて、この様なシステムが本当に機能するのかを確認するためには必ず確認のための実験を行って下さい。

1. 直線性のチェックと吸光度チェック
2. 各濃度における再現性チェック
3. 反応曲線チェック
4. 添加回収試験
5. 他の測定法との相関性チェック

などのデータを取った上で、標準値の明記された検体を測定し、正確度をチェックして下さい。

次に、日々の監視法 (図1) ですが、次の点を注目して下さい。

1. 診療医からの要望が確保できているか。
2. 測定可能範囲が確保できているか。
3. 正確度が確保できているか。

このためには、少なくとも①50~60 mg/dl付近の試料、②126 mg/dl付近の試料、③700~800 mg/dlの試料を測定する必要があります。また、標準物質の濃度は150 mg/dl以上が望ましいと考えられます。そして、次の吸光度を日々モニターして下さい。

1. ブランクの吸光度
2. 標準物質の吸光度
3. 3種類 (50、126、700~800 mg/dl) の監視用試料の吸光度
4. エンドポイントにおける吸光度変化量のチェック

これで、監視できると思います。なお、試薬が変化した場合にどのような現象が発生するかなど、具体的な問題に関しては各測定法毎に記述します。

$$(*1) \quad 126 = \frac{x}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1000}{5} \times 180 \times 100 \quad (*2) \quad 800 = \frac{x}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1000}{5} \times 180 \times 100$$

$$(*3) \quad x = \frac{2.0}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1000}{5} \times 180 \times 100$$

### 3-4. 酵素活性測定法における正確度チェック

酵素活性測定でも同じようにチェックできます。NADHの変化で酵素活性を測定する時の計算は正確度の検証法(2)に記載しました\*。

臨床検査で広く測定されている酵素活性測定には遊離してくるp-ニトロフェノール (PNP:モル吸光係数は405 nmにて、 $1.85 \times 10^4$  mol/l/cm) を測定することもあります。アルカリ性フォスファターゼやアミラーゼ活性測定です。この時も同様に計算できます。200 U/lの酵素活性を測定し、サンプル量10  $\mu$  lで、試薬量が490  $\mu$  l、405 nmにて吸光度変化量を測定した場合、測定できる反応速度は次のように計算できます。

$$200 \text{ (U/l)} = \frac{\Delta \text{Abs/min}}{1.85 \times 10^4} \times \frac{500}{10} \times 10^4$$

$$\Delta \text{ABS/min} = 0.074/\text{min}$$

もちろん、ブランク活性があるときにはブランク活性を差し引いた反応速度がこの計算値と一致すれば良いのです。一致しない場合には、装置の問題か、試薬の問題かを調べる必要があります。各検査項目毎の問題追及法に進んで下さい。

### 3-5. 試薬チェック法 (2)

レートアッセイ試薬のチェックにおいても先と同様、次の2 データを収集し、グラフ上に作図して下さい。

- ①ブランク活性のモニター
- ②標準物質の反応速度をモニター

酵素活性測定法におけるブランク活性はほとんどの測定で発生します。例えば、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) やアラニントランスアミナーゼ (ALT) 活性測定においては次の2つの反応が原因です。

- 1) サンプル中に存在するピルビン酸、LD (乳酸デヒドロゲナーゼ) と試薬に含まれるNADHおよびLDによって発生するブランク反応
- 2) AST、ALTの基質の一つである2-オキソグルタル酸とサンプル中、試薬に含まれるLDによって発生するブランク反応 (基質特異性の問題から、LDが下記の反応を起こす)



\*LDそのものが有している2-hydroxyglutarate dehydrogenase活性

ピルビン酸とLDは必ずサンプル中に存在します。また、試薬に必ずLDが添加されているため、ブランク反応は必ず発生します。このため、ブランクを取らなければ、正しい活性を求めることはできません。標準として用いる試料や試薬が変化しない限り、ほぼ同じブランク活性を示すはずですが、ブランク活性が大きくなることや、小さくなることは測定条件に何らかの変異が生じていることを意味し、原因を追及すべきです。詳しくはAST、ALT活性測定の項で記述します。

ブランクが取れないことはもっと深刻な問題です。LD活性を測定する場合、先に記した1)によるブランク反応が必ず発生します。逆反応を利用しても、乳酸が必ず存在するため、ブランク反応が発生するのですが、測定系が簡単すぎ、ブランク反応を極めて取りにくい問題があります (LDの項参照)。

- ③相違する2時点における反応速度を測定し、比をモニターすること

酵素活性測定の場合、反応開始から特定の時間に反応速度を求めているはずですが。例えば、反応開始1分後から10秒間の吸光度変化量を測定しています。これはそのまま測定するのですが、これとは別に反応開始2分後から10秒間の反応速度をモニターして下さい。この2分後の測定値は活

性測定に反映させないで下さい。ただ、精度管理用にデータ収集して下さい。

酵素反応はほとんどの場合、直線的には反応しません。必ず反応速度は反応開始から時間の経緯とともに活性が低下します。このため、国際生化学連合は「酵素活性を測定する場合、必ず初速度を測定しなさい」と定義しています。反応が小さければ長時間の反応速度を測定したり、非直線反応の場合、測定時間を変更したりする方法は測定誤差を招くだけで、根本的に誤った測定法です。しかし、この時間の相違する反応速度を見ることは試薬による問題の発生を敏感に見いだしてくれます。例えば、LD反応においては基質濃度を過剰に添加できません。Km値より少し濃い程度で、Km値の何倍もの濃度を添加できません（基質阻害が発生し易いため）。このため、直線的に反応する時間がわずかしか得られません。また、低濃度しか添加されていないため、基質のほんの少しの変化によって敏感に活性が変化します。この2時点の反応速度比を見るとすぐに基質の問題を見つけることができます（LDの項参照）。共役酵素を使用する系ではまた別な問題を監視することができます。

### 3-6. 酵素活性測定法のまとめと監視法

酵素活性測定法における精度管理法をまとめておきます。また、同じように診療医からの要望と検査技師からの要望を聴取して下さい。ここではアスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）活性測定法に関して具体的に記述します。

（診療医からの要望）

1. パニック値は1,000 U/lとして下さい。
2. 測定精度を要求する点は70～100 U/l付近で、1%程度の誤差として欲しい。
3. それ以外の測定可能範囲での再現性は3.0%以下として下さい。

（検査技師からの要望）

1. 再検査率を3.0%以下としたい。
2. 検体ブランクを極力小さくし、無視できる範囲としたい。
3. 2試薬系で測定したい。
4. 活性毎に予測できる精度を知りたい。
5. 正しく測定できなくなる、様々な問題も知りたい。

分析装置の基本的な性能は次のようにする。

1. 測定できる反応速度の範囲0.0001～0.25/minとする。
2. 分析分解能は0.0001/minとする。
3. 正しく測定できる反応速度は0.01～0.1/minの間で1.0%の誤差とする。それ以外では3.0%とする。
4. 測定可能吸光度範囲は0.01～2.0の間とする。
5. 総反応液量は1,000 $\mu$ lとする。
6. サンプル量は1.0 $\mu$ l毎に選定でき、50 $\mu$ lまでとする。

また、ASTの測定値の頻度は800 U/lを超えることが5%、1,000 U/lを超えることが1%とする。具体的に測定系を組み立てる。

再検査率の問題とパニック値の問題から、1,000 U/lまで通常、測定できるようにしたい。このことからサンプル量を求めます。

$$2.000 \text{ (U/l)} < \frac{0.25}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1.000}{x} \times 10^4$$

$$x < 19.8 \mu\text{l}$$

となります。同様に、測定できる最小の反応速度が0.0001/minで、分析分解能を1.0 U/lとするために必要なサンプル量は15.8 $\mu$ l以上と計算できます。このことより、サンプル量を19 $\mu$ lとします。すると、40～80 U/l付近で3%程度の誤差で測定でき、80～835 U/lの間では1%程度の誤差で測定可能

となります。850 U/l付近では25 U/l程度の誤差の発生する可能性が高く、また、測定上限は2,089 U/l程度と推定できます。

さて、検体ブランクを全検体にて測定し、差し引くことは極めて問題が多く、また、試薬コストも大変かかることになるため、検体ブランクが無視できるほど小さくする工夫が必要となります。具体的には①試薬Ⅰを添加してから、試薬Ⅱを添加するまでにどれだけの時間を待てるか。②試薬Ⅱを添加してから何分後に反応速度を測定するか。③どの様な性格のLDとMDを使用できるか。の問題にかかっています。この詳細についてはAST活性測定法の項に詳しく記述しますが、要は試薬の作成に誤差をもたらす要因が存在するということです。従って、試薬を作成する上で考えた、性能が維持できているかを確認する必要があります。これで、要望を満足することができましたが、事前にとっておきたいデータは次のような点です。

1. 直線性のチェックと反応速度のチェック
2. 各活性（70～100 U/l, 800U/l付近）における再現性チェック
3. 反応曲線チェック
4. 添加回収試験
5. 他の測定法との相関性チェック
6. 各種ピルビン酸濃度におけるブランク活性

などです。

次に、日々の監視法ですが（図2）、次の点を注目して下さい。

1. 診療医からの要望が確保できているか。
2. 測定可能範囲が確保できているか。
3. 正確度が確保できているか。

です。

このためには①ブランク活性をモニターすること、②標準物質の反応速度をモニターすること、③少なくとも3種の監視用試料を測定し、モニターすることです。監視用試料は、a) 70～100 U/lの活性試料、b) 検体ブランクを無視できる程度に抑えられているかを監視するための試料、c) 700～800 U/lの活性試料（試薬に劣化が生じていないかを観察するために一番大切な試料）です。詳細はASTおよびALT活性測定の記事を参照下さい。

#### 引用文献

- 1) 小川善資: 管理法は分析機器や試薬の異常を見つけられない. 生物試料分析, 34: 359-363, 2011.
- 2) 小川善資: 日常検査法としての相対分析法のメリット. 分析機器・試薬アナリストのためのWeb勉強会Ⅰ, 2011
- 3) Tonks D. B.: Clin Chem, 9: 217-233, 1963.
- 4) Barnett R.N.: Medical significance of laboratory results. Am J Clin Path, 50: 671-676, 1968.
- 5) 小川善資: 吸光度が高すぎると測定できないの、比色分析装置の基礎. 分析機器・試薬アナリストWeb勉強会Ⅳ, 2012.
- 6) 小川善資: 測定光のバンド幅は狭い方が良いの、広い方が良いの、比色分析装置の基礎. 分析機器・試薬アナリストWeb勉強会Ⅳ, 2012.
- 7) 小川善資: 正確に測定しやすい吸光度はあるの、比色分析装置の基礎. 分析機器・試薬アナリストWeb勉強会Ⅳ, 2011.
- 8) 小川善資: 比色分析における分析精度と測定限界の問題—分析装置から考えた精度の限界—. 分析機器・試薬アナリストWeb勉強会Ⅱ, 2011.

図1 エンドポイント法における日々の監視法

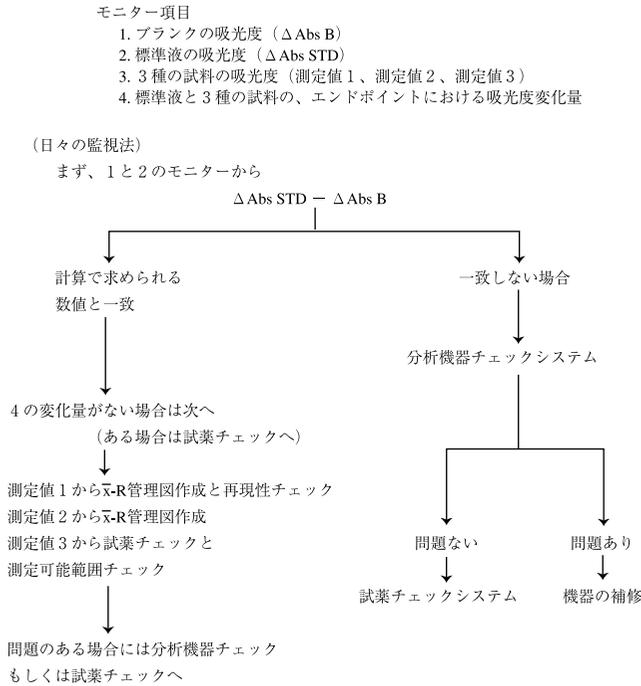


図2 酵素活性測定法における日々の監視法

