

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その8）〉

AST活性測定の日常検査法構築とその管理法（1）

小川 善資

はじめに

日常検査法の構築のためにはまず使用する分析装置の性能を理解しましょう。そして、臨床医や臨床検査技師の要望を聞いた上で、検査法を構築すべきです。なるべく多くの要望を満足させる測定法を考えてみましょう。その上で、要求された性能が満足できているか、また、持続的に維持できているかを管理できる方法を検討します。

さて、日常検査法を構築するためには、①検査前に取っておかなければならないデータ、②トラブルの前兆を発見できる方法、③現象再チェック法、④原因確認法、⑤論理的対策立案法を用意しておく必要があります。ここでは準備しておかなければならない試料や試薬についても記述します。具体的に検討を進めるため、AST活性測定法をまず例に上げ、次回以降は血糖測定、クレアチニン測定法を順次取り上げたいと思います。ご意見、ご質問のある方は学会事務局へご連絡下さい。

I. 日常検査法の構築編

1. 臨床医と臨床検査技師の要望と分析機器の性能

臨床医の要望を調査した結果を下記に示しました。施設によって要望は相違するでしょう。また、各自の施設が使用する分析機器の性能が相違しますので、各自で調査し、施設ごとに満足される方法を考えて下さい。

1) 臨床医からの要望

1. パニック値は800 U/L以上としてほしい。
2. 70～80 U/L付近の再現性を最も高くしてほしい。
3. その他の活性領域でも、再現性は5%以下としてほしい（トンクスの考え方）。

2) 検査室からの要望

1. 再検査率を3%以下とするため、1,500 U/Lまで希釈することなく測定したい。
2. 報告値は整数にて報告するため、1.0 U/L差を正確に測定できる方法にしたい。

3) 測定条件と分析機器の性能

測定は340 nmにて行い、光路長1.0 cm¹のセルを用い、総反応液量は1.0 mlとします。また、NADHのモル吸光係数は340 nmで6.3×10³ l・mol⁻¹・cm⁻¹とし、基準範囲は5～40 U/Lとします。

使用する分析機器は、吸光度変化速度の測定下限が0.0001/min、上限が0.25/minであり、精度良く測定できる反応速度は0.01～0.05/min、吸光度の測定可能範囲は0.01から2.50の間にあるものとしま

す。

*自動分析装置は測定可能範囲を広げる目的で、セル長を短くすることにより、吸光度を3.0や4.0まで測定可能にしています。しかし、本稿では計算式の理解や計算そのものを容易にするため、便宜的にセル長を1 cmとします。

2. 測定法の選択

1) 測定法

日本臨床化学会勧告法によるAST活性測定法¹⁾の考え方をなるべく継承した日常検査法としたいもの下記の下記の点については勧告法から大きく乖離することになります。

- ①標準血清を用いた相対分析法にて活性値を導くこと。
- ②検体ブランクは測定しないこと。
- ③反応開始液をアスパラギン酸から2-オキソグルタル酸に変更すること。
- ④試薬Ⅰ添加から試薬Ⅱを添加するまでの時間を8分から2分に変更すること。

勧告法は正確度の指針となる測定値を求める方法ですから、相対分析が認められるはずがありません。しかし、日常検査において、試薬も、分析機器も完全であることを毎日チェック出来ません。むしろ、多少の問題が発生していたとしても、正しい分析値を求めることの出来る相対分析法を用いることに意義があります²⁾。

検体ブランクを求め、差し引くことは分析的に、とても大切なことです。しかし、AST活性測定の場合、主として発生する検体ブランク反応はサンプル中のピルビン酸によって発生するため、試薬に添加するLD活性を定め、ピルビン酸の反応が完全に終了させれば検体ブランクが消去されてしまいます。これ以外の原因で発生する検体ブランクはほとんど無いことが確認できているため³⁾、日常検査では検体ブランクを測定しないことにします。

反応開始液が多いと、反応管の温度が安定しないこと、吸光度測定の変動が大きくなるため、なるべく液量を低く設定できる2-オキソグルタル酸を反応開始液とした方が有利です。

血清を放置すると、解糖系が働き、乳酸が蓄積し、一定レベルに到達するとピルビン酸濃度が上昇します。したがって、ピルビン酸が高濃度に達している検体では、乳酸も高濃度に達しています。乳酸はLD反応を阻害することやピルビン酸が高濃度であればAST活性に及ぼす影響が大きくなることについて、様々な検討がなされました。一番の解決方法はサンプルを試薬によって希釈して、問題を小さくすることです。第2に試薬Ⅰ添加後の待ち時間で、ほぼ影響のなくなることが報告されています⁴⁾。

以上の理由から日常検査法として、この様に4点の変更を行うこととしました。具体的な測定操作法を考案すると表1、図1のようになります。

3. 要望の具体化

1) パニック値

診察医はパニック値が出た患者の測定値を早く知りたいはずですが、測定可能範囲から外れている場合、希釈、再測定すると、時間を要します。このため、測定上限はパニック値を上回る様に設定すべきです。再検査率の問題と併せて、測定上限を考えます。

2) 再現性

測定下限が5 U/Lで、5%の再現性を確保しようとするなら、0.25 U/L差を正しく測定しなければならぬこととなります。分析段数⁵⁾が2,500段であることを考慮すると、測定上限が625 U/Lにしかならず、要求に応え難くなくなります。臨床医と相談し、基準範囲下限付近での測定精度について話し合うべきです。臨床的意義がなければ、下限付近の測定精度を落とすべきです。臨床検査技師の要望である1.0 U/L差を正しく測定する要望に答えられるようにすることを考えるべきです。

表1 AST測定操作法の原案

試薬	容量	終濃度
試薬 I	a ml	80 mmol/l Tris-HCl 衝液 (pH 7.2) 200 mmol/l Aspartate 0.32 mmol/l NADH 1,000 U/ml LD 500 U/ml MD
Sample	x ml	
37℃に加熱しながら混和し、2分間放置する		
試薬 II	b ml	80 mmol/l Tris-HCl 衝液 (pH 7.2) 10 mmol/l 2-oxoglutarate
37℃に加熱しながら、1分間待ち、その後30秒間の吸光度変化速度を求める。 活性は標準液の速度と比較し、検体の活性を求める。		



図1 測定手順

3) 測定上限

検査室から再検査率を3%以下としてほしい、という要望があります。測定上限を超える試料を測定した場合、その次に測定する試料は必ず再測定する必要がある（キャリアオーバーの問題）。測定値の度数分布曲線から、頻度1.5%となる活性を調べ、上限を考慮すべきです。この施設の場合、1,500 U/Lでした。パニック値が800 U/Lであるため、充分要望を満たすことが出来ます。

以上のことから、本稿では1.0 U/L差を正確に測定でき、希釈することなく1,500 U/Lまで測定できれば良いことにします。

4. 具体的測定操作法の決定

測定上限を決定する因子は①サンプルフラクション（サンプル量/総反応液量）、②吸光度分析限界と測定操作法、③試薬の能力の3つによって決定されます。まずは1,500 U/Lを上限にすることを念頭に考えてみましょう。

①サンプルフラクションから

測定できる吸光度変化量の最大が0.25/minであること、1,500 U/lまでを希釈することなく測定したいことから、次式にてサンプル量を計算します。

$$\frac{0.25/\text{min}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1.0}{x} \times 10^6 \geq 1,500 \quad \text{式1}$$

$$x \leq 0.02646$$

26.5 μlより少なくするとよい。

②吸光度測定限界と測定操作法から

吸光度の測定限界が2.5であること、サンプルに由来する最大の吸光度が0.5（検体の濁度によるものを含め）、サンプル中に存在するピルビン酸が2.0 mmol/lとします。まず、測定できる最大の吸光

度幅からサンプル由来の吸光度を差し引くと $2.5 - 0.5 = 2.0$ となります。さらに、ピルビン酸除去に必要なNADHの吸光度は（サンプル量を①から $25 \mu\text{l}$ として）次のように計算されます。

$$2.0 \text{ mmol/l} \times \frac{0.025}{1.0 \text{ (総反応液量)}} \times 6.3 \text{ (l/mmol/cm)} = 0.315 \quad \text{式2}$$

よって、AST活性測定に利用出来る吸光度幅は $2.0 - 0.315 = 1.685$ となります。その後1分間の吸光度を測定するとすれば、 $0.25/\text{min} \times 1.5 \text{分} = 0.375$ となり、この反応速度は充分測定できることになります。

勧告法のNADH終濃度は 0.16 mmol/l で、吸光度に直すと 1.0 で、ピルビン酸によって消費された分を差し引くと 0.685 しかありませんし、反応開始から2分待つてレイトアッセイをしなければならぬため、反応速度が $0.25/\text{min}$ なら、待ち時間中に吸光度が最大 0.5 消費することになり、実際に利用できる吸光度差は 0.185 しかないため、活性測定が出来なくなってしまいます。

さて、勧告法では分析に用いるセルの光路長は 1.0 cm で、吸光度測定上限は 1.0 と設定されていますが、使用する機器は吸光度の測定上限が 2.5 です。一方、NADHは 0.32 mmol/l 添加しても測定に影響を及ぼさないため、NADH濃度を勧告法の2倍添加すべきです。ただし、これ以上添加するとサンプル自身が持っている吸光度が 0.5 程度あるため、測定上限を超えてしまうことになるので、これ以上の添加はするべきではありません。

③試薬の能力

試薬の能力で問題となるのはMDの添加量です。MDの添加量でラグフェイス^{*2}が決まります。測定できる測定上限のAST活性値が決まります。ASTの場合、MDの添加量を 500 U/L とし、サンプル量が $25 \mu\text{l}$ なら、 $2,000 \text{ U/L}$ まで測定が可能⁴⁾です。

^{*2}反応の直線性でラグフェイスは見つけれられない

「ラグフェイスは反応曲線が非直線な部分」と考えておられる方が多いと思いますが、それは大変な誤解です。ラグフェイスは高活性検体測定時に発生するものです。ところが、日常検査で出会う非直線チェックは低活性の測定時のみです。反応液の揺らぎなどを含め、物理的・機械的に発生する問題で、非直線的な誤った測定誤差を排除するために役立っているものと思われます。ラグフェイスの影響を観察したければMD添加量を極端に低下させ、各種活性のASTを測定して検量線を書けば、高活性検体の測定値が明らかに低下している現象が確認出来ます。これがラグフェイスです。この時、反応の直線性は決して失われません⁶⁾。

以上のことより、希釈することなく $1,500 \text{ U/L}$ まで測定するためには①サンプル量を $26.5 \mu\text{l}$ より小さくすべきこと、②NADHの添加量を終濃度 0.32 mmol/l に上昇させることの2点です。

2) 測定下限から決める操作法

測定下限を決定する因子は①サンプルフラクション、②吸光度変化量の測定下限、の2つによって決定されます。

①サンプルフラクション

測定できる吸光度変化量の最小が $0.0001/\text{min}$ であること、測定したい最小の活性が 1.0 U/L であることから、次式にてサンプル量を計算します。

$$\frac{0.0001/\text{min}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1.0}{x} \times 10^6 \leq 1.0 \quad \text{式3}$$

$$x \geq 0.01587$$

すなわち、 $15.87 \mu\text{l}$ より多くすればよいことになります。測定上限から求めたものと合わせると、

15.8~26.5 μ lの間の整数値を選択すれば良いこととなります。ただ、i)なるべく測定精度を上げること、ii)区切りの良いサンプル量にしておくことが測定法構築上も計算上も有利なので、25 μ lと定めます。

②臨床医の要望から

分析機器の性能により、最も精度良く測定できる速度が0.01から0.05/minであることから、測定しやすい活性を計算すると次のようになります。

$$\frac{0.01/\text{min}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1,000}{25} \times 10^6 = 63 \text{ U/L} \quad \text{式 4}$$

0.05/minでは、317 U/Lと計算できます。このため、再現性良く測定できる範囲は63~317 U/Lとなり、医師の要望する活性は最も精度良く測定できる範囲内にあり、1.0 U/Lの差は正しく測定できます。しかし、40 U/L付近の再現性は2.5%程度になると推定できます。

5. 測定操作法の決定

分析機器からの問題を解決する必要があります。要求されている事項は次のような点です。

- 1) 総反応液量 $a + b + x = 1.0 \text{ ml}$
- 2) サンプル量 25 μ lとする。
- 3) 試薬量の設定

全ての試薬は80 mmol/l Tris-HCl 緩衝液にて作成するため、緩衝液の濃度は考慮しないものとします。

① 試薬 I 終濃度200 mmol/l アスパラギン酸溶液とするためにはなるべく試薬 I の使用量を多くしたいので、試薬 II の添加量を50 μ l、サンプル量を25 μ lとすると、試薬 I 量は925 μ lとなり、試薬濃度は次のようになります。

アスパラギン酸

$$200 \times \frac{1,000}{925} = \frac{216.2 \text{ mmol/l}}{1} \quad \text{式 5}$$

NADH

$$0.32 \times \frac{1,000}{925} = \frac{0.346 \text{ mmol/l}}{1} \quad \text{式 6}$$

② 試薬 II 試薬 I を作成する時に試薬 II 量を50 μ lと定めたため、試薬濃度は次のように計算できます。

2-オキシグルタル酸

$$100 \times \frac{1,000}{50} = \frac{2,000 \text{ mmol/l}}{1} \quad \text{式 7}$$

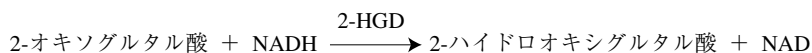
これで、 $a = 925 \mu\text{l}$ 、 $b = 100 \mu\text{l}$ 、 $x = 25 \mu\text{l}$ と定めます。

試薬量が確定できたので再度測定操作法を表2に示します。

6. 検査前に取っておかなければならないデータ

1) 試薬ブランク

試薬ブランクの主たる反応は共役酵素として添加したLD、MDの持つ次に示す反応によるものです。



2-HGD : 2-ヒドロオキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ

この2-HGD活性はLD、MDに含まれるコンタミ酵素ではなく、MD、LD自身の基質特異性から発生するブランクです。検体中に存在するピルビン酸をなるべく短時間に消去するため、LDを添加しています。このLDを必要以上過剰に添加するとこのブランク反応が大きくなります。

生物試料分析

表2 AST活性測定の日常検査操作法

試薬	容量	終濃度
試薬 I	0.925 ml	80 mmol/l Tris-HCl 衝液 (pH 7.2) 200 mmol/l Asparutate 0.32 mmol/l NADH 1,000 U/ml LD 500 U/ml MD
Sample	0.025 ml	
37℃に加熱しながら混和し、2分間放置する		
試薬 II	0.05 ml	80 mmol/l Tris-HCl 衝液 (pH 7.2) 10 mmol/l 2-oxoglutarate
37℃に加熱しながら、1分間待ち、その後30秒間の吸光度変化速度を求める。 活性は標準液の速度と比較し、検体の活性を求める。		

2) 正確度の確保

日常検査法であっても、正確度を知るとはとても大切なことです。ここでは2種類の方法で正確度からズレを推定します。

①理論で求められる反応速度との比較

準備された5種類の酵素活性試料を測定し、1分間当たりの反応速度を求めます。表3に理論上の反応速度を記述しました⁷⁾。実測された反応速度を記入し、理論的に得られる反応速度と実測の反応速度が一致するかを比べます。

また、検量線を作図し、直線性が保たれているかをチェックします(図2)。直線性が保たれていない場合には分析機器チェック法、もしくは試薬チェック法に従い調査し、原因を追求しなくてはなりません。

②ERMの測定

ERMを測定し、標示値との差を比較します。正しい活性が測定されていることを確認した後、最後の確認法としてERMを用いた最終チェックを実施します。正確度が確認できなかった場合、分析機器チェック法、もしくは試薬チェック法に従い、原因を究明して下さい。

3) 再現性

目標とする活性と再現性の関係を図に示しました(図3)。基本的には1.0 U/L差を正し測定できるようにしたこと。分析装置の再現性が2%あることから、この図のような再現性が期待できます。もし、実際に測定した再現性がこの目標を上回った場合、試薬、分析機器など、何らかの部分に問題の発生していることを意味します。目標を満足する結果が得られているかをチェックします。

4) 測定可能範囲の確保

準備された5段階の活性試料(100、200、500、1,000、1,500 U/L)を測定し、検量線を作成します。また、検量線の直線性が確保できているを確認します。予測される反応速度が上記再現性の範囲内であれば問題なしとすべきですが、これを超える場合、問題点を明確にすべきです。

5) 検体ブランク

試薬中に添加されたLDによって、サンプル中に存在するピルビン酸は通常1分程度で反応が終了

表3 理論上の反応速度と実際に測定される反応速度チェック表

試料	理論上の反応速度 (Δ Abs/min)	測定値	
		(Δ Abs/min)	誤差
100 U/L	0.01575		
200 U/L	0.0315		
500 U/L	0.07875		
1,000 U/L	0.1575		
1,500 U/L	0.23625		

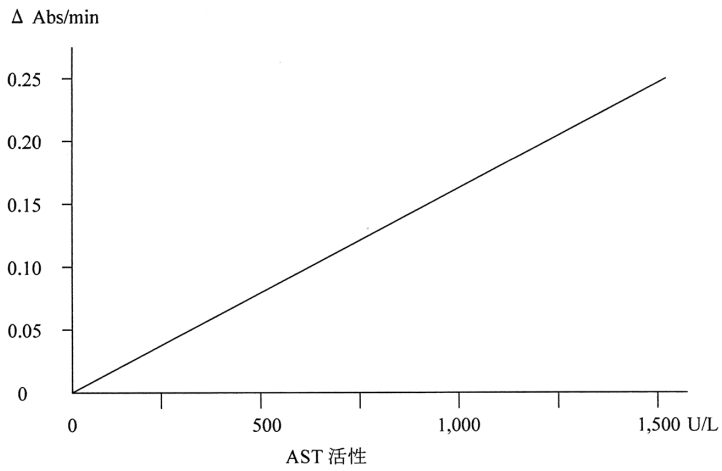


図2 ASTの検量線

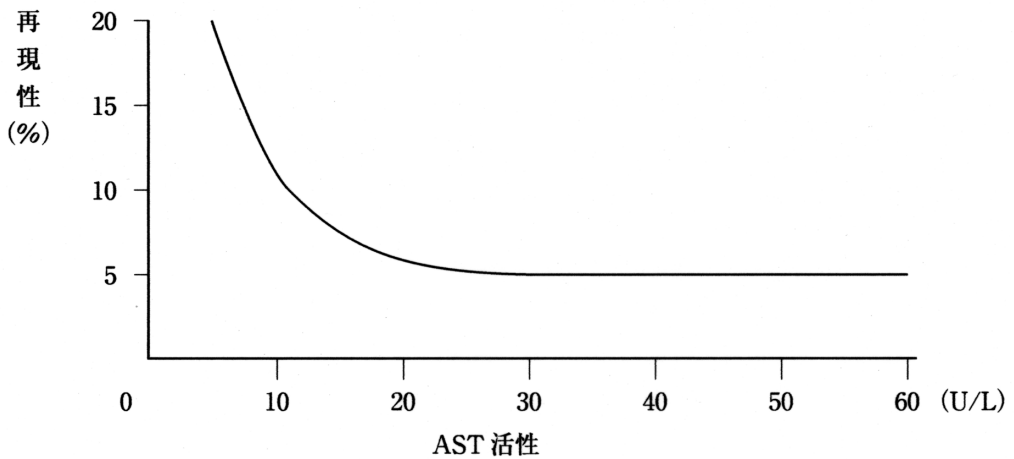


図3 AST活性と予測される再現性の関係 (実効感度の予測)

します。しかし、試薬Ⅱを添加するまでの時間を充分におこななかったり、LDの阻害剤である乳酸やオキサリ酸が高濃度の場合、正誤差が発生します。このような正誤差が発生していないか、チェックすべきです。

6) 勧告法および従来法との相関性

様々な状態にある異常検体を極力集め、また、高活性の検体から基準範囲内にある検体までまんべんなく分布する50検体程度を収集し、勧告法やその他測定法によって測定して相関を求めます。回帰式の傾きで0.98～1.02以内、切片は1.0 U/L以内に入り、かつ、相関係数が0.98～1.02に入ることを確認します。何れが外れても、試薬チェック法と分析機器チェック法を実施し、その原因を追及する必要があります。この解析においては回帰式から外れた位置にプロットされた検体の特徴に注目を集める必要があります。この解析を実施する目的の一つは異常患者血清中に存在する様々な物質によって、測定値が影響を受けていないかを観察することです。従って、外れた患者血清中、干渉物質があるのではないかと考えるべきです。回帰式の傾き、切片や相関係数が標記数値以内に入っていることはここまで準備し、構築してきた過程を考えていただくと、むしろ当然のことなのです。

(次号に続く)