

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その9）〉

AST活性測定の日常検査法構築とその管理法（2）

小川 善資

II. 測定終了後の精度管理から測定前の管理へ

精度管理成績が悪い場合に実施しなければならない「再測定」を実施したことがありますか。日々の精度管理判定を実施していますか。分析装置から測定結果が出次第、報告が行われているのではありませんか。

一日の測定が終了し、精度管理のためのデータを収集し、報告できる正しい測定が実施されたか、否かを判断し、測定値の報告がなされていました。しかし、採血後30分程度で測定値を報告しなければならない時代です。測定開始前に分析機器・試薬のチェックを行い、間違いのない測定値が得られることを確認し、測定値が出た段階で個人個人のデータチェック（デルタチェックなど）を実施し、報告すべきではないでしょうか。測定値が直ぐさま報告できる管理法（測定前の精度管理法）を作りましょう。

前回は測定値に関わる多くの方々の要望を叶えることのできる測定システムの構築法を提案しました。この提案の根本は測定システムの全てがコンピューターによって演算できることを記述しました。実際の測定を行わなくとも検量線が作れたり、反応曲線が作成できるし、計算方法も提示しています。まさに計算し尽くせることをお示しました。それなら、試薬のどこかに問題が発生したとすれば、どの様な誤差が発生するか示すことが出来るはずです。今回とこれ以降は問題発生時にどの様な変化を示すのかを提示しながら、安心できるデータが出せるのかを考えられる方法を提示していきます。まさに、測定動作が始まる前に問題の発生させない測定を確保する方法を勉強しましょう。この方法を獲得した上で、患者個人個人のデータを用いたデルタチェック法、論理チェック法やデータから患者の置かれている状況を読める勉強を積み重ね、絶対に問題を発生させないための精度管理法を獲得して下さい。

はじめに

自動分析機を用いる相対分析では、管理図法を用いても試薬や分析機器の異常を発見でき難くなることを既に指摘しました⁹⁾。標準液を測定するときとサンプルを測定するときと同じ誤差が発生するために誤差が相殺され、サンプルの測定値が補正されてしまうためです。したがって、管理図法では、トラブル発見が難しくなります。では、全ての異常が発見できないのでしょうか。試薬や分析機器の異常は、その内容により種々様々な問題を発生させます。個々の異常を取り上げ、どの様なトラブルを発生させるのか。その計算式と実際に発生する問題を知り、どうすれば試薬や分析機器の異常を早期に発見できるのかを考えましょう。

多くの方は「試薬がおかしい」と聞くと「ブランクを測定した時の吸光度はいくら?」、「標準液の吸光度（または $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ）はいくら?」と聞き返すと思います。測定値に換算される前のデータで判断しようとしているからではないでしょうか。このことが何らかの解決法を示しているのかも知れません。もう少し深く考えてみましょう。

生物試料分析科学会 理事長

〒194-0042 東京都町田市東玉川学園1-9-19

1) 試薬異常でどの様な変化が現れるか

AST活性測定試薬に用いられているものは、①リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MD)、②乳酸デヒドロゲナーゼ (LD)、③NADH、④アスパラギン酸、⑤2-オキシグルタル酸、⑥Tris緩衝液の6点です。これらについて考えます。

① MDの失活

AST活性測定用試薬の中で失活しやすい試薬はMD、LDとNADHの3つです。試薬 I の条件下で、MDを37℃に保存し、失活の速度定数を求めると 0.0537日^{-1} (言い換えれば1日で約5.4%活性が低下する。)でした。すなわち、約10日でMD活性が半分になります。もちろん、この値は市販試薬に添加されている酵素によって相違するため、測定用試薬によって相違します。

さて、MD活性が半分になれば、AST活性測定値にどの様な現象が見られるのでしょうか。各種AST活性のサンプルを測定し、検量線を書くと同図3のようになります⁹⁾。2,000 U/Lの試料を測定するとほんの2%程度低下するものの、それ以下の試料なら、全く誤差が発生しません。さらに、この試薬を37℃に保存し続け、使用し続けると2,000 U/Lの試料の測定値が22日目にやっと-10%低値に測定され、試薬異常に気づきます (図3、4)。しかし、100 U/Lの試料を測定していても、活性の低下に全く気がつきません。100 U/Lの管理試料で監視していれば、33日目からやっと測定値の低下に気づきます⁹⁾。この時点で試薬の異常に気づいたとしたら、高活性検体の測定ミスは2週間近く続けていたことになり、取り返しの付かない誤差を提出し続けたこととなります。

ただ、現実問題として試薬 I を37℃に20日以上放置することはなく、MD活性が低下したことによる試薬異常に遭遇することはほとんどないでしょう。なお、試薬 I を37℃に保温すると、NADHの劣化とLDの失活が同時に起こるため、LDの失活の方が早期に発見できます。

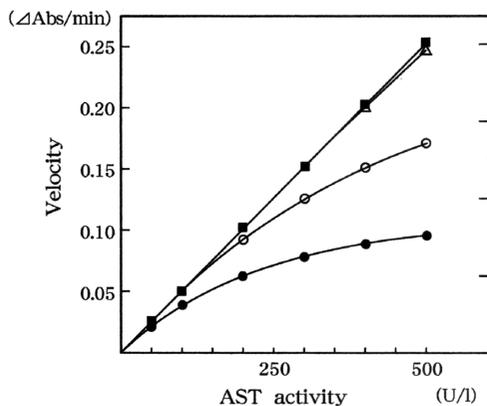


図3 各種MD活性のAST試薬を用いて作製した検量線⁹⁾
AST活性測定用試薬に添加されたMD活性による検量線
■—■ 500 U/Lを添加した試薬
△—△ 250 U/Lを添加した試薬
○—○ 100 U/Lを添加した試薬
●—● 50 U/Lを添加した試薬

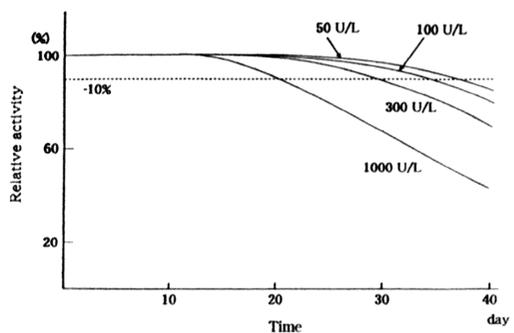


図4 MDが次第に失活した試薬を用いて管理図の予測⁹⁾
管理試料の活性が50、100、300、1,000U/Lの試料を用いてMDが次第に失活している試薬を使い \bar{x} -R管理図を作製した際に予測される管理図

演算法

共役酵素の必要量と初速度測定を行うまでの時間（反応開始から測定までの待ち時間）を正しく知るための実験は大変困難です。その理由は

- ①少ないと、どのような現象が発生するかを想定しにくい。
- ②ラグフェイスとは何かが正しく理解されていない（解説欄を参照）。
- ③酵素の失活が大きいと、正確な実験を再現しにくい。

などの問題があるためです。このため、理論的な演算により実験結果を予測した上で、正しい実験計画を立てて、理論と実際が一致するかを検証すべきです。日本臨床化学会から勧告されている勧告法に記載されている①共役酵素のKm値の規定、②共役酵素として添加すべき必要活性、③測定開始までの時間設定、などは理論的演算と実験の一致から定められている。なお、勧告法設定時に用いられた演算法は、ルンゲクッター・ギル法である。オイラー法の方が理解し易いので、本書ではオイラー法を用いる。また、勧告法ではホートラン言語を用いたが、理解し易いベーシック言語にて記述する。ただし、ベーシック言語では演算誤差が発生する。繰り返しになるが、近似値計算法はオイラー法、コンピュータ言語はベーシック言語を用い、複数酵素反応の連続反応を予測する。

まず、1段階目の酵素反応は測定したい酵素反応（AST反応）で、Ping-PongBi-Bi反応である。この反応の演算式は次式である、

$$v1 = \frac{V_{max1} \times A \times B}{K_{mB} \times A + k_{mA} \times B + A \times B} \text{ ----- 式1}$$

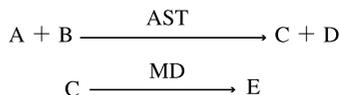
A: アスパラギン酸濃度 B: 2-オキソグルタル酸
 C: オキサロ酢酸 D: グルタミン酸
 v1: ASTの反応速度 KmA: ASTのアスパラギン酸のKm値
 KmB: ASTの2-オキソグルタル酸に対するKm値
 Vmax1: ASTのVmax

2段階目の反応は基質濃度がほとんど存在しない段階から、次第に増加すること、基質の一つがNADHであるため、Km値に対して圧倒的濃度を添加できるため、1基質-1生成物反応と考えることができるため、Michaelis-Menten反応に従うものとして、次式を用いる。

$$v2 = \frac{V_{maxC} \times C}{K_{mC} + C} \text{ ----- 式2}$$

C: オキサロ酢酸 E: リンゴ酸
 v2: MDの反応速度（AST活性測定時の反応速度）
 KmC: MDのオキサロ酢酸に対するKm値
 Vmax2: MDのVmax

AST活性測定の反応式を前述の記号にて記述すると次のようになる。



となる。前述の通り、MDの基質であるNADHは大過剰添加されているため、反応式には組み込まれない。しかし、これでは反応曲線を予測することはできない。ただし、Cの減少量とNADHの減少量、Eの生成量はNADの生成量と等しいことより、反応曲線はCの減少曲線として演算する。

コンピュータープログラムを作成できる方は挑戦してみてください。演算はFOR-NEXT演算の中に式1と式2をそのまま記入し、演算時間を必ず設定して下さい。通常は酵素活性測定時間として使われる5、6分で充分です。演算のSTEPは短くすればするほど正確な予測ができますが、Basic言語で演算させる場合は演算誤差が大きくなるため、適切な時間設定を行って下さい。通常はSTEP時間を0.1分程度に設定すべきだと思います。また、STEPごとに演算結果を印字させると大変な紙面の無

駄遣いになるため、1分毎や30秒毎に印字させるように設定すべきです。なお、N88 Basicにて作成したプログラムは公開しているのを利用して下さい^{12), 13)}。

なお、AST反応は0次反応速度になるように基質量を過剰添加できています。このためAST反応を0次反応と特定すれば、プログラムの作成は簡単です。反応曲線を作成したい場合には時間 t における生成物濃度に、測定物質であるNADHのモル吸光係数を乗じると、吸光度が得られます。反応速度も毎分生成される生成物濃度として演算できますので、これにモル吸光係数を乗じると、実際に測定される $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ となります。

②LDの失活

LD失活の影響をキャリブレーションで補正することはできません。LDがどのような目的で添加されているかから考えましょう。JSCC勧告法では添加理由を次の2つと書かれています²⁾。一つはサンプル中に存在するピルビン酸をAST活性測定前に消去し、AST活性測定に影響を与えないようにするためです(図5)。もう一つの理由はAST反応にて生成されたオキサロ酢酸が脱炭酸してピルビン酸に変化したとしても、LDによって変化しなかったときと同様にNADHを消費するためです(図6)。しかし、実際には後者の目的を叶えることができません。その理由は、①脱炭酸反応がほとんど生じない、②MD反応に正しく追従するためには大量のLDを添加する必要があるにもかかわらず、LD活性がAST活性を阻害するため¹⁰⁾、LDを無制限に添加できません。(LDのピルビン酸に対するKm値は、MDのオキサロ酢酸に対するKm値より数十倍大きいため、少なくともLDをMDの数十倍添加する必要があります。)

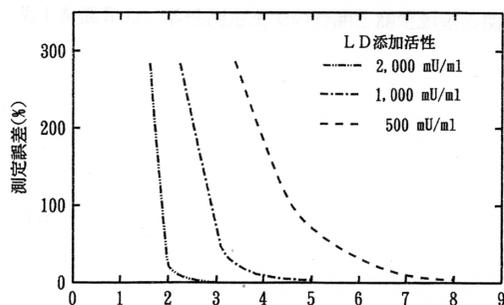


図5 検体と試薬 I を混和してからAST活性測定までの時間と検体中に存在するピルビン酸(0.4 mmol/L)によって発生する誤差の程度影響を最も多く受けるAST活性が5 U/Lで、LD添加活性が2,000 U/L、1,000 U/L、500 U/Lの時に発生する測定誤差。

LD添加の目的である検体中ピルビン酸による正誤差は試薬 I とサンプルが混和されてから開始し、通常2分程度で反応が終了します。本法ではこの反応時間を3分に設定しています。この影響は、測定するAST活性が低いほど、ピルビン酸濃度が高いほど、乳酸濃度が高いほど(LDの阻害剤となるため)、大きな測定誤差をもたらします。

AST測定の下限である5.0 U/Lで、乳酸が2.0 mmol/L、ピルビン酸が2.0 mmol/Lにおける影響を考えてみましょう。試薬 I + サンプル中のLD活性が種々に変化したときの測定誤差の関係を図6に示しました。一方、LD失活の速度常数は 0.0632日^{-1} です。2つの結果を合わせて考えると、試薬 I を37℃に保管すると、9日後に測定誤差が発生するようになります。

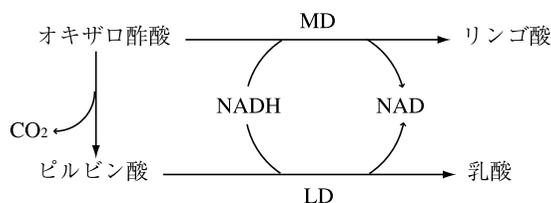


図6 AST活性測定試薬にLDを加える2つ目の理由

この問題は現実に発生しうる可能性があります。LDの失活はMD失活を示すことと同じ意味です。より早期（トラブルを起こす前兆の段階）に発見しやすくするため、LD活性を1/2にする阻害剤を管理試料に添加することを考えました（管理用試料の項参照）。

③NADHの劣化

NADHは保存により、LDとMDを阻害するインヒビター-1 (I-1) とインヒビター-2 (I-2) の生成が報告されていますが¹¹⁾、I-1やI-2がどれだけ産生されているか求めることは困難です。しかし、産生の有無だけを知るのであれば、LDやMDの失活と同じ現象が現れるので、試薬 I 中のLD失活を監視していればNADH劣化は十分検出できます。なお、NADHの劣化はリン酸の存在下でより急速に進むため、現在では使われていないと思いますが、もし、リン酸緩衝液を使用しているなら、試薬の変更をお勧めします。

④アスパラギン酸の劣化

AST活性測定値を低下させるまで、アスパラギン酸が劣化することはほとんどないと思います。また、劣化があったとしても、一定の比率で活性が低下するため、キャリブレーションをすれば測定値の誤差はなくなります。しかし、キャリブレーションや管理試料の $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ で監視すれば、異常を発見することができます。また、アスパラギン酸が極端に劣化した場合（80 mmol/L以下）、m-AST活性が優位なサンプルを測定すると正誤差を与えます²⁾。この場合にはキャリブレーションによる補正はできなくなります。アスパラギン酸添加量は200 mmol/Lで、このような影響が出るまでアスパラギン酸が低下することは通常考えにくいです。

⑤2-オキシグルタル酸の劣化

2-オキシグルタル酸も、AST活性測定値に影響を与えるほど劣化することはほとんどありません。劣化したとしても、一定の比率で活性が低下するため、キャリブレーションをすれば誤差はなくなりますし、アスパラギン酸同様、 $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ で監視すれば、異常を発見することができます。

試薬異常によって発生する測定誤差のまとめ

試薬の中には緩衝液も含まれます。しかし、緩衝液として利用されている試薬の化学反応性は低く、劣化もほとんどありません。ただ、影響があるとすればpH変化が起きます。pHチェックで緩衝液に問題が発生しているかどうかは判断できます。Tris-HCl緩衝液では、あまり注意することはないでしょう。

試薬によって発生する誤差についてまとめてみると、試薬による問題が発生することは極めて稀であることを理解していただけたと思います。また、問題が発生した場合、キャリブレーションによって誤差が回避できる場合とできない場合のあることを理解して下さい（表2）。

表2 試薬によって発生する誤差のまとめ

試薬名	キャリブレーションによる補正の可否	誤差の特徴
MD	ほとんど発生しませんが × 補正不可	・少々失活してもAST活性に影響を与えない。 ・高AST活性時に大きな測定誤差。低AST活性 検体では影響が出ない。
LD	× 補正不可	・サンプル中のビルビン酸濃度、乳酸濃度、LD 活性によって影響が相違するため、補正不可
NADH	× 補正不可	・LDの問題+MDの問題 ・問題が発生することはほとんどありません。
アスパラギン酸	○ 補正可 極まれに補正できない	・もし発生しても補正されます。 ・極端に低下するとアイソエンザイムの問題
2-オキシグルタル酸	○ 補正可	・問題が発生することはほとんどありません。 もし発生しても補正されます。

2) 分析機器の異常で測定値は変化するのか

分析機器のトラブルは突然発生した場合、機能が完全に停止すると思われる方が多いかもしれませんが、必ずしもそのようなことはありません。例えば光源ランプがタングステンランプ（ハロゲンランプ）の場合、ランプの寿命は明示されています。ランプ使用時間を積算し、適宜交換して下さい。光源の劣化による影響は使用限界に近い波長からより大きく発生します。タングステンランプを用いて340 nmの測定を行っておられる方が多いと思いますが、タングステンランプにとって340 nmは限界ぎりぎりの波長です（教科書的には限界を超えていると記載されています）。このため、電源が切れる前から、測定値に影響が出やすいため、注意が必要です。同様に、濃厚試薬流路の配管接合部に試薬結晶の吹き出しも、定期的に目視チェックと定期交換をお勧めします。今までのトラブル発生例を整理し、定期的なチェックや交換時期の設定が大切です。

①吸光度測定直線の範囲の低下

吸光度測定直線の欠如はキャリブレーションで正しく補正はできません。このトラブルが発生すると低活性で、より大きな負誤差を生じます。これに対して、高活性検体の測定では誤差は少なくなります。理由は吸光度測定の直線性は吸光度の高い部分で直線性を失うからです（図7）。AST活性測定の場合、高い吸光度から低下する吸光度変化を測定します。このため、低活性測定時は非直線部分のみ測定します。正しい装置を用いると $\Delta \text{Abs a/min}$ であるのに対し、非直線になっている場合、 $\Delta \text{Abs a/min}$ と測定しているため、吸光度変化量を少なく測定してしまうからです。これに対して、高活性検体では非直線以外の部分も測定するため、誤差は小さくなります。このような誤差が発生しないよう監視する方法は、①試薬 I の吸光度の変化、そして、②なるべく低活性の管理試料の測定値の変化を監視することです。

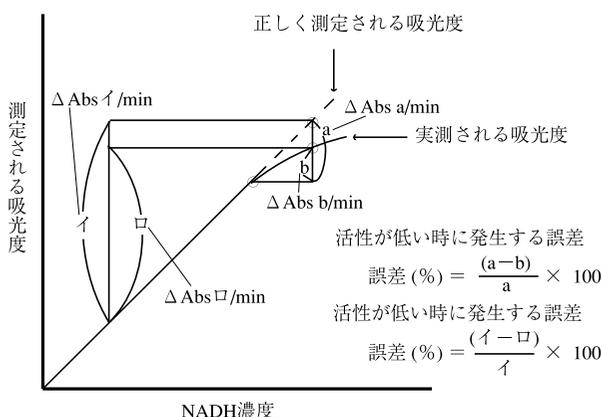


図7 吸光度直線性を失った装置で発生する誤差の模式図

AST活性は吸光度の高い部分から低い方向に測定するため、活性が低い程、大きな誤差が発生する。

直線性を欠如させる原因はセルの汚れと分光器の比迷光の増加によります。セルの汚れは急速に変化することがあります。これに対して比迷光の増加は急速に進行することは少ないため、試薬 I の吸光度チェックで異常を検出できます。1ヶ月年に一度程度、直線性チェックや吸光度測定上限チェックを実施することを推奨します。

セルの汚れやセル内の気泡の発生は突然発生すると思われるかもしれませんが、しかし、セル内の気泡の発生はセルの汚れが発生を助長します。セルの洗浄は丹念に実行することを推奨します。

なお、比迷光を大きくする主たる原因は湿気とホコリです。分析装置および周辺の整理整頓などの環境整備が大切です。

②サンプルノズルの詰まり

サンプルノズルの詰まりは、当然キャリブレーションで補正できる問題ではありません。患者サンプル個々の問題ですが、詰まりの影響が以降の検体測定に影響を与えることがあります。最近、透析や人工心肺、カテーテル治療など、ヘパリンなどの抗凝固剤を連続投与された患者が増加しており、自動分析機にかけられたサンプルが凝固を始め、サンプルノズルを詰まらせるトラブルが発生しています。圧力センサーが付けられ詰まりを発見する方法が導入されています。詰まりのあることが発見できても、自動分析装置を停止させることなく詰まりを除去することはできません。凝固を促進させる試薬や機材が考案されていますが経済的問題もあり、簡単には解決できないのが現状です。自動分析装置を運用する上での最も頭の痛い問題の一つでしょう。

③恒温槽の温度変化

測定温度の変化によって発生する誤差は系統誤差であるため、キャリブレーションによって補正できます。恒温槽の温度が多少間違っても測定誤差は発生しません。しかし、標準物質に添加されている酵素と血清中に存在する酵素の温度依存性が一致するかが問題となります。AST活性の場合、上清分画由来AST (s-AST) がほとんどです。s-ASTの温度依存性と一致するASTが標準液に用いられていれば補正できますが、動物由来ASTの場合は一致しないため、補正できません。標準血清に添加されているASTのチェックが必要です。

④ノイズによる誤差

常に一定のノイズのある場合は誤差とはなりません。むしろノイズのない装置などありません。しかし、非特定のノイズにより発生する誤差はバラツキとなります。このため、キャリブレーションで補正できません。また、原因が機械的問題だけでなく、試薬によっても発生します。活性が低いほどバラツキによる誤差は発見しやすくなります。バラツキの指標は図2の実行感度に示した通りで、この指標をオーバーしている場合は原因を追及し、改善する必要があります。何が原因かを機器チェック法と試薬チェック法にて、丹念にチェックする必要があります。

⑤ドリフトによる誤差

ドリフトにより発生する誤差も系統誤差ではなく、バラツキの原因となり、キャリブレーションで誤差を補正することはできません。理由は同じドリフトが継続的に続くことが少ないためです。ノイズと同じように丹念にチェックし原因を究明すべきです。

⑥検体の取り間違い

検体の取り間違いの防止には、既に広く利用されているデルタチェック（前回値チェック）法が有効な方法です。デルタチェック法の導入で診療医からの問い合わせが激減することからも、その有効性が理解できます。

⑦再現性チェック

再現性低下の原因はとて多く、この情報だけでどの様な問題が発生しているのかを特定することは不可能です。許容される再現性を超えた場合、丹念に原因を究明するしかありません。機器チェック法も試薬チェック法も複雑です。定期的にチェック法を実行し、慣れておく必要があると思います。

Ⅲ. 精度管理法

－測定値が出る前の精度管理法の確立を目指して－

今までの精度管理法は測定誤差が発生していないかを確認し、もし異常があった場合、何が原因であるかを追求できる方法が求められていました。しかし、現在は採血後30分程度で測定値を報告することが求められています。測定が終了してから問題がなかったことをチェックできません。これに対応するためには測定誤差を発生させないための精度管理法を知る必要があります。今回はこれに対応した方法を提案します。

具体的には極わずかな測定値の変化から、将来測定誤差を発生させる異常が進行していることを発見し、この発見が正しいかを簡単に確認し、対策法を論理的に立案できる精度管理法を模索したいと思います。

1) 正確度チェック

正確度に対する確認は精度管理上で最も大切な問題です。しかし、標準液を用いる自動分析法においては主として標準液の表示値で正確度の大半は決定されます（トレーサビリティ）。トレーサビリティについては別途取り上げ、詳細を記します。標準液と管理試料の $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ でチェックする方法を提案します。しかし、この方法では分析機器の問題であれ、試薬の問題であれ、どのような問題であっても異常を示すだけで、どこにどの様な問題が発生しているのかを別途調査する必要があります。測定値としての正確度はこれで保証されたとしても、分析システムに異常が発生していればいつかはトラブルを発生させます。より早期に異常に気付くべきです。この方策として、丹念に問題点を究明できるように訓練して下さい。

①標準物質・管理試料の反応速度（ $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ）

標準液と管理試料のAST活性は測定前に分かっています。この活性を次式に代入すれば $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ が求められます⁸⁾。この数値を記録し、管理図に示します。標準液のAST活性が400 U/Lとし、前項で記述した日常検査法で実施したとします。

$$\frac{\Delta\text{Abs}/\text{min}}{6.3 \times 10^3} \times \frac{1,000}{25} \times 10^6 = 400 \text{ U/L}$$

$$\Delta\text{Abs}/\text{min} = 0.063/\text{min}$$

また、この活性における再現性の目標が5%であるため、0.0599から0.0662（測定できる限界が小数点4桁であると設定していることから5桁目を四捨五入した）が許容限界となります（図8）。同様に管理試料Aの活性が10 U/Lであるとする、平均値が0.0016/minで、許容限界は0.0015/minから0.0017/min内に入らなければならないことになります。

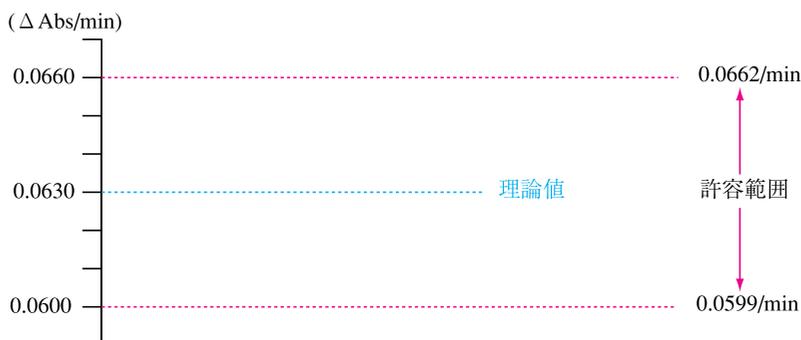


図8 標準液の反応速度管理図（ $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ）

② 2時点における反応速度比

自動分析装置には測定時点ごとの反応速度を明記する機能を持っている装置が多くあります。そこで試薬Ⅱ添加2分後と2分30秒後の2点の $\Delta \text{Abs}/\text{min}$ の比を求めます。理論的にはこの比は1.0であり、この比が大きくなっても、小さくなっても、何らかの問題が発生していることになります。この比を図9に作図します。



図9 2点における反応速度比

2) 試薬ブランクの反応速度

試薬ブランクの主たる原因が、試薬として添加したLDが持つ2-HGD活性であることを前述しました。また、LD活性がAST活性を阻害することも明記しました。すなわち、試薬中のLD活性を高くし過ぎるとピルビン酸による正誤差の危険性は少なくなるものの、試薬ブランク活性が上昇し、AST活性を低値に測定してしまう誤差が発生します。現状の試薬では、試薬ブランクを測定できるほど高い活性で添加されている試薬はないと思いますが、試薬ロットが変更されたときには注意して観察ください。

3) 試薬ブランクの吸光度

試薬ⅠにはNADHが添加されているため、高い吸光度を示します。また、試薬Ⅱの主成分である2-オキソグルタル酸も340 nmに吸光度があります。このため、試薬ブランクの吸光度はこの両者の状態を表します (図10)。



図10 試薬Ⅰの吸光度

NADHが変化しI-1やI-2に変化しても、吸光度はほんの少し低下する程度で、吸光度は大きく変化しません。一方、2-オキソグルタル酸は劣化すると吸光度が上昇することがあります。

4) 管理試料の管理

精度管理には、2種類の試料の測定を推奨します。管理試料Aは診療医から再現性の高い測定を希望されている活性試料で、もう一つの管理試料Bは試薬・機器の異常を発見しやすい試料です。

①管理試料Aの測定

診療医から再現性の良い測定を希望されている活性付近で、どの程度の再現性が維持されているかを表明するための管理図には下記の利点があります（図11）。

- 1) 最終的な報告値がどの程度の再現性で報告されているかを示すことに適している。
- 2) 多くの方に分かりやすく表現できる。

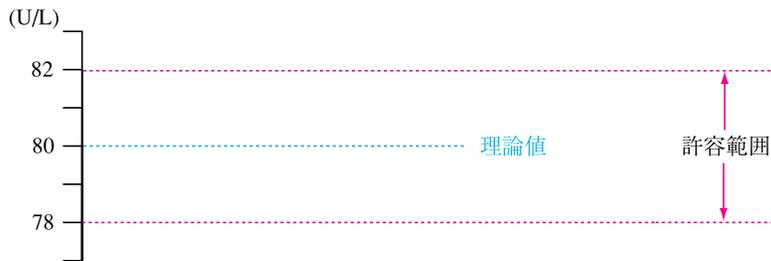


図11 管理試料AのX-R管理図

②管理試料Bの測定

試薬の異常、分析機器の異常をいち早く知るために2種類の管理試料を考えました。中でも、管理試料Bは試薬異常と機器異常の前兆を捉えやすいように考案した試料です（図12）。管理試料の作成方法は別途記述しました。LDの失活をより早期に発見できるようにするため、LDの阻害剤と試料中に存在する可能性のあるLD阻害剤の乳酸を管理試料に添加し、AST活性は異常を発見しやすい測定下限付近のAST活性としたものが管理試料Bです。ただ、検出できる異常は多岐に及んでいるため、異常が発見できても、多くの場合、直ちに何に問題があるかを推測できません。問題の生じている可能性がある場合、試薬チェック法に進んでいただき、詳細な検討を実施し、問題の原因を追及してください。

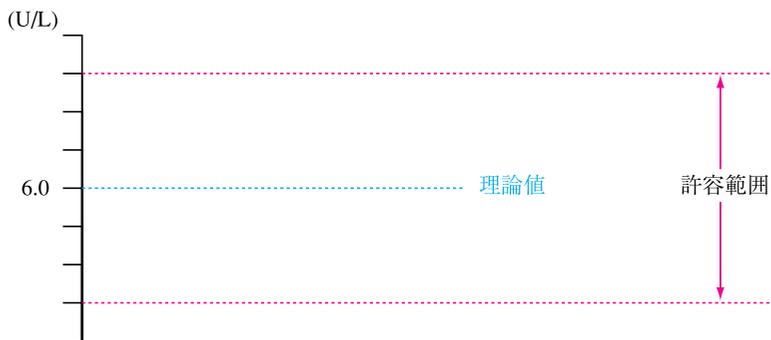


図12 管理試料BのX-R管理図

③各種活性試料（段階的活性のAST溶液）

試薬や分析装置に異常が発生した場合、測定上限付近の測定が問題となることが多い。測定上限まで、正確に測定できているかをチェックするための試料を常に用意しておく必要があります。ただ、測定上限付近のみの検体だけでなく段階的に作成された試料を測定する方が異常を見出しやすいし、対策法の立案に役立ちます。問題があると感じたときや定期診断で測定し、チェックするこ

とを勧めます。結果から検量線を作成し、直線性が確保できているか見て下さい。

まとめ

ここまでで、どうすれば試薬や分析機器の異常を早期に発見できるのか、大まかな考え方を理解していただけたと思います。この後、精度管理試料作成法、異常の確認法、そして対策立案法に言及したいと思います。これに続いてヘキソキナーゼ法によるグルコース定量法、クレアチニン測定法と次第に記述したいと考えています。

引用文献

- 1 日本臨床化学会分析部会酵素委員会: 血清GOT活性測定法に対する標準的測定法. 日本臨床化学会分析部会, 1-5, 1981
- 2 日本臨床化学会分析部会酵素委員会: 血清GOT活性測定法に対する標準的測定法及び解説書 第I版. 日本臨床化学会分析部会, 7-24, 1918
- 3 小川善資: 酵素活性測定における施設間差の現状と酵素標準物質の効用と問題点. 生物試料分析, 15: 103-112, 1992
- 4 日本臨床化学会分析部会酵素委員会: 血清GPT活性測定法に対する標準的測定法. 臨床化学, 18: 40a-44a, 2004
- 5 日本臨床化学会分析部会酵素委員会: 血清GPT活性測定法に対する標準的測定法解説書. 臨床化学, 18: 45a-52a, 2004
- 6 小川善資, 伊藤 啓: 共役酵素反応の基礎. 検査と技術, 20: 13-18, 1992
- 7 小川善資: 正確度の検証法(1) —分析反応と理論は一致しているか、検量線の予測—〈資料: 分析機器・試薬アナリスト認定講座(その3)〉. 生物試料分析, 35: 184-187, 2012
- 8 小川善資: 〈資料: 分析機器・試薬アナリスト認定講座(その1)〉、x-R管理図は分析機器や試薬の異常を見付けられない! . 生物試料分析, 34: 359-363, 2011
- 9 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勉強会資料, 1: 1~7, 2011
- 10 小川善資: 酵素活性による酵素活性の阻害. 投稿準備中
- 11 山内淳一, 吉村世都子, 藤井克美: NADH中のLDH反応阻害物質について. 生化学, 45: 576, 1973
- 12 小川善資, 金島才仁, 伊藤 啓: 酵素反応速度論(その5). 生物試料分析, 16: 150-157, 1993
- 13 小川善資, 金島才仁, 伊藤 啓: 酵素反応速度論(その6). 生物試料分析, 16: 200-207, 1993

【言葉の解説】ラグフェイスとは

酵素活性測定反応をスタートさせて、非直線的に進行する部分のことをラグフェイス(ラグ)と呼ばれることが多いのですが、正しい酵素活性を示していない部分をラグと呼びます。原因は下記に示した5つの原因があります。

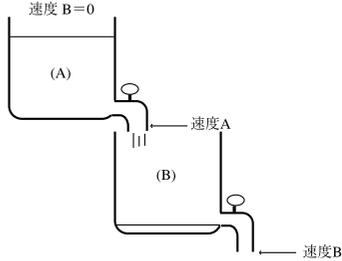
- ①共役酵素を用いるために発生する反応の遅れ
- ②共役酵素不足による反応の遅れ
- ③サンプル中に存在する反応中間体の反応によるもの
- ④反応液攪拌による揺れによるもの
- ⑤反応液と反応開始液の温度差によって発生するもの

この中でも、最も大きな誤差を招くのは共役酵素活性が不足することによって発生する誤差です。しかも、反応曲線は非直線にならないため、測定誤差が発生しているか分かり難い問題があります。図13(次ページ)にそのメカニズムを模式的に記しました。

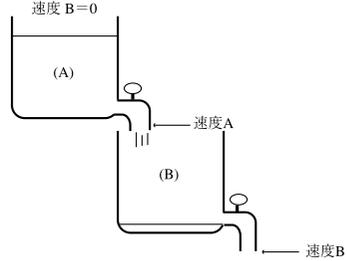
共役酵素が充分添加されている場合

共役酵素が不足している場合

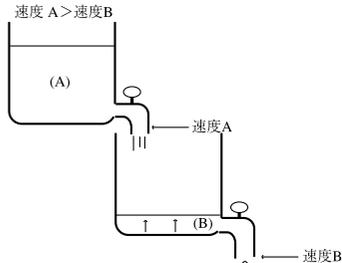
(1) (共役酵素反応のスタート時)



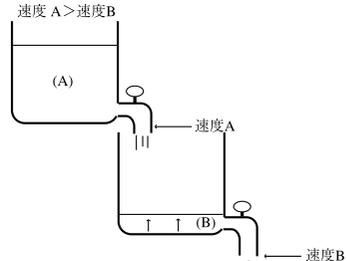
(1) (共役酵素反応のスタート時)



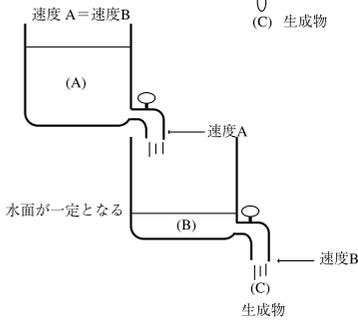
(2) (スタートからしばらく経過したとき)



(2) (スタートからしばらく経過したとき)



(3) (スタートからかなり経過したとき)



(3) (スタートからかなり経過したとき)

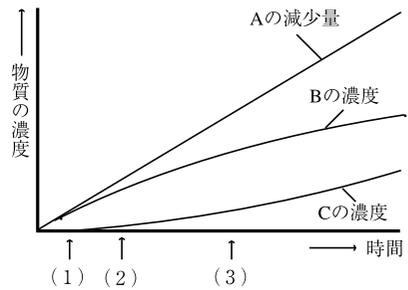
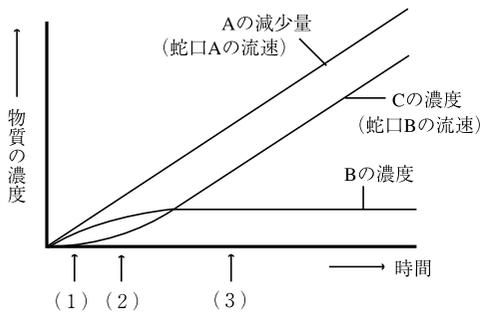
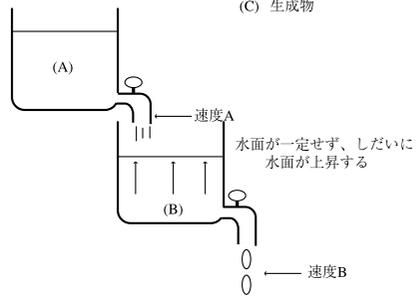


図13 共役酵素が充分添加されている時と不足している時の模式図

共役酵素が不足している場合、反応曲線は曲がらないのですが、正しい酵素活性を表しておらずラグフェイスです。