

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その14）〉

酵素活性測定法の分析システム構築法（その1） 一臨床医の要望と検査技師の要望を取り入れた分析システム構築法一

小川 善資¹⁾、沼上 清彦²⁾

Summary Enzyme activity measurement for the laboratory tests are a widely used, in many cases done with general-purpose automatic analyzers. They are used as screening tests and in tests incorporating diagnostic criteria. Relative analysis methods are widely used to ensure the safety and accuracy of these analytical values. However, unlike methods that quantify substance concentrations, there are factors that affect accuracy even in relative analysis. This is a point that needs to be properly understood. One ideal type of test construction is analysis systems that take into consideration the desires of the treating physician incorporating the test and that also meets with wishes of the person doing the analysis. In other words, construction of an analytical system that has sufficient analytical resolution and that also sufficiently meets the desires of both the treating physician and the person in charge of the analysis with respect to lower or upper measurement limits and the minimum concentration for assay capacity. Since there is overlap in many parts of substance quantitative methods, this discussion focuses on the parts that differ. The analyzable range and precision greatly differ depending on the performance of the device used, and the performance of analytical instruments must be confirmed with each device. In this article performance is assumed and specific examples of analytical systems are proposed. A method of constructing an analytical system for lactate dehydrogenase (LD) is also taken up.

Key words: Routine assay, Assay system of enzyme activity, Automated analyzer, Molecular absorption

1. はじめに

酵素活性測定は広く用いられている検査で、汎用自動分析装置で測定されていることが多く、スクリーニング検査として、また、診断基準に取り入れられている検査もあります。これらの分析値の安定性と正確性を確保するため、相対分析法が広く用いられています。しかし、物質濃度定量法と異なり、相対分析を行っても正確度に影響を与える因子があるので、この点を正しく理解する必要があります。検査法構築の一つの理想は、検査に込められた診療医の要望を汲み取り、併せて分析者の希望を叶えた分析システムにあります。すなわち、分析分解能そして測定下限や上限に関する診療医と分析担当者の要望を十分に叶えられる分析システムを構築することです。なお、物質定量法と重なる部分が多いため、相違する部分を中心に記述します。使用する装置の性能によって、

¹⁾北里大学薬学部

〒194-0042 東京都町田市東玉川学園1-9-19

²⁾生物試料分析科学会 常任理事

分析できる範囲や精密度が大きく変化しますが、分析機器の性能は各自の装置で確認しなければなりません。本稿では性能を仮定し、分析システムの具体例を立案します。その上で、乳酸デヒドロゲナーゼ (LD) 活性測定法の分析システム構築法を取り上げます。

2. 分析装置の性能と測定誤差の関係

汎用自動分析装置を用いて、標準物質を使用し、相対分析によって酵素活性測定を行うった場合に、分析機器の10%程度の異変が、測定値にどのような誤差となって表れるかを表1に示しました。物質濃度測定時と同様、相対分析を行うことで系統誤差は相殺されるため、10%程度の異変が発生したとしても、多くの場合は測定値に影響を与えません。物質定量と相違するのは恒温槽の温度正確性です。

下記に示す測定原理にて酵素E1を測定する場合を取り上げます。この反応にて生成するNADHの340 nmにおける吸光度増加速度にて酵素活性を測定するものとします。



相対分析法による酵素活性と測定物質の吸光度変化量との間には次式が成立します。なお、NADHの340 nmにおけるモル吸光係数は $6.3 \times 10^3 \text{ l/mol/cm}$ とします。

$$\text{酵素活性 (U/L)} = \frac{\text{吸光度変化量}}{\text{モル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times 10^6$$

2-1. サンプルング量

著者らは、相対分析による物質濃度測定について記述しましたが⁹⁾、酵素活性測定においても相対分析を行う限り、サンプルング量に変化しても物質定量と同様、測定値に影響を与えません。

2-2. 試薬分注量

厳密に言うと、試薬濃度変化はアイソエンザイムによって活性差を生み出すため、相対分析を用

表1 分析機器の誤差と酵素活性測定誤差の関係
(10%程度の誤差が発生した場合に発生する測定誤差の関係)

分析機器の部位	内 容	測定値に発生する誤差
サンプルング部	分取量の正確さ バラツキ 詰まり キャリーオーバー	測定誤差は発生しない。 サンプルング量のバラツキが直接分析誤差として表れる。 深刻な誤差となる。 測定誤差は明確に表れる。
試薬分注部	分注量の正確さ バラツキ 試薬流路の漏れ	測定誤差は発生しない。 希釈・濃縮誤差として表れる。 突然異常測定値が連続する。
恒温槽の温度	温度正確度 温度の上下	アイソエンザイム間差による誤差の発生。 測定酵素の温度依存性による。
吸光度の測定精度	測光正確性 波長正確度	ほとんど影響しない。 ほとんど影響しない。
セル	汚れ	突然、汚れがはがれる以外は影響なし。
反応管	汚れ	試薬の汚れは影響を与える。試薬情報により、 影響の受ける組み合わせの排除が必要。
信号経路	ノイズ ドリフト	バラツキの原因になる。 正確度と再現性に影響する。

いても誤差を相殺できません。ただし、基質濃度は至適条件を選択しているため、ごく限られた酵素（LDなど）以外は、多少の基質濃度のズレがあっても活性差が出ないため、測定誤差は発生しません。

2-3. 恒温槽の温度設定

物質定量法では恒温槽の温度の正確さは測定値に影響を与えませんが、酵素活性測定においては測定値に誤差を与えます。原因は標準液に添加されている酵素と検体中に存在する酵素の温度依存性が多い場合に相違するからです。物質を定量したい場合は、標準液になるべく純粋な測定物質を選別して添加すれば良いのですが、酵素の場合は、どの様に精製された酵素を用いても、酵素の性質が相違するため、正しい測定値の伝達ができなくなります。動物由来や細菌由来酵素を添加した管理試料を用いた場合、検体中の酵素と温度依存性が相違することがあります。例えば、37℃で測定するつもりでも、恒温槽の温度が実際は40℃になっていたとします。ヒト血清中の測定対象酵素は熱に弱く、40℃では10%低値に測定されるとします。一方、標準試料に添加された細菌由来の酵素は熱に強く、40℃では37℃の活性より10%高値に測定されるとします。標準液の酵素活性が200 U/Lで検体中の酵素活性が100 U/Lとすると、40℃において測定した場合、標準液の活性が220 U/L分の吸光度変化を示します（例えば0.022/min）。これに対して検体を測定すると90 U/L（0.009/min）分の働きしか示しません。このため、測定値は次のように計算されます。

正しい温度（37℃）で測定した場合

標準液（200 U/L）の反応速度 0.02/min

検体（100 U/L）の反応速度 0.01/min

$$\text{検体中の酵素活性} = \frac{\text{検体の反応速度 (0.01/min)}}{\text{標準液の反応速度 (0.02/min)}} \times 200 = 100 \text{ U/L}$$

40℃で測定した場合

標準液（200 U/L）の反応速度 0.022/min

検体（100 U/L）の反応速度 0.009/min

$$\text{検体中の酵素活性} = \frac{\text{検体の反応速度 (0.009/min)}}{\text{標準液の反応速度 (0.022/min)}} \times 200 = 81.8 \text{ U/L}$$

となり誤差が発生します。これが、コントロールサーベイにおいて様々な問題を引き起こした原因の一つです。では、「ヒト由来の酵素を用いれば問題がないのか」というと、そのように単純ではありません。ヒト由来でも、アイソエンザイムが相違すると温度依存性が同一でなかったり、遺伝子組換え技術によって同一アイソエンザイムを作成しても、温度依存性が一致するかは実験的に確かめないと分からないからです。

さらに複雑な問題があります。血清中に2種類のアイソエンザイムがあり、両アイソエンザイムを均等に測定したいとします。ところが両者の温度依存性が相違すると合わせることができなくなります。一方のヒト由来の温度依存性の等しいアイソエンザイムを添加しても、他方のアイソエンザイムの温度依存性が相違すれば、測定値は大きな歪みを生むことになります。この問題を完全に解決法はありません。皆さんがこのことを十分に理解された上で、多くの方々の合意によって決めるしか解決の方法はないと思います。タンパク濃度として測定することも解決策の一つですが、タンパク定量法はもっと困難で、やっかいな問題があり、スムーズに解決できる術はないように思います。

2-4. 波長正確性

物質定量法と同様、系統誤差で、測定値に影響は現れません。

2-5. 吸光度測定直線の直線性

直線性の欠如した装置では正しい酵素活性測定ができません。特に吸光度減少速度を測定する方法では影響を大きく受けることになります。活性により誤差を受ける割合が相違します。具体的に発生する誤差についての記述を参考にして下さい²⁾。

直線性の欠如は吸光度の高い部分に発生し易く、低い部分には発生し難いため、直線部分だけで測定される場合には誤差が発生しません。物質濃度測定の場合、吸光度の増加反応を利用することが多く、直線性のなくなる吸光度を測定限界とすることで、誤差は発生しません。なお、より大きな吸光度から反応がスタートできるようにしておけば、測定可能範囲が大きくなります（試薬の項参照）。

試薬メーカーによっては、測定可能範囲が広いことを特徴としている製品があります。しかし、特徴にはなりません。また、最近の装置はセル長を短縮させて、高い吸光度まで測定できるようになっていますが、精密性が保たれているかが問題です。吸光度測定上限を2倍にするということは吸光度測定の分解能、すなわち、感度を1/2にしていることになります。したがって、精密性がどこまで保たれているかを明確に知る必要があります。要は、どの吸光度まで直線性を有しているか、精密性は保たれているかを各装置でチェックする必要があります。

2-6. 吸光度測定直線の正確性

直線性が保たれていれば、吸光度測定直線の正確性は測定直線の正確性に影響を与えません。

2-7. 分析装置のまとめ

自動分析装置を用い、相対分析によって実施される日常検査法の正確度と精密度に影響を及ぼす性能についてまとめてみます。まずは正確度に影響を及ぼす因子は次の3つです。

(正確度に影響を及ぼす性能)

- ① サンプルノズルの詰まり
- ② 吸光度測定直線の直線性の欠如
- ③ 恒温槽の設定温度の正確性

(精密度に影響を及ぼす性能)

- ① サンプルリング量のバラツキ、サンプルリング量の減少
- ② 試薬分注量の変化
- ③ 波長正確度

サンプルリング量のバラツキは直接測定直線のバラツキにつながります。また、サンプルリング量の減少も感度減少に直接つながるため、バラツキの原因となります。試薬濃度は至適条件となるように設定されているため、試薬濃度が上昇しても低下しても得られる測定シグナルが低くなるため、感度が低下し、バラツキの原因となる可能性があります。また、測定波長の誤差や測定光の半値幅は測定物質のスペクトルによって変化します。スペクトルがシャープなほど、波長のズレによる影響は大きく受けることになります。

なお、今回使用する分析装置の測定限界は表2のように設定します。

表2 今回使用する自動分析装置で測定できる吸光度変化速度の上限と下限 (仮定)

測定できる下限の吸光度変化量	0.0001/min
吸光度分析の分析分解能 (正しく測定仕分けられる吸光度差)	0.0001/min
測定できる上限の吸光度変化量	0.1500/min

この項の以下を記述するにあたっての仮定としての数値であり、設定としては光路長0.5 cmのセルを用い、検出結果は光路長1.0 cmの結果として表示されるものとします。

3. 試薬と測定誤差の関係

3-1. 正確度を左右する試薬の問題

酵素活性測定の場合、物質濃度測定とは異なり、試薬の変化によって測定値に影響が出てしまいます。物質定量においては、系統誤差はほとんど全て相殺できるとしましたが、酵素活性測定では、ほとんどの場合、そのようにはなりません。コリンエステラーゼ活性測定のように、血清中にアイソエンザイムが存在する可能性があっても、単一なアイソエンザイムのみを測定できる条件を設定できる場合には問題が発生しないのですが、複数のアイソエンザイムを均等に反応させ、その合計活性を求めたい場合は、大変難しい問題があります。そして、検体によってアイソエンザイムの存在比がそれぞれ相違するため、影響を正しく理解することは極めて難しい問題です。個別の酵素において議論しなければ解析は不可能です。具体的には検査項目毎に議論する必要があります。

試薬によって発生する問題は、基本的には系統誤差を発生させることが多く、相対分析にて誤差の解消が起こるはずですが、それぞれ個別の酵素にて吟味する必要があります。したがって、項目毎に議論することになります。

3-2. 測定反応はコンピュータ上で再現できる

酵素活性測定法における試薬濃度の決定はコンピュータ上で行うしかありません。理由は影響因子が多すぎるため、お互いの影響を考慮しながら試薬条件を決定していくことは極めて困難な作業となるためです。個別の酵素において具体的に記述していきます。

3-3. 共役酵素を用いない酵素活性測定法

酵素活性は、一般的に測定原理が単純なほど測定誤差の要因が排除され、より正確な活性値が測定できるはずですが、ところが、測定操作が簡単すぎることにより、測定操作法が組めないことがあります。具体的にはLD活性測定法で、乳酸→ピルビン酸の方向に反応させ、NADHの生成速度にて活性を求めるものとします。検体活性測定と試薬ブランク活性測定、検体ブランクを測定法の全ての組合せを記述してみます。

〔ブランク測定 1〕 精製水+NAD → 予備加温+乳酸 → 試薬ブランクの測定

〔ブランク測定 2〕 検体+NAD → +緩衝液 → 検体ブランク測定 1

〔ブランク測定 3〕 検体+乳酸 → +緩衝液 → 検体ブランク測定 2

〔検体活性測定 1〕 検体+NAD → +乳酸 → 検体活性測定 1

〔検体活性測定 2〕 検体+乳酸 → +NAD → 検体活性測定 2

試薬ブランクを測定することには何の問題もなく、一般的にも測定されていることです。次に検体ブランクの測定に関して考えてみましょう。ブランク測定 2 では検体中に乳酸が必ず存在するため、理論上ブランクを測定できません。かといってブランク測定 3 を選択しても、補酵素がなければいかなる酵素反応も生じるはずがなく、測定を行っても意味をなしません。理論的には、乳酸以外の検体中に存在する何らかの物質によって生じる反応のことを検体ブランクと考えるべきであるため、ブランク測定 2 を実施すべきなのですが、先の説明の通り、測定できないのです。それでは検体の活性測定は検体活性測定 1 で実施すべきなのか、あるいは検体活性測定 2 で実施すべきなのかを選択しなければなりません。一般的にはどちらの操作法を選択しても同じ活性値になると考える方が多いと思われそうですが、実際に測定すると活性値が相違します。理論的にはLDとNADがまず結合し、ここに基質である乳酸と結合します（オーダー-Bi-Bi反応に従う）。ならば、検体活性測定 1 が理にかなっているように思われますが、検体中にLDに反応する物質が存在するため、これが反

応すれば本来の反応の阻害剤となる可能性があり、問題なのです。また、検体中に乳酸が存在するため、わずかですが反応が開始してしまう可能性があり、LD-NADH-乳酸複合体（LD活性の強い阻害剤で、反応の直線性を失わせる原因物質）を形成させやすくしている可能性があるのです。そこで、検体活性測定2を選択することになります。ただし、この両者の活性差は何が原因で発生しているかを明確にしない限り、選択理由を見つけれないのです。

ならば、逆反応であるピルビン酸→乳酸反応で測定すべきと考えるかもしれませんが、同じ問題があるので選択対象になりません。

結論としては、理論的に検体ブランクを正しく取る方法が無いという問題の存在です。では、この問題がLD活性を測定し、臨床応用する上で問題になるかということ、決して大きな問題にはなるはずがないといえます。しかし、検体ブランクが取れないことは、ひょっとすれば大きな誤差を招く患者血清が出て来るかもしれない（LD反応物質が大変高濃度になる疾患があるかもしれないし、特定の薬物によって、反応物質が上昇する可能性もあるかもしれません）という不安が残ります。さらに、標準法作成には悩ましい課題ですし、精度管理を正しく考えようとしたら、管理試料やサーベイ試料を作成する上ではとても重要な問題になります。

3-4. 共役酵素を用いる酵素活性測定法

共役酵素を用いる測定法に関しては「初速度は反応開始直後の反応速度ではない。」という警告が広く知れ渡り、「ラグフェイスとは反応開始直後の非直線部分」という認識のみが知られるようになりました。そこで、多くの市販試薬ではこの反応開始直後に発生する非直線部分が出ない試薬の開発が進められ、現在ではこの様な現象が極力見られない試薬が市販されるようになりました（Km値の小さな酵素を用いたり、酵素添加量を増加させればこの現象は目立たなくなります）。ところが、今度は共役酵素を添加しすぎるという新たな問題が発生する可能性があります。試薬メーカー毎に明らかに測定値が相違する現象がサーベイ結果で現れています。日本の場合、標準物質がほぼ共通のものを使用しているにもかかわらず、この様な試薬間差が発生しているのは、共役酵素に起因する問題の可能性が最も高いと感じます。ただし、マイナーな問題ですから、あまり力を入れなくてもよいような気もしています。

表3 試薬の異常と酵素活性測定誤差の関係
(10%程度の誤差が発生した場合に発生する測定誤差の関係)

試薬の部分	異常内容	測定値に発生する誤差
基質	分解もしくは試薬口開放による水蒸発による濃縮	LDなど基質阻害の大きな酵素は過剰の基質を添加できないため影響有り。 アイソエンザイムによる誤差発生、しかし、多くの酵素は影響ない。
補酵素	分解もしくは試薬口開放による水蒸発による濃縮	試薬の継ぎ足しは厳禁、NADやNADHは酵素の強力な阻害剤を形成。 PALPの問題は複雑、別途記載。 ATP、ADP安定性悪いので要注意。
安定剤	分解、劣化	添加量が少なく、不安定なものが多いので要注意。
共役酵素	安定性 過剰添加 コンタミ酵素	共役酵素の安定剤を添加。 試薬ブランクの発生。 試薬ブランクの発生や正確度チェックにて発見する。

3-5. 試薬に関する問題のまとめ

物質定量における問題のように、酵素活性測定法の一般的な問題として記述すると、試薬に由来する大半の問題は相対分析法により解消されます（試薬の異変は系統誤差となる可能性が高いため）。表3に試薬の異常と酵素活性測定誤差の関係をまとめましたが、物質定量法と根本的に相違する問題は標準物質の問題、アイソエンザイムの問題、それに試薬ブランクの問題です。次回以降では、各項目毎になるべく詳しく記述したいと考えています。

引用文献

- 1) 小川善資, 沼上清彦: エンドポイント法による物質定量法の分析システム構築法 – 臨床医と検査技師双方の要望を取り入れた分析システムの構築 –. 生物試料分析, 37: 364-378, 2014.
- 2) 小川善資: \bar{x} -R管理法は分析機器や試薬の異常を見つけれない. 生物試料分析, 34: 359-363, 2011.