

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その15）〉

酵素活性測定法の分析システム構築法（その2） 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⁾

4. 高い精密度で測定しなければならない酵素活性

相対分析の場合、正確度が標準物質の表示値に依存していることは物質定量と同じです。このため、ここでは精密度についてのみ記述します。

さて、病気であるかないか、また、病気のステージを決定付ける活性など、病態の分岐点となる活性（診断基準、治療開始濃度やディジノンレベルなど）付近では精密度の高い測定が求められています¹⁾。

4-1. 診断基準となる検査について

酵素活性測定において、診断基準となる測定項目はほとんどありません。これは施設間差のない、安定した報告値が供給できるようになってまだ日が浅いことに由来していると思われます。測定値に対する信頼性の上昇に伴い、やがて高い精密度が要求される時代が来るでしょう。また、電気泳動法によるアイソエンザイム測定が広く利用された時代がありましたが、分析時間の長さから敬遠され、現在では様々な酵素活性測定値の比や検査結果の組み合わせから病気を見出そうとする試みが一般的になってきました。

検査項目毎の分析精度については各自施設のそれを必要とする診療医に聞くべきだと思います。ここでは、著者の個人的経験と、医師から要望された高精密度を要求する活性値と再現性を表4にまとめました。参考にして下さい。

4-2. 分析システムから推定できる精密度

汎用自動分析装置を用いた酵素活性測定の場合、レートアッセイであるため、極わずかな吸光度変化を測定することになります。このため、信号ノイズやドリフトは大きな誤差要因となります。その他、精密度に影響を与えるものには次のような因子があります。

- ① 分析装置の再現性（ピペッティング量、試薬分注量）
- ② 吸光度測定装置が有するノイズ（再現性）
- ③ 吸光度測定装置が有するドリフト
- ④ 吸光度変化測定の実験分解能（検出できる最も小さい吸光度差）
- ⑤ 試薬に由来する再現性の低下
- ⑥ サンプル使用量

①の試料ピペッティング量や試薬分注量の再現性は最近の自動分析機においては、極めて再現性が高くなっています。また、キャリアオーバーもほとんどなくなっています。もちろん、サンプリングノズルの劣化によるキャリアオーバーの増加には注意が必要です。定期的に自施設の分析装置

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⁾公益社団法人日本毛髪科学協会

表4 高い精密度を要求される活性と組み合わせて測定される検査項目と病気の関係

酵 素 活性比	高精度が要求 される活性 (U/L)	疑われる疾患と活性の関係	
		活性 (U/L)	疑われる疾患
AST>ALTの 関係でAST	50 ~ 80	500 以上 100~500 100 以下	急性肝炎、劇症肝炎、ショック肝 心筋梗塞、筋疾患、血液疾患 アルコール性肝炎、肝硬変、肝臓
ALT>ASTの 関係でALT	50 ~ 80	500以上 100 ~ 500 100 以下	慢性非活動性肝炎 慢性非活動性肝炎、脂肪肝
LD	150~200 (JSCC法)	LD/AST< 5 LD/AST 5~10 LD/AST> 10	肝疾患 筋肉、腎臓、肺疾患 血液疾患、悪性疾患
ALP	400~500	急激な上昇 軽度な上昇	胆管閉塞性疾患 (LAP、 γ -GT、LD T. Bil、胆汁酸の上昇) 消化管癌、骨疾患
CK	50~100	急激な上昇 軽度な上昇	心筋梗塞 (CK/AST、CK/ALT、 トロポニンT、トロポニンIの上昇) 骨格筋疾患
γ -GT	定性的	上昇 軽度な上昇	胆管閉塞性疾患 継続投薬、肝疾患
AMY	定性的	定性的な上昇	ショック、膵臓疾患

のキャリーオーバーや再現性のチェックを勧めます。②のノイズは測定値の精密度に影響を与えます。これも定期的にチェックすることを勧めます。③のドリフトは、再現性チェックできます。④の測定できる最小の吸光度変化速度は分析装置によって相違するため各装置毎に求める必要がありますが、この項での設定では0.0001/minとします。

この吸光度変化量が何U/Lになるかが分かれば、それ以下の酵素活性は一定の精度を保って測定できないことが判ります。具体的には次式で検出できる最小の酵素活性が分かります。

$$\text{酵素活性 (U/L)} = \frac{\text{吸光度変化}}{\text{モル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times 10^6 \quad \dots \dots \dots \text{式1}$$

この式に具体的な測定条件を代入します。なお、NADHのモル吸光係数は 6.3×10^3 L/mol/cm、サンプル量 $5 \mu\text{L}$ 、試薬量 $200 \mu\text{L}$ にて測定するものとします。

$$\text{検出限界 (U/L)} = \frac{0.0001}{6.3 \times 10^3} \times \frac{205}{5} \times 10^6 = 0.65 \text{ U/L}$$

0.65U/Lの差を測定できないことが分かります。この状態で10 U/Lの管理試料を用い、再現性を求めた場合、予測される変動係数 (%) は次式で求められます。

$$\text{変動係数 (\%)} = \frac{0.65}{10} \times 100 = 6.5 (\%)$$

要するに、上記条件で測定した場合、標準偏差は0.65U/L以下、変動係数は6.5%以下を希望してはならないことを示しています。

⑤の試薬が原因で精密度を低下させることもあります。例えば、試薬中に濁度が生じた場合、吸

光度測定にノイズを発生することになります。また、モル吸光係数の高い検出物質を使用する場合、保存により空気酸化を受けて試薬ブランクの吸光度が高くなります。吸光度が高くなると吸光度測定ノイズが上昇し、再現性を低下させる要因となります。⑤の問題は、③に示した式にサンプル量が入っていることから明らかです。

【測定例1】 下記に示す反応で、NADHの生成量を340 nmにて吸光度を測定し、酵素E1活性を測定した。NADHの340 nmにおけるモル吸光係数は 6.3×10^3 L/mol/cmとする。



試薬量を0.2 mL、サンプル量を0.002 mLとし、反応開始30秒後から1分後の吸光度変化速度 $\langle \Delta \text{Abs}/\text{min} \rangle$ を測定し、酵素活性を求めた。測定に用いた分光光度計で測定できる最も小さな吸光度変化速度は0.0001/minであった。測定できる最小の活性はいくらか。

(解答例) 式1に具体的な数値を代入し、測定できる最小の濃度を求めると次のように計算できます。

$$\text{酵素活性 (U/L)} = \frac{0.0001}{6.3 \times 10^3} \times \frac{0.202}{0.002} \times 10^6 = 1.6 \text{ (U/L)}$$

この分析システムでは1.6 U/L以下の活性差を測定できないことが判ります。

【測定例2】 測定例1と同様に測定するが、サンプル量を $5 \mu\text{L}$ とすると測定できる最小濃度はどの様になるか。また、測定できる最小の濃度を推定しなさい。

(解答例) 例1と同様式1に、サンプル量 $5 \mu\text{L}$ (0.005 mL)、総反応液量0.205 mLを代入して、測定できる最小濃度を求めます。

$$\text{酵素活性 (U/L)} = \frac{0.0001}{6.3 \times 10^3} \times \frac{0.205}{0.005} \times 10^6 = 0.65 \text{ (U/L)}$$

例1に比べると測定精度が2.5倍になります。要するにサンプル量を多くすると再現性が良くなり、少なくすると測定精度が悪くなります。同様に吸光度測定上限値を代入すると、上限が求められません。

【測定例3】 測定例2の方法で測定した場合の測定上限を求めなさい。なお、測定できる吸光度変化速度の最大値が0.25/minとする。

(解答例) 同様に式1に数値を代入して上限を求めると、1,627 U/Lとなります。同様にサンプル量を $2 \mu\text{L}$ にした場合は、4,008 U/Lになります。

5. 測定上限はどの様に決めるか

分析段数から考えると、高活性まで測定しようとする、測定できる最小の活性が大きくなり、再現性が低下します。どこまで高活性検体を希釈することなく測定できるようにするかは明確な考えを持って設定すべきです。

5-1. パニック値から考える

パニック値付近の測定値の場合、検査依頼者は測定結果を早く返却して欲しいと考えているはず。希釈し、再測定すれば、報告時間は確実に遅延します。これを回避するため、あまりにも高活性検体まで希釈なしに測定しようとする、全ての測定の再現性を低下させてしまいます。このため、パニック値を若干上回る活性まで希釈することなく測定できる様に測定上限を設定すべきです。表5に酵素活性測定項目におけるパニック値の例を示しました^{2,3)}。

表5 各種酵素のパニック値

酵素名	パニック値	疑問を持たれる疾患（関連検査）
AST ALT	800 U/L以上	劇症肝炎（アンモニア、PT） 急性肝炎（T. Bil、LD、AST、PT） ショック肝（血圧低下、発汗、）
LD	800 U/L以上	白血病（白血球数、AST） 溶血性貧血（末血像）、急性肝炎（AST、ALT） 熱傷、慢性筋疾患、伝染性単球症
ALP	1,500 U/L以上	膵臓頭部癌、胆管癌、転移性肝癌
CK	1,000 U/L以上	心筋梗塞、横紋筋融解症、骨格筋挫滅
AMY	1,000 U/L以上	ショック、急性膵炎

この活性より2割程度高活性検体まで測定できるように立案してみましよう。

5-2. 吸光度変化速度の測定上限から考える

測定装置には測定できる吸光度変化量の上限があります。一般的な汎用自動分析装置の場合は0.25/min程度です。各自の分析機器の性能を調査し、測定上限付近での再現性チェックを勧めます。この性能は分析段数を決定付けます。ここでは、使用する分析装置の性能を次のように定めます。この場合、測定できる最小の反応速度が0.0001/minで、測定増減が0.25/minであれば、測定段数は次式から計算できます。

$$\text{分析段数} = \frac{\text{測定できる最大の反応速度}}{\text{測定できる最小の反応速度}} = \frac{0.25/\text{min}}{0.0001/\text{min}} = 2,500\text{段}$$

したがって、この分析装置を使用して測定可能な最小の酵素活性を1.0 U/Lにすると、測定上限は2,500 U/Lということになります。また、精密度を2倍上昇させて、最小の酵素活性を0.5 U/Lにすると、1,250 U/Lが測定上限になります。

【測定例4】AST、ALT活性測定において、800 U/Lを超える活性を測定する頻度が1.2%であることから、希釈することなく測定することのできる上限を800 U/Lとしたい。測定方法はJSCC勧告法で、NADHの減少速度をレートアッセイする方法を用い、使用する分光光度計によるNADHの見かけのモル吸光係数が 6.3×10^3 L/mol/cmとする。反応試薬量を200 μ Lとすると、サンプル量はいかにすべきか。また、この場合、測定できる最小の活性と測定上限はおおよその程度と推定できるか。（解答例3）測定できる最大の速度の0.25/minが測定上限（800 U/L）となるためのサンプル量xを求めると次のようになります。

$$800 \text{ (U/L)} = \frac{0.25}{6.3 \times 10^3} \times \frac{200 + x}{x} \times 10^6$$

$$x = 10 \text{ (}\mu\text{L)}$$

10 μ L以下にすると800 U/Lまで希釈することなく測定できることになります。

測定できる最小の活性は、測定でき出来る最小の変化量を代入し、次のように計算できます。

$$\frac{0.0001}{6.3 \times 10^3} \times \frac{210}{10} \times 10^6 = 0.33 \text{ (U/L)}$$

5-3. 試薬によって発生する測定上限

ラグフェイスは2種類あります。試薬の限界によって発生するのラグフェイスは反応曲線が曲が

りません。また、大きな測定誤差を発生させます。

酵素活性測定試薬に添加すべき試薬は、至適反応条件にする濃度であることが広く知られています。この条件においては十分な試薬量のことが多く、上限とはなりません。ところが、添加される共役酵素活性によって測定できる上限が決定されるのです。ラグフェイスとは「反応開始直後に反応曲線が非直線となる部分のこと」と考えておられる方が多いと思います。もちろん、このような部分のことを「ラグフェイス」と呼びます。しかし、共役酵素不足によって発生するのもラグフェイスです。このラグフェイスは、反応曲線が直線になります。また、このラグフェイスの方が恐ろしい測定誤差を発生させるため、測定できる限界を知っておく必要があります。ただ、この限界を計算する方法は少し難しいため、ここでは概念を説明しますので、大まかに理解していただき、詳細に知りたい場合には引用文献に示した速度論的解析を行ってください。

概念的に理解していただくために、まず共役酵素を用いた正しい酵素活性測定法について説明します。ここでは水瓶に入った水を蛇口Aから放出させたとします。蛇口の大きさが酵素活性 (E1活性) で、水の流速を測定すれば蛇口の大きさが測定できます。しかし、蛇口Aの流速が直接測定で

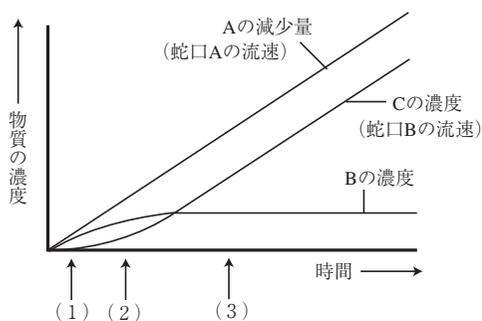
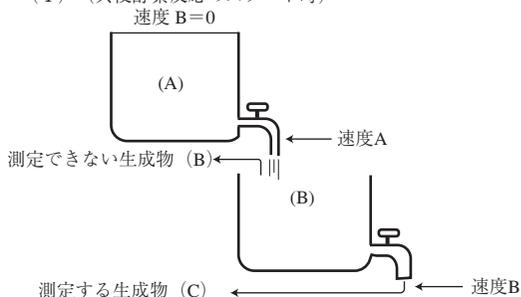
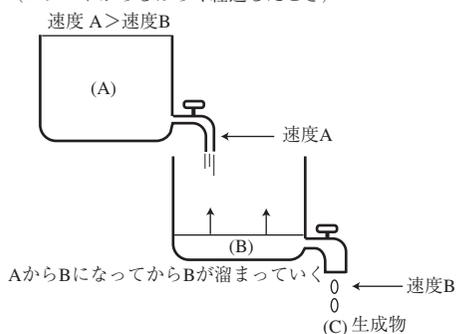


図1 共役酵素が十分添加されている時の基質 (A)、中間物質 (B) と検出物質 (C) の反応経過
水瓶 (A) に入っている水が基質と考え、蛇口Aから出て来る水の速度がE1活性とします。しかし、蛇口Aの流速が測定出来ないため、水を一旦水瓶 (B) に流し込みます。水瓶Bには蛇口Bがあり、ここから流出する水流を測定し、蛇口A大きさ (E1の酵素活性) を測定します。
時間 (1) 反応開始直後で、中間体がほとんど产生されていないため検出物質 (C) がほとんど产生されない状態
時間 (2) 中間体 (B) の濃度が上昇中で、E2の反応速度はE1の反応速度を表していない状態 (一般的に言われているラグフェイスの状態)
時間 (3) 中間体 (B) の濃度が一定となり、E2の反応速度とE1の反応速度が等しくなるため、E2活性で、E1活性が求められる状態

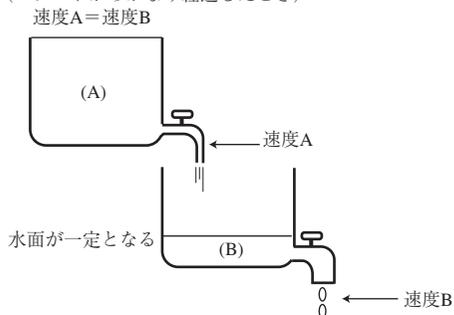
(1) (共役酵素反応のスタート時)



(2) (スタートからしばらく経過したとき)



(3) (スタートからかなり経過したとき)



きないものとします。このため流出した水を水瓶Bに一度貯蔵します。そして、水瓶Bに付いた蛇口Bが共役酵素活性 (E2) です。蛇口Bの流速は測定できるものとします。蛇口Aから放出された水は次第に水瓶Bに貯蔵されます。しかし、最初の内は十分な水量がないため、蛇口Bから水は放出されません。しかし、水槽Bに水が貯まると、次第に蛇口Bから水が流れ始めます。このことを示したのが図1です。一般的によく知られているラグフェイスの発生機序です。

なお、蛇口Bの取り付け位置が共役酵素E2のKm値とと考えていただくとよいでしょう。Km値の小さい共役酵素は水瓶Bの下の方に蛇口Bが付いていて、反対にKm値の大きい酵素の場合には水瓶Bの上の方に蛇口Bが付いていると考えてください。このため、Km値に小さな共役酵素を用いると水瓶Bにほんの少しの水が入ってきただけで蛇口Bから水が放出されることになり、ラグフェイスをほとんど生じることなくE1活性が測定できることを意味しています。

さて、今回改めて勉強していただきたいもう一つのラグフェイスは、共役酵素不足によって発生します。こちらのラグフェイスの方が発見し難く、大きな測定誤差を生じます。共役酵素添加量による測定限界のことです。

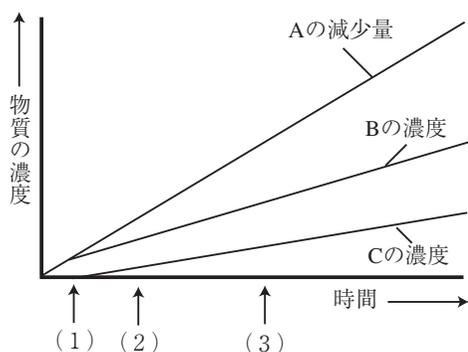


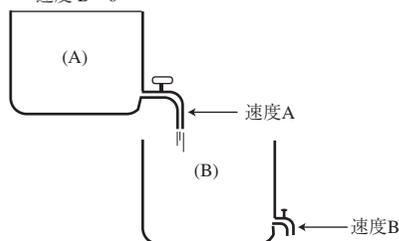
図2 共役酵素が不足している時の基質 (A)、中間物質 (B) と検出物質 (C) の反応経過 (測定時間中の全ての時点で、E2の反応速度がE1の速度を表していないため、E1活性が求められない。しかし、反応は直線的に進行する。ため、直線か、非直線化でラグフェイスを発見出来ない。)

時間 (1) 反応開始直後で、中間体がほとんど産生されていないため検出物質 (C) がほとんど産生されない状態

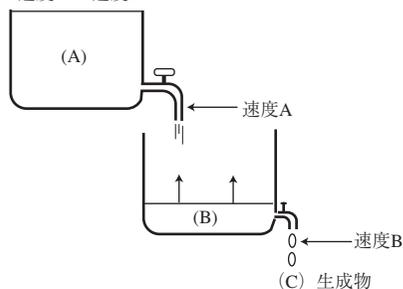
時間 (2) 中間体 (B) の濃度が上昇中で、E2の反応速度はE1の反応速度を表していない状態であるが、E2の活性がフル回転となり、これ以上E2速度を上昇させることができなくなった点

時間 (3) 中間体 (B) の濃度がさらに上昇し、E2の反応速度がE1の反応速度を表していないため、E1活性を測定出来ない。しかし、E2活性はフル回転であるため、反応速度は直線的に進行する。

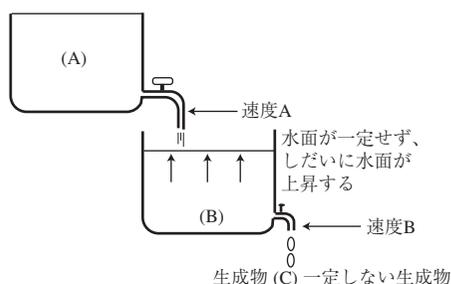
(1) (共役酵素反応のスタート時)
速度 B=0



(2) (スタートからしばらく経過したとき)
速度 A > 速度 B

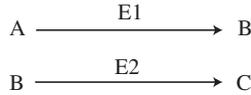


(3) (スタートからかなり経過したとき)



① 共役酵素が不足した場合、どの様になるのですか？

共役酵素 (E2)を用いて酵素 (E1) 活性を測定する場合の反応素機式を次に示しました。



E1の酵素活性よりE2の活性が小さければ、図2でに示すように、蛇口Bが蛇口Aより小さいため、蛇口Aから放出された水は水瓶Bに貯留します。蛇口B (E2) がは限界まで働きますが、E1活性 (蛇口A) の水流を表したものではありません。

② ラグフェイスなのはどうして直線になるのですか？

E2の反応速度がE1の反応速度より低い場合、E2反応は最大限の速度で推移しているため、反応は直線的に進行します。この様にE2の反応速度がE1に追いつかない状態もラグフェイスと称します。言い換えれば直線的に進行するラグフェイスです。このような事態が発生した場合の誤差は、とても大きなものになりますが、反応曲線を見ることによってこの様な事態が発生していることを見つけないことができないのです。

③ 誤った測定をしていることをどの様に発見するのですか？

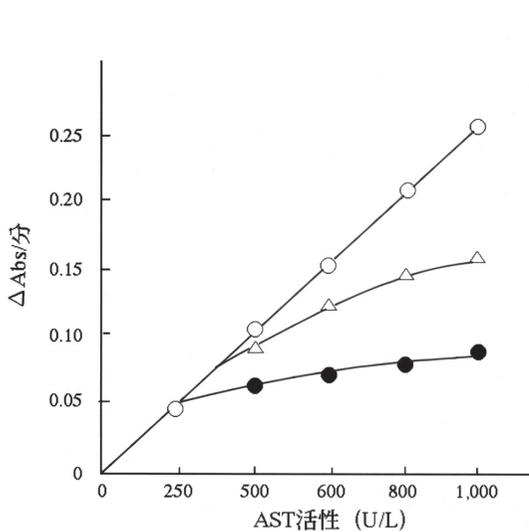


図3 各種MD活性の試薬を用いASTの検量線
共役酵素であるMDのKm値が低い (8.0×10^{-5} mol/L) 場合、共役酵素が不足すると、低活性領域では測定誤差が表れないが、高活性になると、正しい活性が測定出来なくなる。しかし、反応曲線は決して曲線にはならないため、反応曲線を観察しても、測定誤差の発生に気付かない。
○—○共役酵素 (MD) が500 U/L添加され、サンプル量/総反応液量が1/50
△—△MDが100 U/L添加された場合で、サンプル量/総反応液量が1/50
●—●MDが50 U/L添加された場合で、サンプル量/総反応液量が1/50

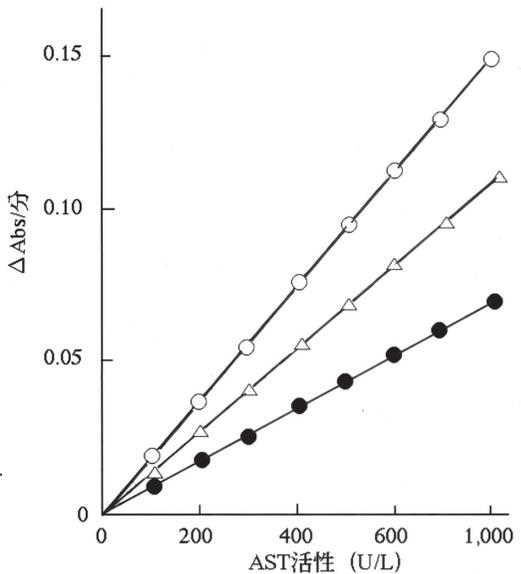


図4 各種LD活性の試薬を用いたALTの検量線
共役酵素であるLDのKm値が高い (4.0×10^{-4} mol/L) 場合、共役酵素が不足すると、全ての活性領域で、同じ比率の測定誤差が表れる。しかし、この場合にも、反応曲線は直線であるため、反応曲線から、測定誤差の発生に気付かない。
○—○共役酵素 (LD) が2,000 U/L添加され、サンプル量/総反応液量が1/50
△—△LDが100 U/L添加された場合で、サンプル量/総反応液量が1/50
●—●LDが50 U/L添加された場合で、サンプル量/総反応液量が1/50

一番大切なことは、この様なラグフェイスがあるということを知っておくことです。また、試薬には必ず限界があります。この限界を知っていただければ、大きな誤りを発生させずに済みます。ともあれ、この様なラグフェイスが発生している場合には、試薬の異常を発見できなければなりません。用いられる共役酵素のKm値が大きいか否かで、表れる症状が相違します。Km値の小さな共役酵素の場合、検量線を描くと、測定したい酵素の活性が一定以上の活性になると大きな誤差が発生することが分かります。AST活性測定時にリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MD）を用いますが、Km値が 8.0×10^5 mol/Lと小さいため、AST活性が高いと大きなマイナス誤差を発生するようになります（図3）。これに対して、Km値が 4.0×10^4 mol/Lと比較的大きな共役酵素である乳酸デヒドロゲナーゼを用いた場合は、検量線が曲がるのではなく、低活性から高活性まで同じ比率で誤差が発生します（図4）。

精度管理の問題ですが、Km値の大きな共役酵素を用いる場合には低活性管理試料を測定していても共役酵素の劣化を発見できます。しかし、Km値の小さな共役酵素を用いた場合には、前述のとおりの低活性管理試料の測定では試薬の異常を見つけることができないのです。何れにおいても、自分の用いている試薬の限界を使用前に知っておくことです。

④ 勧告法でもこの問題が発生するのですか？

当然、勧告法にも限界があります。AST、ALT活性測定の勧告法における測定限界は500 U/Lです。日常検査にて勧告準拠法を用いている場合、サンプル量が勧告法とは異なっています。勧告法ではサンプル量は総反応液量の10%です。これに対して、準拠法では一般的にサンプル量：総反応液量の比は1：50が多く採用されています。この場合、サンプル量が1/5低いため、 $500 \text{ (U/L)} \times 5 = 2,500 \text{ (U/L)}$ となり、MDが失活していなければ、2,500 U/Lまで測定できることとなります。しかし、勧告法に比べ再現性は5倍低下することとなります。

5-4. 再検査率から設定すべき測定上限

測定可能範囲をオーバーする検体が出た場合、その検体を希釈して再測定することは当然ですが、その次に測定した検体はどれだけのキャリーオーバーを受けているのか想定できないため再測定となります。測定可能範囲をオーバーする検体が2.0%あった場合は、単純に考えると再検査しなければならない検体は4.0%となります。測定頻度を検索し、1.0%程度の再検査率となるようにすべきです。

【測定例5】測定例1と全く同じ方法にて酵素活性を測定する。ただし、再検査率1.0%で測定するためには1,000 U/Lまで希釈することなく測定したい。サンプル量をどの様にすべきか。なお、試薬量は $200 \mu\text{L}$ とする。

(解答例) 1,000 U/Lを希釈することなく測定したいことより、次式1に代入し、サンプル量(x)として立式する。

$$1,000 \text{ (U/L)} \leq \frac{0.25}{6.3 \times 10^3} \times \frac{200 + x}{x} \times 10^6$$

$$x \leq 8.3 \text{ (}\mu\text{L)}$$

サンプル量は $8.3 \mu\text{L}$ 以下とすればよく、勧告法に準拠するならば、試薬としての測定上限は1,300 U/L程度と推定できます。

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) 日本臨床検査自動化学会: 極端値・パニック値対応マニュアル. 日本臨床検査自動化学会, 30: 162, 2005.
- 3) 日本臨床検査自動化学会: 緊急検査実践マニュアル・検体検査編. 日本臨床検査自動化学会, 32: 174, 2007.
- 4) 小川善資: 臨床化学実践マニュアル V. 分析基礎技術, 3. 酵素活性測定法(1), 初速度法の組み立てかた. 検査と技術, 21: 257-260, 1993.