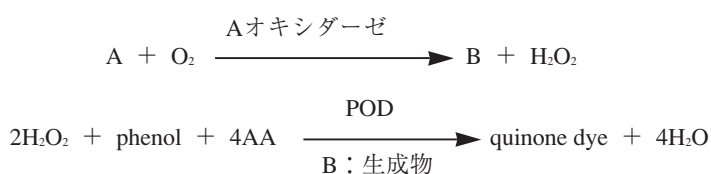


〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その16）〉

平成27年 分析機器・試薬アナリスト認定試験問題

小川 善資¹⁾、沼上 清彦²⁾

問題1～3 酵素法によるエンドポイントアッセイにて物質A（分子量100）を定量した。測定原理は次式に示した。精度管理のため、プール血清を測定し、その \bar{x} -管理図を図1に示した。



試薬は次に示すとおりです。反応槽の温度は37℃に設定し、3分以内にエンドポイントを達成させ、吸光度を測定した。

緩衝液（pH 7.0）	100 mmol/L
Aオキシダーゼ	50 U/mL
POD	10 U/mL
phenol	1.0 mmol/L
4-aminoantipyrine（4-AA）	0.1 mmol/L

なお、測定は精製水をブランクとして測定し、標準物質として物質Aの300 mg/dL溶液を用い、毎日キャリブレーションを実施し、測定した。また、サンプルは1.0 μ L添加し、試薬I（4-AA以外の試薬と緩衝液）1.449 mL加え、直後に試薬II（4-AAと緩衝液）0.5 mLを加え、添加3分後に吸光度を測定した。なお、この方法にて測定した場合、濃度と吸光度の間に直線性が確保できている。下記の問いに答えなさい。

問題1 \bar{x} -管理図では測定値が次第に低下しました。精度管理用語として、この現象をどの様に呼びますか。

1. 低下現象
2. 異常現象
3. シフト現象
4. トレンド現象
5. インテグラル現象

問題2 この原因として最も疑わしい原因は何か。

1. Aオキシダーゼの劣化

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

2. ペルオキシダーゼの劣化
3. phenolの劣化
4. 標準物質中物質Aの分解による濃度低下
5. 管理試料中物質Aの分解による濃度低下

問題3 この原因を確認するために、最初に収集すべきデータは何か。なお、ブランクの吸光度変化はなかった。2つ選べ。

1. 管理試料測定時の反応曲線
2. 未知検体測定時の反応曲線
3. 標準物質の吸光度変化量
4. 管理試料の吸光度変化量
5. 未知検体測定時の吸光度変化量

問題4～7 一般的な汎用自動分析装置を用いて、物質Aを測定したい。物質Aに発色試薬を反応させて、発色物質Aを形成させ、2波長測光にて測定したい。発色物質Aの吸収曲線を図2示す。物質

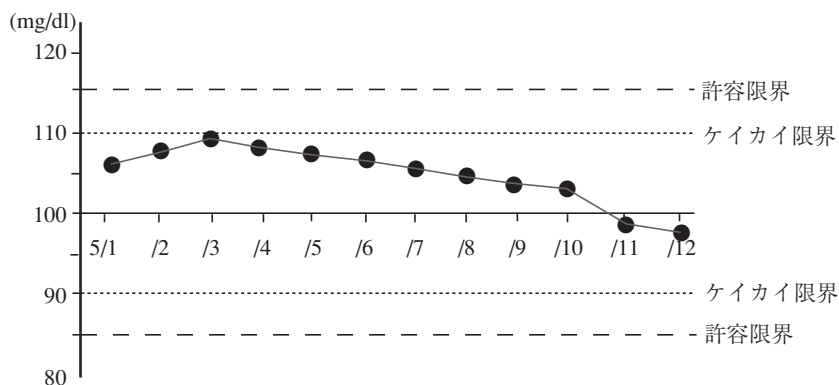


図1 物質Aの管理図

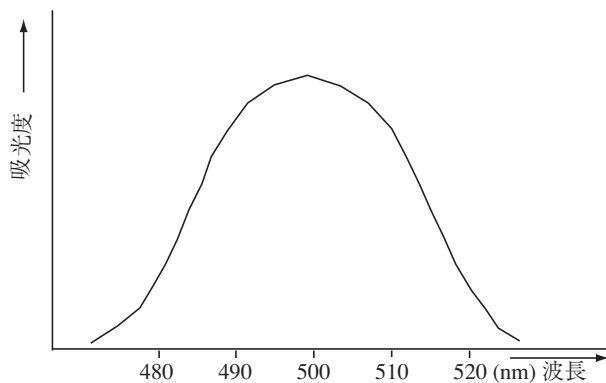


図2 発色物質Aの吸収曲線

Aと発色試薬は等モルで反応し、発色物質Aが等モル形成される。物質Aの標準液（1.0 mmol/L）10 μ Lに必要十分な発色試薬990 μ Lを添加し、完全に発色団を形成させ、発色させた。なお、使用したセルの光路長は1.0 cmとする。また、試薬中にも、試料中にも吸光度を持つ物質はなかったものとする。下記の設問に答えなさい。

問題4 500 nmにおける吸光度は0.5と測定された。発色団物質Aの500 nmにおける見かけのモル吸光係数はどの程度か。

1. 5×10^3 l/mol/cm
2. 1.0×10^4 l/mol/cm
3. 5×10^4 l/mol/cm
4. 1.0×10^5 l/mol/cm
5. 5×10^5 l/mol/cm

問題5 主波長を発色物質Aの極大波長とする理由に関して、誤っている文章はどれか。

1. 感度が高くなる。
2. 波長設定が多少誤っても誤差測定値に差が出にくい。
3. 多少バンド幅の広い測定光を用いても、測定精度値にあまり影響を与えない。
4. バンド幅の広い測定光を用いると、測定正確度が高感度がよくなる。
5. 極大波長以外の波長を選択すると、バンド幅の影響を大きく受ける。

問題6 2波長測定の副波長を選択する上で正しい文章はどれか。2つ選択しなさい。

1. 主波長に近い波長とすべきである。
2. 主波長から離れた波長とすべきである。
3. 主波長より短波長側を選択すべきである。
4. 主波長より長波長側を選択すべきである。
5. 影響を回避したい物質の吸収曲線極大波長を選択すべきである。

問題7 発色物質Aを生成させるため、反応液を加えると、試料中に存在したビリルビンの吸収曲線が完全に消去された。物質Aを測定する上で、ビリルビンの影響を回避する考え方で、正しい文章を選択しなさい。

1. 発色掖液添加前の吸光度を測定し、発色後の吸光度から差し引くことで影響を回避できる。
2. ビリルビンの発色反応中間物質が物質Aの発色反応に影響を与える可能性がある。
3. 反応後、吸収曲線全てがなくなったから、影響はない。
4. ビリルビンのモル数はとても小さいので、影響は考えられ受けない。
5. ビリルビンの吸収極大波長を副波長とすれば影響は回避できる。

問題8 ランベルト（Lambert）の法則では吸光度が何と比例すると定義されているか。

1. 光路長
2. 物質濃度
3. 濁度
4. 光源量
5. 波長

生 物 試 料 分 析

問題9 糸球体濾過能と比較的比例すると考えられている検査のは何どれか。

1. HDL-コレステロール
2. LDL-コレステロール
3. 尿素窒素
4. クレアチニン
5. 尿酸

問題10 デルタチェック法は何との差を求める。

1. 正確な測定値
2. 勧告法でえられる測定値
3. サーベイにてえられる他施設の測定値
4. 市販標準品の表示値
5. 前回の測定値

問題11 酵素法による物質濃度定量において、標準物質を測定したところ、いつも吸光度0.5と測定されるにもかかわらず、今日は10%低値の0.45と測定された。コントロール血清の測定値を見たところ、いつもと遜色のない測定値がえられていた。しかし、吸光度をチェックするとやはり10%低値に測定されていた。原因を調査するために、最初にチェックする項目として正しいのはどれか。2つ選べ。

1. 標準液の反応曲線
2. 患者検体の反応曲線
3. 標準液の劣化
4. ロットの相違するコントロール血清の測定
5. 濃度の明確な各数種の試料による直線性のチェック

問題12 強い胸痛を訴え始めてから、30分以内に来院された急患の検査として、適切でない検査はどれか。2つ選べ。

1. 胸部超音波検査
2. アラニンアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
3. コリンエステラーゼ
4. クレアチニン
5. 乳酸デヒドロゲナーゼ

問題13 僧帽弁はどの間に存在する弁か。

1. 右心房と右心室
2. 左心房と左心室
3. 右心房と左心室
4. 左心房と右心室
5. 右心室と左心室

問題14 心不全の検査はどれか。

1. PTH
2. PSA
3. BNP

4. AFP

5. CRP

問題15 心筋梗塞時、心電図に最も早く出現する現象はどれか。

1. 異常Q波の出現
2. ST上昇
3. T波の増幅
4. 異常S波の出現
5. 異常R波の出現

問題16～18 外部精度管理調査に参加したところ、次のような結果が返却されました。下記の質問に答えなさい。

参加全施設の物質Aの2濃度試料の測定結果は次のように集計されました。

試料1		試料2	
平均値	100 mg/dL	平均値	200 mg/dL
±SD	5 mg/dL	±SD	8 mg/dL

貴施設の報告値は

試料1	110 mg/dL	試料2	220 mg/dL
-----	-----------	-----	-----------

問題16 この結果から、この施設の分析にどのようなことが起こっていると考えられるか、正しい文章はどれか。

1. ランダム誤差の発生している。
2. 系統誤差が発生している。
3. 高濃度になるほど、高値に測定されている。
4. 低濃度になるほど、低値に測定されている。
5. サーベイ試料に高値に測定させる異常が発生した。

問題17 この施設の試料2のSDIは幾らか。

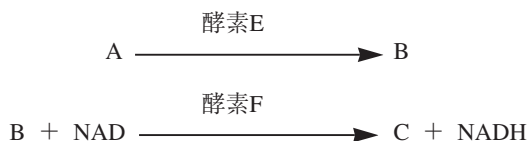
1. 0.5
2. 1.0
3. 1.5
4. 2.0
5. 2.5

問題18 サーベイの結果から物質A測定の測定における再現性を推定すると、おおよそ何%の誤差で測定すべきと考えられるか。

1. 2～3%
2. 3～4%
3. 4～5%
4. 7～8%
5. 10%程度

生物試料分析

問題19～20 下記の示す測定原理で、酵素E活性を測定した。サンプルは $10\mu\text{L}$ 、試薬 I $500\mu\text{L}$ を用い、試薬 II を $120\mu\text{L}$ を用い、試薬 II 添加1分後から1分30秒後の吸光度変化速度を測定した。測定物質であるNADHのモル吸光係数は $6.3 \times 10^3 \text{ l/mol/cm}$ とする。また、測定に用いたセルの光路長は 1.0 cm であった。なお、試薬 I にNADが 4.0 mmol/L 、酵素Fと緩衝液が、試薬 2 にはAと緩衝液が添加されていた。その他の試薬は添加されていない。下記の質問に答えなさい。



問題19 測定試薬採用時の検討から、昨日の測定まで、問題なく測定が実施されていた。ところが、今日の測定で、コントロール血清の測定値が低値になった。原因を知るため、ブランク（精製水）、標準物質、コントロール血清の反応速度をチェックすると次のような結果であった。ブランクの吸光度変化は認められなかった。 200 U/L 標準液の吸光度変化量が $0.02/\text{min}$ で、 100 U/L コントロール血清の吸光度変化量が $0.008/\text{min}$ であった。この結果からどのようなことが考えられるか。

1. NADが変化し、酵素Fを阻害する物質が作成された。
2. 酵素Fの活性が低下した。
3. 標準液に添加されている酵素Eが失活した。
4. コントロール血清に添加されている酵素Eが失活した。
5. 基質Aが分解した。

問題20 患者の臨床症状から理解できない高値検体に遭遇した。原因を追及したところ、この検体中に反応中間体のBが多く存在することが分かった。影響を少なくするためにどのような工夫が有効か。2つ選べ。

1. 試薬 1 添加から試薬 2 添加までの時間を長くする。
2. 試薬 2 添加から測定までの時間を遅くする。
3. 試薬 1 に添加するNADを増加する。
4. 試薬 1 に添加する酵素Fを増加する。
5. 試薬 2 に添加する基質Aの濃度を増加する。

問題21 ネフローゼ症候群の判定基準はどれか。2つ選べ。

1. 血清クレアチニンが 4.0 mg/dL 以上
2. 総コレステロールが 250 mg/dL 以上
3. 尿素窒素が 50 mg/dL 以上
4. 血清アルブミン値が 3.0 mg/dL 以下
5. 尿クレアチニンが 40 mg/dL 以上

問題22 循環性ショック時に表れる症状はどれか。2つ選べ。

1. 血圧低下
2. 甲状腺機能の上昇
3. ASTの上昇
4. ALPの上昇
5. 発汗

問題23 糖尿病検査としてヘモグロビンA1c (HbA1c) が測定されています。測定方法として利用されていないものはどれか。2つ選べ。

1. 分子篩カラムを用いた高速液体クロマトグラフィ
2. 制限酵素とマスペクトログラフィを用いた方法
3. 抗体をラテックス粒子に感作させた免疫法
4. 酵素法
5. 電極法

問題24 半減期が24時間以下のタンパクはどれか。

1. C反応性タンパク
2. アルブミン
3. ヘモグロビン
4. トランスフェリン
5. IgG

問題25 タンパクの定量法にならないのはどれか。

1. スルホサルチル酸を用いた混濁法
2. ベンゼン環の持つ吸光度を測定
3. *p*-ニトロフェノールと結合した吸光度を測定
4. フェノール試薬が結合する際の吸光度を測定
5. ビシンコニン酸と銅錯体が結合する際の吸光度を測定

問題26 タンパクの電気泳動法で、移動度を決定させる因子でないものはどれか。

1. タンパクの形状
2. タンパクの荷電量
3. 支持体の荷電量
4. 染色液の種類
5. 緩衝液の濃度

問題27 酵素活性を表す単位はどれか。2つ選べ。

1. mg/dl
2. mol·s⁻¹
3. mEq/L
4. mmol/min
5. Kg/L

問題28 勧告法では基質濃度を最も高活性になるように選択している。その理由について正しいのはどれか。2つ選べ。

1. 基質阻害を受けなくなるから。
2. 感度の高い測定ができるから。
3. 生成物阻害を受けなくなるから。
4. 反応の直線性が得られ易い。
5. pH変化に影響を受けにくくなるから。

生物試料分析

問題29中性脂肪に見られる、エステル結合は何基と何基の結合したものか。2つ選べ。

1. カルボキシル基
2. メチル基
3. アルコール基
4. アミノ基
5. メトキシ基

問題30 測定光によって蛍光が発生した。測定値はどの様になるか。2つ選べ。

1. 吸光度が低く測定される。
2. 迷光の大きな装置で測定した時と同じ結果になる。
3. 高い吸光度測定になれば成る程、高値に測定される。
4. 安定した吸光度が得られるようになる。
5. 極大吸収より長波長で測定した時と同じ結果となる。

解答と解答

問題1 正解 4

測定値が7回連続して、上昇または低下する現象をトレンド現象と呼ぶ。

問題2 正解 5

試薬の劣化が生じた場合や、分析機器による系統誤差が生じた場合、標準物質の測定にも、管理試料の測定にも同じ率の誤差が生じ、測定値に変化が生じないため、 \bar{x} -管理図上に変化は現れない(キャリブレーションを毎回実施していない場合はこの限りではない)。標準物質の濃度低下が発生した場合、測定値は次第に上昇します。管理試料の濃度低下の場合、測定値は次第に低下する。

問題3 正解 3 & 4

試薬異常の場合、反応曲線を観察することが必要ですが、試薬の異常が想定できないため、反応曲線を観察することはありません。また、未知検体の測定以前の問題です。また、毎日キャリブレーションを実施している分けですから、試薬や分析機器の系統誤差によって、管理図上に変化が現れる訳がありません。標準物質か管理試料の異常と推定出来ます。どちらの問題かを明確にするためだから、まずは、両者の吸光度変化量をチェックすべきです。

問題4 正解 3

生成された発色物質の濃度を求め、これに見かけモル吸光係数 (ϵ) を乗じ、吸光度を求める。

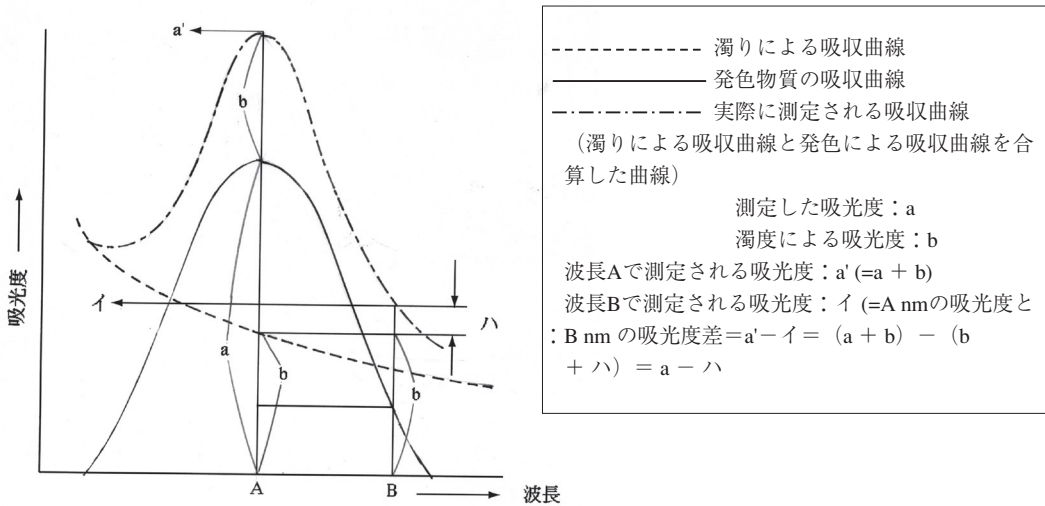
$$1.0 \text{ mmol/L} \times \frac{10}{1000} \times \epsilon = 0.5$$

この式から ϵ を求める。

$$\epsilon = 50 \times 10^3 = 5 \times 10^4 \text{ L/mol/cm}$$

問題5 正解 4

主波長として、吸収極大の波長を選択する理由は、①感度が高くなる。②波長設定が多少ずれても、測定値に影響を与えない。③発色物質のスペクトルバンド幅の1/10のバンド幅の測定光を用いる



図A 2波長測光にて濁度による影響を軽減させる原理図。
 測定波長Aで測定した場合の吸光度は本当に測定したい発色物質による吸光度 (a) と濁度により発生する吸光度 (b) の加算されたもの。2波長測光を行わないと吸光度 (b) の測定誤差となる。これを回避するために波長Bにて測定した吸光度 (イ) を差し引くと、a-ハとなり、誤差はハとなる。副波長を長波長にすればするほどこのハの大きさは大きくなり、2波長測光を実施する意味が薄れる。しかし、あまりにも主波長に近づけすぎると吸光度差が少なくなり、測定誤差が大きくなるため、適切な距離を取ることが望まれる。

と、1%以下の測定誤差で正しい吸光度を測定できる。

問題6 正解 1 & 4

主波長と副波長はあまり離れると2波長測光を行う意味がなくなる。例として濁度による影響を軽減する方法について図示した(図A)。しかし、あまりにも近い波長を選択すると感度が低下する。これとは別に、特定の吸光度を有する物質の影響排除のために副波長を選択することもある。臨床検査に用いる試料中には短波長に吸収を有する物質(ビリルビンやヘモグロビンなど)があるため、副波長に短波長を選択すべきではない。

問題7 正解 2

ビリルビンの吸収曲線がなくなっていることは発色試薬にビリルビンが直接作用したか、発色反応中間物質にてよって、ビリルビンが反応分解したことを示している。どのような反応が生じたかによって、物質Aの測定に影響があるかどうか判断出来ない。発色反応後、ビリルビンの吸収がなくなっていることより、反応前の吸光度を引いても、副波長にビリルビンの吸収極大波長を選択しても、影響を除けない。

問題8 正解 1

ランベルトの法則とは「溶液濃度が一定の時、吸光度が光の通過する溶液層長に比例する」である。

生物試料分析

問題9 正解 4

糸球体濾過能は血清クレアチニン濃度と比例する。

問題10 正解 5

前回測定された測定値との差から、個人の検査値の信頼性を求めている。

問題11 正解 1 & 5

標準物質を測定した時の吸光度変化量とコントロール血清を測定した時の吸光度変化量がともに10%低下している。標準物質の問題やコントロール血清の問題ではなく、測定試薬の問題が強く疑われる。これを確認するためには反応曲線を見ることが一番である。また、試薬に問題が発生している場合、測定の直線性に問題が発生していることが多く、検量線の直線性が維持できているか不明で、どの濃度まで報告可能かを知る必要がある。このため直線性もチェックすべきである。

問題12 正解 3 & 4

コリンエステラーゼは肝臓疾患を、クレアチニンは腎臓機能を表す検査。肝疾患や腎臓疾患で胸痛を訴える可能性が少ない。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）や乳酸デヒドロゲナーゼは心筋梗塞時、発症数時間後と、十数時間後に上昇する。しかし、胸痛開始が梗塞開始と必ずしも連動しないため、適切でない検査とまでは言えない。

問題13 正解 2

左心房と左心室の間にあるのが僧帽弁、右心室と右心房の間にあるのが三尖弁です。左右クロスした血流はありません。

問題14 正解 3

PTHは副甲状腺ホルモン、PSAは前立腺特異抗体、BNPは脳性ナトリウム利尿ペプチド、AFPは α -フェトプロテイン、CRPはC反応性タンパクの略。心不全に関連するのはBNPです。心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）と同様、心房の圧力に対応して分泌されるホルモンです。心不全においてはANPより変化が大きいことより、心不全のマーカーとして検査されている。

問題15 正解 2もしくは3

心筋梗塞時に心電図上に表れる現象としては①T波の増幅→②ST上昇→③異常Q波の出現とされている。しかし、T波の増幅はとも発見し難いことから、両方を正解とした。なお、最近の報告ではST上昇を示さない患者がかなりの確率（報告者によって相違するが30～40%に達する）に増加しており、注意を要する。

問題16 正解 2

両試料試料とも10%高値に測定している。比較的問題なく測定されていると推定出来る。このため、多くの施設の測定値とこの施設の測定値の乖離が発生しているだけで、サーベイ試料に問題が発生していると考え難い。また、ランダム誤差が発生しているとは考え難い。

問題17 正解

SDIは次のように計算できる。

$$SDI = \frac{\text{試料2の測定値} - \text{平均値}}{\text{試料2のSD}} = \frac{220 - 200}{8} = 2.5$$

問題18 正解 3

試料1のCVは5%、試料2のCVは4%であることから、4～5%と推定出来る。

問題19 正解 4

測定された反応速度から活性を計算する。

$$\text{標準物質の活性 (U/L)} = \frac{0.02/\text{min}}{0.3 \times 10^3} \times \frac{0.63}{0.01} \times 10^6 = 200 \text{ U/L}$$

同様に、コントロール血清の活性を求めると80 U/Lと計算できる。この結果から、標準物質は問題なく測定されているのに対して、コントロール血清は100 U/Lの活性のはずが、80 U/Lであったのは、酵素Fを阻害する物質が発生したり、酵素Fが失活したり、測定試薬の異常に原因がなく、コントロール血清の測定に異常が発生したと推定出来る。

問題20 正解 1 & 4

共役酵素を用いて酵素活性を測定する方法においては、検体中に存在する中間体の影響を受ける。この影響を排除するために、①共役酵素活性を過剰に添加する。②中間体と共役酵素の反応を測定酵素活性(酵素E)開始前に終了させるための時間が設定されている。このような工夫は、AST、ALT、CK等の活性測定に適応されている。

問題21 正解 2 & 4

ネフローゼ症候群の診断基準は次の通りです。

- ①尿タンパク：1日の尿へのタンパク排泄量が3.5 g以上であること
- ②血清の低タンパク：血清総蛋白が6.0 g/dL以下であること（血清中アルブミンが3.0 g/dL以下であること）
- ③高脂血症：高脂血症（総コレステロールが250 mg/dL以上）であること

問題22 正解 1 & 5

ショック時には、ショックの5徴候（ショックの5P's）といわれる代表的症状のほか、その他の症状がみられます。

- ・ショックの5徴候
 1. 蒼白 (Pallor)
 2. 虚脱 (Prostration)
 3. 冷汗 (Perspiration)
 4. 脈拍触知不能 (Pulselessness)
 5. 呼吸不全 (Pulmonary deficiency)
- ・その他の症状
 6. 血圧低下 (収縮期圧90-100以下)
 7. 脈圧減少
 8. 表在性静脈虚脱
 9. 呼吸促拍

問題23 正解 1 & 5

分子篩は分子量の相違によって分離する方法。ヘモグロビン（分子量約64,500）にブドウ糖（分子量180）1分子が付加した程度の差を分離することは極めて困難で、現状では測定に利用され

生物試料分析

ていない。通常はヘモグロビンのNH₂基に糖が結合すると、NH₂によるチャージが消失することによって発生するイオン強度差を利用した（イオン交換カラムを用いた）高速液体クロマトグラフィ（HPLC）法が用いられている。日本の基準法である慶応法やアメリカの基準法はこの方法である。一方、ヨーロッパを中心とした国際臨床化学会（IFCC）はヘモグロビンのN末6番目と7番目のペプチド鎖を制限酵素にて切断し、遊離してくる6つのアミノ酸からなるペプチド+ブドウ糖の分子量をマススペクトログラフィ（MS）にて測定する方法を基準法とする測定法を提案している。また、同じ酵素を用い、切断されたペプチド鎖に結合した糖を酵素的に測定する方法が開発され、市販されている。また、ヘモグロビンN末を認識する抗体を用いた方法も市販されている。電極法は現状では報告されていない。

問題24 正解 1

C反応性タンパクの血中半減期は5～7時間であるのに対して、アルブミン濃度は14～18日、ヘモグロビンは60～90日、トランスフェリン8～10日、IgGは23～25日程度と長い。

問題25 正解 3

スルホサルチル酸とタンパクの結合によって生じる混濁を測定する方法（キングスベリー・クラーク法）、芳香族アミノ酸の有するベンゼン環の吸光度を測定する方法、フェノール試薬を用いるローリー法、ピシンコニン酸と銅錯体を用いるBCA法がある。p-ニトロフェノールを用いたタンパク定量法はない。

問題26 正解 4

タンパクの形状は移動度に影響を与える。球状のタンパクは移動しやすいのに対して、糸状のタンパクは移動しにくい。カイロミクロンは泳動によって移動しない。電気泳動であるため、タンパクの荷電量によって移動度が決まる。血清タンパクの電気泳動はpH 8.6で実施されるが、この条件下では全ての血清タンパクはマイナスに荷電しているため、陽極側に移動する。この様に緩衝液のpHは重要であるが、濃度も問題、濃くなるとジュール熱が発生し易くなる。もちろん支持体の荷電も影響を与える。荷電のない支持体を用いると電気浸透現象が少なくなる。一方、染色液は電気泳動後に使用するため、移動度には無関係。

問題27 正解 2 & 4

国際単位をSI単位で表現すると $\mu\text{mol}/\text{min}$ である。1,000 U/LをSI単位で表現すると mmol/min となる。カタールは $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ である。

問題28 正解 2 & 4

酵素活性測定における基質濃度の選択は「Km値の何倍が良いか」という問題が出される。しかし、基質濃度の選択をKm値で考えることはない。基質阻害が発生する酵素（乳酸デヒドロゲナーゼ）や、基質の粘性上昇から酵素反応を低下させる（アミラーゼなど）もあり理論通りにはならない。このため、実験的に濃度変化によって反応速度が変化しにくい濃度が選択される。このメリットは、①現実的に最も高感度な条件である、②基質濃度の変化（試薬の劣化、分析操作上の問題等）による測定値のバラツキを受けにくい、③測定に問題が発生した場合、原因追及、将来予測を的確に行える。

問題29 正解 1 & 3

エステル結合はアルコール基とカルボキシル基の縮合生成物である。

問題30 正解 1 & 2

蛍光が発生する場合、迷光が大きな装置で測定した時と同じ症状が出る。要するに、吸光度が高くなるほど負の誤差が大きくなる（迷光の項を参照下さい）。また、測定光量の揺らぎが蛍光発生量に影響するため、測定値のバラツキが大きくなる。