愛知県臨床検査標準化ガイドライン

臨床化学検査における
試薬検討の基礎知識

第１版

2021 年２月

愛知県臨床検査標準化協議会

AiCCLS:Aichi Committee for Clinical Laboratory Standardization

発刊によせて

愛知県臨床検査標準化協議会
会長　杉田　洋一

これまで、臨床検査の分野では「測定法の標準化」が全国的に推進されており、日本国内のどこで測定しても正確で精度の良い検査結果を得ることが可能になりつつある。また、2018年12月1日に改正医療法が施行され、検体検査の精度の確保につき、全ての施設において、検査精度を保証すべく対応が必須であることは周知のことである。ひいては、地域の医療圏における安全で効率的な医療を実現する上で、どの施設においても、信頼性が高く、共有可能な検査結果の提供ができることが非常に重要であり、目標でもある。

昨今、分析機器・試薬の製造技術の進歩により臨床検査の自動化も進んでおり、正確且つ迅速な結果報告が可能となり、検査にかかる工程の効率化が図られてきている。しかしながらその反面、分析機器・試薬の特性を理解しないまま分析を行うことで、精度不良につながるリスクも抱えている。

冒頭に述べた検査精度の保証を確実なものとするため、自動化された分析行程から得られる検査結果に、再現性と信頼性があるものであることを科学的に保証したうえで、検査結果を報告しなければならない。その妥当性を確認するために、分析機器・試薬の検証を行い、性能評価をすべきである。

今回、分析機器・試薬の性能特性を検証・確認するうえで必要な基礎的検討の手法の理解を深め、各施設における検査結果の正確性向上と維持に、本書が一助となれば幸いである。

はじめに

2021 年 1 月

試薬の基礎的検討において、近年の分析機器の自動化により、測定システムを構築する機会が少なくなっていることで、試薬性能の妥当性を検証することへの壁を感じている技師も少なくない。

また、他者によって実施された検討結果（メーカー検討結果や、文献掲載の他施設検討結果）を確認する機会が多いことから、それらの検討内容を正確に理解することが重要となってくる。

本手順書は（一社）日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会「定量測定法に関するバリデーション指針」を基に作成されており、試薬の基礎的検討において一般的に各施設にて行われている基本手技を要約し記した。新たに基礎的検討を実施する技師、または、本手順書を利用し基礎的検討の手法の教育を行う技師向けに作成されており、基礎的検討作業の一助になれば幸いである。

また各種基礎的検討においては、原則（一社）日本臨床化学会提唱のバリデーション指針に準じ、バリデーション算出用プログラム「Validation-Support/Excel Ver3.5 の操作法」[3] を利用して検討を実施されることが望ましいとされている。あくまで、本手順書を利用する上では、各種基礎的検討手法の理解に重点を置くことで、機器・試薬の性能特性を読み解くことを目的としている。

目次

Ⅰ．試薬検討の基礎知識 ・・ 1

1．正確さの評価 ・・・ 1

2．併行精度（同時再現性）・・ 2

3．室内再現精度（日差再現性）・・ 4

4．検出限界（LoD）・定量限界（LoQ）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

5．直線性 ・・ 9

6．対象方法（試薬）との相関 ・・・ 11

7．干渉物質の影響 ・・ 13

8．検体の保存安定性 ・・・ 16

9．コンタミネーション試験[6] ・・・ 18

10.プール血清の準備について ・・・ 22

Ⅱ．参考文献 ・・ 23

Ⅰ．試薬検討の基礎知識

1. 正確さの評価

正確さまたは真度（trueness）は、真値からのかたよりの程度を表し、測定値の誤差を評価する。正確さとばらつきの程度を示す精密さ（precision）を合わせて精確さ（accuracy）という。

① 検討試料の準備

常用認証標準物質の使用が望ましい。入手困難な場合は、メーカー指定のキャリブレーターを用いると良い。これらの濃度は測定範囲全域をカバーしていることが望ましい。管理血清は添加酵素が動物由来の場合や安定化剤などの影響により患者検体の反応性とは異なることがあるので、試料の組成・反応原理・特異性などについて事前に確認しておく必要がある[1)]。

② 測定方法

1 種類または 2 種類の既知濃度の標準物質を 10 回以上繰り返し測定する（表 1）。

③ 結果の集計

平均値、標準偏差から平均値の 95%信頼区間（t 分布、両側確率 0.05）を求める。

④ 結果の解釈

標準物質の表示値が求めた 95%信頼区間に含まれていれば、有意な偏りはないと見なすことができる（表 2）。信頼区間が外れた場合は（平均値-表示値）/表示値×100（%）が 5%以内であることを確認する。但し、電解質（Na、K、Cl）項目は 2%を上限とする[2)]。

表 1　正確さの確認（例：ALP U/L）

n 回目	測定値
1	165
2	163
3	165
4	166
5	166
6	164
7	166
8	165
9	165
10	166

表 2　正確さの確認・集計値（例：ALP U/L）

平均値	165.1
標準偏差	0.94
95%信頼区間	164.5~165.7
表示値	165

評価（例：ALP）

表 1 に示す繰り返し測定の結果より、表 2 に示す値を算出する。表示値（165）が 95%信頼区間（164.5~165.7）に含まれているため、有意な偏りはないとみなすことができる。

2. 併行精度（同時再現性）

併行精度（repeatability）は同じ検体を短時間で繰り返し測定した場合に、結果がどのくらいばらつくかで確認する。試薬の基本的な性能表示方法であり、一般的には最も高い精度となる。

① 検討試料の準備

3 濃度の試料を用意する（基準範囲の下限付近、基準範囲の上限付近、臨床的な異常濃度域）。試料は精度管理試料を使用するが、適切な濃度の試料が得られない場合には、プール血清の利用も考慮する。その場合はフィブリン析出に注意が必要である。

② 測定方法

試薬の標準測定条件に従いキャリブレーションを行った後、検討試料を各 20 回連続測定する。測定の際は同じ検体容器から連続測定するのではなく、試料を 20 個に分注したものを使用する。分注と測定は試料の濃縮や変性が無いよう短時間で行う [3)]。

③ 結果の集計

試料毎に変動係数 CV（%）を求める（表 3）。

表 3　併行精度の測定結果（例：TG mg/dL）

項目	TG		
濃度	低濃度	中濃度	高濃度
1 回目	42	194	398
2 回目	42	195	389
3 回目	42	197	393
4 回目	41	197	395
5 回目	42	196	396
6 回目	42	197	394
7 回目	42	196	398
8 回目	41	196	396
9 回目	42	195	399
10 回目	42	197	400
11 回目	42	197	394
12 回目	42	196	392
13 回目	42	196	396

14 回目	42	197	393
15 回目	42	194	397
16 回目	42	197	395
17 回目	41	196	397
18 回目	42	196	394
19 回目	43	197	397
20 回目	42	195	396
平均	42	196	396
標準偏差	0.4	1.0	2.5
CV(%)	1.0	0.5	0.6

④ 結果の解釈

結果の評価基準として、日本臨床化学会から「基準範囲の下限値および上限値付近の精密さの許容限界は、個人の生理的変動幅の 1/2 を満たしていること」と示されている。具体的には、測定結果から得られた CV（%）を許容誤差限界 CV_A（個体内の生理的変動幅の 1/2）と比較する（表 4）。CV_A は過去の国際的な提言と比較しても妥当な水準であり、CV（%）が CV_A よりも小さい場合には、実臨床で求められる精密さを満たしていると考えられる。

表 4　わが国における許容誤差限界（%）

項目	CV_A	項目	CV_A	項目	CV_A	項目	CV_A
AST	7.6	TCHO	3.4	UN	7.1	IP	4.6
ALT	11.1	TG	14.8	CRE	2.7	Fe	16.9
LD	3.4	HDL-C	4.2	UA	4.4	GLU	2.9
CK	11.1	LDL-C	4.6	T-Bil	11.7	CRP	28.6
ALP	3.9	PL	3.4	D-Bil	14.8	IgG	2.3
γ-GT	8.2	TP	1.5	Na	0.4	IgA	2.0
AMY	4.2	ALB	1.6	K	2.6	IgM	2.8
ChE	2.6	TTT	11.6	Cl	0.7	C3	3.8
LAP	2.4	ZTT	3.9	Ca	1.3	C4	5.6

CV_A : coefficient of variation of imprecision

日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会「生理的変動に基づいた臨床化学検査 36 項目における測定の許容誤差限界」より引用

注意点

複数の項目で CV_A が 5%を超えているが、実際の運用では 5%を上限とすることを推奨する。また、報告に示されていない項目の評価を行う場合には、5%を基本的な指標とする。低濃度域の試料を評価する場合は、算定された CV_A（表 4）を許容誤差限界としてもよい。

評価（例：TG）

表 4 より CV_A は 14.8%であるため、上限は 5%とする。表 3 で求めた CV（%）は各濃度とも 5%を下回っており、TG の併行精度は良好とみなすことができる。

3. 室内再現精度（日差再現性）

室内再現精度（intermediate precision）は検査結果の精度がどの程度の期間維持されるかを確認するために実施する。日常検査の変動には 1 日の間に生じる日内変動と、日が変わることで生じる日間変動の 2 種類がある [4)]。日内変動と日間変動の両者を含むのが室内再現精度であり、この結果から安定した測定を行うための諸条件（開封後の試薬安定性、機器搭載後のオンボード安定性、キャリブレーションの頻度など）が推測可能である。

① 検討試料の準備

プール血清が使用可能であるが、保存中の変質の防止、適切な濃度域の設定、十分な量の確保などの条件を満たすのは困難なことが多い。そのため多くの場合では、日常業務で使用する精度管理試料を用いて実施される。2 濃度以上の測定が推奨されている。

② 測定方法

未使用の試薬を用意し、標準測定条件に従いキャリブレーションを実施する。その後 2 濃度以上の検体を 1 日 2 回以上 1 週間以上繰り返し測定する。試薬の搭載条件（開封したまま、業務後使用しない時間帯は閉栓など）は、自施設の運用に則した条件で行うことが望ましい。検討期間中に再キャリブレーションを実施しなければ、開封後の試薬安定性を確認することができる。室内再現性は非常に多くの要因から影響を受けるため、各種の影響を排除した結果を得るために、試薬ロットの変更や分析機器の精度に影響を与える作業（光源ランプ・反応セル・試薬プローブなどの交換）は検討期間中、避ける必要がある。

③ 結果の集計

1 週間の測定結果と毎日の平均値をグラフにプロットする（図 1、図 2、図 3）。

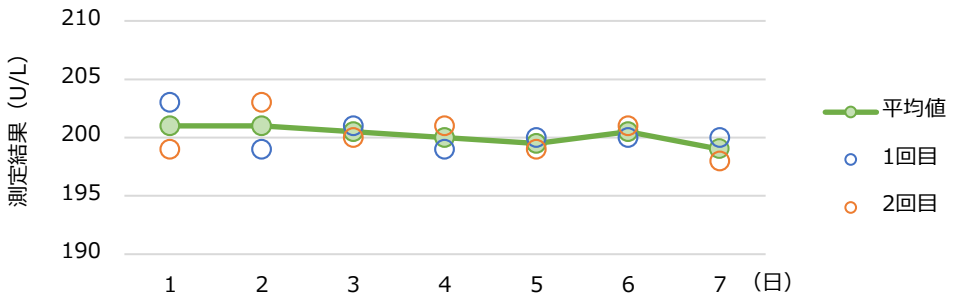

図 1　室内再現精度良好の例（例：ALP U/L　7 日間測定）

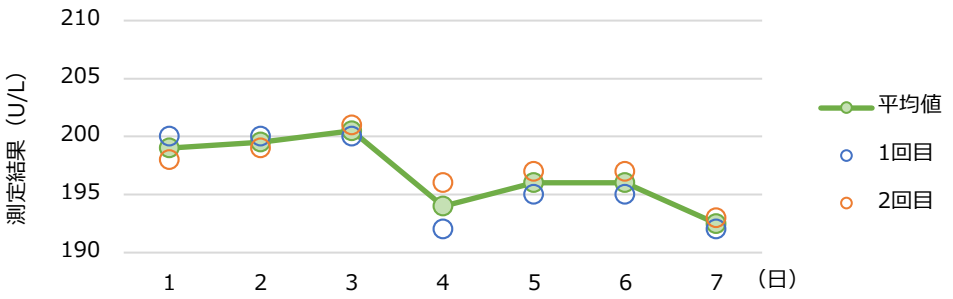

図 2　室内再現精度不良の例（例：ALP U/L　7 日間測定・4 日目よりシフト現象あり）

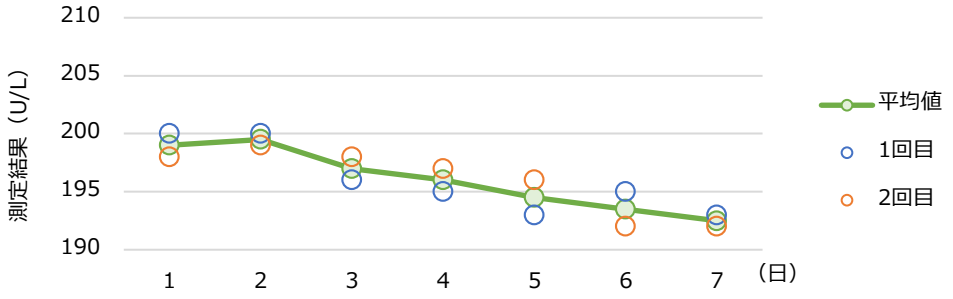

図 3　室内再現精度不良の例（例：ALP U/L　7 日間測定・3 日目よりトレンド現象あり）

④ 結果の解釈

測定結果に大きなばらつきがなく、期間中にシフトやトレンドが生じていないかを確認する。シフトやトレンドが見られた場合は、測定試料の濃縮や劣化、試薬ロットの変更、分析機器のメンテナンスの有無などを確認する。これらの要因が否定できるのであれば、試薬の安定性に問題がある可能性が想定される。この場合には、シフトやトレンドが生じる前に再キャリブレーションを行う。再キャリブレーションによって試薬の劣化を補正した場合、検討期間を延ばしてその効果がどの程度持続するかを確認する。消費頻度が低い試薬の場合、使い切る前に何回も再キャリブレーションを実施する可能性がある。試薬の安定性に関する情報を事前に確認することは、新規項目を採用する際に非常に有用と考えられる。

4. 検出限界（LoD）・定量限界（LoQ）

検出限界（limit of detection：LoD）は測定対象物の検出可能な最低の量を表し、定量限界（limit of quantitation：LoQ）は適切な精度と正確さで定量できる最小量を表す。

LoD の算出方法は、被検物質を含まない試料を用いてブランク上限（limit of blank：LoB）を求め、検出限界に近いと推定される濃度の試料を複数使用して複数日にわたる測定値を用い、合成標準偏差として合わせることで計算される[5)]。

LoQ は、低濃度の検体を測定した場合に精度を維持した状態で定量可能な最小値を確認することを目的とするため、この検証によって得られた定量範囲につき、測定結果の信頼性を担保するものでもある。通常、LoQ を求めるには非常に厳密で煩雑な手順が必要となる。

ここでは、試薬添付文書に記載されている妥当性確認された LoQ を検証する場合の比較的実施が容易な方法（精度プロファイルからの推定）について述べる。極低濃度域での臨床的意義が高く、精度が求められる項目において検証されることが望ましい。例えば、急性相反応蛋白や内分泌機能検査項目、腫瘍マーカーなどが挙げられる。

① 検討試料の準備

予想される LoQ の濃度域に近い実検体を 10～20 検体用意する。この際、各試料の測定値が近くなりすぎないように、ある程度の幅を持たせるとよい。

② 測定方法

各検体の 2 重測定を 5 日間実施する。試料毎に平均値、標準偏差、変動係数（CV%）を算出する。例として、10 検体で実施する場合は合計で 100 回の測定を行う（表 5）。

表 5　LoQ 測定結果（例：CRP mg/dL）

	測定日数										平均値	標準偏差	CV%
試料 No.	1 日目		2 日目		3 日目		4 日目		5 日目				
試料 1	0.008	0.009	0.007	0.008	0.009	0.008	0.007	0.007	0.008	0.009	0.008	0.001	10.2
試料 2	0.001	0.002	0.001	0.002	0.005	0.004	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003	0.001	50.8
試料 3	0.009	0.012	0.012	0.010	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.011	0.011	0.001	9.2
試料 4	0.005	0.004	0.006	0.004	0.003	0.006	0.008	0.005	0.005	0.004	0.005	0.001	28.3
試料 5	0.003	0.005	0.004	0.003	0.002	0.005	0.004	0.003	0.002	0.004	0.004	0.001	30.9
試料 6	0.013	0.013	0.012	0.013	0.014	0.012	0.013	0.013	0.014	0.014	0.013	0.001	5.6
試料 7	0.020	0.020	0.021	0.020	0.019	0.020	0.021	0.019	0.021	0.020	0.020	0.001	3.7
試料 8	0.006	0.004	0.003	0.006	0.003	0.004	0.005	0.005	0.003	0.002	0.004	0.001	33.4
試料 9	0.037	0.035	0.034	0.036	0.035	0.034	0.036	0.035	0.034	0.034	0.035	0.001	3.0
試料 10	0.041	0.042	0.041	0.040	0.042	0.042	0.043	0.041	0.041	0.042	0.042	0.001	2.0

③ 結果の集計

各試料につき算出した平均値、CV を用いて、X 軸に平均値、Y 軸に CV をプロットしたグラフを作成し、適当な曲線式で回帰曲線を引く。許容誤差限界の CV_0値との交点の測定値を LoQ とする（図 4）。

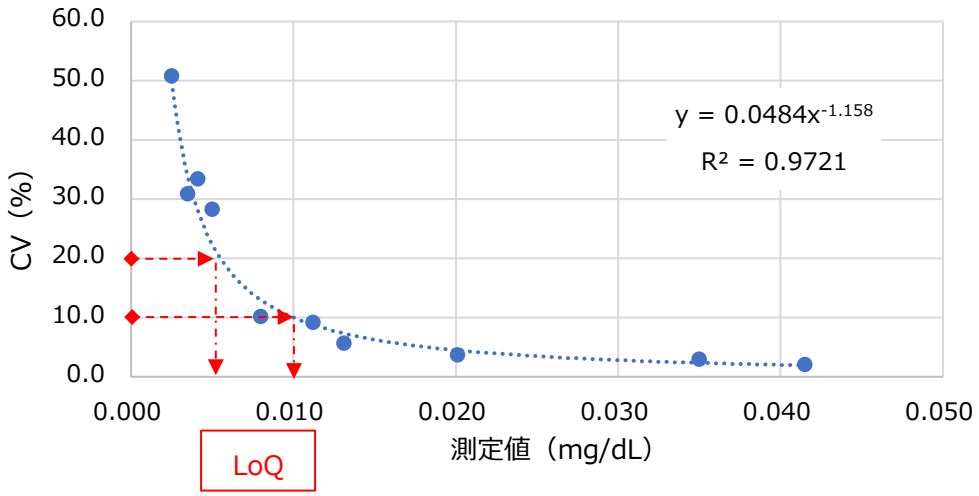

図 4　LoQ（例：CRP mg/dL）

④ 結果の解釈

得られた結果から、LoQ は CV10%もしくは項目の特性を踏まえ CV20%濃度とする [5)] 。またこの時、試薬メーカーの設定値と比較する。正しく測定され精度も維持されている場合には、ほぼ一致した値となることが予想される。大きく乖離する場合には、測定の過程において問題が無いか確認する必要がある。汎用試薬の場合、添付文書には測定に用いた分析機器も記載されている。自施設の分析機器と異なる場合には期待する測定結果が得られない場合もあるため、論文などを参考に他施設での検討結果と比較し、評価するとよい。検討から得られた LoQ は、「測定精度を維持した状態で定量できる最低濃度」を示し、極低濃度域での測定結果の精度を担保するものであり、臨床への報告可能範囲の下限を設定する際の指標となり得る。

評価（例：CRP）

累乗回帰式 $y = 0.0484x^{-1.158}$ より CV%＝10%とすると、

LoQ（CV10%） = 0.010mg/dL

累乗回帰式 $y = 0.0484x^{-1.158}$ より CV%＝20%とすると、

LoQ（CV20%） = 0.006　mg/dL

5. 直線性

直線性（linearity）は、測定範囲全域の正確さを保証するために重要な特性である。測定値がどの測定範囲で、本来の値に対し直線性が得られているかを確認する。測定範囲は試薬の添付文書にも記載されているが、分析機器が変わればあてはまらない事もある。そのため、自施設の測定条件での測定範囲を確認するのは非常に重要である。検討方法としては、高濃度の検体を低濃度の検体や生理食塩水で段階的に希釈した試料を測定し、理論値と比較する方法がとられる。ここでは低濃度と高濃度の検体を用いた方法について述べる。

① 検討試料の準備

試料には実際の患者検体を用いたプール血清を用いる。低濃度と高濃度の実検体を、あらかじめ必要な検体量確保する。高濃度検体の確保が困難な場合には、最高濃度のキャリブレーターや精度管理試料などで代用する場合もある。この場合、確認できる測定範囲が狭くなることや、実検体と同じ挙動を示さない可能性があることには十分な注意が必要である。

② 測定方法

低濃度検体と高濃度検体を用いて混合比系列を作成する。混合は等間隔又は等比的に行い、最低４段階以上になるように希釈する。以下に例を示す（表 6）。各試料は３重測定以上行う。測定中は試料の濃縮に十分注意し、短時間で測定を終えるのが望ましい。

表６　直線性試験（例：CK U/L）

低濃度試料：3.0 U/L　・　高濃度試料：5130.0 U/L

混合比		理論濃度
低濃度	高濃度	
10	0	3.0
8	2	1028.4
6	4	2053.8
5	5	2566.5
4	6	3079.2
2	8	4104.6
0	10	5130.0

③ 結果の集計

X 軸に理論値、Y 軸に実測値をプロットする（図 5）。

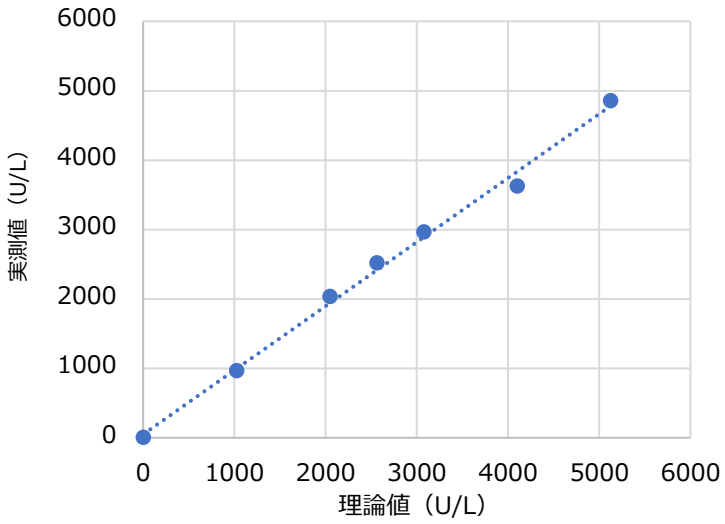

図 5　直線性の評価（例：CK U/L）

④ 結果の解釈

理論値からの測定値のばらつきや乖離が無いかを確認する。各測定ポイントが理論直線から外れていないかを確認し、直線性の保たれている上限と下限を確定する。なお、直線性の評価は、従来視覚的に判断されていた。現在、ガイドラインでは「共分散分析を利用し残差変動の分散と純誤差分散比から F 検定を行い判断する」とされている [5)] 。統計学的計算は日本臨床化学会の HP から「定量測定法のバリデーション算出用プログラム」をダウンロードすると簡便に算出できるため活用していただきたい。

6. 対象方法（試薬）との相関

相関分析は、多数の患者試料を用いて比較対照法による測定値に対する関係性を直線関係式で表し、被検法の正確さを一定系統誤差と比例系統誤差の大きさで評価するものである[4)]。

①検討試料の準備

望ましい患者試料の濃度分布にあう患者検体を 50 例以上用意する。

測定データは X 軸・Y 軸ともに連続性があるようにし、空白欄が無いように入力する。

測定試薬・分析機器の測定レンジ範囲内におけるサンプルを使用する。

②測定方法

試料測定については、比較対照法と被検法の両法で毎日 5～10 例ずつ、5 日以上かけて測定する。日間変動を考慮すると一度に測定しないことが望ましい。

③結果の集計

比較対照法と被検法の両測定結果を入力する。

方法間比較を行う場合は直線回帰式ではなく線形回帰式（標準主軸回帰式または Deming 回帰式）を利用することが望ましい。

［回帰直線の使い分けについて］

直線回帰

通常は x を基準に y の値を推定する。通常の最小 2 乗法による直線回帰である。 x が既値である場合（x には誤差が無いと仮定）に y を推定する場合に求める。直線は等確率楕円の長軸より少し x 軸側に傾く。

線形回帰

x と y を平等に扱って両者の関係式（線形関係式）を求める。直線回帰と異なり一方から他方の推定式を求めるのではなく、x、y 共に誤差があるとして回帰直線を導く。通常一群の対象を 2 つの方法で計測してその値を比較する場合（方法間比較）には、線形関係式を求める必要がある。線形回帰には標準主軸回帰、Deming 回帰などがある。

④結果の解釈

散布図および偏差図から測定法間の直線性とバラツキを観察する（図 6、図 7）。

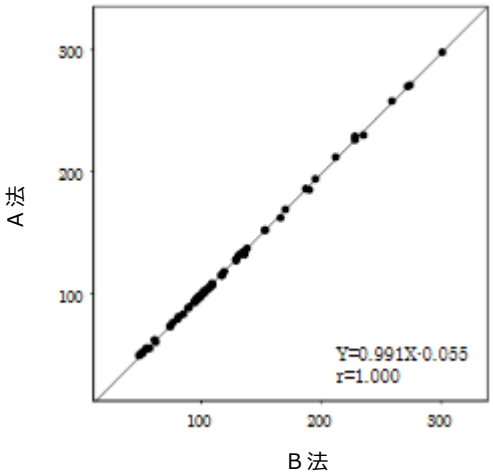

図 6　散布図

（例：GLU mg/dL　A 法/B 法比較）

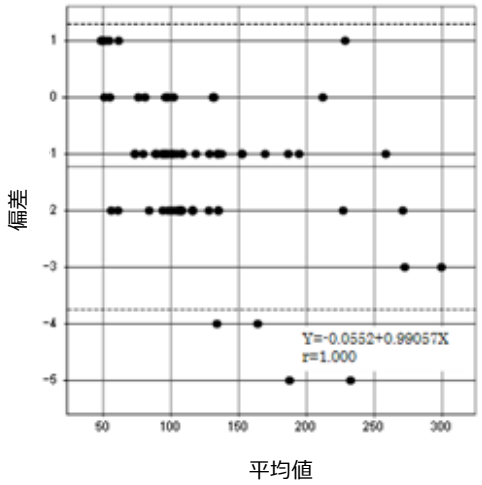

図 7　偏差図

（例：GLU mg/dL　A 法/B 法比較）

直線性から外れたときはその原因を追究する。「比較対照法との比較実験による方法」ではブートストラップ法での傾きおよび切片の信頼区間を求めることが必要となる。

結果の解釈においては、y=x に対してブートストラップ法の 95%信頼区間内に傾き・切片が入っていれば、比較実験の結果が良好であったことを示す。

7. 干渉物質の影響

検体中に共存する種々の干渉物質による測定誤差を検討するために行われる。干渉物質として、ビリルビン、混濁、溶血などが検討されるが、測定項目によっては薬物・凝固剤などの影響を調べる必要がある。現在、複数の干渉物質の影響を調べるキットが市販されているので、使用時には説明書に従い使用する。キットを使用しない場合においても、溶血が測定に与える影響については自施設で確認するのが望ましい。

ここでは、「（1）自家調製ヘモグロビン溶液を用いる方法」と、「（2）干渉チェック・Aプラスを用いる方法」の 2 種類の溶血の影響を調べる手順を解説する。

① 検討試料の準備

（1）自家調製ヘモグロビン溶液を用いる方法

検討試料にはプール血清を使用する。プール血清は測定値が基準範囲内となるように調製する。スタートの測定値が低値や高値に偏ってしまうと、干渉物質の影響を正確に把握することが困難な場合が生じる。

［測定試料の作成方法 [4)] ］

1） 抗凝固剤入り採血管にて採血を実施する（3mL～5mL 程度）。
2） 500～1,500*g*、5～10 分間遠心操作を行い、血漿部分を除去する。
3） 血球を生理食塩水で 3 回洗浄した後、精製水を数 mL 加えて溶血させる。
4） 精製水でヘモグロビン約 5g/dL 程度に調製する（原液）。
5） 精製水で原液の希釈系列（5～10 段階）を作製し、添加試料とする。
6） プール血清と添加試料を 9：1 の容量比で作製し、測定試料とする（表 7）。

表 7　干渉物質の影響試験法における測定試料の作製例

（例：溶血の影響　LD U/L　自家調製ヘモグロビン溶液を用いた方法）

サンプル No.	1	2	3	4	5	6
ヘモグロビン濃度	0	100	200	300	400	500
添加試料の割合	1	1	1	1	1	1
プール血清の割合	9	9	9	9	9	9
測定値（n=3 以上）	297.7	411.7	521.7	636.3	746.7	862.7
変化率（%）	0	38.3	75.2	113.7	150.8	189.8

（2）干渉チェック・Aプラスを用いる方法

干渉物質の検討として、市販の干渉チェック・A プラス（JAN コード 4987562793709、包装規格 2mL 分×8、貯法 2℃～8℃、製造後有効期限 12 ケ月、製造/販売　シスメックス（株））を用いる方法を解説する。検討項目はビリルビン・F（遊離型）、ビリルビン・C（抱合型）、溶血、乳ビの 4 項目である。

［測定試料の作成方法］

1） ベース血清：プール血清を必要量用意する。
2） 添加試料：各検査項目とブランク用のバイアルをそれぞれ精製水 2.0mL で溶解する。
3） 添加ベース血清：1）のベース血清 9.0mL と 2）の添加試料 1.0mL を混合する。
4） ベース血清ブランク：1）のベース血清 9.0mL と 2）のブランク溶液 1.0mL を混合する。
5） 被検試料:3）の添加ベース血清と（4）のベース血清ブランクを用いて希釈系列（5～10 段階）を作製し（表 8）添加試料ごとに添加濃度を計算する。

表 8　干渉物質の影響試験法における測定試料の作製例

（例：溶血の影響　Ca mg/dL　干渉チェック・Aプラスを用いる方法）

サンプル No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
混合比	0/10	1/9	2/8	3/7	4/6	5/5	6/4	7/3	8/2	9/1	10/0
ベース血清のブランクの割合	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
ベース血清の割合	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
測定値（n=3 以上）	8.7	8.7	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.7	8.7	8.7	8.7
変化率（%）	0.0	0.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0

② 測定方法

作製した測定試料をそれぞれ 3 重測定する。測定中は試料の濃縮や変質がないように十分注意する。

③ 結果の集計 [5)]

ヘモグロビン溶液が入っていない試料の測定値を基準として、各系列の変化率を計算する。X 軸にヘモグロビン濃度、Y 軸に変化率をプロットする（図 8、図 9）。

$$\text{変化率（\%）} = \frac{\left(\text{測定試料の測定値} - \text{原液試料の測定値}\right)}{\text{原液試料の測定値}} \times 100$$

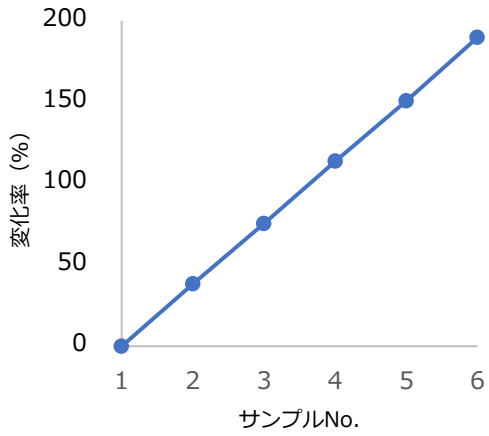

図 8　ヘモグロビン濃度における溶血の影響（例：LD U/L）

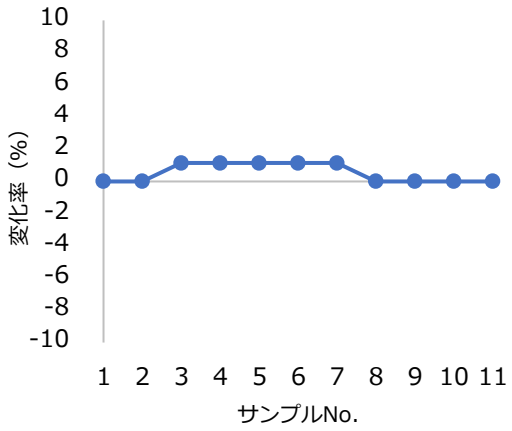

図 9　ヘモグロビン濃度における溶血の影響（例：Ca mg/dL）

④ 結果の解釈 [5)]

ヘモグロビン濃度と測定結果がどのような関係にあるかをグラフおよび変化率で確認する。溶血の影響がある場合には、ヘモグロビン濃度の上昇に伴って検査値が連続的に上昇または低下する。定量測定法のバリデーション算出用プログラムにおいては、変化率が 5%を超過した場合は赤字で表示される。なお、許容されうる限界濃度はその項目の臨床的重要性や生理的変動などによって変わる。

評価（例：溶血の影響）

図 8、図 9 より、今回検討を行った LD 試薬はヘモグロビン濃度の上昇に伴って検査値が連続的に上昇しており、溶血の影響を受けていると考えられる。臨床において検体が溶血している場合には、溶血により測定値が上昇することがある旨をコメントなどで付記することが望ましい。一方、Ca 試薬はヘモグロビン濃度が上昇しても検査値が連続的に上昇または低下していないため、検討に用いた Ca 試薬は溶血の影響を受けないと考えられる。

8. 検体の保存安定性

試薬検討における「検体の保存安定性」とは、検体の保存条件と温度が検査結果に与える影響を確認することを意味する。この情報は医師からの「追加検査出来ますか？」という質問に根拠を持って対応するために必要となる。

一般的な検討では、室温（25℃）、冷蔵（4℃）、凍結（-20℃、-40℃、-80℃）の各種温度で検体を一定期間（数時間～数日）保存した後、検体採取直後の測定値からの経時的な変化を確認する。これらの情報は、試薬の添付文書や文献等から得ることも可能である。しかし、必ずしも自施設と同じ条件下での結果ではないため、実際に検討することが重要である。実施に際しては、自施設での保存方法（採血管のまま保存、別容器に分注して保存）、保存温度（冷蔵、冷凍）、検体の保存期間（検体破棄までの期間）等を確認し、なるべく実運用に近い条件で実施するのが望ましい。

① 検体の準備

保存条件以外の影響を避けるため、肉眼的に異常のない清澄な検体を選択する。保存条件ごとに 5 検体以上を用意し、事前に測定して基準となる測定結果を得ておく。この際、測定値に偏りが生じないように配慮する。凍結保存の検討をする際には、凍結融解の影響を避けるために測定回数分に子分注する必要がある。

② 測定

冷蔵または凍結していた保存検体を室温に戻す。凍結検体は溶解後に十分撹拌すること。測定条件を揃えるため、各条件の測定は同時に行うのが望ましい。

③ 結果の集計と解釈

保存条件ごとに、横軸に保存期間、縦軸に測定値をプロットした折れ線グラフを作製する（図 10）。安定性が保たれていない場合、時間経過とともにグラフは低値または高値側に曲がっていく（図 11、図 12）。初めに測定した基準値との比較を行い、各保存条件での安定性期限を確認する。

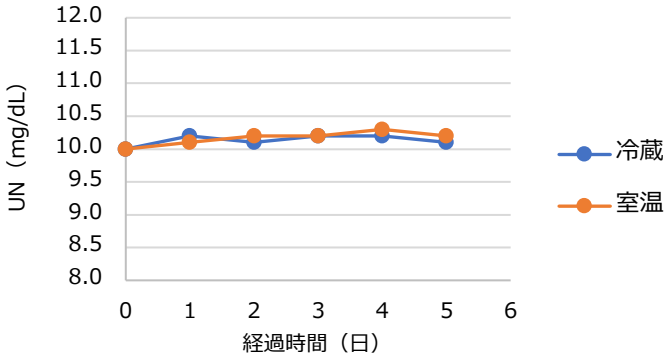

図 10　安定性が保たれている場合（例：UN mg/dL）

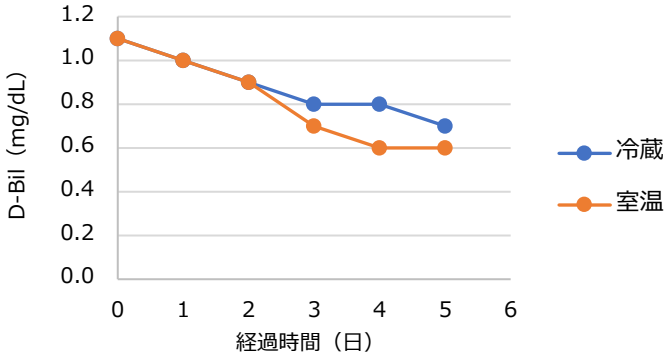

図 11　時間経過とともに低値化（例：D-Bil mg/dL）

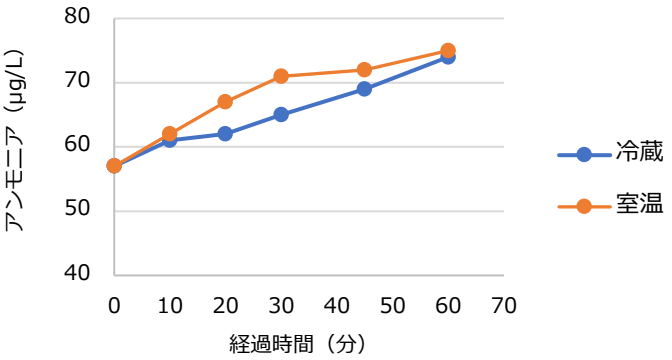

図 12　時間経過とともに高値化（例：アンモニア μg/L）

9. コンタミネーション試験 [6)]

コンタミネーションは汚染を意味する言葉として使用され、略してコンタミと呼ばれている。また、キャリーオーバーは繰り越しや持ち越しを意味する。臨床化学分析において、コンタミネーションとはキャリーオーバーによって生じた患者試料間の持ち越しや、試薬間での持ち越しによる汚染を意味している。

臨床化学分野の分析機器はサンプルプローブや試薬プローブおよび反応セルが共通であり、コンタミの要因となっている。近年、超音波撹拌など撹拌子がない分析機器も登場しているが、撹拌子もコンタミの要因となる。通常の洗浄動作のみではキャリーオーバーを完全に回避することは難しく、次の項目に影響を及ぼすため、対策が必要となってくる。

キャリーオーバーを調べる試験であるコンタミネーション試験には、大きく分けて 2 つの方法がある。

標準的な方法として全項目を交互にプール血清を 3 重測定し測定値の変化を見る方法と、簡易的に試薬中に目的成分および反応に影響を与える成分が含まれるかどうかを調べる方法としてプール血清に試薬を添加したものを各項目で測定する方法がある。

この項では前者の方法を用い、試薬プローブおよび撹拌子を対象とした 5 項目におけるコンタミネーション試験の方法を記述する。

① 検討試料の準備

(1) プール血清を準備する（CRP などプール血清が極低濃度と想定される項目のコンタミネーション試験を実施する場合は、ある程度高濃度になるように試料を作成する）

(2) キャリーオーバーに関するプログラムが設定されている場合は、あらかじめ削除しておく。

(3) 印刷する場合、印刷順をサンプリング順に変更する。

(4) プラスチックセルを用いている場合は新しいセルに交換する。ガラスセルではセル洗浄を実施し、反応セルを十分に洗浄しておく。

② 測定方法

(1) 1 から 21 の項目順に検査依頼をし、多重測定機能がある分析機器では 3 重測定とし、その機能がない場合は 1 から 21 を 3 回ずつ依頼する（表 9）。

(2) 準備したプール血清を依頼した全ポジションに架設し、測定を開始する。その際、プール血清の濃縮に注意する。

表 9　総当たり法における 5 項目の場合の検査依頼順

項目A	項目B	項目C	項目D	項目E
1	2			
3		4		
5			6	
7				8
	9	10		
	11		12	
	13			14
		15	16	
		17		18
			19	20
21				

③ 結果の解釈

結果の例を図 13 に示す。3 重測定の結果におけるＡからＤの解釈は以下の通りとなる。

Ａ：前の測定試薬が次の項目に影響を与えない。

Ｂ：前の測定試薬が次の項目に影響を与える。

Ｃ：偶発誤差が考えられるため、再検討（再測定）を必要とする。

Ｄ：前の測定試薬が次の２テスト後項目まで影響を与える。

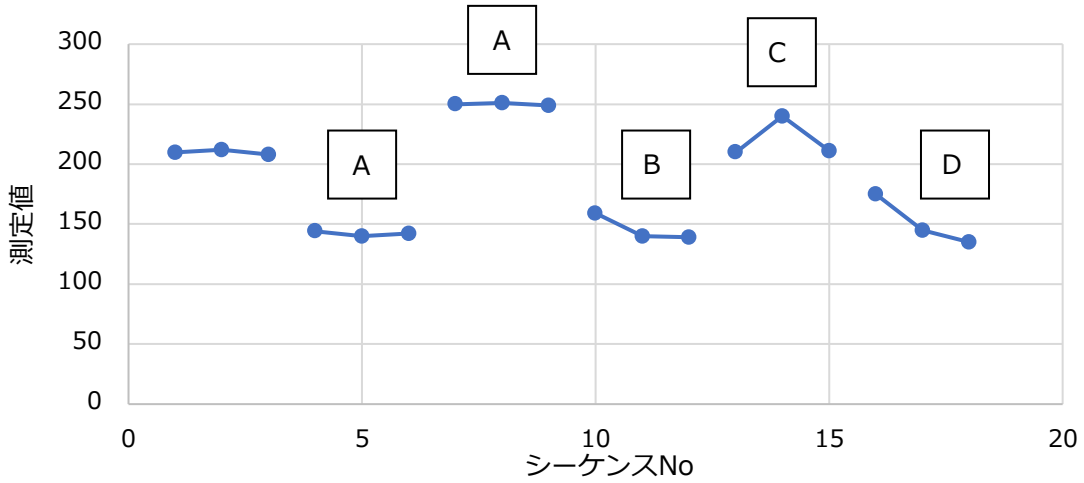

図 13　試薬プローブコンタミネーション試験の結果例

影響がみられた 2 試薬系項目において、第一試薬か第二試薬かを同定する場合は片方の試薬を生理食塩水に置換し、再度コンタミネーション試験を実施する。

④ コンタミネーションの対処法

コンタミネーションの影響回避が精製水または洗剤によって可能かどうか、判断が必要である。洗剤を使用する場合は試薬への影響を確認しておく必要があり、それを確認した上で次の対処法を検討する。

（1） 影響がある項目間において、精製水または洗剤を用いてクロスコンタミ回避プログラムを実施する。

（2） 測定順の並び替えを行う。

⑤ コンタミネーションの影響事例について

測定項目が同じでも、試薬メーカーにおいて測定原理や組成などは様々であり、試薬構成を把握することは重要である。この項では遭遇の多い事例について記載をする。

測定目的成分が試薬中に含有されている事例

AST・ALT→LD

AST、ALT の第一試薬には、ピルビン酸の影響を回避する目的で LD が含まれており、正誤差となる。

波長の影響を受ける事例

総タンパク→600nm～700nm 付近で測定する 2 ポイントエンド法項目

ビューレット試薬は 660nm 付近を中心に広い範囲に吸収を持つため、2 ポイントエンド法項目で正誤差となる。

試薬の pH 変動が影響を与える事例

総タンパク（ビューレット法）→アルブミン（色素結合法）

ビューレット試薬は強アルカリ性であり、ビューレット試薬が混入すると試薬自体の色調が変化し影響を与える。

⑥ まとめ

新規導入機器においてコンタミネーション試験の影響がなかったとしても、経年的に影響が現れることがある。コンタミネーション試験を行うには多大な労力が必要だが、コンタミをゼロにすることは不可能であり、データに疑問が生じた場合にはコンタミネーション試験を実施し、確認することが重要である。また、洗剤などによるクロスコンタミ回避プログラムを実施する場合、動作回数が増えるため処理速度が低下すること考慮し、場合によっては測定順の並び替えなどの方法をとる必要がある。

10. プール血清の準備について

試薬検討では非常に多くのデータが必要なため、想定される測定回数にあわせた検体量を確保する必要がある。各種再現性の検討では、精度管理試料やキャリブレーターを用いる場合も多いが、コストや目的とする濃度の試料が無い等の問題が生じる。また、管理試料では、基材となる血清や各種の添加物質の影響により、実検体とは異なる挙動を示す場合もある [7)]。そのため、必要に応じて実検体から作製したプール血清を用いる必要がある。

① 検体の選択

検査終了後の検体から、肉眼的に異常のない清澄な検体を選択し、ポリエチレンなどの大きな容器にプールする。使用後の試薬容器を利用することも可能だが、使用前には十分に洗浄する必要がある。ここでの肉眼的な異常とは、溶血・混濁・高ビリルビンを指し、安定した測定のためにはこれらの検体を避けるのが望ましい。また、プール後のフィブリン析出を抑制するため、凝固が不十分な可能性のある検体（透析患者や血液疾患の患者検体など）も極力避けたほうが良い。

② 作製中の保存方法

プール中の容器には必要量に達するまで血清を随時追加（追い溜め）していくが、その間は凍結保存する。この後の作業で量は目減りするので、事前に検討計画をよく確認し、必要量よりも多くの検体を確保する必要がある。

③ 凍結融解

フィブリンや蛋白の混濁を出し切らせることと、不安定成分の失活を目的として、凍結融解を 2～3 回繰り返す。融解時には酵素の失活や細菌による汚染の危険があるので、速やかに作業すること。

④ ろ過作業

凍結融解後の試料には多量の沈殿物が発生しているので、遠心操作により除去する。遠心操作が困難な場合は、数枚重ねたガーゼによる粗ろ過を実施する。ほとんどの場合、試薬検討の目的（短期間での使用）であればこの状態でも使用可能である。長期間の安定性が必要な場合には、より細かいメンブレンフィルタ（0.2μm～3μm）を用いたろ過作業が必要となる。メンブレンフィルタは自然ろ過では使用できないので、吸引ポンプ等の機器が必要となる。機器がない場合には、注射器のシリンジにセットして使用する。カートリッジ製品が市販されているので、目的に応じて使い分けると良い。

⑤ 作製後の保存方法

作製後、試料の安定性を確保するため、凍結保存する。頻回の凍結融解を避けるため 1 回の必要量を考慮して小容器に分注すると良い。凍結保存にはポリプロピレン製のものが適している。使用する容器の選択に際しては、凍結時に密閉状態が保たれることを確認する必要がある。

⑥ 検査残余検体使用についての倫理問題

日常診療で生じた検査残余検体を本来の目的以外に利用する場合、患者のプライバシーに配慮した運用が求められる。残余検体の利用についての基本的な考え方については、各種団体から倫理指針が示されており、一定の基準を守れば問題ないとされている。最終的には各施設での判断が優先されるので、自施設の運用方針を確認し、倫理審査委員会等の承認を受けてから使用するのが望ましい。

Ⅱ. 参考文献

1) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会:定量測定法に関するバリデーション指針,臨床化学,2011;40:149-157

2) 大澤　進:「正確さの評価・管理方法」,臨床検査精度保証教本:57-61,（一社）日本臨床衛生検査技師会,東京,2019

3) 飯塚儀明:「日常検査法導入時における精密さ・正確さの評価方法」,臨床検査精度保証教本:51-66,（一社）日本臨床衛生検査技師会,東京,2019

4) （一社）日本臨床検査自動化学会,日常検査法の性能試験マニュアル Ver1.3, 日本臨床検査自動化学会誌 27(suppl-1),2002

5) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会:バリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver3.5 の操作方法　第 13 版,2017

6) （一社）日本臨床検査自動化学会:臨床化学検査に用いる測定試薬の成り立ちと特徴および適正な使用方法,日本臨床検査自動化学会誌 42(Suppl-1),2017

7) 澤部祐司:「精度管理用プール血清の作製法とその倫理的問題」,検査と技術,2007;35:917-921

ガイドライン作成委員会

作成委員長	吉川実季	（名古屋第二赤十字病院）
作成委員	佐藤文明	（株式会社グッドライフデザイン）
作成委員	森部龍一	（愛知医科大学病院）
作成委員	蜂須賀靖宏	（JA 愛知厚生連　安城更生病院）
作成委員	窄中美帆	（JA 愛知厚生連　豊田厚生病院）
作成委員	伊藤智恵	（JA 愛知厚生連　江南厚生病院）
作成委員	神谷美聡	（医療法人豊田会　刈谷豊田総合病院）
作成委員	小栗美里	（株式会社グッドライフデザイン）
作成委員	井上結以	（藤田医科大学病院）

問い合わせ先

愛知県臨床検査標準化協議会事務局

〒450 - 0002

名古屋市中村区名駅五丁目 16 番 17 号　花車ビル南館 1 階

公益社団法人　愛知県臨床検査技師会　事務所

Tel　052 - 581 – 1013

Fax　052 - 586 - 5680

愛知県臨床検査標準化ガイドライン
「臨床化学検査における試薬検討の基礎知識」
第 1 版

発行　　2021 年 2 月
発行所　愛知県臨床検査標準化協議会
発行者　杉田洋一
編集者　藤田孝・佐野俊一・吉川実季
印刷　　印刷株式会社