

〈特集：臨床検査値、基準値の標準化〉

トレーサビリティ連鎖と不確かさの現状

飯塚 儀明¹⁾、桑 克彦²⁾

Current status of metrological traceability and measurement uncertainty in clinical laboratories

Yoshiaki Iizuka¹⁾ and Katsuhiko Kuwa²⁾

Summary Standardization is the most important issue in laboratory medicine. ISO has established the metrological traceability in laboratory medicine as International Standard 17511. Many countries have studied standardization programs based on ISO 17511. Traceability chains have been constituted for measuring biochemical components in clinical chemistry. It is necessary to apply such uncertainty to routine laboratory results. Uncertainty is secured the hierarchy in traceability chain. A thorough evaluation of uncertainty in routine measurement procedures is needed. It is considered that patients' results will estimate the reliability using uncertainty test results.

Key words: Standardization, Metrological traceability, Measurement uncertainty

I. はじめに

臨床化学分析の特徴は、血液などの多成分系の試料、すなわち、マトリックスを有する試料を、迅速に・精密に・互換性をもって測定することである。ここでいう互換性は、標準化されている測定項目については、設定された基準に対してトレーサビリティを確保することである。

すなわち、標準化は、科学的な根拠を基に測定値の互換性を確保することであり、そのため

には化学分析の合理性に基づいたトレーサビリティの考え方が適用される。そのために臨床検査と体外診断システムに関する国際規格の設定作業が進み、このうち定量測定についての国際規格が設定されている¹⁾。

日常検査値のトレーサビリティの確保の仕方は、精確さを基盤としたトレーサビリティ連鎖により、上位の階層に順じ合わせて行くことである。このことを明確に保証するための手段として用いられるのが不確かさの算出と評価であ

¹⁾つくば臨床検査教育・研究センター、
つくばi-Laboratory
〒305-0005 茨城県つくば市天久保2-1-17
²⁾(独)産業技術総合研究所 計測標準研究部門
〒305-0822 茨城県つくば市刈間1230-503

¹⁾Tsukuba Medical Laboratory of Education and Research,
Tsukuba i-Laboratory,
2-1-17 Amakubo, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0005, Japan
²⁾National Metrology Institute of Japan,
National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology,
1230-503 Karima, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0822, Japan

る。

臨床検査での不確かさの算出プログラムが設定され、各施設において容易に実施できるようになった²⁾。このことにより少なくとも生化学項目の測定については、それらの日常検査値のトレーサビリティが確保できるようになった。しかし、一部の測定項目では、必要とされる不確かさの大きさは満たされていない。

一方、免疫測定項目については、これらの日常検査値の不確かさの算出が一部の項目で可能になった。しかし、トレーサビリティ連鎖の組立が十分でないことなどから、標準化のための作業としては、課題が多い。

本稿では、生化学測定項目と免疫測定項目を例に、不確かさの現状について概説する。

II. トレーサビリティ連鎖

臨床検査における計量学的トレーサビリティの基本は、すでにISO17511で設定されている³⁾。この計量学的トレーサビリティは、材料、校正と値付け、操作法、実施および不確かさのシエマで構成されている。これを基本として、測定項目毎にトレーサビリティ連鎖図を組み立てる。

生体試料の成分は多岐に渡っており、特に生

物活性を有する成分系（蛋白ホルモン、抗原や抗体など）では、高位の校正物質や基準測定操作法が設定しにくい。したがって、このような測定成分については、国際学会や国際機関などで合意した測定操作法や標準品を頂点とする連鎖とし、非SI系として扱う。測定の実態に即して、SI系および非SI系も含めた臨床化学分析用のトレーサビリティ連鎖図の基本形を図1に示した²⁾。

校正物質の最上位は、SI系は純物質、非SI系は世界保健機関（WHO）により設定された国際生物学的標準品（WHO標準品）となる。酵素活性の場合の頂点にくる測定法は国際臨床化学連合（IFCC）勧告法が、次いで日本臨床化学会（JSCC）勧告法である。また、免疫成分の濃度測定系の例としては、WHO標準品やEU圏の標準物質・計量研究所（IRMM）などがIFCCの協力のもとに設定した標準物質がある。なお、IRMMで設定した臨床検査用の標準物質には、ヨーロッパ標準物質（European Reference Materials；ERM）という名称がついている。

実用上の最高位の校正物質はマトリックスを有した実試料標準物質、これを常用参照標準物質（reference standard）という。次いで、下位の校正物質として実用標準物質（working standard）および製造業者製品校正物質（manufacturer's

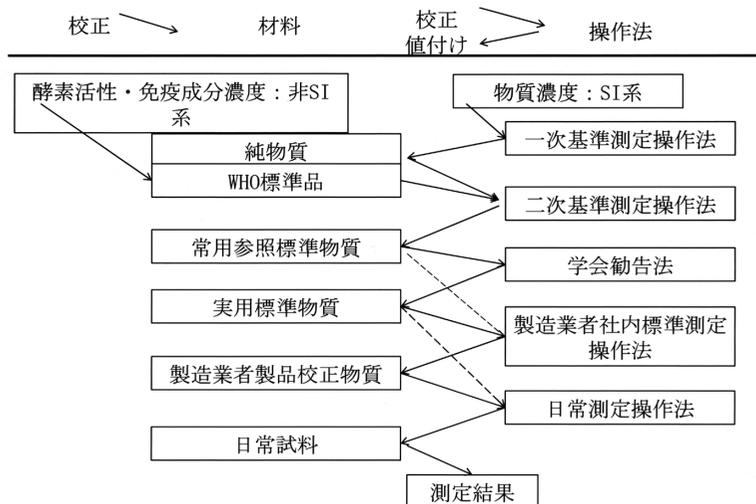


図1 臨床化学分析における計量学的トレーサビリティ連鎖²⁾
破線は精確さの校正、確認や評価に適用

表1 臨床検査用トレーサビリティ連鎖における校正の関係³⁾

カテゴリー	SI単位への トレーサビリティ	基準測定操作法	校正物質	測定項目の例
1	有り	有り	有り	電解質 (Na等) 代謝物 (グルコース等)
2	無し	有り	有り	ヘモグロビン鉄等
3	無し	有り	無し	凝固因子等
4	無し	無し	有り	WHO標準品 (甲状腺ホルモン等)
5	無し	無し	無し	ウイルスの抗体等

product calibrator、キャリブレータという)がある。これに対応した操作法は、高位から順に二次基準測定操作法 (secondary reference measurement procedure)、学会勧告法 (recommended method)、製造業者社内標準測定操作法 (manufacturer's standing measurement procedure)、日常測定操作法 (routine measurement procedure)である。このうち医療現場の検査室などで用いる日常測定操作法は、キャリブレータとセットになって、当該の試薬メーカーが試薬キットとして準備し、国内では薬事法の認可を受ける。また、製造業者社内標準測定操作法はメーカーでの社内基準測定法ではあるが、試薬キットを用いた日常測定操作法が一般的に適用されている。

日常測定操作法はトレーサビリティ連鎖の上で、SI単位へのトレーサビリティ、基準になる測定法および標準物質の有無によって表1のごとく5種のカテゴリーに分類される³⁾。カテゴリー1は、生体試料の定量測定で、測定結果の臨床的使用目的を考慮した生物学的試料中の分析成分が測定対象であり、ヒト試料中の測定対象物に関する基準測定操作法が設定され、測定対象物に関する適した標準物質、例えば、一次校正物質や互換性のあるマトリックスを有した二次校正物質が設定されているものをいう。

しかし、多くの測定項目は製造業者自社推奨測定操作法や製造業者の実用校正物質からはじまる連鎖であることから、トレーサビリティが確保されていない。

校正物質の値付けに用いる基準測定操作法や国際学会による勧告法、純度標準物質、常用参照標準物質などについては、臨床検査医学にお

けるトレーサビリティ合同委員会 (JCTLM) による審査を受けて承認され、登録された操作法や標準物質がBIPMのサイトで公表されている。

Ⅲ. 臨床化学分析用標準物質

臨床化学分析用標準物質は、純度標準物質と組成標準物質に大別される。純度標準物質は主として基準測定操作法の校正に用いて、血清などのマトリックスを有した組成標準物質 (実試料標準物質ともいう) の値付けがされる。臨床化学分析で用いる日常測定操作法は、簡便、迅速を優先させるため試料の精製が不十分でマトリックスの影響を受けやすい。したがって、同様のマトリックスを含む実試料標準物質を用いて校正することが望ましい。実試料標準物質の例を表2に示した³⁾。

臨床化学分析で必須の実試料標準物質として世界で初めて設定されたのがNIST SRM 909であり、化学分析による測定法の校正基準としたものである。電解質、含窒素、脂質成分についての認証値が付与されている。ただし、性状が凍結乾燥であることから、凍結乾燥処理の段階で蛋白が変性していること。また、安定性を維持するための添加剤などが含まれるため、化学分析系以外の、例えば酵素法 (酵素を試薬として用いる測定法) や電極法などには用いることができない³⁾。

イオン電極法 (ISE法) による血液中のNa、KおよびCl濃度の測定のために、わが国で開発された標準物質は、その後の実試料標準物質のモデルになっている。ISE法に用いるために血清の性状を規格化している。また、安定化剤などの

生物試料分析

表2 臨床用実試料標準物質の例：生化学成分³⁾

番号	名称	測定項目	記号	組成・形状
NIST (米国立標準技術研究所)				
1	ヒト血清	Na、K、Cl、Ca、Mg、Li、尿酸、尿酸 クレアチニン、コレステロール、中性脂肪	SRM 909	血清・凍結乾燥
2	ヒト血清	Na、K、Cl、Ca、Mg、Li、イオン化Ca	SRM 956	血清・凍結
3	ヒト血清	グルコース	SRM 965	血清・凍結
4	ヒト血清	クレアチニン	SRM 967	血清・凍結
5	ヒト血清	コレステロール、HDL-C、LDL-C、中性脂肪	SRM 1951	血清・凍結
6	ヒト血清	コレステロール	SRM 1952	血清・凍結乾燥
ReCCS(検査医学標準物質機構)				
7	イオン電極用一次実試料標準物質	Na、K、Cl	JCCRM 111	血清・凍結
8	イオン電極用認証実用標準物質	Na、K、Cl	JCCRM 121	血清・凍結
11	電解質認証標準物質	Na、K、Cl、Ca、Mg	JCCRM 321	血清・凍結
12	電解質標準血清	イオン化Ca		血清
13	Li測定用常用標準物質	Li	JCCRM 323	血清・凍結
14	血清鉄測定用標準血清	血清鉄	JCCRM 322	血清・凍結
15	無機リン測定用常用標準物質	無機リン	JCCRM 324	
16	血液ガス測定用標準物質	pH、pCO ₂ 、pO ₂	JCCRM 621	溶血液・凍結
17	IFCC法HbA1c測定用常用参照標準物質	HbA1c	JCCRM 411	溶血液・凍結
18	HbA1c認証実用標準物質	HbA1c	JCCRM 423	溶血液・凍結
19	総ヘモグロビン測定用認証実用標準物質	Hb	JCCRM 622	溶血液・凍結
20	含窒素・グルコース常用標準物質	尿素窒素、クレアチニン、尿酸、グルコース	JCCRM 521	血清・凍結
21	コレステロール一次実試料標準物質	コレステロール	JCCRM 211	血清・凍結
22	コレステロール・中性脂肪常用標準物質	コレステロール、HDL-C、LDL-C 中性脂肪	JCCRM 223	血清・凍結 血清・凍結
23	脂質測定用常用参照標準物質	HDL-C、LDL-C、中性脂肪	JCCRM 224	
24	尿中成分測定用常用標準物質	Na、K、Cl、Ca、Mg、尿素窒素 尿酸、クレアチニン、無機リン、グルコース	JCCRM U	尿・凍結
JCCLS (日本臨床検査標準化協議会)				
25	常用参照標準物質：常用酵素	AST、ALT、CK、ALP、LD、GGT、AMY	CRM 001	BSA [®] ・凍結
26	常用参照標準物質：ChE	ChE	CRM 002	血清・凍結
IRMM (EU標準物質・計測研究所)				
27	IFCC血漿蛋白国際標準品	ALB、IgG、IgA、IgM、A2M、AAG、 AAT、C3c、C4、HPT、TRF、TTR	ERM-DA470k/IFCC	血清・凍結乾燥
28	IFCC血清CRP国際標準品	CRP	ERM-DA472/IFCC	血清・凍結
NMIJ産業技術総合研究所 計量標準総合センター)				
29	C反応性蛋白溶液	CRP	CRM 6201	蛋白溶液
30	コルチゾール分析用ヒト血清	コルチゾール	CRM 6401	血清・凍結

添加物は用いず、性状は冷凍品としたものである。現在Na、K、Cl測定の日常測定操作法はすべてISE法になっている³⁾。

同様にCa、Mg、尿酸、クレアチニン、尿素窒素、グルコースおよび脂質〔コレステロール、HDLコレステロール (HDL-C)、LDLコレステロール (LDL-C) 及び中性脂肪〕測定用標準物質は、血清の性状を規格化し、安定化剤などの添加物は用いず、形状は冷凍品である。化学分析法以外の酵素的分析法にも用いることができる。なお、HDL-CおよびLDL-C測定は、ホモジ

ニアス (homogeneous) による直接法である³⁾。

赤血球から得たヘモグロビン液をベースとした標準物質としてHbA1c測定用と血液ガス測定用がある。HbA1c測定の最高位の標準物質は、ヒト赤血球からヘモグロビンβ鎖のN末端が糖化してないもの (HbA₀) と糖化したもの (HbA_{1c}) をそれぞれ精製した純物質である。この純物質とIFCCが定めたペプチドマッピング法により、実試料標準物質の認証値が付与される。実試料標準物質の値付けのための測定操作法は順に、常用参照標準物質に対してはIFCC法、実

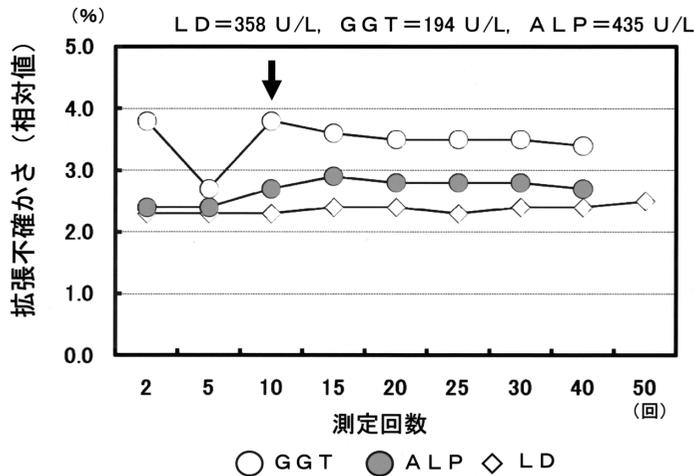


図2 拡張不確かさ算出時の測定回数による変化の例

用標準物質に対しては、日本糖尿病学会 (JSCC/JDS) 指定比較対照法 (DCM) である。これに続いてメーカーの製造業者社内標準測定操作法および日常測定操作法となる。なお、日常測定操作法はHPLC法、免疫法、酵素法などである³⁾。

血液ガス (pH、pO₂、pCO₂) 測定は、救命救急検査では最重要測定項目であるが、1992年に開発されるまで実試料標準物質がなかった。血液ガス測定用の実試料標準物質は、溶血液の性状は規格化されている。この溶血液をトノメトリした後アンプルに封入してから凍結される。使用時には25℃で融解し、指定の回数を振とうして気液平衡処理をした後、測定装置のサンプルノズルに自動吸引させる。これは世界で初めて開発された血液ガス測定用実用標準物質である。ただし、ヘモグロビン液であることから、ベッドサイドでの検査装置であるPOCT (Point-of-Care Testing) 用測定装置では使用できない。そのためPOCT用には、赤血球をベースにし、そのまま冷蔵した実用標準物質を必要に応じて作製して用いられることが多い³⁾。

酵素成分測定用の標準物質は、ChE (Cholinesterase) のみが血清の性状を規格化している。その他の項目はウシ血清アルブミン (BSA) をベースとして粘度などの物性を規格化し、この血清に添加酵素として主としてヒト型酵素遺伝子のリコンビナント (ヒト組換え体)

を用いた擬似標準物質である。値付けはJSCC勧告法で国内共同実験によっている³⁾。

日常検査法での不確かさの算出には、表2の番号11、13~30が主に用いられる。

IV. 測定の不確かさ

測定の不確かさ算出の現状として、1) 臨床化学成分における日常検査項目の不確かさ、2) 免疫項目における不確かさの算出例を以下に示した。

1. 日常検査項目での算出例

臨床化学成分における日常検査項目を対象として、測定の不確かさを算出した結果例を以下に示した⁴⁾。

- 1) 検討方法：(1) 実施項目は、日常検査で実施している酵素活性系6項目、濃度系11項目の計17項目とした。(2) 不確かさの成分は、①検量物質の不確かさ：試薬メーカーから提供された検量物質の不確かさの大きさをそのまま用いた。②測定操作の不確かさ：3濃度の自製ヒト・ブール血清 (低濃度、中濃度、高濃度) を各2バイアル、毎日、午前と午後にそれぞれ1回、独立して15日間測定した。(3) 不確かさの算出：(2)の結果を用いて、日常検査値の不確かさの推定ソフト (ver.5.52)³⁾を用いて、拡張不確かさ (k=2) の大きさをそれぞれ算出した。

2) 測定結果：検量による標準不確かさの成分を算出する際の検量物質（キャリブレータ）の測定回数と拡張不確かさの大きさの関係を図2に示した。10回以上の測定において拡張不確かさの大きさが安定することが確認できた。また、測定日数と拡張不確かさの大きさの関係を図3に示した。測定回数が10回以上で拡張不確かさ

の大きさが安定することが確認できた。

濃度別による拡張不確かさの関係を図4に示した。濃度により拡張不確かさの相対値の大きさが変動することが確認された。したがって、共通に拡張不確かさの大きさを評価するためには、濃度域を、たとえば基準範囲下限、基準範囲上限、基準範囲の2倍付近の3濃度とするなど、一定の濃度域を規定する必要がある。同様

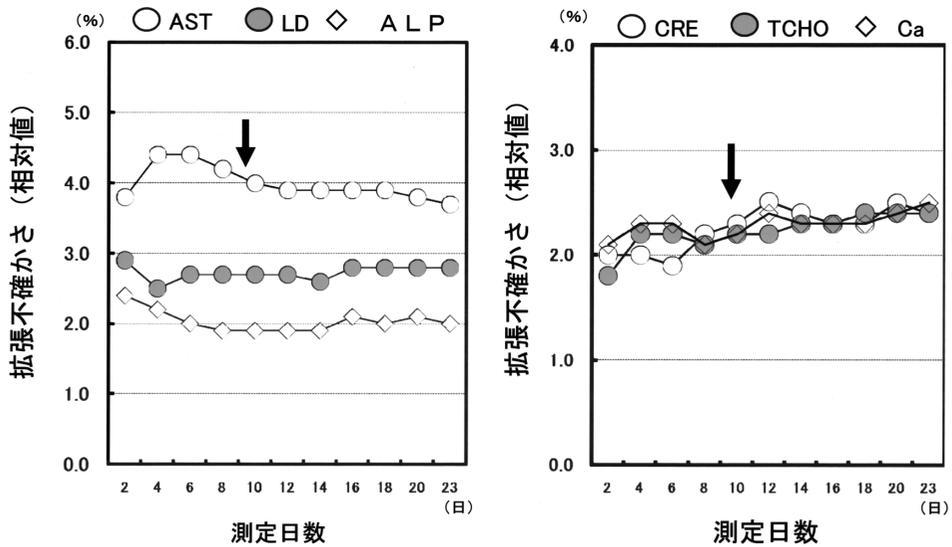


図3 拡張不確かさ算出時の測定日数による変化の例

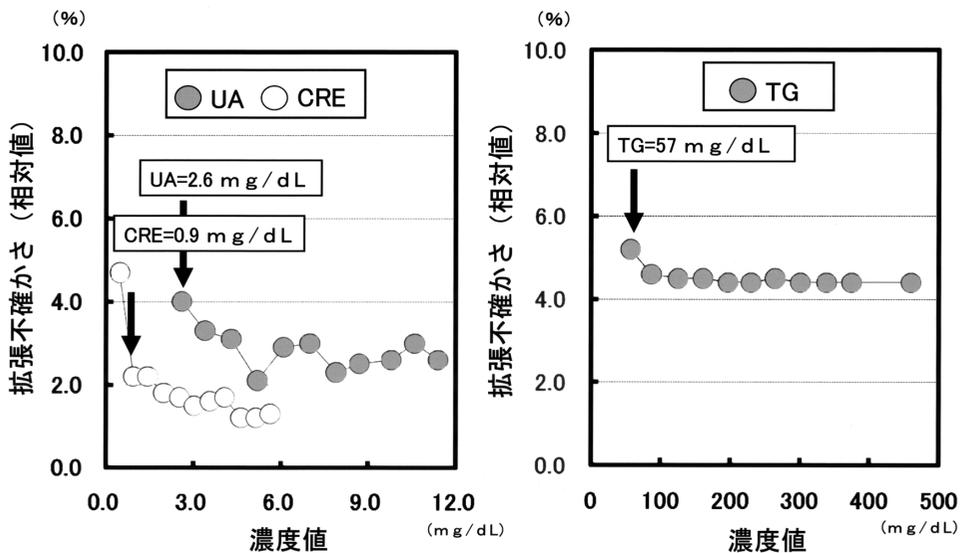


図4 濃度値別の拡張不確かさの例

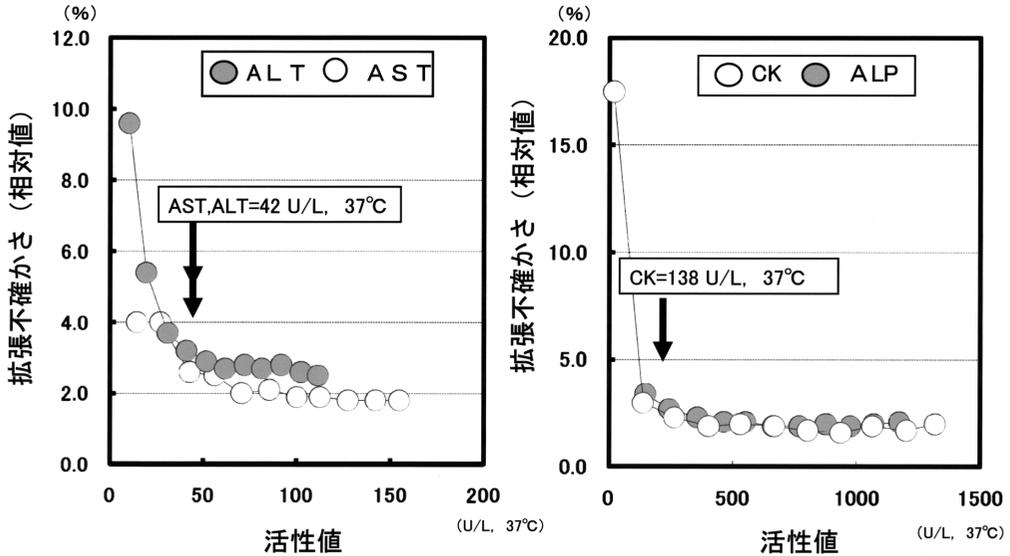


図5 活性値別の拡張不確かさの例

に活性値別による拡張不確かさの関係を図5に示した。活性測定においても濃度測定と同様に複数の活性濃度毎に拡張不確かさを算出することが必要である。

なお、上記の拡張不確かさには、その算出要因に測定装置の性能も含まれる。例えば、汎用分析装置における不確かさの大きさについて、分析装置における不確かさの主な成分は、①サンプリング機構、②試薬機構、③光度計、④反応容器、⑤攪拌、⑥恒温槽内温度などが挙げられる⁶⁾。このうち、特に分析装置の不確かさに影響を与える因子は、Kファクターを算出するための成分、すなわち、サンプリング分注精度(S)、試薬分注精度(R)および光度計のノイズ(Q)であることが推定される⁷⁾。

2. 免疫項目における測定の不確かさの算出例

日常検査法による免疫血清項目を対象として、測定の不確かさの大きさを算出した結果例を以下に示した⁸⁾。

1) 検討方法：(1) 実施項目と分析装置：日常検査で実施している9項目の免疫血清検査を対象にした。なお、分析装置は生化学・免疫検査測定装置モジュラーアナリティクス<E-モジュール>(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)を用いた。(2) キャリブレーションの不確かさ：キャ

リブレーションの標準不確かさは、低濃度域用キャリブレーションの拡張不確かさ(Cal-1)、低および高濃度域用キャリブレーションの拡張不確かさの平均値(MEAN)、および高濃度域用キャリブレーションの拡張不確かさ(Cal-2)のそれぞれから包含係数(k=2)で除した値{(Cal-1/2)、(MEAN/2)、(Cal-2/2)}。(3) 拡張不確かさの算出方法：免疫血清項目における拡張不確かさの大きさは、JCCLSによる校正による成分を別に求める日常検査値の不確かさの推定ソフト(ver.5.52)⁹⁾を用いて、拡張不確かさの大きさをそれぞれ算出した。

2) 測定結果：得られた結果の一部を図6～8にそれぞれ示した。その結果、3濃度域(低、中、高濃度域)のヒト・プール血清を作製して、拡張不確かさの大きさを比較した結果、濃度域ごとに拡張不確かさの相対値の大きさが異なることが確認された。

次に、日常検査法による免疫血清項目の多くは、多点の検量物質を用いている。そこで、多点の検量物質のうち、どの濃度域による検量物質の標準不確かさの大きさを、拡張不確かさの算出に用いるかにより、日常検査法による拡張不確かさの大きさが異なることが確認できた。

生物試料分析

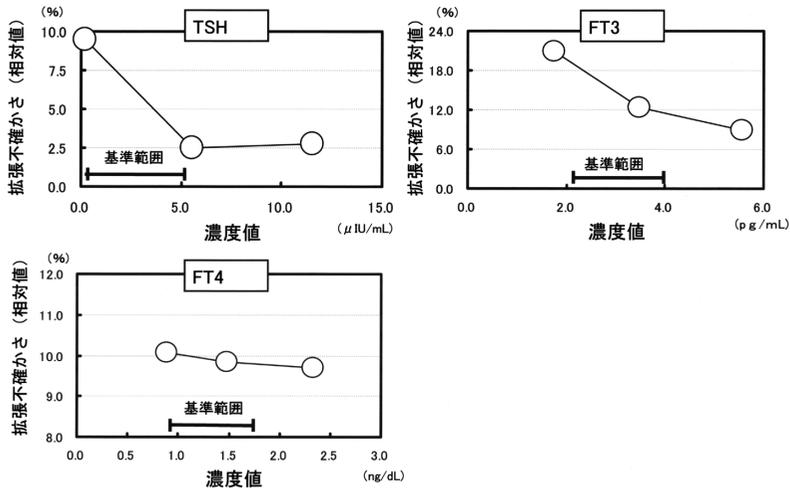


図6 免疫測定項目の拡張不確かさの例 (その1)

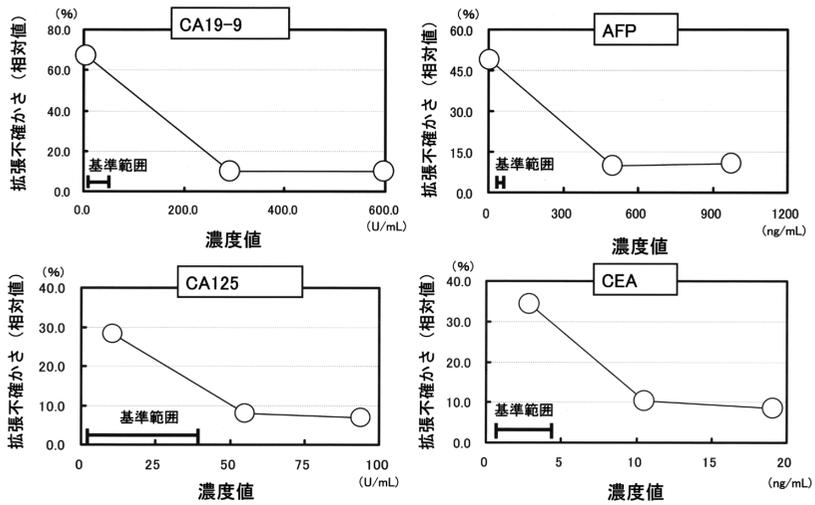


図7 免疫測定項目の拡張不確かさの例 (その2)

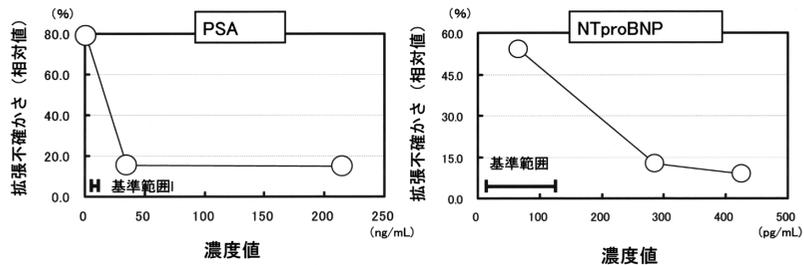


図8 免疫測定項目の拡張不確かさの例 (その3)

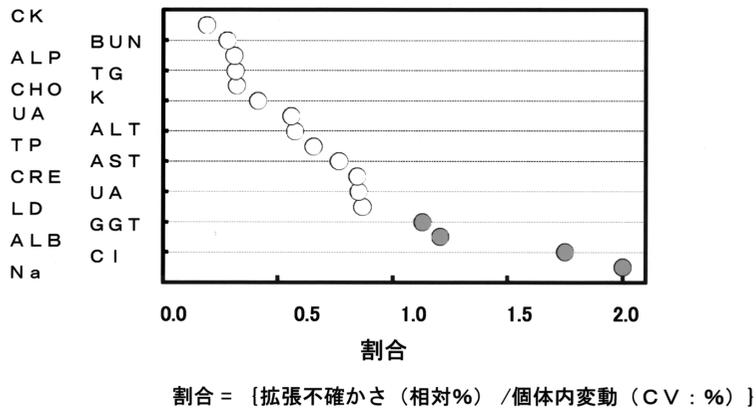


図9 拡張不確かさと個体内変動の比の例

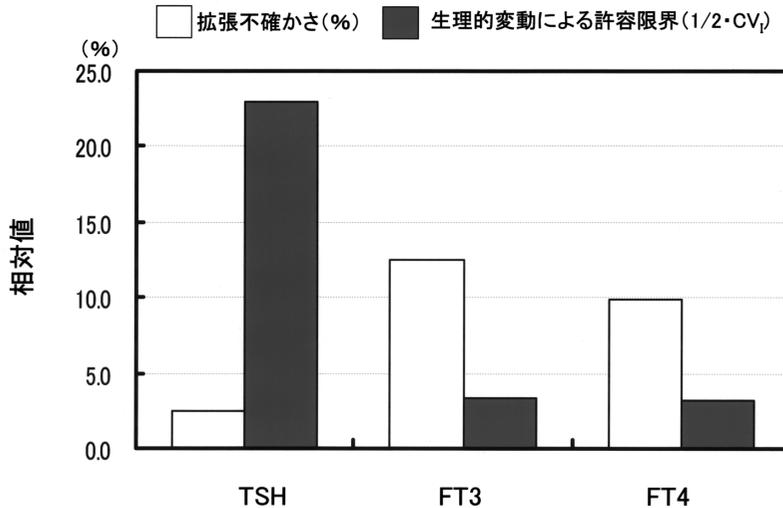


図10 拡張不確かさと個体内生理的変動幅の比較

V. 不確かさと個体内変動

このようにして求めた日常検査法による生化学検査項目の拡張不確かさの大きさの許容限界について、暫定的に個体内生理的変動のCV (%)の大きさを許容限界とし、拡張不確かさの相対 (%)の大きさを比較した結果を図9に示した。多くの項目が許容限界を満たしていた。しかし、電解質など一部の項目では許容限界を超える結果であった。

また、免疫血清検査項目における拡張不確かさの大きさの許容限界については、未だ明確な

指針は出ていないが、暫定的に個人の個体内生理的変動のCV (%)の大きさを許容限界とし、拡張不確かさの相対値の大きさと比較した結果では、許容限界を満たす項目と許容限界を超えた項目が確認された⁸⁾。さらに、甲状腺項目のように、体内のネガティブフィードバック機構により変動が調整されているFT3、FT4などでは、生理的変動幅が小さくなり、TSHは、この調整機能のため変動幅が大きくなった (図10)。このような場合、免疫血清項目における拡張不確かさの大きさが評価対象として、個人の個体内生理的変動の大きさを適用できる否かの検討も

必要である。

VI. まとめ

臨床検査値の標準化は、基準の測定法による測定値に合わせることであり、血清標準物質を用いて精確さを確認するか、日常検査値を校正して初めて精確さが確保された測定値となり得る。そのためには、各測定項目における計量学的トレーサビリティ連鎖と校正の階層段階を理解した上で、日常検査項目における測定の不確かさを算出し、その大きさを個々の患者検体の測定値に適用しておくことが必要である。

文献

- 1) ISO 17511:2003. 体外診断用医薬品・医療機器-生物試料の定量測定-校正物質と管理物質の表示値の計量学的トレーサビリティ-, (財)日本規格協会
- 2) 桑 克彦, 梅本雅夫: 実試料標準物質の概要 -生化学検査系-. 臨床化学, 38: 389-400, 2009.
- 3) 桑 克彦: 臨床化学分析用標準物質. ぶんせき, 12: 665-666, 2010.
- 4) 飯塚儀明, 澤畑辰男, 他: 自動分析装置を用いた日常検査法の不確かさの算出方法に関する研究, 日本臨床検査自動化学会, 32: 19-25, 2007.
- 5) 不確かさ計算ソフト日本臨床検査標準協議会 (JCCLS) のホームページ URL: <http://www.jccls.org> 日本適合性認定協会 (JAB) のホームページ URL: <http://www.jab.or.jp>
- 6) 関口光夫: 臨床化学自動分析装置の基礎特性に基づいた精密度の見積り. 日本臨床検査自動化学会会誌, 32: 3-11, 2007.
- 7) 飯塚儀明, 桑 克彦, 他: 測定装置情報を用いた不確かさの推定. 日本臨床検査自動化学会, 34: 174-179, 2009.
- 8) 飯塚儀明, 石島道邦, 他: 日常検査における免疫血清項目での不確かさの算出. 日本臨床検査自動化学会会誌, 36: 68-73, 2011.