

〈特集：検査技術の新たな展望（1）〉

日常検査におけるバリデサポート試薬の有用性

長尾 健次

The usefulness of validation support reagent in a routine test

Kenji Nagao

Summary In a clinical test, validation is indispensable in order to guarantee the reliability of measurement values and the most fundamental point to be checked.

A "Guideline for the validation of quantitative measurement methods" was published by the Committee on Quality Management Japan Society of Clinical Chemistry in April, 2011. After this, the validation data for every principle were taken according to the guideline, and these data, 21 items (22 products), were published in booklet for on as the "Validation Result Report." Moreover, these reagents with which validation was performed were named "Validation-Support Reagents" in order to clarify its values. The reliability assurance of measurement values has been realized with these reagents.

Key words: Validation, Verification, Guarantee, Robustness

I. はじめに

臨床検査データの精度保証や国際的な標準化を進めるためには、検査室で使用している測定法のバリデーションを確認し、明確化する必要があると言われている。ISO15189「臨床検査室—品質と能力に関する特定要求事項」¹⁾の認定プログラムにおいても測定法のバリデーションは、重要な位置を占めている。

バリデーションとは、具体的には「客観的証拠を提示することによって、特定の意図する用途又は適用に関する要求事項が満たされている

ことを確認する^{2,3)}。」となっている。臨床検査で用いる測定システム（自動分析装置、試薬）が、意図した用途に合致し、測定する要求事項を満足する信頼性の高い結果が得られることが保証されている必要がある。その妥当性を客観的な根拠を示し確認するのがバリデーションの目的としている。臨床に役立つ客観的医療情報の提供を目的とする臨床検査において、測定値の信頼性を保証することは、もっとも基本的で重要な事項である。

したがって、臨床検査で用いる測定法が、日常検査に適用できる性能を有しているかどうか

和光純薬工業株式会社 臨床検査薬営業本部 学術部
〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Technical Service Department Diagnostics Sales
Operations
1-2 Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka 540-8605,
Japan



図1 バリデーション結果報告書

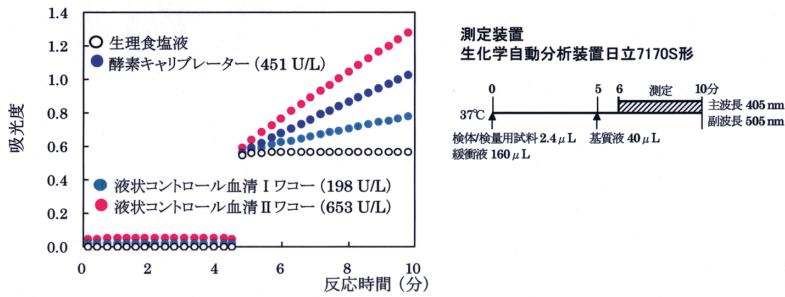


図2 LタイプワコーALP・J2の反応タイムコース

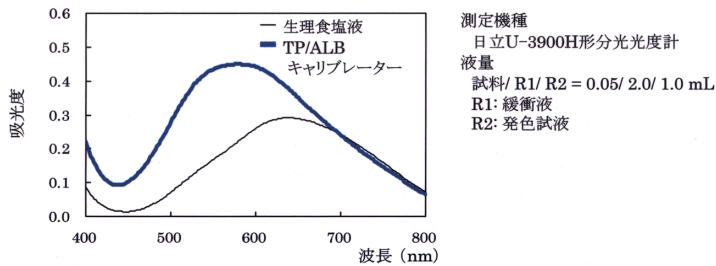


図3 LタイプワコーTPの吸収曲線

の判断にバリデーションデータが必要となっている。

そこで我々としてはバリデーションの意味する重要性を理解した上で、日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会から「定量測定法に関するバリデーション指針」⁴⁾が発行されたのを機に、測定法（項目）ごとに指針の特性項

目（表1）に準じてバリデーションデータを取り、「バリデーション結果報告書」（図1）を21項目（22製品）冊子にした。また、バリデーションを行った試薬の位置付けを明確にするために「バリデサポート試薬」として展開をしている。

検査室が具体的にどのような内容で確認する

表1 バリデーション特性と適応範囲および評価法⁴⁾

バリデーション特性	メーカーの場合	ユーザーの場合	測定手順を変更した場合
特異性、選択性	+	-	+
真度、正確さ	+	+	+
併行精度	+	+	+
室内再現精度	+	+	+
室間再現精度	-+*	-+*	-+*
検出限界	-+**	-+**	-+**
定量限界	+	+	+
直线性	+	+	+
範囲	+	-	+
頑健性	-+***	-+***	-+***
トレーサビリティ、不確かさ	+	+	+

+: 通常実施すべき項目、 -: 通常実施しない項目
 *: 室間共同試験による
 **: 測定対象が微量な場合は実施
 ***: 規定した測定条件で実施可能な場合

のかは指針にも明記されているが、検査室ではメーカーが行うバリデーションをすべて実施するのではなく、バリデーションを行った試薬を用いて必要な特性項目のみ検証（ベリフィケーション）を行うことになる。現在使用されている自動分析装置、試薬がメーカーの提示したバリデーションデータ性能を満たされているかを確認し、もし問題があるようであれば改善することになる。

今回、我々が実際にバリデーションを行ったデータが、日常検査の現場にどのように有用であるかを報告する。

II. バリデーション結果報告書

バリデーション結果報告書の基本は、「定量測定法に関するバリデーション指針」に準じて測定を行った結果のデータ集である。ただ、検査室でベリフィケーションを行い問題が見つかった場合に、対応する情報として測定原理、反応タイムコース、吸収曲線、クロスコンタミネーションなども追記している。また、過去に日常検査で遭遇した事例なども情報として合わせて明記している項目もあるので、参考にしていただきたい。試薬の基本的な測定原理、性能、特性などもバリデーション結果報告書から情報を得ることができ、トラブルがあった場合にはスムーズな対応に役立つと考えている。

たとえば、異常な検体が発生した場合に、反応タイムコースを装置の画面で見るとしても正

常な反応タイムコース（図2）のパターンを知っていなければ異常の判断がつかない。反応タイムコースの挙動が要因解析に重要な情報となる。一般的にはミエローマ検体などの非特異的な濁りがある場合には第一反応で異常が見られ、また自動分析装置の廃液吸上ノズルの不具合でポタ落ちがあれば、O.Dが途中で乱れたりする。攪拌能力が弱くなると直線的な反応にならず曲がった反応を示すなどの異常な挙動を反応タイムコースで確認をすることができる。

吸収曲線はどのような色で発色をしているか、また発色感度がどれくらいあるかを知ることができる。たとえば、TP測定試薬のようにビウレット溶液の青色が血清蛋白と反応して赤紫色になる。これらも吸収曲線から確認ができるので、目視で反応の有無を確認する場合には有用な情報となる。（図3）

III. 特異性、選択性

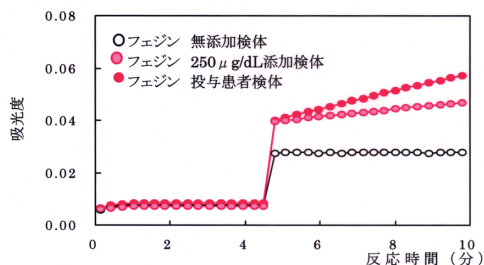
バリデーション特性で特異性、選択性がある。これは患者検体に共存する可能性のある物質、あるいは反応系に影響を与える可能性のある干渉物質の影響を確認することを言う。一般的にはビリルビン、乳び、溶血、抗凝固剤、薬物などがある^{5,6)}。これらの影響度合いを事前に知っておく必要があり、特に薬物が反応系に影響を与え異常な結果となる場合があるので重要である。また試薬メーカーなどを変更した場合には、同じ測定原理であっても影響度合いが違ったり

するので、試薬の特性を十分に把握する必要があります。

1) 血清Fe測定によるフェジン（一般名：含糖酸化鉄）の影響

鉄欠乏性貧血治療薬剤であるフェジンは、鉄欠乏性貧血患者に静脈内投与すると血清Feが急激に上昇するが、短時間内にその大部分が組織中へ移行し、数時間で正常値に下降する。した

がって、静脈内投与直後に採血し、血清Feの測定を行った場合、フェジン中の鉄が血清Fe値として測り込まれる可能性がある。そこで、Lタイプワコー Fe・N（バンフェナントロリン法）を用いて血清にフェジンを添加して測定値の影響を確認したところ、血清Feとは同じ反応は示さないが測定値は高くなった。その場合には正常な反応タイムコースとは違った反応を示すので、血清Feでは特に薬物の影響を疑うことができる（図4）。



測定機種：日立7170S形自動分析装置

添加物質	添加濃度	測定値 (μg/dL)
無添加	—	130
フェジン	25 μg/dL	145
	250 μg/dL	241

血清中へフェジンを添加し影響を確認したもので、投薬による影響を確認したものではありません。

図4 Lタイプワコー Fe・Nによるフェジンの影響

2) AMY測定法の違いによるアカルボースの影響

アカルボースは糖尿病の食後過血糖改善剤でα-グルコシダーゼやα-アミラーゼの阻害剤として働く。AMYの測定法は現在JSCC標準化対応法が主流を占めているが、用いられている基質は多種多様である。そのために共役酵素（特にα-グルコシダーゼ）の含有量も違っている。アカルボースが共役酵素へ阻害するが、測定に用いている基質、α-グルコシダーゼの添加量が違うために影響度合いが異なることになる。下記に2種類の基質の測定法に対する影響を確認したデータを示す。（表2）ともに影響を受けるが測定法によっては影響度合いが異なるので、事前に把握しておく必要がある。

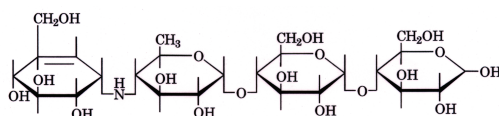
表2 AMY測定法の違いによるアカルボースの影響

添加物質	添加濃度	測定値 (U/L)	
		BG5PNP基質法	EtG7基質法 (*)
無添加	—	70	70
アカルボース (※)	1.0 mg/dL	67	44
	2.0 mg/dL	63	3
	3.0 mg/dL	62	1
	4.0 mg/dL	60	1
	5.0 mg/dL	59	0
	10.0 mg/dL	36	0

血清中アカルボースを添加し影響を確認したもので、投薬による影響を確認したものではありません。

(*) : 4,6エチリデン-G7-pNP基質法

(※) : アカルボース (acarbose) は、糖尿病の食後過血糖改善剤として用いられ、日本ではグルコバイという商品名で販売されている。



IV. 頑健性

バリデーション指針の特性項目に聞き慣れない「頑健性」がある。頑健性とは「測定法の条件が小さい範囲で故意に変動させた時、測定値が影響を受けにくい能力のことであり、通常の状態における測定法の信頼性の指標となる」⁴⁾と

なっている。これは、試薬が何らかの要因で影響を受けたとしてもどこまで耐えうる能力があるかとなる。たとえば試薬の開栓後の安定性などがそれに相当する。試薬が空気に触れることで成分の変化が起こることも考えられるので、実際にデータを取り事前に把握する必要がある。中でもアルカリ性の緩衝液を使用している試薬

表3 頑健性：Lタイプワコー ALB・BCP（2）のpHの影響

対照	No.	R1 pH	R2 pH	各試薬でキャリブレーション			製品のキャリブレーションを 基準にして		
				試料1	試料2	試料3	試料1	試料2	試料3
	1	5.5	5.5	1.02	4.46	7.48	0.92	4.01	6.72
	2	5.5	5.6	1.02	4.45	7.47	0.95	4.16	6.99
	3	5.5	5.7	1.02	4.42	7.42	0.98	4.26	7.16
	4	5.6	5.5	1.02	4.42	7.42	0.99	4.29	7.21
○	5	5.6	5.6	1.00	4.47	7.43	1.00	4.47	7.43
	6	5.6	5.7	1.02	4.44	7.46	1.05	4.56	7.66
	7	5.7	5.5	1.02	4.44	7.43	1.05	4.56	7.63
	8	5.7	5.6	1.02	4.47	7.41	1.08	4.75	7.88
	9	5.7	5.7	1.02	4.42	7.43	1.11	4.81	8.09

表4 自動分析装置別バリデーションデータ一覧（Lタイプワコー CRE・M）

		日立 7170S	東芝 c16000	日本電子 BM6050	ベックマン・ コールター	
測定条件	測定波長	主波長 (nm)	600	604	596	600
		副波長 (nm)	700	700	694	700
	検体 (μL)		5.0	3.0	10.0 (希釈*1)	6.0
	酵素発色液A (μL)		150	110	60	180
	酵素発色液B (μL)		50	37	20	60
校正	試薬盲検		0.0023	0.0030	0.0027	0.0030
	標準感度 (*2)		0.0696	0.0546	0.0610	0.0692
併行精度	試料1 (n=5)	Mean	0.80	0.81	0.80	0.80
		Range	0.04	0.02	0.03	0.00
		SD	0.015	0.009	0.011	0.000
		CV	1.9%	1.1%	1.4%	0.0%
	試料2 (n=5)	Mean	7.33	7.53	7.39	7.32
		Range	0.09	0.07	0.12	0.08
		SD	0.039	0.028	0.056	0.031
		CV	0.5%	0.4%	0.8%	0.4%
	試料3 (n=5)	Mean	92.02	96.27	94.61	94.50
		Range	2.03	0.93	0.37	1.22
		SD	0.772	0.368	0.157	0.463
		CV	0.8%	0.4%	0.2%	0.5%
検出限界・ 定量限界	ブランク上限 (LoB)		0.022	0.019	0.018	0.017
	検出限界 (LoD)		0.044	0.029	0.031	0.029
	定量限界 (LoQ)		0.291	0.205	0.212	0.162
直線性		いずれの分析装置でもCRE 100 mg/dlまで、直線性が確認されました。				
血清実例	検体数		25	25	25	25
	Mean		2.67	2.66	2.68	2.67
	H7170S との 相関性	傾き (a)	—	1.001	1.006	0.993
	切片 (b)	—	—	-0.01	-0.01	0.01
	相関係数 (r)	—	—	1.000	1.000	1.000
	Syα	—	—	0.1	0.0	0.0

(*1) : 標準希釈 (5倍)

(*2) : CRE 5.0 mg/dlアタリ (O.D.)

ではpHが変動するので、運用する手順を考えなければならない。代表的な項目ではALPがよく知られている。

試薬自体が変化する場合もあるが、自動分析装置の不具合で試薬に変化を与え測定値が変動することがある。不具合の箇所、程度にもよるがすべての項目が影響を受けることはない。使用試薬がどのような不具合で影響を受けやすいかなども事前に知っているだけで対策が取りやすくなる。たとえば、反応セル洗浄の機能が低下した状態での測定値のばらつきは、反応セルに残ったアルカリ性洗剤が影響したりする。その場合にはpH変動によって影響を受ける項目を絞ることができる。

このように自動分析装置を用いて測定する限り、不具合で起こる測定値の変動をキャッチして改善に努めなければ測定値の信頼性の保証に繋がらない。そのためにも頑健性は重要な特性項目と考える。頑健性は基本的にはメーカーが行うことになるが、日常検査で気になる場合は検査室でも確認をする必要がある。

1) ALB測定試薬のpHが変動した場合

ALB測定に用いているBCP（プロモクレゾールパープル）はpH5.2～6.8にかけて変色するpH指示薬であり、pHの変化を利用して測定する原理になっている。反応液中にpHを変動する成分が混入した場合には測定値が変動することになる。事前にどれくらいのpH変動で測定値が影響を受けるのかを把握していれば、ALB値が異常になった場合にはpH変動による要因が示唆されたと判断することになる（表3）。

2) 自動分析装置別バリデーションデータ一覧

現在、生化学自動分析装置は多数の機種があり、それらの機種の測定値が日常検査に適用できる性能を有しているかの検証が必要となる。ただ、全ての機種に対するバリデーションはできないので、国内主要機器メーカーの機種で我々が所有している4機種（日立7170S形、東芝c-16000形、日本電子BM-6050形、ベックマン・コールターAU640形）を用いてバリデーションを行っている。検査室で行ったバリフィケーション結果を検証するためには、使用自動分析装置のメーカーとの比較で確認をすることに

なる（表4）。

V. まとめ

臨床検査における検査データの信頼性を保証するためには、バリデーションは重要な位置を占めている。そのためにも、検査室が実際にどれだけ、日常検査に適用できる性能を有している測定値を報告しているかを検証する必要がある。我々試薬メーカーは研究用に自動分析装置を所有しており、各装置の仕様特性に合わせて試薬開発を行っているが、同一の自動分析装置、試薬を用いたとしても検査室と同じ結果が得られないことが少なくない。それは検査室が施設の規模などによって処理検体数、測定項目、試薬メーカーまた自動分析装置の使用年数、メンテナンス状況、試薬の使用頻度などによって使用している環境がさまざまである。その環境を踏まえてのバリフィケーションを行うことになるので、メーカーが行ったバリデーションデータ性能が発揮されない可能性もある。その場合には改善をしなければならないこともある。そのためにも「バリデーションデータ結果報告書」は改善を進める糸口になり、本来あるべきデータ性能の基本情報と頑健性データや反応タイムコースなどが効果を発揮すると確信をしている。今後ともバリデーションを行った試薬としての位置付けた「バリサポート試薬」は、「バリデーション結果報告書」とともに日常検査における測定値の信頼性を保証するために役立つツールと考えている。

参考文献

- 1) ISO 15189: 2007. Medical laboratories - Particular requirements for quality and competence.
- 2) ISO 9000: 2000. Quality management system - Fundamentals and vocabulary.
- 3) JIS Q2000: 2000. 品質マネジメントシステム - 基本及び用語.
- 4) 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, 40: 149-157, 2011.
- 5) 細萱茂実: 臨床検査の標準化・精度管理・基準値. 臨床検査法提要 改訂第33版, 金原出版, 1-30, 2010.
- 6) NCCLS EP7-A: Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline, 2002