

〈資料：分析機器・試薬アナリスト認定講座（その12）〉

精度管理の基礎

—標準物質・管理試料の選択と監視法の構築—

小川 善資、沼上 清彦

1. はじめに

検査室の経済的環境の変化から、精度管理に対する考え方が大きく変化しています。しかし、精度管理が「正確度の高い、しかも再現性の高い測定値を迅速に報告しなければならない」使命に代わりはありません。測定で生じた誤差によって診断や治療に誤りを起こさせたとすれば、取り返しがつきません。いかなる事情があったとしても、誤りの無い測定値を報告し続けなければなりません。では、精度管理をどの様に変更させて行くべきなのでしょう、また、何を変わらずに守っていくべきなのでしょう。今一度原点に立ち返り、精度管理のあるべき姿を考え直してみたいと思います。

2. 標準物質、管理試料の選択と測定

かつて、管理試料を検体10検毎に測定する施設が多かったと思います。理由は測定に異常が発生した場合、どこまでのデータを使えるか、使えないかを明確にするためでした。しかし、現状の分析装置で頻繁にトラブルが発生することはありません。このため、そんなに多く管理試料を測定する必要がなくなっています。このシリーズでも、「 \bar{x} -R管理図にて試薬異常は発見できません。」と記述しましたので、ますます、管理試料を測定しなくても良いという誤解を与えているのかもしれない。精度管理には、何を目的に、何を測定すべきかを改めて考えてみましょう。

1) 標準物質の測定

分析の基本は、試薬ブランク、標準物質及び管理試料をまず測定し、分析システムに異常が無いことを確認後、検体の測定を開始することです。よって、①精製水、②標準物質、③管理試料の3種をまず最初に測定すべきです。このことを踏まえた上で、標準物質測定の必要性について考えましょう。

(1) 標準物質測定はなぜ必要か

相対分析（標準物質と検体の測定を同時に行い、両者の比例関係から測定値を導く方法）では、標準物質の表示値に基づいて測定値の値付けがなされます。したがって、標準物質の測定を行わなければ測定値の算出ができません。でも、実際問題として、標準物質の測定が必要なのでしょう。

理論的な問題はさておき、経済的に追い詰められた環境下で、本当に何が必要なかを考え直す必要があります。標準物質と管理試料の測定値を利用できる見込みがないのなら、中止すべきです。それとも、1週間に一度、いや、1ヶ月に一度で良いのかも考えましょう。

標準物質の測定結果から、「キャリブレーションを毎日行なった方が再現性が良いのか、行わない方が良いのか」を観察しました。実は、キャリブレーションを毎日行わない方が再現性が良かったのです。実験事実を見た時、しばし呆然としました。しかし、よく考えると当然のことなのです。標準物質を測定する時も、管理試料を測定する時も、同じバラツキがついて回ります。キャリブレ

生物試料分析科学会 理事長

〒194-0042 東京都町田市東玉川学園1-9-19

ーションを実施すると、管理試料測定バラツキは標準物質測定バラツキ+管理試料測定バラツキになります。これに対して、キャリブレーションを行わなければ、管理試料のバラツキだけで済むので、当然小さくなるのです。

「心を込めて標準物質の測定を行い、キャリブレーションすれば、それ以降、キャリブレーションは行わない」ということになります。果たしてこれで良いのでしょうか。標準物質を測定するのはキャリブレーションを行うだけの目的なのでしょうか。それだけではないのです。それ以外に、正確な分析が実施されているかを知るために標準物質の測定は必要なのです。標準物質中に測定物質がどれだけ入っているかは当然分かっています。これを反応させれば「どれだけ吸光度変化が生じるか、または、どれだけ反応速度を得られるか」は理論的に演算できます。理論値と実験値が一致することは試薬にも、分析機器にも異常が発生していないことを証明してくれているからです。標準物質を測定し、理論的变化量±許容誤差の内側に入っているかをチェックすることで、試薬も、装置も、一定の基準内の精度を保ち、正しく測定していることが分かるからです。

(2) 標準物質の選択

最近、とても気になることがあります。検査技師の皆さんの標準物質の取り扱いがとても雑であることです。分析の正確度を決定付けているのが標準物質で、標準物質に異変が発生すれば、簡単に正確度は崩壊するのです。ところが、標準物質の容器に直接ピペットを入れる方がとても多いことです。また、標準物質の入られた容器の蓋を開けたままに放置している方が多いことです。もう30年も前の話ですが、グルコース標準液の容器の蓋をせずに放置すると、分単位で確実に変化しました。現在のように精度の高い装置を用いている場合だからこそ、確実に対応すべきです。標準物質は分析者の魂です。どうか大切に扱って下さい。扱っているとしても、再確認して下さい。

さて、標準物質の資質として何が最も重要なのでしょうか。

- ①価格
- ②表示値の正確性
- ③安定性
- ④多項目の表示値
- ⑤酵素の場合、ヒト酵素との類似性
- ⑥キャリブレーションを実施し易い濃度設定

これら全てが重要で、どれもおろそかにできない問題です。しかし、おのずと重要性に差があるのではないのでしょうか。

私が考える一番重要なものは安定性です。測定するたびに、測定値が変化すれば、何をよりどころに正確度を支えれば良いのか、分からなくなるからです。かつては一項目毎に標準物質が作られ、利用されていましたが、汎用自動分析装置の使用から、多項目にわたる標準物質を個別に測定できるほど時間的余裕がなくなりました。そこで、血清のように、全ての項目を網羅できる標準物質が必要になりました。その結果、血清に近い物質が利用されるようになりました。そこで問題になるのが安定性です。一般的な血清中には様々な物質が共存しています。中には互いに安定性を劣化させる関係になる組み合わせもあるからです。少なくともこの問題を明確にし、安定性の確保について考えなくてはなりません。具体的にはアルカリ性ホスファターゼ (ALP) とリポプロテイン、クレアチンキナーゼ (CK) と尿酸など、共存させない方がよい組み合わせがあります。このことをよく知った上で、標準物質を選択して下さい。具体的には検査項目毎の項で記述します。

〈提言〉

1. 標準物質は毎日測定すべきです。結果は吸光度変化量もしくは反応速度で見て、許容範囲内に入っているかをチェックすることにより、一定の正確度が保持できているかを知るためです。
2. 許容範囲内の結果であれば、キャリブレーションは行うべきではありません。

3. 理論値±許容範囲に入っていないければ、原因を究明する必要があります。
4. 標準物質の安定性を確認しましょう。

2) 管理試料の測定

(1) 管理試料の選択

かつては管理試料としてプール血清が用いられていました。元々、プール血清は測定後の残余検体を集め、濾過し、分注し、自家調製にて作成していましたが、感染症の問題などから、プール血清の作成を行っている施設はもはやないと思います。比較的安価で、感染症の懸念もない試料が市販されているからです。でも、この経緯からも分かる様に、基準範囲内に入るような濃度の試料を測定していました。しかし、この様な濃度を守る意味があるのでしょうか。測定システム構築法で記載したが、最も安定で、正しく測定できるような分析システムを組む場合、臨床上最も重要な測定値（definitive point）近辺にターゲットを当てて、作成します²⁾。この濃度は基準範囲上限の数倍程度の濃度の場合が多く、基準範囲近辺はとても安定した測定が実施される濃度です。この様に安定した測定が実施できる濃度で監視しても、試薬の異常は大変見つけにくいのです。むしろ、ほんの少しでもトラブルが発生すれば、直ぐに測定値が歪んでしまう濃度を選択すべきです。測定可能範囲の上限付近や下限付近は再現性の悪い濃度です。この付近の濃度の管理試料を用いれば、試薬や分析機器の異常を発見しやすくなります。さらに、測定上限や下限の測定が確保できているかを監視する必要もあります。低吸光度濃度であったり、測定上限吸光度領域で、試薬や装置の監視をすべきです。また、パニック値付近の検体測定は報告までに時間をかけてはいけません。診療医は早急な報告を待っているのです。パニック値付近の濃度を測定するのに、「高値なので再検査しています」はありません。常にパニック付近の測定値の報告が直ぐに行えるように、準備を整えておくべきです。具体的に記述するなら、ASTやALTなら、400 U/lから800 U/l程度で実施すべきです。グルコースであるなら、40 mg/dLと800 mg/dL付近で監視すべきでしょう。

(2) 管理試料の測定

管理試料の測定意義は、次のような目的だと思います。

- ①測定が正常に実行されていることを知ること
- ②測定可能範囲の維持ができていないかを監視すること
- ③分析システムに異常が発生していないかを知ること
- ④臨床上精度の求められている濃度における正確度・精密度を監視すること

ここで記述したことはとても重要です。しかし、このように様々な目的を全て満足させるために、たった1種類の管理試料の測定で、叶えられることはありません。「測定可能範囲内の測定が満足にされているか」を監視するための試料と、臨床医が高い精度で測定してほしいと望む濃度における再現性監視する試料は同一試料にできるはずがありません。検査項目によって相違しますが、少なくとも2濃度以上の管理試料を測定すべきです。しかし、標準物質の測定も続けなければならないし、数種類もの管理試料を測定することはできないかもしれません。何が重要で、何を毎日測定しなければならないかを考えましょう。

(3) 標準物質と管理試料は同じ試料で良いのか

前述したように、標準物質も管理試料も血清様物質であれば、「わざわざ、相違する2種類の血清を測定する必要あるのか」と疑問を持つと思います。しかし、標準物質と管理試料は決して一緒にはなりません。両者の持つ役割分担が全く相違するからです。前述のとおり、標準物質は検体への値付けのために測定されています。また、正確度に対する一定の歯止めとして測定されます。他方、管理試料の測定意義は前述²⁾に記述した4点の目的です。目的によって、標準物質とは濃度が相違します。標準物質の濃度は基準範囲の上限もしくは臨床上精度を上げて測定したい濃度の3～

4 倍の濃度が一般的です（低値だと、高値の測定値が大きく揺れる可能性があり、高値だと試薬や装置の限界に近く、安定な分析ができないため）。

これ以外にも、標準物質と管理試料が同じであれば、標準物質に異変が発生していても、発見する方法がありません。例えば、100 mg/dL標準物質を用いてキャリブレーションを実施し、同じ標準物質を測定して100 mg/dLと測定されて当然です。試薬に問題があっても、装置に問題が発生していても、よほどの大きなトラブルで無い限り正しく問題なく、100 mg/dLと測定されます。分析システム構築時のチェックに「打ち返し」と言われるチェック法がありますが、まさに打ち返しチェックと同じです。

3) 正確度のチェックはどうすれば良いのか

正確度は「認証標準物質（CRM）や酵素標準物質（ERM）を測定し、測定値と標示値の差を観察する以外にない」ことはご存じのとおりのことと思います。しかし、どの様に使用すべきかが、今一つ明確さに欠けているのかもしれない。そのように感じる理由は、「どうして濃度の相違するものを作ってくれないのか」とか「CRMやERMは1ヶ月に一度測定すべきなのか、あるいは1年に一度程度で良いのか？」という質問を受けるからです。

(1) CRMやERMの利用法

複数濃度の標準物質の市販を希望される方は、日常検査の標準物質として利用しようとされているのでしょうか。プール血清の測定すら経済的理由から削減している現状で、日々使用する標準物質としてCRMやERMを用いることは現実的ではありません。もし、CRMやERMを日常の標準物質として使用することを目指すのであれば、濃度差の相違する標準物質が作られていてもよいはずですが、しかし、CRMやERMの使用目的は正確度の伝達にあります。具体的には様々な手段を講じて、正しい測定ができていることを検証後、最終確認としてCRMやERMを測定し、標示値と同じ値が測定できるかをチェックするためのツールです。測定を監視するためには標準物質や管理試料が用いられるべきです。

(2) 正確度の大きなチェックは自分自身で

検査技師が測定、報告する測定値です。検査技師自身が測定値に自信を持てることが大切です。どうすれば自信がつくのでしょうか。

- ①理論的データとの一致を観測する。
- ②外部精度管理に参加し、他施設との距離を観察する。
- ③学会の学術集会や講演会に参加し、日々研鑽を高める。
臨床医と積極的に接触し、検査に対する不満や要望を細かく聞き取っておく。
- ④技術研修、分析に関する研修・勉強を積極的に行う。
- ⑤最も大切な精度管理は何なのかを検査技師同士で話し合いを持つ。

などを実践することではないでしょうか。

正確度は揺るぎない分析に対する考え方と理論武装した分析者自身が持つ分析体系と訓練によって生まれるものだと思います。この様なことを記述すると「爺の独りよがり」と思われるでしょうが、分析に対する確固たる自信を持たせてくれる様々な根拠（CRMの測定値と標示値の一致、外部精度管理の評価、学術集会や講演会で知識を得ること、診療医から評価をいただくこと、など）の上に成り立つと思うからです。正確度に対する考え方も、時代によって変化します。その情報をいち早く入手できるのが学術集会や講演会でしょう。そのようなバックグラウンドがあった上で、理論的に得られるデータと自身の測定値が一致し、測定可能範囲の維持、検体ブランク、試薬ブランクやサンプルに対する心遣い（蛍光を持たないか、濁度を呈さないか、溶血、黄疸などの問題が無いか、など）があれば、必ずや正しい分析ができていますはずです。

(3) どうして理論値との比較なのか

正しい測定値は、正しい分析装置仕様と正しい試薬の使用で得られます。正しい測定ができれば理論的に得られるデータと測定値は一致します。測定物質濃度が明確な試料を測定すると、測定される吸光度や反応速度は測定前に演算できます。標準物質であろうと管理試料であろうと、演算値と合わなければ分析系のどこかに異常が発生していると考えられるからです。日々行う正確度チェックはこれで実施できます。標準物質が管理試料は必ず測定するのですから、この結果を使用するだけで正確度チェックが可能になります。

(4) 「 \bar{x} -R管理で試薬異常が発見できない」と言いながら、どうして管理試料の測定で、試薬異常を発見できるようになるのか

「試薬の異常」を発見できない、と明言しておきながら、「試薬異常を発見するための管理試料の測定」と矛盾したことを書いています。まず、試薬の異常を発見できない理由をもう一度記述します。

(試薬の異常を発見できない理由)

試薬に異常が発生し、所定の時間内に反応が終わらなくなっていたとします。具体的には物質A(分子量100)の標準液100 mg/dLをエンドポイントにて測定するとします。試料と試薬の添加比は1:49で測定するとします。反応は3分以内に終了するものとします。また、測定する発色物質のモル吸光係数は 5.0×10^3 l/mol/cmとします。試薬が正しい場合、エンドポイントにおける吸光度変化量は次のようになると考えられ、この測定システム開始時から、一貫して理論値と一致していました。理論値を求める式を示します。

$$\text{濃度 (mg/dL)} = \frac{\text{吸光度変化量}}{\text{モル吸光係数}} \times \frac{\text{総反応液量}}{\text{サンプル量}} \times \text{分子量} \times 1,000 \times \frac{1}{10}$$

実際の数値を代入すると

$$100 \text{ (mg/dL)} = \frac{\text{吸光度変化量}}{10 \times 10^3} \times \frac{50}{1} \times 100 \times 1,000 \times \frac{1}{10}$$

$$\text{吸光度変化量} = 1.0$$

吸光度変化量は1.0と考えられます。

試薬が劣化した場合、どの様になるかという、反応が遅くなります。どの様に遅くなるか、どの様な反応曲線になるかは計算できます。この反応は一次反応速度に従うとのことですから、反応曲線は次式に従ういます。

$$\text{反応生成物 (B)} = \text{物質Aの初期濃度 } A_0 (1 - e^{-\text{反応時間速度定数} \times \text{時間}})$$

この式で得られるB濃度に検出物質のモル吸光係数を乗じると、吸光度になる。試薬中の酵素が劣化した場合、この式の一次速度定数が小さくなくことです。標準物質の反応曲線を求めたい場合には、この式の A_0 に標準物質の濃度×サンプル量/総反応液量を入力すれば良いことになります。サンプルを測定する時の反応曲線を求めるのもこの式に検体の濃度を入力すると求められます。要するに標準物質を測定する時の反応曲線と検体を測定する時の反応曲線は相似形となります。試薬中の酵素が劣化した場合も、反応曲線が3分で終了しなくなりますが、標準物質測定時と検体測定時の反応曲線は相似形になります。よって、試薬中の酵素活性が劣化した場合、反応曲線は正しい試薬を用いた場合と相違しますが、標準物質を測定した時の反応曲線と検体測定時の反応曲線は相似であるため、反応開始3分後の吸光度を次式に代入し、検体濃度を求めた場合、濃度に誤差は発生しなくなるのです。

$$\text{検体中の濃度 (mg/dL)} = \frac{\text{検体測定時の吸光度}}{\text{標準物質測定時の吸光度}} \times \text{標準物質の濃度}$$

(管理試料の測定で試薬異常が発見できる理由)

まともに聞けば明らかに矛盾です。現状で市販されている管理試料は、プール血清に添加されている物質濃度はほとんど基準範囲内か少し超える程度です。具体的な例をASTで上げると、30~60 U/Lです。ところがASTの試薬に問題が発生した場合、高活性検体発生時により大きな誤差が発生し、低活性検体では誤差が発生しにくいことは報告したとおりです。試薬の異常を早期に知るためには高活性検体を管理試料に用いるしかありません。また、コレステロール測定においても、高濃度コレステロール測定に問題が発生することが多いのです(実際にあったトラブルですが、大阪で3番に入るような大病院にて、コレステロールエステラーゼの問題から1ヶ月以上、350 mg/dLを超える検体が出ていないというトラブルがありました)。どうして、高濃度検体測定時に高頻度で問題が発生するかは別途詳細に説明させていただきますが、ALTのように試薬が悪い場合でも、全測定範囲で同じ比率の誤差が発生する検査項目もあります。しかし、5%のマイナス誤差が発生した場合、60 U/Lの検体を測定していると-3 U/Lしか低下せず、57 U/Lと測定され、異常が発生していると、気付きにくいと思います。ところが、測定上限の80%程度の濃度(測定上限を2,000 U/Lとすると、1,600 U/L)の管理試料を測定していると-80 U/Lも低値(1,520 U/L)に測定されるわけですから、通常トラブル発生に気付くと思います。また、測定可能範囲全濃度領域において、正しい測定が継続されているか、日々確認することは責務であると考えます。

(正確度チェック法のまとめ)

1. 標準物質、管理試料を用い、理論値と測定値をチェックしましょう。
2. 学会活動、研修活動を積極的に参加しましょう。
3. 外部精度管理に積極的に参加しましょう。

4) 管理試料の選択

管理試料を測定する意義が複数あることを記述しましたが、この全てをたった1種類の濃度試料の測定で満足させられるはずがありません。

測定可能範囲の継続的維持が行われているかのチェック法では項目によって変わりますが一般的には測定可能範囲の上限に近い濃度の測定が求められます。もちろん測定下限近くに臨床意義の高い項目では下限付近のチェックが必要となるでしょう。この問題は項目毎の問題として採り上げるべき問題として記述しますが、それ以外に、次のような目的があります。

- ①測定が正常に実行されていることの確認
- ②臨床上精度の求められている濃度における正確度・精密度の監視

では、この問題について取り上げます。

(1) 測定が正常に実行されていることを知りたい

現在実施されている精度管理の最も大きな目的がこれだと思います。「今日の分析システムが正しく作動しているか」ともかく早く知りたい、というのが分析担当者の切実な要望でしょう。もし、正常でなければ、「検体の測定を認めない」という施設も多いと思います。それに、いつもの試料がいつもの測定値を出していることは言いようもないほど安心感が得られるものです。管理試料を測定することは様々な意味で、必ず必要でしょう。だったら、臨床上精度の求められている濃度を測定すべきではないでしょうか。そして、公表する精度管理図はこのデータを用いるべきでしょう。

(2) 試薬異常の発見

試薬異常は測定可能範囲の維持を監視することが主で、この問題は項目毎に大きな相違があるた

め、検査項目毎の項に記述します。また、試薬の劣化は突然訪れることがないため、正しい監視を行ってれば、必ずしも毎日チェックする必要はありません。気になるときに、気になる項目をチェックできる体制を整えておくことが重要なのです。

(3) 分析システム（装置）異常の発見

基本的には理論値との乖離が見つけれられた時、検査技師は原因について、おおよその見当がつくはずですが、もし、見当がつかないなら、試薬チェックから始め、試薬異常が見つけれなければ装置の異常でしょう。その時には装置チェック法に従い原因を調べてください。

装置の異常は突然起こると考えておられる方も多いと思いますが、必ずしも突然生じる問題ばかりではありません。例えば光源ランプの劣化は光源レベルをモニターするか、光源点灯時間の累積時間をカウントすれば、目処が立つと思います。また、現状で最も多いトラブルはサンプルノズルの詰まりでしょう。人工透析、カテーテル治療、冠動脈造影など、検査や治療上の問題で、抗凝固剤投与と患者が増加しています。これに伴い、分析中に凝固反応が発生する検体が増加し、分析装置上大きな問題になっています。このトラブルに対して、サンプル吸引時の圧力センサーでモニターする方法などの工夫が行われていますが、流路完全閉塞ではなく、一部閉塞状態が問題を発生させているようです。この場合、再現性が低下すると考えられています。管理試料の測定値が低値になった場合は、複数回測定にて再現性を求めることです。

(4) 管理試料の監視には吸光度で記載すべきか、測定値で記載すべきか

標準物質の測定においては、吸光度や反応速度のモニターを提案していますが、管理試料は測定値で管理すべきです。特に、臨床精度が求められる濃度における管理では測定値にて管理し、公表するのが適当です。吸光度や反応速度にて記述すると、臨床医が理解し難いと考えからです。もちろん、標準物質の管理で異常が推定される場合は、同じ程度の誤差が管理試料測定にも発生しているかを吸光度や反応速度でチェックすべきです。管理試料に問題が発生していない場合、標準物質の劣化や異常の発生を疑うべきでしょう。

(提言)

1. 試薬異常を早期発見するための管理試料を用いるべきです。
2. 測定可能範囲全領域が正しく測定されているかをチェックできる管理試料を測定すべきです。
(項目毎に相違するため、各項目の管理法参照)
3. 臨床医の要求する濃度における精度とは明らかに相違します。(各項目の管理法参照)
4. ここで示した全ての管理試料を毎日測定することはないものの、一定の基準を定め、異常の可能性がある場合は、目的に合致した管理試料を取り出して、速やかに測定すべきです。

引用文献

- 1) 小川善資: x-R管理図は分析機器や試薬の異常を見付けられない. 生物試料分析, 34: 359-363, 2011.
- 2) 小川善資: 比色分析における分析精度と測定限界の関係—分析装置の性能限界から考えた精度と限界—. 分析機器・試薬アナリスト認定講座Ⅱ, <http://abs-edu-analyst-kiki-shiyaku.kenkyuukai.jp/images/sys%5Cinformation%5C20120130165349-36FD6978CF9D3782D678537CE4E2BC520DE0160197E4BF1CA22119171D73F932.pdf>, 2012
- 3) 小川善資: AST活性測定の日常検査法の構築とその管理法(1). 生物試料分析, 36: 331-338, 2013.
- 4) 小川善資: AST活性測定の日常検査法の構築とその管理法(2). 生物試料分析, 36: 393-404, 2013.