

## (2) JCCLS CRM-001 の認証値設定手順 (Ver.1.9)

### Applied Procedure for Certified Value on Reference Standard for Enzyme of JSCC Method (Ver.1.9)

#### 序 論

ISO Guide 35<sup>1-2)</sup>に基づき、常用参照標準物質：JSCC 常用酵素 (JCCLS CRM-001) の認証値の設定手順を規定する。なお、ロット更新における特性値の継続性に関する検討を加える。

#### 1. 適用範囲

常用参照標準物質の候補品について、酵素活性の認証値とその不確かさを定める方法を規定する。試験室間の合意による標準物質の認証の手順に従い、候補品の均質性の確認を含めて実施する。

#### 2. 認証の原則

室間共同試験により標準物質を認証する。その際、標準物質の特性値の決定に、容認できる精確さで結果が提供できる、同等の能力のある試験室 (群) の存在を前提とし、各試験室の平均値が物質の特性の不偏推定値であるとみなす。

用いる測定法は、JSCC/JCCLS 常用基準法あるいはそれと同等の値を得ることが事前に確認された JSCC/JCCLS 自動化法 (以下、自動化法) とする<sup>3-5)</sup>。また、IFCC 勧告法による場合も同様の手順を適用する。なお、基準測定操作法 (SOP) は別に定める。

#### 3. 手順の概要

室間共同試験により標準物質を認証する手順は、 $p$  箇所の試験室の各々が、 $q$  個の単位体 (バイアル) のそれぞれについて  $n$  回の反復測定を行い、全体で  $p \times q \times n$  個の測定結果を得る、二段枝分かれ実験を実施する。事前に実験の指針を明確化し、目標期間、単位体の数、単位体当たりの反復測定回数、測定方法などを確認する。望ましい参加試験室数は 15 個所以上であり、単位体数と反復測定の最小数は 2 である。

JSCC/JCCLS 常用基準法による認証実験の場合、試験室数は  $p=6$  個所以上、試料バイアル数は  $q=3$  以上、反復測定数は  $n=2$  以上が望ましい。

自動化法による認証実験の場合、試験室数は  $p=15$  個所以上 (最小の場合でも 10 個所以上)、試料バイアル数は  $q=3$  以上、反復測定数は  $n=2$  以上とする。

試験室は、測定プロセスを含めて一つ一つの結果のすべてを報告し、一括してデータ処理を行う。

統計解析は、まず技術的に説明できる外れ値と、結果の度数分布を確認し、分布の山が一つの場合に合意値を推定し、二つ以上ある場合は合意値を決められない。次に、統計的外れ値をチェックした後、二段枝分かれ分散分析法を適用し、単位体間分散、試験室間分散の有意性を検定し、合意値の不確かさを求める。

なお、物質の均質性が事前に確認されている場合は、各試験室で反復実施した測定結果に対して、統計解析は一元配置となる。

本実験計画に基づく一回目の試験結果から認証値を決定できない場合は、誤差要因を検討した後に二回目の試験を実施する (図 1)。

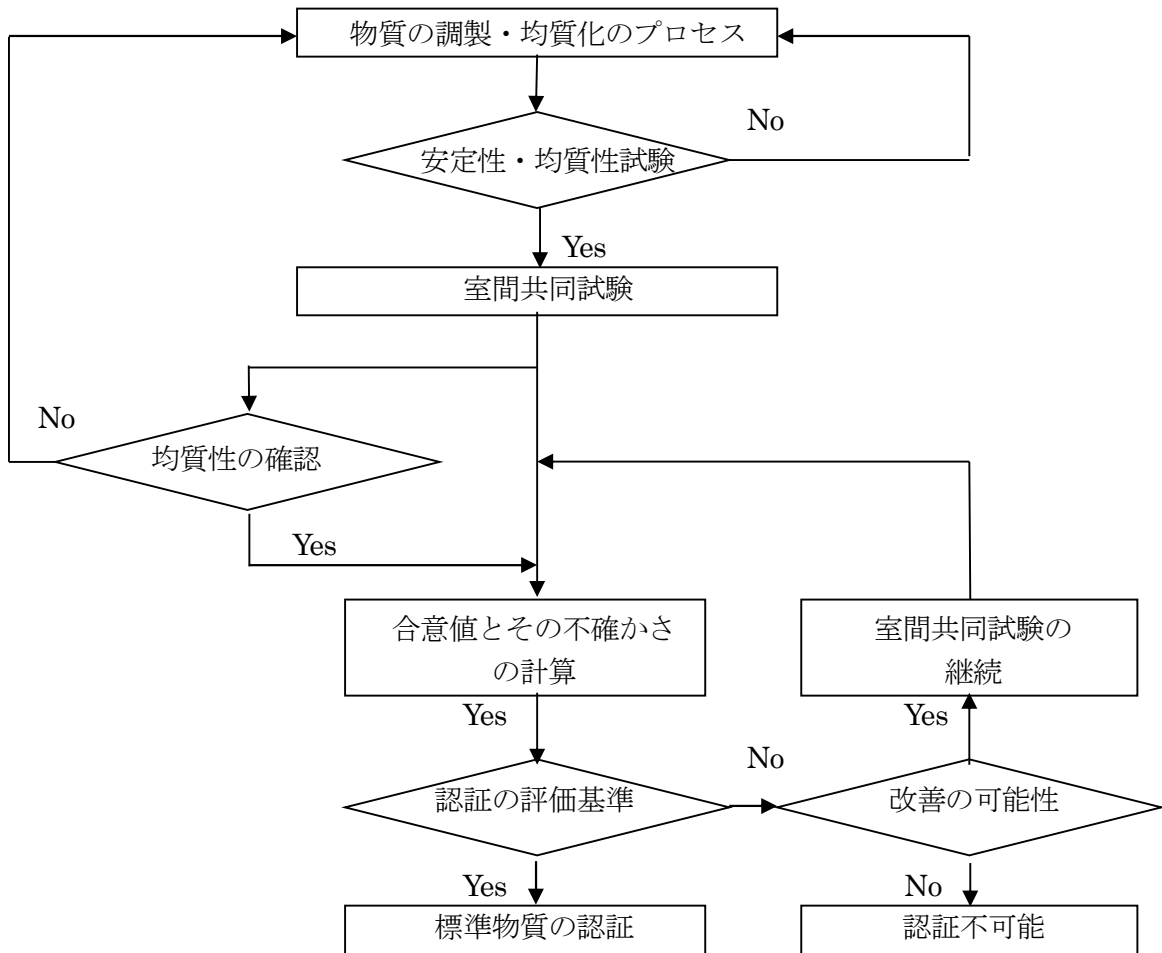


図1 室間共同試験における合意による標準物質の調製と認証過程の概要  
(ISO Guide 35 より引用)

#### 4. 分散分析

データの解析に二段枝別れ分散分析法を適用する。

測定結果は、次式のモデルによって表わされる。

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (i=1, \dots, p; j=1, \dots, q; k=1, \dots, n)$$

ここで、 $X_{ijk}$ は  $i$  試験室におけるバイアル  $j$  の  $k$  番目の測定結果、 $\mu$  は総平均で特性の期待値、 $\alpha_i$  は  $i$  試験室の室間誤差、 $\beta_{ij}$  は  $j$  バイアルによる誤差、 $\varepsilon_{ijk}$  は試験室内の反復測定誤差である。

また、室間誤差の分散を  $\sigma_A^2$ 、バイアル間誤差の分散を  $\sigma_B^2$ 、試験室内の測定誤差の分散を  $\sigma_E^2$  とする。

計算は、まずバイアル単位の合計  $T_{ij}$  と平均値  $XB_{ij}$ 、試験室単位の合計  $T_i$  と平均値  $XB_i$ 、総合計  $T$  と総平均値  $XB$  を求める。

$$T_{ij} = \sum_k X_{ijk}, \quad T_i = \sum_j T_{ij}, \quad T = \sum_i T_i$$

$$XB_{ij} = (T_{ij})/n, \quad XB_i = (T_i)/(qn), \quad XB = T/(pqn)$$

修正項  $CF$  と、平方和  $S_A$ 、 $S_B$ 、 $S_E$ 、及びそれらの自由度  $f_A$ 、 $f_B$ 、 $f_E$  を求める。

$$CF = (\sum_i \sum_j \sum_k X_{ijk})^2 / (pqn) = T^2 / (pqn)$$

$$S_T = \sum_i \sum_j \sum_k (X_{ijk} - XB)^2 = \sum_i \sum_j \sum_k X_{ijk}^2 - CF, \quad f_T = pqn - 1$$

$$S_A = qn \sum_i (XB_i - XB)^2 = (\sum_i T_i^2) / (qn) - CF, \quad f_A = p - 1$$

$$S_B = n \sum_i \sum_j (XB_{ij} - XB)^2 = (\sum_i \sum_j T_{ij}^2) / n - CF - S_A, \quad f_B = p(q - 1)$$

$$S_E = \sum_i \sum_j \sum_k (X_{ijk} - XB_{ij})^2 = S_T - S_A - S_B, \quad f_E = pq(n - 1)$$

それぞれの分散を求める。

$$V_A = S_A / f_A, \quad V_B = S_B / f_B, \quad V_E = S_E / f_E$$

以上の結果を、分散分析表にまとめる。

要因	平方和	自由度	平均平方	平均平方の期待値
試験室間	$S_A$	$p - 1$	$V_A$	$\sigma_E^2 + n\sigma_B^2 + qn\sigma_A^2$
単位体間	$S_B$	$p(q - 1)$	$V_B$	$\sigma_E^2 + n\sigma_B^2$
測定誤差	$S_E$	$pq(n - 1)$	$V_E$	$\sigma_E^2$

モデルのそれぞれのパラメータは次のように推定できる。(I)は推定値を示す。

$$\mu(I) = XB, \quad \sigma_A^2(I) = (V_A - V_B) / (qn), \quad \sigma_B^2(I) = (V_B - V_E) / n, \quad \sigma_E^2(I) = V_E$$

なお、 $\sigma_A^2(I)$  あるいは  $\sigma_B^2(I)$  の数値が負となった場合は、ゼロとする。

1) 単位体間分散の検定:  $F = V_B / V_E$

を自由度  $p(q - 1)$  と  $pq(n - 1)$  の  $F$  分布の値と比較する。なお、検定の結果、有意でない場合は単位体間の項を測定誤差項にプールして処理する。

2) 試験室間分散の検定:  $F = V_A / V_B$

を自由度  $(p - 1)$  と  $p(q - 1)$  の  $F$  分布の値と比較する。

3) 合意値  $XB$  の分散  $\{V(XB)\}$  は、各要因が有意な場合  $V(XB) = V_A / (pqn)$  で推定される。

総平均  $XB$  に基づく  $\mu$  の有意水準  $\alpha\%$  に対する信頼区間の限界値は次のようになる。

$$XB \pm t_{1-\alpha/2}(p-1) \{V_A / (pqn)\}^{1/2}$$

ここで、 $t_{1-\alpha/2}(p-1)$  は自由度  $(p-1)$  の  $t$  分布の  $(1-\alpha/2)$  パーセント点の数値である。

4) 測定データの総平均  $XB$  の A タイプの標準不確かさは次のようになる。

$$u_A(XB) = \{V(XB)\}^{1/2} = \{\sigma_A^2(I) / p + \sigma_B^2(I) / (pq) + \sigma_E^2(I) / (pqn)\}^{1/2}$$

なお、要因の検定結果によってはそれに対応する項を無視できる場合がある。

## 5. ロット更新における継続性の検討

常用参照標準物質の候補品に対する JSCC/JCCLS 常用基準法による認証試験において、前ロットの常用参照標準物質を、今回の候補品と同様に測定し、全試験室による平均値  $XB_0$  を求める。得られた平均値  $XB_0$  が常用基準法による安定性を含めた不確かさの範囲内であれば、前ロットの安定性と測定法の精確さは検証されたものとみなす。

この場合、前ロットの常用参照標準物質をキャリブレーションとして用い、JSCC/JCCLS 自動化法により、新ロットとなる候補品を測定し、特性値を求める。そのときの測定手順は、「3. 手順の概要」と同様とし、自動化法による平均値を  $XB_A$  とする。ここで、常用基準法で求めた候補品の不確かさの範囲内に  $XB_A$  があれば、前ロットの認証値との継続性を考慮し、 $XB_A$  を認証値とする。

①前ロットの常用参照標準物質を対象試料とした、今回得られた常用基準法による平均値  $XB_0$  が、常用基準法による安定性を含めた不確かさの範囲に含まれない場合、②不確かさの範囲内であっても保存期間中に測定値が継続して低下傾向を示した場合、③不確かさの範囲内であっても認証値に対して同一方向のかたよりが連続して認められた場合、あるいは④新ロットとなる常用参照標準物質候補品の常用基準法による値の不確かさの範囲内に、前ロット常用参照標準物質で校正した自動化法による候補品の測定平均値  $XB_A$  が含まれない場合は、その原因を追求し、必要があれば再度試験を行う。原因が不明の場合は、常用参照標準物質候補品の認証値は、今回新たに実施した常用基準法による測定値から求める。

#### 6. 常用参照標準物質の更新および認証値の決め方の分類

常用参照標準物質の更新および認証値の決め方は、常用参照標準物質の前ロットが存在する場合と、存在しない場合に分類されるが、その概要を示すフローチャートは文献<sup>5)</sup>を参照されたい。

#### 7. 認証値の不確かさ

認証値の不確かさの成分として、認証試験による不確かさの成分の他に、バイアル間差や保存安定性による不確かさの成分を見積もり<sup>6, 7)</sup>、合成標準不確かさと拡張不確かさを求める。

#### 文 献

- 1) ISO Guide 35: Reference materials - General and statistical principles for certification. 2006
- 2) JIS Q 0035 : 標準物質－認証のための一般的及び統計的な原則. 2008
- 3) ISO 17511: In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. 2003
- 4) ISO 18153: In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned to calibrators and control materials. 2003
- 5) JCCLS 認証委員会標準物質小委員会：酵素標準物質 (ERM) Lot 004 の設定概要. 日本臨床検査標準協議会会誌 19(1) : 3-4, 2004
- 6) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会：キャリブレーションおよび QA 用試料の不確かさ評価方法 (Ver.1.4). 臨床化学 32 : 186-199, 2003
- 7) Thomas P. et al. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs. Fresenius J Anal Chem 370:183-188, 2001