

平成 27 年度多項目実用参照物質委員会報告

Report of Committee for Multianalyte Conventional Reference Material in 2015

篠原克幸 (JCCLS 多項目実用参照物質委員会委員長、福岡大学筑紫病院 臨床検査部技師長)

Katsuyuki Shinohara (Chairperson of JCCLS Committee for Multianalyte Conventional Reference Material, Technical Supervisor Department of Clinical Laboratory, Fukuoka University Chikushi Hospital)

日本臨床化学会 (JSCC) によるヒト血清中酵素活性測定 の 勧告法、その他の物質の基準測定法の提示や日常検査法に伝達するための認証標準物質の設定により、臨床検査室が測定する主要な検査項目の測定値の標準化は進展した。この測定値の標準化を維持するためには、一般の臨床検査室が測定値の正確さを確認するための試料が必要と考え、本委員会が発足した。平成 16 年度から本会が推進した標準化基本検討委員会柱 2 の活動において利用してきたプール血清の作製技術を基礎に、規格を検討することから始めた。原料血清は日本赤十字社血液センターの検査残余血清が最適と判断し、平成 24 年厚生労働省によって定められた「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に則り、利用に応募した。

1. 試作品の製造および評価

一般社団法人日本臨床衛生検査技師会 (日臨技) との共同事業として平成 23 年度に試作した「多項目実用参照物質-試作品」を、日臨技標準化事業において利用し性能評価した。昨年度までの 4 年間の評価成績から本品の保存安定性および施設間精度を算出した。

2. 第一ロットの製造および値付け

本品の規格を定め、製造委託者を公募、平成 26 年 9 月に「多項目実用参照物質-001」を製造した。その後、多施設の共同実験にて値付け作業、認証評価委員会および認証委員会の審議を経て、平成 27

年 6 月に頒布を開始した。頒布開始時の有効期限は保存安定性の評価実績から製造後 3 年間とした。現在も評価を継続しているので、評価結果によっては有効期限の延長も可能となる。

本品は日常検査の正確さ確認試料であるので、各施設の測定値を評価するための許容誤差を示す必要がある。日常検査法を対象とするので自動分析装置と市販検査試薬による値付けとした。成分の表示値 (JCCLS 認証値) は、JCCLS (Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards、日本臨床検査標準協議会)、NIST (National Institute of Standards and Technology、米国標準技術研究所)、IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements、欧州連合標準研究所)、ReCCS (Reference Materials Institute for Clinical Chemistry Standards、検査医学標準物質機構) の認証標準物質を上位標準物質として用い、ISO ガイド 35 に基づいた方法により決定した。不確かさの成分は、実験誤差成分 (実験誤差) と MaCRM-001 の均質性 (バイアル間差)、校正に用いた上位標準物質の不確かさ、および MaCRM-001 の保存安定性を含む総合的な拡張不確かさ (包含係数 $k=2$) として示した。さらに、正確さ (真度) 評価の許容限界は認証値の不確かさと多施設における室間再現条件での技術水準を合成して設定した。

各項目の許容誤差を算出したバジェット表を表 1 に示す。

表1 多項目実用参照物質-001の不確かさ推定のためのバジレット表

項目名 (単位)	測定方法	上位標準物質	試験施設数	認証値	拡張不確かさ (k=2)	試験バイアル 上位 保存				合成標準不確かさ	施設間精度*1 (%)	真度評価の許容誤差*2 (%)	
						精度	間差	標準	安定性			相対値(%)	
Glu (mg/dL)	HK法、GOD電極法、GluK法、GluDH法	NIST SRM917c	11	197.5	±2.5	0.33	0.38	0.20	0.33	0.63	1.28	2.9	±5.6
		JCCRM 521-12	14	198.4	±3.0	0.29	0.29	0.53	0.33	0.75	1.28	3.0	±5.9
UA (mg/dL)	ウリカーゼPOD法、ウリカーゼ・UV法	NIST SRM913b	11	7.87	±0.11	0.45	0.36	0.25	0.33	0.71	1.31	3.0	±0.23
		JCCRM 521-12	12	7.92	±0.14	0.33	0.30	0.68	0.33	0.88	1.31	3.2	±0.25
UN (mg/dL)	アンモニア消去法、アンモニア回避法	NIST SRM912a	17	34.8	±0.7	0.30	0.25	0.15	0.85	0.95	1.89	4.2	±1.5
		JCCRM 521-12	18	34.6	±0.9	0.17	0.29	0.87	0.85	1.26	1.89	4.5	±1.6
Crea (mg/dL)	酵素法	NIST SRM914a	10	3.46	±0.05	0.30	0.29	0.50	0.40	0.76	1.78	3.9	±0.13
		JCCRM 521-12	11	3.49	±0.14	0.26	0.29	1.98	0.40	2.06	1.78	5.4	±0.19
TBil (mg/dL)	バナジン酸化法、酵素法、亜硝酸酸化法	NIST SRM916*3	8	4.31	±0.22	1.44	0.00	(2.00)	0.61	2.54	3.90	9.3	±0.40
Fe (μg/dL)	Nitroso-PSAP法、パソフェナントロリン法、Ferene色素法	NIST SRM37	10	147.9	±2.5	0.36	0.21	0.05	0.72	0.83	2.34	5.0	±7.4
		JCCRM 322-5	11	147.2	±6.0	0.61	0.31	1.79	0.72	2.05	2.34	6.2	±9.1
Na (mmol/L)	イオン選択電極法	JCCRM 111-6	10	139.3	±0.7	0.06	0.00	0.14	0.18	0.24	0.56	1.2	±1.7
K (mmol/L)		JCCRM 111-6	10	4.17	±0.03	0.13	0.20	0.19	0.15	0.34	0.90	1.9	±0.08
Cl (mmol/L)		JCCRM 111-6	10	104.9	±0.5	0.07	0.00	0.14	0.20	0.25	1.14	2.3	±2.4
Ca (mg/dL)	アルセナゾⅢ法、酵素法、MXB法、クロロホスホナゾⅢ法	NIST SRM915b	10	10.36	±0.21	0.77	0.47	0.20	0.38	1.00	1.72	4.0	±0.41
		JCCRM 321-7	12	10.21	±0.20	0.35	0.41	0.75	0.38	1.00	1.72	4.0	±0.41
IP (mg/dL)	酵素法	NIST SRM200b	10	7.58	±0.10	0.47	0.00	0.19	0.40	0.65	1.42	3.1	±0.23
		JCCRM 324-4	9	7.58	±0.21	0.29	0.00	1.27	0.40	1.36	1.42	3.9	±0.30
Mg (mg/dL)	酵素法	NIST SRM929a	10	3.32	±0.07	0.43	0.69	0.38	0.67	1.12	2.63	5.7	±0.19
		JCCRM 321-7	10	3.32	±0.09	0.35	0.66	0.81	0.67	1.29	2.63	5.9	±0.20
AST (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-001c	12	168	±4	0.27	0.00	1.24	0.40	1.33	1.48	4.0	±7
ALT (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-001c	10	150	±4	0.30	0.53	1.29	0.40	1.48	1.42	4.1	±6
ALP (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-001c	12	472	±16	0.54	0.00	1.53	0.63	1.74	1.96	5.2	±25
LD (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-001c	11	500	±12	0.27	0.26	1.01	0.41	1.15	1.17	3.3	±17
Amy (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-001c	10	343	±10	0.41	0.33	1.29	0.34	1.43	2.00	4.9	±17
CK (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-001c	13	465	±13	0.43	0.18	1.15	0.61	1.38	1.59	4.2	±20
GGT (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-001c	14	146	±5	0.31	0.21	1.64	0.38	1.72	1.44	4.5	±7
ChE (U/L)	JSCC標準化対応法	JCCLS CRM-002c	12	340	±7	0.44	0.00	0.87	0.42	1.06	1.32	3.4	±12
TCho (mg/dL)	コレステロール酸化酵素法、コレステロール脱水素酵素法	NIST SRM1951c	9	185.6	±2.8	0.39	0.00	0.58	0.27	0.75	1.40	3.2	±5.9
		NIST SRM1951c(AK)*4	9	188.2	±2.0	0.39	0.00	0.22	0.27	0.52	1.40	3.0	±5.6
		JCCRM 211-3	8	185.8	±2.4	0.57	0.00	0.19	0.27	0.66	1.40	3.1	±5.8
		JCCRM 211-3(AK)*4	8	187.2	±2.5	0.55	0.00	0.27	0.27	0.67	1.40	3.1	±5.8
TG (mg/dL)	酵素比色法(FG消去)	NIST SRM1951c(FG含)	10	102.0	±2.6	0.57	0.00	1.05	0.44	1.27	2.08	4.9	±5.0
		JCCRM 224-8	11	96.9	±2.3	0.81	0.00	0.78	0.44	1.21	2.08	4.8	±4.7
HDLC (mg/dL)	直接法	NIST SRM1951c	9	58.0	±2.1	0.96	0.33	1.31	0.79	1.84	3.71	8.3	±4.8
		JCCRM 224-8	11	58.0	±1.4	0.64	0.00	0.72	0.79	1.25	3.71	7.8	±4.5
LDLC (mg/dL)	直接法	NIST SRM1951c	9	107.1	±2.4	0.64	0.26	0.73	0.51	1.13	2.29	5.1	±5.5
		JCCRM 224-8	11	109.5	±3.1	0.77	0.24	1.06	0.51	1.43	2.29	5.4	±5.9
CRP (mg/dL)	ラテックス比濁法	IRMM ERM-DA474	11	4.06	±0.27	0.83	0.57	3.03	0.81	3.29	3.05	9.0	±0.37
Alb (g/dL)	BCP改良法	IRMM ERM-DA470k	12	4.61	±0.17	0.35	0.00	1.61	0.72	1.80	2.53	6.2	±0.29
IgG (mg/dL)	免疫比濁法、免疫比ろろ法	IRMM ERM-DA470k	9	1278	±32	0.68	0.00	0.98	0.44	1.27	2.09	4.9	±63
IgA (mg/dL)		IRMM ERM-DA470k	9	248	±8	0.43	0.32	1.39	0.54	1.58	3.07	6.9	±17
IgM (mg/dL)		IRMM ERM-DA470k	9	97.5	±4.2	0.63	0.00	1.87	0.90	2.17	3.44	8.1	±7.9
TP (g/dL)	ビュレット法	NIST SRM927*3	17	7.53	±0.16	0.25	0.00	(1.00)	0.34	1.09	1.26	3.3	±0.25

*1 施設間精度は多項目実用参照物質-試作品における日本臨床衛生検査技師会標準化事業基幹施設の2011年から2014年の測定値から算出した。

*2 真度評価の許容限界は認証値の不確かさと施設間精度(多施設における室間再現条件での技術水準)を合成して設定した。

*3 現在入手困難であるので、これらを上位標準物質とする試薬キットによって認証値を設定した。(TBil、TP)

*4 アメリカ疾病管理予防センター(Centers for Disease Control and Prevention: CDC)リファレンス法であるアベルケンダール法による。

3. 凍結乾燥を目指した安定化剤の検討

平成26年9月に「多項目実用参照物質-001」を製造した際、一部を凍結乾燥し本品と比較した。2mL分注し凍結乾燥、2mLの精製水にて復元したので元の試料より若干希釈され、表2に示すとおり多くの項目で本品の93%程度の測定値となった。ただしAST、ALT、ALP、CK およびLDL コレステロールにおいて、より低い測定値となっており、凍結乾燥による変性を認めた。このことは、凍結乾燥によって①反応性に変化がおこる、②バイアル差の要因となる、可能

性があり、より安定した品にするための安定化剤を検討することとした。

日本臨床衛生検査技師会の精度管理調査などから、調査試料に添加する安定化剤の影響をもっとも受けるのはドライケミストリーと考えられるので、富士フィルムメディカル、オーソクリニカルダイアグノスティックス、アークレイの協力を得て、各種添加物を加えて作製した試料の測定値を比較した。また、添加物は保存安定性に好影響を与える可能性があるため、37℃に保存する加速試験も実施した。

表2 MaCRM-001 凍結乾燥(FD)による変化

項目名 (単位)	MaCRM-001			項目名 (単位)	MaCRM-001			項目名 (単位)	MaCRM-001		
	本品	FD品	比(%)		本品	FD品	比(%)		本品	FD品	比(%)
Glu (mg/dL)	198.2	182.6	92.1	IP (mg/dL)	7.60	7.06	92.9	TCho (mg/dL)	185.7	169.7	91.4
UA (mg/dL)	7.87	7.33	93.1	Mg (mg/dL)	3.32	3.02	91.0	TG (mg/dL)	99.7	93.0	93.3
UN (mg/dL)	34.6	32.0	92.5	AST (U/L)	169.1	140.6	83.1	HDLC (mg/dL)	58.2	53.4	91.8
Crea (mg/dL)	3.48	3.23	92.8	ALT (U/L)	150.5	117.2	77.9	LDLC (mg/dL)	111.3	95.4	85.7
TBil (mg/dL)	4.41	4.05	91.8	ALP (U/L)	446.9	328.7	73.6	CRP (mg/dL)	4.31	3.98	92.3
Fe (μg/dL)	149.8	141.9	94.7	LD (U/L)	499.4	460.0	92.1	Alb (g/dL)	4.65	4.34	93.3
Na (mmol/L)	139.9	130.2	93.1	Amy (U/L)	332.6	310.2	93.3	IgG (mg/dL)	1289	1208	93.7
K (mmol/L)	4.17	3.88	93.0	CK (U/L)	468.4	313.5	66.9	IgA (mg/dL)	247.0	231.6	93.8
Cl (mmol/L)	104.0	96.1	92.4	GGT (U/L)	146.6	136.5	93.1	IgM (mg/dL)	98.4	93.5	95.0
Ca (mg/dL)	10.25	9.55	93.2	ChE (U/L)	343.0	320.4	93.4	TP (g/dL)	7.55	7.09	93.9

1) 安定化剤の有無による方法間統計

MaCRM-001と同様に製造した母液、安定化剤を含まない凍結乾燥品 (FD1)、および8種の安定化剤を加えた凍結乾燥品を試作した。汎用分析法3施設とドライケミストリーの富士フィルムメディカル、オーソクリニカルダイアグノスティックス、アークレイ、計6方法にて測定し、方法間誤差の小さい試料を探した。

15種の試作品のうち、ドライケミストリーで乖離する測定値とならなかったのは2種類の糖を0.5%ずつ添加した1種のみ (FD2) であった。他の14種は、ドライケミストリーのいずれかにおいて乖離する測定値となり、目的に合致しないと判断した。

2) 安定化剤添加の効果 (表3)

安定化剤は、凍結乾燥工程における効果と共に長期保管の際の安定性向上が期待される。そこで母液、安定化剤を含まない凍結乾燥品 (FD1) および2種類の糖を0.5%ずつ添加した凍結乾燥品 (FD2) の測定

値を比較した。先に示した凍結乾燥にて活性が低下するAST、ALT、ALP、CKが安定化剤の添加によって活性低下は少なくなり、一定の効果が認められた。

さらに2種類の凍結乾燥品を37℃に3週間置く過酷試験を実施した。グルコース、AST、ALT、ALP、CKにおいて-70℃以下の保管に比べ20%を超える測定値低下を認めた。また、この測定値低下は安定化剤添加の有無に関係しなかった。

3) 凍結乾燥品への今後の取り組み

今回の検討によって、いくらかの効果を認める安定化剤が見つかった。ただし、その効果は大きくなく、37℃に3週間置く過酷試験で測定値低下する項目があったことから、凍結乾燥品の抱える問題は少なくない。今後の取り組みはあまり価値がないと考える。

表3 各試料の測定値および37°C3週間過酷試験結果

項目名 (単位)	-70°C以下保管			過酷試験		項目名 (単位)	-70°C以下保管			過酷試験	
	母液	FD1	FD2	FD1	FD2		母液	FD1	FD2	FD1	FD2
Glu (mg/dL)	187.8	186.2	187.9	129.7	128.2	ALT (U/L)	151.2	126.8	137.3	55.2	55.9
対母液・正規保管(%)		99.1	100.1	69.6	68.2	対母液・正規保管(%)		83.9	90.8	43.5	40.7
UA (mg/dL)	7.59	7.54	7.53	7.17	7.18	ALP (U/L)	453.0	394.1	403.4	302.2	311.1
対母液・正規保管(%)		99.4	99.2	95.1	95.3	対母液・正規保管(%)		87.0	89.0	76.7	77.1
UN 母液	32.6	32.7	32.7	32.8	32.7	LD (U/L)	435.7	433.3	435.6	392.7	385.1
対母液・正規保管(%)		100.3	100.2	100.2	100.2	対母液・正規保管(%)		99.5	100.0	90.6	88.4
Crea 母液	3.20	3.19	3.17	3.01	3.01	Amy (U/L)	388.1	388.7	388.2	355.7	362.4
対母液・正規保管(%)		99.6	99.1	94.4	94.9	対母液・正規保管(%)		100.1	100.0	91.5	93.4
TBil 母液	4.83	4.86	4.81	4.86	4.78	CK (U/L)	469.5	341.0	381.6	183.6	216.7
対母液・正規保管(%)		100.6	99.6	100.0	99.3	対母液・正規保管(%)		72.6	81.3	53.8	56.8
Fe (μ g/dL)	157.8	158.2	158.2	186.3	187.1	GGT (U/L)	147.1	145.7	145.3	138.7	137.6
対母液・正規保管(%)		100.3	100.3	117.8	118.3	対母液・正規保管(%)		99.1	98.8	95.2	94.7
Na (mmol/L)	149.8	150.0	149.0	150.0	148.6	ChE (U/L)	342.8	341.5	339.9	336.0	334.0
対母液・正規保管(%)		100.1	99.5	100.0	99.8	対母液・正規保管(%)		99.6	99.2	98.4	98.3
K (mmol/L)	5.44	5.44	5.40	5.43	5.38	TCho (mg/dL)	208.3	206.4	207.2	214.3	214.4
対母液・正規保管(%)		100.0	99.3	99.9	99.7	対母液・正規保管(%)		99.1	99.5	103.8	103.5
Cl (mmol/L)	108.5	107.8	106.9	107.3	106.2	TG (mg/dL)	132.0	132.3	132.7	132.6	130.6
対母液・正規保管(%)		99.3	98.5	99.6	99.4	対母液・正規保管(%)		100.3	100.5	100.2	98.4
Ca (mg/dL)	9.57	9.68	9.59	9.68	9.66	HDLC (mg/dL)	59.7	54.4	54.4	51.4	51.2
対母液・正規保管(%)		101.1	100.2	100.0	100.7	対母液・正規保管(%)		91.2	91.2	94.5	94.2
IP (mg/dL)	6.79	6.80	6.82	6.81	6.81	CRP (mg/dL)	4.63	4.50	4.50	3.98	3.88
対母液・正規保管(%)		100.1	100.5	100.2	99.8	対母液・正規保管(%)		97.3	97.3	88.3	86.1
Mg (mg/dL)	3.38	3.38	3.38	3.41	3.38	Alb (g/dL)	4.70	4.68	4.69	4.59	4.56
対母液・正規保管(%)		100.1	100.1	100.9	100.1	対母液・正規保管(%)		99.7	99.8	97.9	97.3
AST (U/L)	166.8	150.3	157.3	108.5	111.5	TP (g/dL)	7.27	7.35	7.38	7.49	7.47
対母液・正規保管(%)		90.1	94.3	72.1	70.9	対母液・正規保管(%)		101.1	101.7	101.9	101.1

4. Clinical Chemistry 誌への投稿

一連の経過について、Clinical Chemistry 誌
に投稿し、受理された¹⁾。

文献)

- 1) Multianalyte Conventional Reference Material (MacRM) : A Useful Tool for Nationwide Standardization of Laboratory Measurements for Medical Care - A Model Study in Japan, Shinohara K, Hamasaki N, Takagi Y, et al. on behalf of the Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards (JCCLS) and the Japanese Association of Medical Technologists. Clinical Chemistry ; 62(2) : 392-406, 2016