

平成 2016 年度認証委員会・認証評価委員会報告
常用参照標準物質：ChE (JCCLS CRM-002) のロット更新概要

**Report of JCCLS Certification Committee for Reference Materials
and Committee for Certification Assessment in 2016
Outline of New Lot of Reference Standard for Enzyme of JCCLS
Certified Enzyme Reference Material for Pseudo-ChE**

高木 康 (JCCLS 認証委員会委員長、昭和大学医学部教授)

**Yasushi Takagi (Chairperson of JCCLS Certification Committee for Reference
Materials, Professor, Showa University School of Medicine)**

細萱茂実 (JCCLS 認証評価委員会委員長、東京工科大学教授)

**Shigemi Hosogaya (Chairperson of JCCLS Committee for Certification Assessment,
Professor, Tokyo University of Technology)**

1. はじめに

常用参照標準物質：ChE (JCCLS CRM-002)
のロット更新を行い、新ロット (JCCLS
CRM-002d) を設定した。設定手順と認証書
を国際文書に従い準備した。

2. 委員

2.1 認証委員会：高木康 (昭和大学)、矢
富裕 (東京大学)、前川真人 (浜松医科
大学)、濱崎直孝 (長崎国際大学)、細
萱茂実 (東京工科大学)

2.2 認証評価委員会：細萱茂実 (東京工
科大学)、石橋みどり (新東京病院)、
市原文雄 (積水メディカル株式会社)、
植田成 (旭化成ファーマ株式会社)、大
澤進 (国際医療福祉大学)、高津章子 (産
総研)、田中龍彦 (株式会社シノテスト)、
美咲英生 (日本臨床化学会)、山舘周恒
(人間総合科学大学)

2.3 事務局：加藤英夫、梅田衛

3. 経過の概要

3.1 候補品の製造計画

平成 27 年 9 月 4 日に認証評価委員会
を開催し、常用参照標準物質：ChE のロ
ット更新に伴う候補品の製造計画を立
案した。

現ロット CRM-002c の有効期限が平成
28 年 9 月であることから、それまでに
次ロットを頒布できるよう、候補品製造
の公募から進めることとした。

製造本数は、現ロットの販売推移と有
効期限 (7 年) を考慮し、5 年程度での
販売終了を想定し 3,000 本とした。

値付け施設は原則的に公募とし、現ロ
ットで協力を得た日本臨床検査薬協会
加盟会社と、病院関連施設に値付けを委
託し、値付け委託承諾書、値付け施設に
関する技能チェック、外部精度管理の評
価結果等の一連の手続きを実施する予

定とした。

これらの製造計画について認証委員会の了承を得た。

3.2 候補品製造の公募

常用参照標準物質：ChE（JCCLS CRM-002）のロット更新にあたり、候補品製造の公募を平成27年10月21日に行った。公募内容は前ロット（JCCLS CRM-002c）の設定条件および規格を継続することとした。候補品製造の公募日は、前ロットと同様に候補品の製造期間を考慮した。

3.3 公募結果

常用参照標準物質：ChEの候補品製造の応募が平成27年10月27日旭化成ファーマ(株)からあった。これにより候補品製造を旭化成ファーマ(株)に依頼した。

3.4 認証値設定試験

認証値設定試験は、現ロットと同様に共同試験方式による手順で進めた。すなわち、1) 共同試験への参加依頼、2) 試薬調製依頼、3) 試験要綱、測定条件、報告書書式の作成、4) 試料配布、5) データ集計・解析、6) 認証評価委員会の開催などである。認証評価委員会では、データの解析・評価と認証書案等を作成した。作成した認証書案および取扱説明書案は認証委員会に提出した。

4. 認証値設定試験成績の概要

平成28年7月7日に認証評価委員会を開催し、認証値設定試験における測定データの解析・評価および認証書案と取扱説明書案の作成を行った。本委員会での主な協議の概要は以下のごとくである。

4.1 認証値の設定手順

- ・新ロットの認証値と不確かさの設定は、原則として常用基準法で行うことが基本である。一方、現実的な問題としてロット間の継続性を重視することも重要であり、現ロットと新ロットについて、常用基準法、自動化法の両者を用い、認証値と不確かさを設定した。
- ・試薬は用手法/自動化法ともにJSCC/JCCLS常用基準法に基づく同じ処方を使用し、日本臨床検査薬協会を通じ、基本的に前ロットと同様にシノテスト株式会社に依頼した。
- ・用手法の試験参加施設は8施設であり、現ロット1バイアルと新ロット候補品3バイアルのそれぞれを2重測定した。
- ・自動化法の試験参加施設は16施設であり、現ロット1バイアルと新ロット候補品3バイアルのそれぞれを5重測定した。
- ・認証値の設定は、ISO Guide 35に基づく認証値設定手順書(Ver. 1.9)に準じ、候補品の均質性の確認を含めて実施した。また、不確かさの算出には、ホームページ掲載の不確かさの計算ソフト(Ver. 5.52)を用いた。

4.2 保存安定性の不確かさ

- ・新ロット(CRM-002d)の認証値決定のための重要要因となる長期安定性の成績と、それに基づく安定性不確かさの結果について、旭化成ファーマ(株)による報告を受けた。
- ・現行ロット(CRM-002c)の保存期間6.5年までの蓄積データが得られており、これに基づく不確かさ、分散分析によって求めた不確かさ、 -80°C と -20°C 保存での測定値の推移をそれぞれ確認し、保存

安定性に問題がないことが示され、保存安定性の不確かさが0.224%となることを確認した。

4.3 認証値と不確かさ

- 現ロットと新ロット候補品を JSCC/JCCLS 常用基準法（用手法）で測定しそれぞれの総平均値を求めた。現ロットの常用参照標準物質の平均値は、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ることを確認した。
- 一方、用手法は参加施設も少なく不確かさが大きくなってしまいうため、ロット間の継続性維持を考慮し現ロット CRM-001c をキャリブレーターとして用いた自動化法で、新ロット CRM-001d の値付けとその不確かさを求めることで承認を得た。
- 自動化法による新ロット候補品の測定値の平均値は、常用基準法による候補品の測定値の不確かさの範囲内にあり、この値を前ロットとの継続性を考慮した新ロット候補品の認証値候補とした。
- 認証値は ISO Guide 35 に従い決定し、不確かさの成分は、均質性と実験誤差成分、校正に用いた標準物質の不確かさ、および安定性を含む総合的な拡張不確かさ（包含係数 $k=2$ ）とし、新ロットの認証値候補と不確かさの値は 539 ± 9 ($k=2$) となった。不確かさの成分ごとの大きさをバジェット表（CRM-002d の不確かさ成分の相対標準不確かさに関するバジェット表）にまとめた。
- 今後の課題として、常用基準法（用手法）の測定手順で、現ロットの測定バイアル数を増やすなど、不確かさを小さくする改善策を検討すること、また用手法を実施できる人材育成を認証評価委員会とし

ても積極的に取り組んでいくことの必要性を確認した。

- 常用参照標準物質：JSCC 常用酵素（JCCLS CRM-002）を用いた測定法の総合的な不確かさの評価と許容限界について、ユーザーが常用参照標準物質を測定法の評価に使用する場合の参考として会誌およびホームページに掲載する。

4.4 継続性確認試験

- 認証値設定試験において、常用参照標準物質の継続性を確認するための追加試験を、日本臨床検査薬協会を通じて今回の試験参加企業と、病院関連施設に依頼することとした。
- 測定結果を JCCLS 事務局に回収し、CRM-001c と CRM-001d 候補品との継続性に特に問題となる成績がないことを確認した。

5. 認証委員会

平成 28 年 7 月 22 日開催の常任理事会および 8 月 5 日の認証委員会（メール会議）において、前述の認証評価委員会の報告、認証書および取扱説明書について確認と承認を行った。また、ラベル、認証書、取扱説明書の印刷、発売、頒布、ホームページ公表などのスケジュールについて協議した。

最後に、今回のロット更新作業は平成 27-28 年度 JCCLS 認証評価委員会が担当した。また、測定の実施についての試薬などの準備は一般社団法人日本臨床検査薬協会・技術委員会を通じて依頼した。共同試験に際し、以下のユーザー施設ならびにメーカー施設の協力を得た。ここ

に関係者に深く謝意を表します。

旭化成ファーマ(株)、栄研化学(株)、関東化学(株)、九州大学病院、慶應義塾大学病院、(一社)検査医学標準物質機構、シスメックス国際試薬(株)、(株)シノテスト、順天堂大学医学部附属浦安病院、(株)セロテック、千葉大学医学部附属病院、天理医療大学/天理よろづ相談所病院、ニットーポ

ーメディカル(株)、日本大学医学部附属板橋病院、浜松医科大学医学部附属病院、山梨大学医学部附属病院、ロシュ・ダイアグノスティックス(株)、和光純薬工業(株) (以上五十音順)

表 CRM-002d の不確かさ成分の相対標準不確かさに関するバジェット表

不確かさの成分	標準不確かさ (U/L)	相対値 (%)
測定に伴う成分	0.4	0.07
均質性の成分	1.0	0.19
上位標準の成分	4.1	0.79
保存安定性成分	1.2	0.224
合成標準不確かさ	4.4	0.82

JCCLS CRM-002 の認証値設定手順 (Ver.1.9)

Applied Procedure for Certified Value on Reference Standard for Pseudo-ChE Method (Ver.1.9)

序 論

ISO Guide 35¹⁻²⁾に基づき、常用参照標準物質：ChE (JCCLS CRM-002) 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。

また、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³⁻⁴⁾。なお、基準測定操作法 (SOP) については別に定める。

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）。

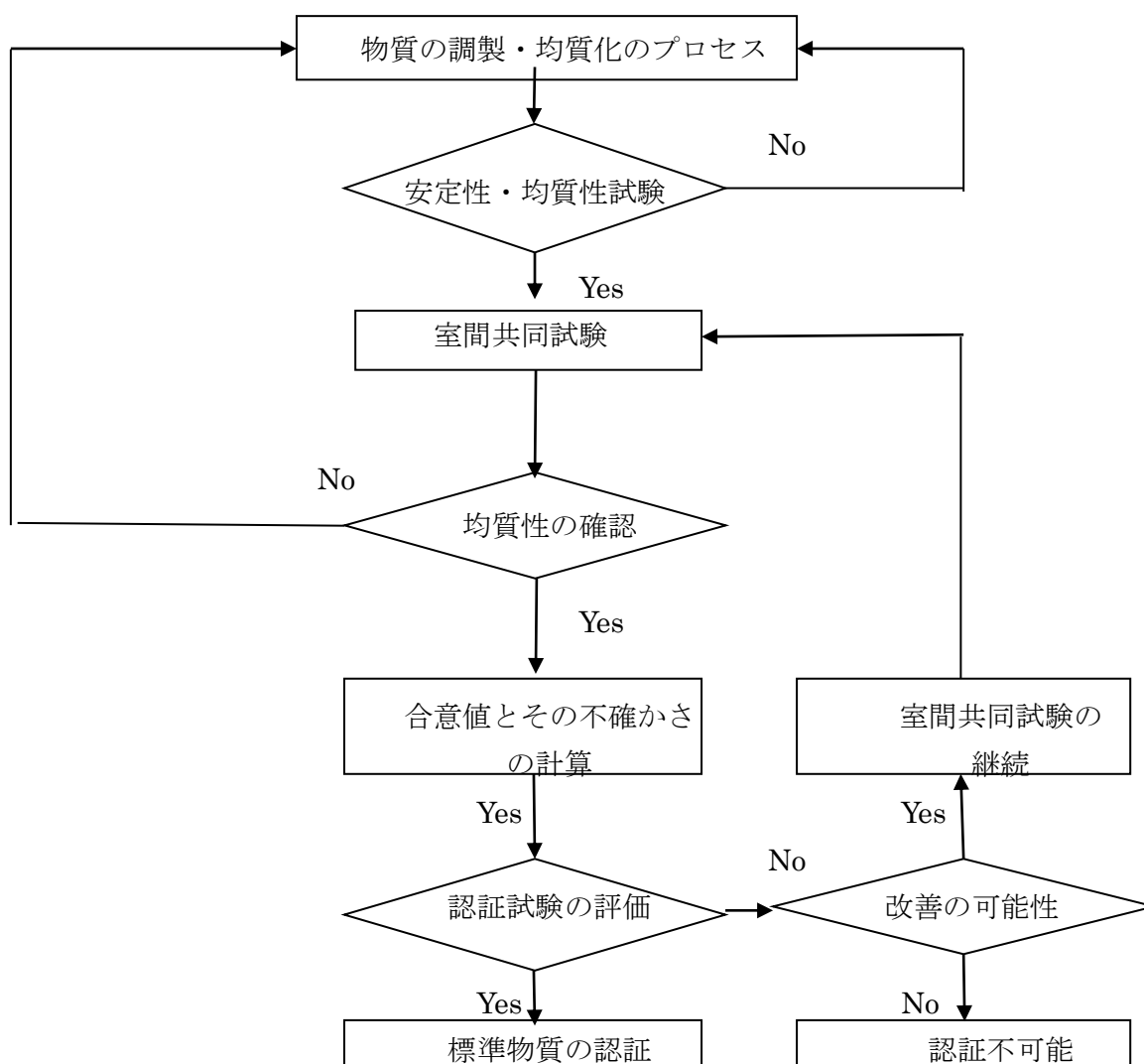


図1 室間共同試験における合意による標準物質の調製と認証手順の概要
(ISO Guide 35 より引用し一部変更)

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、 μ は総平均で特性の期待値、 α_i は i 試験室の室間誤差、 β_{ij} は j バイアルによる誤差、 ε_{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 σ_A^2 、バイアル間誤差の分散を σ_B^2 、試験室内の測定誤差の分散を σ_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_j 、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。

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

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

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。

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

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

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

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

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

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	σ_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 μ 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⁴⁾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^{5, 6)}、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) 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
- 5) 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
- 6) Thomas P. et al. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs. Fresenius J Anal Chem 370:183-188, 2001

常用参照標準物質：ChE（JCCLS CRM-002d）を用いた 測定法の総合的な不確かさの評価と許容限界について

Evaluation of Measurement Uncertainty and Allowance Limits for Measurement Procedure using Reference Standard for Pseudo-ChE Method（JCCLS CRM-002d）

血清酵素活性測定法の総合的な不確かさの評価を目的として、認証値とその不確かさが明示された常用参照標準物質を用いた評価手順と許容限界について規定する。測定プロセスの信頼性は、認証標準物質を用いて評価できるが、評価の方法は関連する国際規格 ISO Guide 33（日本工業規格 JIS Q 0033 対応）¹⁻²⁾ に基づく手順とする。なお、認証標準物質を用いた測定プロセスの評価は、標準物質との反応性（commutability）が確保された場合に適用できる。

標準物質を用いた測定プロセスの評価には、精確さに影響を与える多くの不確かさの成分を明確化する必要がある。一般的に考慮すべき成分として、標準物質の不確かさ（認証値の不確かさ）、測定条件に伴う不確かさとしての室間・室内誤差がある³⁾。ISO Guide33 によれば、一施設における測定プロセスの評価は、認証標準物質の室内再現条件による n 回の反復測定より、測定値の平均値と認証値との差を求め、真度の評価はそれらの一致の程度（ ± 2 倍の測定プロセスに伴う標準偏差の範囲内にあるか否か）で行う。測定プロセスに伴うばらつきの分散は（認証値の誤差分散+室間分散+室内分散/ n ）で求めるが、 $n > 10$ のとき室内誤差は無視し得る。

また、評価限界値の設定において、標準物質の不確かさは常用参照標準物質（CRM-002d）の認証書の値を用い、室間変動の大きさは日本医師会および日本臨床衛生検査技師会主催の精度管理調査結果における JSCC/JCCLS 標準化対応法の認証値に近い濃度試料の 1 回切断補正後の変動係数の値を用いる⁴⁻⁷⁾。ここで、これら全国規模の精度管理調査において、異常報告値を除いた標準化対応法の施設間変動は、現在の技術水準を反映すると考える。

上記に基づき総合的な不確かさの評価に用いる許容限界値とその相対値を表に示す。

[文献]

- 1) ISO Guide 33 : Uses of certified reference materials, 2000.
- 2) JIS Q 0033 : 認証標準物質の使い方, 2002.
- 3) JCCLS 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 : 3-52, 2004.

- 4) 細萱茂実, 尾崎由基男, 桑 克彦: 常用酵素標準物質を用いた測定法の真度評価と許容限界. 日本臨床検査自動化学会会誌 30, 2005.
- 5) 日本臨床衛生検査技師会: 平成 25 年度日臨技臨床検査データ標準化事業報告書, 2014.
- 6) 日本医師会: 平成 26 年度第 48 回臨床検査精度管理調査結果報告書, 2014.
- 7) 細萱茂実: 健診・人間ドックと測定技術水準. 臨床病理 64: 278-283, 2016.

表 常用参照標準物質を用いた総合的な不確かさの評価における許容限界
(CRM-002d による JSCC/JCCLS 標準化対応法の評価限界)

酵素	認証値(U/L)	不確かさ(U/L)	許容限界(U/L)	相対値(%)
ChE	539	± 9	± 14	±2.6