

目次

- 1 総論
 - 1.1 はじめに
 - 1.2 本ガイドラインの対象
 - 1.3 本ガイドラインの位置づけ
 - 1.4 微量検体免疫分析装置の臨床的意義
 - 1.5 使用施設

- 2 測定装置
 - 2.1 概要（微量検体免疫分析装置について）
 - 2.2 基本的事項
 - 2.3 安全性評価
 - 2.4 性能評価
 - 2.5 標準溶液
 - 2.6 試薬調製
 - 2.7 検体調製
 - 2.8 測定制御用プログラム

- 3 測定、データ解析
 - 3.1 測定
 - 3.2 データ解析
 - 3.3 リスク分析

- 4 装置管理
 - 4.1 装置校正
 - 4.2 日常管理・保守点検
 - 4.3 分析法バリデーション

- 5 トラブルシューティング

- 6 参考文献

微量検体免疫分析装置に関するガイドライン案

1. 総論

1.1 はじめに

分析機器の進歩により医療検査のデバイス化やその小型化が進み、近い将来、これまで大病院や分析専業会社の高度な分析機器で行われていた検体検査がクリニックや家庭で行われるようになると予想される。少子高齢化による在宅医療の拡大への対応、クリニック等、小病院への検査業務の分散と合理化、家庭における予防医学的な用途等により国民医療費の抑制に大きく貢献すると期待されている。

医療検査のデバイス化やその小型化は、検体採取量が超微量となり人への負担が小さくなるばかりでなく、採血等の検体採取も、医師や看護師のような専門技術を持たない人がおこなえるようになり、一方では分析技術者などの専門技能職も必要としない分析機器になることが予想される。

その反面、必要検体量がマイクロリットルオーダー以下の超微量になると、従来の検体量の分析法では考慮する必要のなかった採血部位依存性等の課題が生じてくる。また、試薬等も超微量になるため、その調製法や保存法等、微量であるが故に生じるさまざまな技術的課題も生じる。したがって、さまざまな観点から、超微量分析装置に対する評価指標を定めておく必要がある。

以上の背景から、超微量検体を用いた酵素結合免疫法（Enzyme-linked immunosorbent assay：ELISA）等による測定装置（微量検体免疫分析装置）について、科学的根拠を基にした性能評価を適正且つ迅速に行い、当該装置開発の促進、活性化を図る目的で本ガイドラインを作成した。

1.2 本ガイドラインの対象

本ガイドラインでは、採取量がマイクロリットルあるいはミリグラム程度以下の超微量検体（血液、尿等）中に存在する生理活性物質（バイオマーカー）等を測定するためにマイクロ流体デバイス等を用いた微量検体免疫分析装置を対象として、測定において留意すべき事項（検体の採取と取扱い、標準物質、試薬の取扱い、日常管理等）について詳述する。

1.3 本ガイドラインの位置づけ

本ガイドラインは、超微量検体を測定対象とした免疫分析装置を開発する上で求められる性能のうち、現段階で重要と考えられる事項を示したものである。従って、今後のさらなる技術革新や臨床での用途に応じて求められる評価項目やその充足度（達成度）も異なる。装置の評価にあたっては、個別の装置の特性を十分理解した上で、科学的な合理性をもって柔軟に対応することが必要である。また、本ガイドラインのほか、国内

外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

1.4 微量検体免疫分析装置の臨床的意義

微量検体免疫分析装置の開発においては、その装置使用の簡便さに加えて検体採取の低侵襲性と簡便さがポイントとなる。

検体の採取が超微量であることで、人体への負担が軽減されるとともに、眼房水のように元々微量しか採取できない検体の利用が可能となる。また、現在、検体採取が困難な新生児、小児からの検体採取も比較的容易になる。

簡便な検査であることで、患者の状態（正常、要再検査、重症の三段階）をスクリーニング的に迅速に把握可能となる。クリニック等の小規模医療機関で用いて判定できれば、要検査の患者に対してのみ、大病院での精密検査を促すようにできる。このことは基幹となる病院の役割分担に貢献し、医療費の抑制にもつながる。

将来的に、取り扱いにおいて手間や技術を必要としない方法になれば、医師や看護師のように専門知識を有しない人物でも対象患者の年齢、性別、状態を問わずに検体採取が可能となり、クリニックのような小規模の医療機関、さらには災害時等の緊急医療時にその使用が可能となる。

1.5 使用施設

本ガイドラインではクリニックや個人病院等を含む医療機関において、医師、看護師又は臨床検査技師等が取り扱うことを想定している。

2 測定装置

2.1 概要（微量検体免疫分析装置について）

一般的に、微量検体免疫分析装置とは、マイクロ流体デバイス等^{*}と高感度検出器を組合せて酵素結合免疫測定（Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA）等をシステム化した新しい機能を有する小型の微量分析装置である。

（※）マイクロ流体デバイスとは、ガラスやプラスチック等の基板上に数 μm ～数 $100\mu\text{m}$ サイズの微小流路を作り込み、検体や検査試薬が流路を流れる間に分析プロセスが完了する新しい機能デバイス技術である。

2.2 基本的事項

(1) 開発の経緯、品目の仕様、国内外での仕様状況、設計開発、意図する仕様方法等を明確に示すこと。

(ア) (2) 以下の事項を参考に、装置全体の設置、運用に当たっての留意事項等に

ついて評価すること。反応原理、検出原理（反応部、検出部等の機構についての原理を詳細に示すこと：参考資料 1、図 1～4 参照）

- (イ) 反応部と装置の構造（形状・サイズを含めた装置本体の仕様、装置を構成する各構成要素の仕様及び機能概略を示すこと）
- (ウ) 安定性（保管、配送、設置及び移動時）
- (エ) 設置（質量、寸法、転倒防止対策）
- (オ) 騒音・振動
- (カ) トレーニング計画の必要性とその内容
- (キ) 利用者向け操作マニュアル等の文書化の適切性
- (ク) 周辺環境対策（電磁波、温度等）
- (ケ) 使用環境（病院、施設）

2.3 安全性評価

以下に示す各事項を参考に、装置の安全性評価を適切に行うこと。

- (1) 電気的安全性及び電磁両立性
- (2) 機械的安全性
- (3) 品質マネジメント
- (4) リスクマネジメント

不具合が発生すると、ばらつきの原因となり、重大な装置トラブルに発展する可能性がある構成要素に関しては、あらかじめ、そのリスク分析を行うとともに、不具合発生を検出・防止するための適切な機能を備える等、適切な対策を施していることを示すこと。具体的な構成要素の例としては以下のものが挙げられる。

- ・送液部
- ・導入部（オートサンプラー等）
- ・反応部（カラム、微小流路、恒温装置等）
- ・検出部
- ・装置部（プログラムを含む）

2.4 性能評価

- (1) ハードウェア一般

- ・マイクロ流体制御部

- (ア) 流速・圧力制御

対象とする検体の測定時に求められる至適な流速及び圧力が設定可能な制御域をもつこと。また、その設定した値に対する実際の流速及び圧力が許容可能な誤差内で安定することを示すこと。

- (イ) 検体注入

試薬類の注入部分の仕様を考慮して、その方法、注入可能な容量範囲及び至適容量を示すこと。また、超微量検体測定のためには、検体を含む試薬類の装置への注入精度が極めて重要となるため、注入部分の仕様に応じた適切な方法でその精度について評価すること。(参考資料 2、操作と機能についての検討 1 項参照) また、必要であれば、その精度検証を行うべき妥当な頻度を設定すること。

(ウ) デッドボリューム (流路およびバルブ等の装置構成において)

高感度を保つため、可能な限り、デッドボリュームの量を減らすように装置を構築すること。また、装置に生じたデッドボリュームが実際の測定値に与える影響について検討すること。

・その他

(エ) 温度制御

測定時に必要な温度が設定可能な制御域をもち、その温度を許容可能な誤差内で安定して保持できることを示すこと。あるいは、外部温度による影響を内部補正可能な機構を備えていることを示すこと。

(オ) 抗体固定化法

一次抗体を抗原抗体反応部位に固定化するため、抗体の結合能を可能な限り維持可能な至適反応条件を検討しておくこと。あるいは抗体の種類に応じた至適反応条件を決定するためのプロトコールを構築しておくこと。(参考資料 2、固相化方法に関する検討参照) そのために、以下の項目に関して、その妥当性評価も含めた検討を行っておくこと。

- ・用いる抗体の抗原に対する特異性評価
- ・抗体導入率測定方法設定
- ・導入後の抗体活性測定方法設定
- ・測定対象物質に応じた至適な一次抗体導入率設定 (反応条件選定を含む)
- ・抗体固定化の再現性確認
- ・抗体及び試薬の安定性確認 (保存条件及び使用期限の設定)

(2) 分析性能

(カ) 検出感度 (LOD/LOQ)

測定対象とするバイオマーカーの臨床的意義のある濃度域を設定できること。また、その濃度域において、十分な検出感度を有することを確認するため、その検出限界濃度および定量限界濃度を判定すること。(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 2 項参照)

(キ) ダイナミックレンジ

対象とするバイオマーカーの測定において、様々な濃度について試験を行い、精

度よく定量できる濃度範囲を示すこと。(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 8 項参照)

(ク) 再現性・頑健性

適切な濃度の複数のサンプルを使用した繰り返し測定を行うとともに、各種測定条件を適切な範囲内で変動させて測定を行い、微量検体測定での再現性及び頑健性について検証すること。その際、繰り返し回数、使用検体、条件変動範囲等に関する妥当性を示すこと。また、必要に応じて、外部精度管理の方法に関する情報を提供すること。(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 3 項参照)

(ケ) 正確性

臨床的に必要な測定範囲内で得られた測定値の妥当性(正確性)を評価するために、国際標準品または外部精度管理物質等を使用した試験を行うこと。(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 4 項参照)

(コ) キャリーオーバー

実際の使用時では、同一装置で複数の患者検体を測定することから、前の高濃度の持ち越し誤差(キャリーオーバー)で生じる測定誤差を防ぐため、検体間のキャリーオーバー対策を講じるとともに、適切な試験により測定時にキャリーオーバーによる影響が無いことを示すこと。(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 5 項参照)

(サ) 相関性

同一採取法の検体を用いて、従来法による測定値と微量検体による測定値の比較を行い、その相関性を確認すること。(参考資料 4、検体調整および測定条件に関する検討 2 項参照)

(シ) 共存物質の影響

対象とする物質の測定時に抗原抗体反応や基質の酵素反応を妨害する可能性のある物質(血液中のヘモグロビン、ビリルビン、脂質などや投薬された薬物等)について、あらかじめ評価しておくこと(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 6 項参照)。また、測定機構に影響を与えうる混入物全般の影響についてもあらかじめ評価を行い、その影響を排除可能な機構を備えていることを示すこと。

(ス) 希釈直線性

試料を段階的に希釈し、試料の希釈倍率と測定値が比例関係にある事を確認すること。(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 7 項参照)

(セ) 添加回収試験

試料に目的成分を一定量加え、添加した量が正確に定量されるかどうかを確認すること。(参考資料 2、操作機能と性能に関する検討 9 項参照)

2.5 標準溶液

(1) 作製方法・使用方法

ELISA 法を基礎原理とするため、微量検体免疫分析装置では外部検量線法による相対定量が基本となる。外部検量線法では、目的物質の検体濃度を求めるために、既知濃度の標準物質を含む標準溶液を用いて、標準物質と測定値との関係線を作成し、検体を同様に処理して得られたシグナル強度から目的物質の濃度を求めることができる。検量線用の標準溶液の作製にあたっては、濃度範囲の設定根拠、作製方法及び使用方法について明記すること。(参考資料 2、標準物質に関する検討 1 項参照) なお、分析バリデーション等に用いる陽性対照に使用するための標準溶液に関しても、同様にその濃度の設定根拠、作製方法及び使用方法を示すこと。

(2) 保存条件

標準溶液は、開封前後の保存安定性を評価した上で、適切な保存条件(温度、保存液量、保存容器等)、有効期限、ロット管理および在庫管理等を設定すること。なお、保存容量を超微量とする場合は、容器への吸着等に留意して保存に必要な最低液量、最低濃度等を設定するとともに、その保存条件の妥当性について評価すること。(参考資料 3、標準物質に関する検討 2 項参照)

2.6 試薬調製

微量検体免疫分析装置において、抗原固定化反応以外に必要な試薬としては、以下のものが挙げられる。

- ・ 溶媒 (移動相)
- ・ 酵素修飾二次抗体
- ・ 基質

ELISA 法を基礎原理とすることから、溶媒には抗原抗体反応及び基質との反応を妨げないものを選ぶこと(一般的には、pH 7.4 前後のリン酸緩衝生理食塩水等が用いられる)。検体中の測定対象物質想定量を考慮して、最適な結果が得られるよう二次抗体の溶液濃度及び注入量を設定すること。また、ELISA の場合には、測定原理に応じて最適な酵素-基質の組合せを選択するとともに、検出に適切な基質濃度、溶媒溶解時の各種試薬安定性等を検討しておくこと。

2.7 検体調製

(1) 検体の種類

主に血液(全血、血漿、血清)および尿を対象とする。その他、髄液、穿刺液等があげられるが、使用する検体が、測定対象物質の測定に妥当である科学的根拠を示すこと。

(2) 採取量・方法・部位

検体の採取量は、機器の仕様を基に適切な量を設定すること。また、患者への負担を

考慮し、可能な限り痛みや苦痛を軽減できる採取方法及び部位を選択すること。検体が血液の場合、微量採血をする身体の一部による測定値の違いを考慮する必要があるため、定量可能範囲（特に定量下限値）に留意して採取部位依存性評価を行うこと。

（参考資料 4、検体調整および測定条件に関する検討 5 項参照）また、溶血による測定値への影響についても評価を行うこと。

(3) 前処理

検体の希釈条件に関する検討を行い、測定への影響が最も少ない検体種類に応じた適切な希釈方法を設定すること。また、検出感度及び濃度域を考慮して、測定前には適切な倍率で検体を希釈すること。希釈以外の前処理を必要とする場合、例えば検体に血漿、血清を用いる場合には、その前処理が測定結果に及ぼす影響を検討し、その影響がないことを確認すること。（参考資料 4、検体調整および測定条件に関する検討 1 項参照）また、ヘパリン等の抗凝固剤による前処理など他の前処理が測定に及ぼす影響についても検討すること。（参考資料 4、検体調整および測定条件に関する検討 7 項参照）

(4) 保存方法

検体採取、前処理後、すべての段階のサンプルにおいて、保管法および輸送法を検討し、適切な保存条件を設定すること。（参考資料 4、検体調整および測定条件に関する検討 6 項参照）

2.8 測定制御用プログラム

装置のプログラム構成（ユーザー操作部分、機器制御部分、データ管理及び解析部分等）及びその機構について示すこと。ユーザーの操作ミスや機器に異常が発生した場合の対応策についても必要であれば示すこと。なお、プログラムは、JIS T 2304 に適合していることが望ましい。

本装置を用いて取得したデータは、測定日時、検体名、試薬ロット、測定方法等の情報を含めて管理されていることが要求される。

3 測定、データ解析

3.1 測定

測定対象検体の超微量測定にあたり、反応速度等、装置の各種パラメーターが測定値のばらつき要因となる可能性があるため、分析条件（検体注入量、流量、圧力、温度等）の検討をおこない、最適化したプロトコルを構築して測定を行うこと。（参考資料 3、測定条件に関する検討参照）必要であれば本測定の前後に陰性対照及び陽性対照となる標準物質あるいは管理物質を用いた測定を行い、測定結果の安定性を確認すること。

検体内のバイオマーカー定量にあたり、検量線を測定毎に作成するのか、あるいは測定前後の陰性対照及び陽性対照標準物質を用いた測定結果を基に過去の検量線による

定量が可能と判断するのか等、定量時の懸念事項については、あらかじめ評価しておくこと。

3.2 データ解析

解析プログラム、解析原理、解析フロー及び統計分析方法等、測定にあたって実際に使用する方法をその科学的妥当性ととも示すこと。

3.3 リスク分析

誤った測定結果が得られた場合に起こりうる診断上のリスクについて、文献等を使って評価すること。

4 装置及び試薬等の管理

4.1 装置校正

一定期間毎に標準物質による装置の性能評価を実施し、十分な感度が得られない場合は、メーカーによる点検を実施し、感度調整を行うこと。

4.2 日常管理・保守点検

洗浄機構の詰まりや汚れ、液漏れを防ぐために十分且つ妥当な洗浄・保守方法及び対象部位を示すこと。または、そのための機能を装置に装備しておくこと。消耗部品に関しては、適切な耐用期間を設定すると同時に、定期交換を行うこと。また交換後にはバリデーションを行い、通常時に期待される性能との同等性を確認すること。

4.3 分析法バリデーション

一定期間毎に陰性対照及び陽性対照となる標準物質あるいは管理物質を用いてバリデーションを行い、測定結果の信頼性を担保すること。抗体固定化条件、検出部、測定条件等を変更した場合にも、適切なバリデーションを実施すること。バリデーションにおいては、適切な理論（統計学的手法、FUMI理論等）を基に、許容可能な標準物資の測定誤差範囲を設定し、その範囲を逸脱した場合は洗浄や部品交換等、トラブルシューティングも参照して必要な措置を行うこと。

5 トラブルシューティング

微量検体免疫分析装置において、不具合が発生するとバラツキの原因となり、放置すると重大な装置トラブルに発展する可能性がある機構を以下に示す。

- ① 反応部（チップ）
- ② 試薬/検体を正確・精密に分注する分注機構
- ③ 検体と試薬を均一にする攪拌機能

④ 検出機構

機構ごとにトラブルの発生する要因を整理してトラブルシューティングとして取りまとめておき、トラブル発生時の解決手段を文書化しておくこと。

6 参考文献

- 1) 生化学および免疫化学自動分析装置のための実践精度管理マニュアル：Ver.1.0
2013年4月1日 JJCLA（日本臨床検査自動化学会）
- 2) POCTガイドライン第3版：2013年4月1日 JJCLA（日本臨床検査自動化学会）
- 3) 次世代型高機能人工心臓の臨床評価のための評価指標：平成20年4月4日 薬食機発第0404002号
- 4) 整形外科用カスタムメイド人工膝関節に関する評価指標：平成24年11月20日 薬食機発1120第5号
- 5) テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発ガイドライン2007「遺伝子型（ジェノタイピング）検定用DNAチップに関して」：平成19年5月 経済産業省