

FT+によるケトン体の測定精度に関する調査試験

1. 目的

光学式多成分測定機（以下 FT+という）の測定項目としてケトン体が新たに追加され、本会では平成 26 年 6 月に道北事業所にオプションとして導入した。

ケトン体とは、アセトン（AC）、 β -ヒドロキシ酪酸（BHB）、アセト酢酸（ACAC）の総称であり、乳牛の代謝性疾患である潜在性ケトosis診断の指標として用いられる。FT+では、ケトン体のうち BHB と AC が測定可能であり、これらの測定精度の確認と運用基準について検討を行ったので報告する。

2. 方法

(1) FT+の標準化

月 1 回の頻度で、イコライザー試薬により FT+の標準化を実施した。

(2) 調査期間

平成 26 年 6 月～平成 27 年 7 月

(3) ZERO 点調整

測定機稼動前の確認として、ZERO 点調整を 2 回以上実施した。

(4) 精度管理用試料の測定による稼動前確認

測定機稼動前の精度管理用試料には市販の LL 牛乳を用いた。LL 牛乳は同一ロットを連続 2 ヶ月間使用し、2 ヶ月毎に新ロットへ切り替えを行い、調査期間中には述べ 6 ロットを使用した。

測定機は検査開始前に ZERO 調整を行った後、LL 牛乳を連続 6 回測定しケトン体測定値の確認を行った。

(5) 個体乳検査データの中央値、平均値ならびに日間変動

調査期間中に個体乳検査を実施した 263 日間における BHB および AC の個体乳検査データの日ごとの中央値ならびに平均値と、日間変動（SR）について検討した。

(6) クロスチェック

道北事業所および十勝農協連に配備されている FT+の 2 測定機において、BHB および AC 濃度の異なる同一試料を用いクロスチェックを行い、複数測定機間における精度管理基準について検討を行った。

(7) 参照法分析との検証

予め FT+で測定を行った個体乳試料 100 検体について、新得畜産試験場に依頼し、BHB 分析キット (N-アッセイ 3-HB, ニットーポー) を用い、生化学自動分析装置 (ベッグマン コールター AU480) により BHB を測定し、FT+との比較を行った。

(8) 保存料添加による影響

個体乳試料の保存料として用いられるプロモポール顆粒 (マイクロタブレット) が BHB および AC 測定値に及ぼす影響について検討を行った。保存料は規定量である 1 粒を LL 牛乳 30ml に添加した。

(9) 精度管理基準の検討

収集したデータに基づいて、BHB および AC の精度管理基準の検討を行った。

3. 結果および考察

(1) ZERO 点調整

調査期間中における ZERO 点調整データの集計値を表 1 に示した。平均値は、BHB が -0.489mM/L、AC は 1.677mM/L であった。日間変動 (SR) は、BHB の 0.002mM/L に対し、AC は 0.241mM/L と変動が大きかった。

表1 ZERO調整の平均値ならびに日間変動

	BHB		AC	
	平均 mM/L	併行精度(Sr) mM/L	平均 mM/L	併行精度(Sr) mM/L
平均	-0.489	0.002	1.677	0.409
最大	-0.481	0.009	2.464	1.345
最小	-0.495	0.000	0.917	0.018
日間変動 (SR)	0.002	0.002	0.241	0.206

(2) 精度管理用試料の測定による稼動前確認

LL 牛乳のロット別 BHB、AC の平均値および標準偏差を表 2 に示した。BHB、AC とともにロット間のバラツキは小さく、BHB の平均値は約 0.04mM/L、AC は 0.06 ~ 0.10mM/L の範囲内であった。併行精度の平均は BHB が 0.009mM/L、AC は 0.020mM/L とメーカー公称値の範囲内であった。

表2 精度管理用試料の平均値、併行精度ならびに日間変動

ロット	BHB		AC	
	平均 mM/L	併行精度(Sr) mM/L	平均 mM/L	併行精度(Sr) mM/L
1	0.043	0.009	0.055	0.018
2	0.044	0.010	0.092	0.020
3	0.041	0.010	0.096	0.022
4	0.039	0.009	0.096	0.020
5	0.044	0.009	0.087	0.020
6	0.039	0.009	0.076	0.019
平均	0.042	0.009	0.084	0.020
日間変動(SR)	0.009	0.003	0.016	0.007

(3) 個体乳検査データの中央値、平均値ならびに日間変動

表3 個体乳測定値の日ごとの中央値および平均値

	中央値		平均		検体数 (1日当り)
	BHB mM/L	AC mM/L	BHB mM/L	AC mM/L	
平均	0.030	0.010	0.042	0.032	945
Max	0.06	0.06	0.21	0.09	2984
Min	0.00	0.00	0.02	0.00	11
日間変動(SR)	0.011	0.011	0.023	0.012	

(4) クロスチェック

同一試料における道北事業所と十勝農協連の FT+測定値について回帰分析を行い、その散布図を図 1 および図 2 に示した。

BHB の平均値は、道北 FT+で 0.120mM/L、十勝 FT+で 0.102mM/L と近似値を示し、両機の相関係数は 0.952 と強い相関性があり、回帰式は、道北 FT+ = 十勝 FT+ × 1.024 + 0.015、標準誤差は、0.032mM/L であった。

AC 平均値は、道北 FT+で 0.163mM/L、十勝 FT+で 0.151mM/L と近似値を示し、両機の相関係数は 0.789 と強い相関性があり、回帰式は、道北 FT+ = 十勝 FT+ × 0.833 + 0.037、標準誤差は、0.134mM/L であった。AC 測定値 0.5mM/L 以下の試料においては、相関係数 0.861、回帰式が、道北 FT+ = 十勝 FT+ × 0.867 + 0.020、標準誤差は 0.057mM/L であった。

图1 BHB:道北 vs 十勝

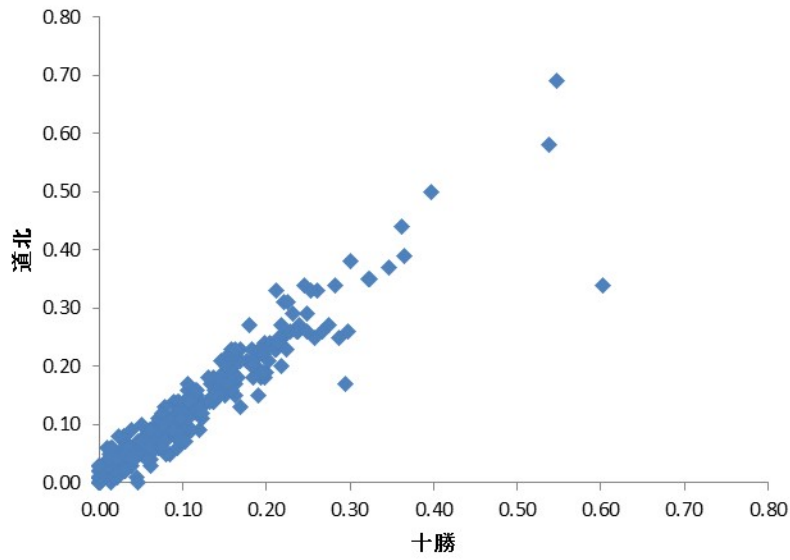
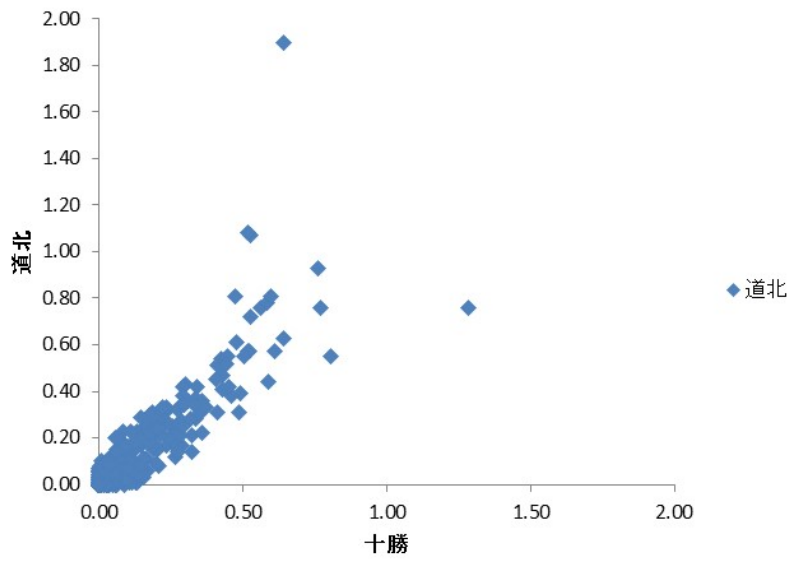


图2 AC:道北 vs 十勝



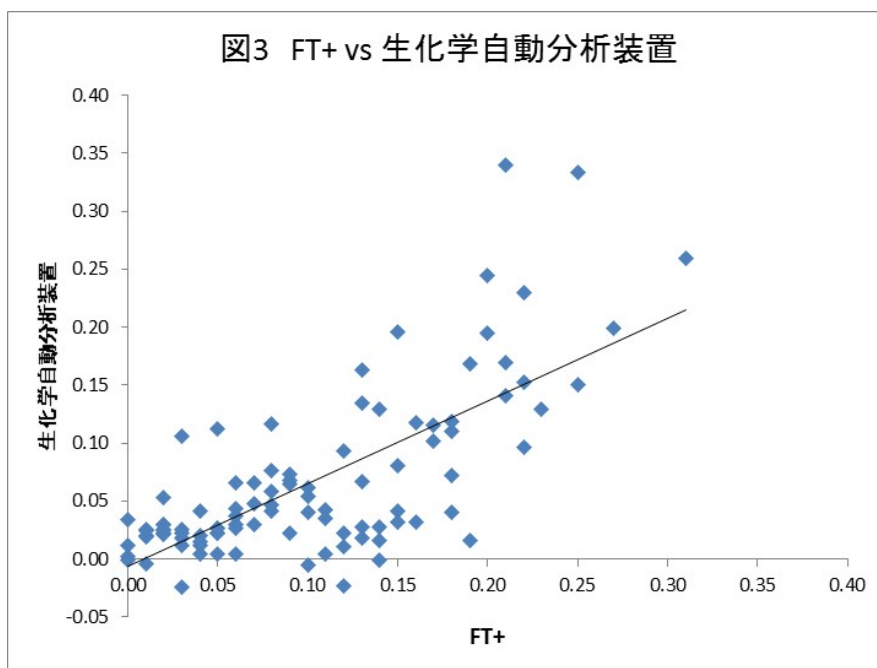
(5) 参照法との比較

FT+および生化学自動分析装置で分析した BHB データのうち、極端な外れ値を示した 2 検体を除外した 98 検体の両法における BHB 測定値の関係を表 4 ならびに図 3 に示した。

BHB の平均値は、FT+で 0.102mM/L、生化学自動分析装置で 0.066mM/L と FT+の方が高く、両機の相関係数は 0.719 と強い相関性が認められた。しかし、回帰式は生化学自動分析装置 = FT+ × 0.719 - 0.006 と傾きについては 1.0 からの乖離が大きく、標準誤差は 0.050mM/L であった。機器メーカーにおける FT+の検量線作成には、生化学自動分析装置とは分析原理の異なる連続流れ分析法 (CFA) が用いられており、その影響と考えられた。従って、FT+の参照法としては連続流れ分析法を用いることが重要と考えられた。

表4 FT+と生化学自動分析装置によるBHBの関係

	n	平均値	標準誤差	回帰分析		
				相関係数	y:自動分析装置、x:FT+ Slope	intercept
生化学自動分析装置 FT+	98	0.066 0.102	0.050	0.719	0.711	-0.006



(6) 保存料添加による影響

約 30ml の生乳試料に対し、プロモポール顆粒 (マイクロタブレット) を規定量である 1 粒添加し、BHB および AC 測定値に及ぼす影響について検討を行った結果を表 5 に示した。BHB は 0.014mM/L 上昇し、AC は 0.019mM/L 低下したが、実用的に問題のない変動範囲であると考えられた。

表5 保存料添加による影響

	試験数	無添加 mM/L	添加 mM/L	差 mM/L	t検定(5%)	P値
BHB	53	0.053	0.067	0.014	有意差あり	<0.01
AC	53	0.149	0.130	-0.019	有意差あり	<0.01

(7) 精度管理基準の検討

1) 稼働前

a. パイロット試料

精度管理用試料の検討の結果、生乳パイロット試料については、殆どのロットにおいて BHB は 0.03mM/L 程度、AC は 0.00mM/L であり、特に AC の精度管理用としては適さなかった。一方、LL 牛乳については、調査期間中 6 ロットを使用した。日間変動およびロット間変動は小さく BHB、AC 共にほぼ一定の値を安定して得られるため、精度管理用試料として採用することとした。

b. 併行精度

BHB および AC の併行精度のメーカー公称値を表 6 に示した¹⁾。パイロット試料 (LL 牛乳) の併行精度は表 2 のとおり、BHB は 0.009mM/L、AC は 0.02mM/L であり、メーカー公称値よりも良好であった。日常の管理基準としては、メーカー公称値を用いることとした。

表6 併行精度(メーカー公称値)

	AC mM/L	BHB mM/L
併行精度	0.04	0.01

c. 再現精度

再現精度については、メーカーから公称値が示されていないため、表 2 に示したパイロット試料の日間変動 (SR) から、再現精度の管理基準を検討した。測定機稼働前のパイロット試料における再現精度の管理幅については、日間変動の 3 以内すなわち BHB は平均値 ± 0.03 (0.009×3)、AC は平均値 ± 0.05 (0.016×3) の範囲内とした。

2) 稼働中

機器オペレーターによる精度管理用試料の確認作業の負担増を考慮し、BHB および AC に係る稼働中確認を省略する。ただし、メーカーが簡易運用法として示している検査終了後に 1 日の測定値の中央値をモニターすることによって¹⁾²⁾、稼働中における再現精度の確認を行うこととする。

3) 検査終了後

表3に示した1稼働日単位の個体乳検査データ中央値の日間変動(SR)から、中央値の管理幅を検討した。中央値の管理幅を日間変動(SR)の ± 3 以内、すなわちBHBは 0.03 ± 0.03 (0.011×3)、ACは $0.00 + 0.03$ (0.011×3)の範囲内とした。

メーカーが示す中央値管理の推奨法は、1稼働日もしくは1ワークセッションにおける少なくとも2,000検体以上のルーティン・サンプルの中央値を用いている。また、基準となる中央値の推奨値はBHBが0.03mM/L、ACを0.00mM/Lとしている¹⁾。

実際の運用法としては、1日の検体数がコンスタントに2,000検体に達することが少ないため、1,000検体以上の測定データにおいて、中央値が基準範囲を逸脱した場合は、測定機のbiasの変更を行う(1回に設定変更できるbias値は、 ± 0.01 とする)。検体数が1,000検体未満の場合は、前後の検査日の中央値の動向を考慮して検討することとする。

BHB、ACともに測定値の表示はプラス側のみなので、マイナス側にシフトし過ぎた場合は、その程度が分からない。特にACについては、規定の中央値平均は0.00mM/Lなので注意が必要である。ACの中央値は、0.01mM/L程度でコントロールすることが望ましい。

4) クロスチェック

共通試料を用いた複数測定機によるクロスチェック結果の評価基準については、平均値の差は、3.結果および考察の(7),1),cで示した再現精度(SR)に対して再現許容差(R)を求める際の係数(f)を乗じた値³⁾を基準として採用し(表7)、標準誤差については実測値であるBHB:0.03mM/L、AC:0.06mM/Lを目安として採用することとした。

表7 ケトン体の再現許容差

測定機台数 n	係数 f(n)	再現許容差(R)	
		AC	BHB
2	2.8	0.045	0.025
3	3.3	0.053	0.030
4	3.6	0.058	0.032
5	3.9	0.062	0.035
6	4.0	0.064	0.036
7	4.2	0.067	0.038
8	4.3	0.069	0.039
9	4.4	0.070	0.040
10	4.5	0.072	0.041

5) 精度管理基準の総括

今回、検討したBHBおよびACの精度管理基準の総括を表8に示した。

表8 ケトン体の精度管理基準

管理ポイント		精度管理基準
標準化(毎月)	試薬	イコライザー
稼働前	試料	LL牛乳
	併行精度	AC: ±0.04mM/L BHB: ±0.01mM/L
	再現精度	AC: 平均値 ±0.05mM/L BHB: 平均値 ±0.03mM/L
稼働中・稼働後	中央値	AC: 0.00 + 0.03 BHB: 0.03 ± 0.03
クロスチェック	再現許容差(R) ¹⁾	AC: 再現精度(SR:0.016) × 係数f(n) BHB: 再現精度(SR:0.009) × 係数f(n)

1) 再現許容差の求め方

再現許容差(R) = f(n) × 再現精度(SR)
nは、測定機の台数

4 . 参考資料

- 1) MilkoScan FT+ Ketosis Calibration , FOSS Application Note 35c, August 2010
- 2) Status on Ketosis Screening, In Focus 2012 issue 2,FOSS
- 3) JIS Z 8402-6 (2005) ,測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度) ,第 6 部:精確さに関する値の実用的な使い方

(小坂英次郎、帯川芳彦、佐伯宗久、樋口翔太)