透析液採取時におけるコンタミネーションの 発生頻度は1%未満である

井上 有紀^{*1} 本田 和美^{*1} 大 藺 英 一^{*1,2} 葉 山 修 陽^{*3}野呂瀬 嘉彦^{*2}信英会越谷大袋クリニック^{*1} 日本医科大学微生物学免疫学^{*2} 日本医科大学腎臓内科^{*3}

key words : 透析液清浄化, エンドトキシン活性, 併行精度, 室間精度, リスクマネージメント
〈要旨〉

透析液の清浄度をみるために, 多くの施設でエンドトキシン活性の測定が行われている。私たちは3年3か月間, 週2回この測定を行い, その精度管理から測定値の変動要因を検討した。突発的な測定値の0.5Log以上の上昇・下降(3.33倍, 0.33倍)が生じたものは全測定回のうち1.79%にみられた。しかしこれらのうち併行精度までみた場合, 採取時の技術的変動(いわゆるコンタミネーション)の頻度は0.45%, 測定時の技術的ミス(測定エラー)は0.36%にすぎなかった。これらの結果より, 測定値の変動は透析液自体の変動であることの方が多く真摯に捉えて清浄化対策を講じるべきであると考えられた。また, コンタミネーションであることを証明するためには, コンタミネーションが疑われた箇所もしくは同じエンドトキシン活性であろうと思われる箇所からの溶液ですぐに再検証をするのが最もよいと思われた。

The frequency of contamination has been shown to be less than 1% during measurement of endotoxin activity in dialysis fluid

Yuki Inoue^{*1}, Kazumi Honda^{*1}, Eiichi Osono^{*1,2}, Naoaki Hayama^{*3}, Yoshihiko Norose^{*2}Koshigaya Ohbukuro Clinic^{*1}; Department of Microbiological Immunology, Nippon Medical School^{*2}; Department of Kidney Internal Medicine, Nippon Medical School^{*3}

Bacterial endotoxin testing is performed for quality monitoring of dialysis fluid at many dialysis units. We measured bacterial activity using LAL assay twice a week for 3 years and three months, and investigated causes of variances in measured values. We found that sporadic increase or decrease by 0.5 log occurred with a frequency of 1.79%. The actual rate of bacterial contamination at sampling confirmed by intermediate precision was only 0.45% and technical problems with the assay showed a rate of 0.36% by intra-assay precision. These findings suggested that over half of the variances in data were not caused by contamination, facilitating the development of a strategy for bacterial control. To determine whether the variance was caused by contamination, we should (1) re-confirm the data as soon as possible, (2) at the same sampling site showing the un-expected data as well as (3) at another sampling site simultaneously in order to confirm equal fluid quality.

はじめに

透析液の清浄度を推し測る指標として生菌数計測とエンドトキシン活性測定が広く行われ, その目標達成基準値が示されている^{1,2)}。一般的に測定値が変動す

る要因は3つあるとされている(表1)^{3~5)}。しかし透析液のエンドトキシン活性測定では, 予想外な値が得られても, その原因探求が行われずに採取時の技術的変動(以下, 採取時のコンタミ)として扱われていることが多く見受けられる。当院では過去3年間, エンドトキシン活性測定を日本薬局方¹⁾に沿った方法で

井上 有紀 信英会越谷大袋クリニック 〒343-0032 埼玉県越谷市袋山1557-25

Yuki Inoue Tel: 048-978-1611 Fax: 048-978-1641 E-mail: kocl@e-kocl.jp

〔受付日: 2008年3月25日, 受理日: 2008年8月30日〕

行ってきた。その測定値と院内での精度管理の指標(表2)^{3~5)}を元に、採取時のコンタミと検体測定時の技術的過誤(以下、測定時のエラー)とを分け、採取時のコンタミがどのくらいの頻度で発生するか、知見を得たので報告する。

I. 方 法

1. エンドトキシン活性測定

採取時のコンタミや測定時のエラーによる測定値への影響を小さく抑えるために、採取から測定・結果解析までを1名が専任した。

エンドトキシンによる汚染がおきた時に、汚染源の

表 1 測定値が変動する因子

① 検体自体の変動
・ 汚染の影響
・ 阻害物質の影響
② 採取時の技術的変動(採取時のコンタミ)
・ 分析前段階における処理の誤り
採取前処理・採取容器・採取技術
採取量・保存条件など
③ 測定時の技術的変動(測定時のエラー)
・ 固有誤差 ⇒ 施設間差
測定機器・測定方法
・ 技術誤差 ⇒ 施設内変動
系統誤差
標準物質・試薬の劣化・分注精度
反応温度など
ランダム誤差
人為的ミス・メンテナンス不良・汚染など

表 2 内部精度管理

技術的信頼性	精密さ	・ 測定内精密さ…同時再現性 (%CV)
		・ 測定間精密さ
		<div> <div>日差再現性 (%CV)</div> <div> <div>日内変動…</div> <div> 短時間日内変動 長時間日内変動 </div> </div> <div>日間変動…</div> <div> 短時間日間変動 長時間日間変動 </div> </div>
		・ 稼動状態の精密さ
正確さ		・ 偏り
		・ 不確かさの大きさ
		・ 系統誤差・ランダム誤差 (R)

図 1 採取箇所

特定が容易にできるように、透析液作製系での各段階原水(水道水)・RO水(ROフィルター直後・循環後)・透析液(中央供給装置部製造直後・ET retentive filter (ETRF)前・ETRF後))にサンプリングポートを設置した(図1)。測定開始当時からRO水は2箇所サンプリングポートを設置していたが、ETRF前透析液は中央供給装置部製造直後のみ、ETRF後透析液は1箇所のみの設置だった。このため高い測定値が得られた時に、真の高値なのかコンタミなのかの判断に苦慮することが多かった。これを改善するために途中からサンプリングポートの数を増やし、ETRF前透析液は中央供給装置部製造直後1箇所とコンソール2台の計3箇所から、ETRF後透析液はコンソール2台から採取できるようにした。サンプリングポートの形状は、RO水はゴムに針を刺すゴムボタン方式、透析液はシリンジの先を弁で押しあけるニードルレスアクセスポート

を用いている。採取方法はサンプリングポートを個別包装された酒精綿で消毒・乾燥後、清潔操作で γ 線滅菌のシリンジを差込み2回のポンピング操作後3回目の溶液をエンドトキシンフリーのガラス滅菌試験管に採取した。採取時間は、予備実験でRO水・透析液で最も高いエンドトキシン活性値を示した透析終了後、洗浄・消毒前に設定した。

エンドトキシン活性測定はCAMBREX社 Kinetic-QCLTMシステムの Kinetic-QCL 比色定量法を選び、付属の測定キット Kinetic-QCLTMKitを用いた。検体の二重測定（ひとつの溶液を2回同時測定）を標準とするプログラムを用い、測定値と同時に変動係数（%CV）を算出した。また、測定のために既知濃度の標準液を希釈し、5~500 EU/Lの3濃度または5~50,000 EU/Lの5濃度で検量線を作製した。相関係数(R)から検査成立の可否を判定し、さらに検量線の範囲を測定範囲とすることで真度を保証した。これらは第15改正日本薬局方¹⁾に示されたエンドトキシン試験法の内容を満足させている。

測定頻度は週当たりで二重測定することでデータの裏づけが早期にでき、測定結果の妥当性を週内で再検証できるように週に2回と設定した。

測定時に作業上の問題点が生じた場合には、作業ノートに逐時記録し、個別の測定時エラーの原因を検討できるようにした。

2. データ解析

1) 測定時のエラー^{3~5)}

i) 検査不成立の頻度～正確さの保証～

一般的に比色法では、検量線作製時に求めた回帰式の相関係数(R)が1.0に近づくほどに直線性の高い検量線になる。日本薬局方でエンドトキシン測定において求められている相関係数(R)は0.98以上¹⁾であり、0.98未満で検査として不成立とした測定の頻度を調べた。

ii) 測定値のばらつき～精密さの保証～

同じ検体を2回測定してまったく同じ測定値が得られることは稀である。そのばらつき具合を変動係数(%CV)で表し、この値が低いほどその測定値は精密度が高いとされる。%CVは日本薬局方では求められてはいないが、FDA (Food and Drug Administration: アメリカ食品医薬品局)に認可されているCAMBREX社 Kinetic-QCLTM測定システムでは10%未満が求められている。%CVが10%以上で測定値として採用できない測定回数と測定件数を調べ、再度同じことがおきないように測定ノートを元にその原因を検討した。

2) 採取時のコンタミ

1) の測定時のエラーの項で不適とされた測定値を除き、測定上問題のなかった測定値群から、採取時のコンタミの有無を検討した。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞膜上に存在することから、その増減は生菌と同じく10倍100倍との変動がみられ^{6,7)}、Log単位での解析を行った。一般的なバイオバーデンの基準値の設定方法である ± 3 SDでは測定限界以下の頻度が高く不適であった。そこで今回、一般的に大きな変動と捉える1 Log (10倍)の変動を振幅としてとらえ、直前の測定値から0.5 Log 上昇・下降(3.33倍・0.33倍)し、直後の測定値は0.5 Log 変動して元の水準まで戻っている場合に採取時のコンタミの疑いがあるものと考え抽出し、真の透析液中のエンドトキシン活性値として採用するか採取時のコンタミとして考えるかを以下の2つの方法で検証した。

i) スミノルフの棄却検定～数学的検証～

統計時に母集団から外れた値（透析液作製系での各段階で定義に当てはまる測定値）が数学的に棄却できるかどうかを判断するために当該値の前後3回の値から棄却、すなわち採取時のコンタミの可能性のある棄却できる値であるか否かを求めた。

スミノルフ検定の式⁸⁾ 当該データ: X_n , X_n を含めた前後3回ずつ(計7回)のデータの平均値: $\bar{X}$ と標準偏差: s として、統計量 $T_n = (X_n - \bar{X})/s$ を求め、スミノルフの棄却検定表からデータ数7のときの T_n の最大許容偏差の臨界点 1.938 より大の場合、棄却してもよい値=測定時のコンタミとして捉えた。

ii) 複数の箇所から採取した均質な溶液の値の推移

～室内再現性～

透析液作製系の各段階に複数配置した(RO水・中央供給装置からとコンソールのETRF前透析液・ETRF後透析液)サンプリングポートから採取した溶液は、各々の段階で同程度の測定値・推移が期待される¹⁾。これと異なる測定値や推移を示した測定値は採取時のコンタミといえるかを判断した。

II. 結 果

採取時のコンタミや測定時のエラー等による棄却すべき値も含めすべての測定値の推移を図2に示す。突発的な変動は原水を含めRO水・透析液とすすべての溶液で観察された。

1) 測定時のエラー

i) 検査不成立の頻度～正確さの保証～

3年3か月間で319回測定し毎回検量線を作製し

図 2 各溶液の測定値の推移

た。その 97%は相関係数(R) 0.99 以上であり、日本薬局方で求めている検量線の信頼性を表す相関係数(R) 0.98 を満たさずに検査不成立となったものは 4 回、頻度は 1.3%あった。

発生原因は、試薬の取り違いによるもの、分注時のピペット誤操作および、標準液の失活が各 1 回あり、残り 1 回の原因は不詳であった。これらは表 1、2 のランダム誤差（人為的ミス）と系統誤差（分注精度）と系統誤差（標準物質の劣化）に当たる。

ii) 測定値のばらつき～精密さの保証～

i) で検査不成立となった 4 回を除く 315 回で毎回 6～7 検体を二重測定し、総検体数は 1,943 件あった。操作に慣れるまでの約 6 か月の変動係数(%CV)が 5%以上になることがあり、測定に熟練するにつれて減少する傾向がみられた。その後慣れによる気の緩みで 5%を超えることがあったが、全測定件数の 95%は 3%未満であった(図 3)。このうち 10%を超えたものは 7 検体(図 3)あり、発生頻度は 0.36%で 2 回は複数の検体でみられた。この原因は誤動作で分注後の検体が混入したランダム誤差（人為的ミス）と、試薬不足による系統誤差（分注精度）であった。ほかの単発でおきた 5 回は、二重測定のそれぞれの反応時間から

みて系統誤差（分注精度）が原因と思われた。

2) 採取時のコンタミ(表 3)

1) にある測定時のエラーを除いたものは 315 回測定中 1,936 検体あった。内訳は原水 158 検体、RO 水 618 検体、ETRF 前透析液 708 検体、ETRF 後透析液 452 検体であった。このうち採取時のコンタミが疑われる直前の測定値から 0.5 Log 以上変動し、その次の測定回には元の推移している値に戻っていた回数は RO 水 13 検体、ETRF 前透析液 16 検体、ETRF 後透析液 3 検体、合計 32 検体あった。このうち 26 件はスミノルフ検定でも棄却され、採取時のコンタミの可能性が考えられた。中央供給装置部製造直後の ETRF 前の透析液を例にすると(図 4)、314 回の測定中、0.5 Log 変動という定義に当てはまった 6 回のうち、スミノルフ検定で棄却されたのは 2・3・6 回目と 3 回あった。3 回目は ETRF 前の異なる箇所の測定値は異なる動向を示し、採取時のコンタミであったと判断した。しかし 6 回目では異なる箇所の測定でも同様の推移をしているので、採取時のコンタミはなく透析液の真の値である可能性が高いと判断した。一方、1・2 回目は室内再現性による裏づけはできなかった。しかし測定値の変動の様子を前後 1 か月まで広げ経時的観察によ

単位：EU/L

図 3 変動係数 (%CV) の変動

表 3 採取口別採取時のコンタミ判定

採取口名	総測定件数	0.5Log ↑ ↓		スミノルフ棄却試験 棄却可能		併行精度までみて コンタミと判断した件数	
RO (1)	309 件	11 件	3.56%	10 件	3.24%	1 件	0.32%
RO (2)	314 件	2 件	0.64%	2 件	0.64%	0 件	0.00%
中央供給装置 製造直後	314 件	6 件	1.91%	3 件	0.96%	1 件	0.32%
ETRF 前 (1)	262 件	9 件	3.44%	7 件	2.67%	3 件	1.15%
ETRF 前 (2)	136 件	1 件	0.74%	1 件	0.74%	0 件	0.00%
ETRF 後 (1)	312 件	3 件	0.96%	3 件	0.96%	3 件	0.96%
ETRF 後 (2)	142 件	0 件	0.00%	0 件	0.00%	0 件	0.00%
計	1,789 件	32 件	1.79%	26 件	1.45%	8 件	0.45%

る併行精度とみると同様の変動がみられることから、採取時のコンタミの可能性は低いと思われた。この結果より、明らかな採取時の技術的変動は 314 回測定中 1 回のみ、頻度は 0.32% だった。同様の検証を透析液作製系での各作製段階 (RO 水・透析液 (ETRF 前・ETRF 後)) の採取口ごとに行いその結果を表 3 に示した。またこの検計中、採取に用いていたゴムボタン方式のサンプリングポートのゴムを交換すると測定値が感度未満となる場合を 3 回経験した (図 2 右上 RO 水)。これらの異常値はサンプリングポートの汚染に

よるものと考えられ、エンドトキシン活性値の推移のみから採取時のコンタミを推定することはできなかった。これらの状況を判断して棄却してもよい = 採取時のコンタミと判断できたのは、1,778 件体中 8 件、頻度は 0.45% だった。

Ⅲ. 考 察

今回の検討で採取時のコンタミを、急激な測定値の変動 (0.5 Log・3.33 倍・0.33 倍) があり再バリデー

a) 採取時のコンタミ判定

	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
0.5Log変動						
スル/7棄却試験	不可	棄却可!	棄却可!	不可	不可	棄却可!
異なる採取口の結果	なし	なし				
併行精度	不明	不明	推移異なる	推移同じ	推移同じ	推移同じ
コンタミ?	真値	真値	コンタミ	真値	真値	真値

b) エンドトキシン測定値の推移(1・2回目前後)

図4 採取時のコンタミ判定 (中央供給装置部製造直後)

ションで元の値の推移 (トレンド) に戻るという経過で推定したもので1.79%, 数学的棄却による裏づけをすると1.45%, さらに併行精度を求めると, 実際には全計測中0.45%で1%に満たないことが明らかになった。そこで, もし測定で異常値がみられた場合, その値が真の異常値か採取時のコンタミであるかを見分けるには, 再バリデーションを, すぐに, 異常値が出た箇所および同じ製造段階の溶液で異なる採取箇所から得られたサンプルで行うことが推奨される。この測定でも同等の数値であれば得られた値は室内精度と併行精度をあわせた真の値¹⁾とみてよいことになり, 汚染の元となった日常工程を見直す際のデータとして信頼性の高いものになる。原因の究明・改善から透析液の清浄化につながっていくと考えられる。細菌培養においてもコロニー数計測を行う場合には同様の精度管理が必要となり, 今後の検討が待たれる^{9~13)}。

測定時のエラーは測定開始後ほどなく安定し, むしろ2年目以降におき, 測定ノートの記録をみると, その原因はランダム誤差と系統誤差が多く時間的に余裕がない時に多発していた。作業者自身の特性の問題もあるが, 慣れによるアクションスキームの短縮が, 時間等の制約で破綻したために作業精度が低下した¹⁴⁾と考えられ, その後のスキームの再構築で制約下での安定がみられるようになったと考えられる。採取時のコ

ンタミも同様の工程をたどると考えられ, 慣れた頃こそ落とし穴に注意すべきであると考えられた。

結 語

得られた測定値における採取時のコンタミの頻度は0.45%, 測定時のエラーは0.36%, 採取時・測定時合わせても0.84%だった。エンドトキシン活性測定におけるコンタミネーションは1%にも満たなかった。

文献

- 厚生労働省: 4.01 エンドトキシン試験法・13 製薬用水の品質管理・25 分析法バリデーション。第15改正日本薬局方 <http://jpdb.nihs.go.jp/jp15/>, p70-73・p1599-1602・p1647-1650
- 内野順司: 透析液に関する ISO 会議報告書。(社)日本臨床工学技士会誌 No. 29, p72-75, 2007
- 細萱茂実, 日高宏哉, 亀子光明, 滝沢正臣, 川口竜二, 竹村一男, 川俣 治, 小林 優, 白濱秀也, 宮本幸夫, 酒井文和: 臨床検査法提要 (金井正光), p1-39, 金原出版株式会社, 東京, 2005
- 河合 忠, 菅野剛史, 中 甫, 飯塚儀明, 永峰康孝, 大澤 進, 矢野順子, 細萱茂実, 市原清志, 山田輝雄: 日本臨床衛生検査技師会ライブラリー XV 臨床検査精度管理教本 (社団法人 日本臨床衛生検査技師会 ©), p35-94, 近代出版, 東京, 2006

- 5) 片山善章, 久原巻彦, 浦 敏郎, 岩 信造, 小林茂昭, 増田喜一, 高橋 浩, 市村輝義, 山中 亨, 松尾収二, 岡山幸成, 長谷川正行, 山本慶和: 臨床衛生検査技術学 2 検査機器総論/検査管理総論 (菅野剛史, 松田信義), p128・149-175, 医学書院, 東京, 2002
- 6) PDA: PDA バリデーションレポート No. 2 水のシステムと脱パイロジェン (日本 PDA 監修), p23-38, 薬業時報社, 東京, 1995
- 7) 土谷正和: 1. エンドトキシン測定法 (通常法・超高感度法), 血液透析とエンドトキシン (竹澤真吾編), p9-24, 東京医学社, 東京, 2002
- 8) 市原清志: バイオサイエンスの統計学—正しく活用するための実践理論—, p284-285・366, 南江堂, 東京, 1990
- 9) 大藺英一, 葉山修陽, 透析液 GQP 委員会: 改定薬事法グッドクオリティープラクティスに準拠した透析液清浄化対策の透析専門クリニックでの取り組み, 透医会誌 22: 311-317, 2007
- 10) 佐々木次雄, 那須正夫, 坂根 健, 城野久美子, 松原正利, 田中憲志, 梶原庸生, 棚元憲一: 平成 15 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告—製薬用水中の微生物評価培地“R2A 培地”に関する研究—, 医薬品研究 35 (別冊): 638-652, 2004
- 11) 鈴木富美: 損傷菌ならびに貧栄養菌の特性およびこれらの菌の修復・培養条件について 10 R2A 培地の水中グラム陰性菌生育性能について, 防菌防黴 35: 153-159, 2007
- 12) 大藺英一, 井上有紀, 本田和美, 野呂瀬嘉彦, 市村恭子, 葉山修陽: 無菌性保証に向けた従属栄養菌培養 2 メンブランフィルター法の検出感度に関する精度管理, 腎と透析別冊 HDF 療法 In Press, 2008
- 13) 大藺英一, 井上有紀, 本田和美, 野呂瀬嘉彦, 市村恭子, 葉山修陽: 無菌性保証に向けた従属栄養菌培養 1 R2A 培地の検出感度限界に関する精度管理, 臨床透析別冊 HDF 療法 In Press, 2008
- 14) 芳賀 繁: ミスをしない人間はいない—ヒューマン・エラーの研究—, p109-131, 飛鳥新社, 東京, 2001