

バリデーション算出用プログラム

Validation-Support/Excel Ver 7.1 の操作方法

第 17 版 2024.05.02

両面印刷で綴じると表示が見やすくなります

目 次

1. Validation-Support/Excel について	3
(1) Validation-Support/Excel Ver 7.1 特徴	3
(2) Validation-Support/Excel のバージョンアップ履歴と特徴	4
(3) Validation-Support/Excel の使用方法	5
□ バリデーシヨンの対象となる項目	5
□ 目次シートについて	5
□ サンプルデータについて	5
□ プロテクトに関して	5
□ 書式の変更について	5
□ 解説セルについて	6
(4) 使用上の注意点	6
(5) マクロとセキュリティーレベルの変更方法	6
(6) 必要システム	6
(7) 免責・転載・配布について	6
2. 各分析シートの使用方法	7
(1) セキュリティーの警告について	7
(2) 目次シート	7
(3) 特異性・選択性シート	8
(4) 正確さの評価シート	9
(4) 相関分析シート	13
・ 各回帰式の説明	15
回帰係数の信頼区間算定法	1918
(5) 併行精度シート	2019
(6) 室内精度シート	2221
(7) 検出限界と定量限界シート	2423
検出限界と定量限界のデータの意味	2625
(8) New 直線性シート	2827
(9) 報告書シート	3231
参考文献：	3433

1. Validation-Support/Excel について

臨床検査室におけるバリデーションは、測定試薬や装置から得られる結果の客観的証拠を提供することにより、特定の意図された用途や適用に関する要求事項が満たされているかを確認する作業である。この主要な目的は、報告される検査結果の再現性と信頼性を科学的に保証し、検査値を報告することにある。

このようなバリデーション作業を支援するために、バリデーション算出用プログラム「Validation-Support/Excel」が開発された。このプログラムは、2011年に日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会が発表した「定量測定法に関するバリデーション指針」に基づき開発されたものである。しかし、10年以上が経過し CLSI のガイドラインも改変されていることから、大きく変更された直線性の評価についてバージョンアップを行った。

Validation-Support/Excel は、Microsoft Excel を利用することで、バリデーション関連の計算やグラフによる視覚的評価を行い、検証作業を容易にするもので、臨床検査室での精度と信頼性の向上に貢献する重要なツールである。本ソフトウェアは、日本臨床化学会のクオリティマネジメント専門委員会のホームページからダウンロード可能である。

(1) Validation-Support/Excel Ver 7.1 特徴

Validation-Support/Excel Ver 7.1 には、臨床検査や科学研究におけるデータ分析を支援するための複数の重要な機能が備わっている。

1) データ入力と同時に表示される分布型検討用グラフ

最初の特徴は、データが入力されると同時に分布型検討用のグラフや散布図が自動的に描かれることである。統計処理では、データ集団が正規分布をしていることが一般に前提とされるため、扱うデータの分布が実際にどのような形をしているのかを視覚的に確認することが非常に重要である。これにより、極端値や外れ値を見落として誤った分析を行うリスクを避けることができる。

2) 解説セルによるガイダンス

次に、各シートに設けられた「解説セル」は、マウスカーソルを合わせることで実施手順や注意点を表示する。これにより、ユーザーは分析の過程で正確な手順を踏み、正しい結果を得るための支援を受けることができる。

3) 報告書シートの提供

最後に、分析結果を一覧できる報告書シートが用意されている。このシートは、検討した各項目についてシート別の内容を1つのシートに集約しており、分析状況全体を一望できるようにすることで有用性を提供する。報告書シートはプロテクトがかかっておらず、利用者が自由に編集可能であるため、分析結果に基づいて報告書を柔軟にカスタマイズすることが可能である。

(2) Validation-Support/Excel のバージョンアップ履歴と特徴

1) Ver7.1 - 直線性の評価方法の大幅改訂

Ver7.1 では、直線性の評価方法が CLSI EP06-P2 の 2022 年改訂版を参照して大きく変更を行った。従来は、統計的手法を重視して作成されたもので、回帰直線の周囲の分散を分析し、適合度検定により直線性を判定していた。この方法では再現性の高い測定系でわずかな逸脱でも不適判定を受けることがあった。Ver7.1 では、臨床的に許容可能な偏差を線形回帰統計で評価する方法に変更し、より実用的な判定が可能になった。(2024.4.2)

2) Ver6.3 - 直線性検定の改良

このバージョンでは、直線性検定におけるいくつかの改良が行われた。特に、0 点が 0.0 の場合に計算値から削除される不具合を修正し、負のデータに対する処理能力を強化した。(2023.7.23)
なお、この機能は Ver7.1 で変更されている。

3) Ver6.2 - 不確かさ算出の改善

Ver6.2 では、不確かさの算出に関する SD の算出法に日内・日間変動および総変動を採用する 2 通りの処理を追加し、日間変動が過剰な場合のバグを修正した。(2023.5.20)

4) Ver6.1 - 方法間比較の機能追加

このバージョンでは、相関分析シートに Passing-Bablok 回帰の計算機能と Altman の偏差図の作図機能が追加された。Passing-Bablok 回帰は、非正規分布データ間の関係性を分析するためのノンパラメトリック手法であり、Altman の偏差図は偶然誤差と系統誤差を視覚的に判断するためのものである。さらに、Deming 回帰に必要な誤差分散比 (λ) を求める機能が新たに加えられ、2 回目の測定結果を入力することで λ が算出される。(2022.2.22)

(3) Validation-Support/Excel の使用方法

- バリデーシヨンの対象となる項目

臨床検査におけるバリデーシヨン対象項目には以下のものがあり、試薬メーカーが行うバリデーシヨンとユーザーが検証する対象項目がある。ユーザー自身が検証するものとして、真度と正確さ、精度、定量限界、直線性、トレーサビリティと不確かさがあり、Validation-Support/Excel で評価が可能である。

- ① 特異性 (specificity), 選択性 (selectivity)
- ② 真度, 正確さ (trueness)
 - ← 「真度」は真の値からのかたよりの程度を意味し、「正確さ」ともいう
- ③ 精度 (precision) ← ばらつきの程度を表す指標
 - 併行精度 (repeatability)
 - ← 同一検査室で日時、装置、試薬、人が同一とみなされる測定条件
 - 室内再現精度 (intermediate precision)
 - ← 同一検査室で日時、校正、人などが異なる測定条件
 - 室間再現精度 (reproducibility) ← 異なる検査室間におけるばらつきの程度を表す
- ④ 検出限界 (limit of detection) ← 検出限界は測定対象物の検出可能な最低の量
- ⑤ 定量限界 (limit of quantitation) ← 適切な精度と正確さで定量できる最少量
- ⑥ 直線性 (linearity) ← 測定範囲全域で精確さに問題なく直線性を保った状況
- ⑦ 範囲 (range) ← 直線性と定量限界を検討することで検証
- ⑧ 頑健性 (robustness) ← 試薬の組成や pH などを多少変化させても測定値に影響を受けず、また長期間および施設間において測定値が安定している特性
- ⑨ トレーサビリティ (traceability) と不確かさ (uncertainty)

- 目次シートについて

「目次シート」の各項目にカーソルを合わせると、バリデーシヨンの概略について表示されるようになっている。

- サンプルデータについて

各シートには、サンプルデータが入っているので、このデータを利用して、本ソフトの機能や操作方法に慣れて頂きたい。実データを入力する際には、削除してから実行する。

- プロテクトに関して

グラフや計算式を保護するためにプロテクトがかかっている。何れのシートにおいても「青色セル」は、入力可能範囲を示し、それ以外の部分にはロック（保護処理）がかけられているので入力できない。

- 書式の変更について

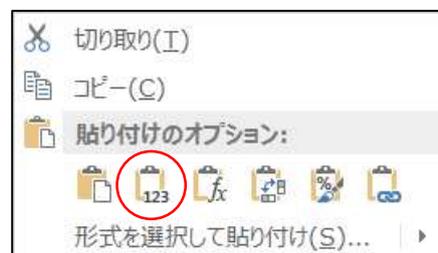
「青色セル」に関しては、桁数の変更、書式の変更、条件付書式の変更および並べ替えは可能である。なお、桁数の変更に伴ってグラフの桁数も自動的に変更される。

- 解説セルについて
各シートには「**解説セル**」があり、各統計処理の方法や注意点が記載されている。セルにマウスを合わせることで表示される。

(4) 使用上の注意点

- ① データの貼り付け方法について：

他のシートからのデータコピー時には「編集」「形式を選択して張り付け」張り付け方法を「値」として実行すること。そのまま貼り付けてしまうと計算式、書式等までが張り付いてしまい、計算やグラフ化が行えなくなる可能性がある。



- ② 入力に関して：

表入力の際には、空欄のデータがないように左上詰めで入力する。

- ③ その他：

データの中に**数値**ではなく、文字が含まれていることがある。データの中に全角文字が入っていないか確認してデータ入力処理を行なう。ワープロなどで作ったデータは、もう一度キーボードから入力することが勧められる。

(5) マクロとセキュリティーレベルの変更方法

Validation-Support/Excel V7.1 では、相関分析シートの**ブートストラップ計算**と

Passing-Bablok 回帰の計算においてマクロを使用している。相関分析シートを使用しない場合には、マクロを有効にする必要性はない。なお、ブートストラップ法とは、線形関係式信頼区間を推定するときに、データセットを乱数によって繰り返し再抽出（リサンプリング）を実行して、その度に回帰式($y=a+bx$)を計算し、計算された回帰式の中心部の 95%領域を信頼区間とするものである。

マクロを有効にする場合には、各バージョンにおける Excel 設定変更を実行してください。

(6) 必要システム

基本ソフトウェア：

本ソフトは、OS として Windows 10 / 11 上の Excel 2016 以降のシステムで動作する。

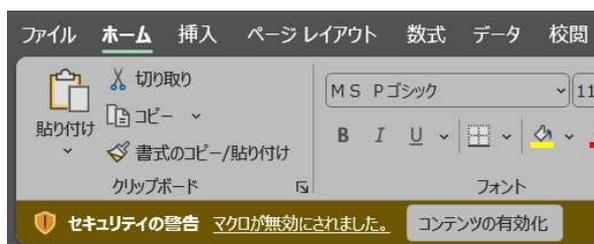
(7) 免責・転載・配布について

このソフトウェアを使用しての問題発生に関して、一切責任を問われないものとする。また、このプログラムはフリーウェアで自由に配布可能である。ただし配布時は、ファイルの改変がないこと。

2. 各分析シートの使用法

(1) セキュリティーの警告について

Validation-Support/Excel を開くと図のようなメッセージが表示されるが、これはマクロを使用した Excel ファイルのためである。臨床化学会の HP からダウンロードしたものであればマクロウイルスチェック済みの Excel ファイルである。相関分析シートを使用する場合は、マクロを使用するため有効化する必要があるが、相関分析シートを使用しない場合には有効化の必要はない。



(2) 目次シート

目次シートでは、Validation-Support/Excel で実施できるシートの紹介をしている。アンダーラインのあるセルにカーソルを合わせると、下図のようにコメント表示機能が働き、各分析方法の手順と解説を見ることができる。

シートの解説では、実施手順の順で解説を行う。

コメントの表示

	B	C	D	E
4	真度、正確さ 評価法 (1から3濃度以上に対応) [正確さの評価シート]	マクロ機能を有効にする方法は、Excelのバージョンに 比較対照法との比較実験による方法(相関分析)		
5	比較対照法との比較実験による方法 [相関分析シート]	本法は、多数の患者試料を用いて比較対照法による測定値に対する関係を直線関係式で表し、被 検法の正確さを一定系統誤差と比例系統誤差の大きさに評価するものである。なお、この検討を行う 場合には、比較対照法自体の真度が明らかである必要がある。		
6	併行精度 (同時再現性) [併行精度シート]	1) 測定試料の準備: 望ましい患者試料の濃度分布にあつた患者検体を、50例以上用意する。データはX軸・Y軸共に 連続性があるように入力する。また、測定試料・測定機器の測定レンジ 内のサンプルを使用する。		
7	室内再現精度 (日間変動と日内変動)と不確かさ [室内精度シート]	2) 試料の測定 患者検体は一度に測定せず、比較対照法と被検法の両方で毎日5~10例ずつ、5日以上測定す る。		
8	検出限界 定量限界 測定 [検出限界と定量限界シート]	3) 結果を「相関分析シート」に入力 データを入力すると即座にグラフ化される。		
9	直線性 [直線性シート]	4) プロット図の作成 2セットの相関を比較できる用に設計した。プロット図を作成する際、濃度範囲(低濃度、中濃度、 高濃度など)によって関係が異なる事を診る場合や判別分析を行いたいときに2セットの入力を可能 とした。		
10	許容限界の指針 [許容限界シート]	なお、方法間比較を行なう場合は、直線回帰式ではなく、標準主軸回帰式 または Deming の関係 式を利用することが望ましい。Deming の関係式を使用する場合には、ランダム化2回測定によって 明らかでないX軸側とY軸側のバラツキの比がわかってるときに、誤差分散比 λ を設定して使用するこ とが望まれる。		
11	報告書 検討結果のまとめ [報告書シート]	誤差分散比 λ は以下の方法によって求める。各方法についてランダム化2回測定を行ない、そ の誤差分散値を下式に当てはめ算出する。誤差分散比 $\lambda = X$ 軸の分散 / Y 軸の分散		
12	バージョンアップ情報	5) 結果の解釈 散布図および偏差図から測定法間の直線性とばらつきを観察し、直線性から外れたときはその原因 を追究する。「比較対照法との比較実験による方法」では、ブートストラップ法での傾きおよび切片の信 頼区間を求めることが必要となる。結果の解釈においては、 $y = x$ に対してブートストラップ法の95% 信頼区間内に傾き・切片が入っていれば、比較実験の結果が良好であった事を示すが、入らなかった 場合は、「医学的意思決定濃度」の5%を限界として数値を観察して判断する。		
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				

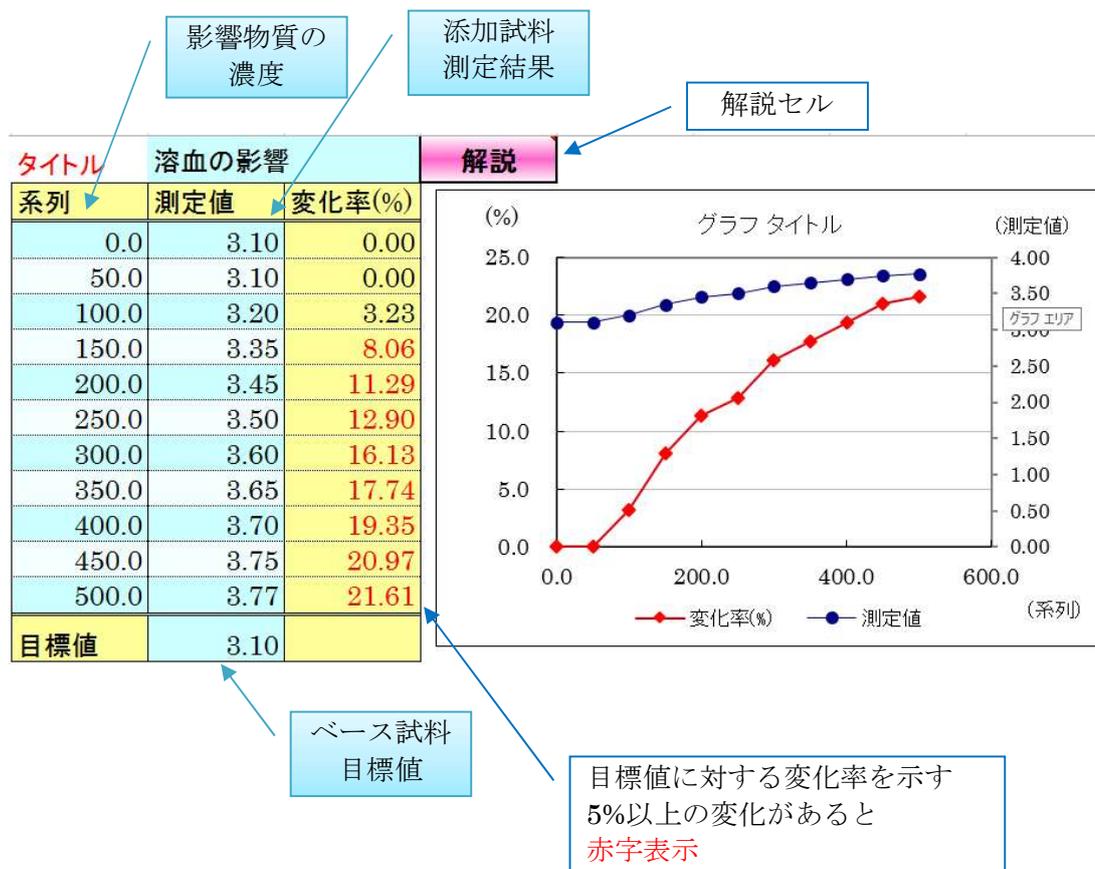
(3) 特異性・選択性シート

特異性・選択性シートは、試料に共存する可能性がある類似成分、反応に影響されると予想される成分を評価するために設計されている。試験の手順は、測定対象物を含む試料（値の異なる2~3濃度の患者検体）に妨害を引き起こす可能性がある物質を添加して、求めた結果と妨害物質を含まない元の試料の結果とを比較することによって確認する。

具体的には、ベース試料に対して、干渉物質を溶解した試料を用いて5~10段階の混合系列を作成し、添加濃度ごとの測定値を求め評価する。化学反応に影響を与える可能性がある干渉物質としては、ビリルビン、乳び、溶血、抗凝固剤、薬物などが考えられる。このシートでは、影響物質の濃度と測定結果を入力すると自動的に変化率(%)と測定値がグラフ化される。この機能により、特定の干渉物質が測定結果にどのような影響を与えるかを直感的に理解することが可能となり、より正確なデータ解析を行うことができる。

$$\text{変化率} = \frac{\text{添加試料の測定値} - \text{ベース試料の測定値}}{\text{ベース試料の測定値}} \times 100$$

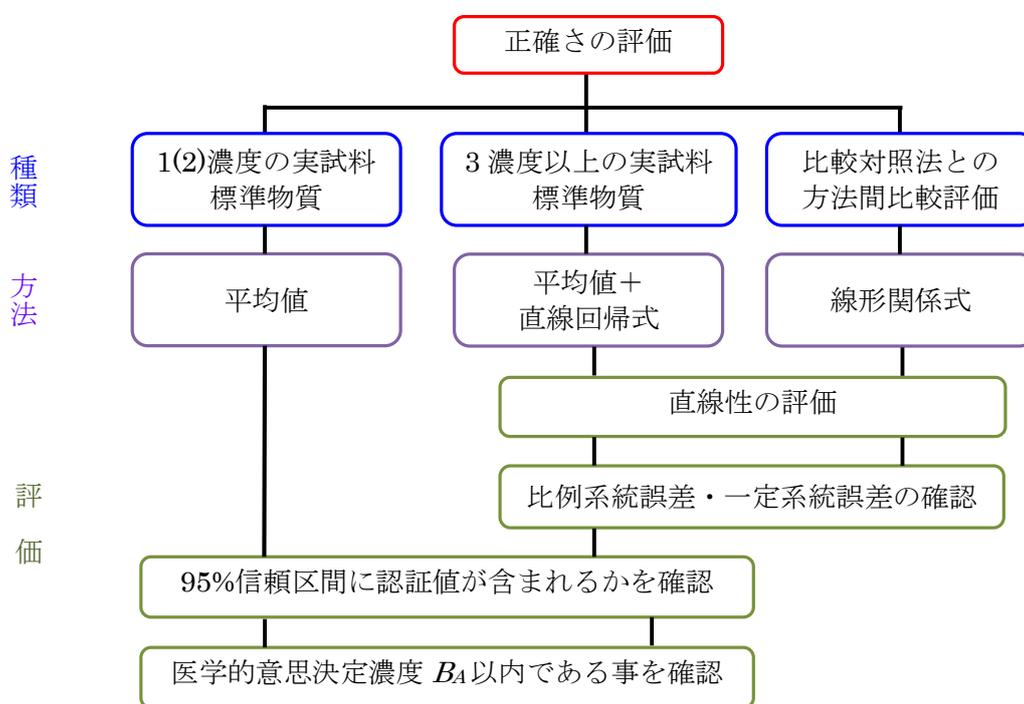
例では、ヘモグロビン添加濃度が200mg/dL以上のとき変化率が10%を超えていることがわかる。なお許容される限界濃度は、その項目の臨床的重要性や生理的変動などによって変わる。



(4) 正確さの評価シート

正確さの評価シートでは、測定値の真度、すなわち平均値と真の値との偏差を評価することができる。真度は、測定値の平均値と真の値との偏差を意味し、正確さともいう。変動係数(CV)を使用して真度(正確さ)について評価する。Validation-Support /Excelでは、3種類の評価方法に対応している(下図参照)。これらの方法を選択は、必要とする標準物質が入手可能であるか否かで決まる。1濃度のみの標準物質による評価は、分析法の直線性があり、一定系統誤差がないという前提条件があることに注意する。

- ① 1または2濃度の実試料標準物質による評価
- ② 3濃度以上の実試料標準物質を用いる評価
- ③ 多数の患者試料を用いた比較対照法との方法間比較評価 (相関分析シート使用)



正確さの評価方法

正確さの評価シートでは、標準物質を測定し、表示値との比較を行うために使用される。最大8種類までの標準物質(または標準物質の希釈試料)に対して評価を行うことが可能である。

1濃度のみの標準物質で実施する場合には、平均値の95%信頼区間に標準物質の認証値が含まれるかを確認する。また、日本臨床化学会の偏りの指標である正確さの許容誤差限界(B_A : analytical bias)以内であることを確認する。限界値から外れた場合には、各測定値がバイアスの参考上限の5% ($\text{Na} \cdot \text{Cl} \ 2\text{mmol/L}$) 以内であることをチェックする。

3種類以上の濃度の標準物質が得られる場合は、1濃度の場合と同様に各濃度の偏りについて評価する。加えて、比例系統誤差および一定系統誤差の検定結果を確認する。

正確さの評価における実施手順

① 測定試料の準備

② 試料の測定

被検法が安定な状態にあるとき、標準物質を 10 回以上繰り返し測定する。正確さの評価は、直線性が確保されている範囲内で行う必要があるため、先に測定法の直線範囲を確認しておく必要がある。

③ 結果入力

標準物質の「認証値」、「拡張不確かさ」と実際の検査結果を「正確さの評価シート」に入力する。

④ 結果の解釈

- **グラフの観察**：標準化残差図または差の図においてデータの分布状況を確認する。
- **外れ値の検討**：極端に大きな差がある測定値は、外れ値ではないかを検討する。
- **濃度によるバラツキ確認**：2 濃度以上測定した場合は、濃度によるバラツキの違いを確認する。
- **信頼区間の確認**：測定値と認証値のグラフから、測定結果の信頼区間に認証値を含んでいるかを確認する。信頼区間は、測定結果のバラツキと認証値の不確かさを合わせたもの（分散の加法性）であり、次の式によって算出される。

$$u_{\Delta} = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2} \quad U_{\Delta} = 2 \times u_{\Delta}$$

u_{Δ} = 測定値の標準誤差と認証値の不確かさの合成値

u_m = 測定結果の標準誤差

u_{CRM} = 認証値の標準不確かさ

95%信頼区間は、包含係数 2 を乗じて求めている。

- **B_A (%)値との比較**：平均測定値と認証値との絶対差 $\Delta_m = |\text{測定値} - \text{認証値}|$ を正確さの許容誤差限界 B_A (%)の値と比較する。

B_A (%)は個体内生理的変動 (CV_I) と個体間生理的変動 (CV_G) から求めた総変動の 1/4 以下となっている。

$$B_A < \frac{\sqrt{CV_I^2 + CV_G^2}}{4}$$

- 3 濃度以上ある場合には、直線性の評価を行う。直線関係であれば、 T_b と T_a から比例系統誤差と一定系統誤差の評価を行う。(直線性の詳細な状況を判定する場合は、直線性シートによって実施)

実施例

この例は、Na について電解質の二次標準物質 (ISE CRS) を用いた検討結果である。標準物質の認証値(127.7, 141.3, 156.5 mmol/L)、拡張不確かさ(0.38, 0.42, 0.47 mmol/L)と測定結果から平均値(128.2, 141.0, 155.6 mmol/L)と標準偏差 (0.12, 0.19, 0.25 mmol/L)が得られた。

直線性の評価については、散布図や標準化残差図・差のプロット図からの視覚的な評価と直線性の検定結果を参考にして評価する。例題では、濃度毎のプロットにバラツキの差は認められず、散布図も直線を示している。直線性の検定統計量は、 $F=3.51$ (片側確率 $P=0.072$) であることから、直線性があると考えられる。

一方、比例系統誤差と一定系統誤差の検定結果では有意差が認められ、平均値の 95%信頼区間と認証値からも低濃度試料と高濃度試料の正確性に問題がある。許容誤差限界 B_A (%) の評価においても Δ_m の値が許容誤差限界値以上である事から、偏りを修正する必要性があると考えられる。ヒゲ図を見ると、認証値と測定値の信頼区間に乖離状態が確認できる。

臨床化学会が示した Na の許容誤差限界 B_A (%) は 0.3% から各濃度の許容誤差限界は次のように計算される。

$$\left. \begin{array}{l} \text{低濃度試料} \quad 127.7 \text{ mmol/L} \times 0.3\% = 0.38 \text{ mmol/L} \\ \text{中濃度試料} \quad 141.3 \text{ mmol/L} \times 0.3\% = 0.42 \text{ mmol/L} \\ \text{高濃度試料} \quad 156.5 \text{ mmol/L} \times 0.3\% = 0.47 \text{ mmol/L} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{または } 2 \text{ mmol/L 以下} \\ \text{(参考上限)} \end{array}$$

標準物質の認証値

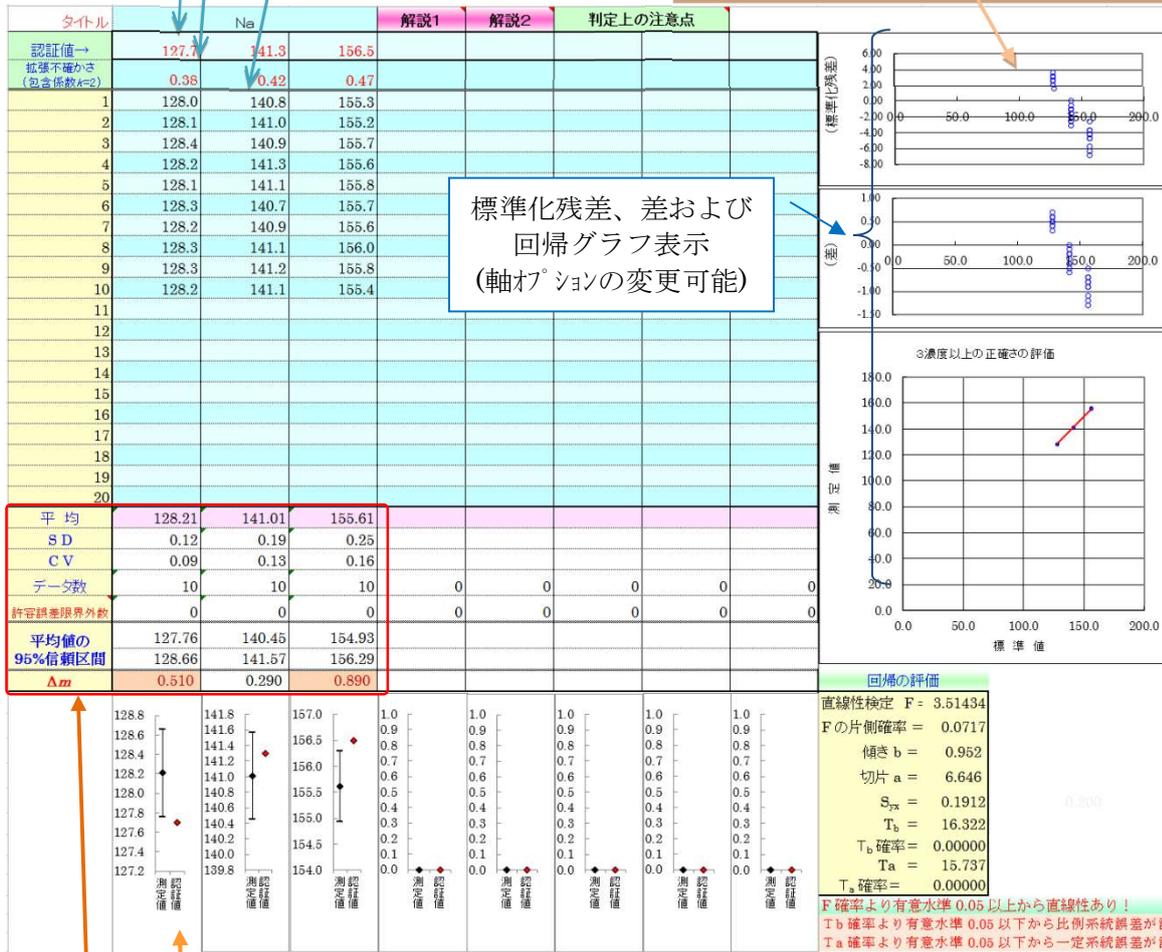
標準物質の拡張不確かさ

測定結果

拡張不確かさを超えるデータは赤字で表示

回帰関連グラフの評価

- 個々のデータの分布状況を確認特に極端値の有無をチェック
- 認証値との関係を見る
- 相関図の直線性の確認



標準化残差、差および
回帰グラフ表示
(軸オプションの変更可能)

測定値の信頼区間と認証値の評価

測定値の標準誤差と認証値の不確かさから
95%信頼区間を示す。

- 1) 平均値と認証値との絶対差 Δ_m を評価する。
 Δ_m の値が赤く表示された場合には、統計学的に平均値と認証値に差があることを示す。
- 2) グラフから、許容誤差限界内であるか、高値か低値かを視覚的に判断する。
- 3) 最終的な評価は、許容誤差限界 B_A (%) を含めて全体として評価する。

回帰の評価と注意点

ここでの直線性の評価は、F検定を利用しているが、あくまで統計的な評価であるため、臨床的な評価と異なる点に注意する。

回帰式の比例系統誤差・一定系統誤差の検定にはt検定を利用している。精密度が高い検査では、わずかな誤差が検定結果に影響を与えてしまうため、検定結果ばかりではなく、臨床的な必要性から判断することが必要である。

(4) 相関分析シート

(多数の患者試料を用いた比較対照法との方法間比較評価に使用)

このシートは、正確さの評価の一つである多数の患者試料を用いた比較対照法との比較評価を行うためのものである。単に比較評価だけでなく、相関分析、回帰分析（直線回帰、**Deming の回帰**、**標準主軸回帰**、**Passing-Bablok 回帰の計算機能**）および **Mahalanobis 等確率楕円** をグラフ表示する機能も備えている。

方法間比較においては、従来からある最小二乗法による直線回帰では、前提条件として説明変数側（x 軸）に誤差がなく、回帰の周りデータ分布が正規分布であることを前提条件としている。最小二乗法による直線回帰は、方法間比較のような x 軸 y 軸ともに誤差が基本的に存在するデータに関して適していないため、線形関係式を使用する。線形関係式にはパラメトリックによる回帰にあたる **Deming の回帰**、**標準主軸回帰** がある。一方、極端値が存在する場合や分布が非正規分布である場合には、ノンパラメトリック手法である **Passing-Bablok 回帰** によるデータ処理が推薦される。なお、Passing-Bablok 回帰の計算処理は膨大なため、データ数によるが時間を要する。上方にある **ブートストラップ計算** ボタンをクリックするとブートストラップ法による信頼区間が計算される。

れる。

直線回帰(古典的回帰式)		b	a	b	a
x → y		0.970	0.726	0.952	0.762
y → x		1.312	-0.2		
$S_{y,x}$	→	1.00		0.96	
s	→	0.715		0.70	
Demingの線形回帰式		b	a	b	a
誤差分散比 λ		1.155	0.248	1.149	0.247
λ(y変量の分散/x変量の分散)	→	0.95		0.60	
ブートストラップによる	信頼区間下限 =	0.959	-0.203		
	信頼区間上限 =	1.392	0.655		
$S_{y,x}$	→	1.046		1.024	
s	→	0.685		0.672	
標準主軸回帰		b	a	b	a
		1.128	0.318	1.094	0.391
ブートストラップによる	信頼区間下限 =	0.961	-0.025		
	信頼区間上限 =	1.315	0.671		
$S_{y,x}$	→	1.033		0.99	
s	→	0.685		0.67	
Passing Bablok		b	a		
		1.158	0.200		
ブートストラップによる	信頼区間下限 =	0.995	-0.022		
	信頼区間上限 =	1.408	0.506		

また、**Bland-Altman** の偏差図作成機能により偶然誤差と系統誤差(比例系統誤差, 一定系統誤差)を視覚的に判断することも重要である。偏差図はバラツキの状態を拡大して表示するため、分布形状が判定しやすい。以下に例を示す。

ブートストラップによる信頼区間計算ボタンを押すことで、線形関係式の信頼区間が求められる

相関係数の表示

階級数の入力ヒストグラムに反映される

Deming 回帰で使用する λ の表示

データ入力(最大は300まで)			
No	群1(1回目)	群2(2回目)	
1	0.22	0.41	0.22
2	0.50	0.40	0.50
3	0.51	0.70	0.51
4	0.71	0.43	0.63
5	0.32	0.80	0.30
6	0.50	0.96	0.52
7	0.40	1.05	0.40
8	1.68	1.13	1.59
9	0.60	1.18	0.57
10	1.12	1.20	1.08
11	0.91	1.30	0.92
12	2.16	1.60	2.21
13	1.24	1.70	1.19
14	1.16	1.72	1.17
15	1.30	1.80	1.29
16	1.58	1.83	1.67
17	1.30	1.89	1.41
18	1.32	2.00	1.33
19	1.33	2.06	1.27
20	2.06	2.23	2.02
21	1.83	2.32	1.89
22	2.35	2.40	2.70
23	1.15		
24	1.70		
25	3.68		
26	2.15		
27	4.01	3.00	3.72
28	2.80	3.40	3.02
29	2.40	3.50	2.21
30	3.40	3.70	3.16
31	1.54	3.71	1.65
32	2.83	3.77	3.14
33	4.28	3.99	4.19
34	3.40	4.00	3.10
35	2.83	4.02	2.83
36	2.28	4.10	2.18
37	3.70	4.20	3.93
40	5.16	4.92	5.36
41	5.95	5.10	5.93
42	2.97	5.30	3.30
43	3.79	5.65	3.93
44	3.40	5.80	3.30
45	5.20	5.80	5.53
46	5.90	6.10	5.50
47	2.34	6.20	2.33
48	7.10	6.20	7.82
49	3.94	6.80	4.28
50	4.50	6.80	4.17
51	6.00	7.00	6.27
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			

λ の入力欄

Deming の線形回帰式	b	a	b	a
誤差分散比 λ	1.155	0.248	1.149	0.247
λ (変量の分散/変量の分散)	0.659	0.203	0.60	
信頼区間上限	1.392	0.655		
標準主軸回帰	1.128	0.318	1.094	0.391
信頼区間上限	1.315	0.671		
Passing-Bablok	1.158	0.200		
信頼区間上限	1.408	0.506		

比較対照法との比較評価では、直線回帰で評価しないこと

$$y = bx + a \quad a = \bar{y} - (b \times \bar{x})$$

$$S_{y \cdot x} = \sqrt{\frac{S_{yy} - 2bS_{xy} + b^2S_{xx}}{n-2}}$$

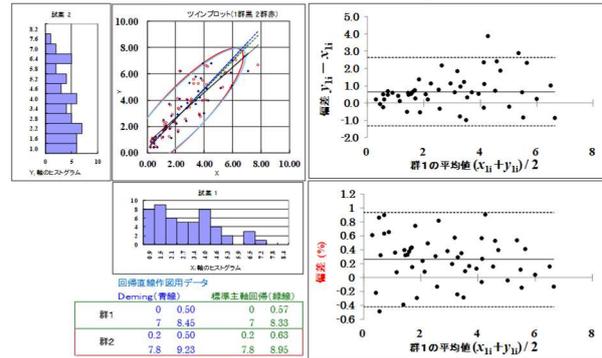
直線からの y 軸方向の標準偏差

$$s = \frac{S_{yx}}{\sqrt{1 + b^2}}$$

直線からの距離の標準偏差

誤差分散比(λ)

階級数	データ名	X	Y
1	0.0	8	8
2	1.5	17	9
3	2.1	23	6
4	2.7	28	5
5	3.4	33	3
6	4.0	41	8
7	4.6	45	4
8	5.3	47	2
9	5.9	47	0
10	6.5	50	3
11	7.2	51	1
12	7.8	51	0
13	8.4	51	0



【Altman の偏差図の作成方法】

- 2つの測定値の平均値 $(x_i + y_i) / 2$ を横軸に置く
- その差 $y_i - x_i$ を縦軸にして打点する
- 偏差の平均値を x 軸に平行な中心線として引く
- 偏差の標準偏差の ± 2 倍の位置に平行なリイド線を引く

【判定】

- 中心線からのバラツキが小さいほど、方法間の差が小さいと判断
- 相対誤差がある場合は、中心線が 0 から離り
- 0.5% 信頼区間に 0 が含まれない
- 相対誤差がある場合は、横軸のある範囲になる

Altman の偏差図の留意点

基本的に $y = x$ を想定した測定値の比較表示法である。測定単位が違ったり異なる測定法の比較には使えない。(平均値や偏差が無意味なため)

相対誤差がある場合は、相対誤差の判断が難しい。比例誤差がある場合は、相対軸プロット(%)に変換して観察する方法もあるが、相対誤差の影響を受けて、解釈が難解となることもある。

測定結果の入力

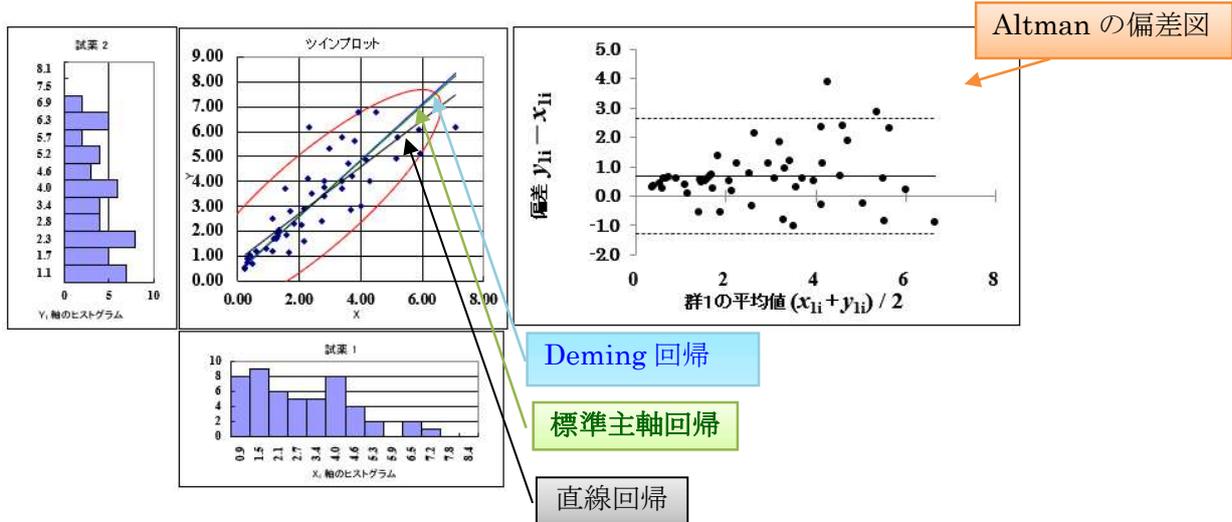
群 2(2 回目)のデータ入力欄

Deming 回帰と信頼区間

標準主軸回帰と信頼区間

Passing-Bablok 回帰

散布図とヒストグラムの分布に偏りがある場合は、得られた回帰や相関係数の評価に注意



群 2(2 回目)のデータを入力すると Deming 回帰の誤差分散比(λ)の計算結果を得ることが可能。

● 各回帰式の説明

直線回帰式

最小二乗法を利用した直線回帰式(ordinary least squares)は、広く利用される方法であるが、 x 軸側(説明変数)に誤差が存在しないことを前提とした回帰方式であるため、方法間比較の場合には適さない方法である。以下に直線回帰式の公式を示す。

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$a = \bar{y} - (b \times \bar{x})$$

$$y = bx + a$$

標準主軸回帰

標準主軸回帰 (standard major axis regression) は、次式で表され、幾何平均回帰 (geometric mean regression) とも呼ばれる。この回帰直線の特性として、常に等確率楕円長軸に一致することと、変数 x と変数 y の計測尺度の違いに対して頑強であることである。散布図上および視覚的にも両変数を平等に扱った関係式として理解しやすいものである。切片 a は上記の式から求める。

$$b = \sqrt{b_1 \cdot b_2} = \sqrt{\frac{S_{yy}}{S_{xx}}}$$

Deming 回帰

Deming 回帰は、各点の x 軸方向の計測誤差 e_x と y 軸方向の計測誤差 e_y の間に差があるとして、次式の誤差分散比 λ^* で補正して (誤差の少ない方の変数に、よりウェイトを置いて) 回帰式に対する標準偏差 s_d が最小となるように回帰直線を求める。技術的誤差に関しては、各試料の 2 回測定法などから算出する。

$$\lambda = \frac{(\text{各点の } y \text{ 成分の技術誤差})^2}{(\text{各点の } x \text{ 成分の技術誤差})^2} = \frac{e_y^2}{e_x^2}$$

$$b = \frac{S_{yy} - \lambda S_{xx} + \sqrt{(S_{yy} - \lambda S_{xx})^2 + 4\lambda S_{xy}}}{2S_{xy}}$$

Passing-Bablok 回帰

標準主軸回帰や Deming 回帰はデータの分布が正規分布でかつ極端値が存在しないことを前提としている線形関係式であるが、Passing-Bablok 回帰はノンパラメトリックによる方法であるため、極端値や分布の偏りに頑健な方法として用いられる。傾き b の算出方法は、全 2 点間の直線の傾きを求め、①完全に一致する 2 点は除外する、② y 軸に平行な直線は ∞ とする、③ x 軸に平行な直線の傾きは 0 にする、④ -1 より小さな傾きを除いた中央値を求めることによって算出する。ノンパラメトリック手法全般にいえることであるが、データ数が少ない場合は解が不安定になるため、データ数が少ない場合には使用を避けた方がよい。関係性が高い場合でも、少なくとも 30 サンプル程度は必要で、できれば 50 サンプル以上が望ましい。

* 誤差分散比 λ は、群 2(2 回目)欄にデータを入力すると x_{1i} と x_{2i} 、 y_{1i} と y_{2i} の誤差を計算し算出することができる。

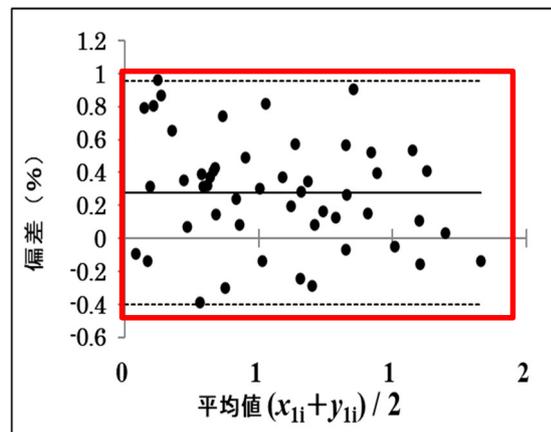
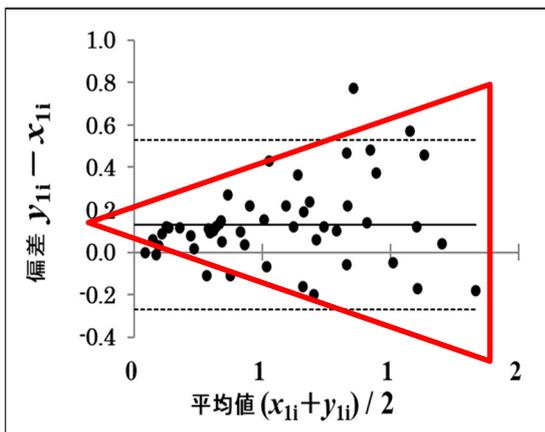
Bland-Altman の偏差図

Bland-Altman の偏差図は、2 つの測定方法の一致性の評価に用いられるもので、回帰とは別の表現方法で関係性を見ることができる。横軸 (x 軸) に x_i と y_i の平均 $\{(x_i+y_i)/2\}$ をとり、縦軸 (y 軸) に偏差 (y_i-x_i) を示したグラフである。誤差には、偶然誤差と系統誤差があるが、系統誤差の内一定系統誤差がある場合は、中心軸 0 点からずれてプロットされる。比例系統誤差がある場合は、傾きのあるプロット図として表現される。グラフには、実線でバラツキの中心を表し、 $\text{Mean}-2\text{SD}$ と $\text{Mean}+2\text{SD}$ のところに点線が表示されているので、誤差の大きさを知ることができる。

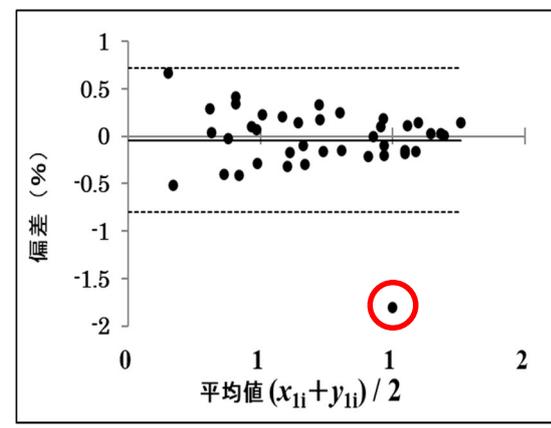
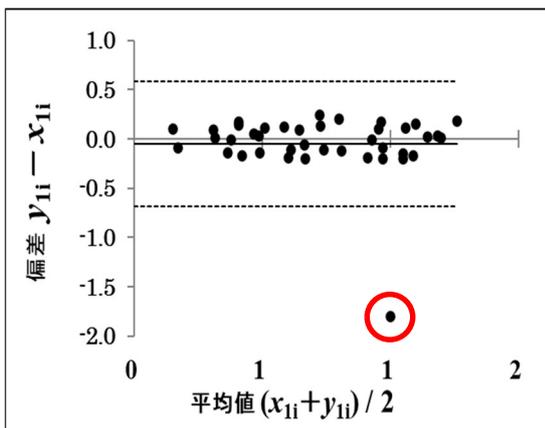
Bland-Altman の偏差図の判定法

- ・ 中心線からのバラツキが小さいほど、方法間の差が小さいと判断
- ・ 相加誤差がある場合は、中心線が 0 から偏り (95%信頼区間に 0 が含まれない)
- ・ 相乗誤差がある場合は、傾きのある図に (平均値と偏差の無相関の検定で有意となる)

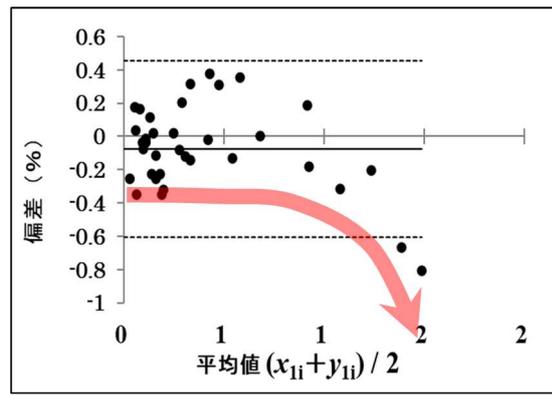
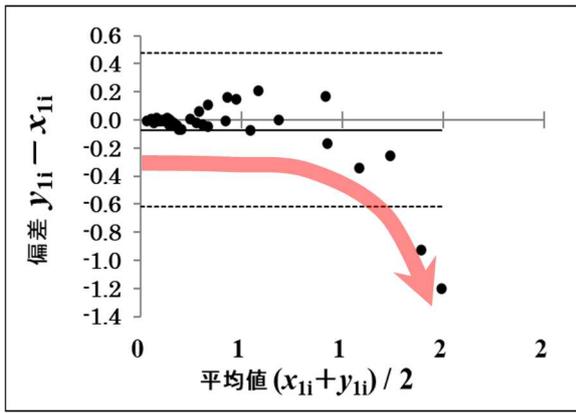
濃度依存性のばらつき



極端値の検出



直線性に問題がある場合



回帰係数の信頼区間算定法

・ Bootstrap 法

直線関係式における傾き b と切片 a の信頼区間を推定する方法として **Bootstrap 法** を採用する。これは、患者検体を使用する場合、分布に正規分布を仮定することが難しいため、分布型によらない推定量を得るため使用するものである。Bootstrap 法による 95%信頼区間を求めるためには、シートの上部にある **ブートストラップ計算** ボタンを押すことで得られる。なお、乱数を使用して計算しているため計算する度に多少異なる信頼区間となる。

実施例

14 ページの例は、従来法との方法間比較を行った例である。ピアソンの相関係数は $r = 0.860$ 、Spearman の相関係数 $r_s = 0.895$ と同一項目における $r < 0.95$ 以下で関係性が悪い。散布図を見ると濃度依存的に回帰式からの乖離が認められ、Bland-Altman の偏差図においても濃度の増大によって偏差が拡大している(偏差(%)では一定の傾向)。また、ヒストグラムを見ると、低値側にデータが偏った分布をしているなどパラメトリックで処理するのが不適なデータである。このようにデータ分布に偏りがある場合の回帰式の選択としては、ノンパラメトリックの Passing-Bablok 回帰が適用になる。実施例では、回帰の傾きと切片には統計上有意な差にはならないものの違いが認められる。

なお、Passing-Bablok 回帰は[ブートストラップ計算]ボタンで Passing-Bablok 回帰以外の信頼区間を求めた後に[Passing-Bablok 回帰の計算] ボタンで Passing-Bablok 回帰の計算を実施することで、適切な回帰式を算出する。Passing-Bablok 回帰はデータ数が 30 以下では、解が安定しないのでデータ数が少ない場合には適応に注意が必要である。

(5) 併行精度シート

併行精度は、従来同時再現性と言われていたものである。同一の試薬、装置、オペレータで短時間のうちに測定を行った結果について変動係数(CV)で評価する。

このシートでは数値だけの処理による解析間違いを避ける意味で、ヒストグラムを作成するようになっている。30 例程のデータで分布を把握することは困難であるが、外れ値などの結果に大きく影響するデータの把握は可能である。

併行精度は、測定法の精度の中で最も小さな値であり、日本臨床化学会で定めた精密さの許容限界値(CV_A : coefficient of variation of imprecision)の範囲以内であることが要求される。

(Validation-Support/Excel の許容誤差限界シート参照)

実施手順

① 測定試料の準備

基準範囲下限・基準範囲上限・異常濃度の少なくとも 3 濃度以上について、20 回測定分以上の試料を準備する。

② 試料の測定 (短時間で測定を行う)

③ 結果入力

試料の測定結果を「併行精度シート」に入力する。

(このシートでは 8 種類の濃度について検討できるようになっている。)

④ 結果の解釈

- 併行精度 CV(%)が「許容誤差限界シート」の CV_A (%)以下であること

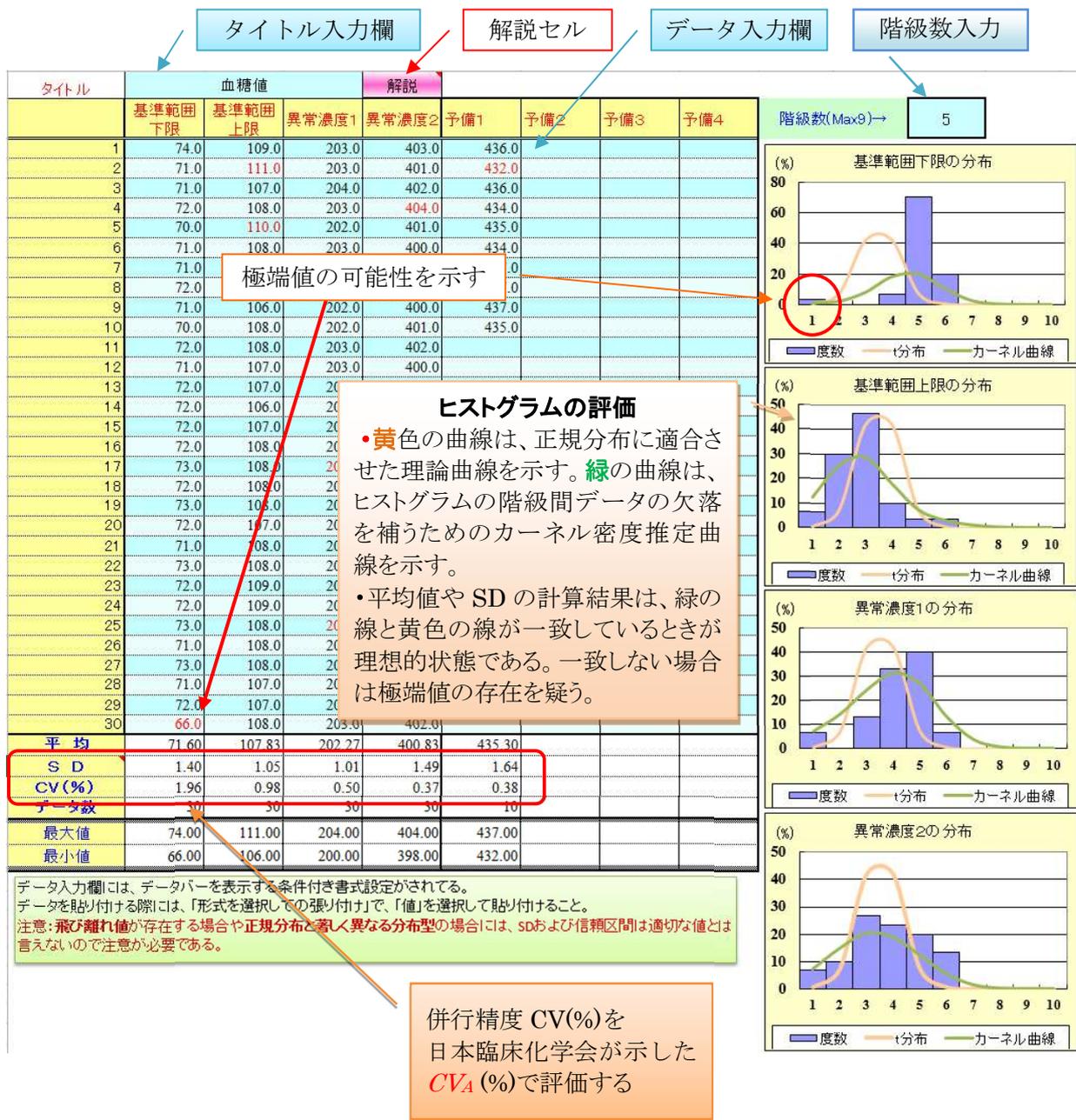
$$\text{精度(CV)} = (\text{標準偏差} / \text{平均値}) \times 100 \quad (1)$$

(試料濃度が基準範囲を超えて異常高値試料の場合は、5%を参考上限とする)

- 基準範囲域の試料においては、「許容誤差限界シート」を参照。

サンプルデータでは血糖の事例を紹介する。今回得られた結果では、いずれの濃度の CV も 0.37~1.96%でグルコースの許容限界値 $CV_A < 2.9\%$ であることから、併行精度は許容範囲内であるといえる。しかし、基準範囲下限のデータの中に下側に極端値が認められている。極端値を含めてデータ処理を行うかどうかを判断して解析を進める必要がある。

(この極端値は、検体不足によっておこった事象と判明したため、削除して分析をすることにした。基準範囲下限のデータの極端値を除いた場合には、 $CV=1.96 \rightarrow CV=1.3$ となった。)



許容誤差限界シート

表5 現在の技術水準から算出した施設間許容誤差限界と既報告の施設間・施設内許容誤差限界(%)

	日本臨床衛生検査技師会		日本臨床化学会		Ricos		臨床医の望む
	基準域施設間	高値域施設間	施設間 B_A	施設内 CV_A	施設間 B_A	施設内 CV_A	許容誤差
Glu	3.2	2.9	2.3	2.9	2.2	2.9	2.7

(6) 室内精度シート

(分析法の誤差変動は、濃度依存的に変化することを考慮し、同一シートを3つ用意している)

室内再現精度は、日内と日間の誤差変動を含んだもので、患者検体測定値の一般的な誤差の大きさを反映する。

このシートは、長期安定な管理試料を用いて室内再現精度(日間変動と日内変動)の評価および日常精度管理データからの日常検査の「不確かさ」算出を行うためのものである。解析には**分散分析法**を用い、日内変動と日間変動(**純日間変動**)を分離して、室内精度を確認することができる。日常測定しているコントロール血清を解説に従い測定し、1日2回以上の測定値を入力後、分散分析結果、グラフ化および結果判定を行う。許容範囲を上回る変動係数の場合には、対応を考える。

実施手順

① 測定試料の準備:

安定な管理試料を用い、基準範囲下限と上限のものおよび異常値濃度域に近いそれぞれの試料を3種類程度用意する。このときマトリックスについても考慮する。

② 試料の測定

1日数回(2回以上)、試料を測定。これを15日以上実施する。

(欠損がないようにする。計算は可能であるが、グラフにプロットされないことがある。)

③ 結果を「日内日間精密度シート」に入力

自動的に作図と分散分析の計算が行われ、分散分析の判定が実施される。

④ 結果の解釈

- グラフを観察し、全体像をつかむ。シフトやトレンドがある場合は、原因を追究して対処する。シフトやトレンドがある場合、適正な精度計算が行われないので注意が必要である。Vre6.2 から全データのヒストグラムを使って分布状況を観察することが可能に。
- 偏差平方和欄の赤字は、極端値の可能性を示す。日内データに大きなバラツキがないかを確認する。
- 分散分析の上側確率 P 値の判定結果から、日内変動と日間変動の関係を見る。 $P < 0.05$ の場合は有意に日間差があると判断する。なお、統計学的視点だけではなく、臨床的視点からの判断が重要である。総合精密度は、以下の式によって求められる。

$$\text{日間変動がある場合 } SD_s = \sqrt{SD_a^2 + SD_e^2},$$

$$\text{日間変動がない場合 } SD_s = \sqrt{\text{総変動} / \text{自由度}}$$

- 日本臨床化学会で定めた評価法に従い評価する。
 - 室内精度の日内変動と日間変動および総変動が「許容誤差限界シート」の表の CV_A (%)以下であること
(試料濃度が基準範囲を超えて異常高値の場合は、5%を参考上限とする)
 - 低濃度(低活性)域の試料に置いては、 CV_A を上限とする場合もある。
日内個体内変動が大きい項目(TG, Fe など)の判定には注意する。

室内精度①の例は、AMY について日内変動と日間変動を検討したものである。変動係数は日内 0.40%、日間 0.68% で臨床的効果量としては、日内・日間とも良好であった。しかし、等分散の検定(F検定)を実施すると観測された分散比は 1.67 であり、統計量から求めた確率は $p = 0.021$ となり有意水準 5% ($p < 0.05$) で検定すると、室内精度と日間精度の間には統計学的に有意な差があると判定された。ただし、これはあくまで分散の相対的な比較結果であり、両者の変動係数はいずれも十分に小さいことから、室内精密度に日間差があるとは考えにくい。なお、総合精密度は、室内精密度と日間精密度を分散成分として合成することにより算出している。

室内精度 2 の例では、CRP の日内変動と日間変動のデータを示した。日内と日間の変動係数を見るとそれぞれ 1.61%、0.5% で良好な結果であり、観測された分散比は 1.19 で $P = 0.21$ であったことから有意水準を $p < 0.05$ とすると、日間変動に差があるとは言えないと判定される。したがって、総変動から求めた精密度を採用する。

拡張不確かさの算出：また、測定試料が標準物質で「拡張不確かさ」が示されており、長期間繰り返し測定されているときには、総合変動のデータから、「日常検査における不確かさ」を算出することが可能となる。室内精度 1 の例から管理試料データ入力欄に「表示値」と「拡張不確かさ」および「包含係数」を入力すると、標準物質の拡張不確かさの 3.14% が計算されるとともに今回計測した総変動係数 0.79% から分散の加法性を使って、次式より日常検査の不確かさ 3.5% (包含係数=2) が計算される。なお、不確かさの算出には、90 日程度のデータが必要である。

$$\text{日常検査の拡張不確かさ(\%)} = \sqrt{\left(\frac{3.14}{2}\right)^2 + 0.79^2} \times 2 = 3.5$$

データ入力欄

日	NO. 1	NO. 2	NO. 3	NO. 4	NO. 5	平均	偏差平方
1	254	256				255.00	2.000
2	252	255				253.50	4.500
3	258	256				257.00	2.000
4	256	253				254.50	4.500
5	255	254				254.50	0.500
6	254	257				255.50	4.500
7	254	259				256.50	12.500
8	253	255				254.00	2.000
9	251	256				253.50	12.500
10	253	257				255.00	8.000
11	255	256				255.50	0.500
12	258	257				257.50	0.500
13	255	259				257.00	8.000
14	256	259				257.50	4.500
15	256	256				256.00	0.000
16	256	258				257.00	2.000
17	257	254				255.50	4.500
18	255	258				256.50	4.500
19	255	254				254.50	0.500
20	255	259				257.00	8.000
21	256	259				257.50	4.500
22	256	259				257.50	4.500
23	257	258				257.50	0.500
24	256	260				258.00	8.000
25	253	257				255.00	8.000
26	254	257				255.50	4.500
27	252	255				253.50	4.500
28	256	255				255.50	0.500
29	255	257				256.00	2.000
30	257	257				257.00	0.000
31	259	259				259.00	0.000
32	257	258				257.50	0.500
33	256	253				254.50	4.500
34	254	257				255.50	4.500
35	259	258				258.50	0.500
36	254	256				255.00	2.000
37	253	252				252.50	0.500
38	255	253				253.00	0.000
39	255	256				255.50	0.500

偏差平方和欄: 赤字は大きなばらつきがあることを示す

日内変動 CV(%)と 純日間変動 CV(%)

総合変動係数(CV)と CV_Aを比較

純日間変動CVと 日内変動CV

総合変動係数(CV)と CV_Aを比較

F 検定による日内変動と日間変動の分散分析検定結果

室内再現精度の評価: 日内変動と日間変動および全体的なバラツキを確認する

日常検査における拡張不確かさの結果

管理試料の表示値の入力欄 日常検査の「不確かさ」算出

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	精密度(SD)	変動係数(CV)
グループ間(日間)	322.88	63	5.13	1.016	0.40%
グループ内(日内)	196.00	64	3.06	1.760	0.68%
合計(室内精密度)	518.8750	127	2.023	0.79%	

観測された分散比: 1.673, P-値: 0.020958, F 境界値: 1.515

P-値より有意水準0.05以下から日内精密度に対し有意な日間精密度が存在する!

資料は入力可能範囲(セル)でデータを持ってきた場合バックの色消えてしまいますので注意して下さい!!

偏差平方和に赤字がある場合は、日内データに大きなバラツキがないかを確認してください。

室内再現精度(日内日間精密度)

全データに対するヒストグラム

標準物質の表示値 255.0 (← 使用した管理物質の表示値を入力)

標準物質の拡張不確かさ 8.0 (← 使用した管理物質の拡張不確かさを入力)

包含係数 2.0 (← 包含係数の入力(通常k=2))

標準物質の拡張不確かさ(%) 3.14%

日常検査の平均値 255.66

日常検査の総変動(%) 0.79%

日常検査の拡張不確かさ 8.98

日常検査の合成不確かさ(%) 1.76%

日常検査の拡張不確かさ(%) 3.51% (← 合成不確かさ×包含係数(2))

極端なバラツキ・トレンド・シフト等がないことを確認

(7) 検出限界と定量限界シート

これまで曖昧であった測定の検出限界について**ブランク上限**、**検出限界**、**定量限界**という3成分を明確に評価するものである。従来、2SD法や3SD法といった方法で行われていた最小検出感度(感度の用語にも問題がある)に替わるものである。

検出限界 (LoD: Limit of Detection)は、測定対象物の検出可能な最低の量で、**定量限界 (LoQ: Limit of Quantitation)**は適切な精度と正確さで定量できる最少量を意味する。検出限界 (LoD) は、全ての検査項目に要求されるものではなく、高感度測定が要求される腫瘍マーカーやホルモンなどの免疫関連物質の一部に限られる。

検出限界 (LoD) の算出方法は、被験物質を含まない試料を用いて**ブランク上限 (LoB: Limit of Blank)**を求め、検出限界に近いと推定される濃度の試料を複数使用して複数日にわたる測定値を用い合成標準偏差として合わせることによって計算される。

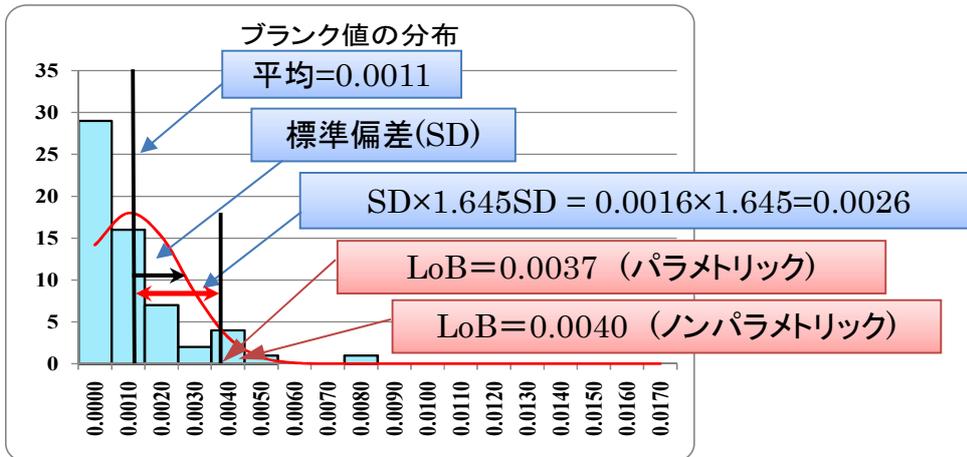
定量限界 (LoQ) はユーザーが行う項目となっている。定量限界は、定量限界に近い濃度の試料を複数用意し、各5回程度の反復測定を実施して **precision profile** を求め、許容限界 CV (10%、20%または任意%) の点から推定する。

この例は、CRP の LoD と LoQ を求めた事例である。ブランク上限 (LoB) は 12 種類の試料を 5 日間測定し、平均 0.0011 mg/dL、SD 0.0016 mg/dL を得たので LoB は平均値+1.645 SD より $LoB = 0.0037$ となった。しかし、マイナス側のデータがない打ち切りデータであるため、パーセントイル法 (ノンパラメトリック法) で上側 5%の値を LoB として 0.0040 を採用する。吸光度を利用してマイナス側のデータが得られる場合や機種によってマイナスデータも得られる場合には、パラメトリックで算出した $LoB = 0.0037$ が利用できる。つづいて、検出限界に近いと推定される濃度の試料の測定結果から合成標準偏差を求め、 $LoD = LoB + 1.645 \times \text{合成標準偏差}$ より $LoD = 0.0078 \text{ mg/dL}$ が得られる。

LoQ は、定量限界に近いと推定される濃度の試料の繰り返し測定値から、CV10%点を採用すると 0.017 と考えられる。LoD、LoQ とともに外れ値の影響を大きく受けるため注意が必要である。

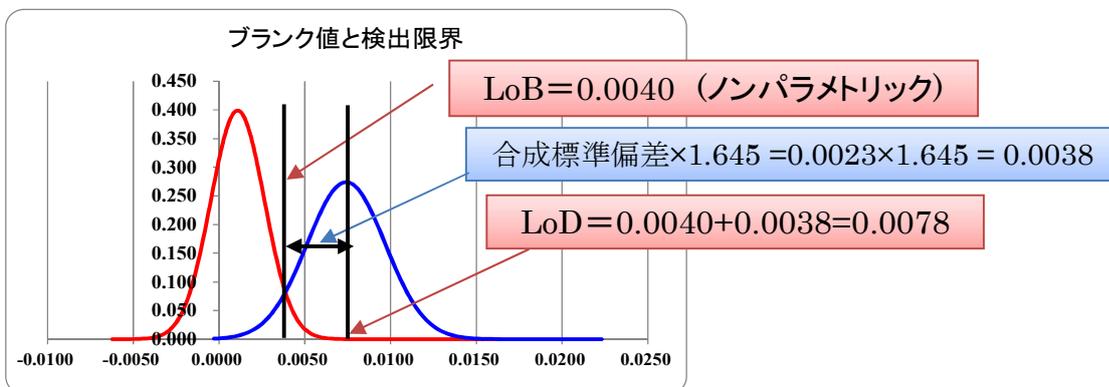
詳細については、「日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会：定量分析法における検出限界および定量限界の評価法、臨床化学 35:280-294、2006」を参照。

検出限界と定量限界のデータの意味



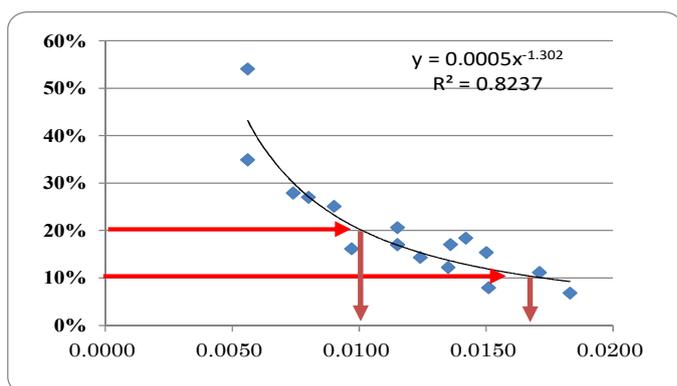
LoB グラフの見方

LoB は、分布が正規分布と仮定できる場合には、平均値と標準偏差を使って 0.0037 と計算することができるが、正規分布と仮定できない時はパーセンタイル法を使って、上から 5%の点(下から 95%点)0.0040 を LoB とする。ここでは、0.0 以下がない打ち切りデータであるため、パーセンタイル法での結果を採用する。



LoD グラフの見方

LoD は、検出限界に近い試料の測定結果から合成標準偏差を求め、その片側 95%を LoB に加えたものとしている。



LoQ	
CV 10%点	0.01723
CV 20%点	0.01011
30%	0.00741

LoQ グラフの見方

LoQ は、定量限界に近いと推定される濃度に対する CV%点から回帰曲線を求め、CV10%濃度を LoQ とする。

(8) New 直線性シート†

2024/05/02

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) は、2022 年に「定量的測定手順の直線性評価」の第 2 版ガイドライン (EP06-P2 2nd Edition) を発表した。初版の EP06-P では、回帰分析の適合度を分散分析によって評価していたが、この方法では、再現性の高い測定系で小さな直線性の逸脱を誤って問題ありと判定するリスクがあった。また、再現性が低い測定系では、非直線性を見逃すことがあった。続く EP06-A では、1 次式だけでなく多項式を使用するなどの改善が行われたが、これらのアプローチは統計手法に頼っており、臨床的な評価は含まれていなかった。

第 2 版では、この問題に対処するため、試験データを適切に視覚化し、各サンプル濃度での直線性から**臨床的に許容される偏差を評価する**新しい方法を導入した。多項式の使用はやめ、**重み付き最小二乗法線形回帰(weighted least squares : WLS) (切片なし)** を使って回帰直線を算出する方法に変更された。さらに、定量下限 (LLoQ) から定量上限 (ULoQ) までの全範囲で直線性を検証するようになっている。なお、バリデーションでは 9 つ以上のサンプルを用いて、ベリフィケーションでは 6 つ以上のサンプルを用いた反復測定を推奨している。

測定手順：

1. 校正の実施：

実施にあつたては、測定前に正しくキャリブレーションされていることが求められる。直線性を評価する際には、**重み付き最小二乗法線形回帰(WLS)**線形回帰を使用して、直性に対する分布と共に、切片の値が適正かどうかを判定する。

2. 検体の準備：

患者サンプル (測定対象) と可能な限り類似したマトリックスを有する高濃度検体と低濃度検体を準備する。一定のマトリックスを保持することを意識して準備することが重要。

- 高濃度検体は、測定上限(ULLI: Upper Limit of Laboratory interval)よりも十分に高い濃度の検体を準備する。困難な場合は、添加試料を検討する。
- 低濃度検体は、利用可能な場合は無添加の患者サンプルを用意する。困難であれば反応に影響を及ぼさない溶液で代用する。
- 直線範囲をカバーすること。検出下限(LLoQ)を考慮する。すなわち、低濃度検体は希釈用を使用する。ただし、計測には検出下限(LLoD)を下回るサンプルは、線形性分析データの分析に含めない。
- 最も低いサンプルはサンプルブランクではなく、推定される直線性区間の下限(LLLI: lower limit of the linearity interval)よりわずかに低く設定する。
- 準備した試料を使用してバリデーションであれば 9 段階以上のパネルを準備する。ベリフィケーションであれば 6 段階以上に希釈したパネルを作成する。なお、段階数を

† Vre.7.1 では、CLSI の「定量的測定手順の直線性評価」の第 2 版ガイドライン (EP06-P2 2nd Edition) 2020 年を基に改修を行った。

多くするのは WLS では、個々のばらつきの影響を受けるため、大きなバラツキが発生したときの影響を最小限にするためである。

- 間隔は、必ずしも等間隔である必要はないが、偏りがないように配慮する。
- 希釈系列は、ピペットのバイアスを可能な限り低減する手順で作成する。

3. 許容偏差の設定：

臨床的妥当性に基づいて許容偏差(ADL)を設定する。偏差はパーセンテージ(% δ)または絶対値(δ)で表すことができる。

相対値の ADL は、以下のように計算され、

例えば ADL=2% のとき Lower Limit は -4%、Upper Limit は 4% となり、ADL=5% の場合、Lower Limit は -9%、Upper Limit は 10% となる。

$$\text{Lower Limit} = (1 - \% \delta) / (1 + \% \delta)$$

$$\text{Upper Limit} = (1 + \% \delta) / (1 - \% \delta)$$

4. 反復測定の回数：

反復回数は次式より算出して実行する。計算のためには、検査法の %CV をあらかじめ測定することが求められる。%CV は単一濃度ばかりでなく、測定範囲全般に実施することが望ましい。この式は 95% の信頼区間を想定した式である。検査法の測定精度が悪いほど多くの反復回数が要求される。反復測定数は少なくとも 2 回以上行う。2 回の反復の場合は、測定精度向上のために、近接のデータを合成して精度を算出する方法がとられる。本ソフトでは高濃度検体から低濃度検体にかけて、3 濃度、3 濃度以下全ての 3 ブロックに分けてばらつきの算出を行っている。

なお、反復とは希釈調整から実行した回数であって、測定のみ反復ではないことに注意する。

例えば、許容偏差を 5% とし、検査法の CV が 4.2% の場合の反復回数 R の計算結果は 2.7 となり 3 回の反復回数が必要となる。

$$R = \frac{1.96^2 \times \text{検査法の CV}\% ^2}{\text{許容偏差 } 5\% ^2} = \frac{1.96^2 \times 4.2^2}{5^2} = 2.7$$

5. 測定：

ばらつきを最小限に抑え、精度を向上させるために、同じ日に単一の直線性パネルを使用して測定を行う。異常値の混入に気を付ける。

6. データ分析：

- ① 「直線性シート」にデータを入力する。
- ② グラフにプロットされたデータを視覚的に調査分析する。
(再現性、外れ値の存在、プロットパターンなどを調べる)
- ③ 外れ値は、調査を行い削除することも可能であるが、削除理由を明確にする必要がある。

- ④ 重み付き最小二乗回帰分析(WLS)は、各水準の分散(variance; Var)に反比例する重み(W)を使用して自動算出される。

$$W = \frac{\text{反復測定数}(R)}{\text{分散}(Var)}$$

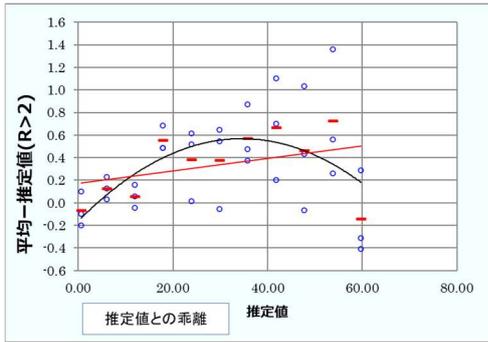
- ⑤ 反復測定回数が2回の場合は、分散を合併して平均分散を使用して重み(W)を算出する。(分散を計測するためには3つ以上のデータが必要なため)
- ⑥ SDがすべての測定値でほぼ一定である場合は、ordinary least squares (OLS)線形回帰が使用可能である。一方、濃度依存的にバラツキが大きくなる場合には%CVを使用して、WLSを使用する。
- ⑦ %CVは平均値で割るため、値がゼロに近づくにつれて、%CVが急速に増加し始める範囲がある。大きな%CVの濃度の部分はSDを使用して計算する。(一貫性のない%CVが得られた場合は、別の対処法考える)

7. 判定：

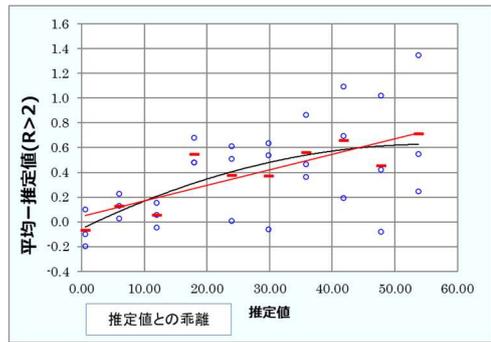
測定値があらかじめ定義された許容偏差(ADL)内に入っていれば、直線とみなされる。

この例は、CRPの直線性範囲を求めたものである。

- ① 本検査法の許容偏差(ADL)を2%に設定する。
- ② 必要な反復測定回数を求めるため、検査法の%CV値3.7%を入力すると、必要な反復回数が3と出力される。
- ③ 測定範囲上限以上の試料について(測定範囲上限以上と思われる検体)、低濃度検体を使用して希釈系列を作成するためのサポート表使用し、マトリックスを考慮しながら3度の希釈系列を作成し測定した。
- ④ 希釈倍率、被検試料の理論値および測定値を入力すると自動的にグラフ化および計算結果が得られる。
- ⑤ 作成された各種グラフから極端値の存在や入力間違いなどをチェックする。また、グラフの実測値の平均値(黒線)と予測式(赤線)からその一致度を確認する。
- ⑥ 回帰グラフからは十分な直線性であると思われたが、平均-推定値グラフから極端値は認められないものの、濃度依存性にバラツキが大きくなっていることが確認された。%Deviationグラフから最低濃度検体での%CV急激に大きくなっているが、その他では偏差率の最大が3.1%であり、ADL=2%のときLower Limitは-4%、Upper Limitは4%より全測定範囲が許容された。
- ⑦ しかし、最高濃度検体において理論値から低下する傾向が見られたため被検試料の理論値60mg/dLの計算利用の1を削除したところ、理想的な直線性が得られた。



60mg/dLのデータを利用しない



直線範囲と考えられるところに数値（ここでは1）を入力すると、数値入力した行のデータを利用して計算を行う。

希釈倍率の入力。

被検試料の理論値の入力

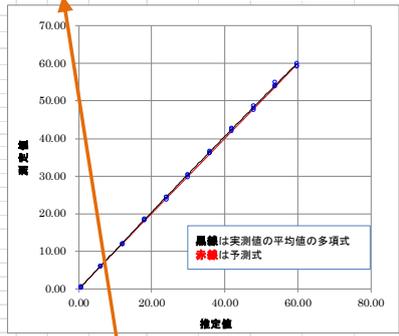
測定結果を入力する。

希釈系列を作成するためのサポート表。低値試料の濃度と高値試料の濃度を入れると理論濃度が表示される。(この例では利用していない)

計算利用	希釈倍率	被検試料理論値(x)	測定値(y)	平均(y)	Y推定値線り返し(R)>2	Y推定値線り返し(R)=2	SD	Var	Average Var	線り返し(R)>2		線り返し(R)=2		高値濃度	低値濃度	参考: 混合比率と理論濃度	
										平均-推定値	個別偏差率(%)	平均-推定値	個別偏差率(%)	混合比率	理論濃度		
1	1	60.00	59.30	59.57	59.71	60.59	0.38	0.14	0.257	-0.14	-0.2%	-1.02	-1.7%	60.0	0.0	1	60.00
1	0.9	54.00	54.00	54.47	53.74	54.53	0.57	0.32	0.139	0.73	1.4%	-0.06	-0.1%	10	0	1	54.00
1	0.8	48.00	47.70	48.23	47.77	48.47	0.55	0.30	0.042	0.47	1.0%	-0.24	-0.5%	8	2	0.8	48.00
1	0.7	42.00	42.00	42.47	41.80	42.41	0.45	0.20	0.042	0.67	1.6%	0.05	0.1%	7	3	0.7	42.00
1	0.6	36.00	36.20	36.40	35.83	36.35	0.26	0.07	0.042	0.57	1.6%	0.05	0.1%	6	4	0.6	36.00
1	0.5	30.00	29.80	30.23	29.85	30.29	0.38	0.14	0.042	0.38	1.3%	-0.06	-0.2%	5	5	0.5	30.00
1	0.4	24.00	24.50	24.27	23.88	24.24	0.32	0.10	0.042	0.38	1.6%	0.03	0.1%	4	6	0.4	24.00
1	0.3	18.00	18.40	18.47	17.91	18.18	0.12	0.01	0.042	0.55	3.1%	0.29	1.6%	3	7	0.3	18.00
1	0.2	12.00	11.90	12.00	11.94	12.12	0.10	0.01	0.042	0.06	0.5%	-0.12	-1.0%	2	8	0.2	12.00
1	0.1	6.00	6.10	6.10	5.97	6.06	0.10	0.01	0.042	0.13	2.2%	0.04	0.7%	1	9	0.1	6.00
1	0.001	0.60	0.70	0.53	0.60	0.61	0.15	0.02	0.042	-0.06	-10.7%	-0.07	-12.0%	0.1	10	0.0099	0.60

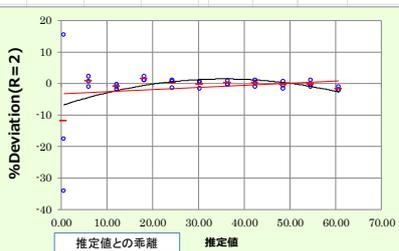
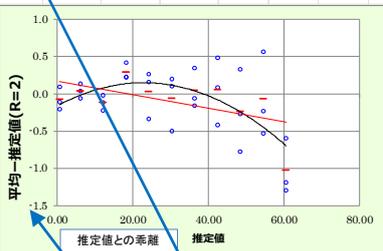
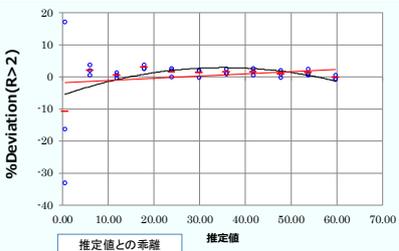
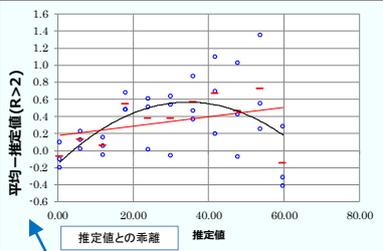
最低濃度は、LoQを考慮して設定する。ゼロを設定するとエラーとなるので注意。また、%CVが大きくなるが臨床的な必要性を考慮して判断する

反復回数の計算	切片なしの重み付反復
95%の信頼区間を想定した計算式を使用	反復回数(R)>2: 0.995
検査法の%CV: 2.5	反復回数(R)=2: 1.010
反復回数: 2回	重み付反復: 横き
	切片: 1.001 0.174



外れ値の存在に注意を払う

推定値に対するデータのバラツキや乖離が少ないことを確認し、評価する



低濃度検体では、%Deviationが急激に拡大することがある。この場合は、実測値で評価する

回帰グラフの表示

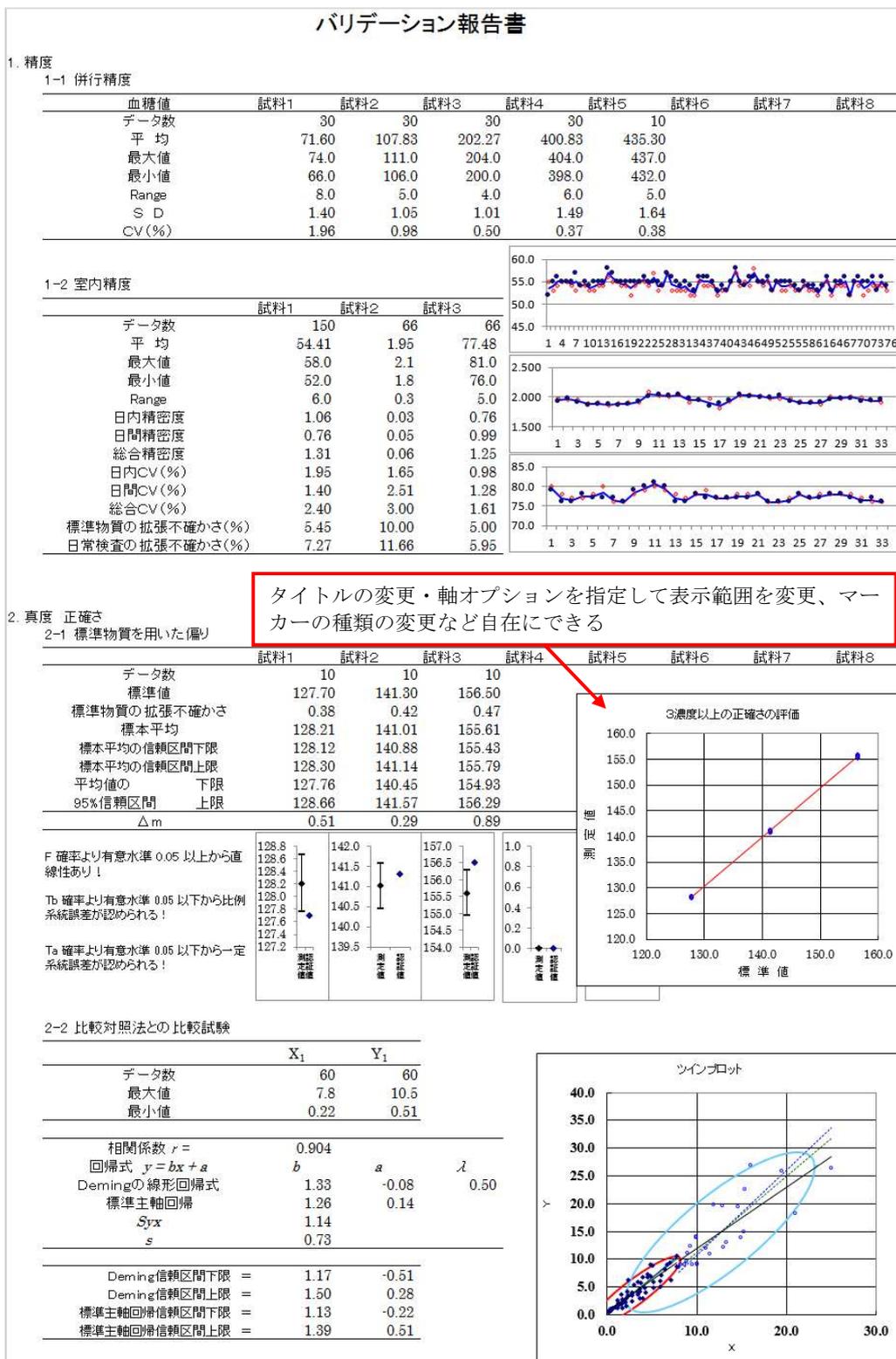
検査法の%CVから割り出した反復回数

平均-推定値(反復回数 R > 2 の場合)を表示

平均-推定値(反復回数 R > 2 の場合)を表示

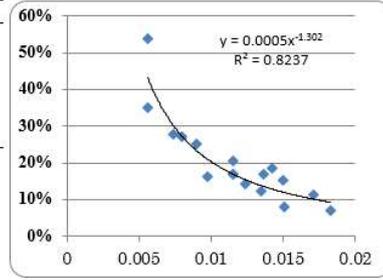
(9) 報告書シート

このシートは、これまで行ってきた検討結果を自動的にまとめたものである。精度、真度・正確さ、検出限界と定量限界、直線性、特異性 選択性をまとめて表示することで、これまでの検討結果の把握が容易となる。このシートには、シートロックがかかっていないので、書式やレイアウトグラフの変更等が自由に行える仕様になっている。

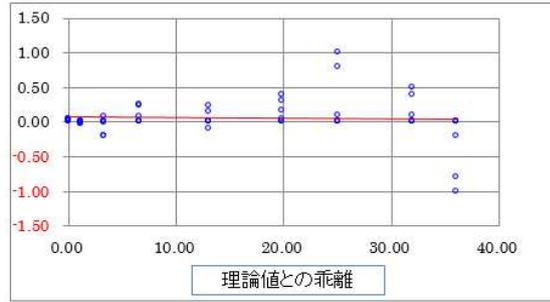
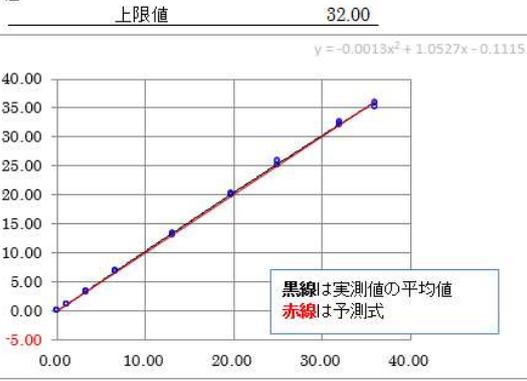


検出限界と定量限界

	ハラムリック	ノンハラムリック	
ブランク上限(LoB: Limit of Blank)	0.0037	0.0040	
検出限界(LoD: Limit of Detection)	0.0074	0.0078	
定量限界(LoQ: Limit of Quantitation)			
	CV 10%点	0.01722568	
	CV 20%点	0.01011401	
	任意点	CV 7%点	0.02265547



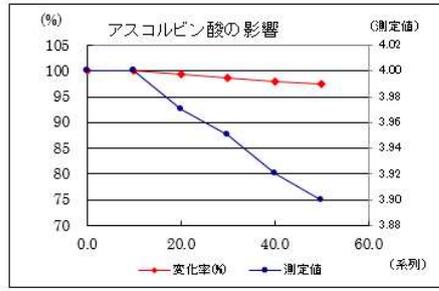
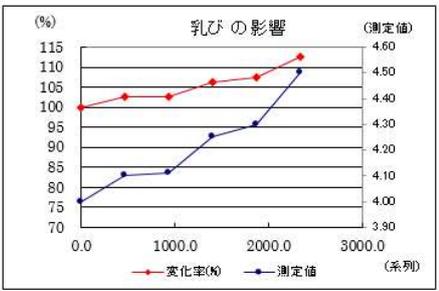
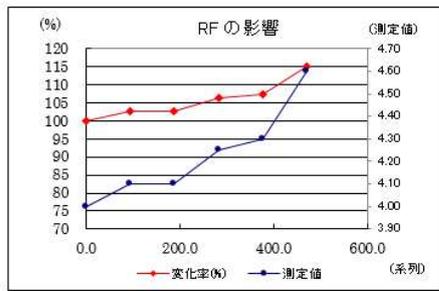
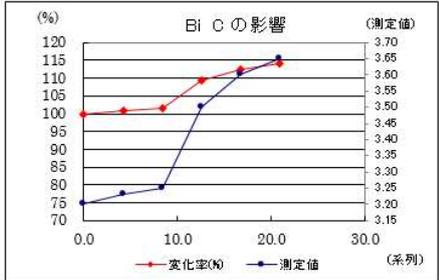
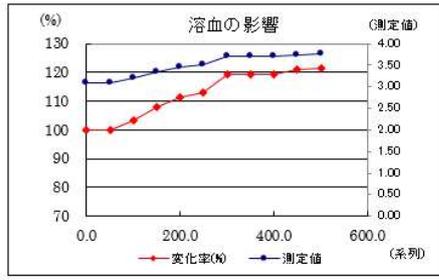
直線性



範囲

測定範囲 下限	= LoQ
上限	32.00

特異性 選択性



参考文献：

- 1) 市原清志: 臨床検査の分析能の比較評価法. 臨床化学 Vol.27, No.1, 21-49, 1998.
- 2) 細萱茂美:直線性の評価と試料希釈誤差補正法. 検査と技術 Vol.28, No.2, 131-134, 2000.
- 3) 細萱茂美:標準物質を用いた正確さの評価. 検査と技術 Vol.28, No.2, -292, 2000.
- 4) 細萱茂美, 尾崎由基男: トレーサビリティと不確かさの概念. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1283-1288, 2005.
- 5) 細萱茂美, 尾崎由基男: 一要因分散分析と精密度の正しい推定法. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1289-1292, 2005.
- 6) 細萱茂美, 市原清志: 検出限界と定量限界の設定法. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1307-1312, 2005.
- 7) 市原清志: 臨床検査の方法間比較. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1315-1326, 2005.
- 8) 山本慶和, 細萱茂美, 桑克彦, 大沢進, 高木康 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会: 定量測定法に関するバリデーション指針. 臨床化学 Vol.40, No. 2, 149-157. 2011
- 9) 臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会: 生理的変動に基づいた臨床化学検査 36 項目における測定の許容誤差限界. 臨床化学 Vol.35, No.2, 144-153, 2006.
- 10) 社団法人日本臨床衛生検査技師会 精度管理調査評価法検討・試料検討ワーキンググループ: 臨床検査精度管理調査の定量検査評価法と試料に関する日臨技指針. Vol.57, No.1, 109-117, 2008
- 11) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会: 定量分析法における検出限界および定量限界の評価法、臨床化学 35:280-294、2006
- 12) 汪金芳, 田栗正章; ブートストラップ法入門, 「計算統計 I : 統計科学のフロンティア 11」, 岩波書店 2003: 41-51
- 13) 杉山将; 機械学習、講談社 2013: 14-18
- 14) Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline—Second Edition (EP06-P2 2nd ed.). CLSI.