

ERM 認定体細胞標準物質に係る試験

1.目的

生乳中の体細胞数測定のための国際標準システムを確立することを目的とした IDF(国際酪農連盟)と ICAR (家畜の能力検定に関する国際委員会) および EC JRC(欧州委員会共同研究センター)の共同プロジェクトにより、ERM 認定標準物質(以下、ERM という)が開発された。

本会の蛍光光学式体細胞数測定機(FM)は、年 12 回の協会内内部精度管理(クロスチェック試料)、国内の 4 台のマスターマシン(乳技協・東海酪連・本会 2 台)による試験所間相互試験、ならびに国内の試験所が参加する年 4 回の外部精度管理により精度管理を行っている。また、本会のマスターマシンは、ICAR の技能試験スキームにも参加し良好な成績を得ており、国際標準にトレーサブルになっている(図.1)。このように、現状でも十分な精度管理が行われていると考えているが、今般、ERM を活用した精度管理の可能性について検討を行ったので報告する。

2.方法

1)試料

① E R M a 試料(低 SCC)

② E R M b 試料(高 SCC)

それぞれの認定値を表 1 に示した。

なお、評価に用いた認定値は、各試料下段の、直接鏡検法及び測定機により決定された体細胞数とした。

表1.ERM 認定値

	①ERM a試料(低SCC)		②ERM b試料(高SCC)	
	認定値(cells/mL)	不確かさ(cells/mL)	認定値(cells/mL)	不確かさ(cells/mL)
体細胞数 (直接鏡検法による)	64000	8000	1202000	121000
体細胞数 (直接鏡検法及び 測定機による)	62000	6000	1166000	79000

2) 試験手順

① 試料調製

付属マニュアル(別紙 1)の手順に従い試料を調製した。

試料調製はプロトコル A、プロトコル B の 2 つの調製方法が認められている。

今回は試料調製を調査試験課が行い、各事業所に発送して測定を行うという手順とするため、プロトコル B を採用した。

② 測定

協会所有の FM 8 台(A~H)で測定を行った。

ERM とあわせて、協会クロスチェック試料(以下、SCCクロスという)も同時に測定した。

③ 評価

ERM および SCCクロスの測定値について、統計処理を行い、再現精度について評価を行った。

④ キャリブレーション

③で条件を満たした機器をキャリブレーション対象とした。

3) 再現精度試験

ERM a および b 試料を各 5 回連続測定し、認定値からの差の相対比率を検証した。

3. 結果及び考察

1) 再現精度試験

①ERM a 試料・b 試料の測定結果を表 2 ならびに表 3 に示した。表 4 に ERM 2 試料の平均値と認定値からの差の相対比率を示した。

表2 a試料

	認定値	A	B	C	D	E	F	G	H
	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml
Count 1		61	59	60	48	67	59	56	63
Count 2		57	58	57	61	61	61	57	67
Count 3		64	57	55	63	59	60	72	63
Count 4		57	58	59	55	63	59	57	72
Count 5		61	63	62	57	67	55	55	57
平均	62	60.0	59.0	58.6	56.8	63.4	58.8	59.4	64.4
標準偏差 Sd		3.0	2.3	2.7	5.8	3.6	2.3	7.1	5.5
変動系数CV(%)		5.0	4.0	4.6	10.3	5.6	3.9	11.9	8.6
基準値との差		-2.0	-3.0	-3.4	-5.2	1.4	-3.2	-2.6	2.4
認定値からの 差の相対比率%		-3.2	-4.8	-5.5	-8.4	2.3	-5.2	-4.2	3.9

表3 b試料

	認定値	A	B	C	D	E	F	G	H
	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml
Count 1		1120	1163	1183	1148	1157	1108	1141	1198
Count 2		1122	1133	1130	1132	1183	1096	1081	1135
Count 3		1132	1105	1159	1128	1141	1103	1123	1153
Count 4		1083	1136	1146	1114	1157	1111	1088	1192
Count 5		1099	1090	1167	1155	1144	1116	1120	1172
平均	1166	1111.2	1125.4	1157.0	1135.4	1156.4	1106.8	1110.6	1170.0
標準偏差 Sd		19.8	28.5	20.2	16.3	16.6	7.7	25.3	26.4
変動係数CV(%)		1.8	2.5	1.7	1.4	1.4	0.7	2.3	2.3
基準値との差		-54.8	-40.6	-9.0	-30.6	-9.6	-59.2	-55.4	4.0
認定値からの 差の相対比率%		-4.7	-3.5	-0.8	-2.6	-0.8	-5.1	-4.8	0.3

表4 ERM 2試料の平均値と認定値からの差の相対比率

	A	B	C	D	E	F	G	H
ERM 2試料の 平均の差の相対比率%	-4.6	-3.6	-1.0	-2.9	-0.7	-5.1	-4.7	0.5

表2および表3より、ERM 2試料とも、試料に規定されている不確かさ(表1参照)の範囲内であった。

②協会クロスチェック試料の測定結果を表5に示した。

表5 SCCクロス

	基準値	A	B	C	D	E	F	G	H
	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml	千/ml
No. 1	10.5	10.5	10.6	10.6	10.4	11.3	10.4	10.0	10.7
No. 2	34.5	34.7	33.9	34.1	34.7	34.9	33.5	34.1	35.4
No. 3	58.0	57.6	57.0	57.7	58.2	58.4	57.4	56.8	59.2
平均		34.3	33.8	34.1	34.4	34.9	33.8	33.6	35.1
基準値からの 差の相対比率%		-0.2	-1.5	-0.6	0.3	1.6	-1.7	-2.0	2.2

表5より、全測定機で、SCCクロス3試料平均値は、基準値からの差の相対比率7%以内であり、本会の精度管理基準を満たす結果であった。

2) 評価

ERM(①)および SCC クロス(②)の各平均値について、認証値(基準値)からの差の相対比率を表 6 に示した。

表6 平均値の認定値(基準値)からの差の相対比率

	A	B	C	D	E	F	G	H
	%	%	%	%	%	%	%	%
① ERM 2試料の 平均の差の相対比率	-4.6	-3.6	-1.0	-2.9	-0.7	-5.1	-4.7	0.5
② SCCクロス 3試料の 平均の差の相対比率	-0.2	-1.5	-0.6	0.3	1.6	-1.7	-2.0	2.2

評価基準は、以下の条件のとおりとした。

- 条件 1: ①,②の平均の差の相対比率が両方マイナスもしくは両方プラスである
- 条件 2: ①,②の平均の差の相対比率が±3%以上である
- 条件 3: 条件 1、2 の両方を満たすこと

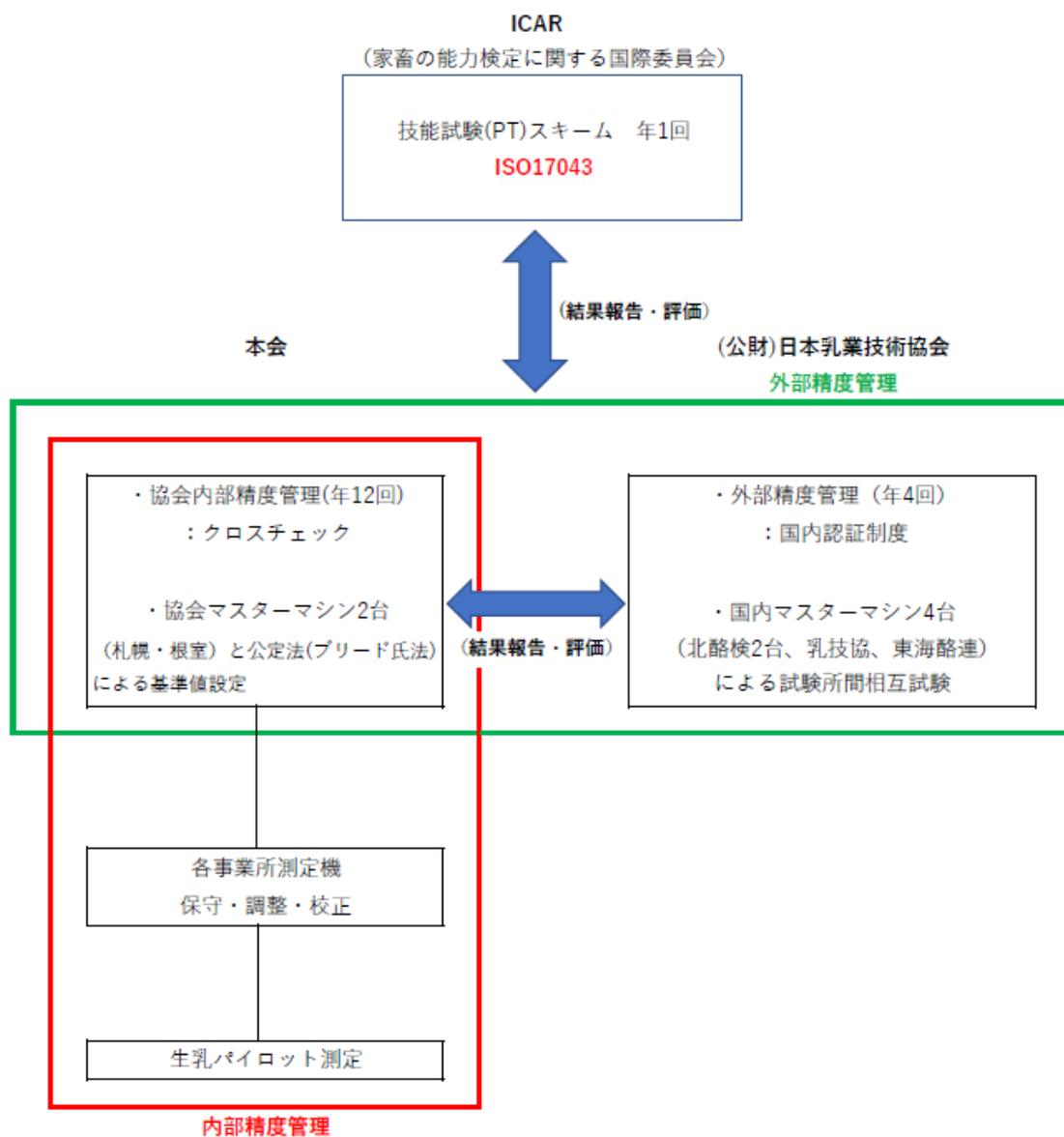
上記の基準から評価すると、条件を満たす機器は無く、今回の試験ではキャリブレーションの必要はなかった。

4. まとめ

ERM は ISO17034 認定機関(標準物質生産者認定)が製造元であり、認定値の決定には、各国の ISO17025 認定ラボが参加しているため、非常に信頼性が高い試料だといえる。従来まで、FM の再現精度の検証は、主に複数機器間の測定値平均とばらつきにより判断していたが、ERM を活用することで、これまでよりも正確で簡便な検証が期待できる。ERM 試料は凍結乾燥された粉乳であり、-20°Cで冷凍保管するため保管中の劣化の心配がなく、使用の都度、必要分を調製して使用する。調製手順も煩雑なものではないため、各事業所で使用したいときに直ぐに使うことができる。使用が想定される場面は、重大な機器トラブルが生じた後の確認試料として、あるいは技能試験のインターバル期間における精度確認等に使用できるものと考えている。このような国際認証を受けた信頼性の高い試料を容易に入手できるようになったことは、本会の機器精度管理において非常に有用であるため、今後活用していくこととしたい。

(中野まどか、小坂英次郎、國川尚子)

図1. 体細胞数測定機の精度管理体制



【別紙1】 付属マニュアル

プロトコル A

- 1) サンプル調製および分析当日に、サンプルを室温に戻した後、一定分量を計量する。
- 2) 粉末試料と水の比率は 1 対 9.22 である。したがって、粉乳 3.00 g (1 サンプル当りの最小採取量) の場合は、27.66 mL の蒸留水を加える。使用前に蒸留水は予め 40°C に加温しておく。
- 3) サンプル前処理用の容器は、ネジ式キャップが付いた清潔なガラス瓶 (ホウケイ酸ガラスなど) あるいは密閉可能な滅菌プラスチックボトルを使用する。
- 4) 粉末に 40°C に加温した蒸留水を加える。最初に、ボトル内の全ての粉末を蒸留水と接触させるよう手で軽く振る。手で軽く振った後、粉末が溶解して形成された塊が徐々に消えるまで、約 10 分かかる。
- 5) 磁気攪拌子を入れ、中速 (300 rpm) で 30 分間、40°C に設定したホットプレートで攪拌する。
- 6) 均一な溶液が得られたら、分注し、不必要な遅延なしに分析を進める。
- 7) サンプル調製後すぐに測定しない場合に備えて、測定前には再度、確実に混合する。

プロトコル B

上記の調製プロトコル A の代わりに、プロトコル B を使用できる。JRC-Geel (ベルギー Geel にある欧州委員会合同調査センター) の調査と試験結果により、2 つのプロトコルの同等性は保証されている。

- 1) サンプル調製および分析当日に、サンプルを室温に戻した後、一定分量を計量する。
- 2) 粉末試料と水の比率は 1 対 9.22 である。したがって、粉乳 3.00 g (1 サンプル当りの最小採取量) の場合は、27.66 mL の蒸留水を加える。使用前に蒸留水は予め 40°C に加温しておく。
- 3) サンプル前処理用の容器は、密閉可能な滅菌ベットボトル、あるいは滅菌遠心チューブを使用できる。
- 4) 粉末に 40°C に加温した蒸留水を加える。最初に、ボトル内の全ての粉末を蒸留水と接触させるよう手で軽く振る。手で軽く振った後、粉末が溶解して形成された塊が徐々に消えるまで、約 10 分かかる。
- 5) 手で 20 回振とうし (反転混合)、ボトルを 40°C の水浴に 30 分間入れ、手で 20 回再度混合し (反転混合)、サンプルを冷蔵室または冷蔵庫 (4°C) に一晩入れてタンパク質を再水和させる。
- 6) 翌日、手で 20 回再度混合し (反転混合)、ボトルを 40°C の水浴に 30 分間入れ、最終的に手で 20 回混合し (反転混合)、分析のために一部試料を分注する。