

デュアル比色光度法を用いた シングルチャンネルピペットの校正 およびオペレーターの習熟度評価

Rebecca L. Kitchener, PhD and Nathaniel G. Hentz, PhD

INTRODUCTION

手動ピペットは、ほとんどのライフサイエンス研究室において不可欠なツールであり、最も広く使用されている実験機器の一つです。校正の対象となる実験機器の中でも使用頻度が最も高い機器ですが、測定法の開発やバリデーションにおける正確性 (Accuracy) および再現性 (Precision) の低下要因として見過ごされることが少なくありません。しかし、ピペットの性能を適切に維持することは、信頼性と再現性を備えたデータを得るために不可欠であり、これらは研究室の評価と成功を左右する重要な要素でもあります。

測定法の開発およびバリデーション、さらに日常的な試験業務を成功させるためには、主に二つの要件が求められます。一つ目は、その測定法で使用する機器が適切に機能していることです¹。そして二つ目は、測定法の開発やバリデーションを実施するオペレーターが十分な教育訓練を受けていることです^{2,3}。規制対象の試験環境では、機器の適格性評価やオペレーターの資格認定は通常実施されているものの、手動ピペットのような比較的単純な機器は見落とされやすく、データ品質に与える潜在的な悪影響が十分に考慮されない場合があります。多くの研究室では、体系的なトレーニングや習熟度評価プログラムを実施することなく、オペレーターが適切なピペッティング技術を身につけていることを前提として業務が進められています^{2,3}。また、自動分注機と同様に、ピペットは予兆なく「静かに (silently)」故障する可能性があります。そのため、校正や定期点検のサイクル間に不具合が発生しても、それが検出されないまま見過ごされる恐れがあります。実際に、ピペットの故障の90%は予期せず発生することが報告されています⁴。したがって、オペレーターに対するピペッティング技術の教育訓練を実施し、定期的な再教育および習熟度評価を行うこと、さらに手動ピペットの性能確認および校正を定期的に行うことは、測定法バリデーションにおける誤差を最小限に抑え、データ品質を向上させるためのベストプラクティスと考えられています¹。また、日常的な分析業務を担当するオペレーターにとっても、継続的なトレーニングと定期的な評価は不可欠です。このような環境では、サンプル量が限られていることが多く、迅速な結果の取得が求められます。さらに、オペレーター教育と継続的なピペッティング訓練は、オペレーター間の手技の標準化に寄与します。一方で、定期的な校正および校正期間中の性能確認を実施することで、不具合のあるピペットを早期に特定でき、データ品質の信頼性低下が生じるリスクを最小限に抑えることができます。

研究室における最適なピペット校正頻度を設定するためには、いくつかの点を考慮する必要があります。まず考慮しなければならないのは、米国医薬品局(FDA)など規制当局が示している機器校正における最低限の要求事項に関する基本指針です。それに加え、各研究室ごとのピペットの平均故障間隔(Mean Time Between Failure: MTBF)および液体分注の目標信頼性を評価することが推奨されています。MTBFとは、ピペットの故障が発生する平均的な頻度を示す指標です。複数のピペットを継続的に追跡し、各ピペットが故障するまでの期間を記録することで算出できます。一方、目標信頼性は百分率(%)で表されます。例えば、信頼性95%とは、実験室内のピペット群の95%が、任意の時点において正常に機能している状態を意味します。

ピペット群のMTBFと目標信頼性を考慮することで、以下の例示グラフ(Figure 1)を用いて、その研究室に適した推奨校正頻度を算出することができます⁴。

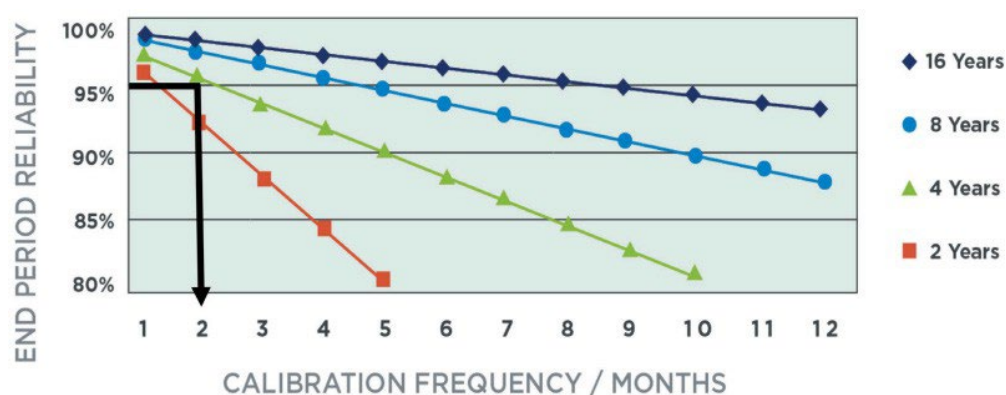


Figure 1. MTBFと目標信頼性に基づく推奨校正頻度⁴

例えば、研究室で使用しているピペットがMTBFが4年で、目標信頼性が95%の場合、研究室全体で95%の信頼性を維持するためには、Figure 1の黒い矢印が示すように、2か月ごとの校正が推奨されます。これは、多くの研究室で一般的に実施されている6～12か月ごとの校正間隔と比較すると、かなり短い間隔です。このような場合、分析担当者は、前回の校正以降にピペットに不具合や故障が発生していないことを確認するために、週次、日次、あるいは使用前に日常点検を実施します。日常点検を取り入れることで、ピペットの信頼性を大幅に向上させることができます。特に、多くの研究室では校正や定期点検のためにピペットを計測標準機関や外部の校正サービス事業者へ送付していることを考えると、日常点検は非常に重要です。日常点検は、ピペットを実際に使用している実験室内で実施できるため、不具合を早期に発見し、実験結果の信頼性維持に役立ちます。

手動ピペットの性能確認方法

ピペットの性能確認は、一般的に複数回にわたって一定量の液体を分注し、それぞれの分注量を測定することで行われます。ピペットの校正および性能確認には、広く受け入れられている方法として、重量法⁵、光度法⁵、および滴定法⁶の3種類があります。重量法によるピペットの性能評価では、ASTMまたはISO規格に従い、分注した液体の質量を天びんで測定します^{5,7}。その後、天びんで得られた測定値を用いて液体の質量を求め、対象液体の既知の換算係数を適用することで分注容量を算出します。この方法では通常、脱イオン水が使用されます。ライフサイエンス分野の実験室では天びんが広く設置されていることから、重量法は性能確認方法として最も一般的に利用されている手法の一つとなっています。

しかし、重量法にはいくつかの欠点があり、実験室で実施する前にそれらを十分に考慮する必要があります。重量法は一般的に100 μ Lを超えるような比較的大きな容量の測定では信頼性が高いとされていますが⁸、マイクロリットルやナノリットルレベルの微量域では、試料の蒸発が速く、周辺環境の影響を受けやすいため、正確な測定がより困難となる場合があります。マイクロリットル単位の分注量を正確に測定するためには、極めて高感度な天びんが必要ですが、このような天びんは、ごくわずかな振動や気流、静電気、さらには試験室内の環境条件の変化が測定結果に影響をもたらす可能性があります。一般的に、高感度天びんは厳密に管理された専用の試験室内に設置され、大理石製の計量台などに固定されています。そのため、性能確認を行う際には、ピペットを通常使用している実験室から持ち出し、天びんが設置されている場所へ移動させたいので、試験室の環境条件に十分になじませる必要があります。しかしこれは、正確性と再現性を最大限に高めるとともに、環境変化の影響を最小限に抑えるため、ピペットを実際に使用する研究室内で校正するという推奨事項とは相反しています。さらに、高感度天びんでは、分注後に測定値が安定するまで十分な時間待たなければならず、その結果、測定効率が低下するとともに、誤差が生じるリスクも高まります^{9,10}。残念ながら、この安定化時間は使用者が設定できる場合が多く、極端に短く設定すると測定の不確かさに直接影響を及ぼします。重量法は有効な手法ではありますが、ピペットが実際に使用される環境で評価を行うことこそが、そのピペットの実際の性能を最も適切に反映した結果を得るために重要です。

光度法は、ピペットの性能を評価するためのもう一つの一般的な手法です。通常、光度法は可視光または紫外線領域の光を吸収する色素を既知の濃度で含む溶液の吸光特性を利用します。ピペットを用いて一定量の色素溶液を容器へ分注しますが、このときの実際分注量は未知数として扱われます。その後、容器内の吸光度変化を分光光度計で測定し、物質収支計算に基づいて分注量を算出します。

光度法に必要な機器としては、適切な紫外可視分光光度計(UV-Vis分光光度計)、既知の光路長を持つ測定セル、および温度計が挙げられます。また、色素溶液を実験室内で調製する場合には、分析天びんとJIS Class A相当のガラス製メスフラスコなどの体積計も必要となります。

光度法による校正には、1種類の色素溶液を使用する単一色素光度法(Single-Dye Photometry)と、2種類の色素溶液を使用するデュアル比色光度法(Dual-Dye Ratiometric Photometry)があります。単一色素光度法では、色素溶液を、無色の希釈液が入った容器(キュベット、マイクロプレートウェル、または測定セル)に分注します。その後、吸光度を測定し、吸収された光の量が色素濃度に比例することを利用して、Beer-Lambertの法則に基づき分注量を算出します。単一色素光度法は高い精度を有し、重量法と比較して環境条件の影響を受けにくい手法です。しかし、デュアル比色光度法では標準化された2種類の色素溶液を使用することにより、トレーサビリティ、正確性、および再現性をさらに向上させることができます。この利点は、極めて微量な液量の測定において特に顕著です⁹。

光度法によって適切な校正および性能確認を行うためには、特性が十分に評価された容器、校正され安定性が確認された色素溶液、さらに校正済みの分光光度計および分析天びんが必要となります。これらの機器や器具のすべてが、必ずしもすべての研究室で利用できるとは限りません。そのため、100 μLを超えるような比較的大きな容量を日常的に測定する研究室では、光度法を自施設で運用する場合、重量法と比較して費用対効果が低くなる可能性があります。一方で、微量域の測定において光度法が実現する高い正確性と再現性、さらにそれによって得られる高品質なデータを考慮すると、光度法校正の費用対効果は重量法を上回るものといえます。

Artel® Pipette Calibration System (PCS®)は、即時の容量確認を可能にするデュアル比色光度法 (Dual-Dye Ratiometric Photometry)の原理を採用しています。ArtelWareソフトウェアを使用することで、ピペットから分注された液量を迅速かつ正確に測定することができます。そのため、使用前の日常点検、ピペットの損傷が疑われる場合、あるいは汚染後の洗浄作業後などに行う迅速な性能確認に適しているだけでなく、オペレーターのピペッティング技能評価にも有効です。また、Artel PCSは分析担当者が日常的に作業を行う実験室内で使用できるため、ピペットの不具合やオペレーターのピペッティング技術に起因する問題を、より迅速に特定することが可能です。ISO 8655-7で推奨される適切な色素を使用した場合、デュアル比色光度法による校正は重量法と比較して多くの利点を有しています。さらに、0.1 μLから5000 μLまでの広い容量範囲において、不正確性 (Inaccuracy) 0.6%以下、ばらつき (CV) 0.3%以下の高い性能で測定結果を提供することができます。

Beer-Lambertの法則

Beer-Lambertの法則は、色素を含む溶液に光を照射した際、溶液中の色素の濃度と、その溶液が吸収する光エネルギーの量との間に線形関係が成立することを示しています。この法則は、以下の式で表されます。

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l C$$

ここで、 A_{λ} は波長 λ における色素の吸光度を表します。 ε_{λ} はその波長における色素のモル吸光係数、 l は溶液中を透過する光の光路長、 C は溶液中の色素濃度を表します。したがって、ある波長における色素の吸光度は、モル吸光係数、光路長、および色素濃度の積に比例します。この原理の代表的な応用例の一つが、未知試料の濃度測定です。光路長およびモル吸光係数が既知であれば、特定の波長における吸光度を測定することで、この式から溶液中の色素濃度を求めることができます¹¹。

デュアル比色光度法

PCSは、独自の色素技術を用いたデュアル比色光度法の原理に基づき、迅速で使いやすく、トレーサビリティに優れ、かつ堅牢な容量測定を実現しています。このピペット校正手法は、ISO 8655-7にも記載されており、高い正確性、再現性、および測定の堅牢性を備えた手法として認められています^{6,9}。この手法では、2種類の色素(赤色および青色)の吸光度を所定の条件下で測定し、Beer-Lambertの法則に適用することで、最終的に手動ピペットの正確性および再現性を評価するためのデータを取得します。なお、赤色および青色色素の吸収極大波長は、それぞれ520 nmおよび730 nmです。デュアル比色光度法では、赤色および青色色素の濃度が厳密に管理されており、それぞれのモル吸光係数も既知かつ一定です。そのため、各色素について単位光路長あたりの吸光度を求めることができ、ピペットによって分注された赤色色素の容量を算出することが可能になります。これにより、ピペットの正確性および再現性を評価することができます^{6,12-15}。

Artel PCSの構成

Artel PCSは、コンパクトかつ持ち運び可能な設計となっています。省スペース設計により、さまざまな研究室での使用に適しているだけでなく、実験室間の移動も容易です。そのため、ピペットを実際に使用している場所で校正や性能確認を実施することができます。Artel PCSによって提供される測定結果は、NISTおよびNPLの標準を通じて国際単位系(SI)にトレーサブルであり、Artel PCSを用いたピペット校正は、CLIAやCAPをはじめとするさまざまな規制要件に適合しています。また、Artel PCSは21 CFR Part 11に準拠した研究室をはじめ、AABB、CAP、CLSI、およびISOが策定した臨床検査、校正、試験、および品質マネジメント規格の認定を受けた研究室でも広く利用されています。Artel PCSシステムは、以下のコンポーネントで構成されています。

1. PCS本体

PCS本体は、520 nmおよび730 nmにおける吸光度を高い信頼性で測定・記録します。本体にはバーコードスキャナー、自動開閉機構付きの蓋、およびバイアル混合機能が搭載されています。

2. ArtelWareソフトウェア

ArtelWareソフトウェアはPCSを制御し、ピペットの校正スケジュール管理、日常点検、ピペット管理、オペレーターのトレーニングおよび技能評価、文書管理を行うことができます。また、電子署名、監査証跡、パスワードで保護された個別ユーザーアカウント、セキュアなデータベースにより、21 CFR Part 11への対応を支援します。さらに、電子メール通知機能、ユーザー権限のカスタマイズ機能、レビュー、承認、および記録保管までを完全電子化した運用にも対応しています。

3. ノートPC

ArtelWareソフトウェアに対応したノートPCを使用することで、Artel PCSを実験室間で容易に持ち運ぶことができます。また、ソフトウェアをネットワーク環境へ導入することで、品質管理部門による遠隔でのアクセス、レポート作成、およびデータレビューが可能になります。

4. ラベルプリンター

ピペット管理用バーコードラベルおよびピペット校正ラベルを作成するためのラベルプリンターが付属します。

5. PCS QualAssure®試薬

PCS QualAssure試薬は、0.1 µLから5,000 µLまでの容量範囲に対応しています(Table 1)。PCS QualAssure試薬を用いて得られる測定結果は、NISTおよびNPLの標準を通じて国際単位系(SI)へのトレーサビリティが確保されています。

Table 1. PCS QualAssure試薬と対応するピペット容量範囲

QualAssure Solution	Pipette Volume
1	200 µL- 5,000 µL
2	50 µL- 199 µL
3	10 µL- 49.9 µL
4	2.0 µL- 9.9 µL
5	0.10 µL- 0.499 µL

6. PCS Instrument Calibrator Kit

PCS Instrument Calibrator Kitを使用することで、ユーザー自身が迅速かつ容易に装置の校正を実施することができます。Calibrator Kitには、4種類の異なる校正液が入ったバイアルが含まれており、これらのバイアルは密封された状態で繰り返し使用することが可能です。そのため、必要に応じていつでもArtel PCSの校正を実施することができます。Artel PCSの校正は設置場所で容易に実施できるため、校正作業のためにサービスエンジニアや専門技術者を手配する必要はありません。

Artel PCSのワークフロー

Artel PCSは、数分で完了できるシンプルなワークフローに従って操作します。分かりやすい操作ガイドに沿って進めることができるため、あらゆる研究室環境へ容易に導入することが可能です。基本的なワークフローは、ピペットの選択、実施するタスクの選択、試薬のスキャン、サンプルの分注、結果の確認の5つのステップで構成されています。基本的な操作手順をFigure 2に示します。



1. ソフトウェア上で対象のピペットを選択
2. ピペットのバーコードをスキャン



3. 実施するプランを選択(校正、トレーニング、技能評価、容量測定)
4. 試験容量を設定



5. Blank Vial(青色液)のバーコードをスキャン
6. QualAssure液(赤色液)のバーコードをスキャン



7. QualAssure液(赤色液)を分注
8. 測定結果をリアルタイムで取得



9. 自動生成されるレポートのレビュー、承認、電子署名を実施

Figure 2. Artel PCSワークフロー概要

Artel PCSの活用例

Artel PCSは、研究室のニーズに応じて、さまざまな用途に活用することができます。

校正

ピペットの校正は、従来、社内の計測管理部門または外部の校正サービス事業者によって実施されています。校正は通常、定期点検の際に、あるいは定期点検の一環として、有資格の専門家によって実施されます。一般的な校正手順では、まず現状性能の確認(As-Found校正)を行い、その結果に応じて必要な保守や調整を実施した後、最終状態の校正(As-Left校正)を行います。このプロセスは、必要に応じて繰り返し実施されることがあります。

トレーニングおよび技能評価

トレーニングおよび技能評価は、組織内のさまざまなオペレーターや研究室において、一貫したピペッティング技術を維持するために不可欠な仕組みです。トレーニングは、経験の有無にかかわらず、特に新規採用者に対して重要です。またArtel PCSは、オペレーターのピペッティング技能評価にも活用できます。技能評価は通常、事前に定められたスケジュールに従って定期的実施されますが、測定結果のばらつきが増加した場合や、cGMPが適用される研究室においてCAPA(是正措置および予防措置)の一環として実施される場合もあります。問題が発生してから対応するのではなく、あらかじめトレーニングおよび技能評価プログラムを構築しておくことで、不具合や品質問題に伴うコストを最小限に抑えることができます。さらに、このようなプログラムは、ピペッティング技術の重要性に対する意識向上にもつながり、測定の成功率向上に貢献します。トレーニングの重要性を示す例をFigure 3に示します。この事例では、2つの受講グループに対し、まず特別な指導を行わず、通常どおりの方法でピペッティングを実施してもらいました(Pre-Training)。その後、測定結果を評価し、適切なピペッティング手技について説明したうえで、同じグループに再度ピペッティングを実施してもらいました(Post-Training)。Figure 3が示すように、経験の有無にかかわらず、トレーニング後にはピペッティング性能が大幅に改善しています。

日常点検

日常点検は、定期的な校正プログラムを補完するために活用することができます。校正サイクルの合間に日常点検を行うことで、ピペットの不具合を可能な限り早期に発見でき、規格外の性能が確認された場合でも、是正措置を講じるまでの時間を短縮することができます。日常点検は、特に不適合が発生した際の影響やコストが大きい規制対象研究室において重要です。また、日常点検の結果は適切な校正の頻度を決定するための指標として活用することもできます。さらに、日常点検の結果は、ピペットの正式な性能履歴の一部として記録・保管されることが一般的です。

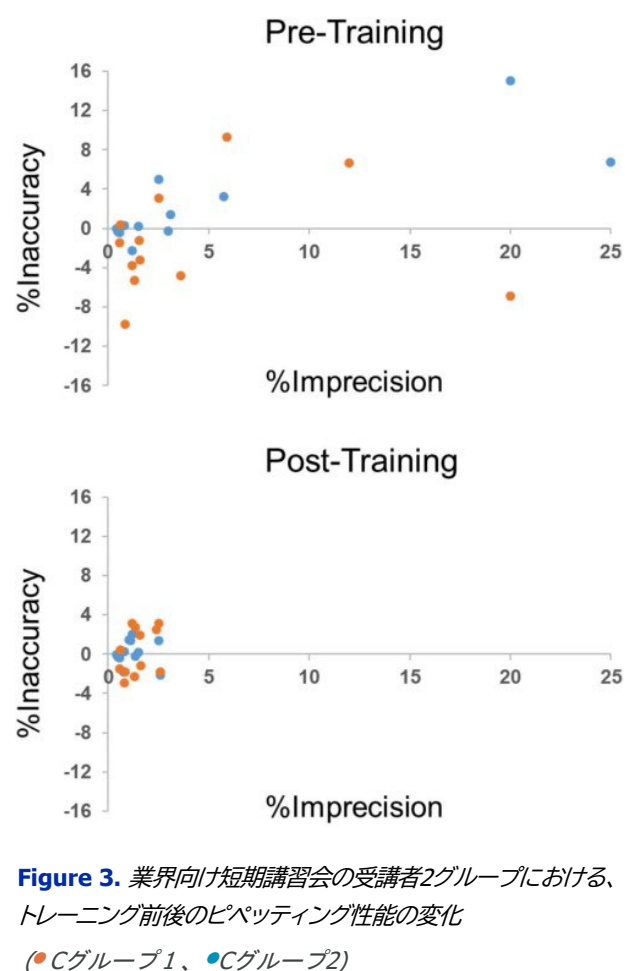


Figure 3. 業界向け短期講習会の受講者2グループにおける、トレーニング前後のピペッティング性能の変化

クイックチェック

クイックチェックは、多くの研究室で活用されている機能であり、ピペットの性能に何らかの懸念が生じた際に、その場で性能を確認するために実施されます。例えば、ピペットを実験台や床に落下させてしまった場合、新しいピペットチップを使用する場合、あるいは日常的な試験において規格外の傾向や通常とは異なる測定結果が認められた場合などに活用されます。

まとめ

本ホワイトペーパーでは、業界をリードするArtel PCSに採用されているデュアル比色光度法の原理について紹介しました。Artel PCSは、ピペットの校正、日常点検、オペレーターのトレーニングおよび技能評価を、効率的に実施できる統合ソリューションです。また、Artel PCSで得られる測定結果は、NISTおよびNPLの標準を通じて国際単位系(SI)へのトレーサビリティが確保されています。Artel PCSのワークフローは、分かりやすいソフトウェアインターフェースにより容易に実行できるよう設計されており、データのレビューから承認までを電子的に管理することができます。そのため、手動ピペットを使用するあらゆる規制環境へ円滑に導入することが可能です。さらにArtel PCSは、ピペットの校正、日常点検、オペレーターのトレーニングおよび技能評価に関する規制要件への対応を支援するとともに、21 CFR Part 11に準拠した電子記録管理にも対応しています。また、Artel PCSはピペットの校正記録やトレーニング記録を常に監査に対応可能な状態で維持することを支援し、研究室におけるデータインテグリティへの信頼性向上にも貢献します。

参考文献

1. Curtis R.H., Rodrigues G. *Pipette Performance Verification: An Important Part of Method Validation*. Am Lab News. 2004.
2. Vaccaro W. *Minimizing Liquid Delivery Risk: Operators as Sources of Error*. Am Lab. 2007; 39(17):16-17.
3. Carle, A.B. *Five Good Reasons – The Argument for Pipetting Technique Training*, MLO. 2013 Jul; 45(7):58-62
4. Artel. *Calibration Frequency for Pipettes* (Lab Report 6).
5. ISO 8655-6:2002. *Piston-operated Volumetric Apparatus - Part 6: Gravimetric Methods for the Determination of Measurement Error*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2002.
6. ISO 8655-7:2005. *Piston-operated Volumetric Apparatus - Part 7: Non-gravimetric Methods for the Assessment of Equipment Performance*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2005.
7. ASTM E 1154-14 (re-approved 2014). *Standard Specification for Piston or Plunger Operated Volumetric Apparatus*. ASTM International, West Conshohocken, PA. 2014.
8. *Volume Comparison on Calibration of Micropipettes -Gravimetric and Photometric Methods*. EURAMET Study 1353, Final Report. 2016. www.euramet.org
9. Rodrigues G., Curtis R. *Instrument Performance Verification: Micropipettes*. In: Chan CC, Lam H, Zhang XM, eds. *Practical Approaches to Method Validation and Essential Instrument Qualification*. John Wiley & Sons, Inc.; 2010:327-346.
10. Rodrigues G. *Bias, Uncertainty and Transferability in Standard Methods of Pipette Calibration*. Westbrook, ME; 2003.
11. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. *Principles of Instrumental Analysis* Sixth Edition; 1998.
12. Curtis, R.H. *Photometer Having a Long lamp Life, Reduced Warm-up Period and Resonant Frequency Mixing*. (US Patent No. 5,092,677). March 3, 1992.
13. Curtis, R.H., Rundell, A.E. *Pipette Calibration System*. (US Patent No. 5,298,978). March 29, 1994.
14. Curtis, R.H., Rundell, A.E. *Reagent System for Calibration of Pipettes and Other Volumetric Measuring Devices*. (US Patent No. 5,492,673). February 20, 1996.
15. Curtis, R.H. *Performance Verification of Small Volume Mechanical Action Pipettes*. Cal. Lab. 1996; 3: 23–28