

生じる問題は、検査前、検査測定過程の問題点が幾重に重なって如実に現れ、以下に示すように基準範囲の相互比較からも明確に標準化の評価が可能となる。基準範囲の設定も外部精度アセスメントの一面をなす。

2. 血漿蛋白の測定の標準化と問題点

1) 検査前検査

CRM470関連成分を含め、血漿蛋白成分のサンプルの至適採取法、保存法が詳細に検討確立されているわけではなく、CRM470関連成分においても至適条件で採血から保存までルチンペースで適切に行われているかも疑問である。一つの参考となるのはWHOのtechnical report、CRM470の作成を記載したBCRレポートがある(表3)(2)。ただし、あくまでも標準品作製を目的としており、例えば、至適容器などの選択基準も不明のままである。

今後、臨床化学会、技師会などにおいて、文献的な見直しと必要に応じて系統的な実験により、検査前検査の統一基準を個別成分別に詳細に決めてゆく必要がある。

2) 測定検査

血漿蛋白においては表2のように多くの因子により測定値がバラツクため、酵素測定法のように標準品、測定法の両面から標準化出来ない。このような理由から免疫化学的測定法では、標準物質をまず作製しここから総合的に標準化を図る方法が取られる。血漿蛋白国際標準品として代表的なものにCRM470があり(表4)、このほかWHOからサイトカイン、ホルモン類などが認証されている。国際標準物質の表示値がサンプルまで正確に伝達され(correct value assignment)、逆にサンプルの測定値が国際標準品の設定表示値に一致する(traceability) reversible な表示値の正確な移行が、標準化の必要十分条件となる。もし、この条件が完全に満たされれば、実は測定法システムの違いを超えた、標準化が実現することになる。著者は唯一無二の評価法として測定範囲内において希釈系列を作製し対数座標において両者の直線性の完全癒合を、標準化の実現の目安としている(3)。免疫学的測定法における測定システムの問題は、複雑多岐にわたる影響要因をいかに最小限度に止めることが出来るかが、ここでシステムの質が決められ、各成分ごとでできる限り原点を通過し $y=x$ の直線を持つものが優れたシステムと言える。

3) 検査後検査

測定値がバラツク原因の一つに入力ミスがある。これについては、検査全般にわたる患者識別コードのシステムと測定結果の自動組み込みにより確実に改善が図られている。いかに人を介するプロセスを最小限に止めるか更なる改善が課題となる。先に述べたように個別成分の標準化の実現の程度の判断には、健常者を対象とした基準範囲の設定が有力な目安となる。標準品は原則として健常者の血清から構成されており、構造、免疫学的挙動も近似していることがこの理由である。あらゆる条件を越えて最終的に基準範囲が、5-1内に収められれば、標準化は実現したと判断される。

患者検体においては、健常者とは異なる性状を有する。従って、十分なサンプル数で、できれば同一サンプルで病的状態においても比較評価検討することが望まれる。

3. 個別蛋白成分についての考察

第一類の成分(CRM470関連成分)

1) CRP

CRPは炎症マーカーとして、本邦でもっとも広く利用されている血漿蛋白である。細かな点は別にして、標準化がおおむね実現した数少ない成分である。CRP標準品の歴史は古く、1985年にWHOで一次標準品が作製され(WHO CRP85/506)、これに準拠して旧国立予防研究所で作製された国内標準品(二次標準品)により推進され、さらに1993年から導入されたCRM470に引き継がれている。

(3)。標準品用のCRPは患者血清、腹水から粗精製されたもので、これを健常者プール血清に入れて(spike)作られている。その安定性、構造、物性も均一で、免疫反応性ともに、標準品、正常血清、患者血清ともほとんど差異がなく、この結果作製される抗体もほぼ同一のエピトープを認識しており、極めて標準化が容易である。著者は過去5年間、日本衛生検査所協会のCRPサーベイ調査に関わってきた。ここでの問題は、最近の医療経済の悪化にともない汎用測定システムにCRPが組み入れられ単点検量により測定が行われているために、CRM470導入に関わらず、正確定量が行われておいなかったことによる。現在、多点検量への強力指導を行い徐々に改善が得られてきている(4)。CRPの基準範囲は現在使用されている測定シス

テムが 0.3-0.5 mg/dl 位の測定感度限界であり、ほとんどの健常者はこれ以下に含まれ、正確な基準範囲は設定されていない。近年CRPの循環器疾患の新しいリスクファクターとして注目を集め、0.5 mg/dl 以下のいわゆる高感度測定法が急速に普及してきている。これにともない、まもなくCRP高感度測定法の標準化が必要とされる時代を迎えている。ごく最近一測定システム(Behring ネフロメトリー法)で基準範囲が設定され 95 パーセントイルで非喫煙者で上限が 0.1 mg/dl、喫煙者で 0.2 mg/dl と設定されている。

近年の遺伝子工学の著しい進歩で、大量のリコンビナントCRPの産生が可能となり、本邦のほとんどの測定システムで利用されている。今後は、標準品からキャリブレーター、コントロールまで全て統一され値づけされたリコンビナントCRPが普及すれば、CRPの標準化は他の成分に先駆けて初めて完成されることが期待される。

2) IgG

IgG は主要免疫グロブリンの一つで、血清では著増する骨髄腫や慢性炎症、著減する免疫不全症などが測定の対象となる。標準品の歴史はもっとも古く1967年にWHOでIgA、IgMとともに初めて一次標準品が作製され(WHO 67/85)これに準拠して旧国立予防研究所で1987年にCRPも合わせ国内標準品(二次標準品)が作製され標準化が行われた。さらに1993年から導入されたCRM470はWHO 67/85から値づけされ、質量濃度で表され引き継がれている。この標準品の問題点はまず表示値の不正確にある。1967年当時は現在のよ様な精度、正確性に優れた自動測定システムはなく、マニュアル法である単純免疫拡散法により値づけされ、これが現在に至るまで引き継がれている。IgGを含め免疫グロブリンの表示値をより正確に修正することは理想であるが、表示値変更による臨床の現場での大混乱を生じるため、今後もこの表示値を継続使用されるのが妥当と思われる。CRM470が導入されたとき、直ちに一測定システム(Behring ネフェロメトリー法)に基準範囲設定を行い、年齢、性別、生活習慣などからの基準範囲の設定を行った(5)。男女差認められるが、実は喫煙の影響であった。男性の喫煙比率が高いため、見掛け上の差異であることが判明した(表5)。日本臨床化学会に血漿専門委員会が置かれ、著者はCRM470関連成分の基準範囲設定プロジェ

クトを立ち上げた。あらかじめ国内外の測定システムを有する各社に希望を募り、BCRレポートに準拠して正確にCRM470から値づけられたキャリブレーターを各社独自に作製していただき、各社に健常血清200検体を配付して市原法(Box-Cox変換法)により設定した(6)。この結果を図1に示す。CRM470に準拠したキャリブレーターは、独自に値付けして作製したキャリブレーターに比べ、測定システム間のバラツキはかなり解消されている。同時に、注目すべきは測定システム間のバラツキは依然と存在し、国際標準品だけでは限界があることが示唆される。CRM470に準拠して作製されたキャリブレーターで、世界で初めて小児の基準範囲が設定されている(7)。

平成11年医師会サーベイ調査では、CRM470に準拠したキャリブレーターが80%にもおよび、プール血清2種類の調査結果では方法間変動はCVは2%以下であり極めて満足行く結果を得ている(表6)(8)。これはCRM470の効果による。

3) IgA

IgAは主要免疫グロブリンの一つで、主に消化器、肺などの粘膜組織に広く分布している。測定の意義はIgGとほぼ同様である。国際標準品はIgG同様CRM470が用いられている。

医師会サーベイ調査でもCRM470の導入の効果が顕著に現れており、方法間変動はCVは5%以下であり極めて満足行く結果を得た。日本臨床化学会での結果でもCRM470の導入効果は認められている。

一般的に成人では男女差はない。喫煙等の影響もなく従って基準範囲は一本に統一され 110-410 mg/dl (n=418)と設定されている。年齢別変動が認められ、生下時に感度以下であり漸増して15歳くらいで成人に達し、以後ほぼ一定の値をたどる。CRM470に準拠してIgG同様、小児の基準範囲が設定されている(8)。

4) IgM

IgMは主要免疫グロブリンの一つで、分子量が約100万で血管内に主に分布存在している。測定の意義は原発性マクログロブリン血症や免疫不全症などの補助診断にある。国際標準品はCRM470が用いられている。

医師会サーベイ調査ではCRM470の導入にもかかわらず、方法間変動は未だCVは10%と成績不十分である(表7)。しかし各企業に直接測定を依

頼して、いわゆるマスター法として基準範囲を設定した日本臨床化学会でのプロジェクト結果では、バラツキはかなり解消されている(図2)。IgM は高分子であり、増加患者血清では IgG などと複合体を形成してさらに高分子化するなど物性が極めて複雑であり、測定システムによっては影響を受けやすく、実際の病的患者血清では更にバラツク可能性がある。少なくとも、サーベイ調査には測定システム、サンプルマトリックス効果など何らかの問題が含有しておりこれらの追及により(例えば単点検量)改善は期待できると思われる。

基準範囲では成人では女性が男性に比べ高値となることが、これまでの調査で明らかにされている(表7)。また女性では年齢別変動がある。機序は不明である。

CRM470に準拠して、小児の基準範囲も設定されている(8)。生下時に47mg/dl で、漸増して約一歳で成人レベルに達する。

5) C3

補体第3成分(C3)は SLE、急性糸球体腎炎など免疫複合体性疾患で低下する。活性経路が古典経路、交替経路の2種類あるがいずれも低下する。C4は古典経路のみ低下することから、両経路の活性化状態を知ることが出来る。

CRM470導入以来C3については未だ標準化は達成されていない。当面、達成は困難と思われる。臨床化学会で行った基準範囲設定においても、基準範囲にも互換性が認められない(図3)。

C3は血中の蛋白分解酵素により分解されて、自然状態ではC3cへと変化する。従って新鮮血清では完全構造のC3から徐々にC3cへと置き変わり、両者は保存状態などにより複雑な比率で存在する。このような理由から、CRM470においてはC3は全て、酵素処理によりC3cに均一化している。一方、各社のキャリブレーターは恐らく同様にC3cであると推定される。また抗体は免疫原としてC3cを用いているが、完全構造のC3とも交差反応を示す。各測定システムに同一物質を配付してこれだけバラツクのは、配付試料中のC3cの不均一性に対して、各測定システムで完全構造C3からC3cに至るまでの抗体の反応性が異なることが主な原因と推定される。標準化からみて有効な方法は、4℃で20日間放置し血清中のC3を全てC3cに変換し均一化すれば、バラツキの縮小は可能となる。一方、採血血清分離後、短時間で測定すれば完全構造の

C3の比率が高いため、C3cを認識する抗体の反応性は低いため測定値は低下する。このような検査上不可避な状態を認識して、当面、検査利用が必要となる。

機序は不明であるが、基準範囲は飲酒群は非飲酒群に比べ低値となる(表8)(5)。

6) C4

C4は古典経路の活性化を、特異的にその濃度低下で知ることが出来る。日本臨床化学会での調査結果では、CRM470導入が効を奏した成分である(図4)。男女差、年齢差が認められない。

第二類の成分

CRM470には無数の成分が含まれており、潜在的な予備軍は数多い。最近では、血清総蛋白測定の標準化が国際臨床化学会(IFCC)で新しいプロジェクトとして企画されている。CRM470を全ての蛋白測定に関わる標準品として利用することは、著者は以前からの主張であり(9)、最近では尿アルブミン標準化にも成果を挙げてきており、国際的な動向も同様と思われる。未発表であるがトランスフェリンレセプターも成果が上がって来ている。

第三類、特殊項目の成分

1) CA19-9 抗原

CA19-9 抗原はすい臓ガン、胆嚢癌、大腸ガンなどのフォローに利用される糖鎖抗原である。以前から標準化の必要性が説かれたが、未だ解決が与えられていない。医師会サーベイ調査においても測定の方法間変動は40%を越え(表9)、サーベイ調査で2種類の試料をX軸、Y軸に同時に表したツインプロットで、高値領域と低値領域にグループに別れ、広く測定値が分布している。現状では基準範囲の共有は期待できない。

この問題については、菅野剛史班長の下で著者が取り組んできたが諸般の事情から休止している。これまで明らかとなったことは、測定のバラツキの原因は1)抗原構造が高分子で不均一性が高い、2)抗体の認識するエピトープが異なる、3)測定システムの performacne が不良なものがあるこの3点に要約される。大別して original assay である Centocore 社の単クローン抗体(NS19-9)を採用しているグループと、これを用いない非 NS19-9 グループに分類される。後者はさらに互換性を持たない不均一なグループで構成されている。

国際的な統一基準となる標準物質はなく、本来そ

れぞれの免疫原をキャリブレーターとしており、表示値も Centocore 系と非 Centocore 系とで異なる。仮の標準法を Centocore 社の放射免疫測定法測定値としていあるが、相関性は薄い。Centocore 系の測定システム同士でも、同じ抗原、抗体を用いても測定原理などの違いから測定値は大きくバラツク。基準範囲の設定は、健常者+2SDのポイントである37U/ml をカットオフとして設定された。その後数多くの測定システムが発売されたが、測定システムの違いも考慮されず、同じ値を使用する異常事態が続いている(表9)。

このように背景は極めて複雑で、CA19-9 抗原の測定の標準化は困難であると判断される。今後、測定値の乖離の要因の更なる解明と、将来的には共通のキャリブレーターの使用も考慮すべきである。

2) Prostate specific anigen (PSA)

前立腺がんのマーカー蛋白である。早期発見のスクリーニング検査として、また治療効果、フォローに有用性が認められている。血清中には主に、遊離型(free form)と α 1- ACT)と結合した ACT 結合型から構成される。日本国内では、現在30種類を越えるとされる測定システムが利用されているが、総 PSA 測定値に乖離が見られており、そこで、泌尿器学会と臨床病理学会とが共同でサーベイ調査を行い、この原因が各測定システムの抗体の、free formとACT結合型に対する反応性の違いによることがあらためて確認された。すなわち両者に対して等価(equimolar)に反応する抗体と、非等価(non-equimolar)に反応するものがあり、equimolar ではバラツキが少ないが、non-equimolar ではより free form に対する反応性が高く、この程度の違いにより測定値が異なることを確認された(10)。現在、各企業において測定システムを equimolar に変更し、標準化を推進する努力が行われている。1999年、WHO から精漿精製由来の遊離型 PSA、および free form と ACT 結合型が 1:9の比率で混合した標準品が登場しており、さらなる標準化は推進されるものと期待される。しかし日本医師会サーベイ調査においても未だに改善が得られていない(表10)。

標準化が推進されていない現在、基準範囲は測定システムで異なる。AIA2000 (TOSOH) では20 - 0.2-2.4 ng/ml、50歳以上では0.4-5.0 ng/ml で(11)、50歳を境に70歳後半まで漸増す

る。

PSA は生理的変動の上に、前立腺肥大(BPH)などでも増加する。そこで前立腺肥大、前立腺癌について測定して濃度分布を検索したところ、BPH の75%は 4 ng/ml 以下で残り25%も10 ng/ml 以下であった。これに対してステージ A, B の癌では45%が偽陰性であったが、23%は >10 ng/ml であったことから、4-10ng/ml をグレーゾーンとし 4 ng/ml を病態識別の目安カットオフ値とするようになった。しかしこれは、参考基準法とされる Tandem R 法により定められたもので測定システムが異なれば当然異なるはずであるが、実際にはこの値がカットオフとして共有利用されている。

3) α -フェトプロテイン

肝臓がんのマーカー蛋白である。測定システムは30以上を越える。我が国では国際標準物質は WHO 72/225 AFP(1975)、最近ではCRM486がある。前者はロットのたびに値づけが変更になる問題があった。医師会サーベイ調査においても方法間変動、方法内変動も10%以内で腫瘍マーカーとしては比較的安定している(表9)。ただし、サンプル直線性は低いため、やはり測定システム間の問題は内在しており現状での標準化は望めない。また、症例によっては濃度が極めて高いために、測定希釈誤差などの影響も否定できない。基準範囲は健常成人で平均+2SDで10ng/ml 以下であるが、良性疾患との鑑別して肝臓がんスクリーニングを行うために、15- ng/mlをカットオフとしている。

4) 癌胎児抗原(CEA)

非特異的腫瘍マーカーであり、特に大腸がんの再発の早期発見、フォローに有用である。抗原が極めて複雑な糖鎖構造を有し、認識エピトープが異なり、しかも交差性を有する複雑構造の類似抗原が存在するだけに標準化は困難である。現在30以上を越える測定システムがある。日本医師会サーベイ調査では方法間差が15- 決が得られていない。WHO 国際標準品は存在するが、これを用いてなおかつ同じ抗体を使用して放射免疫測定法により健常成人の基準範囲を平均+2SDで求めると、2.5 ng/ml、酵素免疫測定法では 5.0 ng/ml と2倍濃度が異なる。この機序は不明なままである。

5) 甲状腺刺激ホルモン(TSH)、フリーT4

甲状腺の一次、二次的機能亢進、機能低下の診

断に遊離型サイロキシン(フリーT4)と合わせて測定される。標準物質は WHO から各社が独自に値づけを行っている。具体的な値付けの方法も不明なままである。医師会サーベイ調査では酵素免疫法が70%を占めている。方法間差は 7.9-12.04%と幅広い。しかし基準範囲は収束が認められてきている(表10)。

フリーT4の標準物質はなく、透析平衡法により値付けされたものを仮の真値として、各社が独自にキャリブレーターに値付けしている。IFCC においては、フリーT4の標準物質の作製を考慮中である。

おわりに

蛋白の免疫学的測定法の標準化においては、基準測定法がないだけに国際標準品がもっとも重要な位置を占める。CRM470関連成分ではこの標準品により標準化が実現可能なものと、不可能なものがあり後者は個々の成分により機序が異なり、多くの因子が複雑に作用している。一方、腫瘍マーカー、甲状腺関連ペプチドでは国際標準品がないものがあり、あっても標準品として求められる諸条件を満たさず、腫瘍マーカーに見られるように構造、免疫反応性の複雑性から解決の糸がかりをつかめないものも多い。標準品の対極に存在する測定システムに求められるものは、複雑抗原の多様性の影響を受けずに、いかに高い performance を開発・改良できるかにかかっている。作製法、性状、安全性などの規定された信頼できる国際標準品の作製から、優れた測定システムの確立、最終的に基準範囲の設定に至る標準化の道筋が、これからも持続的に開かれなければならない。

文献

1. 外部精度評価(EQA)標準化のためのガイドライン(JCCLS GP2-
会誌 4:137-
2. Baudner S et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins CRM470, Brussel; Community Bureau of References, Commission of the European Community, 1993, P1-172.
3. 伊藤喜久、河合 忠 IFCC 血漿蛋白国際標

準品(CRM470/RPPHS)ー開発の経緯、特徴、日本への導入経過ー 臨床病理 血漿蛋白13項目の日本人成人基準範囲 P24-

4. 伊藤喜久 免疫血清学 CRP 日本衛生検査所協会精度管理調査報告書平成 11 年度 P87-98, 2000
5. 河合 忠、菅野剛史、市原清志、伊藤喜久他 血漿蛋白13項目の実用的な基準範囲 臨床病理 P207-
6. 市原清志 基準範囲設定のための統計処理法 臨床病理 P48-
7. 伊藤喜久 免疫グロブリン A (IgA) 日本人小児の臨床検査基準値 P263-P266, 1996
8. 吉田 浩 血清学的検査 平成11年度第33回臨床検査精度管理調査結果報告書 P98-2000
9. Itoh Y, Kanno T, Kawai T, et al. Serum protein standardization project in Japan. Evaluation of an IFCC reference material (RPPHS/CRM470) and establishment of reference intervals. J Clin Lab Analysis 11:39-44, 1997.
10. 加野象次郎、石橋みどり、伊藤喜久 我が国における総 PSA 測定の現状と方法間差の要因 臨床泌尿器外科 11:942-949, 1998
11. 飯田暢子 PSA Medicina 36:671-1999

図1 CRM470 導入によるIgG 基準範囲の設定

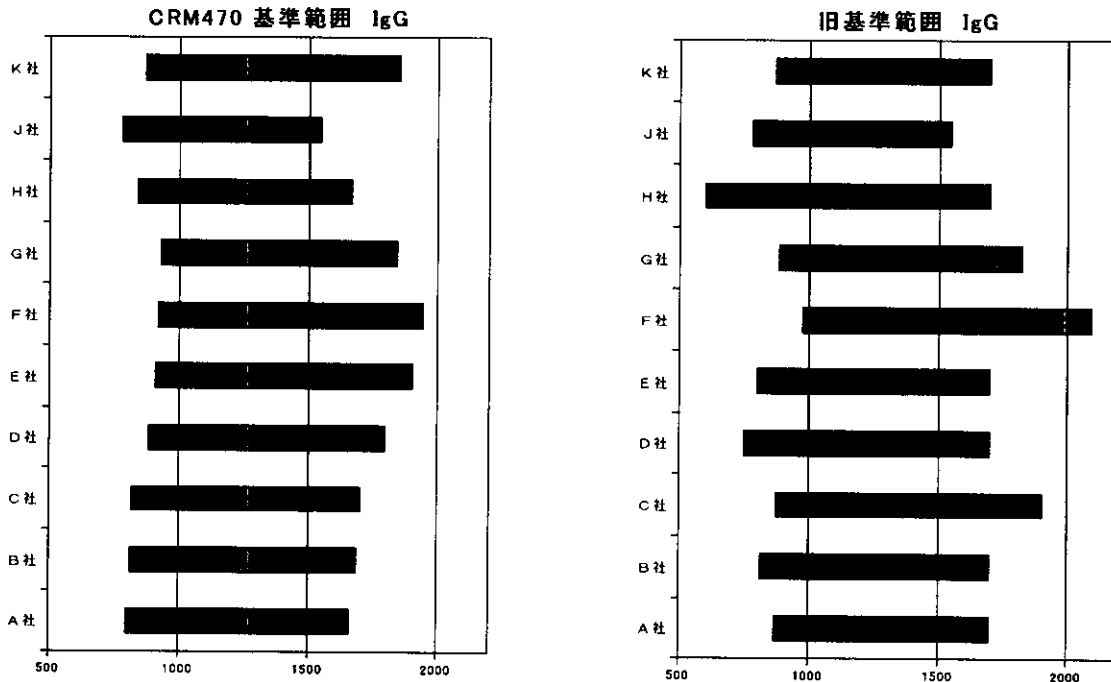


図2 CRM470 導入によるIgM 基準範囲の設定

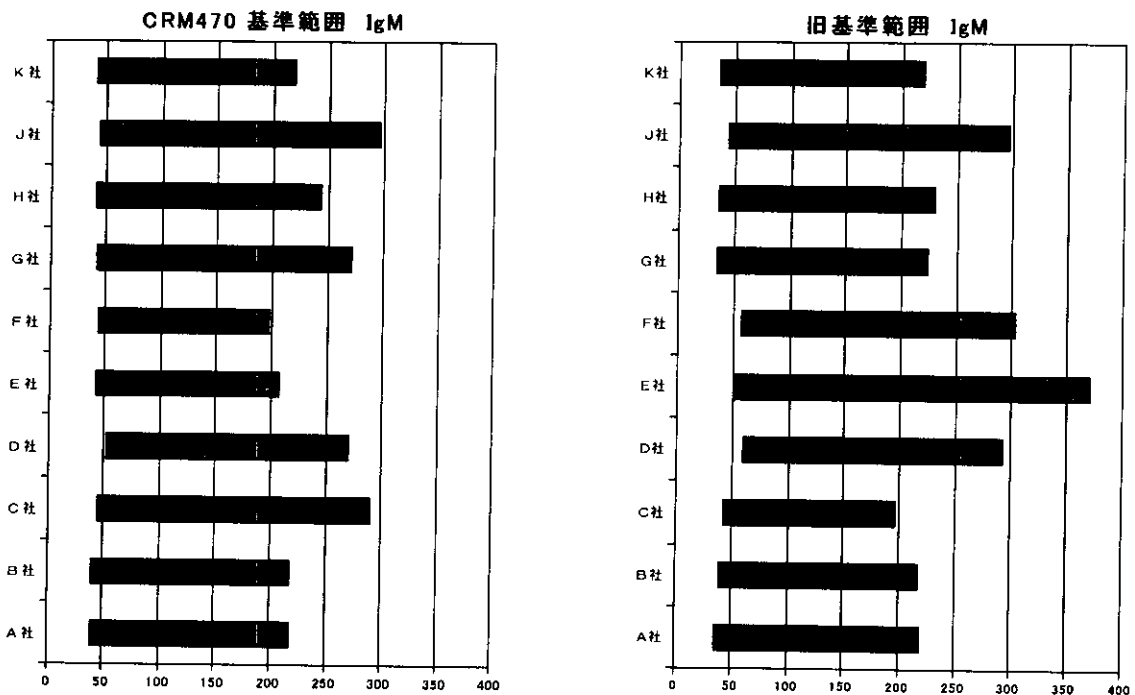


図3 CRM470 導入によるC3基準範囲の設定

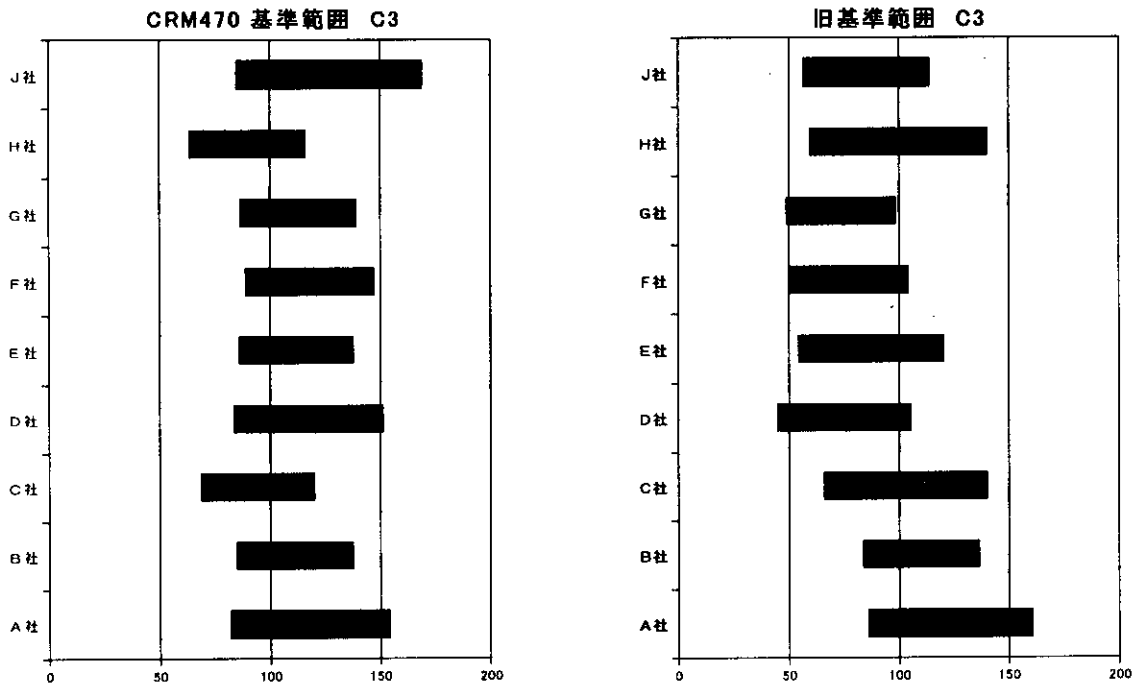


図4 CRM470 導入によるC4基準範囲の設定

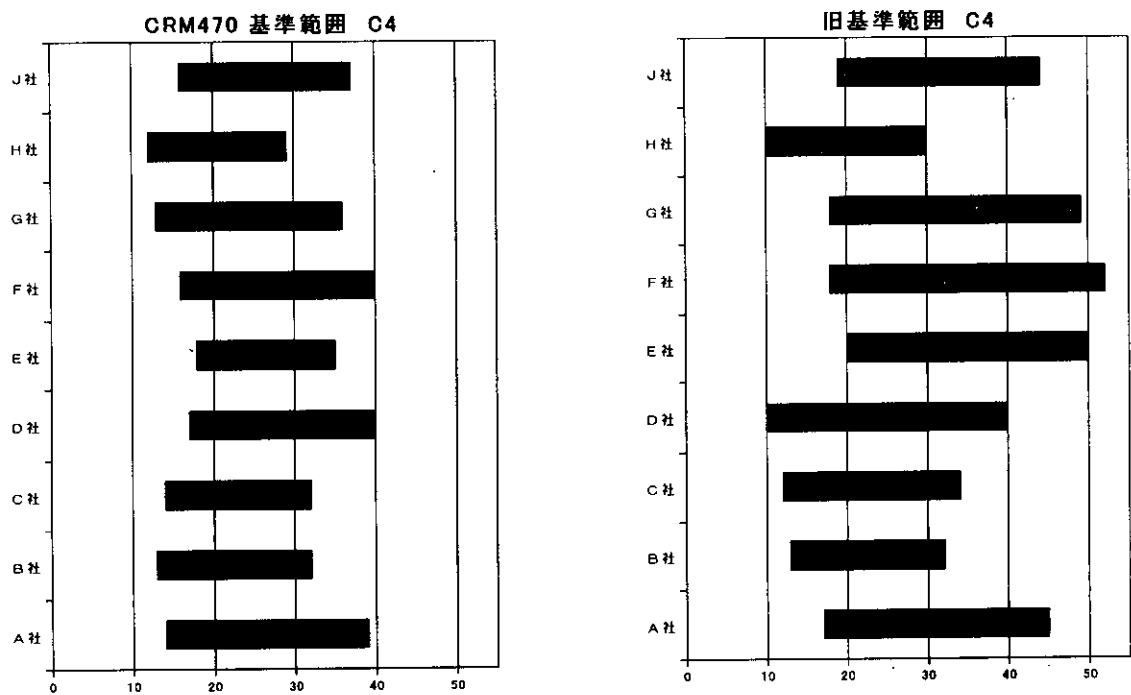


表1 JCCLS GP2-P1 に準拠し分類した調査血漿蛋白

	主な成分	コメント
基幹項目		
第一類	IgG, IgA, IgM, C3, CRPなど	CRM470関連蛋白
第二類	総蛋白	CRM470より値付け準備中
第三類	CRM関連以外の成分	特殊項目と分類が不祥
特殊項目	PSA, T4	学会、研究会に委ねられる

表2 測定値のバラツキに影響を与える要因

抗原の不均一性	
構造の複雑性	
重合, 複合体の形成	
変性	
標準物質, キャリブレーター, サンプル間での相違	
抗体の不均一性	
免疫動物種	
単クローン, 多クローン性	
特異性	
結合性, 親和性	
認識するエピトープ	
免疫グロブリンクラス, サブクラス	
測定機器, 試薬	
測定原理: ネフェロメトリー法, 比濁法	
測定検知システム	
希釈装置	
検量線 (スプライン変換, ログロジット変換など)	
反応温度	
マトリックス効果 (不明な原因, 検査前検査の影響も含める)	
血清由来にもとづくもの	
RF, M蛋白, プロテアーゼ活性, 脂質, 薬剤, 溶血など	
バッファーなどの影響	
pH, PI, 含有成分	
使用容器 (非特異的吸着など)	

表3 主な検査前検査の要点

サンプル採取条件	少なくとも採血前15分は座位 上腕の静脈から採血(肘下静脈) 駆血帯の
血清採取、保存	採血後少なくとも1時間放置、 3000g、5分遠心 迅速に-80℃凍結保存
搬送	ドライアイスにより-20℃~-80℃
凍結溶解	凍結溶解は-20℃で一晩放置、さらに 30~37℃で乾燥 少なくとも5日間は4℃で安定

表4 CRM 470/RPPHSの標準化成分とその設定表示値

標準化成分	質量濃度 (g/l)			国際単位 (IU/ml)		
	平均±1SD			平均±1SD		
トランスサイレチン	0.243	0.018	(1)			
アルブミン	39.7	0.8	(2)	97	4	(4)
α ₁ -酸性蛋白	0.656	0.005	(1)			
α ₁ -アンチトリプシン	1.206	0.011	(1)	91	4	(4)
α ₁ -アンチキモトリプシン	0.245	0.015	(1)			
セルロプラスミン	0.205	0.011	(2)	67	10	(4)
α ₂ -マクログロブリン	1.64	0.05	(2)	79	4	(4)
ハプトグロビン	0.893	0.009	(2)			
トランスフェリン	2.45	0.06	(1)	100	4	(4)
C3c	1.091	0.027	(2)	89	10	(4)
C4	0.151	0.005	(2)	60	n.c.	(5)
CRP	0.0392	0.0019	(3)	0.0392	0.0019	(3)
IgG	9.68	0.10	(2)	117	n.c.	(6)
IgA	1.96	0.04	(2)	125	n.c.	(6)
IgM	0.797	0.023	(2)	105	n.c.	(6)

表示値移行のリファレンス物質:(1) 精製蛋白, (2) USNRP, (3) CRP 85/506, (4) WHO 6 Human Serum Proteins (HSP), (5) WHO Complements 5/4, (6) WHO IgG, IgA, IgM(67/86), n.c. 例数が少なく算定せず。

表5 IgG(免疫グロブリンG)の基準範囲

群別	個数	中央値	基準範囲
全体群	418	1250	870-1700
喫煙群	182	1180	850-1550
男性群	160	1170	860-1550
女性群	22	1210	930-1660
非喫煙群	236	1310	920-1770
男性群	95	1280	870-1720
女性群	141	1330	940-1790

表6 血清学的検査の方法間および方法内変動

	試料	方法間変動		方法内変動		共通CV (%)	総平均 (ng/dl)
		標準偏差(CV%)	()	標準偏差(CV%)	()		
IgG	13	20.3	(1.43)	59.0	(4.14)	3.54	1426.2
	14	48.2	(1.86)	19.9	(4.62)	4.28	2600.4
IgA	13	6.24	(2.88)	9.24	(4.27)	3.76	216.9
	14	19.8	(4.48)	19.0	(4.29)	4.03	444.9
IgM	13	8.20	(5.58)	6.4	(4.36)	3.87	147.7
	14	29.2	(11.72)	12.4	(4.96)	4.29	251.7

表7 IgM(免疫グロブリンM)の基準範囲

群別	個数	中央値	基準範囲
全体群	415	99	35-220
男性全年齢	252	87	33-190
女性全年齢	163	120	46-260
30歳代	16	144	60-340
40歳代	70	129	58-310
50歳代	63	111	48-230
60歳代	14	81	36-230

表8 C3(補体第3成分)

群別	個数	中央値	基準範囲
全体群	416	120	86-160
飲酒群	279	119	84-160
非飲酒群	140	125	91-172

表9 主なCA19-9 測定システム

1. RIA法

キット名	製造元	販売元	使用機器	測定原理	使用抗体	基準値
エルザCA19-9	CIS	CISD	用手法	RIMA	NS19-9	35U(m+2SD)
セントコアCA19-9	CentoCor	TFB	用手法	RIMA	NS19-9	37U(COV)
ボール・エルザCA19-9	CIS	CISD	用手法	RIMA	NS19-9	
バイオミラCA19-9	Biomira	コダック	用手法	RIA	B25.10	20U,37u
ボール・CA19-9	CIS	塩野義	用手法	RIMA	NS19-9	

2. EIA法

キット名	製造元	販売元	使用機器	測定原理	使用抗体	備考
CA19-9ダイナパック	ダイナ	ダイナ	IMx	EIMA	NS19-9	60U(COV)
エンチムンテストCA19-9	CentoCor	富士レ	ES	EIMA	NS19-9	22U(m+2SD)
ルミパルスCA19-9	富士レ	富士レ	Lumipul	CLIA	NS19-9	41U(m+2SD)
グロオザイムCA19-9	三洋	和光	PK	EIMA	Pax2	38U(m+2SD)
EテストHICA19-9	東ソー	栄研, 日水	AIA	EIMA	2D3(IgM)	30U(m+2SD)
グロオザイムNEW CA19-9	三洋	和光	PK	EIMA	Pax2	
シスパックCA19-9	CIS	CISD				
コバスコラティックスCA19-9	Roche	ロッシュ	COBAS-C	EIMA	NS19-9	

3. LIA法

キット名	製造元	販売元	使用機器	測定原理	使用抗体	備考
ランリームCA19-9	テイーエフビー	TFB	PAMIA	CIA	NS19-9	37U
LPIA CA19-9	三菱	ダイア	LPIA	LPIA	IH4	42U(m+2SD)

表10 腫瘍マーカー, 甲状腺関連ホルモン基準範囲, カットオフ値 ※1

	CA19-9抗原 (U/ml)	PSA (ng/ml)	α-フェトプロテイン (ng/ml)	CEA (ng/ml)	TSH (IU/ml)	FT4 (ng/ml)
国際標準物質	無	WHO 96/668 (フリー) WHO 96/670 (90:10)	WHO 72/225 AFP(1975)	WHO 73/601	WHO 94/674 リコンビナント	無
参考標準法	Centocore社	Tandem社	無	無	無	平衡透析法 OCP社 (Amersham)
各社基準値						
協和メディクス (ACS 180)	-	-	-	-	-	0.88 - 1.81 (n=301)
東ソー (AIA-1200)	<37 (n=200)	<4 ※2 (n=159)	<6.1 (n=159)	<6.7 (n=229)	0.38 - 4.31 (n=497)	0.82 - 1.63 (n=618)
TFB						
PAMIA	<37, 健常人97% (n=357)	-	<10, 正常上限 (n=56)	-	-	-
RIA(タンデム)	<37 (n=357)	-	-	-	-	-
第一ラジオアイソトープ	-	-	-	-	0.4 - 5.0	-
ロシュ (エクルーシス)	-	<3.5 (n=153)	-	<4.6	0.54 - 4.54 (n=249)	1.1 - 1.8 (n=249)
オーソクリニカルダイアグノスティクス (アマレックス-MAB)	-	-	-	-	-	2.4 - 4.03 (n=234)
シーアイエス (ポールエリザ, RIA)	<37 (n=99)	<4 (n=104)	<5 (n=298)	<2.5	0.1 - 4 (n=1966)	-
富士レビオ	<2.70 (n=98)	-	8.5 (n=200)	<5.12	0.541 - 4.261 (n=120)	0.71 - 1.52 (n=100)
和光純薬	<37	-	<10	-	0.5 - 4.8	0.8 - 1.9
栄研化学 (ルミスポット)	<37 (n=239)	<3 (n=564)	<5 (n=100)	<5 (n=100)	-	-

※1 調査協力企業による。

※2 男性年齢別変動あり。

肝機能検査の有用性評価の解析

野村文夫(千葉大学医学部臨床検査医学)
小川善資(北里大学医療衛生学部臨床化学)

(1)肝機能検査としての酵素活性測定法

1. 施設間差の現状

酵素活性測定値の施設間差は20年前、大変な大きさであった。これを是正すべく、臨床化学検査全体を巻き込んだ、多大な努力が払われた。その結果、1981年アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST, GOT)の測定方法に対する勧告が日本臨床化学会から提出された。それ以後、alanine aminotransferase (ALT, GPT), lactate dehydrogenase (LD), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), creatin kinase (CK) の6種類の酵素活性測定法に関する勧告法が提出された。また、継続的努力の結果、全国的な施設間差は正はASTをはじめ、数種の酵素活性測定で施設間差がなくなった。ただ、測定方法の勧告法の提示が遅れている項目では施設間差が現在でも残っていた。

1) AST(GOT)

臨床検査を実施している全国2,522箇所の施設に対して、平成11年度に実施された日本医師会の調査によると、JSCC標準化対応法によって測定されている施設は87.8%にも達している。IFCC標準化対応法が4.2%、ドライケミストリーが3.9%で、他を圧倒している。日本臨床衛生検査技師会の調査においてもJSCC標準化対応法による測定が84.3%に達していることが報告されている。

施設間差を同一試料測定値のバラツキで表すとすれば、日本医師会精度管理調査の3種の試料の測定結果中、JSCC標準化対応法使用施設2,162施設のCVが2.7%、2.2%、2.1%ときわめて小さかった。

ERMを検量物質として利用する方向にも向かいつつある。日本臨床衛生検査技師会の調査において、ERMもしくはERM対応キャリブレーションを使用して

いる施設が27%に達している。これに伴い、試薬メーカー間の差が解消されて来ており、ますます問題がなくなっている。

これらのことを総合して考えると、測定値の信頼性は全国的に優れており、測定方法にも、分析装置にも、正確度を保証する方法にもほとんど問題のなくなっていることを示している。

2) ALT(GPT)

ALTの施設間差を日本医師会の調査で見ると、0.9%、1.7%、2.3%とASTとほぼ同等のバラツキであった。日本臨床衛生検査技師会の調査においても、JSCC標準化対応法によるCVは4.5%、3.6%であった。AST同様、ほとんど問題のなくなっていることを示している。

しかし、あえて指摘すれば、ASTよりはバラツキが大きい。eQAPの昨年10月に報告された、同一試料の測定成績を低値に報告された結果から順に並べると図1の結果となった。活性値の低かった50施設と活性値の高かった30施設の合わせて30施設の結果を除けば、ほとんどの施設の報告値が奇麗に横一線になった。同じことをALTで作図すると、明らかに傾きのあるスロープになった(図2)。このことはASTに比べ、ALTでは全体の統計成績には現れにくい、明らかに施設間差が残っていることを示していた。この原因を調査するため、10施設以上利用されている試薬メーカー(14社)別平均値をツウインプロットした(図3)。すると、明らかに系統誤差が発生していた。ASTも同様な傾向を示したものの、その程度ははるかに軽微であった。

3) GOT(AST):GPT(ALT)ratio

JSCC勧告法が設定される以前のAST基準範囲の上限値は40 U/Lであったのに対してALTは25 U/L程度であった。ところが勧告法によってALT活性が上昇し、上限値の平均が45 U/Lに対して、ASTの上限値はさほど上昇せず41 U/Lと逆転してしまった。このため、AST:ALT ratioは1981以前のratioと、変わってしまった。

4) ALP

AST, ALTは問題点が大幅に改良された。ALPは勧告法が提示されているにも関わらず、まだまだ問題を抱えていた。その原因の一つは多くの組織・団体が相違する勧告法を出しているためである。しかも、それぞれの方法によって、測定値が大きく変わってしまう。また、同じ方法でも測定値のバラツキはAST, ALTに比べると2倍近く大きく、改善すべき点が多い。p-ニトロフェノールを測定する問題、緩衝液の問題などが課題である。

このような問題を乗り越えるため、ERMが開発されたと言える。日本臨床衛生検査技師会の調査において、ERMやERM対応キャリブレーションを用いた施設が31%で、それら施設でのCVが3.8~4.5%と報告されている。希望の持てる数値と考える。

臨床医から見れば、各種単位が存在することは難解で、いらざる誤解を招きかねない。測定方法は別々であっても、ERMを介して、JSCC勧告法への換算で、統一化されることが望まれる。

5) γ -GT

JSCCとIFCC勧告法が同一であるため、測定方法の統一化は進み、約63%の施設が利用している。施設間差も3.6%, 3.6%, 3.7%とALPに比べ小さかった。ERMおよびERM対応キャリブレーションを用いている施設が30%あり、この施設におけるCVは1.5~3.2%と良好である。測定値の信頼性は全国的に優れており、ほとんど問題のないことを示している。

6) ChE

JSCCによる標準化のための検討が進められているが、結論が提出されるまでには若干の時間が必要と思われる。勧告法の提示がないためか、種々雑多な測定方法が市販されている。また、合成基質を用いているため、試薬毎に測定値が相違している。日本医師会の調査でも30種類以上の方法に分割されている。勧告法が出されていないため、ERMも出されていない。このため、ERMを介した測定値の統一化もできない状況である。勧告法の提示とそれに伴うERMの使用が進めば、測定試薬の統一化がなくとも、改善が図られるものと期待される。

2. 基準範囲の現状

1) AST

測定方法別に基準範囲の下限値と上限値の平均を求めた(表1)。また、調査した1,198施設全部の下限値を低値から順に並べたのが図4で、上限値を低値から順に並べた結果が図5である。同じ試料の測定値を同様に、低値から順次並べた場合、ほとんど横一線であったのに対して、下限値にも上限値にも、階段が現れた。標準化が効果的に作用し、同一試料の測定値の統一化は図られたが、基準範囲の統一化が図られていないことを示唆していた。その差はあまりないものの、測定値の統一化が完成しているため、基準範囲の統一化が早期に図られることが望まれる。ALTも、AST同様、測定方法別に基準範囲の下限値と上限値の平均を求めた(表2)。また、調査した1,191施設全ての基準範囲の下限値を低値から順に並べたのが図6で、上限値を低値から順に並べた結果が図7である。

2) ALP

全国847施設の基準範囲の下限値と上限値を低値からプロットしたのが図8, 9である。様々な測定方法があるため、下限値も上限値も幅広い範囲となった。基質によって測定値が大きく変化するため、6つの測定方法に分けて上限値を比較したが、方法別に集計したら、かえって数値が離れるものもあった(図10~15)。

3) γ -GT

全国847施設の基準範囲の下限値と上限値を低値からプロットしたのが図10, 11である。同一試料の測定に関しては施設間差がなくなっていたものの、基準範囲はかなりの広がりを見せた。

4) ChE

全国755施設の基準範囲の下限値と上限値を低値からプロットしたのが図12, 13である。同一試料の測定値もバラツいていたが、基準範囲も大きく相違した。

(2)肝疾患診療における病態識別値

肝疾患の診療において利用される病態識別値は数多い。これらの病態識別検査項目のなかには検査値の施設間差が存在する 경우가少なくなく、患者の転院に際して、また多施設共同研究などにおいて大きな支障をきたす。

そこで本稿の前半でとりあげた広義の肝機能検査項目が肝疾患の一般診療において用いられる病態識別値にどのように取り入れられているかについて検討した。

1.トランスアミナーゼ値

1)GOT(AST):GPT(ALT)ratio

肝疾患の診療に欠かせないトランスアミナーゼ値は通常 AST と ALT の両者が同時測定されることが多く、その測定値の比が重要な情報を与える。この点については多くの evidence がある。

AST:ALT比(S/L比)の上昇が特徴的なのはアルコール性肝疾患で、Cohenらの報告¹でもアルコール性肝疾患の約70%でS/L比が2.0以上であったのに対し、ウイルス性肝硬変では26%、慢性肝炎では7%に過ぎない。一方、ウイルス性の慢性肝障害が進展するに伴いS/L比が増加することもよく知られているが、その意義については成績が分かれている。Shethら²はC型肝炎ウイルスによる47例の肝硬変と92例の慢性肝炎を対象とし、S/L比1.0以上の場合は感度53.2%、特異度100%、陽性予測値100%、陰性予測値80.7%の診断確率で肝硬変と診断できるとしているが、Reedyら³の同様な検討では陽性予測値は77%に過ぎない。

当然ながらS/L比はAST、ALT両者の測定が標準的な方法で行われた場合に限り普遍性をもち、各論文において正確な測定法の記載がない限りデータの厳密な比較は困難であり、諸外国のデータと比較する場合は注意を要する。また本邦においてはJSCC 勧告法ではALTが従来よりも高く測定されるので、過去の論文におけるS/L比よりも低値をとることに留意するべきである。

2)肝硬変症におけるALTの推移と肝発癌の関連

C型肝炎ウイルスによる肝硬変症を長期にわたりフォローしているとトランスアミナーゼ値が低値のまま推移する例では発癌率が低いという経験則があったが、そのエビデンスが明確に示されたのは比較的最近である、多羅尾らの検討⁴により、ALTの年平均値が持続して80単位以上の群では5年間で44%が発癌するhigh-risk群であったのに対し、持続

して80単位未満に押さえられた群では5年間に7%が発癌したに過ぎなかった(図20)。この成績は広く知られているが、オリジナル論文においてトランスアミナーゼの測定法に関する記載はない。

3)アルコール性肝障害の診断基準におけるAST

C型肝炎ウイルスを保有する常習飲酒家に肝機能異常がみられた場合にその異常値が飲酒によるものか、HCV感染によるものかを鑑別することなどを目的として文部省科研費総合研究「アルコールと肝」研究班により、多施設の症例の集計結果に基づき、アルコール性肝障害の診断基準が作成された⁵。その抜粋したものを表3に示す。本基準においてもAST、ALTに特定の数値が与えられていて、基準値が異なる施設間で分類が異なる可能性が生じる。

2.胆道系酵素

いわゆる胆道系酵素としてALP、GGT、LAPが日常臨床で測定されている。そこで我々は代表的な肝内胆汁うっ滞性疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)におけるこれら3つ検査法の診断効率を比較してみた⁶。対象はPBC21例、その他の慢性肝障害52例であり、カットオフ値は偽陰性率の2乗と偽陽性率の2乗の和が最小となる値として求めた。その結果PBCと非PBCの鑑別における感度、特異度、有効率は表4の通りで、LAPの感度が他に比べて低いとの予想にはほぼ合致した結果である。

3.コリンエステラーゼ

血清コリンエステラーゼが過栄養性脂肪肝の診断に有用であることがよく知られているが、その診断効率に関するデータは多くない。関谷ら⁷は腹腔鏡下肝生検により確定診断された症例において、血清コリンエステラーゼが高値(400IU/l以上)を呈する例と脂肪肝の関係をみると、感度58.3%、特異度35.4%と報告している。一方、本酵素活性が低値の場合は進行した慢性肝疾患の可能性があり、同様に低値(200IU/l以下)の例と肝硬変の関係をみると、感度68.9%、特異度59.2%であった。

4.アルブミン

本邦におけるアルブミン測定法について1179施設を対象にして調査した結果、BCG法が1097施設(93%)と圧倒的に多く、BCP法は66施設(5.5%)であった。我が国で一般的なBCG法ではBCG試薬がグロブリンとも反応するための正誤差が生じる。一方、アルブミンにより特異的なBCP法は還元型アルブミンを含む血清SH物質による負誤差が問題となるが、BCG法に比し、0.2程度低めに出る傾向にある。

肝硬変の重症度分類として Child 分類(表 5)が用いられてきた。血清アルブミンは Child 分類における重要な項目の一つであるが、1964 年に本分類が初めて記載された文献⁸ではその測定法は詳細に述べられていない。Child 分類はその後 Pugh ら⁹により一部改変された方法が Child-Pugh 分類(表 6)として現在、我が国においても欧米においても広く利用されている。しかしこの Pugh らによる改変が報告された論文においても grade C のアルブミン基準が 2.8 と変更されたにもかかわらず、その測定法についての記載はない。Child 分類を用いた臨床研究ではアルブミン測定法の具体的記述が必須と思われる。

5. ビリルビン

血清ビリルビンの測定法として古くから使用されてきたジアゾ法および最近の主流の酵素法のいずれにおいても HPLC 法に基づく正確な分画測定結果と比較すると直接ビリルビンに一部間接ビリルビンや δ ビリルビンが測りこまれてしまうことが明らかになっている。しかし、最近開発された新酵素法では 1 および 2 グルクロン酸抱合ビリルビンのみをきわめて選択的に測定することが可能である^{10,11}。高ビリルビン血症が見られる場合にその直接/間接比は臨床的に重要な指標であり、日本急性肝不全研究会による劇症肝炎における肝移植適応のガイドラインにおいても表 7 のように直接/総ビリルビン比 ≤ 0.67 が項目にあげられている。この診断基準は旧酵素法による測定結果に基づくものであり、改良された新法により新たな基準を設定することが必要である¹²。

(6) 習慣飲酒のマーカーとしての γ -GTP

習慣飲酒のマーカーとして最も広く測定されているのは、 γ -GTP であるが、最近の欧米からの報告では血清糖鎖欠損トランスフェリン CDT)は γ -GTP を越える診断感度を有するマーカーとみなされている¹³。そこで健診受診者を飲酒習慣別に分け、両者の測定値と診断効率を比較検討したが、表 8 および ROC 分析の結果では γ -GTP の診断効率の方が明らかに良好であった(図 21)。

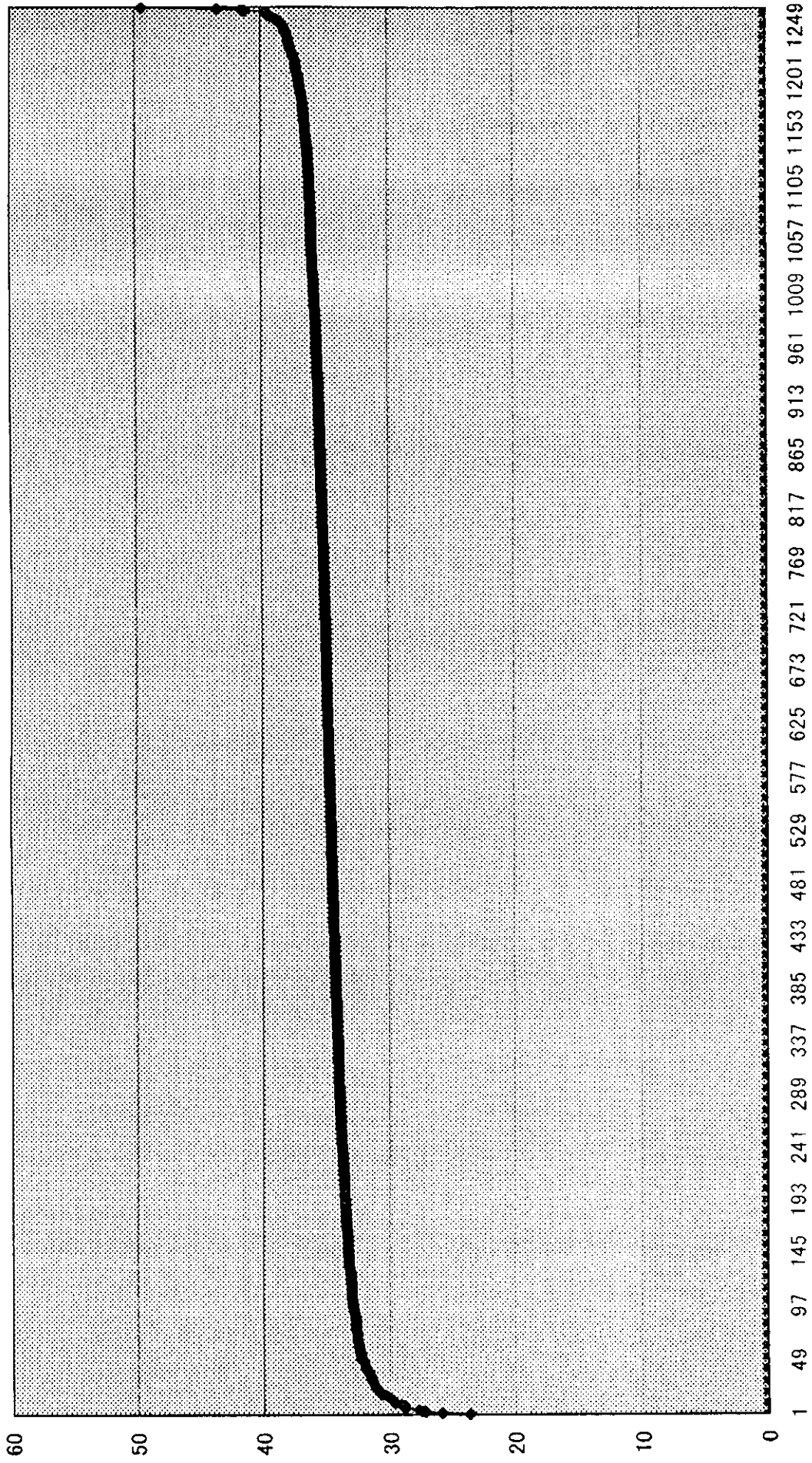
文献

1. Cohen JA, Kaplan MM: The SGOT/SGPT ratio-an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1979;24:835-838.
2. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD et al: AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1998;93:44-48.
3. Reedy QW, Loo AT, Levine RA: AST/ALT ratio is not diagnostic of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1998;43:2156-2159.
4. 多羅尾和郎、清水昭男、大川伸一ほか：肝硬変を母地とした肝癌発生と再発、肝胆膵 1995; 31:195-207.
5. 高田昭：アルコール性肝障害に対する新しい診断基準試案の提案、*肝臓*1993;34:888-890.
6. 飯塚儀明、桑克彦、野村文夫ほか：血液化学成分の ROC 分析による原発性胆汁性肝硬変の鑑別診断 *臨床化学* 1995;24:83c.
7. 関谷千尋、長谷部千登美：コリンエステラーゼ検査の診断効率とピットフォール (中井利昭編) P14 1998, 中外医学社
8. Child III CG, Turcotte JG: Surgery and portal hypertension. In: Child III CG ed. *The liver and portal hypertension*. Philadelphia: WB Saunders Co., 1964:50.
9. Pugh RNH, Murray-Lyon IM et al: Transection of the oesophagus for bleeding oesophagus varices *Br J Surg* 1973;60:646-649.
10. Kurosaka K, Senba S, Tsubota H, Kondo H: A new enzymatic assay for selectively measuring conjugated bilirubin concentration in serum with use of bilirubin oxidase. *Clin Chim Acta* 1998; 269:125-136.
11. Morimoto Y, Ishihara T, Takayama M et al: Novel assay for measuring serum conjugated bilirubin and its clinical relevance. *J Clin Lab Analysis* 2000;14:27-31.
12. Shiomi S, Habu D, Kuroki T et al: Clinical usefulness of conjugated bilirubin levels in patients with acute liver diseases. *J Gastroenterol*

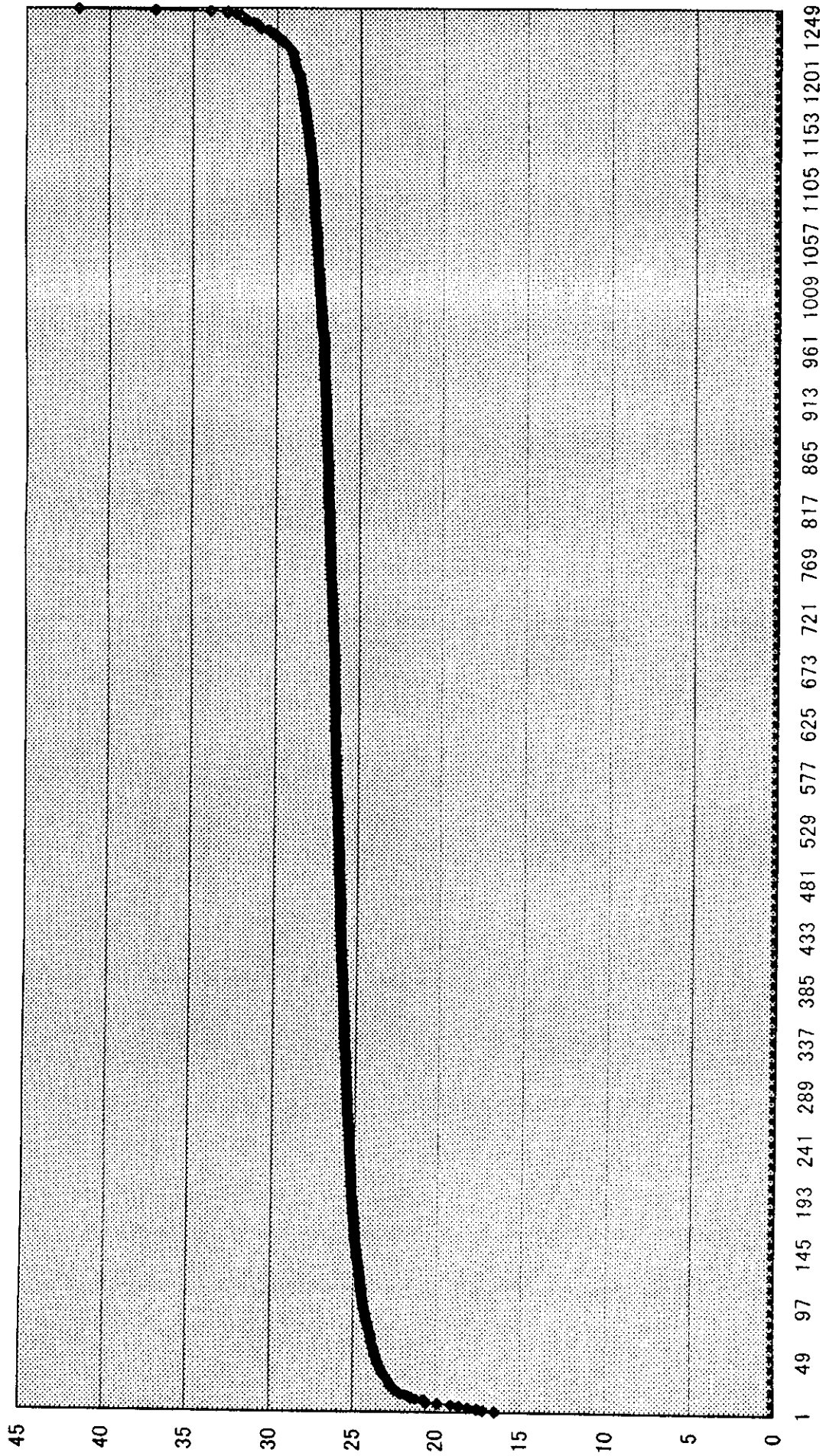
1999;34:88-93.

13. Xin Y, Lasker JM, Lieber CS: Serum carbohydrate deficient transferrin: mechanism of increase after chronic alcohol intake. *Hepatology* 1995;22:1462-1468.

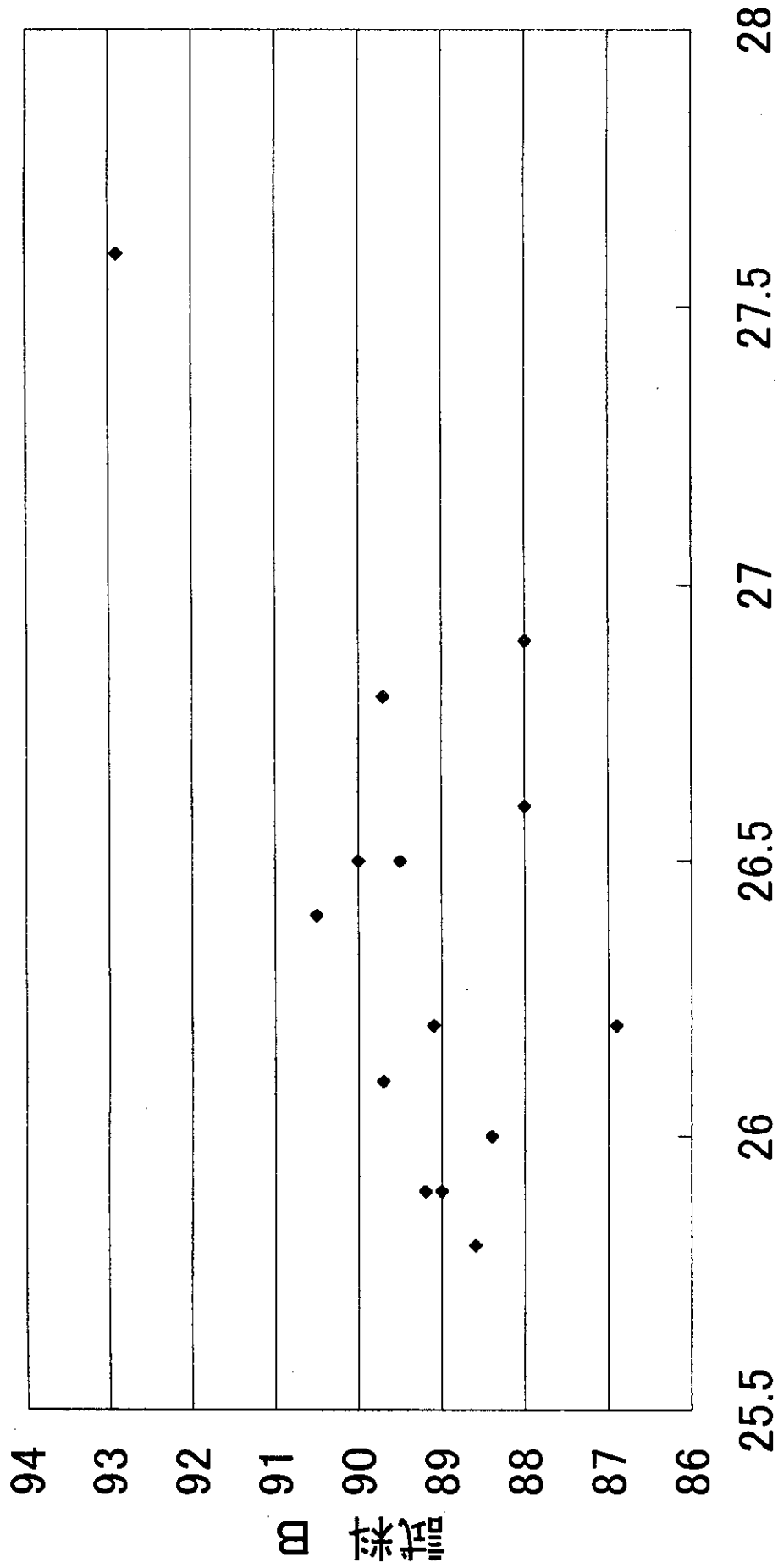
(図1) 同一試料によるAST活性測定結果



(図2) 同一試料によるALT活性測定結果



(図3) 試薬メーカー別、ALT活性測定のスウインプロット



試料 A

(表 1) AST 測定方法別基準範囲の下限値と上限値

方法名	施設数	基準範囲	
		下限値	上限値
JSCC 標準化対応法	1087	7.1	38.0
IFCC 標準化対応法 (PALP 添加)	13	5.8	41.4
IFCC 標準化対応法 (PALP 無添加)	46	6.4	37.2
SSCC 標準化対応法	5	3.8	33.0
GSCC 標準化対応法	3	9.3	35.7
その他 MD 法	25	6.3	37.2
ドライケミストリー (ピストロ)	1	10.0	35.0
ドライケミストリー (富士)	10	9.6	39.1
ドライケミストリー (その他)	1	11.0	26.0
その他	7	4.1	37.9