

3. 現状よりみた本試験の意義

statin による脳卒中の一次予防（すなわち脳卒中の発症予防）の効果については、2004年に発表された7万例のメタアナリシス⁶⁾（図2）から、18%リスクを低下させることが知られている。しかし、脳卒中の既往がある患者において、脳卒中の再発を statin は予防するか（二次予防）についての evidence はほとんどない。類似した研究から2つだけ挙げて比較しておきたい。それらは HPS 試験⁷⁾ と SPARCLE 試験⁸⁾ である。

2004年の3月6日の Lancet 誌に、HPS 試験のサブ解析結果⁷⁾ が発表された。全体では20,536人の大規模試験であったが、脳卒中の対象は3,280人であった。statin による有意な再発予防効果は見られなかったが、脳梗塞の群でその予防効果が多少見られていた。HPS 試験では、脳卒中あるいは TIA の発作から平均で4.3年経過の患者が含まれていた。J-STARS では最長3年目までの患者であるから、J-STARS のほうが少し高めの再発率になると予想される。実際のところ、HPS 試験は平均4.8年追跡で、simvastatin 群では10.4%、placebo 群では10.5%の再発率なので、1年あたりにすると2%強ということであった。J-STARS ではそれより高い、年5%の再発率を予想している。図3に脳卒中の予防効果を一次予防と二次予防に分けて示した。一次予防での効果があることはメタアナリシス（図2）と同様の結果になっていたが、二次予防のほうで効果はみられなかった。いわゆるネガティブデータであった。多少の望みというのは、carotid endarterectomy or angioplasty 施行患者においては、50%も再発を予防していた点であった。また、脳梗塞と脳出血に分けてみると、脳梗塞患者において再発予防効果は多少見られていた（20%リスク低下、図4）。このように、statin による頸動脈閉塞の進展抑制の可能性が HPS 試験から伺われた。

平均追跡が同様の試験として SPARCLE 試験⁸⁾ が進行中である。これは発症後1~6ヶ月の脳卒中あるいは TIA 患者4200名が対象であり、コレステロールは低値（LDL で100~190mg/dl）である。治療上の理由から、冠動脈心疾患の患者は除外されている。脂溶性の atorvastatin 80mg と placebo とのランダム化二重盲検試験である。エンドポイントは脳卒中の再発（致死のおよび非致死）である。発症後の期間が短いため、HPS さらには J-STARS よりも再発率が高くなることが予想される。この SPARCLE 試験の結果は2005年か2006年に発表される予定と聞いている。

最後に、J-STARS 成功の鍵について少し考察しておきたい。現在のところ、図1に示したように200例（7%）しか登録されていない。適格な患者がいれば、本試験の意義をよく説明し、患者より同意を取得し、連続的に症例を登録することが肝要と思われる。まずは症例登録のさらなる推進が望まれるところである。次に、データセンターが追跡と進捗管理をしっかりと運営することが望まれている。最後には、追跡を滞りなく行うことである。すなわち、外来へ来てもらう

とか、電話をかけるなどで患者とコンタクトを取り、行方不明にならないよう気をつける必要がある。但し、途中で同意撤回したいといわれた場合などは、それ以上追跡することは適当ではない。なお、同意撤回においてもそれまで収集されたデータについては、当該患者が全データの使用を撤回しない限りは統計解析の対象になる。途中の中止脱落というのが、このような大規模長期臨床試験では常に問題となる。しかし、そのような症例がゼロというのは、5年も追跡する試験では不可能に等しい。1つ同様の試験の例を示そう。これは VISP 試験⁹⁾ といって、high-dose vitamin の長期摂取により homocysteine 低下を惹起し、ひいては脳卒中再発予防するのではないかという仮説を検証するための大規模長期臨床試験である。図 5 に示したように、この試験は 2 年追跡であるが、その間に 7~8%の脱落が示されている。一般的には、服薬中止などの脱落はある程度起こるのは医療上やむをえないとされているものの、行方不明などの脱落はゼロを目指すのが通例なので、追跡の徹底を図ることが次の大きな目標になるだろう。

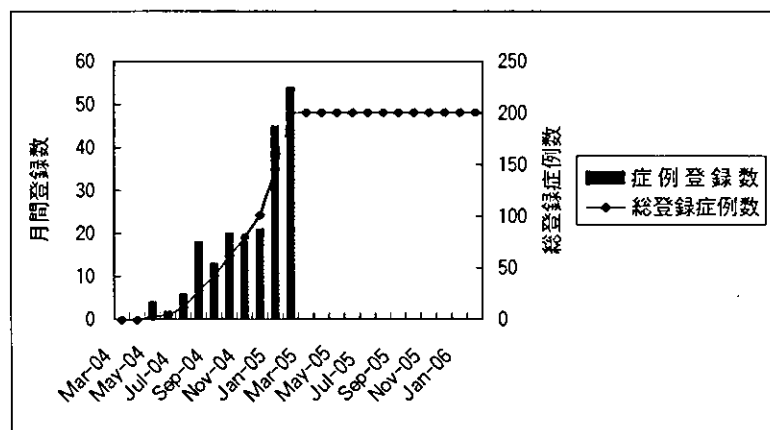


図 1. J-STARS試験の症例登録の進捗状況(2005.2現在)

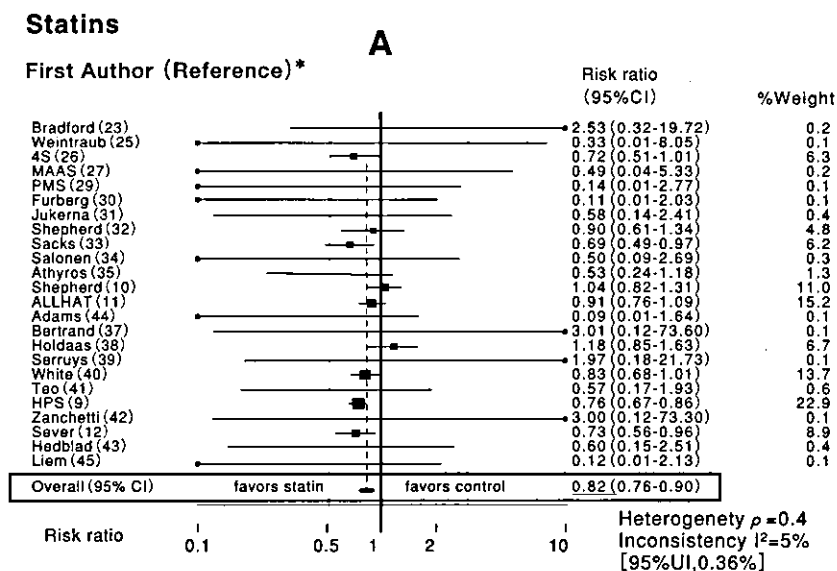


図 2. Statin によるStroke Primary Prevention⁶⁾ (7万例のメタアナリシス)

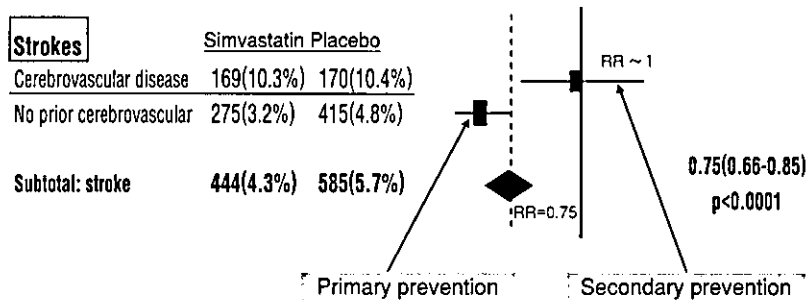


図 3. HPS試験でのsimvastatin (40mg/d) による脳卒中再発予防効果⁷⁾

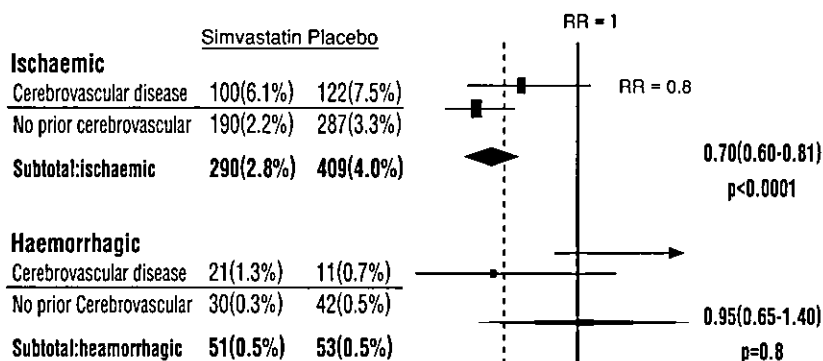


図 4. HPS試験での脳卒中の型別によるサブ解析結果⁷⁾

脳卒中全体の再発予防効果は見られなかったが、型で分けると脳梗塞のほうの再発予防効果は有意ではないが見られていた。

Figure 1. Flow of Study Participants

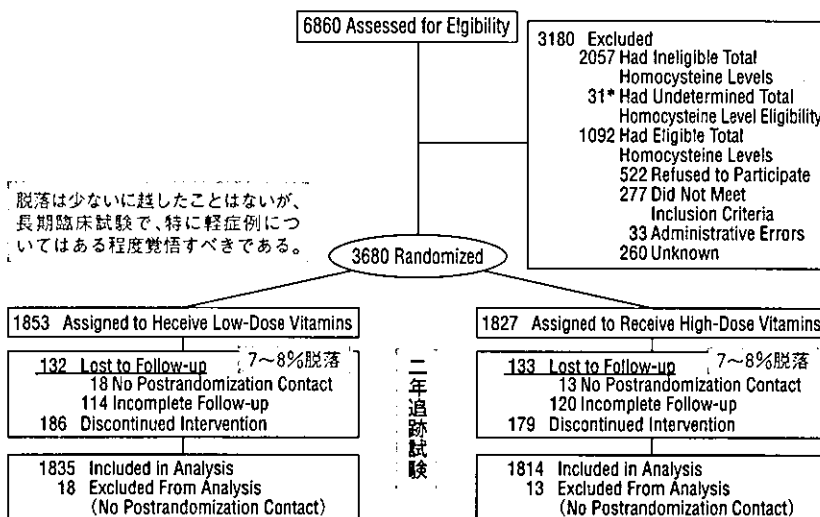


図 5. VISP試験での2年以内脱落例の発生状況⁹⁾

引用文献

- 1) Avenell A, Grant AM, McGee M et al: The effects of an open design on trial participant recruitment, compliance and retention - randomized controlled trial comparison with a blinded, placebo-controlled design. *Clinical Trials*. 2004; 1: 490-498.
- 2) Yokota C, Minematsu K, Hasegawa Y, Yamaguchi T: Long-term prognosis, by stroke subtypes, after a first-ever stroke: A hospital-based study over a 20-year period. *Cerebrovasc Dis*, 2004; 18: 111-116.
- 3) Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM, for the PRINCE Investigators: Effects of statin therapy on C-reactive protein levels: The Pravastatin Inflammation/CRP Evaluation (PRINCE). *JAMA*, 2001; 286: 64-70.
- 4) MacMahon S, Sharpe N, gamble G, Hart H, et al: Effects of lowering average or below-average cholesterol levels on the progression of carotid atherosclerosis: Results of the LIPID atherosclerosis substudy. *Circulation*, 1998; 97: 1874-1790.
- 5) Mercuri M, Bond MG, Sirtori CR, Veglia F, Crepaldi G, Feruglio FS, Descovich G, Ricci G, Rubba P, Mancini M, Gallus G, Bianchi G, D'Alo G, Ventura A: Pravastatin reduces carotid intima-media thickness progression in an asymptomatic hypercholesterolemic mediterranean population: the Carotid Atherosclerosis Italian Ultrasound Study. *Am J Med*, 1996; 101: 627-634.
- 6) Briel M, Studer M, Glass TR, Bucher HC: Effects of statins on stroke prevention in patients with and without coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med*, 2004; 117: 596-606.
- 7) Heart Protection Study Collaborative Group: Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet*, 2004; 363: 757-67.
- 8) The SPARCLE Investigators: Design and baseline characteristics of the stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels (SPARCL) study. *Cerebrovasc Dis*, 2003; 16:389-95.
- 9) Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang C-H, Stampfer M: Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: The Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 2004; 291; 565-575.

厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患等総合研究事業)
研究報告書

脳血管疾患の再発に対する高脂血症治療薬の
HMGCoA 阻害剤の予防効果に関する研究
脂質検査の標準化 (3年間の総括)

研究協力者 中村 雅一 大阪府立健康科学センター脂質基準分析室
ディレクター

研究要旨

本研究班では、130以上の医療施設を対象に高脂血症治療薬の投与による臨床試験が実施される。血液化学検査の中でも脳血管疾患等の危険因子とされる総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロールなどの脂質の測定値の信頼性は、米国の国立研究機関であるCDCが主催する脂質標準化プログラムを通じて標準化、即ち、認証されて始めて精度保証がされる。このことから、欧米の疫学研究や臨床試験では、CDCを源とする脂質の標準化は、研究や試験の遂行に際しての必須条件と見なされている。

大阪府立健康科学センターは、CDCを中心とした国際脂質標準化ネットワーク(CRMLN)に参加するわが国で唯一の脂質基準分析室であり、1992年の正式登録以来13年間にわたってその資格を維持し、世界中の試薬メーカーや臨床検査室を対象とした脂質標準化の認証を実施してきた実績を有する。

本研究では、この認証資格を背景に世界に通用する判定基準の下で脂質の標準化を実施し、もって本班の学術成果が国際的な評価に耐えられるように精度管理面から支援することにある。

ここに脂質標準化の成果に関する3年間の総括報告をまとめた。

A. 研究目的

血液化学測定的面から本班の研究に参加する131の医療施設を対象にCDC/CRMLNの開発した脂質標準化プログラムを適用し、総コレステロール、HDLコレステロール、及び、LDLコレステロールの3項目の測定値を、

国際的に通用する判定基準の下で標準化して、本班で得られた測定成績を解析する際の基礎資料とすることを目的とする。

B. 研究方法

CDC/CRMLNは、臨床検査室を対象

とした総コレステロールの標準化プログラムとして Certification Protocol for Clinical Laboratories(May 2004)(5)を、また、試薬メーカー(SRL)を対象とした総コレステロールの標準化プログラムとして Total Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers-Revised-(October 2004)(6)を、HDL コレステロールの標準化プログラムとして HDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers(November 2002)(7)を、LDL コレステロールの標準化プログラムとして LDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers(May 2004)(8)を開発した。これらのプログラムを運用できるのは、CRMLN(Cholesterol Reference Method Laboratory Network)に登録されて、認証資格を有する世界8カ国から成る計10施設(2005年04月現在)の脂質基準分析室に限定される。

臨床検査室(本班では、SRLを除く2施設)を対象とした総コレステロールの標準化プログラムでは、臨床検査室で規定濃度を持つ6濃度(100~200 mg/dLの濃度域で2濃度、200~240 mg/dLの濃度域で2濃度、240 mg/dL以上の濃度域で2濃度の計6濃度)の新鮮ヒト血清を準備し、この血清を臨床検査室では1濃度につき2重測定を日常分析法で3日間測定、また、基準分析室(大阪府立健康科学センター)では総コレステロールの基準分析法である Abell-Kendall 法により単一測定をして目標値を確定し、臨床検査

室の測定値と基準分析室の目標値の両者を比較検定ソフトに入力・解析する。その後、解析結果を CDC に送付し、CDC と大阪府立健康科学センターの両者による合議判定により、臨床検査室の認証の合否が決定される。

一方、試薬メーカー(本班では、SRL)を対象とした総コレステロールの標準化プログラムでは、試薬メーカー(SRL)で規定濃度(120~180 mg/dL 及び 261~400 mg/dL の濃度域で総検体数のそれぞれ20%、181~220 mg/dL 及び 221~260 mg/dL の濃度域で総検体数のそれぞれ30%を占めるように配分)を持つ最低40検体以上の新鮮ヒト血清を準備し、この血清を試薬メーカー(SRL)では1検体につき2重測定を約1ヶ月間で20回測定、また、基準分析室では Abell-Kendall 法で二重測定をして目標値を設定し、試薬メーカー(SRL)の測定値と基準分析室の目標値の両者を比較検定ソフトに入力・解析する。その後、解析結果を CDC に送付し、CDC と大阪府立健康科学センターの両者による合議を通じて SRL の認証の合否が判定される。

HDL コレステロールの標準化プログラムでは、試薬メーカー(SRL)で規定濃度(20~29 mg/dL、30~39 mg/dL、40~49 mg/dL、50~59 mg/dL 及び 60~69 mg/dL の濃度域でそれぞれ最低5検体が含まれるように配分)を持つ最低40検体以上の新鮮ヒト血清を準備し、この血清を試薬メーカー(SRL)では1検体につき2重測定を約1ヶ月間で5回に分けて測定、また、基準

分析室では比較対照法 (Designated Comparison Method) で二重測定をして目標値を設定し、SRL の測定値と基準分析室の目標値の両者を比較検定ソフトに入力・解析する。その後、解析結果を CDC に送付し、CDC と大阪府立健康科学センターの両者による合議により、SRL の HDL コレステロールの認証の合否が判定される。

試薬メーカー(本班では、SRL)を対象とした LDL コレステロールの標準化プログラムでは、試薬メーカー(SRL)で規定濃度(100 mg/dL 以下及び 161~400 mg/dL の濃度域で総検体数のそれぞれ 20%、100~130 mg/dL 及び 131~160 mg/dL の濃度域で総検体数のそれぞれ 30%を占めるように配分)を持つ最低 40 検体以上の新鮮ヒト血清を準備し、この血清を試薬メーカー(SRL)では 1 検体につき 2 重測定を約 1 ヶ月間で 5 回測定、また、基準分析室では LDL コレステロールの基準分析法である Beta-Quantification(BQ)法で二重測定をして目標値を設定し、SRL の測定値と基準分析室の目標値の両者を比較検定ソフトに入力・解析する。その後、解析結果を CDC に送付し、CDC と大阪府立健康科学センターの両者による合議により、SRL の LDL コレステロールの認証の合否が判定される。

世界的に認容されている脂質の判定基準は、米国の NCEP (National Cholesterol Education Program) に準拠する。それによれば、臨床検査室と試薬メーカー(SRL)共に、総コレステロ

ールの正確度は目標値の $\pm 3\%$ 以内、精密度は変動係数で 3% 以下、HDL コレステロールの正確度は目標値の $\pm 5\%$ 以内、精密度は変動係数で 4% 以下、LDL コレステロールの正確度は目標値の $\pm 4\%$ 以内、精密度は変動係数で 4% 以下を示すことが求められる。以上の判定基準を満たしたとき、CDC は精度保証の証として認証書を交付する。認証書の有効期限は、臨床検査室の総コレステロールが 6 ヶ月間、試薬メーカーは 3 項目ともに 2 年間である。

CRMLN には、臨床検査室を対象とした HDL コレステロールと LDL コレステロールの標準化プログラムは存在しない。これら 2 項目については、各基準分析室の自主的な運用に付託されている。この信託を受けて、大阪府立健康科学センターは独自に臨床検査室向けの HDL コレステロールの標準化プロトコルとして HDL-Cholesterol Evaluation Protocol for Clinical Laboratories(October 2001)を、また、LDL コレステロールの標準化プロトコルとして LDL-Cholesterol Certification Protocol for Clinical Laboratories(October 2001)を開発した。HDL コレステロールでは、規定濃度を持つ 6 濃度 (39 mg/dL 以下の濃度域で 2 濃度、40~59 mg/dL の濃度域で 2 濃度、60~75 mg/dL 以上の濃度域で 2 濃度の計 6 濃度) の新鮮ヒト血清を、臨床検査室では日常分析法で 1 回に各濃度につき 4 重測定をし、また、基準分析室では CRMLN の比較対照法によ

り目標値が確定され、比較検定ソフトに入力・解析されて測定精度が判定され、その結果により認証の合否が判断される。次に、LDL コレステロールでは、規定濃度を持つ6濃度(119 mg/dL以下の濃度域で2濃度、120～139 mg/dLの濃度域で2濃度、140 mg/dL以上の濃度域で2濃度の計6濃度)の新鮮ヒト血清を、臨床検査室では日常分析法で1回に各濃度につき4重測定をし、また、基準分析室ではCRMLNの基準分析法(Beta-Quantification)により目標値が確定され、比較検定ソフトに入力・解析されて測定精度が判定され、その結果として認証の合否が判定される。判定基準が満たされた場合、大阪府立健康科学センターから認証書が発行される。

本班において脂質標準化の対象となる131施設のうち、129施設の検体は臨床検査センターの一つであるSRL(東京都八王子市、免疫化学部 生化学課 第2ラボラトリー)に委託分析を、2施設が自施設で検体分析をすることとされた。そこで、SRLについては、総コレステロール、HDL コレステロール、及び、LDL コレステロール共に、試薬メーカー用の標準化プロトコルに従うことを求め、SRL以外の2施設については臨床検査室用の標準化プロトコルで標準化することを求めた。

文献5から文献8までの4本の標準化プログラムは、CDCのWeb site(<http://www.cdc.gov/labstandards/crm1n.htm>)で閲覧できる。

(倫理面への配慮)

脂質の標準化の実施に当たって、倫理面への問題は無い。

C. 研究結果

【SRLの標準化成績】

SRLにおける総コレステロールの測定条件は、分析装置が日立7170型自動分析機器、試薬が和光純薬のL-Type Wako CHO・H(試薬1のLot No.=AH489、試薬2のLot No.=AG848)、キャリブレーターがデンカ生研のLiquid Abnormal Plus(表示値=245 mg/dL、Lot No.=VAB01301)であり、標準化検体の測定期間は2004年02月26日から2004年03月25日までの1ヶ月間(1回目の測定日=2004年02月26日、2回目の測定日=2004年03月04日、3回目の測定日=2004年03月11日、4回目の測定日=2004年03月18日、5回目の測定日=2004年03月25日)を要した。その結果、総コレステロールの正確度はCDCの目標値に対する%バイアスで-0.1%、精密度は変動係数(among-run CV)で0.6%を示し、その結果総合誤差は1.4%と計算される。これらの測定精度は、CDCの判定基準を十分に満たす。この成績により、CDCは2004年03月26日から2006年03月26日までの2年間有効の認証書を発行した。

SRLにおけるHDLコレステロールの測定条件は、分析装置が日立7170型自動分析機器、試薬が第一化学薬品のCholestest N HDL(試薬1のLot No.=117REA、試薬2のLot

No.=114RDA)、キャリブレーターが第一化学薬品の Cholestest N Calibrator(表示値=57 mg/dL、Lot No.=118RGA)であった。標準化検体の測定期間は、2003年11月05日から2003年12月18日までの約1ヶ月半(1回目の測定日=2003年11月05日、2回目の測定日=2003年11月13日、3回目の測定日=2003年11月20日、4回目の測定日=2003年12月04日、5回目の測定日=2003年12月18日)であった。その結果、HDL コレステロールの正確度は CDC の目標値に対する%バイアスで +1.0%、精密度は変動係数 (among-run CV)で 1.7%を示し、総合誤差は 4.4%と判明した。これらの測定精度は、CDC の判定基準を十分に満たす。この成績により、CDC は 2003年11月05日から2005年11月05日までの2年間有効の認証書を発行した。

SRL における LDL コレステロールの測定条件は、分析装置が日立 7170 型自動分析機器、試薬が第一化学薬品の Cholestest L DL(試薬1の Lot No.=116REA、試薬2の Lot No.=124RIA)、キャリブレーターが第一化学薬品の Cholestest N Calibrator(表示値=106 mg/dL、Lot No.=120RKA)であった。標準化期間は2004年04月14日から2004年05月19日までの約1ヶ月(1回目の測定日=2004年04月14日、2回目の測定日=2004年04月21日、3回目の測定日=2004年04月28日、4回目の測定日=2004年05月12日、5回目の測定日=2004年05月19日)であった。

その結果、LDL コレステロールの正確度は CDC の目標値に対する%バイアスで -0.7%、精密度は変動係数 (Among-run CV)で 0.7%を示し、総合誤差は 2.1%と判明した。これらの測定精度は、CDC の判定基準を十分に満たす。この成績により、CDC は 2004年05月21日から2006年05月21日までの2年間有効の認証書を発行した。

【SRL 以外の臨床検査室の標準化成績】

自らの施設の検査室で検体分析したのは、愛知県と福岡県の2施設のみであった。愛知県の施設の標準化成績を見ると、総コレステロールの正確度が -0.8%、精密度が 0.6%、HDL コレステロールでは正確度が +0.1%、精密度が 0.8%、LDL コレステロールでは正確度が -2.6%、精密度は 0.4%であった。一方、福岡県の施設の標準化成績を見ると、総コレステロールの正確度が -0.4%、精密度が 0.7%、HDL コレステロールでは正確度が -2.2%、精密度が 0.4%を示した。LDL コレステロールの標準化は未実施であるが、来年度には実施の計画である。以上のことから、2施設とも CDC の判定基準を満たした。

SRL と2施設の臨床検査室をあわせた計3施設共に、同一の判定基準を満たす限りにおいて相互に矛盾はなく、測定値の互換性並びに国際的な相互比較性は担保される。

D. 考察

欧米の先進諸国では、心・血管疾患等を対象とした疫学研究や臨床試験を実施する場合、リスクファクターとされる脂質、特に総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロールなどの測定値を標準化することは、研究の前提条件として慣例化している。事実、公表される最近の論文は、例外なく CDC の標準化を受けた事実が明らかにされている。その際に適用される基準が、WHO を背景として CDC 及び CRMLN が主宰する脂質標準化プログラムであり、これが世界標準とみなされる。CDC の判定基準を満たした測定結果は、正確度と精密度が数値で直接明らかにされることにより、複数の施設間、あるいは、研究成績間で相互比較性（互換性）があると理解されている。(1,2)

大阪府立健康科学センターは、1992年07月以来今日まで国際脂質標準化のネットワークであるCRMLNの正式メンバーであり、2ヶ月に1回の割合でCDCが実施する認証資格試験に合格することによって、2005年04月現在、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、及び、トリグリセライドに対する認証資格を保有し、世界中の試薬メーカーや臨床検査室の標準化を実施する資格を有する。このような認証資格を背景に、本研究班の検体分析の97%を担当するSRLと残りの3%の検体分析を担当する2臨床検査室を対象に標準化を実施したところ、CDCの判定基準

を満たす良好な精度を確認することが出来た。(3,4)

以上のことから、本研究班における脂質の測定値の正確度と精密度は、共に国際水準での判定基準を満たし、国際的な互換性が確認されたことを証明した。このことは、多施設の分析室を対象に国際基準の下で第三者による標準化が実行され、且つ、判定基準が満たされれば、複数の施設で収集された成績を解析する際の支障にはならないことを示唆するものである。

E. 結論

CDC/CRMLN に由来する脂質標準化プロトコルに基づいて、国際的な比較に耐えられる水準での標準化をSRLと2施設の臨床検査室を対象に実施し、いずれも標準化が完結していることを実証した。

F. 文献

- 1 Nakamura M, Sato S and Shimamoto T. Improvement in Japanese Clinical Laboratory Measurements of Total Cholesterol and HDL-cholesterol by the US Cholesterol Reference Method Laboratory Network. J of Atherosclerosis and Thrombosis, Vol.10, No.3, 145-153, 2003.
- 2 Nakamura M, Sato S and Shimamoto T. Current Status of CDC Lipid Standardization and International Needs for Standardization in Epidemiological Studies and Clinical Trials in Japan. J of Atherosclerosis

- and Thrombosis, Vol.11, No.1, 35-37, 2004.
- 3 中村雅一、特集 脂質測定値の標準化と精度維持、薬の知識. ライフサイエンス出版、Vol.55, No.8, 2004.
 - 4 Nakamura M, Kayamori Y, Sato S and Shimamoto T. Lipids Standardization Results of Japanese Manufacturers by US Cholesterol Reference Method Laboratory Network Certification Protocols and the Reagents Specificity and Performance. Focus on Cholesterol Research,NOVA Science Publishers, Inc. In press, 2005.
 - 5 Certification Protocol for Clinical Laboratories(May 2004)
 - 6 Total Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers-Revised-(October 2004)
 - 7 HDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers(November 2002)
 - 8 LDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers(May 2004)
- G. 健康危険情報**
なし
- H. 研究発表**
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
なし
- I. 知的財産権の出願・登録状況**
- 1.特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

脳血管疾患の再発に対する高脂血症治療薬の
HMGC_oA 阻害剤の予防効果に関する研究
高感度 CRP 検査の標準化 (3 年間の総括)

研究協力者 中村 雅一 大阪府立健康科学センター脂質基準分析室
ディレクター

研究要旨

CRP は、急性炎症時のモニタリング以外に、動脈硬化症などの慢性炎症時のマーカーとしても測定対象とされる。最近の研究成果によれば、CRP の高値傾向は脳血管疾患等の新しい独立した危険因子としての意義があると報告されている。この意味において、本研究における高感度 CRP 値を標準化することは研究成績を解析する上で重要な意味を持つ。本研究班では、80 の医療機関が高感度 CRP 値を提供する。CRP の予知因子としての測定には、特に低濃度域を高い再現性で測定できる高感度測定法が求められる。したがって、予知因子として利用する治験では、かなり厳密な標準化が求められることになる。しかしながら、高感度 CRP の基準分析法が確立されていない現状からみれば、CDC/CRMLN による脂質標準化のようにトレーサビリティの確立した本格的な標準化は期待し難い面が残る。このような制約を前提として、本班の 80 施設を対象とした精密度の把握と測定値の互換性の検討を課題とする標準化計画を立案し、実行に移した。

ここに高感度 CRP の標準化に関する 3 年間の総括報告をする。

A. 研究目的

血液化学測定的面から本班の研究に協力する 80 の医療機関を対象に、高感度 CRP の互換性と再現性に関する外部精度管理プログラムを構築し、高感度 CRP 値を標準化することによって、本班で収集された研究成績を解析する際の基礎資料を得ることを目的とする。

B. 研究方法

CRP の測定は、血清中の蛋白質が測定の対象である。中でも、高感度 CRP は、CRP の濃度で 100~200 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 付近の低濃度域を高い精度で測定することを目標としなければならない。加えて、高感度 CRP の測定系では、基準分析法も一次標準物質 (primary standard) も未だ確立していない。この

ような理由から、世界的に通用する高感度 CRP の標準化プログラムは存在しない。高感度 CRP においては、脂質の標準化に見られるような厳密なトレーサビリティの確立された形での標準化は期待し難く、研究班内部もしくは複数の国内の研究班間を対象とした外部精度管理に留まらざるを得ない。そこで、高感度 CRP の測定をする他の研究班（都島班：循環器疾患の予防に向けての炎症反応指標の応用、住民および患者集団の炎症指標と動脈硬化に関する研究）と共同して、2 班に共通した互換性と再現性的を絞ったデザインを構築することにした。

【外部精度管理プログラムのデザイン】

高感度 CRP の外部精度管理プログラムは、2003 年 1 月に Dade Behring 社から提案された「BN システムによる hsCRP 標準化測定法の提案」をベースに、これに一部修正を加えて新たに考案した。本プログラムは、外部精度管理と内部精度管理に関する統計学的背景として、分析施設の変動係数 (CV) を 2% と仮定し、Statistical Power を 80%、両側有意水準を 0.05 とし、測定精度を検出することを目標に設計された。長期間の測定値の観察を目的とした高感度 CRP 用の外部精度管理プログラムが、これまでにわが国で実施されたことはない。

【外部精度管理の参加施設】

本班において高感度 CRP の成績を提供する 80 施設の中、79 施設は臨床

検査センターの一つである SRL(東京都八王子市、免疫化学部 生化学課)に委託分析を、福岡県の 1 施設が自施設で測定することとなった。SRL は外部精度管理プログラムに平成 15 年 05 月と 11 月の 2 回にわたって参加した。この 2 回共に、検体番号は別番号にして同一の血清が配布された。また、自施設で測定をする 1 施設については、測定の準備体制の遅れから平成 17 年 3 月に参加した。SRL と自施設測定の 1 施設の測定時期には 2 年間の間隔が空いているが、 -70 度 C で保冷された血清中の CRP には長期安定性が認められているので、SRL への 2 回と自施設で測定する 1 施設共に、同じ精度管理検体が配布された。

【外部精度管理血清と内部精度管理血清の測定方法】

外部精度管理：大阪府立健康科学センターで脱脂処理（脱脂処理剤は、Dade Behring 社からの提供による）された外部精度管理血清は、1 測定日当り検体 1 から検体 5 までの 5 濃度の血清（血清量は、1 バイアルにつき 1 mL）を 1 組として、5 日間（計 25 本）、各濃度について日常検体と同時にアトランダムに 4 重測定することとした。外部精度管理血清の貯蔵は、 -70 度 C 以下とした。

内部精度管理：外部精度管理血清が測定された 5 日間を含めて、最近 20 日間の各施設における内部精度管理血清の測定日当り 1 個の測定値 ($n=1$) の報告を求めた。内部精度管理血清の選定は、施設の任意によるものとした。

内部精度管理血清の測定方式は、脂質標準化プログラムで採用されている方式を踏襲した。

【測定精度の判定基準】

正確度：外部精度管理血清の正確度と精密度を評価するための指標として、世界的に認められた判定基準は現在存在しない。高感度 CRP では絶対基準法あるいは標準測定法は存在しないので、ゴールドスタンダードまたは一次標準物質を基準とみなし、個々の測定値を対象に Outlier 処理をして、その後に得られた平均値から目標値を設定することとした。この場合の目標値は、外部精度管理への参加施設(当研究班と都島班の分析施設)の成績を基に数値処理された合意値である。本班及び都島班に共通する正確度の判定基準は、数値処理された目標値の±10%以内を許容すると規定した。それによれば、検体1の目標値は 53.03 µg/dL でその 10%許容範囲は 47.73 µg/dL~58.33 µg/dL、検体2の目標値は 98.36 µg/dL でその 10%許容範囲は 88.52 µg/dL~108.20 µg/dL、検体3の目標値は 274.24 µg/dL でその 10%許容範囲は 246.82 µg/dL~301.66 µg/dL、検体4の目標値は 302.06 µg/dL でその 10%許容範囲は 271.85 µg/dL~332.27 µg/dL、検体5の目標値は 419.89 µg/dL でその 10%許容範囲は 377.90 µg/dL~461.88 µg/dL と計算された。

精密度：AHA/CDC Scientific Statement(Circulation,2003;107:499-511)によれば、高感度 CRP の精密度(interassay precision)は変動係数(CV)

で<10%が目標とされる(濃度範囲：30-1000 µg/dL)。国際的な比較可能性の観点から、本班及び都島班においてもこれを準用することとした。

(倫理面への配慮)

hsCRP の標準化の実施に当たって、倫理面への問題は無い。

C. 研究結果

本報告書では、SRL を対象として平成 15 年 05 月と平成 15 年 11 月の 2 回にわたって実施した精度管理成績を中心に記述した。自施設で測定する福岡県の 1 施設については、現在、分析が継続中である。

【SRL の測定条件】

SRL における高感度 CRP の測定条件は、1 回目の平成 15 年 05 月における測定機器がベーリングネフェロメーター II 型自動分析装置、測定試薬が N-ラテックス CRP II (Lot No.=167538A)、校正用血清が N CRP Standard(human)(Lot No.=191941(1630 µg/dL))、内部精度管理血清が自家調整コントロール血清(Lot No.=033211)、測定期間は平成 15 年 05 月 23 日から平成 15 年 06 月 07 日に至る約 2 週間であった。2 回目の平成 15 年 11 月における測定機器がベーリングネフェロメーター II 型自動分析装置、測定試薬が N-ラテックス CRP II (Lot No.=167541B)、校正用血清が N CRP Standard(human)(Lot No.=191942(1700 µg/dL)と Lot No.=191943(1440 µg/dL))、内部精度管理血清が自家調整コントロール血清(Lot No.=033211)、測定期間

は平成 15 年 11 月 29 日から平成 15 年 12 月 16 日までの約 2 週間であった。

【SRL の正確度と精密度について】

正確度：1 回目(平成 15 年 05 月)の SRL の測定精度は、検体 1 の平均値が 51.6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=0.81\%$)、検体 2 の平均値が 97.2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=1.32\%$)、検体 3 の平均値が 263.3 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=0.99\%$)、検体 4 の平均値が 286.2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=1.44\%$)、及び、検体 5 の平均値は 385.2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=1.03\%$)であった。目標値と比較した場合、1 回目の SRL における 5 濃度の血清の平均値は平均 -4.3%と低値を示すが、前述した目標値 $\pm 10\%$ の許容範囲に収まった。2 回目(平成 15 年 11 月)の SRL の測定精度は、検体 1 の平均値が 50.79 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=1.63\%$)、検体 2 の平均値が 95.19 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=1.00\%$)、検体 3 の平均値が 271.6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=0.93\%$)、検体 4 の平均値が 300.35 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=0.50\%$)、及び、検体 5 の平均値は 420.15 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ($n=20$, $\text{CV}=0.88\%$)であった。目標値と比較した場合、2 回目では SRL における 5 濃度の血清の平均値は平均 -1.8%と 1 回目と同じく低値を示すが、前述した目標値 $\pm 10\%$ の許容範囲に収まった。

精密度：1 回目の外部精度管理における SRL の平均変動係数は 1.12%、また内部精度管理血清による変動係数は 0.81%であった。一方、2 回目の外部精度管理における SRL の平均変動係数は 0.99%、また内部精度管理血清による変動係数は 1.87%であった。2

回の外部精度管理と内部精度管理共に、10%以下の判定基準を十分に満たした。

D. 考察

抗原抗体反応を利用した免疫化学的測定法において、その測定値に影響を与える因子として、1)標準物質の値付けおよびマトリックスの違い、2)試薬として使用される抗体の違い(モノクローナル抗体/ポリクローナル抗体、免疫動物、免疫源)、3)測定原理(SRID 法、ネフェロメトリー法、比濁法)の違い、4)測定機種(測定条件)の違いが挙げられる。市場で使用されている測定系はそれらが組み合わされており、そのすべてを標準化し統一することは極めて難しい。このために、共通の標準物質を導入して、出来る範囲内で標準化する方法を取らざるを得ない。これが血漿蛋白測定の標準化の基本的な考え方である。見方を変えれば、標準物質を統一しただけでは施設間差は解消されず、抗体、測定原理、測定機種(測定条件)などに起因する測定値の乖離が厳然と存在することは避けられない。このことは、脂質標準化プログラムと高感度 CRP の互換性を比較すれば、より明確になる(下表)。

比較項目	脂質標準化プログラム	高感度 CRP の互換性プログラム
基準分析法(目標値)	あり(正確さの基準値)	なし(参加者の合意値)
標準物質	あり	なし(精製蛋白、CRM470)

標準化プログラム	あり	なし
試料	新鮮血清	脱脂血清
解析ソフト	あり	なし
判定基準	あり	なし

蛋白測定 of 標準物質のゴールドスタンダードは精製蛋白である。多くの場合、精製蛋白の準備は技術的に容易であるが、ゴールドスタンダードから一次標準物質、さらには二次標準物質への表示値の伝達、さらには血清中の成分の測定に至るまでのトレーサビリティにおいて絶対基準法あるいは標準測定法は存在しない。このような理由から、ゴールドスタンダードまたは一次標準物質を標準にして、基本性能が充足された信頼できる測定システムを使用して複数の施設で測定することで、その平均値を求めて目標値とする方法が取られている。この場合の目標値は、合意値である。以上のことから、高感度 CRP においては、脂質検査のような標準化ではなく、参加施設間の互換性の検討に留まらざるを得ない。高感度 CRP における表示値の移行・伝達経路を以下に示した。《高感度 CRP における表示値の移行・伝達経路》

ゴールドスタンダード→一次標準品 (WHO, CDC) →二次標準品 (血漿蛋白国際標準品 CRM470, 0.0392 g/L, IFCC 製造) →マザーキャリブレーター (企業) →キャリブレーター→血清トレーサビリティの確立した脂質標準化の場合、判定基準、特に正確

度を満足できないケースでは、修復の方法として基準分析法が支援に乗り出すのが一般的である。しかしながら、高感度 CRP では基準分析法が存在せず、合理的な支援方法がないことから、各施設の平均値が目標値の±15%以上乖離した場合の修復操作として、血漿蛋白国際標準品(CRM470)の提供を始めとして、Dade Behring 社による機器、試薬、測定条件、試料、操作法、メンテナンスなどを受けることが出来るように配慮した(1)。しかしながら、本班においては修復する必要はなかった。

本班に先行して実施した都島班における9施設の集計結果を基に、外部精度管理に使用した検体の目標値と許容範囲を計算して【測定精度の判定基準】に示した。都島班において施設別に許容範囲に入るケースを判別したところ、全ての参加施設の平均値は、目標値±7%の範囲に収まることが明らかとなった。このことから、平均値の許容範囲を目標値の±10%に設定することに一つの根拠が与えられたと考えられる。SRLの正確度については、1回目と2回目共に、目標値よりもやや低めの傾向を示したが、いずれも目標値の±7%以内は十分に達成されたと言える(2)。

一方、精密度については、変動係数で10%以下とされている国際基準を準用したが、SRLの精密度は1回目と2回目ともにこれを満たした。1回目の変動係数と2回目の変動係数の差には、5%水準で有意差は認められなかった。心血管系疾患の inflammatory

marker として測定の対象とされる項目には、E-selectin 等の soluble adhesion molecules、cytokines、fibrinogen、SAA、WBC count などが上げられる。米国の規定によれば、interassay precision、即ち、精密度はそれぞれ soluble adhesion molecules が CV<15%、cytokines が CV<15%、fibrinogen が CV<8%、SAA が CV<9%、WBC count が CV<3% とされている。この規定から見れば、高感度 CRP の精密度が 10%以下とされるのは、合理的であろう。しかしながら、現実の分析の場では、それよりもはるかに小さな精密度で測定されていることから、高感度 CRP 値の長期の再現性を考察する上で有利に働くものと思われる。

E. 結論

本研究班の外部精度管理では、分析施設の持つ再現性を約 2%と仮定してスタートした。正確度も精密度も、当初の予測値よりも良好な結果が得られた。その理由の一つとして、SRL の内部精度管理体制が確立されて着実に機能していることに加えて、測定値の直接的な変動要因としての使用機器・試薬・校正用標準血清が Dade Behring 社に統一されていたことが、寄与したものと推測される。脂質の標準化とは異なり、絶対基準分析法も標準分析法も確立していない血漿蛋白の標準化では、測定システムの 1 社統一方式はより望ましい方式であると考えられる。残る課題としては、高感度 CRP 値の何年にも及ぶ施設内と施設間の再現性を確認し、今後の疫学

研究や治験に対する対策に備える必要が認められた。

F. 文献

- 1 Thomas AP, et al.: Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease, Application to Clinical and Public Health Practice, A Statement for Healthcare Professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association, *Circulation* 107:499-511,2003.
- 2 Roberts WL, et al.: Evaluation of Nine Automated High-Sensitivity C-Reactive Protein Methods: Implications for Clinical and Epidemiological Applications. Part 2. *Clinical Chemistry* 47:418-425,2001.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金
(循環器疾患等総合研究事業)
研究報告書

虚血性脳卒中後の心血管イベントの発症と高脂血症の関係
に関する多施設共同調査 (J-STARS-L)
—第1回追跡調査—

J-STARS 予備調査委員会

研究協力者 野村栄一 あかね会土谷総合病院神経内科医長
研究協力者 小林祥泰 島根大学医学部神経・血液・膠原病内科教授
分担研究者 峰松一夫 国立循環器病センター内科脳血管部門部長
研究協力者 棚橋紀夫 埼玉医科大学神経内科教授
分担研究者 井林雪郎 九州大学大学院医学研究院病態機能内科学助教授
研究協力者 入江克美 国立病院機構嬉野医療センター神経内科医長

J-STARS-L investigators

研究要旨

背景および目的

脳卒中の再発に対する HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン) の効果を検証するために J-STARS (Japan Statin Treatment Against Recurrent Stroke) が開始されている。J-STARS を開始するにあたって、虚血性脳卒中の既往を有する日本人の脂質代謝を中心とした臨床的特徴を知る必要が生じた。そこで、虚血性脳卒中発症時の総コレステロールの値、その後の治療に介入しない状態での脳卒中をはじめとする心血管イベントの発症率およびその種類等について検討する目的で、多施設共同の前向き調査である J-STARS-L (J-STARS-Longitudinal study) が行われた。

対象および方法

日本脳卒中協会の脳卒中データバンク部門に参加している 16 施設から 2004 年 10 月 1 日の第 1 回追跡調査後に 302 例の虚血性脳卒中患者のデータが集積された。これらについて、その臨床背景やプライマリーエンドポイントである心血管イベントの発症等について高脂血症の有無別に検討した。

結果

302 例中 15 例に心血管イベントが発生し、そのうち 14 例が虚血性脳卒中、1 例が狭心症であった。高脂血症ありの群で、有意に脳卒中データバンク登録時

の BMI (Body Mass Index)、総コレステロール、中性脂肪が高値で、高血圧、糖尿病を有する割合も高かった。一方、年齢、男性の割合、虚血性心疾患を有する割合に有意な差は認めなかった。心血管イベントの発症率は、高脂血症なしの群に比べ、ありの群で有意に発症率が高く、イベントを脳卒中に絞ってもその傾向を認めた。さらに、対象をデータバンク登録直後より経過を観察した非心原性虚血性脳卒中に限って解析すると、心血管イベントあるいは脳卒中の発症は高脂血症ありの群で発症率が有意に高かった。Cox 比例ハザードモデルによりハザード比を計算すると、高脂血症ありの群は、なしの群に比べ、高血圧や糖尿病の有無等を調整しても、心血管イベントが 9.23 倍、脳卒中は 8.13 倍発症する危険が有意に高かった。

結論

虚血性脳卒中後の心血管イベントの発症、脳卒中の再発に高脂血症が危険因子となる可能性が示唆された。この傾向は心原性脳塞栓症を除く群でより顕著であった。

A. 研究の背景および目的

高脂血症が脳卒中の危険因子であるか否かについては、現在でも議論のあるところであるが^{1,2,3}、虚血性脳卒中については肯定的な報告がいくつか見られる^{4,5,6}。また、高脂血症の治療薬であるスタチンを高脂血症、冠動脈疾患、あるいはその他の動脈硬化の危険因子を有する患者に投与すると、脳卒中の発症が有意に減少することが数多くの臨床試験とそのメタアナリシスによって明らかにされている⁷。ただし、これらの臨床試験の対象になった患者の大部分は脳卒中の既往を有さないため、スタチンの予防効果で証明されているのは今のところ脳卒中の一次予防についてのみである。

高脂血症が虚血性脳卒中の再発の危険因子であるかは、さらにはっきりしない。同様にスタチンが虚血性脳卒

中の二次予防に有用であるかについても今のところほとんど検討がなされていない。最近行われた HPS (Heart Protection Study) のサブ解析においては、脳卒中の既往がある例においてスタチンの脳卒中再発予防効果は有意ではなかったと報告されている²。

このようななか、欧米においては atorvastatin の脳卒中に対する再発予防効果を検証する目的で SPARC L (Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels) 研究が開始され、その結果がどのようになるのか注目されている⁸。ただし、欧米と日本では、脳卒中の臨床病型、スタチンの使用量などが異なるため、日本人を対象とした臨床試験も行われることが望ましいのはいうまでもない。

以上のような事実を背景に 2002 年度から J-STARS が厚生労働科学研究

費補助金により計画され、2004年3月より実際に症例登録が開始された。そこでまず J-STARS のプロトコルを作成するにあたり、J-STARS が対象とするような、脳梗塞の既往を有する日本人の臨床的特徴を知る必要が生じた。特に、①患者の年齢分布、高脂血症を中心とした生活習慣病の合併率、高脂血症の治療の内容、虚血性心疾患の既往、②総コレステロールの値、既にスタチンの投与されている割合、その後の治療に介入しない状態での脳卒中をはじめとする心血管イベントの発症率およびその種類等の情報が得られれば有用と考えた。①に関しては J-STARS-C 研究として結果を既に報告した⁹⁾。今回我々は、②について主に明らかにするため、J-STARS-L (J-STARS-Longitudinal study) と名付けた多施設共同の前向きな症例登録による追跡調査を行った。

B. 研究方法

日本脳卒中協会の脳卒中データバンク (<http://cvddb.shimane-med.ac.jp/>) に参加している病院から参加施設を募集した。2003年9月1日から症例の登録が開始され、2004年10月1日の第1回追跡調査では16施設から症例が送付された。参加施設は、脳卒中データバンクが作成したソフトにデータを入力しているため、本研究に必要なデータを取り込み可能で、さらに追加のデータも入力できる新しいソフトを作成した。なお症例登録期間は、

2005年8月31日までで、2005年10月1日に最終的な追跡調査が予定されている。追跡は、面接、手紙、電話で行い、追跡期間中の心血管イベントの発生および死亡の有無を調査した。

登録患者の選択基準

J-STARS-Lでは症例登録の際に選択バイアスができるだけかからないようにするため、虚血性脳血管障害で、以下の基準のどちらかを満たしていれば登録できることにした。

- 1) J-STARS-L への症例登録期間中に脳卒中データバンクに新規に登録する予定の虚血性脳血管障害例のうち、
 - a) 脳卒中データバンクへの登録時に脂質に関する血液検査(総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール)が施行可能である。
 - b) 脳卒中の既往がある場合はその病型を明らかにできる。
 - c) 高脂血症がある場合はその治療内容を明らかにできる。
 - d) 登録時の身長、体重を明らかにできる。の項目を全て満たすもの。
- 2) 2003年9月1日より前に既に脳卒中データバンクに登録されている虚血性脳血管障害例のうち
 - a) 脳卒中データバンクへの登録時に脂質に関する血液検査(総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール)が施行されていてその結果を入力できる。
 - b) 脳卒中の既往がある場合はその病型を明らかにできる。