

原 著

HbA1cに関する新たな糖尿病診断区分が空腹時血糖値で規定される
糖尿病診断区分に与える影響—栗橋ライフスタイルコホート研究より¹東京女子医科大学医学部内科学（第三）²埼玉県済生会栗橋病院健診部フクシマ サヤカ ナカガミ トモコ ヤマモト ヤヨイ エンドウ ヤスヒロ イワモト ヤスヒコ
福嶋 清香¹・中神 朋子¹・山本 弥生¹・遠藤 康弘²・岩本 安彦¹

（受理 平成22年12月27日）

Impact of New Diagnostic Cut-off for HbA1c in Diabetes and Pre-diabetes Based on Fasting Plasma Glucose:
The Kurihashi Lifestyle Cohort StudySayaka FUKUSHIMA¹, Tomoko NAKAGAMI¹, Yayoi YAMAMOTO¹,
Yasuhiro ENDO² and Yasuhiko IWAMOTO¹¹Department of Medicine III, Tokyo Women's Medical University School of Medicine²Saitama-ken Saiseikai Kurihashi Hospital

We assessed the relation between HbA1c and fasting plasma glucose (FPG) by analyzing the data of 3,273 men and women who underwent health examinations. Subjects were stratified into three groups: normal glucose (NLG); FPG < 110 mg/dl, HbA1c (Japan Diabetes Society: JDS) < 5.2%, borderline glucose (BLG); FPG 110-125 mg/dl, HbA1c 5.2-6.0%, diabetes (DM); FPG ≥ 126 mg/dl, HbA1c ≥ 6.1%. In subjects with DM on HbA1c, 51.8% were classified as DM on FPG. In those with DM on FPG, 72.5% were classified as DM on HbA1c. The diagnostic agreement of DM between FPG and HbA1c was 43.3%. The area under the receiver operating characteristic curve for HbA1c predicting DM on FPG was 0.96 (95% confidence intervals: 0.93-0.99). The optimal cut-off of HbA1c corresponding to DM on FPG was 5.8%, with a sensitivity of 88.8% and a specificity of 94.2%. Of subjects with BLG on HbA1c, 10.0% were classified as BLG on FPG. Of those with BLG on FPG, 73.0% were classified as BLG on HbA1c. The diagnostic agreement of BLG between FPG and HbA1c was 9.7%. The combined use of HbA1c and FPG would be recommended for the diagnosis of DM and BLG.

Key Words: fasting plasma glucose, HbA1c, diagnosis, diabetes

緒 言

我が国では、2010年7月、糖尿病の診断基準が約11年ぶりに改訂された¹⁾。1985年以降糖尿病の診断は75gブドウ糖負荷試験（oral glucose tolerance test: OGTT）における空腹時血糖（fasting plasma glucose: FPG）とブドウ糖負荷後2時間血糖値（2-hour plasma glucose: 2-h PG）で行われてきた。しかし、煩雑で高価なOGTTは日常臨床の場で施行される機会が減じてきた状況を踏まえ、1997年にAmerican Diabetes Association（ADA）は、FPG 126mg/dl以上のみで糖尿病と診断するよう勧告した²⁾。これに対し、1998年にWorld Health Organiza-

tion（WHO）、1999年に日本糖尿病学会が、FPG 126mg/dl以上もしくは2-h PG 200mg/dl以上、もしくは随時血糖 200mg/dl以上を糖尿病型とし、別の日に施行した試験で糖尿病型と再確認できれば糖尿病と診断するよう勧告³⁾⁴⁾した。一方、HbA1cは、空腹時採血の必要がなく、検体の取り扱いが簡便、値の個体内変動が少なく、糖尿病合併症との関係が確立しており⁵⁾⁶⁾、患者の血糖管理や治療目標⁷⁾として過去20年間日常臨床の場で重用されてきた。しかし、測定法の国際標準化が不十分であったため、診断テストとして採用するのは時期尚早と見送られてきた⁸⁾⁹⁾。一方、諸外国に先駆け国内でHbA1cの標準化

Table Distribution of subjects according to glucose categories based on HbA1c and fasting plasma glucose (FPG)

		HbA1c (%)			total
		<5.2	5.1-6.0	≥6.1	
FPG (mg/dl)	<110	1,525	1,430	16	2,971
	110-125	22	162	38	222
	≥126	1	21	58	80
total		1,548	1,613	112	3,273

DM: diabetes mellitus, FPG: fasting plasma glucose.

が進行した我が国においては、日本糖尿病学会 (Japan Diabetes Society : JDS) 値を用いており、HbA1c (JDS 値) 6.5% の境界値では正常型と糖尿病型間のオーバーラップが大きく、HbA1c (JDS 値) 6.5% 未満であっても糖尿病を否定する根拠にはならないため、糖尿病の補助診断として使用されてきた⁴⁾。

その後、国際標準化が整う一方で、世界的規模で糖尿病が急増している^{8)10)~14)}ことから糖尿病を簡便に診断する手段としてHbA1cを糖尿病診断基準項目の1つとして採用することを検討するよう提言^{15)~17)}があった。同時期にADA, ヨーロッパ糖尿病学会, 国際糖尿病連合のInternational Expert Committeeは、世界9カ国から収集した48万人のデータを再解析したdetection and evaluation of type 2 diabetes (DETECT-2) 研究¹⁸⁾の成績をもとにHbA1cを診断基準に採用するよう提言した。DETECT-2は、HbA1cと糖尿病に特異的な合併症である網膜症の関係は、FPGや2-h PGとの関係に類似しており、網膜症有病率が上昇し始めるHbA1c (National Glycohemoglobin Standardization Program 値 : NGSP 値) は6.5% 周辺であると報告した。この結果を受け2009年ADAはFPG 126mg/dl, 2-hPG 200mg/dlと同列にHbA1c (NGSP 値) 6.5% を糖尿病診断のカットオフ値とするよう勧告した⁸⁾¹⁹⁾。またこれと時期を同じくして我が国においても、日本糖尿病学会の検討委員会で、HbA1cをFPGや2-hPGと同等に診断目的に使用することが検討された。同委員会において、60歳未満のOGTT施行者約6,700例での検討でFPG 126mg/dl, OGTTの2-h PG 200mg/dlに対応するHbA1c (JDS 値) がそれぞれ6.1, 6.0% であり、HbA1c (JDS 値) 6.1~6.5% で糖尿病網膜症の頻度が明らかに高率となること、HbA1c (NGSP 値) (%) = HbA1c (JDS 値) (%) + 0.4% として推算でき

ることが確認され¹⁾、我が国の糖尿病診断基準に使用されるHbA1c値のカットオフは6.1%と推奨された¹⁾。そこで、本研究では、既存の健診受診者のデータを用いて、HbA1cの糖尿病や糖尿病予備軍に対するカットオフ値の影響を、FPGによる糖尿病予測と比較することによって検討し、人間ドックにおける判定について、FPG単独または、HbA1c単独、両者の組合せによる判定がよいのか検討することを目的とした。

対象と方法

2006年2月~2007年1月に埼玉県済生会栗橋病院の人間ドックを受診した6,012名の中で、FPGおよびHbA1cの測定がなされた3,778名のうち、HbA1cがみかけ上低値となる病態(赤血球寿命短縮の短縮する溶血性貧血や妊娠時貧血、鉄欠乏性貧血治療時、異常ヘモグロビン血症、透析、肝硬変など)を反映する可能性がある貧血(男性:Hb 13.0g/dl未満, 女性:Hb 12.0g/dl未満), 既知糖尿病を除外した3,273名(男性:2,208名, 女性:1,065名)を対象とした。平均年齢±標準偏差は51±9歳, 範囲は21~85歳である。なお既知糖尿病は、問診による自己申告で、医師から糖尿病と診断されたことがある、もしくは食事運動療法中、経口血糖降下薬やインスリン治療中の糖尿病患者と定義した。

8時間以上絶食後の早朝空腹時にNaF入り採血管で採血を行い、HbA1cとFPGを測定した。HbA1cは高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC) 法(アダムスエーワンシー HA-8160, アークレイ株式会社)で測定した。またFPGはヘキソキナーゼ法(ビトロス 5.1FS, オーソ・クリニカル・ダイアグノスティック株式会社)で測定した。アダムスエーワンシー HA-8160のmean coefficient of variation (CV) 値は1.16%, ビトロス 5.1FSのCV値は1.14%であった。Body mass index (BMIkg/m²)は体重(kg)を身長(m)の2乗で除して求めた。

対象者は、FPG, HbA1c, 各々の診断基準におけるカットポイントを用いて、正常型(FPG<110mg/dlまたはHbA1c (JDS 値) <5.2%), 境界型(FPG 110~125mg/dlまたはHbA1c (JDS 値) 5.2~6.0%), 糖尿病型(FPG≥126mg/dlまたはHbA1c (JDS 値) ≥6.1%)の3群に分類した。2つの血糖指標における基準のκ係数を求めた。

FPGとHbA1cが正規分布を示さないため、3群におけるFPGとHbA1cの相関係数をSpearman

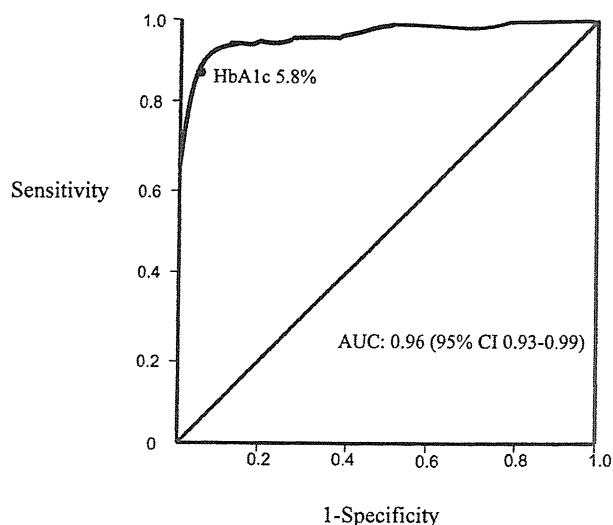


Fig. 1 Receiver operating characteristic (ROC) curve for HbA1c predicting screen detected diabetes based on fasting plasma glucose
AUC: area under the curve: 0.96 (95% CI 0.93-0.99).

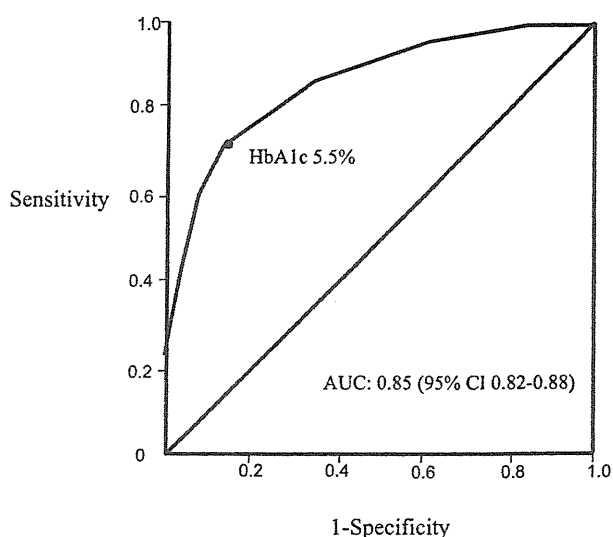


Fig. 2 Receiver operating characteristic (ROC) curve for HbA1c predicting borderline glucose based on fasting plasma glucose
AUC: area under the curve: 0.85 (95% CI 0.82-0.88).

相関係数で計算し、FPG 基準による糖尿病および境界型の分類に対して HbA1c の有用性を receiver operating characteristic (ROC) 曲線¹⁹⁾を用いて検討した。また糖尿病診断基準による新規糖尿病型と境界型における FPG 値と HbA1c 値について感度、特異度、陽性ならびに陰性的中率を算出した。なお境界型に関しては FPG, HbA1c のいずれの基準でも糖尿病となる者を除外して算出した。臨床データの統計処理は SPSS Statistics Ver.17.0 で行った。

なお本研究は、栗橋ライフスタイルコホート研究の一部として埼玉県済生会栗橋病院の倫理審査委員会で承認され、参加者からインフォームドコンセントを得て施行された。

結 果

対象者の年齢 (平均年齢 \pm 標準偏差) は男性 51 ± 9 歳, 女性 51 ± 9 歳, BMI (平均 BMI \pm 標準偏差) は男性 $23.7 \pm 2.9 \text{ kg/m}^2$, 女性 $22.6 \pm 3.1 \text{ kg/m}^2$ であった。FPG と HbA1c の Spearman 相関係数は正常型では 0.39, 境界型では 0.33, 糖尿病型では 0.66, 全体では 0.50 (すべて p 値 <0.001) であった。

1. 糖尿病型に関する検討

FPG 診断基準で糖尿病型 80 名中, HbA1c 基準で糖尿病型の者は 72.5% (58/80), 境界型は 26.3% (21/80), 正常型は 1.3% (1/80) であった (Table)。一方 HbA1c の診断基準で糖尿病型 112 名中, FPG 基準で糖尿病型の者は 51.8% (58/112), 境界型は 33.9% (38/112), 正常型は 14.3% (16/112) であっ

た (Table)。対象者全体における診断の一致率は κ 係数 0.130 ($p=0.0094$) と有意不良であった。糖尿病型における FPG と HbA1c の 2 つの診断基準の一致は 43.3% (58/134) であった。

FPG 診断基準で糖尿病型を予測する HbA1c の ROC 曲線下面積は 0.96 (95% 信頼区間 [95% CI]: 0.93-0.99) であり, 感度 (88.8%) と特異度 (94.2%) の総和が最も高い HbA1c (JDS 値) は 5.8% であった (Fig.1)。FPG 126mg/dl に対する HbA1c (JDS 値) 6.1% の感度は 72.5%, 特異度は 98.3%, 陽性的中率は 51.8%, 陰性的中率は 99.3% であった。

2. 境界型に関する検討

FPG 診断基準で境界型 222 名中, HbA1c 基準での糖尿病型は 17.1% (38/222), 境界型は 73.0% (162/222), 正常型は 9.9% (22/222) であった (Table)。一方 HbA1c 基準で境界型 1,613 名中, FPG 基準で糖尿病型は 1.3% (21/1,613), 境界型は 10.0% (162/1,613), 正常型は 88.7% (1,430/1,613) であった (Table)。境界型における FPG と HbA1c の 2 つの診断基準の一致は 9.7% (162/1,673) であった。

いずれの基準でも糖尿病型と判定される者を除外すると, FPG 基準で境界型を予測する HbA1c の ROC 曲線下面積は 0.85 (0.82-0.88) であり, 感度 (70.3%) と特異度 (85.5%) の総和が最も高い HbA1c (JDS 値) は 5.5% であった (Fig.2)。FPG 110mg/dl に対する HbA1c (JDS 値) 5.2% の感度は 90.1%, 特異度は 51.3%, 陽性的中率は 16.2%, 陰性的中率は

98.5%であった。

考 察

本研究では、糖尿病診断基準改訂後のHbA1cに関するカットオフが一施設の健診受診者のデータでどれだけ一致するかを検討した。その結果、FPGとHbA1cは糖尿病型での診断一致率は43.3%で、境界型の9.7%に比べ上昇したものの依然低かった。これは、糖尿病の発症機転においてHbA1cとFPGが表す病因生理学的役割の違いを表しているためと思われた。FPGは主に肝のブドウ糖放出によって、また、食後血糖は腸管からのブドウ糖吸収速度と筋肉や脂肪などの末梢組織の利用速度、肝のとり込みによって規定される¹⁾。そして、HbA1cは血糖値の日内変動など細かい変化の把握には向かないが、空腹時や食後を合わせた血糖平均値を反映した指標であり、一般的にはHbA1cが1%上昇すれば平均血糖値はおおよそ30mg/dl上昇するとされている²⁰⁾。以上より、糖尿病や境界型を診断する際はFPGとHbA1cの両者を測定することが必要と考えられた。

HbA1cは過去1~2ヵ月間の比較的長期の血糖の状態を反映しており、高血糖状態は、ポリオール経路の活性化やジアシルグリセロール-プロテインキナーゼCの活性化、ヘキソサミン経路の活性化、酸化ストレスの蓄積、終末糖化産物の蓄積を引き起こし、細小血管症および大血管症を発症・進展させる。よってHbA1cは糖尿病患者における血管症の発症のみならず²¹⁾、一般住民における健康指標、心血管疾患や総死亡の予知因子として認知されるようになった^{22)~25)}。我が国では日本動脈硬化学会が採用したNIPPON-DATA80に基づく心血管疾患一次予防モデルに随時血糖値が使用されている。随時血糖値は、食事の内容、形態、時間等で大きく変動するため、糖尿病や境界型の判定におけるカットオフの妥当性が十分検討されたとは言いがたい。そのため、糖尿病と心血管疾患の両者の予防を効果的、効率的に行うため、随時血糖値の代わり、もしくは随時血糖値と同時にHbA1cをどう組み込み利用するか、今後の検討課題と思われる。

今回、HbA1cの糖尿病の診断的カットオフ値は、FPGや2-hPGのカットオフ値と同様に、糖尿病網膜症の有病率との関係から求められた¹⁾。一方で、ROC曲線を用いてHbA1cの糖尿病の診断もしくはスクリーニングのカットオフ値を検討した報告は現在まで数多くあり、その結果は報告によりまちまちであ

る¹⁵⁾。本研究における対象者での感度と特異度の総和が最も高値であったのはHbA1c (JDS値)5.8%であったが、他の報告では感度43~81%、特異度88~99%であった¹⁶⁾²⁶⁾²⁷⁾。この違いの理由には、遺伝性、年齢、赤血球形態異常、赤血球寿命、測定方法の相違、採用した糖尿病の診断基準の違い(75gOGTTを用いる場合)等が挙げられる^{15)28)~32)}。またサリチル酸使用やアルコール、血液透析や尿毒症、高ビリルビン血症など見かけ上HbA1cが低値となる疾患^{32)~37)}を慎重に除外して解析しているか否かも影響したと思われたが、本研究では、これらの疾患をできる限り慎重に除外して解析した。本論文は、通常健診で収集したデータを分析しているため、糖尿病診断の最適な基準と考えられる75gOGTTのブドウ糖負荷後2時間血糖値のデータが欠如しており、この点が本研究の限界として挙げられる。また、本データは一度きりの健診データを分析したものであり、同時期に繰り返し検査を行った成績ではなく、耐糖能の分類、特にFPG分類に際し誤分類をした可能性があるかもしれない。血糖値は採取後経時的に低下する上、日差変動は12~15%程度³⁸⁾と報告されている。一方、HbA1cは、室温で3~14日は安定しており、その日差変動は2%未満である³⁸⁾。

結 語

一施設の健診受診者のデータにおいて、FPGとHbA1cの基準の診断一致率は低かった。糖尿病型におけるFPGとHbA1cは糖尿病型の一致は43.3%と、境界型の9.7%に比べ上昇したものの依然低かった。そのため、糖尿病や境界型を診断するには、FPGとHbA1cの両者を、できれば繰り返し測定することが望ましいと考える。

謝 辞

栗橋ライフスタイルコホート研究に際し、データ収集・管理に尽力、協力くださった当教室の大屋純子先生、長谷川美彩氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の解析は、厚生科学研究費補助金、日本女医会、東京女子医科大学医師会、東京女子医科大学吉岡弥生研究奨励金、やずや食と健康研究助成金の一部を使用して行われ、第53回日本糖尿病学会年次学術集会・岡山において口演発表された。

文 献

- 1) 糖尿病診断基準に関する調査検討委員会：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告。糖尿病 53：450-467, 2010
- 2) Expert committee on the diagnosis and classifica-

- tion of diabetes mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197, 1997
- 3) Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complication. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553, 1998
 - 4) 糖尿病診断基準検討委員会：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病* 42: 385-404, 1999
 - 5) Little RR, Rohlfing CL, Tennill AL et al: Effects of sample storage conditions on glycated hemoglobin measurement: evaluation of five different high performance liquid chromatography methods. *Diabetes Technol Ther* 9: 36-42, 2007
 - 6) Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R et al: Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem* 48: 1116-1118, 2002
 - 7) Nathan DM, Buse JB, Davidson MB et al: Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetologia* 52: 17-30, 2009
 - 8) The International Expert Committee: International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 32: 1327-1334, 2009
 - 9) Genuth S, Alberti KG, Bennett P et al: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: 3160-3167, 2003
 - 10) Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K et al: The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 310: 341-346, 1984
 - 11) Tsuji I, Nakamoto K, Hasegawa T et al: Receiver operating characteristic analysis on fasting plasma glucose, HbA_{1c}, and fructosamine on diabetes screening. *Diabetes Care* 14: 1075-1077, 1991
 - 12) Hanson RL, Nelson RG, McCance DR et al: Comparison of screening tests for non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 153: 2133-2140, 1994
 - 13) McCance DR, Hanson RL, Charles MA et al: Comparison of tests for glycated hemoglobin and fasting and two hour plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes. *BMJ* 308: 1323-1328, 1994
 - 14) Little RR, England JD, Wiedmeyer HM et al: Relationship of glycosylated hemoglobin to oral glucose tolerance: implications for diabetes screening. *Diabetes* 37: 60-64, 1988
 - 15) Bennett CM, Guo M, Dharmage SC: HbA_{1c} as a screening tool for detection of Type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med* 24: 333-343, 2007
 - 16) Jesudason DR, Dunstan K, Leong D et al: Macrovascular risk and diagnostic criteria for type 2 diabetes. Implications for the use of FPG and HbA_{1c} for cost-effective screening. *Diabetes Care* 26: 485-490, 2003
 - 17) Perry RC, Shankar RR, Fineberg N et al: HbA_{1c} measurement improves the detection of type 2 diabetes in high-risk individuals with non-diagnostic levels of fasting plasma glucose: the Early Diabetes Intervention Program (EDIP). *Diabetes Care* 24: 465-471, 2001
 - 18) Colagiuri S, Borch-Johnsen K: DETECT-2: early detection of type 2 diabetes and IGT. *Diabetes Voice* 48: 11-13, 2003
 - 19) American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33: S62-S69, 2010
 - 20) 富永真琴：ヘモグロビン A1c. 「基準値と異常値の間 その判定と対策, 改訂6版」(河合 忠編), pp503-506, 中外医学社 (2006)
 - 21) Tapp RJ, Tikellis G, Wong TY et al: Australian Diabetes Obesity and Lifestyle Study Group: Longitudinal association of glucose metabolism with retinopathy. *Diabetes Care* 31: 1349-1354, 2008
 - 22) Khaw KT, Wareham N, Bingham S et al: Association of hemoglobinA1c with cardiovascular disease and mortality in adult: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med* 141: 413-420, 2004
 - 23) Barr EL, Boyko EJ, Zimmet PZ et al: Continuous relationships between non-diabetic hyperglycaemia and both cardiovascular disease and all-cause mortality: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle (AusDiab) study. *Diabetologia* 52: 415-424, 2009
 - 24) Selvin E, Steffers MW, Zhu H et al: Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in non-diabetic adults. *N Engl J Med* 362: 800-811, 2010
 - 25) Nakanishi S, Yamada M, Hattori N et al: Relationship between HbA_{1c} and mortality in a Japanese population. *Diabetologia* 48: 230-234, 2005
 - 26) Herdzyk E, Safranow K, Ciecchanowski K: Diagnostic value of fasting capillary glucose, fructosamine and glycosylated haemoglobin in detecting diabetes and other glucose tolerance abnormalities compared to oral glucose tolerance test. *Acta Diabetol* 39: 15-22, 2002
 - 27) Tavintharan S, Chew LSW, Heng DMK: A rational alternative for the diagnosis of diabetes mellitus in high risk individuals. *Ann Acad Med Singapore* 29: 213-218, 2000
 - 28) Herman WH, Ma Y, Uwaifo G et al: Differences in A1C by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 30: 2453-2457, 2007
 - 29) Ziemer DC, Kolm P, Weintraub WS et al: Glucose-independent, black-white differences in hemoglobin A1C levels. *Ann Intern Med* 152: 770-777, 2010
 - 30) Pani L, Korenda L, Meigs JB et al: Effect of aging on A1C levels in persons without diabetes: evidence from the Framingham Offspring Study and NHANES 2001-2004. *Diabetes Care* 31: 1991-1996, 2008
 - 31) Kherra PK, Joiner CH, Carruthers A et al: Evidence for interindividual heterogeneity in the glucose gradient across the human red blood cell membrane and its relationship to hemoglobin glycation. *Diabetes* 57: 2445-2452, 2008
 - 32) Cohen RM, Franco RS, Kherra PK et al: Red cell

- lifespan heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood* **112**: 4284-4291, 2008
- 33) Nathan DM, Francis TB, Palmer JL: Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* **29**: 446-449, 1983
- 34) Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB et al: Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J Clin Invest* **67**: 361-369, 1981
- 35) Wang X, Peesapati SK, Renedo MF et al: Hemoglobin A1C levels in non-diabetic patients with end-stage renal disease (ESRD) receiving hemodialysis. *J Endocrinol Invest* **27**: 733-735, 2004
- 36) Weykamp CW, Miedema K, de Haan T et al: Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assay (Letter). *Clin Chem* **45**: 438-440, 1999
- 37) Simon M, Eissler J: Critical factors in the chromatographic measurement of glycohemoglobin (HbA1). *Diabetes* **29**: 467-474, 1980
- 38) Selvin E, Crainiceanu CM, Brancati FL et al: Short-term variability in measures of glycemia and implications for the classification of diabetes. *Arch Intern Med* **167**: 1545-1551, 2007
-

日本臨牀 69 卷 増刊号 1 (2011 年 1 月 20 日発行) 別刷

メタボリックシンドローム (第 2 版)

—基礎・臨床の最新知見—

IV. 病 態

メタボリックシンドロームに起因もしくは関連する病態とその管理

糖尿病・耐糖能異常

中神朋子 岩本安彦

IV. 病 態

メタボリックシンドロームに起因もしくは関連する病態とその管理

糖尿病・耐糖能異常

Diabetes mellitus and impaired glucose regulation

中神朋子 岩本安彦

Key words : メタボリックシンドローム, IFG, IGT, 糖尿病

はじめに

日本人の糖尿病患者数は増加の一途をたどっており、厚生労働省による糖尿病実態調査(平成19年)では、糖尿病が強く疑われる人が約690万人、可能性を否定できない人が約1,320万人であり、10年前の平成9年に比べ約1.3倍に増えたと報告されている。糖尿病の主要な原因には、インスリン分泌不全の遺伝的素因に加え、生活習慣の変化による肥満、インスリン抵抗性要因が増加しているためと考えられる。

肥満・インスリン抵抗性は、肥満・耐糖能障害・脂質異常症・高血圧が重複するメタボリックシンドローム(metabolic syndrome: MetS)を惹起し、糖尿病や心血管疾患の主因となると考えられる。MetSの原因となる肥満では、肥大化した肥満細胞からTNF- α 、レジスチン、遊離脂肪酸など種々のシグナル分子‘アディポカイン’が多量に産生・分泌される一方で、インスリン感受性因子のアディポネクチンは低下し、骨格筋や肝臓でインスリンの情報を障害しインスリン抵抗性を惹起する。

厚生労働省による国民健康・栄養調査(平成17年)では、40-74歳の成人において、MetSが強く疑われる者の比率は、男性25.5%、女性10.3%、予備群と考えられる者の比率は、男性

25.0%、女性9.5%であり、40-74歳の男性の2人に1人、女性の5人に1人がMetSを強く疑われるまたは予備群、と考えられた。

こうしたMetSの該当者および予備群が増加する状況を受け、2009年4月から特定健康診査・特定保健指導が開始された。本健診では、医療保険者(国保・被用者保険)に対し、40-74歳の加入者(被保険者・被扶養者)を対象とする、内臓脂肪型肥満に着目した健康診査(特定健診)および保健指導(特定保健指導)の実施を義務づけたもので、MetSの予備群の生活習慣に介入することにより、粥状動脈硬化症に基づく虚血性心疾患や脳血管障害のみならず糖尿病の発症も減少させることを目指している。

本稿では、我が国の健康施策の中心に位置するMetSを糖尿病の発症リスクの点から検証する。

1. 糖尿病の発症リスクからみたMetS

MetSと糖尿病発症の関係は既に多く報告されている。それによると、MetSが存在する場合はしない場合に比べて糖尿病の発症率は5-10倍¹⁾増加する。このリスクの幅は、採用されたMetSの基準や糖尿病の診断基準の違い、追跡期間の差や交絡因子調整の有無、またその種類や数にも由来すると考えられた。Ford²⁾は

Tomoko Nakagami, Yasuhiko Iwamoto: Division of Diabetes and Metabolism (Diabetes Center), Department of Internal Medicine, Tokyo Women's Medical University School of Medicine 東京女子医科大学 糖尿病センター

2001-National Cholesterol Educational Panel(NCEP)と1999-World Health Organization(WHO)の2つの診断基準からみた糖尿病発症リスクをメタ解析した。2001-NCEP診断基準を採用した5つの研究のデータソースは、フィンランド(白人), 米国(アメリカンインディアン, メキシコ系アメリカ人, 白人), スコットランド(白人), メキシコ(メキシコ人)からの12,275人である。2001-NCEPの基準を採用した4研究¹⁾の結果では, 糖尿病発症に関するオッズ比は2.99(95%信頼区間:1.96-4.57)であり, これにbody mass index(BMI)をウエスト径に代用した1研究を追加すると3.08(2.16-4.40)に上昇した。また, 1999-WHO診断基準を採用した2研究における交絡因子で調整しない場合のオッズ比は6.08(4.76-7.76)であった。これは同研究者¹⁾がMetSの総死亡や心血管疾患発症に関連したリスクを同様にメタ解析し, それぞれ1.27(0.90-1.78), 1.74(1.43-2.12)と報告した成績よりも高いことから, MetSは総死亡や心血管疾患発症の予測より糖尿病の発症予測に優れていると報告された¹⁾。

アジア系人種ではインド人において, impaired glucose tolerance(IGT, 75gブドウ糖負荷試験(OGTT)2時間血糖値 \geq 140mg/dL)から糖尿病への移行に関連した1999-WHO MetSのオッズ比は1.02(0.78-1.35)と有意でないことが報告された²⁾。しかし, 中国のNational Diabetes Surveyの一部であるBeijing project³⁾では, 食後2時間の毛細血管の血糖値が120mg/dL以上の成人に75gOGTTを行い, 非糖尿病の者を追跡調査する中で, 糖尿病の発症に関連したMetSのオッズ比(年齢, 教育, 職業, 喫煙, 糖尿病家族歴, 総コレステロール値で調整)を男女別に観察し, 2001-NCEP基準では男性で3.98(1.85-8.58), 女性で2.80(1.48-5.32), 1999-WHO基準では男性で4.46(2.56-8.87), 女性で2.08(1.05-3.53), European Group for the Study of Insulin Resistance(EGIR)基準では男性で3.68(1.82-7.79), 女性で1.55(1.11-3.28), American Association of Clinical Endocrinologists(AACE)基準では男性で3.96(2.12-

7.30), 女性で2.77(1.50-5.13)と報告した。ただしこの成績は, 肥満度の指標のカットオフ値を中国人向けに変化せず, 欧米の値を採用した成績である。

我が国からは, 久山町研究が, 1,935人を対象に2005年にアップデートされた2005-NCEP基準に関連した糖尿病発症に関するオッズ比を, 男性で2.58(1.85-3.59), 女性で3.69(2.58-5.27)と報告した。また, 2005-NCEP基準は, impaired fasting glucose(IFG, 空腹時血糖値 \geq 100mg/dL)から独立して糖尿病の発症予測に有効と報告した⁴⁾(図1)。

2. 糖尿病の発症予測の効率からみたMetS

MetSを糖尿病の発症を予測するためのスクリーニングテストととらえると, その有効性を知ることは重要である。前出のBeijing project³⁾における4つの診断基準の感度と特異度をみると(表1), 診断基準により大きな違いがあることがわかる。興味深いことに, San Antonio Heart Study⁵⁾では, MetSの糖尿病発症予測の有効性をIGTやIFGのそれと比較している(表2)。それによれば, 2001-NCEP MetSのpositive predictive value(PPV)はIGTのPPVに比べ低いものの, それ以外はさほど変わらないが, IFGの糖尿病発症予測の感度に比べると2001-NCEP MetSの感度はかなり良好である。更に, San Antonio Heart Study⁵⁾では, 2001-NCEP MetSから予測される偽陽性率[MetSを有していても糖尿病を発症しない人の比率; 100%-特異度]に対応する感度を, 以前作成した糖尿病発症予測のためのリスクスコアで検証した⁶⁾(表3, 図2)。糖尿病のリスクスコアは, 年齢, 性, 人種(メキシコ系アメリカ人/白人), 空腹時血糖値, 収縮期血圧, HDLコレステロール, BMI, 糖尿病家族歴が情報として含まれており, これらの情報すべてを総合して糖尿病の発症率を予測するものである⁶⁾。2001-NCEP MetSと異なるのは, 個々の危険因子がyes-noの2者択一でなく, 性, 人種, 糖尿病家族歴を除きその他すべてに連続実数値を採用していることで

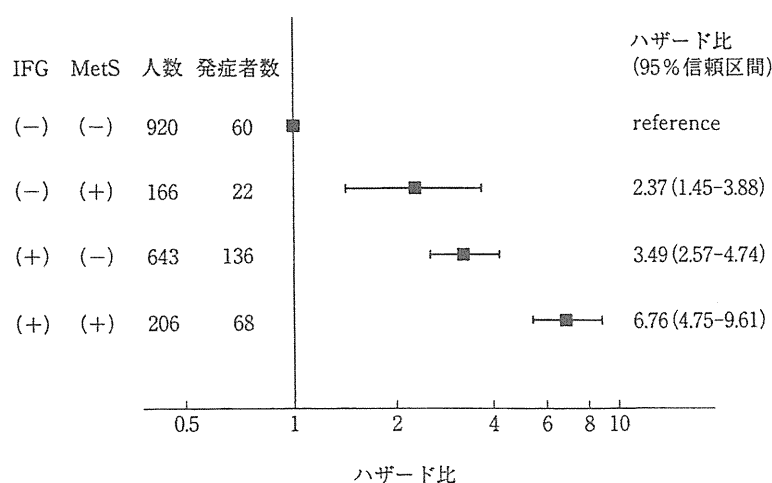


図1 久山町研究における2005-NCEP MetS, IFGの有無別にみた糖尿病発症に関連したハザード比

表1 Beijing projectにおける糖尿病の発症に対する異なる4つのMetS診断基準における感度と特異度

	感度 (%)	特異度 (%)
男性		
2001-NCEP(ウエスト周囲径>102 cmを腹部肥満と規定)	27	91
1999-WHO(WHR>0.9 or BMI≥30 kg/m ² を肥満と規定)	53	74
EGIR(ウエスト周囲径≥94 cmを腹部肥満と規定)	28	91
AACE	61	71
女性		
2001-NCEP(ウエスト周囲径>88 cmを腹部肥満と規定)	41	84
1999-WHO(WHR>0.85 or BMI≥30 kg/m ² を肥満と規定)	42	71
EGIR(ウエスト周囲径≥80 cmを腹部肥満と規定)	28	87
AACE	58	70

表2 San Antonio Heart Studyにおける糖尿病の発症に対する4つのMetS診断基準のパフォーマンス

	感度 (%)	特異度 (%)	PPV (%)	NPV (%)
IGT	51.9	91.5	43.0	93.9
IFG	9.2	98.9	51.4	89.6
2001-NCEP	52.8	84.9	30.8	93.4
1999-WHO*	42.8	87.1	30.4	92.1

*ただし尿アルブミンは基準から除外, IGT, 高インスリン値の者も除外し解析.

PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value.

ある。そのため、糖尿病の発症予測の効率は図2に示したような連続的なROC曲線を描くこととなる。一方、2001-NCEP MetSの糖尿病発

症予測の効率はワンポイントのみの数値(▲)で表される。その結果、2001-NCEP MetSが提供する偽陽性率と同じ比率の偽陽性率に対応する

表3 San Antonio Heart Study における糖尿病の発症予測能と効率の比較

	ROC 曲線下面積	感度 (%)	偽陽性率(100-特異度) (%)
2001-NCEP	—	66.2	27.8
糖尿病リスクスコア	0.819	75.9(p<0.0015)	27.8に規定
糖尿病リスクスコア+2001-NCEP	0.824(p=0.13)	75.9(p<1.00)	27.8に規定
糖尿病リスクスコア	—	66.2に規定	19.2(p<0.0001)
糖尿病リスクスコア+2001-NCEP	—	66.2に規定	19.9(p=0.22)

p 値は直上の列の値との比較から得られたものである。

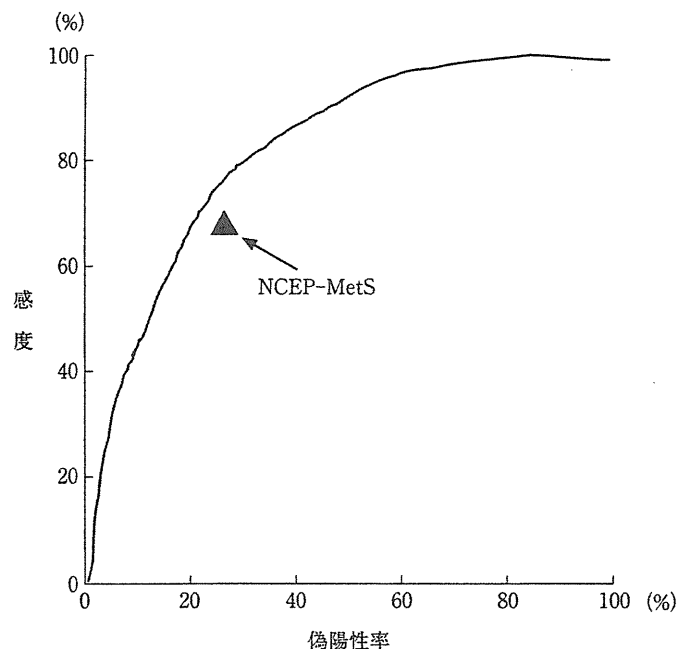


図2 San Antonio Heart Study における 2 型糖尿病の発症予測のための糖尿病リスクスコアの ROC 曲線

リスクスコアは本集団が観察 7 年で糖尿病が発症する可能性を、年齢、性別、人種、空腹時血糖、収縮期血圧、HDL コレステロール、BMI、糖尿病家族歴から予測するものである。▲は 2001-NCEP MetS の感度と偽陽性率。

リスクスコアの感度より 2001-NCEP MetS の感度は有意に 10% 低いことが判明した(表 3)。逆に、2001-NCEP MetS の感度と同じ感度を提供するリスクスコアのカットポイントは 2001-NCEP MetS の偽陽性率より低い偽陽性率を示していた。以上より、2001-NCEP MetS の診断基準は既に確立されている糖尿病のリスクスコアより糖尿病発症予測の効率からみて劣っていることが明らかとなった。更に興味深いのは、

糖尿病のリスクスコアと 2001-NCEP MetS を組み合わせて使用しても、ROC の曲線下面積は変化せず、予測能は不変であったという。同研究では、その後、アップデートされた 2005-NCEP MetS 基準が IFG の糖尿病発症予測能を上昇させる追加的効果をもつことも報告した⁷⁾。

一方、我が国の舟形町研究では、2006-IDF MetS の有無、腹部肥満の有無よりも、IFG そのものが糖尿病の発症者を効果的に拾い上げると



病
態

表 4 舟形町研究における IDF MetS 基準に様々な腹囲基準値を採用した場合の糖尿病の発症率(95%信頼区間)

腹部肥満の有無	腹部肥満なし				腹部肥満あり			
	≤1		≥2		≤1		≥2 (IDF-MetS)	
IFG 以外の MetS 危険因子数								
IFG の有無	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり
1) IDF MetS 基準(日本人向けウエスト周囲径採用) 男: 90 cm, 女: 80 cm								
人数	461	88	52	12	102	24	23	17
糖尿病発症者数	7	12	0	1	0	4	1	1
糖尿病発症率(/千人年)	3.8	34.3	—	20.9	—	42.0	10.9	14.7
	(1.0-6.7)	(15.2-53.4)		(-19.7-61.5)		(1.7-82.3)	(-10.4-32.3)	(-14.0-43.6)
2) 我が国の MetS 診断基準 男: 85 cm, 女: 90 cm								
人数	494	86	61	16	69	26	14	13
糖尿病発症者数	5	10	1	2	2	6	0	0
糖尿病発症率(/千人年)	2.6	29.3	4.1	31.4	7.3	58.1	—	—
	(0.3-4.8)	(11.4-47.2)	(-3.9-12.2)	(-11.4-74.2)	(-2.8-7.4)	(13.0-103.2)		
3) 腹囲提案値 男: 85 cm, 女: 80 cm								
人数	419	73	45	9	144	39	30	20
糖尿病発症者数	5	9	0	1	2	7	1	1
糖尿病発症率(/千人年)	3.0	31.0	—	27.9	3.5	45.2	8.4	12.6
	(0.4-5.6)	(11.1-51.0)		(-26.0-81.8)	(-1.3-8.3)	(12.5-78.0)	(-8.0-24.8)	(-11.9-37.1)

報告した⁹⁾(表4)。類似した成績は、我が国の久山町研究⁹⁾、中国やオーストラリア(アジア系移民を含む)の住民調査においても観察される⁹⁻¹¹⁾。とりわけ、欧米人に比べ膵β細胞機能の低い日本人における糖尿病発症予防を考えるときには、空腹時高血糖値(IFG)がある場合はそれ以外の代謝指標の異常の有無によらず、糖尿病のハイリスクとして取り扱うことが、糖尿病発症者数を減少させるためには必要である。その場合、現行の生活習慣介入のみならず、膵β細胞障害に対する介入(治療)が必要と思われる。

おわりに

MetSは、心血管疾患のみならず糖尿病の発症基盤という点で注目されているが、診断基準の差異によらず、東アジア系人種においても欧

米人と同様、糖尿病の発症リスクを少なくとも2倍以上上昇させる。そのため、インスリン抵抗性、MetSを上流にもつ場合、生活習慣の改善は極めて効果的と思われ、我が国の特定健診・特定保健指導の成果が待たれる。一方で、糖尿病発症者の拾い上げのスクリーニングの効率からみると、(診断基準の違いにもよるが)IGTやIFGと同程度、もしくはそれ以下である。また、現存するMetSの糖代謝異常の指標には空腹時血糖が用いられているが、糖尿病の初期のサインは食後高血糖である。MetSは動脈硬化の独立した危険因子であるIGTを伴うことが多いため、空腹時高血糖を呈さずとも、それ以外のMetS構成因子をもつ場合はOGTTを行い、血糖やインスリン分泌パターンを評価することが推奨される。

IV
病
態

■ 文 献

- 1) Ford ES: Risks for all-cause mortality, cardiovascular diseases, and diabetes associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 28: 1769-1788, 2005.
- 2) Ramachandran A, et al: Metabolic syndrome does not increase the risk of conversion of impaired glucose tolerance to diabetes in Asian Indians—Result of Indian diabetes prevention programme. *Diabetes Res Clin Pract* 76(2): 215-218, 2007.
- 3) Wang JJ, et al: The metabolic syndrome and incident diabetes: assessment of four suggested definitions of the metabolic syndrome in Chinese population with high post-prandial glucose. *Horm Metab Res* 36: 708-715, 2004.
- 4) Mukai N, et al: Impact of metabolic syndrome compared with impaired fasting glucose on the development of type 2 diabetes in a general Japanese population: the Hisayama study. *Diabetes Care* 32: 2288-2293, 2009.
- 5) Lorenzo C, et al: The metabolic syndrome as predictors of type 2 diabetes: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 26: 3153-3159, 2003.
- 6) Stern MP, et al: Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at high risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care* 27: 2676-2681, 2004.
- 7) Lorenzo C, et al: The National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care* 30: 8-13, 2007.
- 8) Nakagami T, et al: Raised fasting plasma glucose a better predictor of diabetes than the IDF definition of the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 85: e19-21, 2009.
- 9) Wang JJ, et al: How well does the metabolic syndrome defined by five definitions predict incident diabetes and incident coronary heart disease in a Chinese population? *Atherosclerosis* 192: 161-168, 2007.
- 10) Cheung BM, et al: Development of diabetes in Chinese with the metabolic syndrome: a 6-year prospective study. *Diabetes Care* 30: 1430-1436, 2007.
- 11) Cameron AJ, et al: The metabolic syndrome as a tool for predicting future diabetes: the AusDiab study. *J Intern Med* 264: 177-186, 2008.

Seven Direct Methods for Measuring HDL and LDL Cholesterol Compared with Ultracentrifugation Reference Measurement Procedures

W. Greg Miller,^{1*} Gary L. Myers,² Ikunosuke Sakurabayashi,³ Lorin M. Bachmann,¹ Samuel P. Caudill,² Andrzej Dziekonski,¹ Selvin Edwards,² Mary M. Kimberly,² William J. Korzun,¹ Elizabeth T. Leary,⁴ Katsuyuki Nakajima,⁵ Masakazu Nakamura,⁶ Göran Nilsson,⁷ Robert D. Shamburek,⁸ George W. Vetovec,¹ G. Russell Warnick,⁹ and Alan T. Remaley⁸

BACKGROUND: Methods from 7 manufacturers and 1 distributor for directly measuring HDL cholesterol (C) and LDL-C were evaluated for imprecision, trueness, total error, and specificity in nonfrozen serum samples.

METHODS: We performed each direct method according to the manufacturer's instructions, using a Roche/Hitachi 917 analyzer, and compared the results with those obtained with reference measurement procedures for HDL-C and LDL-C. Imprecision was estimated for 35 runs performed with frozen pooled serum specimens and triplicate measurements on each individual sample. Sera from 37 individuals without disease and 138 with disease (primarily dyslipidemic and cardiovascular) were measured by each method. Trueness and total error were evaluated from the difference between the direct methods and reference measurement procedures. Specificity was evaluated from the dispersion in differences observed.

RESULTS: Imprecision data based on 4 frozen serum pools showed total CVs <3.7% for HDL-C and <4.4% for LDL-C. Bias for the nondiseased group ranged from -5.4% to 4.8% for HDL-C and from -6.8% to 1.1% for LDL-C, and for the diseased group from -8.6% to 8.8% for HDL-C and from -11.8% to 4.1% for LDL-C. Total error for the nondiseased group ranged from -13.4% to 13.6% for HDL-C and from -13.3% to 13.5% for LDL-C, and for the diseased group from -19.8% to 36.3% for HDL-C and from -26.6% to 31.9% for LDL-C.

CONCLUSIONS: Six of 8 HDL-C and 5 of 8 LDL-C direct methods met the National Cholesterol Education Program total error goals for nondiseased individuals. All

the methods failed to meet these goals for diseased individuals, however, because of lack of specificity toward abnormal lipoproteins.

© 2010 American Association for Clinical Chemistry

The current national guidelines on the use of LDL cholesterol (LDL-C)¹⁰ and HDL-C for cardiovascular risk assessment (1, 2) were largely based on early epidemiologic studies that established the link between lipoproteins and cardiovascular disease. Most of these studies used chemical precipitation methods for HDL-C, and β -quantification or the Friedewald calculation for LDL-C. These older procedures have largely been supplanted by newer direct measurement methods for lipoprotein that do not depend on the physical separation of the different lipoprotein classes. The development of direct measurement methods was prompted, in part, by a recommendation from a National Cholesterol Education Program (NCEP) expert laboratory panel that stated LDL-C should ideally be directly measured (3) because of limitations of the Friedewald equation (4). A disadvantage of precipitation-based HDL-C methods was a requirement for manual pretreatment and centrifugation or some other type of labor-intensive separation step (4). Homogeneous reagents for direct measurement of HDL-C and LDL-C facilitated automation and improved imprecision over the previous methods.

In 2008 there were 7 different commercial homogeneous direct measurement methods for HDL-C and LDL-C determination that were distributed worldwide under various trade names. These methods used a wide

¹ Virginia Commonwealth University, Richmond, VA; ² US Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA; ³ Jichi Medical University, Tochigi-ken, Japan; ⁴ Pacific Biometrics and Pacific Biometrics Research Foundation, Seattle, WA; ⁵ Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan; ⁶ Osaka Medical Center for Health Science and Promotion, Osaka, Japan; ⁷ Nilsson Measurement Quality, Uppsala, Sweden; ⁸ NIH, Bethesda, MD; ⁹ Health Diagnostics Laboratory, Richmond, VA. * Address correspondence to this author at: PO Box 980286; Richmond, VA,

23298-0286. Fax 804-828-0353; e-mail gmiller@vcu.edu.

Received December 28, 2009; accepted March 22, 2010.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2009.142810

¹⁰ Nonstandard abbreviations: C, cholesterol; NCEP, National Cholesterol Education Program; RMP, reference measurement procedure; VCU, Virginia Commonwealth University; CDC, US Centers for Disease Control and Prevention.

variety of different surfactants, ionic polymers, and other components that either selectively prevented or enabled measurement of cholesterol in specific classes of lipoproteins among the full range of lipoprotein particles present in serum. Despite their advantages, there has been concern whether direct lipoprotein methods are analytically equivalent to older methods and to the established reference measurement procedures (RMPs) for HDL-C or LDL-C used as the basis for clinical guidelines.

For samples from dyslipidemic patients, who are higher-risk patients, measurement performance issues are of particular importance, especially when performance differences may affect clinical interpretation of results (4–6). There have been many studies evaluating direct lipoprotein methods (6–15), but these investigations usually examined only one or a few of these methods and in many cases did not compare the results to the RMPs. Samples from patients with dyslipidemias or other conditions known to challenge method performance were not always included in previous evaluations. In addition, the various direct lipoprotein methods have undergone considerable changes since their introduction, and older evaluation studies may not be relevant for the latest formulations of these methods.

This study was designed to evaluate direct measurement reagent formulations from 7 manufacturers for quantifying HDL-C and LDL-C. We examined patients with no known disease (nondiseased) as well as patients with known cardiovascular disease and other conditions previously shown to interfere with these methods (diseased), and we compared the results to those obtained with RMPs. We evaluated trueness, accuracy for individual samples, imprecision, and specificity for HDL and LDL lipoproteins, thus providing a comprehensive assessment of the analytical performance of the current direct lipoprotein methods.

Materials and Methods

PATIENT SAMPLES

Study participants were recruited at Virginia Commonwealth University Medical Center (VCU) and the NIH, with the approval of the respective institutional review boards. Of the 175 individuals enrolled (see Table S1 in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol56/issue6>), 37 (21%) had no known diseases and were not on lipid-lowering drugs (nondiseased group) and 138 (79%) were being treated for cardiovascular disease or had other conditions that might be expected to affect lipoprotein methods (diseased group).

Blood was collected into plain glass vacuum tubes (Becton Dickinson), clotted 60–90 min, and centrifuged (1800g for 10 min at 4 °C). Serum from each study participant was combined and mixed in plastic vials before being divided into aliquots. Two full 6-mL aliquots in plastic tubes were shipped overnight at 4 °C in insulated shipping containers, containing temperature indicators (#310 with #319 refrigerant, Saf-T-Pak), to either the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) or to VCU. Samples were measured by direct methods (VCU) and RMPs (CDC) within 48 h after collection, and all measurements were performed on the same day. Because of unacceptable QC parameters RMP values were not available for 1 HDL-C and 3 LDL-C individual sample measurements.

DIRECT HDL-C AND LDL-C METHODS

Reagents, calibrators, and verification controls were provided by Denka Seiken, Niigata; Kyowa Medex, Tokyo; Sekisui Medical, Tokyo (formerly Daiichi); Serotec, Hokkaido; Sysmex International Reagents, Hyogo; UMA, Shizuoka; and Wako Pure Chemical Industries, Osaka (all located in Japan) and were distributed worldwide under various trade names by instrument manufacturers and reagent suppliers. Roche Diagnostics, Penzberg, Germany, the distributor of Kyowa Medex reagents, also provided reagents with Roche calibrators and controls.

All methods were performed on a Hitachi 917 analyzer (Roche Diagnostics), according to parameters recommended by each manufacturer. Each method was installed on a separate channel and calibrated weekly, and method-specific controls were verified to meet each manufacturer's specifications, except for UMA, which did not provide verification controls. Reagents and calibrators from a single lot were used for the Denka Seiken, Kyowa Medex, Sekisui Medical, and Roche methods; reagents from 2 lots were used for the Serotec, Wako, and UMA methods; and reagent from 1 lot and calibrators from 2 lots were used for the Sysmex method. We verified each lot to conform to the manufacturer's analytical range by recovering a linear concentration relationship for patient sera prepared by mixing samples with increased and low concentrations of each analyte. In addition to the normal wash (Cell Wash Solution, Roche Diagnostics), the reagent probe and each reaction cell underwent an additional wash with 300 μ L of Acid Wash Solution (Roche Diagnostics) between each measurement to minimize reagent carryover. We verified that instrument pipette and spectrophotometer CVs were <0.5% weekly, by using a solution of 0.068 mol/L potassium dichromate in 0.005 mol/L H₂SO₄ with 0.145 mol/L NaCl and 1% (vol/vol) Hitergent® (Roche Diagnostics).

Aliquots of 4 off-the-clot frozen human serum pools, prepared according to the CLSI C37A protocol (16), were provided by the CDC and measured in duplicate before and after each run. Frozen pools and patient samples were measured in the sequence shown in online Supplemental Table S2. A maximum of 8 patient samples were measured in a run, which required 2 h to complete all methods.

REFERENCE MEASUREMENT PROCEDURES

The reference measurement procedures for HDL-C and LDL-C were performed at the CDC (17). Chylomicrons and VLDL were removed by ultracentrifugation of 5 mL of serum, overlaid with 0.195 mol/L NaCl, for 16.2 h at a mean of 120 000g (33 700 rpm) in a Beckman-type 50.4 rotor at 18 °C. The top layer, which contained chylomicrons and VLDL components, was removed by slicing the tube. The remaining bottom fraction containing HDL and LDL was quantitatively transferred to a 5-mL volumetric flask, and the volume was made up to 5 mL with 0.15 mol/L sodium chloride. The cholesterol in this bottom fraction was analyzed by the Abell-Kendall RMP (18). For HDL-C measurements, a 2-mL aliquot of the bottom fraction was precipitated with 80 μ L of injectable heparin (5000 USP units/mL plus 0.15 mol/L NaCl in water) and 100 μ L of 1.0 mol/L manganese chloride in water to remove lipoproteins that contained apolipoprotein B. We measured the HDL-C in the supernatant by using the RMP for cholesterol. Beta-quantification LDL-C was obtained by subtracting the HDL-C concentration from the corresponding bottom-fraction cholesterol concentration. Ultracentrifugation was performed in duplicate, except for 21 samples for which insufficient serum was available. Duplicate cholesterol reference measurements were performed for each bottom fraction and HDL supernatant (net 4 HDL-C or LDL-C results for each sample, except 18 of 696 HDL supernatant measurements and 36 of 688 bottom-fraction measurements that had 3 results each owing to outlier exclusions).

OTHER METHODS

Measurement procedures for other analytes and statistical procedures, including estimation of error components, definition of error component terms, and evaluation of the Genzyme (Cambridge, MA) calibrator for HDL-C reagents, are described in the online Supplemental Data file.

Results

IMPRECISION

The imprecision of each method was determined from 4 frozen serum pools (see online Supplemental Table

S4). The total CV for HDL-C on the individual frozen serum pools ranged from 1.5% (Sekisui) to 3.7% (Sysmex) and was below the HDL-C imprecision goal of $\leq 4\%$. All the LDL-C methods showed imprecisions with total CVs ranging from 1.4% (Kyowa) to 3.7% (Serotec), with only 1 pool (#715) with 1 method (Serotec) having a CV of 4.4%, which exceeded the LDL-C imprecision goal of $\leq 4\%$.

Online Supplemental Figs. S1–S16 show plots for the 4 frozen serum pools on each day of measurement over the 28-week study. For LDL-C, there was a shift in results for Serotec (3.6% to 7.5%) and UMA (-4.9% to -2.1%) methods concurrent with reagent-lot changes, and a shift in the Sysmex results (-3.9% to 3.3%) concurrent with a calibrator-lot change. The influences of among day effects and reagent- and calibrator-lot changes are included in the imprecision statistics based on frozen pools.

Online Supplemental Tables S5 and S6 show differences in mean results for the frozen pools measured at the beginning and end of each 2-h run. The magnitude of change from beginning to end of HDL-C runs ranged from -1.0% to 3.4% and for LDL-C ranged from -0.4% to 3.5%, with more frequent observation of higher values at the end of runs. The position effects are included in the imprecision statistics based on frozen pools.

TRUENESS AND TOTAL ERROR

Figs. 1 and 2 show box-and-whisker plots for the non-diseased and diseased groups for the percentage differences between the means of triplicate measurements of each sample and its RMP value for the HDL-C and LDL-C methods, respectively. The median difference in the nondiseased group is a close approximation of the trueness of the calibration, whereas the median difference is influenced by nonspecificity in the diseased group. The interquartile distance and range are related to the lipoprotein specificity and total error. As can be seen for all the methods, there were considerably more discordant results for the diseased vs nondiseased study participants. Sysmex and Wako HDL-C methods showed consistent negative and positive biases, respectively, compared to the RMP. For LDL-C, the Roche, Serotec, and Sysmex methods showed a consistent negative bias.

Online Supplemental Figs. S17–S32 show plots of the percentage differences vs the RMPs for each method. Nearly all discordant results occurred in the diseased group. Except for the UMA methods, which had discordant results throughout the concentration range for both HDL-C and LDL-C, most of the other methods had discordant results mostly at lower HDL-C (<1 mmol/L; <40 mg/dL) and LDL-C (<2.5 mmol/L; <100 mg/dL) concentration ranges.

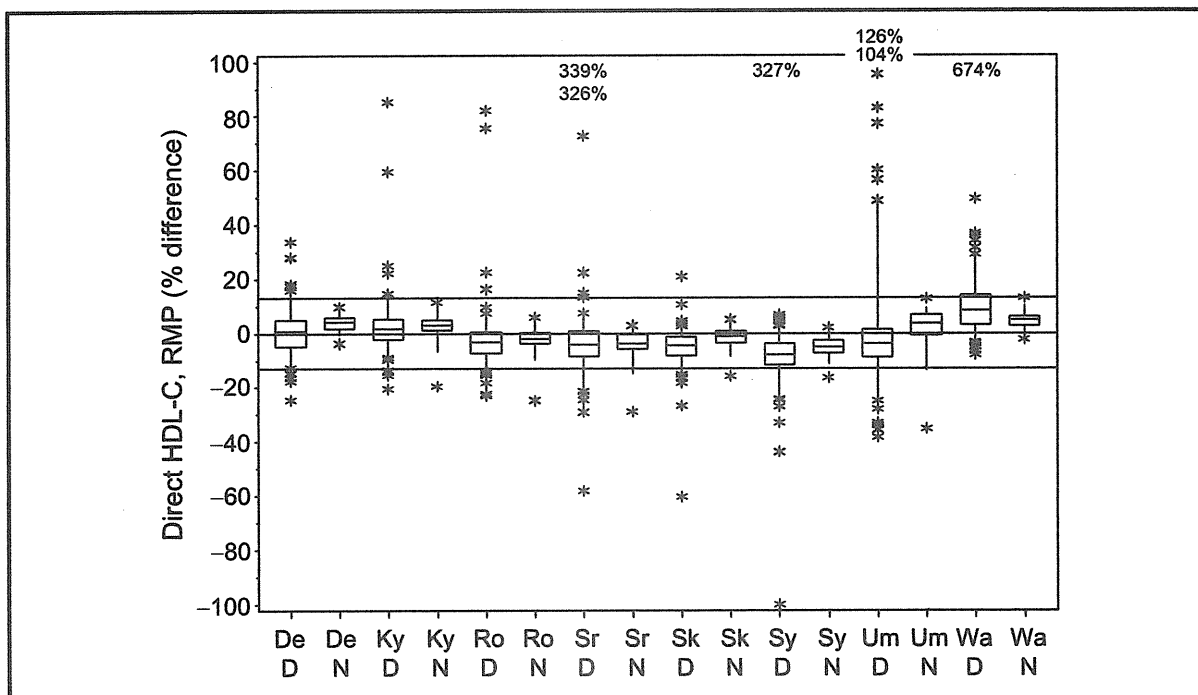


Fig. 1. Box-and-whisker plot of the differences in percentage between the direct and RMP results for HDL-C for each direct method (D, diseased group; N, nondiseased group; De, Denka; Ky, Kyowa; Ro, Roche; Sr, Serotek; Sk, Sekisui; Sy, Sysmex; Um, UMA; and Wa, Wako).

The median is the center line, the ends of the box represent 25th and 75th percentiles, the end of the lines extend to the 10th and 90th percentiles, and individual results are shown beyond the lines.

TOTAL ERROR FOR SINGLE MEASUREMENTS

The total error for a single measurement was based on the first result (no replication) for each sample. The percentage of results (without exclusions) for each method that were within the NCEP total error goals are shown in Table 1. For nondiseased individuals, most of the HDL-C methods reached the 95% acceptance criterion (3), and only the Serotec and UMA methods did not meet this criterion. The performance of all the HDL-C methods considerably deteriorated for the samples from the diseased group. Only the Roche and Sekisui methods for HDL-C met the total error goals for the diseased study patients. In general, the performance of the LDL-C methods was not as good as the HDL-C methods for both the diseased and nondiseased samples, with 4 of the LDL-C methods not meeting the criterion for the nondiseased individuals and all the methods failing for the diseased individuals. For the Serotec LDL-C method, only slightly more than half the results for the diseased study participants were within the NCEP total error goal.

ERROR SOURCES CONTRIBUTING TO TOTAL ERROR

Table 2 shows the contribution of different major sources of error for the nondiseased and diseased

groups. Note that some markedly discordant results, frequently from the same individuals, were excluded as outliers for the error component analysis to avoid any disproportionate influence on mean bias or CV attributable to patient sample specific effects (CV_d ; see online Supplemental Data for details). Thus, the error components listed in Table 2 may be underestimated in some cases.

For the nondiseased group, 6 of 8 HDL-C methods met the NCEP total error goal of $\leq 13\%$. The Serotec method and the UMA method, however, minimally exceeded this limit, primarily owing to increased imprecision from sample-specific effects (CV_d). In contrast, all of the HDL-C methods exceeded the total error goal for the diseased individuals, sometimes by substantial amounts. Most of the excess error was attributable to sample-specific effects (CV_d), most likely due to inadequate specificity for the HDL-C lipoprotein class, but several of the methods also exceeded the recommended mean bias of $\leq 5\%$.

For the LDL-C methods, 5 of 8 met the NCEP total error goal of $\leq 12\%$ for the nondiseased group. The Denka, Roche, and Sysmex methods minimally exceeded the total error goal owing to a combination of imprecision and bias. All LDL-C methods substantially

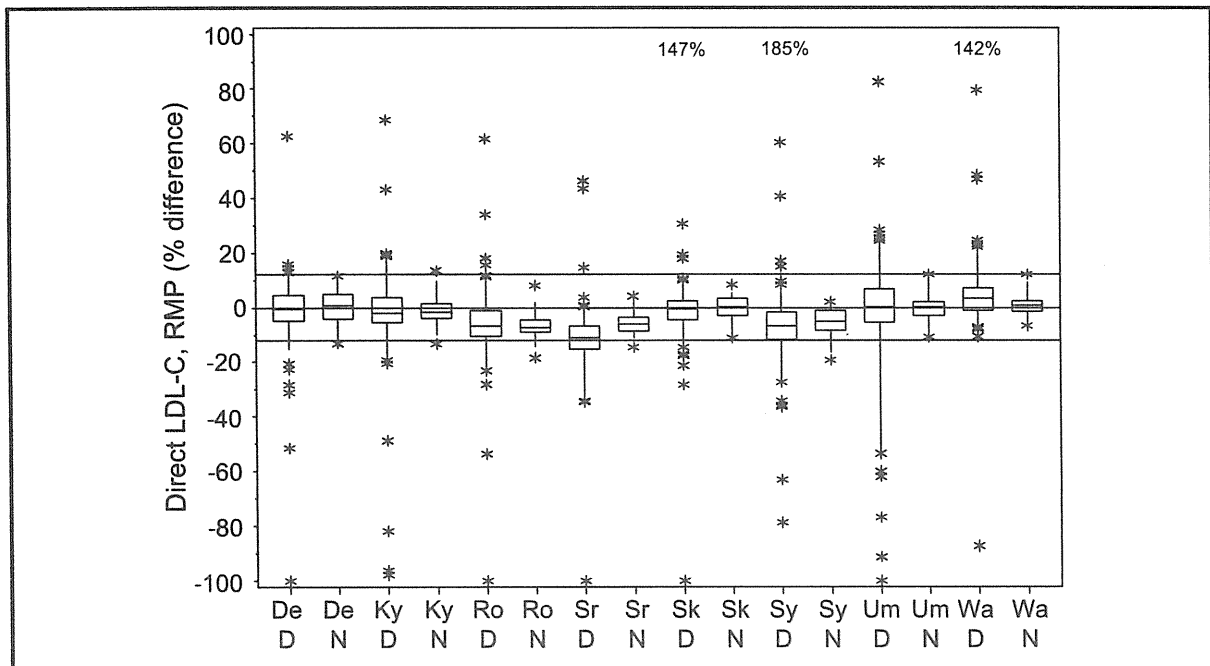


Fig. 2. Box-and-whisker plot of the differences in percentage between the direct and RMP results for LDL-C for each direct method (abbreviations as defined in the Fig. 1 legend).

The median is the center line, the ends of the box represent 25th and 75th percentiles, the end of the lines extend to the 10th and 90th percentiles, and individual results are shown beyond the lines.

exceeded the total error goal for the diseased individuals, primarily because of sample-specific effects (CV_d). Three of the LDL-C methods showed a negative mean bias exceeding the goal of $\leq 4\%$ for both the nondiseased and diseased groups.

SPECIFICITY ISSUES FOR CLASSES OF INTERFERING SUBSTANCES
To investigate an association between triglyceride concentrations and discordant results, all results were combined and grouped into triglyceride tertiles (Figs. 3 and 4). Five of 8 HDL-C methods were found to have a

Table 1. Percentage of results within the NCEP total error (TE) requirements for a single measurement of each patient's serum.^a

Method	%HDL-C results within TE requirement, ^b nondiseased	%HDL-C results within TE requirement, diseased	%LDL-C results within TE requirement, ^c nondiseased	%LDL-C results within TE requirement, diseased
Denka	100	92.7	89.2	85.2
Kyowa	97.3	94.2	94.6	85.9
Roche (Kyowa)	97.3	95.6	91.9	77.0
Sekisui	100	96.4	100	91.1
Serotec	94.6	86.9	97.3	53.3
Sysmex	100	89.8	86.5	71.9
UMA	91.9	83.9	97.3	75.6
Wako	100	74.5	97.3	87.4

^a Determined from the first result (not the mean of triplicate measurements) for each study participant. No study participants were excluded.
^b Total error criteria for HDL-C are: 95% of results $\leq 13\%$ (with desirable imprecision $\leq 4\%$ and bias $\leq 5\%$) when HDL-C is ≥ 1.09 mmol/L (≥ 42 mg/dL), and, when HDL-C is < 1.09 mmol/L (< 42 mg/dL), within a percentage determined by using a fixed 0.044 mmol/L (1.7 mg/dL) SD in the equation: 5% bias + [(1.96 \times 0.044 mmol/L \times 100)/concentration (in mmol/L)].
^c Total error criteria for LDL-C are: 95% of results $\leq 12\%$ (with desirable imprecision $\leq 4\%$ and bias $\leq 4\%$).

Table 2. Error components^a for direct HDL-C and LDL-C methods.

Method	CV _{br} , %, interassay, frozen pools	CV _{er} , %, intraassay, patient samples	CV _{dr} , %, patient sample-specific effects	CV _{totr} , %, combined random effects of CV _{br} , CV _{er} , and CV _{dr}	Mean bias, %	TE, %, for greater of positive or negative limit
HDL-C, nondiseased group						
Denka	1.4	1.2	2.3	2.9	4.0	10.4
Kyowa	0.9	0.9	3.5	3.7	2.5	10.4
Roche	1.4	1.4	3.8	4.3	-2.4	-10.4
Sekisui	0.9	1.1	3.1	3.4	-1.7	-8.2
Serotec	1.9	1.2	4.2	4.8	-4.8	-13.4
Sysmex	2.3	1.0	1.8	3.1	-5.4	-10.9
UMA	1.1	1.2	5.8	6.0	0.7	13.6
Wako	1.7	1.3	1.4	2.6	4.8	10.5
HDL-C, diseased group^b						
Denka		1.2	8.2	8.4	0.4	18.8
Kyowa		1.8	7.8	8.1	2.1	20.0
Roche		2.0	7.7	8.1	-3.1	-17.5
Sekisui		1.2	5.9	6.1	-5.2	-16.0
Serotec		1.7	8.6	9.0	-3.0	-18.9
Sysmex		1.6	6.1	6.7	-8.6	-19.8
UMA		1.9	16.3	16.4	-1.9	36.3
Wako		1.2	6.0	6.4	8.8	24.0
LDL-C, nondiseased group						
Denka	1.3	2.8	5.4	6.2	0.2	13.5
Kyowa	0.7	0.7	3.2	3.3	-1.1	-7.5
Roche	0.8	1.6	3.3	3.8	-6.8	-13.3
Sekisui	1.2	1.5	3.8	4.2	-0.7	-8.8
Serotec	2.9	1.4	0.0	3.2	-6.2	-11.9
Sysmex	2.3	0.7	3.4	4.2	-6.0	-13.3
UMA	2.2	0.9	1.2	2.6	-0.1	5.3
Wako	0.6	1.8	2.0	2.8	1.1	6.8
LDL-C, diseased group^c						
Denka		2.2	10.5	10.8	-1.5	22.3
Kyowa		1.1	9.6	9.7	-0.8	20.4
Roche		1.3	10.0	10.1	-6.3	-23.3
Sekisui		2.0	6.0	6.4	-1.7	-13.5
Serotec		1.3	9.0	9.5	-11.8	-26.6
Sysmex		0.9	10.8	11.1	-7.8	-25.9
UMA		1.5	13.8	14.1	-0.4	31.9
Wako		1.8	6.0	6.3	4.1	18.2

^a See online Supplemental Data for detailed explanation of error component terms, criteria for outlier exclusion, and calculation of total error from the estimated component contributions.

^b HDL-C, diseased group results excluded and difference value: sample 108, 0.99 mmol/L (38 mg/dL), from UMA (126%); sample 220, 0.66 mmol/L (25 mg/dL), from Serotec (-58%); sample 310, 0.1 mmol/L (4 mg/dL), from Sekisui (-60%), Serotec (339%), Sysmex (327%), Wako (674%); sample 348, 0.33 mmol/L (13 mg/dL), from Serotec (326%), Sysmex (-100%, <LOQ).

^c LDL-C, diseased group results excluded and difference value: sample 101, 2.95 mmol/L (114 mg/dL), from UMA (-60%); sample 102, 4.20 mmol/L (162 mg/dL), from UMA (-62%); sample 108, 4.44 mmol/L (172 mg/dL), from UMA (-77%); sample 145, 0.78 mmol/L (30 mg/dL), from Serotec (-100%, <LOQ); sample 178, 0.81 mmol/L (31 mg/dL), from Serotec (-100%, <LOQ); sample 220, 0.67 mmol/L (26 mg/dL), from Sysmex (-63%); sample 310, 2.56 mmol/L (99 mg/dL), from Kyowa (-98%), Roche (-100%, <LOQ), Serotec (-100%, <LOQ), Sysmex (-79%), UMA (-91%), Wako (-87%); sample 348, 0.60 mmol/L (23 mg/dL) and very lipemic, Kyowa (-96%), Roche (-100%, <LOQ), Sekisui (147%), Serotec (-100%, <LOQ), Sysmex (185%), UMA (-100%, <LOQ), Wako (142%); sample 349, 0.07 mmol/L (2.6 mg/dL), all methods.

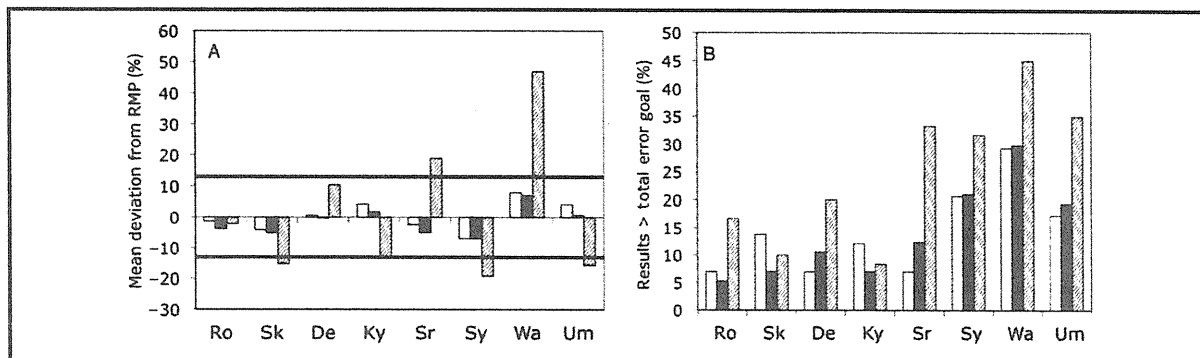


Fig. 3. Percentage mean deviation from RMP values (A) and the percentage of direct method HDL-C results greater than the NCEP total error goal (B) for samples grouped by tertiles of triglycerides (TG) concentrations (abbreviations as defined in the Fig. 1 legend).

Open bars TG <0.94 mmol/L (83 mg/dL); shaded bars TG 0.94 mmol/L (83 mg/dL) to 1.60 mmol/L (142 mg/dL); striped bars TG >1.60 mmol/L (142 mg/dL). The solid lines in (A) represent the total error goal as $\pm 13\%$ from the RMP. Note the total error goal becomes larger at HDL-C concentrations below 1.09 mmol/L (42 mg/dL) (see footnote in Table 1), and this criterion was used in the calculation for (B).

mean bias that exceeded the total error goal for the high triglyceride group. Increased triglycerides caused either a positive or negative bias, depending on the method. Furthermore, the frequency of discordant cases that exceeded the NCEP total error goal was usually smallest in the low or middle tertile and greatest in the high tertile. For LDL-C, higher triglycerides were associated with an increase in the direct LDL-C results compared to the RMP, except for the Serotec method, which had a mean negative bias exceeding the total error goal for the high tertile. For the low triglycerides tertile, 7 of 8 LDL-C methods showed a negative bias, with the Roche method exceeding the total error goal. No consistent pattern was observed for the fre-

quency of discordant LDL-C results with triglyceride concentration.

We also inspected the clinical information for all study participants whose samples had a result that differed from the RMPs by $\geq 20\%$ (see online Supplemental Tables S7 and S8). For HDL-C, all but 1 of 42 study participants came from the diseased group. All of these individuals except 3 had cardiovascular disease and/or a known dyslipidemia. All 40 study participants with discordant LDL-C results came from the diseased group and all except 2 had cardiovascular disease and/or dyslipidemia.

There were only a limited number of study participants with increased IgG (range 20.0–44.2 g/L, $n = 4$),

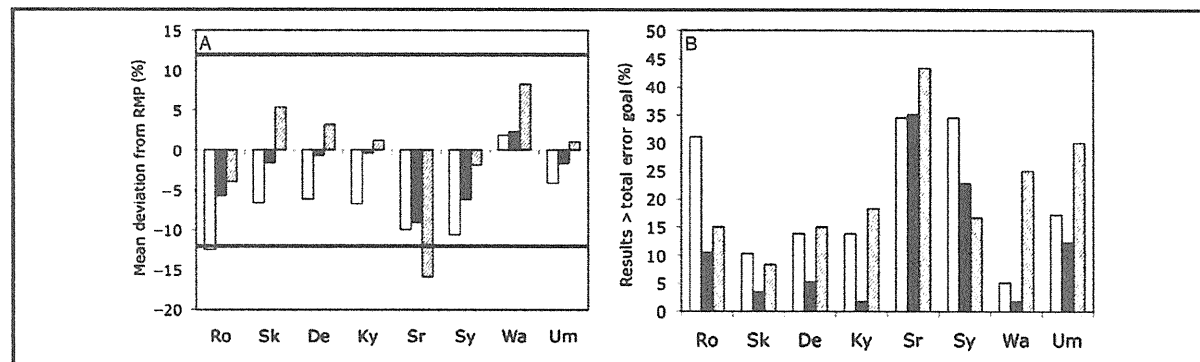


Fig. 4. Percentage mean deviation from RMP values (A) and the percentage of direct method LDL-C results greater than NCEP total error goal (B) for samples grouped by tertiles of triglyceride concentrations (abbreviations as defined in the Fig. 1 legend).

The solid lines in (A) represent the total error goal as $\pm 12\%$ from the RMP.