

分担研究報告書

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策政策研究事業)
non-HDL 等血中脂質評価指針及び脂質標準化システムの構築と基盤整備に関する研究

LDL コレステロールの基準分析法(Beta Quantification 法)の測定精度について

研究分担者 中村 雅一 国立循環器病研究センター予防健診部 脂質基準分析室 室長
研究分担者 西村 邦宏 国立循環器病研究センター予防医学・疫学情報部 室長
研究分担者 宮本 恵宏 国立循環器病研究センター予防健診部・研究開発基盤センター
予防医学疫学情報部 部長

研究要旨

脂質異常症の診断基準は、LDL コレステロール(LDL-C)が中心であることは疫学調査研究のみならず、治療エビデンスのメタ解析等からも明らかにされている。このことから、LDL-C の測定は重要な課題である。LDL-C の測定は超遠心法を含む複雑な測定系で構成されていることにより、日常分析には馴染まない。高い測定技術が要求されるので、どこの分析室でも容易に正確な測定結果が得られないなど、測定上の難題を抱えている。この難題を克服するための切り札として、1998 年頃から、わが国の試薬メーカーは血清と試薬を混合して反応させるという単純な操作で、自動分析装置を使い、10 分程度の短時間で LDL-C を直接的に測定する簡便法を次々と開発し、世界中の臨床検査で使われるようになった。米国は、LDL-C にもっとも関心の高い国である。このことを受けて、米国の Miller らは、わが国発の 8 つの LDL-C 直接法の試薬とキャリブレーターを使用して精密性と正確性を検討したが(1)、稀なりポ蛋白異常症が少なからず含まれており、日常臨床での LDL-C の直接法の性能評価には必ずしも適切ではなかった。その後、三井田らは、わが国の患者に適合できるような検体を選択して LDL-C の直接法の再評価を行っているが(2)、この研究では検体数の不足、トリグリセライドの濃度による影響、食後採血の問題など幾つかの課題を残した。本研究においては、これらの課題を克服するための研究が実施される。

LDL-C の正確な目標値を決定する基準分析法は、Beta Quantification(BQ)法とされている。分担研究者らの所属する国立循環器病研究センターの脂質基準分析室は、米国の Centers for Disease Control and Prevention(CDC)が主催している Cholesterol Reference Method Laboratory Network(CRMLN)に 1992 年から正式加盟しており、1997 年 5 月から今日まで 15 年間にわたり、継続して BQ 法の標準化を行ってきた。BQ 法は、これまでに大規模疫学共同研究や臨床試験等において、LDL-C の目標値を提供する役目を担ってきた。しかしながら、本法の測定精度の実態についての研究報告は極めて少ない。そこで、われわれはこの空白を埋める目的で、15 年間の標準化成績を集計し、論文化して Clinica Chimica Acta に投稿し、2014 年 02 月 22 日に受理された(3)。本分担研究報告書では、LDL-C の基準分析法である BQ 法の測定精度について記述する。

A. 研究目的

LDL-C の基準分析法は、Beta

Quantification(BQ)法とされている。国立循環器病研究センターの脂質基準分析室は、米国の

Centers for Disease Control and Prevention(CDC) が主催する Cholesterol Reference Method Laboratory Network(CRMLN)に参加している正式のメンバーである。このネットワークを通じて、1997年5月から今日まで15年間にわたり、継続してBQ法の標準化を行ってきた。BQ法は、これまでに大規模疫学共同研究や臨床試験等において、LDL-Cの目標値を提供する役目を担ってきた。しかしながら、本法の測定精度の実態についての論文や学会報告は極めて少ない。そこで、われわれは、BQ法の測定精度を明らかにする目的で、これまでの標準化成績を集計し、論文化した。分担研究報告書では、LDL-Cの基準分析法であるBQ法の測定精度を中心に述べる。

B. 研究方法

本研究班の1年目に当たる平成25年度内に行った研究課題とその主な内容は、以下のとおりである。

【脂質標準化システムの構築】

脂質標準化システムは、CDCが実施しているシステムとネットワーク分析室(国立循環器病研究センター)が実施しているシステムに大別することができ、いずれも試薬メーカーと臨床検査室を対象に運用中である。

【BQ法に対する最新の評価成績】

本研究班では約100人を対象に採血を実施して、HDLコレステロール(HDL-C)とLDL-Cの正確な測定値をBQ法で求める予定である。この測定に備えて、国立循環器病研究センターの脂質基準分析室ではBQ法の測定準備が完了している。2013年10月に実施されたCDCによるBQ法に対する最新の評価成績を、表1に示した。

【BQ法の基本的な測定精度について】

BQ法が初めて適用された疫学研究は、米国で実施されたLipid Research Clinics Programにおいてである。BQ法は、欧米やわが国の大規模疫学共同研究や臨床試験の場でLDL-Cの目標値として提供されてきた。文献調査をしたところ、BQ法が一体

どの程度の性能を発揮できるのかについて、学会報告や論文での発表が非常に少ないことが判明した。そこで、1997年05月から2012年10月までの15年間に測定された70回のサーベイで用いられた計280検体の分析において得られた標準化成績を集計して、論文化し、BQ法の基本性能を明らかにした。その研究結果を表2、表3、図1(A, B, C)、図2、及び、図3(D, E, F)に示した。

C. D. 研究結果と考察

【脂質標準化システムの構築】

CDCが実施しているシステム：試薬メーカーを対象とする脂質標準化システムは、CDCのweb site(<http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.html>)に掲載されている。その内容は、総コレステロールではTotal cholesterol certification protocol for manufacturers-revised-(October 2004)、HDLコレステロールではHDL cholesterol certification protocol for manufacturers (November 2002)、LDLコレステロールではLDL cholesterol certification protocol for manufacturers (June 2006)として公開されている。国立循環器病研究センターを通じて、試薬メーカーを対象とする標準化プログラムにより標準化を実施し、判定基準を満たした試薬メーカーの名称等は、CDCのweb siteにおいて総コレステロールではAnalytical systems certified for total cholesterol、HDLコレステロールではAnalytical systems certified for HDL cholesterol、LDLコレステロールではAnalytical systems certified for LDL cholesterolとして公表されている。次に、臨床検査室を対象とする脂質標準化システムは、総コレステロールのみであり、その内容はCertification protocol for clinical laboratories (May 2004)で公開されている。国立循環器病研究センターを通じて、臨床検査室を対象とする標準化プログラムにより標準化を実施し、判定基準を満たしたわが国の臨床検査室の名称等は、List of international clinical laboratories certified for total cholesterolとしてCDCで公表されている。

国立循環器病研究センターが実施しているシステム：試薬メーカーを対象とする脂質の標準化は、CDCのプログラムと同じものが適用されている。次に、臨床検査室を対象とする脂質標準化シ

システムは、総コレステロールでは CDC と同じプログラムが適用されているが、HDL コレステロール、LDL コレステロール、及び、トリグリセライドは、国立循環器病研究センターで独自に開発されたプログラムが運用されており、それらは同センターの web site で公表されている。HDL コレステロールでは臨床検査室を対象とした HDL コレステロールの標準化プログラム(2012年06月)として、LDL コレステロールでは臨床検査室を対象とした LDL コレステロールの標準化プログラム(2012年06月)として、トリグリセライドでは臨床検査室を対象としたトリグリセライド(中性脂肪)の標準化プログラム(2012年06月)として公開されている。中でも、トリグリセライドの標準化は、わが国では最初のプログラムであり、その目標値は CDC に標準化されたがスマートグラフアウトプット・希釈・質量分析計で求められている点に特徴がある。

【BQ 法に対する最新の評価成績】

BQ 法は、バックグラウンド 1.006 の比重下で超遠心後に上清に浮上するカイロミクロンと VLDL をチューブスライサーで除去し、下層部分を Bottom fraction(BF)と称する。BF 中のコレステロールを BFC、BF 中の HDL をヘパリンマンガン分離法で分離・測定したコレステロールを HDL-C と見なす。LDL-C 値は、 $LDL-C=BFC-HDL-C$ として求められる。2013 年 10 月の評価成績(表 1)によれば、国立循環器病研究センターの BFC の 3 濃度の検体の精密度(CV)は 0.33%、正確度を示す平均値は CDC に対して -0.10mg/dL を示し、同様に HDL-C では精密度(CV)が 0.74%、正確度は 0.05mg/dL 、LDL-C では精密度(CV)が 0.27%、正確度は -0.29mg/dL を示した。これらの評価成績は、いずれも基準分析室に課される判定基準(表 2)を満たす。以上の成績から、国立循環器病研究センターの脂質基準分析室は BQ 法の標準化状態にあると判断され、本研究班における測定準備態勢が完了している。

【BQ 法の基本的な測定精度について】

国立循環器病研究センター(以下、国循)における過去 15 年間の測定精度を、表 3 に示した。CDC(x)と国循(y)の相関関係は、BFC では $y=0.988x+1.794(R^2=0.997)$ 、HDL-C では $y=0.980x+1.118(R^2=0.994)$ 、LDL-C では $y=0.987x+1.200(R^2=0.997)$ を示し、両者間に高い相関性が認められた。

国循で得られた 3 要素(BFC, HDL-C, LDL-C)の

測定成績を表 2 の判定基準に基づいて判定した場合の合格率は、精密度では BFC で 280 検体中の 267 で 95.4%、HDL-C で 280 検体中の 267 で同じく 95.4%、LDL-C で 280 検体中の 257 で 91.8%を示し、一方、正確度では同様に 91.4%、94.6%、89.6%であった。

1997 年 05 月から 2012 年 10 月までの 15 年間に測定された 70 回のサーベイで用いられた計 280 検体の分析において、各サーベイ毎に検体の正確性を CDC に対する%バイアスで図 2 に示した。それによれば、測定開始当初と比較したとき、国循の LDL-C 値は次第に低値を示す傾向が認められたが、測定結果に大きな影響を与えるものではなかった。

CDC の目標値に対する国循のバイアスの大きさを 3 要素(BFC, HDL-C, LDL-C)別に図 1 の A, B, C に示した。図 1A は、 122.3mg/dL から 223.7mg/dL の濃度域における BFC のバイアスの分布図である。x 軸には CDC の目標値を、y 軸には CDC との差の大きさを濃度(mg/dL)で示した。その結果、 $Y=-0.012x+1.759(R^2=0.042, p\text{ value}=0.001)$ であった。X の係数の p value と 95%信頼限界はそれぞれ 0.001 と $(-0.019, -0.005)$ であり、y 切片の p value と 95%信頼限界はそれぞれ 0.004 と $(0.551, 2.968)$ であった。図 1B は、 27.0mg/dL から 72.4mg/dL の濃度域における HDL-C のバイアスの分布図である。x 軸には CDC の目標値を、y 軸には CDC との差の大きさを濃度(mg/dL)で示した。その結果、 $Y=-0.020x+1.112(R^2=0.063, p\text{ value}<0.001)$ であった。X の係数の p value と 95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と $(-0.029, -0.011)$ であり、y 切片の p value と 95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と $(0.671, 1.553)$ であった。図 1C は、 71.5mg/dL から 173.3mg/dL の濃度域における LDL-C のバイアスの分布図である。x 軸には CDC の目標値を、y 軸には CDC との差の大きさを濃度(mg/dL)で示した。その結果、 $Y=-0.013x+1.186(R^2=0.059, p\text{ value}<0.001)$ であった。X の係数の p value と 95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と $(-0.020, -0.007)$ であり、y 切片の p value と 95%信頼限界はそれぞれ 0.004 と $(0.376, 1.996)$ であった。以上の成績から、CDC とのバイアスで見ると標準化は順調に進展した。

BQ 法における 3 要素(BFC, HDL-C, LDL-C)別に、BFC(x 軸)と LDL-C(y 軸)の関係を図 3 の D に、

BFC(x軸)とHDL-C(y軸)の関係を図3のEに、また、LDL-C(x軸)とHDL-C(y軸)の関係を図3のFに示した。図3Dは、 $y=1.088x-0.208$ ($R^2=0.652$, p value <0.001)であった。Xの係数のp valueと95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と(0.994, 1.182)であり、y切片のp valueと95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と(-0.289, -0.128)であった。図3Eは、 $y=0.480x+0.513$ ($R^2=0.057$, p value <0.001)であった。Xの係数のp valueと95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と(0.250, 0.711)であり、y切片のp valueと95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と(0.316, 0.710)であった。また、図3Fは、 $y=-0.441x+0.299$ ($R^2=0.087$, p value <0.001)であった。Xの係数のp valueと95%信頼限界はそれぞれ <0.001 と(-0.609, -0.273)であり、y切片のp valueと95%信頼限界はそれぞれ0.004と(0.098, 0.499)であった。以上の結果から、BQ法の3要素の中では、BFの分離、すなわち超遠心の技術が最も重要であり、LDL-C値の正確性に与える影響が大きいことが明らかとなった。一方、BFCとHDL-Cの関係では相関係数はプラスに、また、LDL-CとHDL-Cの関係では相関係数はマイナスの傾向が認められるが、いずれもLDL-Cの正確性に与える影響は大きくはなかったことが明らかとなった。

E. 結論

CDCにおける15年間の標準化成績を解析することにより、LDL-Cの基準分析法であるBQ法(Beta quantification)の測定精度を明らかにした。この研究成果を活用して本研究班における検体の分析を担当する。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 論文発表

(1) Nakamura M, et al. Revised system to evaluate measurement of blood chemistry data from the Japanese National Health and

Nutrition Survey and Prefectural Health and Nutrition Surveys. J Epidemiol. 23 ; 28-34,2013

(2) Nagai Y, et al. Rationale, design, and baseline features of a randomized controlled trial to assess the effects of statin for the secondary prevention of stroke: the Japan Statin Treatment Against Recurrent Stroke (J-STARS). International J of Stroke 9(2);232-239,2014

(3) Oliveira MJ, et al. Evaluation of four different equations for calculating LDL-C with eight different direct HDL-C assays. Clin Chim Acta 21(2);135-40,2013

(4) Yokoyama S, et al. High-density lipoprotein levels have markedly increased over the past twenty years in Japan. J Atheroscler Thromb21(2);151-60,2013

(5) Miida T, et al. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. Atherosclerosis 233(1);235-9,2014

(6) Nakamura M, Kayamori Y, Iso H, et al. LDL cholesterol performance of beta quantification reference measurement procedure. Clinica Chimica Acta 2014, available online.

* 下線論文は主要論文なので、「研究成果の刊行に関する一覧表」に掲載する。

H. 知的所有権の出願・登録 なし

表 1 BQ 法に対する最新の評価成績

Osaka 1013 (October 2013) LDL cholesterol survey

Bottom Fraction

Sample ID	BF		BF		%CV	% Bias vs CDC	Absolute % Bias	Bias vs CDC	Bias Limit Range	
	CDC RV	S.D.	Osaka mean	S.D.						
BQ47	163.18	2.07	163.51	0.52	0.32	0.20	0.20	0.33	-2.12	1.85
BQ55	184.38	2.25	184.39	0.56	0.31	0.00	0.00	0.00	-2.40	2.74
BQ57	209.33	1.79	208.69	0.75	0.36	-0.31	0.31	-0.64	-3.03	3.28
Mean =				0.61	0.33	-0.03	0.17	-0.10		

HDL Cholesterol

Sample ID	HDLC		HDLC		%CV	% Bias vs CDC	Absolute % Bias	Bias vs CDC	Bias Limit Range*		Bias (4% RV) Limit Range*	
	CDC RV	S.D.	Osaka mean	S.D.								
BQ47	64.51	1.05	64.38	0.52	0.80	-0.21	0.21	-0.14	-2.00	2.00	-2.58	2.58
BQ55	55.84	1.07	56.01	0.62	1.10	0.31	0.31	0.17	-2.00	2.00	-2.23	2.23
BQ57	51.60	1.83	51.73	0.16	0.31	0.24	0.24	0.13	-2.00	2.00	-2.06	2.06
Mean =				0.43	0.74	0.11	0.25	0.05				

LDL Cholesterol

Sample ID	LDLC		LDLC		%CV	% Bias vs CDC	Absolute % Bias	Bias vs CDC	Bias Limit Range	
	CDC RV	S.D.	Osaka mean	S.D.						
BQ47	99.06	2.16	99.14	0.20	0.20	0.08	0.08	0.08	-1.98	1.98
BQ55	128.55	2.20	128.38	0.19	0.15	-0.14	0.14	-0.18	-2.57	2.57
BQ57	157.73	1.73	156.96	0.72	0.46	-0.49	0.49	-0.77	-3.15	3.15
Mean =				0.37	0.27	-0.18	0.23	-0.29		

Shaded rows indicate cases where results exceed Proposal A criteria

Bold numbers indicate cases where results exceed Proposal B criteria

HDLC Bias Limit Range* - Use the HDLC limit range that is smaller

表 2 CRMLN 脂質基準分析室に要求される判定基準

Lipid	Precision	Accuracy
BFC	CV ≤ 1.5 %	± (CDC LDL-C reference value x 0.02 + HDL-C bias vs. CDC) [max = ± 2 mg/dL or 0.04 (HDL-C reference value) if smaller]
HDL-C	SD ≤ 1 mg/dL	± CDC HDL-C reference value x 0.04
LDL-C	CV ≤ 1.5 %	± CDC LDL-C reference value x 0.02

CRMLN: Cholesterol Reference Method Laboratory Network. BQ RMP: Beta quantification reference measurement procedure.

CDC: US Centers for Disease Control and Prevention. SD: Standard deviation. CV: Coefficient of variation.

BFC: Bottom fraction cholesterol. HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol. LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol.

表3 国立循環器病研究センターの測定精度

Statistical item	BFC	HDL-C	LDL-C
Mean precision as %CV (SD)	0.60 (0.342)	1.01 (0.605)	0.85 (0.461)
Mean bias as % (SD)	-0.12 (0.853)	0.45 (1.708)	-0.34 (1.148)
Pass rate for imprecision (N)	95.4% (267)	95.4% (267)	91.8% (257)
Pass rate for bias (N)	91.4% (256)	94.6% (256)	89.6% (251)
Absolute bias (%)	0.63 ± 0.589	1.23 ± 1.270	0.86 ± 0.830
Bias in mg/dL (95%CI)	0.34 (0.14, 0.53)	-0.16 (-0.26, -0.07)	0.49 (0.32, 0.66)
Limits of agreement in mg/dL	-2.87 - 3.54	-1.76 - 1.43	0.31 - 0.66
Slope (95%CI)	0.988 (0.981, 0.995)	0.980 (0.971, 0.989)	0.987 (0.980, 0.993)
Intercept (95%CI)	1.794 (0.581, 3.006)	1.118 (0.676, 1.560)	1.200 (0.388, 2.011)
Correlation coefficient as R ²	0.997	0.994	0.997

CRMLN: Cholesterol Reference Method Laboratory Network.

SD: Standard deviation. CI: Confidence interval. N: Number.

BFC: Bottom fraction cholesterol. HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol. LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol.

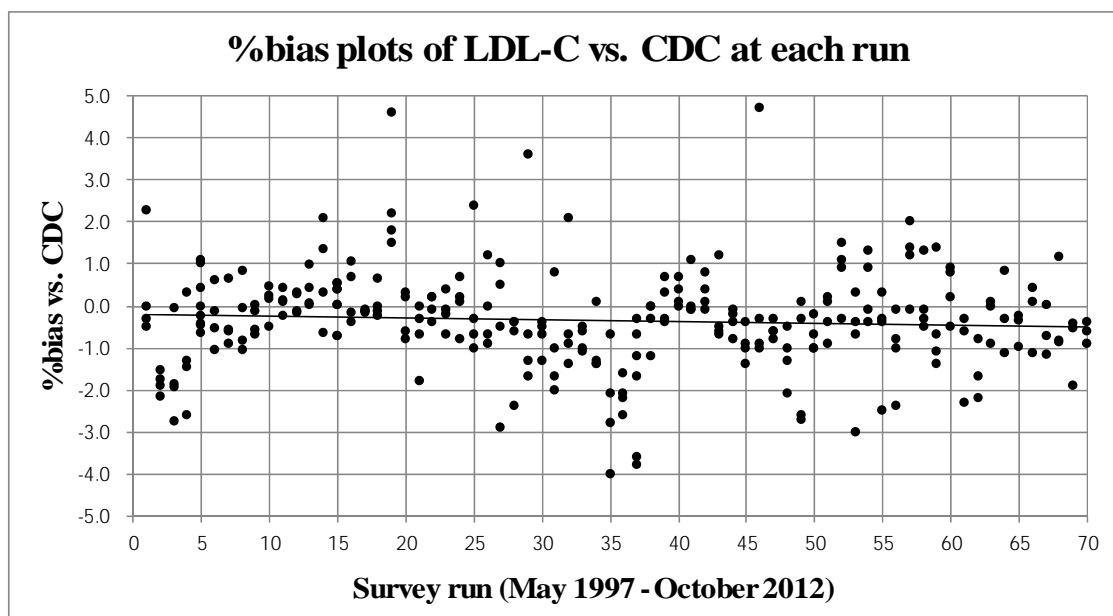
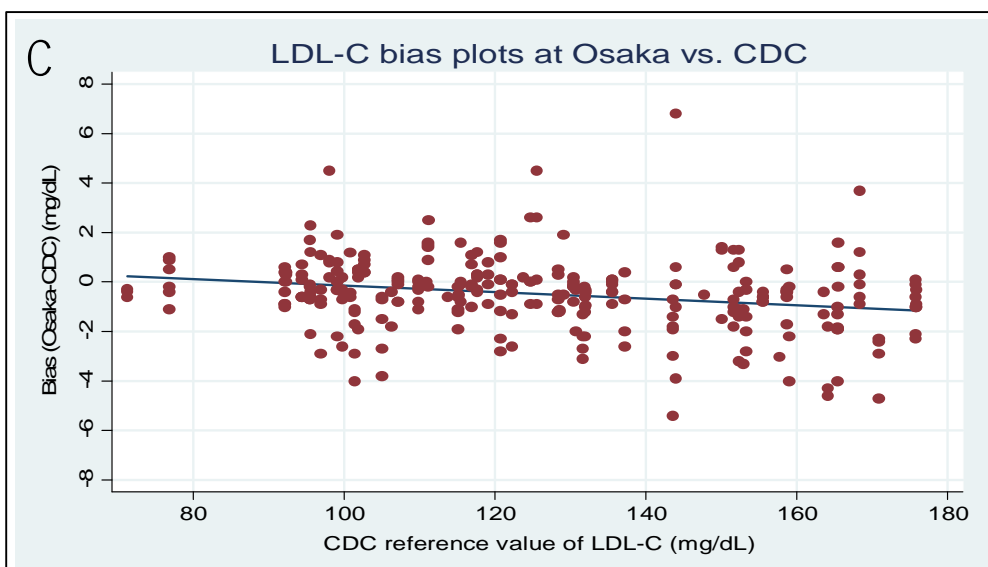
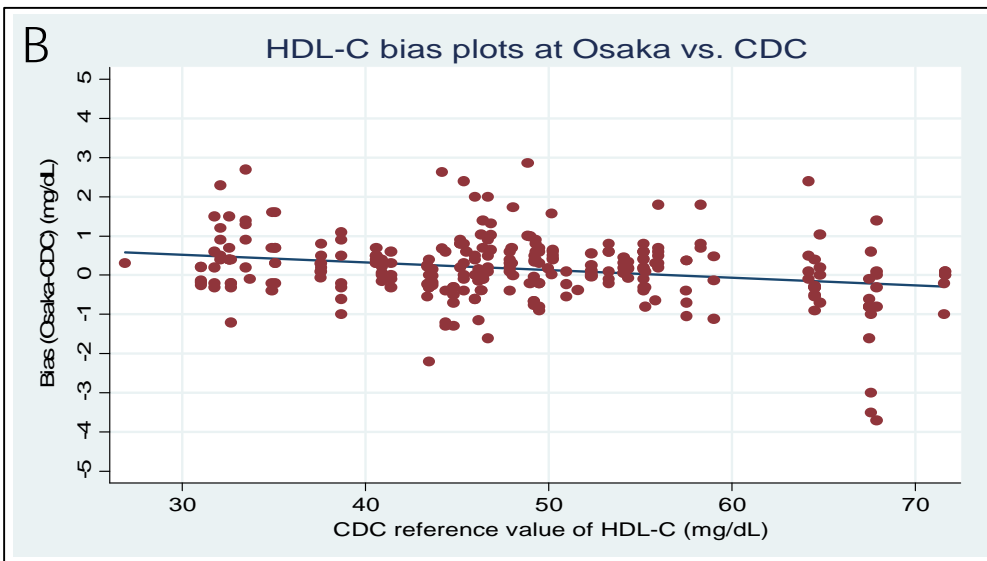
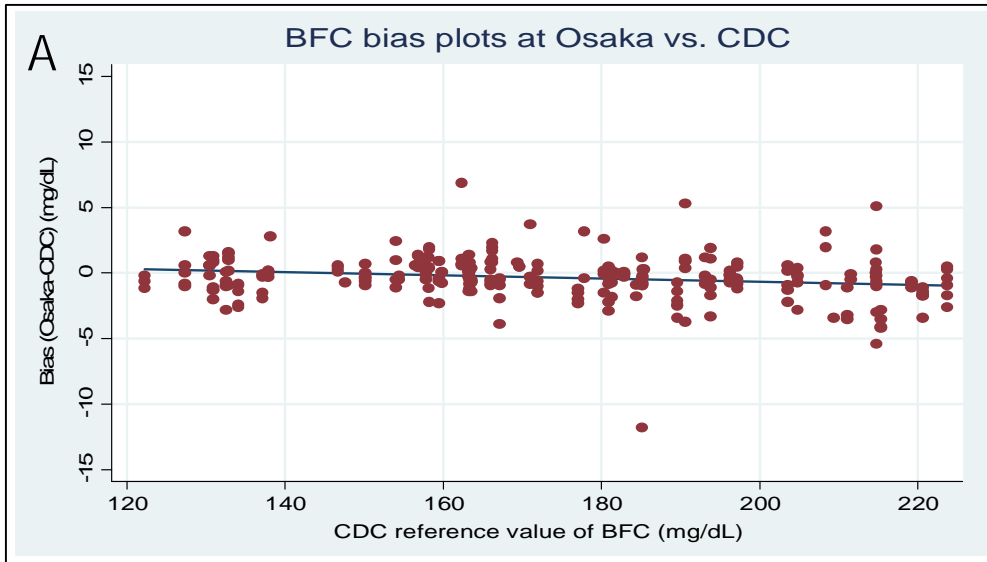


図 2. 1997年5月から2012年12月の期間におけるバイアスの変動



☒ 1 BFC, HDL-C, LDL-Cのバイアスの分布状況

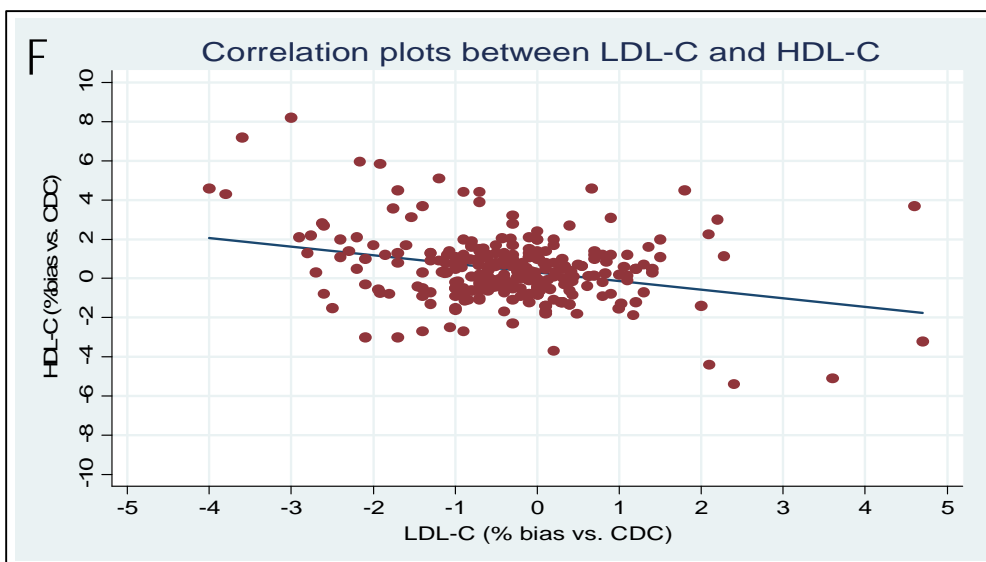
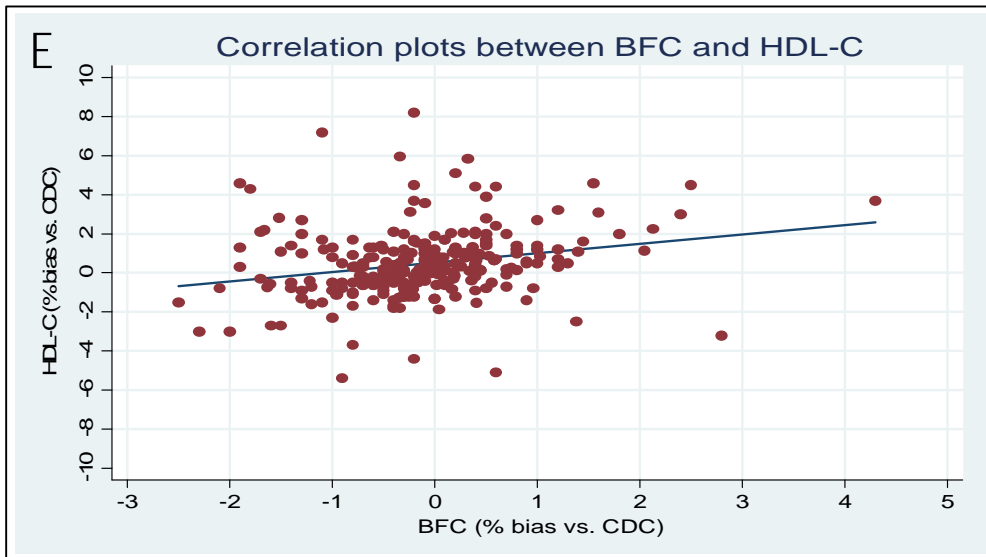
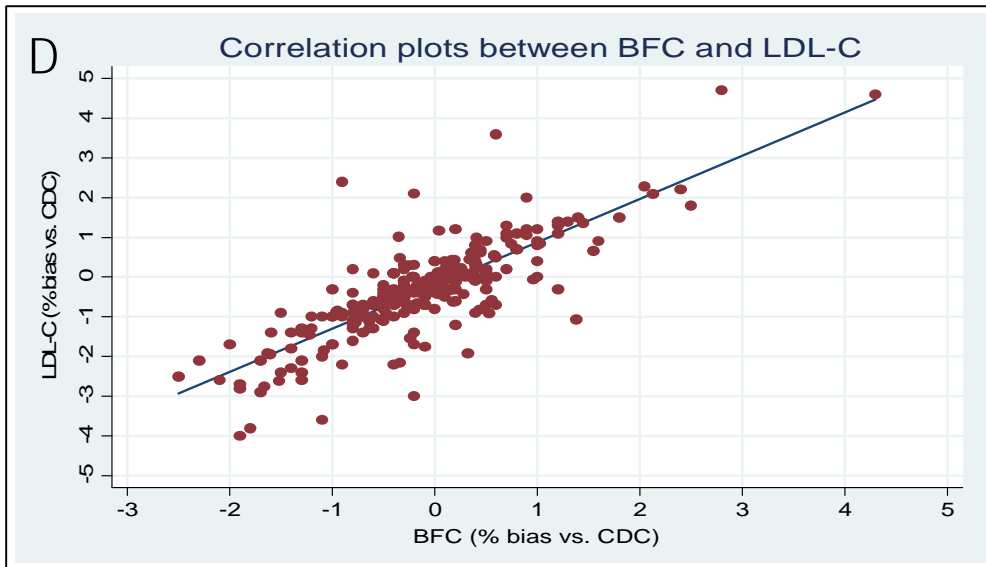


図 3. BFCとLDL-C、BFCとHDL-C、及び、LDL-CとHDL-Cの関係を示す相関図