

分担研究報告書

平成 26 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

HDL コレステロールの基準分析法(Ultracentrifugation 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循環器病統合情報センター統計解析室 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・循環器病統合情報センター 部長

研究要旨

脂質異常症の診断基準の適用に際しては、先ず第一に、LDL コレステロール(LDL-C)、あるいは、non-HDL-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つつある。HDL コレステロール(HDL-C)の低値は冠動脈疾患の発症リスクとなり、逆に高いほどリスクが減少するとされることから、HDL-C 値を正確に測定することは診断基準の運用に際して重要である。HDL-C の基準分析法は、CDC を始め、多くの疫学・臨床分野の研究機関が採用してきた超遠心法(Ultracentrifugation 法)とされる。超遠心法は超遠心機や超遠心用のチューブの操作技術を含め高度な技術が要求されることから、日常分析には馴染まない上に、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、測定上の課題は少なくない。この課題を克服するための実用的な臨床検査法として、1997 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、8 分程度の短時間で HDL-C を測定する簡便な直接法を次々と開発し、その後、世界中の臨床検査室で使われるようになった。特に心疾患の克服を国家的課題とする米国は、LDL-C と共に、HDL-C にも関心の高い国である。このような背景の元に、米国の Miller らは、わが国で開発された 8 社の HDL-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)、検体の中には稀なり蛋白異常症が少なからず含まれており、米国の評価成績をわが国の日常臨床の場にそのまま適用することは、必ずしも適切ではなかった。その後、三井田らは、わが国の患者を代表するような検体を選択して HDL-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直接法への影響、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為の追加研究が実施され、あらためて直接法の再評価がされる。

HDL-C の正確な目標値を確定する基準分析法は、Ultracentrifugation(UC)法とされる。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 17 年間にわたり、継続して UC 法の標準化を行ってきた。UC 法は、これまでに大規模疫学共同研究や国際的な臨床試験等において、HDL-C の目標値を提供する役割を担ってきた。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、最近 17 年間の CDC による標準化成績を集計し、論文化して Clinica Chimica Acta に投稿し、2014 年 10 月 28 日に受理された(3)。本分担研究報告書では、HDL-C の基準分析法である UC 法の測定精度について記述する。

A. 研究目的

HDL コレステロール(HDL-C)の基準分析法は、超遠心法(Ultracentrifugation 法、UC 法と略)とされる。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2014年1月までの17年間にわたり、継続してUC法の標準化を行ってきた。UC法は、これまでに大規模疫学共同研究や臨床試験等の場でHDL-Cの目標値を提供する役割を果たしてきた。UC法は、本研究においても適用される。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、UC法の測定精度を明らかにすることを目的として、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、HDL-Cの基準分析法であるUC法の測定精度を中心に述べる。

B. 研究方法

本研究班の2年目に当たる平成26年度内に行った研究課題とその主な内容は以下の通りである。

【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を構成する脂質基準分析室(例: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標準化が行われる。

【UC法の操作方法】

UC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超遠心法によるHDL-Cと見なす。本研究班では、この測定法によりHDL-Cの目標値を確定した。

C. 研究結果、及び、D. 考察

【脂質標準化システムの構築と内容】

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)として世界中に公開されている。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として公示されている。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が対象であり、その内容はCertification protocol for clinical laboratories (May 2004)で公開されている(4)。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で公示されている。

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内容が適用されている。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 に標準化されたガスクロマトグラフ・アイソトープ希釈・質量分析計で確定されている点に特徴がある。

【UC 法の 17 年間の測定精度のまとめ】

UC 法に対する最新の評価成績：本研究班では約 200 人を対象に採血を実施して、HDL-C の正確な測定値を UC 法で求める。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 UC 法の測定体制が常時整っている。2014 年 7 月に実施された CDC による UC 法に対する最新の評価成績を、表 1 に示した。

CDC のネットワーク(CRMLN)を構成する脂質基準分析室に適用される判定基準を、表 2 に示した。

1997 年 5 月から 2014 年 1 月までの 17 年間における UC 法の測定精度を正確度(Accuracy)と精密度(Precision)に 2 分して、表 3 に示した。それによれば、対象例数が 626 例の正確度の回帰式 ($y=Osaka, x=CDC$) で 見 る と 、

Slope=-0.008(95%CI: -0.013, -0.003; $p=0.001$)、Intercept=0.540(95%CI: 0.296, 0.784; $p<0.001$)で、 r -square=0.017 であった。正確度の分布図を図 1 に示した。一方、精密度の回帰式 ($y=Osaka, x=CDC$)で見ると、Slope=0.002(95%CI: -0.00005, 0.0036; $p=0.056$)、Intercept=0.270(95%CI: 0.179, 0.360; $p<0.001$)で、 r -square=0.006 であった。精密度の分布図を図 2 に示した。

臨床検査室と試薬メーカーに適用される HDL-C の判定基準を、表 4 に示した。この判定基準が、認証試験に適用される。

1997 年 5 月から 2014 年 1 月までの 17 年間における UC 法の分析経過を、図 3 に示した。

E. 結論

CDC における 17 年間の標準化成績を解析することにより、HDL-C の基準分析法である超遠心法(Ultracentrifugation 法)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 HDL-C の目標値を確定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. Clin Chem 2010;56:977-986.

(2) Miida T, Nishimura K, Okamura T, et al. Validation of homogeneous assays for

HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2014;233:253-259.

(3) Nakamura M, Yokoyama S, Kayamori Y, et al. HDL cholesterol performance using an ultracentrifugation reference measurement procedure and the designated comparison method. *Clin Chim Acta* 2015;439:185-190.

(4) Nakamura M, Iso H, Kitamura A, et al. Total cholesterol performance of Abell-Levy-Brodie-Kendall reference measurement procedure: Certification of Japanese in-vitro diagnostic assay manufacturers through CDC's Cholesterol Reference Method Laboratory Network. *Clin Chim Acta*に投稿中

2. 学会発表

なし

H. 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

3. その他

なし

表1 Network survey PS0714 - HDL-C

Pool ID	CDC目標値	大阪測定値	S.D.	Bias (mg/dL)
172	50.6	50.8	0.3	0.2
152	32.6	33.0	0.9	0.4
371	50.9	50.6	0.1	-0.3

単位: mg/dL

表2 Performance criteria applied to CRMLN lipid reference laboratory using ultracentrifugation method

Lipid	Imprecision criterion	Accuracy criterion
HDL-C	Standard deviation \leq 1 mg/dL	bias \leq 1 mg/dL

CRMLN: Cholesterol Reference Method Laboratory Network.

HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol.

表3 Regression analysis of the bias between Osaka (y) and CDC (x) and imprecision for HDL-C over time (unit: mg/dL)

Parameter	HDL-C Method	Number of samples	Slope (95% CI)	Intercept (95% CI)	R ²	Time period
Accuracy	UC	626	-0.008 (-0.013, -0.003) p=0.001	0.540 (0.296, 0.784) p<0.001	0.017	May 1997 to January 2014 (17 years)
Precision	UC	626	0.002 (-0.00005, 0.0036) p=0.056	0.270 (0.179, 0.360) p<0.001	0.006	May 1997 to January 2014 (17 years)

UC: Ultracentrifugation.

HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol.

CV: Coefficient of variation. CI: Confidence interval.

表4 Performance criteria applied to clinical laboratory and manufacturer for HDL-C

Parameter	Criterion
R ²	> 0.975
Bias at 40 mg/dL	\leq 5 %
Bias at 60 mg/dL	\leq 5 %
Average % Bias	\leq 5 %
Average absolute % Bias	\leq 5 %
Among-run CV	\leq 4 %
t-test of bias	Not significant at $\alpha=5\%$
Within-method outliers	1 allowed
Between-method outliers	None allowed, but may eliminate one sample

HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol. CV: Coefficient of variation.

CV: Coefficient of variation.

