

特集：HDL を再考する

HDL を分析する

1. 臨床検査における HDL コレステロールとは？

中村 雅一*

Nakamura Masakazu

* 大阪府立健康科学センター脂質基準分析室/US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network

臨床検査の場において、HDL コレステロールはどの程度の測定精度（精密度、正確度）で分析されているのだろうか？臨床検査の精度管理状況を示す各種のサーベイでは、その実態は明確にはみえてこない。そこで、メタボリック健診対策に焦点を当て、臨床検査室に試薬を供給する側である試薬メーカーの測定精度を明らかにするために、CDC/CRMLN による認証試験（標準化）を実施した。試薬メーカーに対する標準化を通じて、現時点の問題点を掘り起こしてみた。

KEY WORDS

- CDC
- CRMLN
- 標準化
- 精密度
- 正確度

○ はじめに

長年の疫学研究と臨床試験は、心・血管系疾患の発症に関与する危険因子としての HDL コレステロール (HDL-C) の重要性を明らかにしてきた。

1999 年以降、HDL-C はほとんどすべての健康診断の場で測定が義務付けられるようになり、2008 年 4 月からは厚生労働省による「標準的な健診・保健指導プログラム」(メタボリック健診)において必須項目となった。

それでは、HDL-C は、どれくらい再現性よく、しかも正確に測定されているのだろうか？問われているのは、直接法 (Homogeneous method) の信頼性の指標となる精密度と正確度である。2008 年 3 月、メタボリック健診対策として試薬メーカーを対象とした CDC/

CRMLN による認証試験（標準化）を実施した。その結果は、最新の測定精度の実態を明確に物語る。認証試験から何が読めるのだろうか？^{1)~4)}

○ HDL コレステロールの直接法の開発

今から 15 年ほど前までの HDL-C の定量分析では、測定の前処理作業としてヘパリン-Mn 法やデキストラン硫酸-Mg 法などによる HDL の沈殿分離操作は避けられなかった。それだけに、前処理不要の完全自動化日常臨床検査法が登場するやいなや、燎原の火のごとく広がった。現在、わが国の 7 社〔北から順に、株セロテック、デンカ生研(株)、積水メディカル(株)(旧、第一化学(株))、協和メデックス(株)、(株)ユーエムエー、和光純薬(株)、シス

HDL を分析する 1. 臨床検査における HDL コレステロールとは？

メックス(株)（旧、国際試薬(株)）によって試薬・校正用標準物質(キャリブレーター)・検量線確認用物質・精度管理用物質が市販されている。今や、直接法の試薬は、LDL-Cを含め、わが国の独壇場である。

HDL-Cの直接法の試薬が世界ではじめて登場したのは、1994年に発売された国際試薬(当時)の4試薬系であった。1995年、熊本大学(当時)のSugiuchiら⁵⁾が世界ではじめてHDL-Cの直接法による試薬の開発の可能性を示す実験結果をClinical Chemistryに論文発表した。その発表を待つ間も惜しく、1994年12月に協和メデックス(株)が発売した2試薬系が市場に出るや、たちまちの内に世界中に波及し、沈殿分離法はあっという間に過去のものになった。その後、各試薬メーカーは、それぞれに特徴的な測定原理を背景にした完全自動化法の2試薬系を次々と市場に送り出し、少しづつ改良が加えられて今日に及んでいる。試薬の開発から製品化に至る10年間を、筆者は「第一ステージ」とよんでいる。

○ CDC/CRMLNによる認証試験(標準化)の概略

試薬メーカーを対象としたCDC/CRMLNのHDL-Cの標準化プロトコル(HDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers, November 2002)による実施概要(<http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.htm>)を記す。

1. 目標値を確定する比較対照法(DCM)：検体をデキストラノ硫酸-Mg法で分離し、上清中のHDL-CをAbell-Kendall法で定量して目標値とする。DCMは、Designated Comparison Methodの略である。ただし、DCMではTGが200 mg/dL以下の検体を使用する。
2. 検体：検体数は少なくとも40検体を必要とし、1週間に1回(約10検体)の測定を4回実施する。原則として新鮮な個人血清を用いる。濃度配分は、20~29 mg/dL, 30~39 mg/dL, 40~49 mg/dL, 50~59 mg/dL, 60~69 mg/dLで、それぞれ少なくとも5検体は含まれるように採血する。

3. 測定：CDCの認証資格をもつCRMLNの基準分析室と試薬メーカーの測定系(試薬+校正用標準物質+分析装置の組み合わせ)の両者で、同じ検体を二重測定する。別に、試薬メーカーの内部精度管理血清による20日間の測定値(n=1)の報告が求められる。
4. NCEPの判定基準：比較検定の結果、①相関係数の二乗が0.975以上、②40 mg/dLと③60 mg/dLでの濃度点での%Bias(正確度)が5%以下、④Average %Bias(正確度)と⑤Average Absolute %Bias(正確度)が5%以下、⑥Among-run CV(精密度)が4%以下、⑦Biasのt検定が $\alpha=5\%$ 水準で有意差なし、⑧Within-method outliersは1個まで可、⑨Between-method outliersが確認されないこと、以上の9条件が満たされる必要がある。
5. 認証書：CDCが2年間有効の認証書を交付し、認証の事実はCDCのホームページに掲載される。CDC/CRMLNによる認証は、米国内で試薬を発売するために必要とされるFDAの認可条件の一つとされる。

○ 認証試験の結果をどのように解釈するか？

トレーサビリティーからみたとき、CDCとCRMLNの基準分析法で形成された正確度は、試薬と校正用標準物質を介して、臨床検査室に伝達される。川の流れにたとえれば、CDCとCRMLNが上流に、試薬メーカーが中流に、臨床検査室は下流に位置する。それぞれの流域に位置する側に求められる測定精度を川幅にたとえれば、上流側ほど厳しい。ちなみに、CRMLNの基準分析室に求められるHDL-Cの判定基準は、正確度がBiasで1 mg/dL以下、精密度が標準偏差で1 mg/dL以下であるから、試薬メーカーよりも3~4倍は厳しい。ところが、NCEPの判定基準では、試薬メーカーも臨床検査室も求められる測定精度は同じであり^{6)~8)}、これは不合理である。今回のメタボリック健診対策では、NCEPの求める判定基準よりも厳しく、正確度を示す最終のAverage %Biasが目標値の±1%以内に収まるようにと

HDL を分析する 1. 臨床検査における HDL コレステロールとは？

メックス(株)（旧、国際試薬(株)）によって試薬・校正用標準物質(キャリブレーター)・検量線確認用物質・精度管理用物質が市販されている。今や、直接法の試薬は、LDL-Cを含め、わが国の独壇場である。

HDL-Cの直接法の試薬が世界ではじめて登場したのは、1994年に発売された国際試薬(当時)の4試薬系であった。1995年、熊本大学(当時)のSugiuchiら⁵⁾が世界ではじめてHDL-Cの直接法による試薬の開発の可能性を示す実験結果をClinical Chemistryに論文発表した。その発表を待つ間も惜しく、1994年12月に協和メデックス(株)が発売した2試薬系が市場に出るや、たちまちの内に世界中に波及し、沈殿分離法はあっという間に過去のものになった。その後、各試薬メーカーは、それぞれに特徴的な測定原理を背景にした完全自動化法の2試薬系を次々と市場に送り出し、少しづつ改良が加えられて今日に及んでいる。試薬の開発から製品化に至る10年間を、筆者は「第一ステージ」とよんでいる。

○ CDC/CRMLNによる認証試験(標準化)の概略

試薬メーカーを対象としたCDC/CRMLNのHDL-Cの標準化プロトコル(HDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers, November 2002)による実施概要(<http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.htm>)を記す。

1. 目標値を確定する比較対照法(DCM)：検体をデキストラノ硫酸-Mg法で分離し、上清中のHDL-CをAbell-Kendall法で定量して目標値とする。DCMは、Designated Comparison Methodの略である。ただし、DCMではTGが200 mg/dL以下の検体を使用する。
2. 検体：検体数は少なくとも40検体を必要とし、1週間に1回(約10検体)の測定を4回実施する。原則として新鮮な個人血清を用いる。濃度配分は、20~29 mg/dL, 30~39 mg/dL, 40~49 mg/dL, 50~59 mg/dL, 60~69 mg/dLで、それぞれ少なくとも5検体は含まれるように採血する。

3. 測定：CDCの認証資格をもつCRMLNの基準分析室と試薬メーカーの測定系(試薬+校正用標準物質+分析装置の組み合わせ)の両者で、同じ検体を二重測定する。別に、試薬メーカーの内部精度管理血清による20日間の測定値(n=1)の報告が求められる。
4. NCEPの判定基準：比較検定の結果、①相関係数の二乗が0.975以上、②40 mg/dLと③60 mg/dLでの濃度点での%Bias(正確度)が5%以下、④Average %Bias(正確度)と⑤Average Absolute %Bias(正確度)が5%以下、⑥Among-run CV(精密度)が4%以下、⑦Biasのt検定が $\alpha=5\%$ 水準で有意差なし、⑧Within-method outliersは1個まで可、⑨Between-method outliersが確認されないこと、以上の9条件が満たされる必要がある。
5. 認証書：CDCが2年間有効の認証書を交付し、認証の事実はCDCのホームページに掲載される。CDC/CRMLNによる認証は、米国内で試薬を発売するために必要とされるFDAの認可条件の一つとされる。

○ 認証試験の結果をどのように解釈するか？

トレーサビリティーからみたとき、CDCとCRMLNの基準分析法で形成された正確度は、試薬と校正用標準物質を介して、臨床検査室に伝達される。川の流れにたとえれば、CDCとCRMLNが上流に、試薬メーカーが中流に、臨床検査室は下流に位置する。それぞれの流域に位置する側に求められる測定精度を川幅にたとえれば、上流側ほど厳しい。ちなみに、CRMLNの基準分析室に求められるHDL-Cの判定基準は、正確度がBiasで1 mg/dL以下、精密度が標準偏差で1 mg/dL以下であるから、試薬メーカーよりも3~4倍は厳しい。ところが、NCEPの判定基準では、試薬メーカーも臨床検査室も求められる測定精度は同じであり^{6)~8)}、これは不合理である。今回のメタボリック健診対策では、NCEPの求める判定基準よりも厳しく、正確度を示す最終のAverage %Biasが目標値の±1%以内に収まるようにと

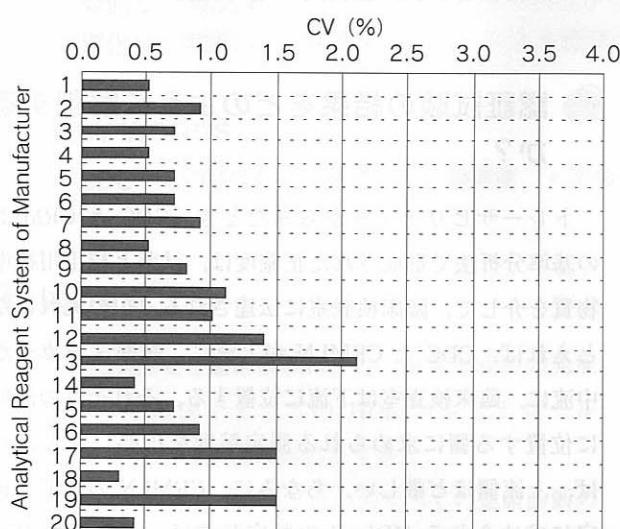
の条件を試薬メーカーに通告して実施した。すでに各社とも標準化を何回も受けているので、この条件は達成可能であろうと考えた⁹⁾。

今回の認証試験では、全 7 社が参加し、計 50 検体が 6 回に分けて測定された。7 社の測定系は計 20 システムに達した。その結果、全システムが判定基準を満たした。システム別に精密度 (CV) と正確度 (Average %Bias) を図①に示す。図①は、どのシステムでも判定基準を満たしていることを示す。メタボリック健診のプログラムによれば、「標準物質を用いれば、同一の健診者は、どの健診施設で検査をしても同じ測定値が得られる」と記されている。どのようなエビデンスをもとにこのような理念が掲げられたのか理解に苦しむが、果たして達成可能であろうか？著者の回答は、懷疑的である^{10)~12)}。

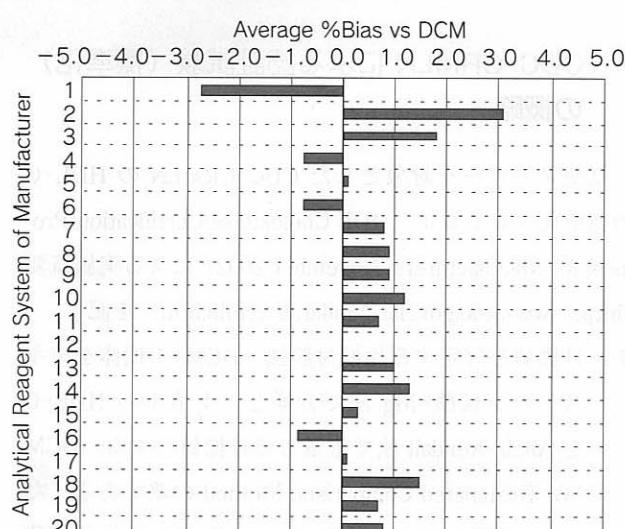
その第一の理由は、検体はおもに試薬メーカーの職員を対象として採取されたことにより、全 50 検体のおよ

そ 80% は電気泳動的にみたときに健常であり、残りの 20% の検体も著しいリポ蛋白異常症例といえるほどの病的検体ではなかった。この傾向は、過去 5 回の認証試験の結果とも矛盾しない。このことは健常者を対象とすれば、標準化は可能であることを示している。

システム別にみた場合、全システムの何% が正確度の判定基準に入ったのかを示す比率を表①に示した。それによれば、HDL-C では、±1% 以内では 70.0%，±2% 以内では 90.0% であった。筆者らの期待は、中流域に位置する試薬メーカーの達成率は、±1% 以内で少なくとも 80%，±2% 以内では 100% であるべきと考える。このような達成率を設けないと、下流域の臨床検査室の正確度を、HDL-C の許容限界である目標値の±5% 以内に制御することはほとんど絶望的になるからである。表①は、HDL-C のみならず、他の脂質 3 項目においても達成率は期待よりも低いことを示す。以上が、第二の理由である。



図① システム別の HDL コレステロールの精密度 (CV) と正確度 (Average %Bias)



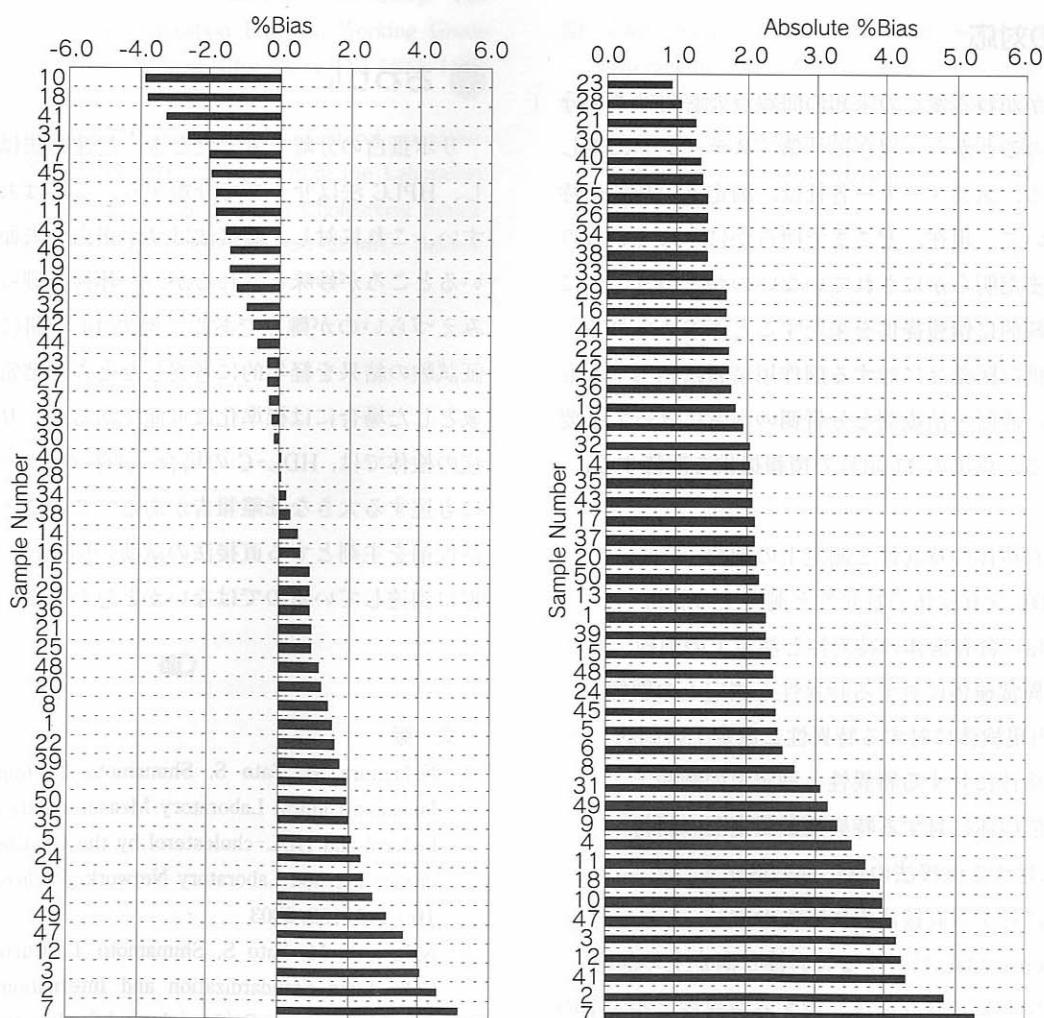
表① システム別にみた場合、全システムの何% が正確度の判定基準に入ったのか？

項目	システム数	±1% 以内	±2% 以内	±3% 以内	±4% 以内	±5% 以内	±5% 以上	許容限界
TC	20	50.0%	95.0%			100.0%		±3% 以内
HDL-C	20	70.0%	90.0%	95.0%	100.0%			±5% 以内
LDL-C	21	23.8%	81.0%	95.2%			100.0%	±4% 以内
TG	9	22.2%	44.4%	55.6%	66.7%	100.0%		±5% 以内

HDL を分析する 1. 臨床検査における HDL コレステロールとは？

IFCC の勧める標準化システムでは、標準物質を通じて HDL-C の正確度を確保しようと試みる。このシステムでは、基準分析法が適用されるのは標準物質のみであって、患者検体が直接、基準分析法で測定されることはない。この点において、患者検体の目標値を確定して評価する CDC 方式とは異なる。IFCC 方式の特徴は、簡単な図式をすべての検査項目に当てはめようとする点で簡潔であるから、臨床検査室が自ら単独で実施できる。目的とする検査項目が水溶性の低分子物質で、分子量が既定であれば可能であろう。たとえば、グルコースであれば、標準化は IFCC 方式で可能となろう。しかしながら、HDL や LDL は、本来脂溶性の複雑な組成を持つ高

分子物質で、分子量が不定で、経時変化を受けやすく、標準物質のロットが変わればマトリックスも変わる。ここに、グルコースなどとは違って、標準物質を通じてリポ蛋白を定量することの難しさが存在する。図②は、検体別の %Bias と Absolute %Bias の大きさを示した。左図は相対的な %Bias を示しているが、一番上の検体 10 番はどの試薬メーカーの測定系でも目標値よりも低く測定され、逆に一番下の検体 7 番は目標値よりも高く測定される傾向のある検体が存在することを示す。右図は絶対値としての Absolute %Bias を示しているが、検体によってことごとくバイアスの出方が異なることを示す。検体が持つマトリックス¹³⁾の違いと各社の試薬の特異



図② 検体別の HDL コレステロールの正確度 (%Bias と Absolute %Bias)

性・反応性の違いが加わって、バイアスの大きさの違いになって現れる。すなわち、どの検体も、患者が違えば顔も違うように、同じバイアスを持つ検体は存在しない。これが、懐疑的とする第三の理由である。仮に、素晴らしい標準物質が出来たとしよう。その場合、患者検体と標準物質のマトリックスが偶然にせよ一致すれば、標準物質を介して患者の HDL-C は正確に測定されるであろう。しかし、その発生確率はきわめて小さい。これが、HDL-C や LDL-C の標準物質の製造を躊躇する理由である。この実態を前にしたとき、IFCC 方式で果たして「同一の健診者は、どこの健診施設で検査をしても同じ測定値が得られる」と期待できるだろうか?

○ 今後の対応

直接法にかかる多くの未知の問題点の解明は不十分である。このことから、現在は「第二ステージ」に差しかかっている。試薬メーカー各社は、測定上の制約や特質などについて、現在、どこまで明らかにされているのか、どこがまだ明らかにされていないのかということに関して、継続的に情報提供を果たすことが求められる。この情報提供は医薬品に対する副作用情報に相当するものであって、診断・治療側と分析側の両者にとって必要な情報である。以下の 11 項目の情報提供を期待する。

1. IDL 含有検体の特異性と測定上の制約
2. β -VLDL 含有検体の特異性と測定上の制約
3. 高 Lp (a) 含有検体の特異性と測定上の制約
4. 肝機能異常検体に対する特異性と測定上の制約
5. Lp-X 出現検体に対する特異性と測定上の制約
6. 高 TG 検体に対する特異性と測定上の制約
7. 高 ApoE 検体に対する特異性と測定上の制約
8. LDL に対する直接法の反応性の機序
9. VLDL に対する直接法の反応性の機序
10. small dense LDL に対する特異性と測定上の制約
11. 高ガムマグロブリン検体に対する特異性と測定上の制約

以上に述べた問題点を解決するための一つの手段として、直接法に関する日米共同実験計画 (US-Japan cooperative evaluation of current generations of homogeneous methods for measuring HDL and LDL cholesterol) が現在、米国で進捗中である。米国側からは CDC, NIH, Virginia Commonwealth 大学 (VCU) 等が参加し、日本側からは櫻林 (前自治医大教授), 中嶋 (Tufts 大学客員教授), および、著者の 3 人が参画している。約 60% はリポ蛋白異常症例の患者血清を含め、総数で 150~200 の個人検体を採取し、わが国から提供された 7 社の試薬と校正用標準物質を使い、専用の分析装置により VCU で測定される。本計画は 2008 年 11 月に終了し、結果は論文化される。

○ おわりに

リポ蛋白の分離を考えたとき、超遠心法は比重で分類し、HPLC 法はサイズで分類する。これは大変わかりやすい。これに対し、直接法はリポ蛋白の表面に依存しているところが妙味とされるが、一体何を測っているのかみえづらいのが難点である。過去 14 年間に実施した認証試験の結果を経年的に考察したとき、健常者検体を対象とした場合には標準化は可能であるが、リポ蛋白異常症の検体では、HDL-C の場合、試薬メーカー間で 800% にも達する大きな乖離報告がある。このことから、界面活性剤を主剤とする直接法の試薬の開発は、そろそろ限界に到達しているのではないかと思われる。

文 献

- 1) Nakamura M, Sato S, Shimamoto T : Improvement in Japanese Clinical Laboratory Measurements of Total Cholesterol and HDL-cholesterol by the US Cholesterol Reference Method Laboratory Network. *J Atheroscler Thromb* 10 : 145-153, 2003
- 2) Nakamura M, Sato S, Shimamoto T : Current Status of CDC Lipid Standardization and International Needs for Standardization in Epidemiological Studies and Clinical Trials. *Cardiovasc Diagn Ther* 2008 ; 28 : 10-14.

HDL を分析する 1. 臨床検査における HDL コレステロールとは？

- als in Japan. *J Atheroscler Thromb* **11** : 35, 2004
- 3) Kimberly M, Leary E, Cole T et al : Selection, validation, standardization, and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the Cholesterol Reference Method Laboratory Network. *Clin Chem* **45** : 1803-12, 1999
 - 4) Nakamura M, Sato S, Shimamoto T : Establishment of external quality control program for hs-CRP and three-year follow-up of the performance for precision and accuracy. *J Atheroscler Thromb* **14** : 287-293, 2007
 - 5) Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H et al : Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene-glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem* **41** : 717-713, 1995
 - 6) Warnick GR, Wood PD : National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol : executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. *Clin Chem* **41** : 1427-1433, 1995
 - 7) Recommendations for improving cholesterol measurement, executive summary : a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. (NIH Publication No : 90-2964A). Bethesda, MD : National Institutes of Health, February 1990
 - 8) NCCLS : Method comparison and bias estimation using patient samples ; approved guideline. NCCLS document EP9-A (ISBN 1-56238-283-7). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 USA, 1995
 - 9) Nakamura M, Kayamori Y, Sato S et al : 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, New York, 2006, pp.75-146
 - 10) Annual report on the external quality assessment of clinical laboratory by JMA, Japan Medical Association, 2006
 - 11) Myers GL, Schap FD, Smith SJ : CAP-CDC collaborative study for evaluating reference materials for total serum cholesterol measurements. *Arch Pathol Lab Med* **114** : 1199-205, 1990
 - 12) CAP Surveys 2007, Participant Summary, Chemistry/ Therapeutic Drug Monitoring
 - 13) Eckfeldt JH, Copelan KR : Accuracy Verification and Identification of Matrix Effects. The College of American Pathologists' Protocol. *Arch Pathol Lab Med* **117** : 381-386, 1993