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**

# Phase-2

#

 2018年07月

US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network(CRMLN)

国立循環器病研究センター 予防健診部 脂質基準分析室

国立循環器病研究**センターによるトリグリセライド(中性脂肪)の標準化プログラム(Phase-2)**

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　 　　　　 2018.07

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　国立循環器病研究センター 予防健診部 脂質基準分析室

この説明書は、WHOの協力センターである米国のCDC(Centers for Disease Control and Prevention)と世界9ヶ国の9施設（2018年07月現在）の脂質基準分析室で構成されるCRMLN（US Cholesterol Reference Method Laboratory Network）に参加している国立循環器病研究センターが、独自に開発した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です。このプログラムは、ヒトの新鮮な非凍結の個人血清を検体として、標準化の基本6原則（①基準分析法による目標値の確立、②標準物質の存在、③標準化プログラムの運用、④検体として新鮮血清を使用、⑤測定成績解析ソフトの運用、⑥判定基準の適用）に従い、「正確度」のトレーサビリティを実行する点に重点を置いた標準化システムです。Phase-1は総コレステロール(TC)を、Phase-2はHDLコレステロール(HDL-C)とLDLコレステロール(LDL-C)とトリグリセライド(中性脂肪, TG)を対象とした臨床検査室向けのミニサイズ版、Phase-3は試薬メーカーを対象としたフルサイズ版です。原則として、Phase-1を通じて総コレステロールの標準化を達成していることが、Phase-2に進む為の前提条件となります。技術料は有料となりますが、外国を含め、どの臨床検査室も年中いつでもご利用頂けます。

【**CDC**/**CRMLN**による脂質標準化プログラムの構造】



下表に続く

 (注) NIST: National Institute of Standards and Technology SRM: Standard Reference Material NCEP: National Cholesterol Education Program

 DCM: Designated Comparison Method (比較対照法)　 BQ: Beta-Quantification(LDL-Cの基準分析法) 質量分析計: GC-IDMS

1. 米国のCDC(Centers for Disease Control and Prevention)は、1980年以来、WHO(世界保健機構)の脂質標準化に

おける協力センター(WHO Collaborating Center for Reference and Research in Blood Lipids)として承認されています。下図の左はCDC、右は国立循環器病研究センターの建物です。



1. CRMLN (US Cholesterol Reference Method Laboratory Network)は、米国から1施設と米国外から8施設の計9施設の脂質基準分析室で構成される国際標準化のネットワークです(2018年07月現在)。国立循環器病研究センターは1992年07月以来、CRMLNの正式メンバーとして登録 (http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.html)されており、現在、世界中の臨床検査室と試薬メーカーに対し、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(中性脂肪)の認証資格を保有しています。

 米国グループ: University of Washington, WA, USA

 外国グループ: Erasmus MC, The Netherlands (オランダ)

 National Cerebral and Cardiovascular Center, Japan (日本、国立循環器病研究ｾﾝﾀｰ)

 CEQAL Inc., Canada (カナダ)

 H.S. Raffaele, Italy (イタリア)

 Fundacion Bioquimica Argentina, Argentina (アルゼンチン)

 Beijing Institute of Geriatrics, China (中国)

 CDC Korea, Korea (South) (韓国)

Laboratoire national de métrologie et d’essais (LNE), France (フランス)

3. トレーサビリティ[Traceability追跡可能性]: 標準化とは、トレーサビリティを実行することです。日本臨床化 学会の標準品情報専門委員会による標準化に関する用語（Ver.2.4）の規定によれば、トレーサビリティとは「測定体系の上でより高い正確さに下位から次々と合わせることができること」と定義されます。ここに、「より高い正確さ」とは、CDCのトリグリセライド(中性脂肪)の実用的基準分析法(二次標準)である質量分析計(GC-IDMS)法を、「下位」とはトリグリセライド(中性脂肪)の日常分析法(酵素法)を意味します。すなわち、日常分析法を標準化することによって、国立循環器病研究センターの質量分析計(二次標準)を経由して、CDCの実用的基準分析法(二次標準)やNISTの絶対基準分析法(一次標準)まで、その正確性を系統的に追跡(トレース)することが可能になります。NISTもCDCも国立循環器病研究センターも共に質量分析計を装備しておりますが、CDCと国立循環器病研究センターは臨床的な実用性に重きを置く点からいずれも二次標準として、一方、NISTは理論的な厳密性に重きを置く点から一次標準として、それぞれ役割分担をしております。HDLコレステロールとLDLコレステロールには一次標準としての絶対基準分析法は、まだ確立されておりません。

4. 標準化の実施に当たりましては、基本となる６原則（①基準分析法、②標準物質、③標準化プログラム、④新　鮮血清、⑤解析ソフト、⑥判定基準）が必要とされます。下表のように標準化と臨床検査精度管理調査(サーベイ)を相互比較しますと、両者の違いが明瞭になります。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  比較項目 | 標準化(Standardization) | 臨床検査精度管理調査(サーベイ) |
| 1. 基準分析法
 | あり | なし |
| ② 標準物質 | あり | なし |
| 1. 標準化プログラム
 | あり | なし |
| 1. 試料
 | 新鮮血清 | 製造血清(新鮮血清もあり) |
| 1. 解析ソフト
 | あり | なし |
| 1. 判定基準
 | あり | なし |
| (7) 　目標値  | あり | サーベイ参加者の合意値 |
| (8) 　対象項目 | 限定的(数項目) | 全般的(多項目) |

5. 標準化は、日常分析室における測定値の「正確さ」に重点を置いた外部精度管理法の一つです。標準化では基準分析法による目標値と日常分析法で得られた測定値の平均値との差がバイアスとして「絶対評価」することが出来るのに対し、臨床検査精度管理調査(サーベイ)では全参加施設の中での相対的な位置づけを「A,B,C,D」や「○△×」等で評価される「相対評価」に止まります。標準化の成果は、単に検査室内の品質管理に役立つのみならず、認証書は国際的な効力を持ちますので、国際共同研究・臨床試験・疫学研究・研究班活動・学会発表・論文投稿などに活用することが出来るというメリットがあります。今日、Evidence-Based Medicineの必要性が強調されていますが、標準化の成果はEvidenceそのものに相当します。

6. 申込み方法: トリグリセライド(中性脂肪)の標準化(Phase-2)の申込書は、このプログラムの7頁にあります。必要事項を記入の上、電子メール（CDC\_hyojunka@ncvc.go.jp）に添付してお送りください。年中いつでも予約なしでお申込みいただけます。また従来通り、FAX(06-6833-5300)でのお申込みも可能です。

7. 基準分析法: CDCとCRMLNにおけるトリグリセライド(中性脂肪)の基準分析法は、ガスクロマトグラフィー/質量分析計法（GC-IDMS法）です。質量分析計によるトリグリセライドの測定は、内部標準に安定同位体（1,3-13C2-Glycerol）を用いた同位体希釈法により行います。新鮮血清中のトリグリセライドをKOH性のアルコールで加水分解し、生成したグリセロールをアシル化後、酢酸エチルエステルで抽出後、アシル化した試料を質量分析計に注入し、得られたトリアセチンのフラグメントピーク（m/z = 116, m/z = 118）の面積比より作成した検量線（標準物質はトリパルミチン[NIST SRM1595]を使用、トリオレイン換算値として表現）から、試料中の総グリセロール値(Total glycerides)を求めます。一方、試料中の遊離グリセロールの測定は、KOH性のアルコールによる加水分解操作を省略した方法で求めます。日本では、臨床検査室で使われている酵素法によるトリグリセライドの測定値は、総グリセロール値(Total glycerides)から遊離グリセロール値(Free glycerol)を差し引いた実質値(Net triglycerides)として表現され、臨床の場で利用されています。しかしながら、欧米諸国ではトリグリセライドの測定値は、遊離グリセロールを含めた総グリセロール値(Total glycerides)として表現され利用されています。

8. CRMLNを構成する脂質基準分析室に対するCDCの評価基準は、トリグリセライドの場合、正確度が%バイアスで±2.5%以内、精密度はCVで2.5%以下とされます。国立循環器病研究センターは、1992年07月以降今日まで継続してCDCの評価基準を満たし、その結果としてトリグリセライドの認証資格を保有しております。

9. 標準物質と管理血清: 質量分析計法(GC-IDMS法)で使用されるグリセロールの標準物質は、米国のNISTのSRM 1595が使用されています。CDCとCRMLNで使用されている複数濃度の管理血清は、人の新鮮血清を基に作成されたものです。ネットワーク(CRMLN)内では国際間で厳格な品質管理が行われていますので、CRMLNの標準化を受けて判定基準を満たした施設間では、国際的な互換性が保証され、測定成績の相互比較が可能となります。

10. 臨床検査室を対象とした脂質標準化プログラム(Phase-2): トリグリセライド(中性脂肪)の標準化プログラムは、国立循環器病研究センターで開発されました。このプログラムは、国立循環器病研究センターの予防健診部のHPで検索できます。

11. 標準化用の血清: 標準化を希望される検査室で、次のような4濃度の新鮮血清を準備して下さい。

　 　濃度域1⇒100 mg/dL以下の濃度域で、1濃度（種類）の新鮮血清①を準備して下さい。　※

　　　濃度域2⇒100～150 mg/dLの濃度域で、1濃度（種類）の新鮮血清②を準備して下さい。　※

 濃度域3⇒150～200 mg/dLの濃度域で、1濃度（種類）の新鮮血清③を準備して下さい。　※

　　　濃度域 4⇒200 mg/dL以上の濃度域で、1濃度（種類）の新鮮血清④を準備して下さい。　※

　 ※ 濃度域の1～4で準備する血清の本数は自己分析用として1本（１測定日分）、国立循環器病研究センター

　　　用として1本必要です。

　　　　　　　　　　　　 100　　　　　　　　 　150 　200

 [濃度域1]　 mg/dL　 [濃度域2]　　 mg/dL [濃度域3] mg/dL [濃度域4]

 　　 ↑　　　　　　　　 　　↑　　　 　 　　　　　 ↑ 　　 　　　　　｜

 　　①　　　　　　 　　　　②　　　　　　 　　　　③ 　　　　 ④

　(注1)　標準化ではマトリックスによる影響(Matrix Effects)を出来るだけ小さくする為に、リポ蛋白変性の少ないヒトの新鮮な非凍結の個人血清を使用することを、原則としています。やむを得ず血清をプールする場合は、2～3人までとして下さい。

　(注2)　コレステロールやトリグリセライド(中性脂肪)やリン脂質の測定では検体の凍結保存は問題ないとされます。しかし、HDLやLDLの測定では、血清を凍結したり、凍結乾燥することによって、リポ蛋白の構造変成があるとされます。これを避けるために、新鮮な非凍結の個人血清を使うことを原則としています。

 (注 3) 市販品の多くは人工的に合成された血清です。このような合成血清はヒトの個人の新鮮血清と比べてリポ蛋白の組成・構造・物理化学的特性などのプロファイリングが異なることにより、試薬との反応性に違いが発生するとされます。その結果、新鮮な個人血清とは違った測定値が得られる危険性が指摘されております。また、凍結保存しておいた前回と同じ血清を再使用することもお勧めできません。これらを使用した場合は、確実に失格となりますので、ご注意下さい。

12. 血清量: 標準化を希望される日常分析室で必要となる血清量は、自動分析装置によっても異なりますが、 一般的には１本につき約0.5~0.8 mLが適当と思われます。国立循環器病研究センターの脂質基準分析室に発送する血清量は、質量分析計で測定しますので、1検体につき最低1.5 mL、必要となります。

13. 日常分析室における検体の測定方法：分析は4濃度の血清を採取した当日中に、１検体につき日常分析法でアトランダムに4重測定して下さい。測定結果は、12頁の記入例にならってResults Form for Triglycerides(10頁)に記入し、測定結果を電子メール(CDC\_hyojunka@ncvc.go.jp)或いはFax(06-6833-5300)でご報告下さい。

14. ご参考までに、日本動脈硬化学会による動脈硬化性疾患予防ガイドライン2017年版から、脂質異常症: スクリーニングのための診断基準(空腹時採血)を引用しました。標準化では、この診断基準値をカバーするように、検体を採取することが望まれます。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 高LDLコレステロール血症 | LDLコレステロール | ≧140 mg/dL |
| 低HDLコレステロール血症 | HDLコレステロール | ＜40 mg/dL |
| 高トリグリセライド血症 | トリグリセライド | ≧150 mg/dL |
| 高nonHDLコレステロール血症 | 総コレステロールHDLコレステロール | ≧220 mg/dL＜40 mg/dL |

15. 測定成績解析ソフト: トリグリセライド(中性脂肪)値の解析ソフトは、国立循環器病研究センターで考案されました。ソフト名は、Triglycerides Analysis Software(May, 2012)です。

16. 測定条件等につきましては、11頁の記入例にならって、9頁のInformation Form for Triglyceridesに記入して下さい。出来る限り英文で正確にお書き下さい。英文の表記方法が判らない場合は、和文で結構です。その際、試薬等の使用説明書に記載されている名称を、そのままフルネームで記入して下さい。

17. 4濃度の血清、標準化参加分析室情報(8頁)、Information Form for Triglycerides(9頁)の準備が出来ましたら、国立循環器病研究センターまでお送り下さい。検体は凍結していただいて結構です。国立循環器病研究センターは土曜と日曜の両日が公休日ですので、この日の大阪着荷にならないように発送日にはご注意下さい。検体測定が済みましたら、Results Form for Triglycerides(10頁)を電子メール(CDC\_hyojunka@ncvc.go.jp)或いはFax(06-6833-5300)でご報告下さい。なお、標準化参加分析室情報 (8頁)、Information Form for HDL-Cholesterol (9頁)も合わせて電子メール(CDC\_hyojunka@ncvc.go.jp)でお送り頂いでも結構です。

18. トリグリセライド(中性脂肪)の測定精度に関する判定基準は、米国のNCEP(National Cholesterol Education Program)の判定基準を適用しています。このような判定基準は、わが国には存在しません。NCEPの目標は、正確度が基準分析法による目標値の±5％以内、精密度は変動係数(CV)で5％以下とされています。ご参考までに、NCEPが提案している脂質4項目の判定基準(Clinical Chemistry,Vol.41, No.10, 1995の1416頁)を、ここに引用しました。この判定基準は、臨床検査室と試薬メーカーの両者に共通して適用されます。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 測定項目 | 正確度(Goal for bias) | 精密度(Goal for CVw) | 総合誤差(Goal for total error) |
| Cholesterol |  ±3%以内 |  3%以下 |  8.9%以下 |
| HDL-cholesterol |  ±5%以内 |  4%以下 |  13%以下 |
| LDL-cholesterol |  ±4%以内 |  4%以下 |  12%以下 |
| TG |  ±5%以内 |  5%以下 |  15%以下 |

　　　(注) CVw: within-run CV

19. 項目19.の判定基準が満たされた場合、国立循環器病研究センターから認証書が発行されます。トリグリセライド(中性脂肪)の認証書の有効期限は１年間です。認証書は、データー解析結果と請求書と一緒に、検体受付後、出来る限り速やかにお返し致します。臨床検査室を対象としたHDLコレステロールやLDLコレステロールやトリグリセライド(中性脂肪)の標準化では、CDCは直接、認証書の発行はしておりません。

20. Phase-1を通じて総コレステロールの標準化を達成していることが、原則として、Phase-2のHDLコレステロールやLDLコレステロールやトリグリセライド(中性脂肪)の脂質標準化プログラムに参加する為の前提条件になります。

21. CDCとCRMLNによる脂質標準化のご案内は、CDCのHP (<http://www.cdc.gov/labstandards/crmln.htm>l)、あるいは、国立循環器病研究センター 予防健診部のHPを通じて、ご覧頂けます。

22. 技術料: 標準化では、基準分析法を運用して正確な目標値を提供いたしますので、有料になります。詳しくは、この説明書の1頁の表(CDC/CRMLNによる脂質標準化プログラムの構造)をご覧下さい。トリグリセライドの技術料は、32,000円となります。

23. 技術料請求の根拠: 脂質標準化の国際ネットワーク（CRMLN）では、基準分析法の運用による目標値の確定に関する経費として、検体1件につき、総コレステロールで50＄、HDLコレステロールで60＄、LDLコレステロールで70＄、トリグリセライド(中性脂肪)で80$の請求が出来ると規定されています。

24. 基準分析法の更新：従来、CDCとCRMLNで使用していたTGの基準分析法は、化学反応生成物を分光光度計で比色定量する化学的分析法（クロモトロプ酸法）でしたが、猛毒の試薬を使うなど問題点も多くあることから、CDCはコレステロールに先駆けて2012年にTGの基準分析法をアイソトープ希釈/ガスクロマトグラフ/質量分析計法(GC-IDMS法に切り替えました。CDCはTotal glyceridesのみの測定ですが、当分析室では、Free glycerolも同様にGC-IDMS法で測定し、日本で主に測定され臨床に利用されているNet-TGに対応できる体制を整えております。

25. その他、お判りになり難い点がございましたら、下記まで、Fax、あるいは、Emailでご質問下さい。

　　　　　　 標準化に関するお問い合わせ先

|  |  |
| --- | --- |
| 施設名 | 国立循環器病研究センター 予防健診部 脂質基準分析室 (RI棟、4階）US National Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN) |
| 責任者 | 宮本　恵宏 |
| 住所 | 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1 |
| 電話 | 06-6833-5004(内線 2886) |
| FAX | 06-6833-5300 |
| Email | CDC\_hyojunka@ncvc.go.jp |
| 脂質標準化プログラムの閲覧 | 「国立循環器病研究センター 予防健診部」で検索してください。 |

26.ここにご紹介いたしました4濃度制のトリグリセライドの標準化プログラムとは別に、個別検体中のトリグリセライドの分析をご希望の場合には、CDCに標準化された質量分析装置を用いて濃度(トリオレイン換算値)の確定(Net glycerides値、あるいは、Total glycerides値）が実施できます。ご希望の施設がございましたら、ご連絡下さい。分析に必要となる検体量は、1.5 mLです。検体１本当たりの分析料金は、8,000円となります。

27. 参考文献

　[1] Nakamura M, 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 2015;445:127-132.

 [2] Nakamura M, et al. HDL cholesterol performance using an ultracentrifugation reference measurement procedure and the designated comparison method. Clin Chim Acta 2015;439:185-190.

 [3] Nakamura M, et al. LDL cholesterol performance of beta quantification reference measurement procedure. Clin Chim Acta 2014;431:288-293.

 [4] Nakamura M, et al. Comparison between the triglycerides standardization of routine methods used in Japan and the chromotropic acid reference measurement procedure used by the CDC Lipid Standardization Programme. Ann Clin Biochem 2016; 53(6):632-639.

脂質の国際標準化の申込書

臨床検査室を対象とした標準化プログラム(Phase-1 or Phase-2)に参加を申し込みます。

( 今回の該当項目に 〇 を記入する。 )

Phase-1 : 総コレステロール 　　（　　　　　）

Phase-2 : HDL-コレステロール　（　 　 ） 　LDL-コレステロール　　（　　　　）

トリグリセライド （TG）　（　 　　　）

施設名：

住所：　〒

代表者（技師長）氏名：

担当者氏名：

電話：

Email：

検体発送日：　　　　　　　　　　　　年　　　　　月　　　　　日(　　　)

検体到着予定日：　　　　　　　　　年　　　　　月　　　　　日(　　　)

宅配業者名：

伝票番号：

試料送付先：

国立循環器病研究センター

予防健診部 脂質基準分析室　　　小山　勲　宛て

〒565-8565　大阪府吹田市藤白台5-7-1

Tel： 06-6833-5012　(内線 2886)

FAX: 06-6833-5300

国立循環器病研究センターによるトリグリセライド(中性脂肪)の標準化プログラム(Phase-2)

標準化参加分析室情報（必ずご提出下さい）

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　記入日: 年　　　月　　　日

1．施設名：

　　　　　　　和文

　　　　　　　英文

2.　住所：

　　　　　　　和文　〒

　　　　　　　英文

3.　**Contact Person** (認証書、データー解析結果、請求書等の受取人となります)：

　　　　　　　和文

　　　　　　　英文

　　　　　　　電話：

FAX：

　　　　　　　**Email**：

4.　今回、採取された4濃度の検体について、記入して下さい。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 検体番号 | 採取年月日 | 個人の血清ですか、あるいは、複数の人のプール血清ですか？ |
| 1. |  | 　　　個人血清　　　　　プール血清（　　　　　　人分を混合） |
| 2. |  | 　　　個人血清　　　　　プール血清（　　　　　　人分を混合） |
| 3. |  | 　　　個人血清　　　　　プール血清（　　　　　　人分を混合） |
| 4. |  | 　　　個人血清　　　　　プール血清（　　　　　　人分を混合） |

1. その他: この標準化参加分析室情報に正確に記入して頂きますと、**Information Form for Triglycerides(9頁)**や**Results Form for Triglycerides(10頁)**の該当欄に、同じ内容を再記入する必要はありません。